



# **IZOLOVANJE, SELEKCIJA I ADAPTACIJA ZIMOGENIH MIKROORGANIZAMA- OSNOV USPEŠNE BIOREMEDIJACIJE**

**G.Gojgić-Cvijović<sup>1</sup>, V.P.Beškoski<sup>1</sup>, J.Milić<sup>1</sup>, M.Ilić<sup>1</sup>, T.Šolević<sup>1</sup>, S.Miletić<sup>1</sup>,  
I.Vučković<sup>1</sup>, B.Potkonjak<sup>1</sup>, B.Jovančićević<sup>1,2</sup>, M.Radulović<sup>1</sup>, D.Djordjević<sup>1</sup>,  
D.Jakovljević<sup>1</sup>, O.Martinov<sup>1</sup>, S.Spasić<sup>1</sup>, V.Matić<sup>1</sup>, B.Nastasijević<sup>1,2</sup>, M.M.Vrvić<sup>1-3</sup>**

*<sup>1</sup>Centar za hemiju IHTM, 11001 Beograd, Njegoševa 12, P.f. 473*

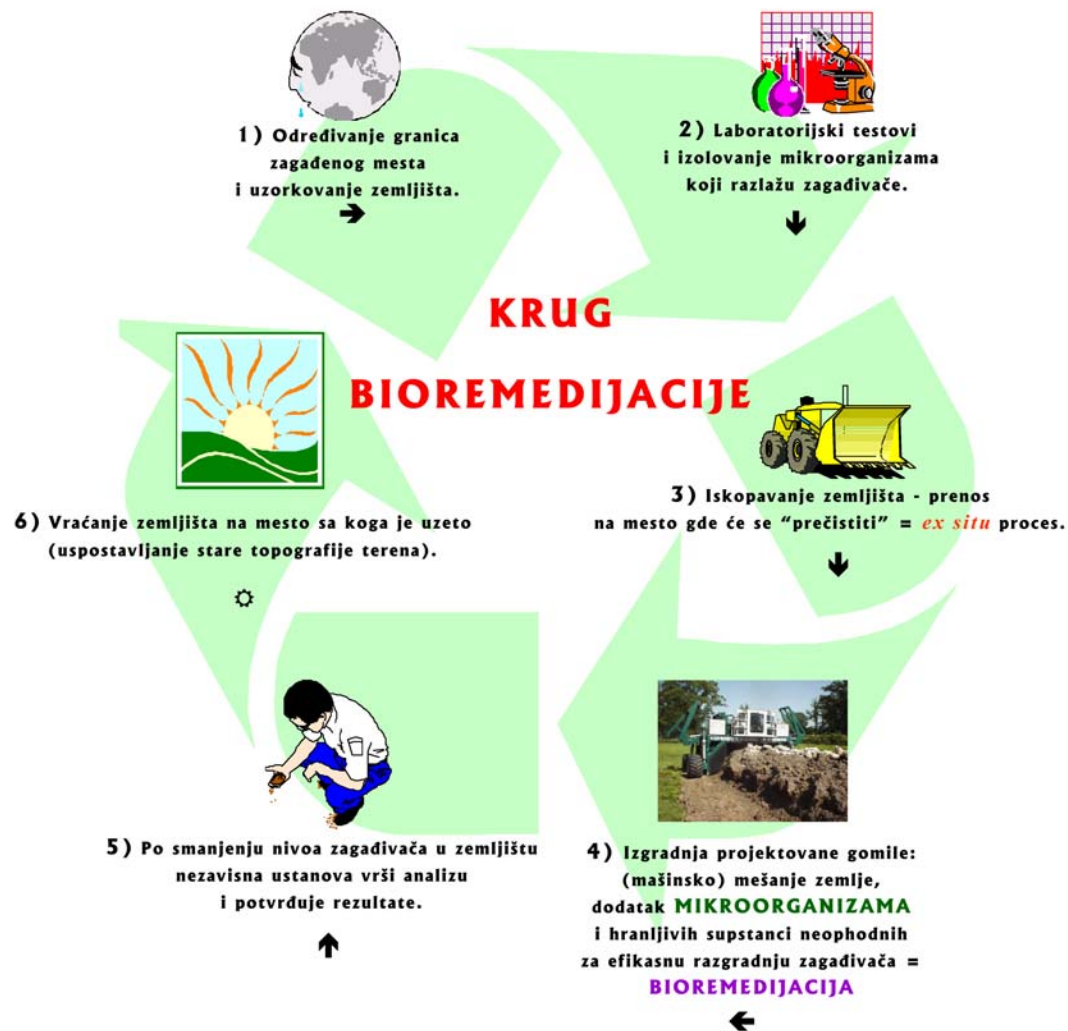
*<sup>2</sup>Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 11001 Beograd, Studentski trg 16, P.f. 158*

*<sup>3</sup>BREM GROUP doo, 11000 Beograd, Njegoševa 12*

**BIOREMEDIJACIJA-BIOLOŠKA  
DEGRADACIJA I DETOKSIKACIJA  
ZEMLJIŠTA, POVRŠINSKIH I PODZEMNIH  
VODA I VAZDUHA OD ŠTETNIH SUPSTANCI,  
KAO ŠTO SU ORGANSKI ZAGADJIVAČI  
(NAFTA I DERIVATI NAFTE, PESTICIDI,  
DETERDŽENTI, POLIMERI, FENOLI,  
ORGANSKI RASTVARAČI,...), VEŠTAČKA  
DJUBRIVA, TEŠKI METALI (NPR. ŽIVA,  
KADMIJUM, OLOVO,...) I DRUGI TOKSIČNI  
ELEMENTI I JEDINJENJA (ARSEN,  
CIJANOVODONIK,...), TOKSIČNI GASOVI  
(RECIMO VODONIK-SULFID) I  
RADIONUKLIDI, NAJČEŠĆE I  
NAJEFIKASNIJE POMOĆU  
MIKROORGANIZAMA!**

# SUŠTINA BIOREMEDIJACIJE





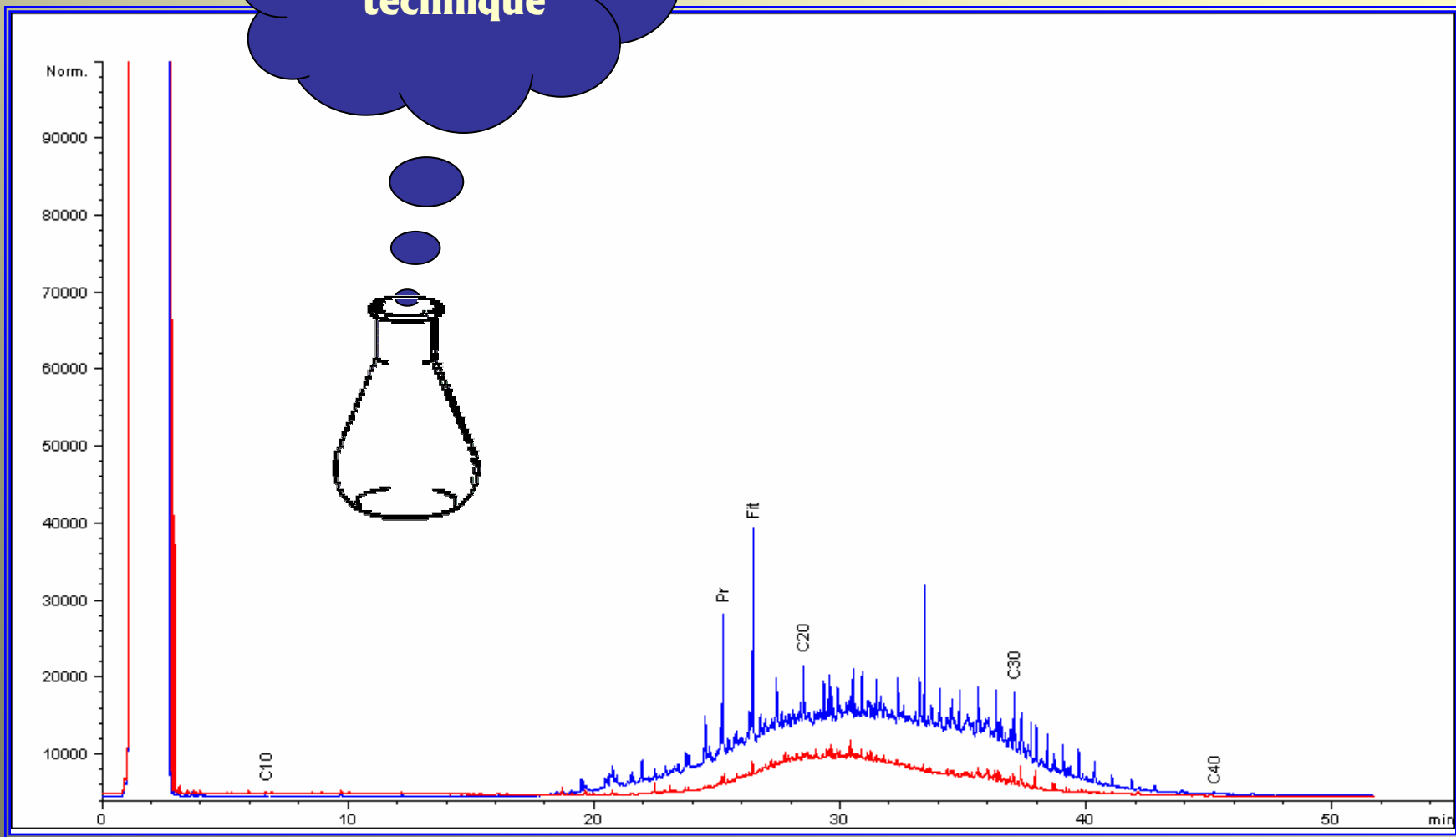
# STANJE "0"

## OSNOVNI POKAZATELJI<sup>a</sup>

FIZIČKI, FIZIČKO-HEMIJSKI I HEMIJSKI POKAZATELJI									BIOGENI ELEMENTI, [%]						
$t_{\text{vaz.}}^a$ [°C]	$t_{\text{halde}}^a$ [°C] <sup>b</sup>	RVK, [L/m <sup>3</sup> ] <sup>c</sup>	Voda na 105°C, [%]	pH	OS <sup>d</sup> , [%]	Pepeo na 800°C [%]	Pepeo na 1200 °C [%]	TPH <sup>e</sup> , [g/kg]	$\Sigma C^f$ , [%]	OC <sup>g</sup> , [%]	NC <sup>h</sup> , [%]	$\Sigma H^i$ , [%]	$\Sigma N^j$ , [%]	$\Sigma S^k$ , [%]	$\Sigma P^l$ , [%]
18,0	53,4	125	21,3	7,9	31,8	68,2	61,4	29,99 ± 1,88	15,87	14,84	1,03	2,36	0,35	0,48	0,20
BIOGENI I NEKI ZNAČAJNI TOKSIČNI METALI, [g/kg]									MIKROBIOLOŠKI PROFIL, [CFU/g]						
Na	K	Mg	Ca	Fe	V	Ni	UBA <sup>m</sup>		ANA <sup>n</sup>		KIP <sup>o</sup>	CEL <sup>p</sup>	RUV <sup>q</sup>		
0,11	0,92	5,43	46,23	9,18	0,072	0,034	1,0x10 <sup>7</sup>		2,9x10 <sup>6</sup>		1,9x10 <sup>4</sup>	7,0x10 <sup>4</sup>	9,3x10 <sup>5</sup>		

<sup>a</sup>Svi rezultati hemijskih i mikrobioloških pokazatelja odnose se na suhu supstancu; <sup>b</sup>Na 30 cm; <sup>c</sup>U uslovima na terenu; <sup>d</sup>Organska supstanca; <sup>e</sup>Total petroleum hydrocarbons-Ukupni ugljovodonici nafte; <sup>f</sup>Ukupni ugljenik; <sup>g</sup>Organski ugljenik; <sup>h</sup>Neorganski (karbonatni) ugljenik; <sup>i</sup>Ukupni vodonik; <sup>j</sup>Ukupni azot; <sup>k</sup>Ukupni sumpor; <sup>l</sup>Ukupni fosfor; <sup>m</sup>Ukupne hemoorganoheterotrofne mezofilne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije; <sup>n</sup>Anaerobi; <sup>o</sup>Kvasci i spore plesni; <sup>p</sup>Celulolitički mikroorganizmi i <sup>q</sup>Mikroorganizmi što razlažu ugljovodonike.

**“Shake flasks test  
technique”**



**Uporedni prikaz gasnih hromatograma TPH na početku i na kraju  
eksperimenta u erlenmajerima uz mućkanje**

# STRUKTURA AKTIVNOG ZIMOGENOG KONZORCIJUMA

REDOVI MIKROORGANIZAMA (MO) I ROD <i>Pseudomonas</i>	PODLOGA	PROSEČNI RED VELIČINE ZASTUPLJENOSTI, [CFU/g SUVE SUPSTANCE]
Prave bakterije	Hranljivi agar	$\sim 10^7$
Gram negativne bakterije	MacConkey agar	$> 10^5$
Anaerobi	Hranljivi agar sa glukozom	$> 10^6$
Aktinomicete	Skrob-kazein agar sa aktidionom	$\sim 10^6$
<i>Pseudomonas</i>	Agar sa Irgasan <sup>®</sup> -om za izolovanje <i>Pseudomonas</i>	$\sim 10^4$
Kvasci i spore plesni	Sladni agar sa streptomycinom	$\sim 10^4$
MO koji razlažu ugljovodonike	Mineralni agar sa dizelom	$> 10^6$
Bakterije koje razlažu ugljovodonike	Mineralni agar sa dizelom i aktidionom	$> 10^6$
Plesni koje razlažu ugljovodonike	Mineralni agar sa dizelom i streptomycinom	$> 10^5$
Ukupni celulolitički MO	Podloga za celulolitičke MO	$\sim 10^6$
Celulolitičke bakterije	Podloga za celulolitičke MO sa aktidionom	$\sim 10^6$
Celulolitičke plesni	Podloga za celulolitičke MO sa streptomycinom	$> 10^5$

# PRIMER SELEKCIJE SOJEVA ZA AKTIVNI KONZORCIJUM

IZVOR UGLJOVODONIKA I DERIVATA KAO JEDINI IZVOR UGLJENIKA	<i>Pseudomonas</i> CH-RNP 1	<i>Pseudomonas</i> CH-RNP 2
Dizel D-2	+ <sup>a,b</sup>	+
TPH ekstrakt	+	-
Parafin	+	+
Heksadekan	+ <sup>b</sup>	+
Dekan	+	- <sup>c</sup>
Heptan	+	+
Heksan	+	+
Cikloheksan	+	+
Benzen	+ <sup>b</sup>	+
Toluen	-	-
Ksilen (smeša izomera)	-	-
Fenantren	-	-
Piren	+	+
CHCl <sub>3</sub>	+	+

<sup>a</sup> Razlaže ugljovodonični supstrat; <sup>b</sup> Zelena pigmentacija kao dokaz visoke aktivnosti i <sup>c</sup> Ne razlaže ugljovodonični supstrat.

Koncentracije ugljovodonika: a) Tečni uzorci-100 µL/10 mL podloge i b) Čvrsti uzorci-5 mg/10 mL podloge.

Provera uspešnosti selekcije: Rast na hranljivom bujonu posle 2 nedelje na mučkalici u epruvetama



# IZGRADNJA HALDE U RNP



Homogenizacija zemlje



Postavljanje cevi  
za aeraciju



Mešanje zemlje pre nanošenja  
na haldu



Nanošenje zemlje



Sistem oluka za sakupljanje  
procedne tečnosti



Konačan izgled halde

# Nota bene: USPEŠNA BIOREMEDIJACIJA!!!



- ▶ IZOLOVANJE, SELEKCIJA I ADAPTACIJA ZIMOGENIH MIKROBA ⇒ AKTIVAN KONZORCIJUM  
(*BIOAUGMENTACIJA*)



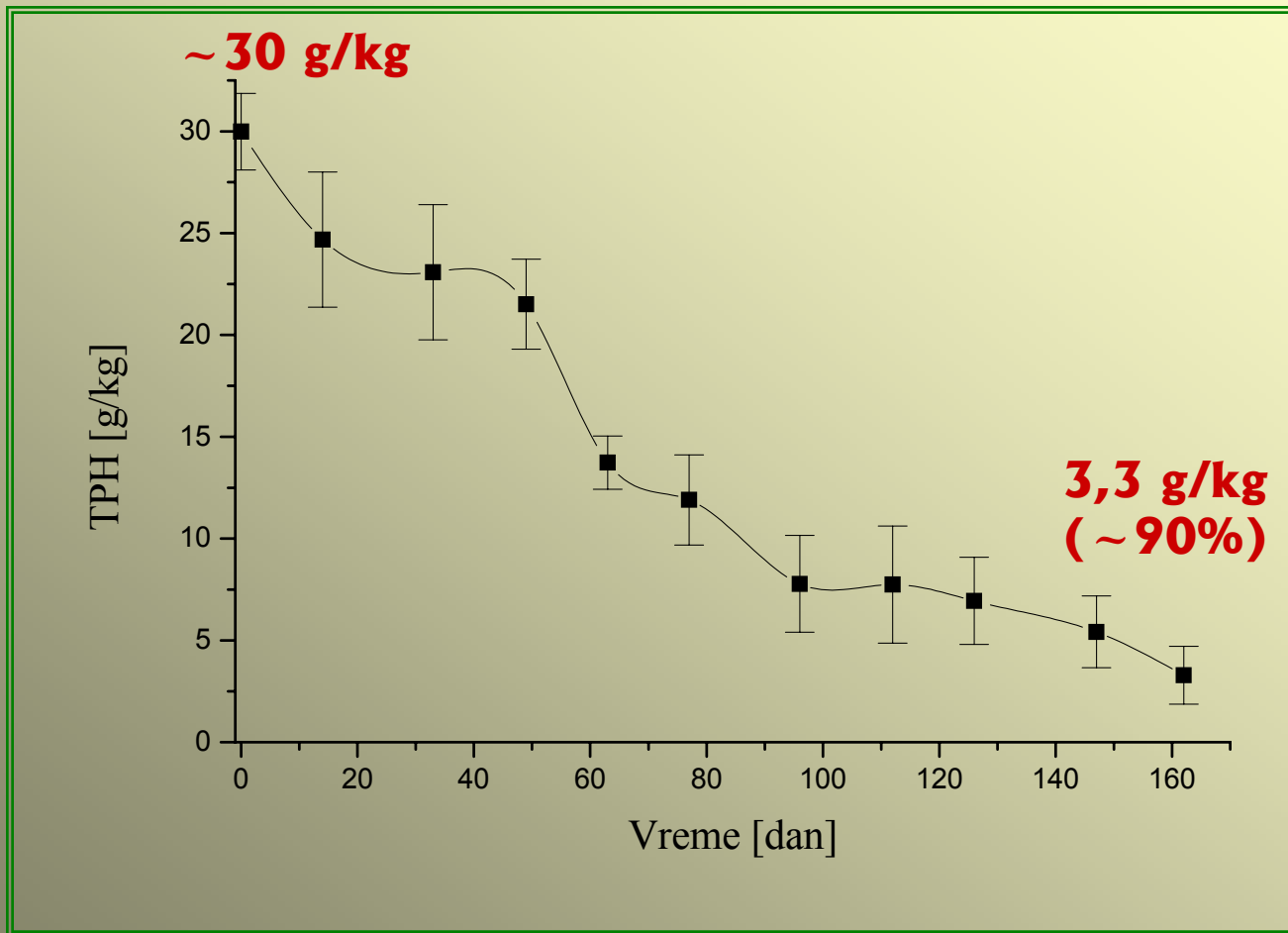
**JOŠ I:**

- ▶ POSTIZANJE ŠTO VEĆEG STEPENA HOMOGENIZACIJE STALNIM MEŠANJEM, ŠTO OBEZBEDJUJE I POTREBNU KOLIČINU MOLEKULSKOG KISEONIKA-AERACIJU  
(*BIOVENTILACIJA*)
- ▶ ODRŽAVANJE OPTIMALNE VLAŽNOSTI I DODAVANJE BIOGENIH ELEMENATA U POTREBNIM KOLIČINAMA, A PRE SVIH AZOTA I FOSFORA  
(*BIOSTIMULACIJA*)



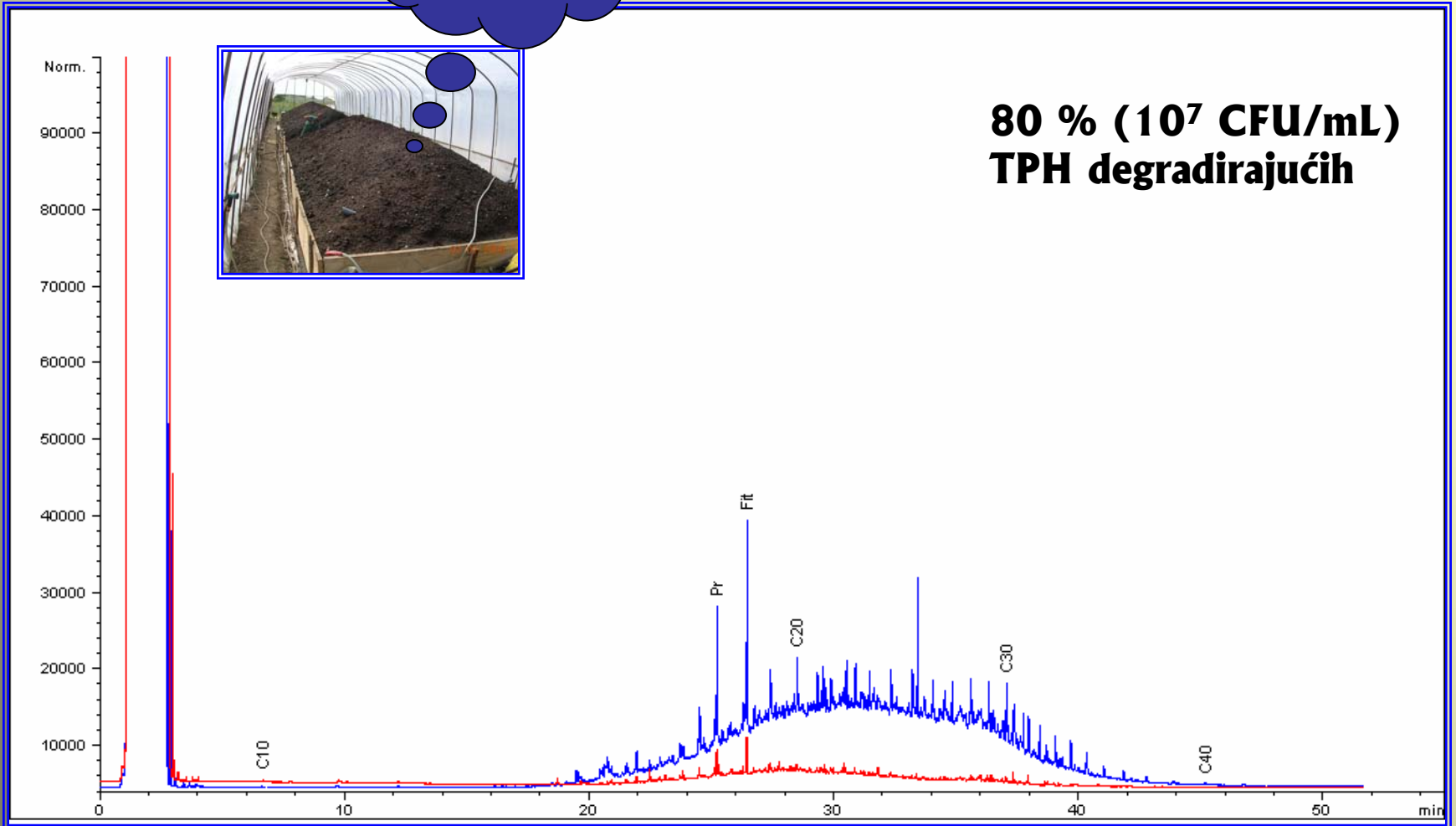
10<sup>13</sup> CFU/mL

12.06.2006



**Grafički prikaz dinamike bioremedijacije u funkciji vremena**

# HALDA



**Uporedni gasni hromatogrami TPH na početku i po završenoj bioremedijaciji na pilot haldi-postrojenju**

# ZAKLJUČCI

- 1. Postupak *ex situ* bioremedijacije zemljišta kontaminiranog visokim koncentracijama nafte i njenim derivatima u industrijskim-realnim razmerama moguće je efikasno realizovati na osnovu laboratorijskih testova.**
- 2. Za uspešnost postupka ključni je pravi izbor konzorcijuma aktivnih zimogenih mikroorganizama, što smo u opisanom pilot postupku bioremedijacije još jedanput dokazali radom sa sopstvenim sojevima mikroorganizama izolovanim, selekcionisanim i adaptiranim iz mikrobiogeocenoze, koja je bila predmet biodegradacije kontaminanata antropogenog porekla.**
- 3. Biostimulacija i bioventilacija, koja u opisanom slučaju nije bila potpuno odgovarajuća, neizostavni su i kompatibilni elementi uspešne bioremedijacije.**
- 4. I naši rezultati potvrđuju da je bioremedijacija bio(geo)tehnološki postupak, kojim se dobija reciklirano zemljište. Dakle, ne dobija se bezopasan otpad koji može da se odloži na deponiju, već zemljište, koje ima upotrebnu vrednost.**

# ZAHVALNOST

Posebnu zahvalnost, pored **Ministarstva nauke i zaštite životne sredine**, koje sa Naftnom industrijom Srbije finansira i podržava aktivnosti bioremedijacije u okviru kompleksnog projekta **TD 7032B**, želimo da izrazimo Rafineriji nafte Pančevo što nam je pružila priliku da demonstriramo bioremedijaciju i pokažemo sve njene prednosti, pošto ova biotehnologija kod nas, nažalost, još nije zaživela. Hoćemo da verujemo i nadamo se da će se to ubrzo desiti!