

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Tanja Jednak Berić

**Bioremedijacija složenih rafinerijskih
supstrata nastalih incidentno ili namernom
destrukcijom instalacija: ispitivanja na model
supstratu**

doktorska disertacija

Beograd, 2024. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Tanja Jednak Berić

**Bioremediation of complex refinery
substrates resulting from accidental or
intentional destruction of installations: a
studies on a model substrate**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentori:

Dr Branimir Jovančičević
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Srđan Miletić
Viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Član komisije:

Dr Goran Roglić
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Mojoj dečici

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju Katedre za biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Tema za rad je predložena od strane dva izuzetna profesora prof. dr Branimira Jovančićevića i prof. dr Miroslava M. Vrvica, koji su posredno i neposredno i rukovodili izradom ove doktorske disertacije.

Prof. dr Branimiru Jovančićeviću zahvaljujem na uvek prijatnom razgovoru i prijatnoj atmosferi kao i na predusretljivosti i velikom entuzijazmu pri izradi ove doktorske disertacije

Mome divnom profesoru, učitelju, prof. dr Miroslavu M. Vrvicu, kome na moju žalost kao i na žalost čitave naučne, akademske javnosti postuhmno izražavam veliku zahvalnost na svemu što me je naučio kako vezano za nauku, tako i za poslovni svet kroz moj rad u BREM GROUP DOO gde je sprovedena i priprema eksperimenta koji je obrađen kroz doktorsku disertaciju.

Dr Srđanu Miletiću divnome mentoru, kolegi i čoveku hvala na svemu što me je naučio i što je na svakome koraku moj vetar u leđa.

Gospodinu Dobrivoju Ćuku i gospodinu Miroslavu Krmpotiću i kolegama iz KVADRIKOMa dugujem neizmerno, veliku zahvalnost jer su bili pre svega puni razumevanja, podrške i zajedničke želje ka mome daljem napredovanju i usavršavanju pružajući bezrezervnu podršku.

Mome suprugu neizmerno hvala što je uvek u tišini verovao u mene, i koji je uvek bio oslonac na ovome putu nauke nedajući da u bilo kom trenutku pokleknem ili odustanem.

Mojoj, dragoj, maloj dečici Nikoli i Lenki hvala što su u svojim malim glavicama imali razumevanja da mama tamo nešto piše, „neku priču“, sa nadom da će im ta napisana „priča“ predstavljati, u budućnosti, vetar u leđa i pokazati da ništa nije nemoguće i da snovi mogu postati stvarnost.

Mojoj divnoj mami HVALA što je omogućila da na putu mojih želja stignem do cilja, i što je uvek bila tu kada je bilo najteže i u tišini nosila svoju brigu i nadanja i želju da od mene sama napravi osobu koja će uvek stremiti ka boljem sutra. Mama, HVALA TI.

Autor

Bioremedijacija složenih rafinerijskih supstrata nastalih incidentno ili namernom destrukcijom instalacija: ispitivanja na model supstratu

Sažetak

Ova studija istražuje bioremedijaciju složenih rafinerijskih supstrata kontaminiranih teškim metalima, prvenstveno kobaltom i molibdenom, koji potiču iz otpadnih katalizatora korišćenih u procesu hidrodesulfurizacije (HDS) nafte. Eksperimentalno su ispitivana tri tipa HDS katalizatora kako bi se utvrdio njihov inhibitorni efekat na rast mikrobnog konzorcijuma, pri čemu nije utvrđen značajan inhibitorni uticaj. Sekvencijalna analiza metala pokazala je da se tokom procesa bioremedijacije smanjuje izmenljiva frakcija metala, uključujući kobalt i molibden, koji su najmobilniji i najpodložniji biološkom usvajanju. Uočeno je i smanjenje frakcija vezanih za karbonate i Fe-Mn okside, dok se rezidualna frakcija, koja sadrži najmanje mobilne metale, povećava. Ovi rezultati ukazuju na promene u mobilnosti i dostupnosti metala pod različitim hemijskim uslovima tokom bioremedijacije. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize pokazale su smanjenje sadržaja organskih supstanci, HES-a i ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH), dok je sadržaj huminskih kiselina značajno povećan, što sugeriše uspešnu bioremedijaciju. Huminske kiseline, kao indikatori degradacije organskih materijala, ukazuju na poboljšanje ekoloških uslova i kvalitet zemljišta. Pored toga, studija sugeriše da je moguće reciklirati otpadne katalizatore hidrometalurškim procesom, čime bi se smanjio ekološki rizik i omogućila održiva reciklaža ovog otpada.

Ključne reči: bioremedijacija metala; rafinerijski supstrati; kobalt; molibden; mikrobn konzorcijum; sekvencijalna analiza metala; katalizatori

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Bioremediation of complex refinery substrates resulting from accidental or intentional destruction of installations: a studies on a model substrate

Abstract

This study investigates the bioremediation of complex refinery substrates contaminated with heavy metals, primarily cobalt and molybdenum, originating from waste catalysts used in the hydrodesulfurization (HDS) process of oil. Three types of HDS catalysts were experimentally examined to determine their inhibitory effect on the growth of a microbial consortium, with no significant inhibitory effect observed. Sequential metal analysis showed that, during the bioremediation process, the exchangeable fraction of metals, including cobalt and molybdenum, which are the most mobile and bioavailable, decreases. A reduction in carbonate- and Fe–Mn oxide-bound fractions was also observed, while the residual fraction, containing the least mobile metals, increased. These results indicate changes in metal mobility and availability under different chemical conditions during bioremediation. Physicochemical and microbiological analyses revealed a reduction in organic substances, hydrocarbons extracted with solvents (HES), and total petroleum hydrocarbons (TPH), while the content of humic acids significantly increased, suggesting successful bioremediation. Humic acids, as indicators of organic material degradation, point to improvements in ecological conditions and soil quality. Additionally, the study suggests that it is possible to recycle waste catalysts through a hydrometallurgical process, which could reduce environmental risks and enable sustainable recycling of this waste.

Keywords: bioremediation of metals; refinery substrates; cobalt; molybdenum; microbial consortium; sequential metal analysis; catalysts

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Sadržaj

1.	Uvod	4
2.	Pregled literature	6
2.1.	Kontaminacija životne sredine od strane naftne industrije	7
2.2.	Kratak prikaz prerade nafte. Proces hidrodesulfurizacije (HDS)	9
2.3.	Tretman otpada	13
2.3.1.	Fizičke i hemijske tehnike remedijacije	16
2.3.2.	Metode solidifikacije i stabilizacije	17
2.3.3.	Termalni tretman	18
2.3.4.	Biosorpcija	18
2.4.	Bioremedijacija	18
2.4.1.	Mikrobna bioremedijacija	20
2.4.1.1.	Tretman otpada aerobnim mikroorganizmima	21
2.4.1.2.	Tretman čvrstog otpada aerobnim mikroorganizmima	21
2.4.1.3.	Aerobni tretman tečnog otpada	22
2.4.1.4.	Aerobni tretman gasovitih otpada	22
2.4.1.5.	Anaerobni tretman otpada	22
2.4.1.6.	In-situ bioremedijacija	22
2.4.1.7.	Ex-situ bioremedijacija	23
2.4.1.8.	Mobilizacija i imobilizacija	24
2.4.1.9.	Ubrzavanje bioremedijacije	25
2.4.1.10.	Biomonitoring bioremedijacije	27
2.4.2.	Fitoremedijacija	28
2.4.3.	Zooremedijacija	29
2.5.	Zagađenje životne sredine različitim zagađivačima – toksični efekti na čoveka	31
2.5.1.	Zagađenje životne sredine naftnim zagađivačima	31
2.5.2.	Zagađenje životne sredine PAH-ovima	32
2.5.3.	Zagađenje životne sredine teškim metalima	36
2.6.	Bioremedijacija životne sredine zagađene naftom i derivatima nafte	40
2.7.	Toksični efekat teških metala na mikrobne ćelije	44
2.8.	Mikroorganizmi koji učestvuju u bioremedijaciji	45
2.9.	Bioremedijacija životne sredine zagađene teškim metalima	49
2.10.	Faktori koji utiču na bioremedijaciju	55
2.10.1.	Hemijski faktori	55
2.10.1.1.	Bioraspoloživost zagađivača	55
2.10.1.2.	Biorazgradljivost zagađivača	55
2.10.2.	Faktori životne sredine	56
2.10.2.1.	Temperatura	56

2.10.2.2.	pH.....	56
2.10.2.3.	Hranljive materije.....	57
2.10.2.4.	Sadržaj vlage i dostupnost vode.....	57
2.10.3.	Populacija mikroorganizama u bioremedijaciji.....	58
3.	Materijal i metode.....	59
3.1.	Ispitivanje inhibitornog efekta HDS katalizatora na mikroorganizme.....	60
3.1.1.	Uzorci katalizatora za HDS.....	60
3.1.2.	Konzorcijum mikroorganizama.....	60
3.1.3.	Analitičke metode.....	61
3.1.3.1.	Analiza osnovnih hemijskih parametara.....	61
3.1.3.2.	Određivanje metala (Fe, Mo, Co, Ni i W) u katalizatorima.....	61
3.1.3.3.	Analiza rendgenske difrakcije (XRD, X-ray).....	62
3.1.3.4.	Ekstrakcija rastvorenih frakcija metala.....	62
3.1.3.5.	Ispitivanje inhibitornog efekta metala na konzorcijum mikroorganizama.....	62
3.2.	Bioremedijacija složenog rafinerijskog supstrata.....	63
3.2.1.	Model supstrat – smeša polutanata.....	63
3.2.2.	Dizajn eksperimenta.....	63
3.2.3.	Priprema biomase zimogenog konzorcijuma mikroorganizama.....	64
3.2.4.	Uzorci za analizu.....	64
3.2.5.	Osnovne mikrobiološke analize.....	64
3.2.5.1.	Određivanje broja mikroorganizama.....	64
3.2.5.2.	Priprema mikrobioloških podloga.....	65
3.2.5.3.	Identifikacija mikroorganizama API testovima.....	66
3.2.6.	Osnovne hemijske i fizičko-hemijske analize.....	66
3.2.7.	Praćenje naftnih frakcija.....	67
3.2.8.	Određivanje kobalta i molibdena.....	68
3.2.8.1.	Određivanje ukupnog sadržaja metala korišćenjem optičkog emisionog spektrometra sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).....	68
3.2.8.2.	Sekvencijalna ekstrakcija kobalta i molibdena.....	69
3.2.8.3.	Ekstrakcija metala Mehlich-ovim postupkom.....	69
3.2.8.4.	Luženje kobalta i molibdena.....	69
3.2.9.	Određivanje faznog sastava uzoraka pomoću X-ray difrakcije.....	69
3.2.10.	Statističke metode obrade rezultata.....	70
4.	Rezultati.....	71
4.1.	Rezultati ispitivanja inhibitornog efekta metala na mikroorganizme.....	72
4.1.1.	Osnovni hemijski parametri i sadržaj metala u katalizatorima.....	72
4.1.2.	Rezultati XRD-a katalizatora.....	74
4.1.3.	Rezultati ispitivanja inhibitornog efekta HDS katalizatora na konzorcijum mikroorganizama.....	76

4.2.	Rezultati bioremedijacije složenog rafinerijskog supstrata	78
4.2.1.	Osnovne mikrobiološke analize.....	78
4.2.2.	Osnovne hemijske i fizičko-hemijske analize.....	79
4.2.3.	Određivanje kobalta i molibdena.....	81
4.2.4.	Rezultati analize rendgenskom difrakcijom	83
5.	Diskusija	86
6.	Zaključci	89
7.	Literatura	91
	Biografija.....	105
	Objavljeni radovi u sklopu doktorske disertacije	106
	Изјава о ауторству	107
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	108
	Изјава о коришћењу	109

1. UVOD

Danas su mnogi industrijski sektori važni za razvoj ekonomije jedne zemlje. Ali, na različite načine ti industrijski sektori mogu da dovedu do zagađenosti životne sredine generisanjem industrijskog otpada. Kontaminacija zemljišta, podzemnih voda, sedimenata, površinskih voda i vazduha sa opasnim otpadom kao što je nafta i nusprodukti koji nastaju tokom prerade nafte, predstavljaju veliki problem sa kojim se svet danas suočava.

Proizvodi bazirani na nafti su glavni izvor energije za industriju i svakodnevni život. Curenje i akcidentno izlivanje se najčešće javlja u toku istraživanja, proizvodnje i prerade, transporta i skladištenja nafte i naftnih derivata. Procenjena količina iscurele nafte, na godišnjem nivou, je oko 600.000 tona godišnje. Oslobađanje ugljovodonika u okolinu bilo da je slučajno ili rezultat ljudske aktivnosti je glavni uzrok zagađivanja vode i zemljišta. Zagađenje zemljišta ugljovodonicima izaziva veliku štetu sistema pri akumulaciji zagađujućih materija kod životinja i biljnog tkiva i može se završiti letalno ili dovesti do mutacija.

Ispitivanja bazirana na kontaminaciji životne sredine uz ispitivanja uticaja različitih kontaminanata na biljni, životinjski svet i na ljudski organizam došla su do rezultata koji ukazuju na to da su dva najveća zagađivača životne sredine teški metali i organski zagađivači obzirom na njihovu sveprisutnost u ekosistemu što uključuje zemljište i otpadne vode. Sa razvojem tehnologija naročito ekoloških, mnoge metode koje se upotrebljavaju pokazuju efikasnost u određenoj meri za ove tipove zagađivača.

Postoji nekoliko tehnika za uklanjanje teških metala iz životne sredine uključujući hemijsku precipitaciju, oksidaciju i redukciju, filtraciju, reverznu osmozu, membransku tehnologiju, evaporaciju i elektrohemijski tretman. Ali, većina ovih tehnika je neefikasna kada su koncentracije teških metala manje od 100 mg/L. Većina soli teških metala je rastvorna u vodi i otpadnoj vodi, što znači da ne mogu biti odvojeni fizičko separacionim metodama. Osim toga, fizičko-hemijske metode su neefikasne i skupe kada je koncentracija teških metala veoma niska. Biološke metode kao što je biosorpcija i/ili bioakumulacija za uklanjanje teških metala predstavlja zamenu za fizičko-hemijske metode. Upotreba mikroorganizama u remedijacijone svrhe, predstavlja moguće rešenje za zagađenje teškim metalima, jer podrazumeva održivost remedijacionih tehnologija da bi se uspostavilo ponovno prirodno stanje zemljišta. Teški metali u mikrobiološkim ćelijama uzrokuju inhibiciju bitnih funkcionalnih grupa, zamenjuju esencijalne metalne jone ili dovode do modifikacije konformacije aktivnih bioloških molekula. Odgovor mikrobiološke zajednice na teške metale zavisi od koncentracije i dostupnosti teških metala i kompleksan je proces koji je kontrolisan od strane više faktora, kao što su tip metala, priroda medijuma i mikroba vrsta.

Metode biološke remedijacije zasnovane na mogućnostima remedijacije na mestu nastanka zagađenja sa izraženim ekonomskim prednostima bez stvaranja sekundarne kontaminacije predstavljaju metode izbora za sanaciju zagađenja izazvanog organskim kontaminantima ili teškim metalima.

Cilj ovog rada je bio da se ispita da li dolazi do promene formi metala, koji predstavljaju katalizatore u procesu desulfurizacije nafte, tokom procesa bioremedijacije.

Pored navedenog rađena su i osnovna fizičko-hemijska i mikrobiološka ispitivanja, zemljišta kontaminiranog naftom i katalizatorima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Kontaminacija životne sredine od strane naftne industrije

Nafta se se u modernom društvu naziva „crno zlato“ ili „ekonomska krv“. Predstavljajući izvor važne energije, obim primene nafte se znatno širi, što rezultuje povećanjem potrošnje. Zbog ograničenosti procesa tehnologije pri eksploataciji, preradi, skladištenju, upotrebi nafte kao i u procesu tehnologije prerade otpadnih voda, gde kao rezultat prerade nastaje otpad koji sadrži naftne materije koje se ispuštaju u zemljište, što je u velikoj meri praćeno problemom zagađenja životne sredine koji postaje sve ozbiljniji, narušavajući ceo ekosistem zemljišta i površinskih i podzemnih voda. (Hu 2020)

Tokom prve polovine dvadesetog veka naftna industrija je doživela svoju ekspanziju ostavljajući mogućnost stalnog isticanja nafte u životnu sredinu. Prirodno curenje nafte ili curenje iz bunara koji se koriste za pumpanje nafte ne predstavljaju nužno veliki problem jer dolazi do njihovog slabljenja što smanjuje štetu po ekosistem. Slabljenje iscurele nafte stimuliše autohtone mikrobe na razgradnju, uz promovisanje tehnologije bioremedijacije, bez dodavanja konzorcijuma mikroorganizama. Ovaj fenomen je karakterističan i za druga jedinjenja kao što je slučaj sa polihlorovani bifenili i ugljovodonici. Ovo samo ukazuje na činjenicu da mikroorganizmi imaju sposobnost adaptacije na novonastale uslove istovremeno razgrađujući dati zagađivač. Međutim, prethodno se odnosi na istraživanja i studije koje se odnose na kratkoročne slučajeve (npr. oštećenje naftovoda ili izlivanje), ali mali broj je sprovedenih istraživanja na učestala tj. hronična curenja i njihov uticaj na mikrobnu populaciju. (Cébron et al. 2022) Istraživanja koja se odnose na kontaminirano zemljište naftom u sredinama gde dolazi do naftne eksploatacije su se uglavnom zasnivala na izolovanju mikroba sposobnih da razgradnju, u cilju primene u bioremedijaciji. (Spini et al. 2018)

Na osnovu dosadašnjih istraživanja procenjeno je da na različite načine, na svetskom godišnjem nivou, oko 100 milijardi kg nafte i naftnih derivata uđe u podzemne vode, površinske vode i zemljište (na primer procenjuje se da se u Kini u podzemne vode izlije oko 600 miliona kilograma godišnje). Jedan od primera visokog sadržaja sirove nafte u zemljištu od čak 10.000 mg/kg što predstavlja 20 puta veću vrednost od kritične vrednosti koja iznosi 500 mg/kg predstavlja oblast naftnog polja u Kini koja se zove LiaoHe. (Hu 2020)

Otpad koji se generiše iz petrohemijske industrije ima ozbiljan uticaj na životnu sredinu. Potrošni naftni katalizatori predstavljaju glavni čvrst otpad iz petrohemijske industrije. (Bosio et al. 2008)

Značaj razumevanja ponašanja naftnih zagađivača u životnoj sredini i štetnosti koji prouzrokuju u zemljištu predstavlja veliki teorijski značaj za prevenciju i kontrolu naftnih zagađivača. (Hu 2020) Povećanje svesti i donošenje propisa o životnoj sredini naročito su usmereni na smanjenje nivoa zagađivača u komercijalnim gorivima gde je najveći fokus na nižim nivoima sadržaja sumpora (S), azota (N) i metala, posebno nikla (Ni) i vanadijuma (V). (Trejo et al. 2008)

Obzirom da rafinerije predstavljaju ključni i najbitniji deo naftne industrije čiji kapacitet na svetskom nivou, u 2020. godini, iznosi 101,2 miliona barela opravdana je pretpostavka da rafinerije predstavljaju glavni izvor zagađenja životne sredine i na taj način predstavljajući veliki izazov na globalnom nivou. Životna sredina usled svakodnevne izloženosti otpadu na bazi ugljovodonika naftnog porekla koji je namerno, slučajno ili akcidento pušten, zakopan ili eventualno iscureo iz postrojenja trpi velike posledice u vidu zagađenja zemljišta, emisije zagađivača) i hemikalija (policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), toluen, fenol, teški metali (npr. olovo, cink, kadmijum, bakar) u atmosferu, podzemne vode ili zemljište.

Rafinerijski vazduh je bogat oksidima azota (NO_x) i sumpora (SO_x). Tako, npr. sumpor dioksid (SO₂) predstavlja gas koji u znatnoj meri dovodi do zagađenja životne sredine jer sa padavinom, vlagom i povećanom temperaturom dolazi do povećanja količine rastvorljivog SO₂ i njegove akumulacije u okolnom rafinerijskom zemljištu (Tabela 2.1 i Tabela 2.2). (Al-Rubaye et al. 2023)

Tabela 2.1 Najvažnije emisije iz rafinerija nafte i njihovi izvori

Emisija	Izvori
CO _x	<ul style="list-style-type: none"> • Rafinerijske peći • parni kotlovi i proizvodnja električne energije • aktivacija katalizatora u jedinicama za fluidno katalitičko krekingovanje (FCC) <ul style="list-style-type: none"> • sistem plamena
SO _x	<ul style="list-style-type: none"> • Refining furnaces • parni kotlovi i proizvodnja električne energije • aktivacija katalizatora u FCC jedinicama <ul style="list-style-type: none"> • sistem plamena • jedinica za odsumporavanje
NO _x	<ul style="list-style-type: none"> • Refining furnaces • parni kotlovi i proizvodnja električne energije • aktivacija katalizatora u FCC jedinicama <ul style="list-style-type: none"> • sistem plamena
Isparljiva organska jedinjenja (VOC)	<ul style="list-style-type: none"> • skladištenje i transport sirove nafte i hemikalija <ul style="list-style-type: none"> • tretman opasnih voda • ventilacija posuda radi smanjenja pritiska <ul style="list-style-type: none"> • curenje ugljovodonika iz opreme
Čestice suspendovane u vazduhu (PM)	<ul style="list-style-type: none"> • Refining furnaces • parni kotlovi i proizvodnja električne energije • aktivacija katalizatora u FCC jedinicama <ul style="list-style-type: none"> • gorenje gasova u sistemu plamena

Adaptirano iz Al-Rubaye i saradnici (Al-Rubaye et al. 2023)

Tabela 2.2 Prosečna stopa najvažnijih emisija iz rafinerija nafte

Emisija	Tone/milion tona rafinisane nafte
CO ₂	25000 – 40000
NO _x	90 – 450
PM	60 – 150
SO _x	60 – 300
VOC	120 – 300

Adaptirano iz Al-Rubaye i saradnici (Al-Rubaye et al. 2023)

2.2. Kratak prikaz prerade nafte. Proces hidrodesulfurizacije (HDS)

Sirova nafta je prirodna mešavina ugljovodonika u tečnom stanju, što uključuje jedinjenja sumpora (S), azota (N), kiseonika (O), raznih metala metala i drugih neorganskih supstanci, kao i vodu. Sastav nafte može varirati tako da u procesu prerade nafte mogu nastati različiti proizvodi kao rezultat varijacija samog sastava nafte gde sa hemijskog aspekta ona predstavlja vrlo složenu mešavinu jedinjenja ugljovodonika, gde su manje količine onih jedinjenja koja u svome sastavu imaju već pomenute elemente, a može biti prisutna i voda. Kao rezultat varijacija u sastavu nafte u procesu rafiniranja nastaje širok spektar proizvoda koji se razlikuju po sastavu. (H. Al-Dahhan and MA Mahmood 2019)

U svome sastavu nafta sadrži toksične elemente koji obuhvataju vanadijum, sumpor koji sagoreva dajući sumpor – dioksid koji dovodi do zagađenosti vazduha. U nafti kao fosilnom gorivu koje sadrži različita organska jedinjenja gde se smatra da taj broj podrazumeva na stotine različitih organskih jedinjenja čiji sastav dosta varira npr. takav je slučaj sa sumporom čija koncentracija varira od 0, 04 do 8 %. (Jednak Berić et al. 2023)

Nafta nosi naziv i *kameno ulje* zbog toga što se u sedimentnim stenama javlja u različitim agregatnim stanjima bilo da je u gasovitom, tečnom stanju ili kao polučvrsta ili čvrsta materija. Iz navedenog se zaključuje da je nafta po hemijskom sastavu vrlo složena mešavina jedinjenja ugljovodonika sa manjim primesama jedinjenja koja sadrže azot, kiseonik, sumpor kao i male količine jedinjenja koja u svome sastavu imaju metale. Energenti koji se dobijaju preradom nafte čine više od polovine ukupne svetske ponude što se tiče energije tako da se može reći da nafta kao sirovina ima centralnu odnosno najvažniju ulogu za funkcionisanje današnje, moderne industije. (H. Al-Dahhan and MA Mahmood 2019)

Sa pronalaskom motora sa unutrašnjim sagorevanjem, početkom dvadesetog veka, porasla je upotreba nafte. U drugoj polovini dvadesetog veka organska geohemija je dala nova i potkrepljena saznanja i samim tim naftna istraživanja su postala perspektivna, gde su organske geohemijske metode doprinele pronalascima novih, do tada neistraženih naftnih depozita što je uključivalo i biološke markere. (Jovancicevic et al. 2022)

Najvažniji i najčešći ugljovodonici u sirovoj nafti su ravni i razgranati alkani (nazvani parafini), cikloalkani (nafteni), aromatični ugljovodonici i najsloženije hemijske supstance, kao što su sastojci asfalta, čija je molekulska težina 800-2500. Ugljovodonici imaju opseg od (15-60%) za parafine, (30-60%) za naftene, (3-30%) za arome, a ostatak je asfalt. (H. Al-Dahhan and MA Mahmood 2019)

Elementarne analize su pokazale da su glavne komponente nafte ugljenik i vodonik sa manjim količinama sumpora (0,1–8% v/v), azota (0,1– 1,0% v/v), i kiseonik (0,1–3% v/v), i elementi u tragovima koji su prisutni u promilima (ppm) kao što su vanadijum, nikl, gvožđe i bakar. Od

ne-ugljovodoničnih heteroelemenata najviše je prisutan sumpor dok azot i metali u tragovima imaju štetne efekte. (El-Naggar et al. 2014)

Posmatrano sa fundamentalnog aspekta nafta je jedan od oblika postojanja organske supstance, u geosferi. Ono što je izdvaja od ostalih organskih supstanci je značaj u pogledu komercijalnog aspekta kada se poredi sa drugim jedinjenjima i predstavlja sa ugljem i prirodnim gasom najvažniji prirodni resurs. (Milicevic et al. 2017)

U cilju zaštite životne sredine rafinerije treba znatno da smanje koncentracije zagađivača kao što je sumpor koji je prisutan u frakcijama nafte, naročito u benzinu i srednjem destilatu. (Trejo et al. 2008)

Nafta se nakon vađenja iz morskih naftnih platformi doprema do obale. Tako dobijena sirova nafta nema direktnu upotrebnu vrednost, već se podleže rafinerijskim procesima. U procesima rafinacije dobijaju se benzin, ulje, vosak, dizel, kerozin, katran, asfalt, tečni naftni gas. (Sayed et al. 2021)

Poboljšanje kvaliteta dizel goriva se postiže zahvaljujući posebno konstruisanim postrojenjima za hidrodesulfurizaciju (HDS). (Petrova et al. 2022) Hidrodesulfurizacija je proces koji se najčešće koristi u naftnoj industiji sa ciljem smanjenja količine sumpora u naftnim proizvodima. (Kadhun and Albayati 2022) Sam proces odvijanja hidrodesulfurizacije se vrši na katalizatorima koji su različitog svojsta i sastava a samim tim i čvrstoće. Smatra se da aluminijum-kobalt-molibden katalizatori i slični njima imaju najveću primenu u procesu hidrodesulfurizacije na industrijskom nivou. (Petrova et al. 2022) Ovaj tip katalizatora je bifunkcionalan što podrazumeva njegovu primenu i u hidrogenizaciji i u procesu hidrotretmana. (Jednak Berić et al. 2024)

Sa aspekta nauke i prakse ovi katalizatori su detaljno proučeni sa posebnom pažnjom na strukturne karakteristike aktivnih centara sa osvrtom na hemijski sastav, strukturu, aktivnost i stanje samih katalizatora (prirode katalizatora, puta sinteze, koncentracije aktivne supstance), koncentracije sumpornih jedinjenja, reakcionih uslova (parcijalni pritisak H_2S i vodonika, temperatura ...). (Kadhun and Albayati 2022; Petrova et al. 2022)

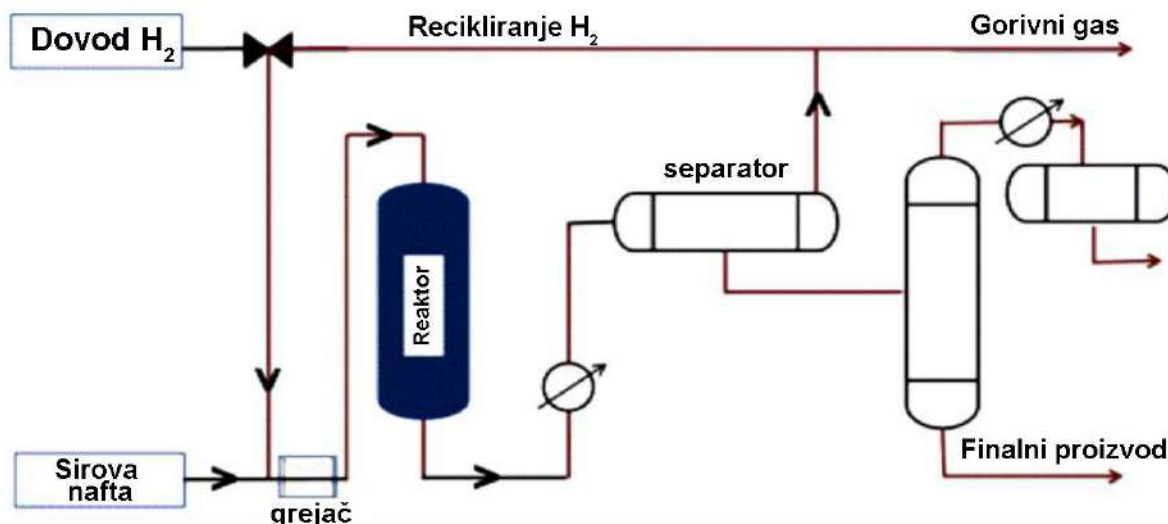
Za ispitivanje efekta strukture CoMoS nanoklastera na reakcionu aktivnost ispitivane su Mo-edge (Mo-E), Co-mixed Mo-edge (Mo-Ks), Co-edge (Co-E) i ugao (Corner) lokacije. Uočene su disocijacije vodonika praćene sa endo/egzotermnim efektom i različitim aktivacionim energijama što je doprinelo identifikaciji Mo-S veza koje mogu da budu kratke ili dugačke. Nanoklasteri Co-Mo-S stvaraju koordinaciono nezasićene centre koji pokazuju visoku aktivnost u hidrogenolizi CS veza. Tiofen koji se nalazi u centru uglova se odsumporava i proizvode se 2-buten molekuli selektivnosti 95%. Na temperaturama koje su visoke u centru rešetke katalizovana je sinteza butadiena selektivnosti koja iznosi do 70%. (Petrova et al. 2022)

Proizvodnja različitih goriva, iz sirove nafte, podrazumeva reakcije redukcije prisutnog sumpora u skladu je sa zakonskom regulativom i zakonima EU. Jedan od primera je koncentracija sumpora koja je ograničena 0,05 %, u gorivima, koja se proizvode i koriste u zemljama Evropske unije i njenih članica. (Jednak Berić et al. 2023)

Proces izdvajanja sumpora odnosno ekstrakcija sastoji se iz dva ključna koraka i to od hidrodesulfurizacije (HDS) i od Clausovog procesa koji podrazumeva reakcije oksidacije vodonik-sulfida gde nastaje sumpor-dioksid i redukuje se u sumpor. (Jednak Berić et al. 2023)

U napunjeni reaktor, u kome se nalazi sloj katalizatora koji je fiksni dovodi se sirova nafta zajedno sa vodonikom (Slika 2.1) pri čemu se organska jedinjenja sumpora pretvaraju u H_2S u

prisustvu H₂ iz reaktanata katalizatora koji imaju metalne komponente u prisustvu visokog pritiska i temperature. Ova metoda predstavlja dinamičan proces, zasnovan na velikoj potrošnji materijala i na visokoj ceni proizvodnje. Povećanje snabdevanja rafinerije sirovom naftom usled prisustva velike količine sumpora dovodi do smanjenja životnog veka katalizatora.



Slika 2.1 Proces hidrodesulfurizacije
Adaptirano iz Kadhum i Albayati (Kadhum and Albayati 2022)

U tabeli je naveden mehanizam hidrogenolize i hidrogenacije tiofenskih jedinjenja, za HDS (Tabela 2.3)

Tabela 2.3 Hidrotretmanski putevi organskih sumpornih jedinjenja

Tipovi organskih sumpornih jedinjenja	Mehanizam reakcije hidrotretiranja
R-SH merkaptani	$R-SH + H_2 \rightarrow R-H + H_2S$
R ₁ -S-R ₂ sulfidi	$R_1-S-R_2 + 2H_2 \rightarrow R_1-H + R_2-H + H_2S$
R ₁ -S-S-R ₂ disulfidi	$R_1-S-S-R_2 + 3H_2 \rightarrow R_1-H + R_2-H + 2H_2S$
Tiofeni	$C_4H_4S + 4H_2 \rightarrow C_4H_{10} + H_2S$

Adaptirano iz Kadhum i Albayati (Kadhum and Albayati 2022)

U procesu hidrogenacije prsten je zasićen i dolazi do uklanjanja atoma sumpora. (Kadhum and Albayati 2022) Ovako dobijen elementarni sumpor ima veliku primenu, i samo tokom 2005 godine kada je proizvodnja sirove nafte bila približno 5 miliona barela dnevno, dobijeno je oko 64 miliona tona sumpora. (Jednak Berić et al. 2023) Oba procesa se mogu odvijati u isto vreme pri čemu se na katalizatoru, mogu koristiti aktivna mesta koja su odvojena i koja se nalaze na površini katalizatora čija selektivnost zavisi od strukture jedinjenja sumpora i katalizatora koji se koristi.

Npr. Ni-Mo/Al₂O₃ katalizator se karakteriše visokom aktivnošću hidrogenizacije, a katalizator Co-Mo/Al₂O₃ hidrogenolizom. Reaktivnost jedinjenja sumpora u HDS-u je: tiofen > alkilovani tiofen > benzotiofen > alkilovani-benzotiofen > DBT i alkilovani-dibenzotiofen na poziciji

koja nije 4 i 6 > DBT > 4,6-alkilovani DBT. Više zamenjenih prstenova je teže obraditi. Nakon hidrodesulfurizacije, jedinjenja koja ostaju u dizelu su 4,6-DBT i 4,6-DBT. (Kadhun and Albayati 2022)

Konkretan primer važnosti procesa odsumporavanja je 2020. godina koja se karakteriše smanjenom preradom i eksploatacijom zbog tada aktuelne pandemijske situacije COVID – 19, gde je prerada nafte iznosila 85 miliona barela dnevno, a tokom 2021. proizvodnja rafinisanog ulja je bila 95 miliona barela dnevno, a u 2022. godine proizvodnja je bila oko 100 miliona barela dnevno što odgovara količini pre pandemije odnosno proizvodnji iz 2019. godine, tj. pre pandemije. Prema procenama proizvodnja do 2025. će dostići količinu od 103 miliona barela dnevno. Proizvodnju je neizvesna zbog neizvesnosti na globalnom nivou. (Jednak Berić et al. 2023)

Nova istraživanja su sprovedena kako bi se optimizovao HDS metod korišćenjem različitih katalizatora i konfiguracija reaktora (

Tabela 2.4).

Tabela 2.4 HDS pod idealnim uslovima za reakciju organskih sumpornih jedinjenja

Vrsta ulja	Katalizator	Sumpor (ppm)	Temp. (°C)	Pritisak (MPa)	Uklonjeno sumpora (%)
Dekan	Mo/TiO ₂	1000	320	8,963	/
Heksadekan	Co/Mo/Al ₂ O ₃ MgOLi	2400	320	5,59	73
Cikloheksan	Ni/Mo/ δ -Al ₂ O ₃	500	340	4	99,65
FCC benzin	BT, DBT	259,1126	360	2,5	99,99
FCC dizel	Trimetildibenzotiofen, Ni/Mo	10637	315	8	99

FCC - iz Fluid Catalytic Cracking (FCC) procesa; BT – benzotiofen, DBT – dibenzotiofen
Adaptirano iz Kadhun i Albayati (Kadhun and Albayati 2022)

Katalizatori koji se koriste u hidrodesulfurizaciji se sastoje od metala koji je impregniran na aluminijumskom nosaču koji je porozan. Po površini glinice odnosno u porama glinice (200-300 m²/g) nalaze se u tankom sloju fino dispergovani metali. Iako je mala težina katalizatora može se reći da ova vrsta katalizatora pokazuje veliku katalitičku površinu. U HDS procesu najčešće se koriste katalizatori koji u svome sastavu imaju kobalt (Co), molibden (Mo) i nikel (Ni), koji se u sastavu katalizatora nalaze u oksidovanom obliku. Tokom HDS metali prelaze u svoj aktivni oblik odnosno u sulfidno stanje. (Speight 2017) Ono što je dokazala praksa jeste to da je Al₂O₃ dobra podloga u slučaju molibdenskih katalizatora jer su na ovaj način njihovom kombinacijom dobijene dobre strukturne, termičke i mehaničke karakteristike. (Jednak Berić et al. 2024)

Katalizatori koji se najviše koriste u procesu odsumporavanja direktnih naftnih frakcija su Co-Mo katalizatori. Kada je potrebno postići veću aktivnost zasićenja aromatičnih jedinjenja (polinuklearna) ili u slučajevima kada su u sirovinama (krekirane) prisutne veće količine vatrostalnih jedinjenja koja sadrže sumpor Ni-Mo katalizatori u tom slučaju imaju veću primenu od Co-Mo katalizatora. Pokazalo se da su katalizatori Ni-Co-Mo u fazi hidrotretiranja u fazi balansa što se tiče aktivnosti. Nikel-volfram (Ni-V9) predstavljaju izbor katalizatore kod zasićenja aromata pokazujući vrlo visoku aktivnost pri čemu se odvija i eliminisanje azota (N) i sumpora (S). (Speight 2017)

Zbog brze industrijalizacije potražnja za teškim metalima je sve veća, a rezerve visoko kvalitetnih ruda se smanjuju. Stoga postoji potreba da se istraže alternativni izvori teških metala. Brza industrijalizacije generiše različit industrijski otpad, koji poseduje toksične elemente kao što su teški metali. Neispravno odlaganje tog otpada dovodi do kontaminacije koja predstavlja ozbiljan ekološki problem. (Jadhav and Hocheng 2012)

Tokom procesa prerade nafte procesom hidrodesulfurizacije (HDS) stvara se čvrst otpad koga čine HDS katalizatori koji predstavljaju opasnost po životnu sredinu jer se ova vrsta otpada zasniva na prisustvu opasnih metala kao što su molibden (Mo), kobalt (Co) i nikel (Ni). Da bi se ovaj otpad mogao naći u životnoj sredini kao neopasan potrebno je prethodno primeniti odgovarajuće operacije koje se zasnivaju na aktivnom uklanjanju metala (Mo, Co, Ni) koji predstavljaju sastavni deo otpada koji nastaje u procesu HDS što je i propisano od strane Agencije za zaštitu životne sredine (EPA). (Rouhani et al. 2020) U zavisnosti od kontaminacije katalizatora derivatima nafte i sirovom naftom kao i od fizičko – hemijskih parametara katalizatori se mogu reciklirati i imati primenu u ekstrakciji metala koji učestvuju u elektrolizi, gde je Co (kobalt) od izuzetne važnosti. (Jednak Berić et al. 2023)

Razvijeno je više metoda koje se zasnivaju na kontroli kontaminacije (iskopavanje i očvršćavanje/stabilizacija) ali ovim metodama se ne postiže trajno uklanjanje teških metala iz otpada. Ove metode imaju nedostatke koji se ogledaju u stepenu isplativosti, neefikasne su a takođe kao rezultat njihove primene nastaju opasni nus-proizvodi. Obzirom da je velika većina soli teških metala rastvorljiva u vodi primena fizičko-hemijskih metoda (hemijsko taloženje, oksidacija, filtracija, jonska razmena, reverzna osmoza, isparavanje, elektrohemijski tretman, isparavanje) je neefikasan ili pak neisplativ, naročito kada su koncentracije teških metala jako niske. Velika prednost u ovim slučajevima se daje biološkim metodama koje su jednostavne a kao rezultat njihove primene ne nastaju sekundarni izvori zagađenja. Kada nafta i njeni derivati dospeju u životnu sredinu tada se menja njihova uloga i značaj obzirom da predstavljaju prirodne resurse bez kojih se ne može zamisliti život i dospevanjem u životnu sredinu menjaju svoj karakter i značaj postajući opasna pretnja po životnu sredinu i ekosistem. Ovo je i opravdano obzirom da nafta predstavlja mešavinu mnogih organskih jedinjenja (aromatičnih, alifatičnih i drugih organskih jedinjenja koja u svome sastavu sadrže azot, kiseonik i sumpor). Jedinjenja koja u svome sastavu imaju prethodno navedene komponente su toksična, mutagena, teratogena i kancerogena. (Jovancevic et al. 2022)

Na osnovu sprovedenih istraživanja koja se odnose na pogodnosti metoda za tretman kontaminiranih površina i došlo se do rezultata od 51% za ekološki pristup, što uključuje mikrobiološku remedijaciju (35%) i fitoremedijaciju (16%). (Dixit et al. 2015)

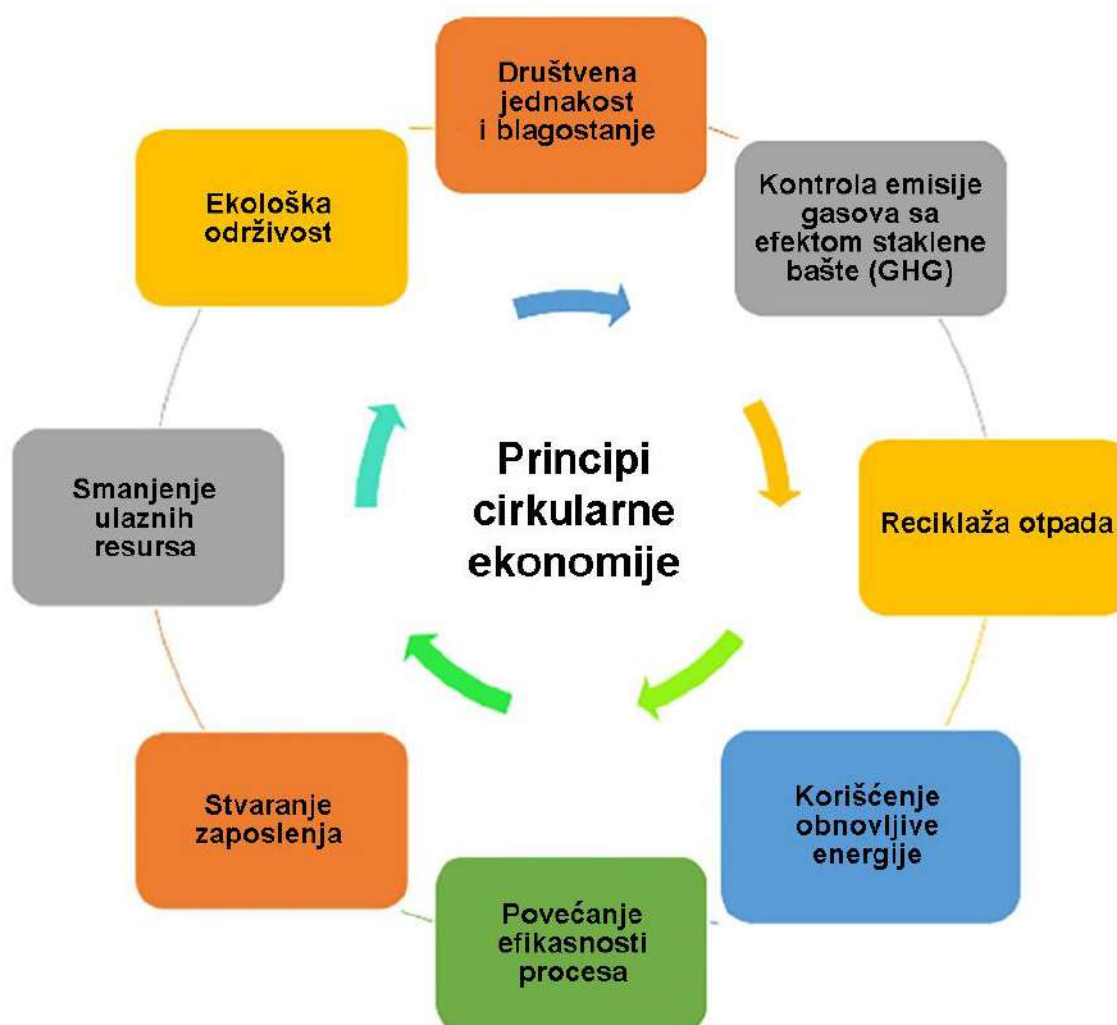
2.3. Tretman otpada

Brza industrijalizacija kao i napredak u razvoju ekonomije, doprineli su proizvodnji otpada u različitim oblastima industrije i industrijskim sektorima. Rezultati pokazuju da su upravo farmaceutska, poljoprivredna, tekstilna industrija kao i logistika glavne odgovorne u povećanju proizvodnje otpada u svetu. Prema istraživanjima iz 2016. godine došlo se do cifre od 2, 2 milijarde tona čvrstog otpada do 2025. godine. Da bi se smanjila količina proizvedenog otpada na svetskom nivou pribegava se usvajanju zelene/curkularne ekonomije koja je usmerena na smanjenju otpada u svakom koraku industrijske proizvodnje u smislu postizanja održivosti. (Tanveer et al. 2022)

Kao alternativa postojećoj linearnoj ekonomiji nastala je cirkularna ekonomija (CE). Cirkularna ekonomija zanemaruje nastanak zagađenja životne sredine nasuprot težnji ka neprestanom profitabilnom i materijalnom rastu.

Glavni element za cirkularnu ekonomiju predstavlja upravljanje otpadom, međutim na efikasnost koncepta CE utiče nedostajanje analize koja je zasnovana na izvodljivosti koncepta CE i na njegovoj daljoj primeni.

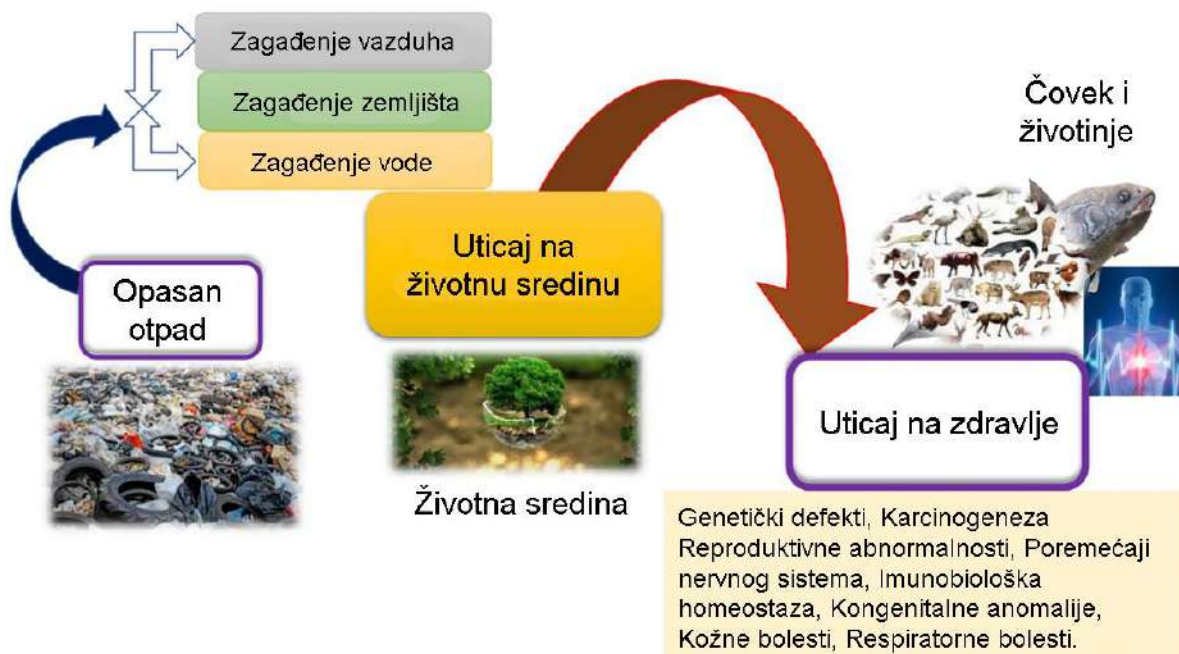
Principi CE (Slika 2.2) strategije su uvedeni i od strane Evropske komisije gde je glavna osnova za sprovođenje ove strategije hijerarhija koja se odnosi na upravljanje otpadom. Državni organi takođe u svojim sektorima koji su odgovorni za upravljanje otpadom ulažu u sprovođenje i napredovanje CE strategije. (Snellinx et al. 2021)



Slika 2.2 Principi cirkularne ekonomije za upravljanje otpadom
Adaptirano iz Corona i saradnici (Corona et al. 2019)

Značajni ekološki problemi, u prošlom veku, nastali su kao posledica neodgovornog upravljanja odnosno odlaganja otpada. (Stanojevic et al. 2023) Neadekvatno upravljanje čvrstim otpadom, što podrazumeva njegovo spaljivanje i deponovanje dovodi do oslobađanja zagađivača (metan, ugljen-dioksid, procedne vode i dioksine). Shodno prethodno navedenom

voda, vazduh, i zemljište su zagađeni teškim metalima, radioaktivnim materijalima i jedinjenjima sumpora. (Sharma et al. 2023) Iz tog razloga javnost je u sve većoj meri zainteresovana da se ovaj globalni problem reši jer prisutnost otpada u životnoj sredini prelazi kapacitete procesa samoprečišćavanja koji se odvijaju u životnoj sredini (Slika 2.3). (Stanojevic et al. 2023)



Slika 2.3 Uticaj opasnog otpada na životnu sredinu i na zdravlje
Adaptirano iz Kumar i saradnici (Kumar et al. 2023)

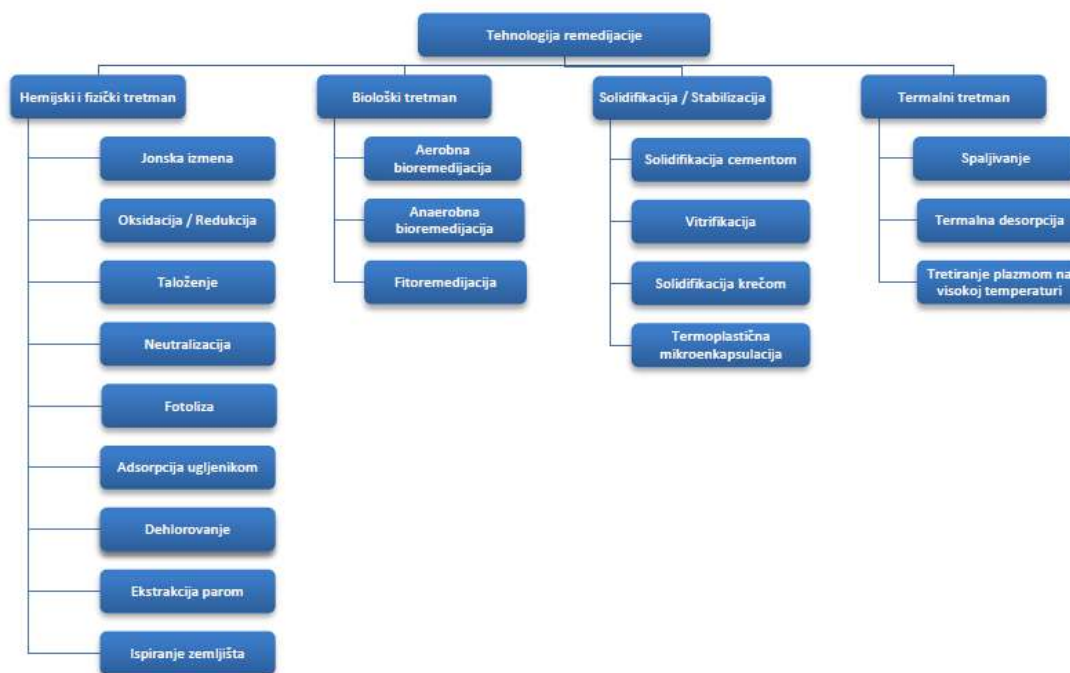
Prema mišljenju Waste Management World, tržište otpada će u periodu od 2020. do 2027. godine rasti za približno 2,8%. Tako u slučaju otpada koji sadrži metale mora se izvršiti klasifikacija takvog otpada na opasan otpad i primeniti koraci tretmana koji prethode koracima konačnog zbrinjavanja odnosno odlaganja, ali sve u skladu sa propisima i direktivama Evropske unije. Smatra se da je jedan od najefikasniji načina tretmana ove vrste otpada, obzirom da je ekstrakcija ekonomski neisplativa, bioremedijacija kao vid mikrobiološkog tretmana zasnovanog na razlaganju ugljovodoničnog polutanta u prisustvu mikrobne populacije i transformacije metala u teško pokretne ili nepokretne oblike što podrazumeva da su metali imobilisani do tog stepena koji će doprineti njegovoj kategorizaciji i svrstavanju u neopasan otpad koji se kao takav može odložiti na deponiju neopasnog industrijskog otpada. (Jednak Berić et al. 2023)

Uspešnost izvođenja remedijacionog plana se zasniva na podacima koji su dobijeni tokom izvođenja preliminarnih istraživanja koja se izvode pre početka izvođenja remedijacionog postupka. Da bi se pristupilo izvođenju remedijacije neophodno je dobiti podatke koji daju odgovor na neka od sledećih pitanja (Miletic 2013):

- koje su vrste i koja je hemijska priroda zagađivača na datoj lokaciji,
- stepen zagađenosti i dimenzije zagađenog prostora,

- nivo rizika,
- koje su najoptimalnije remedijacijske metode za datu zagađenu lokaciju,
- da li postoje finansijska ograničenja vezano za izabranu metodu remedijacije.

Uobičajene tehnologije tretmana (remedijacije) životne sredine su prikazane na slici (Slika 2.4).



Slika 2.4 Tehnologije remedijacije životne sredine
Preuzeto (Miletic 2013) uz saglasnost autora

2.3.1. Fizičke i hemijske tehnike remedijacije

Jonska izmena. Zasniva se na vezivanju metala i organskih zagađivača koji su pozitivno naelektrisani od strane struktura zemljišta koje imaju visok kapacitet za izmenu jona. Na ovaj način organski zagađivač i metali postaju hemijski nepokretni pri čemu se smanjuje rizik od izlaganja. (Mirsal 2008)

Oksidacija. Predstavlja uobičajnu metodu sa visokom efikasnošću za zemljište koje je zagađeno cijanidima i organskim zagađivačima. Ova metoda se zasniva na oksidacionim sredstvima koji imaju širok spektar i tu spadaju ozon, vodonik-peroksid i kalijum-permanganat. (Mirsal 2008)

Fotoliza Zasniva se na primeni ultraljubičastog zračenja (UV) u degradaciji organskih zagađivača. Suština je u korišćenju sunčeve svetlosti ili primenom veštačkog UV zračenja na zagađeno zemljište. Ima primenu u slučajevima kada je kontaminant dospelo do male dubine i izvodi se *in situ* ili u ležajevima koji su posebno pripremljeni. Ako je zagađenje dospelo do većih dubina u tim situacijama vrši se iskopavanje zemljišta i njegov transport na lokaciju na kojoj će se tretirati. (Mirsal 2008)

Adsorpcija na granulisanom aktivnom ugljeniku. Suština ove tehnike je u adsorpciji organskih zagađivača na površini aktivnog uglja. Ima primenu kod isparljivih organskih jedinjenja koja imaju veću molekulsku masu, eksploziva, pesticida i halogenovanih isparljivih organskih jedinjenja (VOC). (Mirsal 2008)

Reduktivno dehlorovanje. Ima primenu u tretmanu isparljivih jedinjenja hlora koji se iz polihlorovanih organskih jedinjenja zamenjuje ili uklanja. Ovom prilikom dolazi do propuštanja vrućeg gasa u čijem sastavu se nalazi i zagađena supstanca, kroz katalizator u čijim delovima se nalaze slojevi metala (plemenitog) i dolazi do raskida se veza sa halogenom. (Mirsal 2008)

Ekstrakcija parom. Dekontaminacija sloja zemljišta iznad podzemnih voda koje je nezasićeno odvija se ekstrakcijom parom kojom se uklanjaju organska jedinjenja koja su isparljiva. Vazduh koji je čist se upumpava u sloj zemljišta i dolazi do izdvajanja organskih para koje se odstranjuju vakuum pumpama. (Mirsal 2008)

Ispiranje zemljišta. Ovom metodom se (eng. soil flushing) ne razgrađuju zagađujuće supstance već dolazi do njihovog prelaska iz zemljišta u vodu. Zagađujuće materije se zatim isumpavaju sa vodom i tretiraju. Ova metoda ima veliku primenu kod zagađenja podzemnih voda. (Roote 1998)

2.3.2. Metode solidifikacije i stabilizacije

Ovim metodama se postižu imobilizacija ili stabilizacija kontaminanta u zemljištu pri čemu je onemogućeno njegovo dalje prodiranje u životnu sredinu. Najuspešnije su sledeće tehnologije (Miletic 2013):

Solidifikacija na bazi bitumena.

Enkapsulacija u termoplastičnim materijalima. U specijalnim tankovima se liju i mešaju zagađeni materijal i termoplastična jedinjenja (npr. sumporni cement koji je modifikovan) i nastaje homogena smeša. Nakon hlađenja i očvršćavanja dolazi do uklanjanja zagađivača.

Istiskivanje polietilenom.

Mešanje sa Pozolanskim/Portlandskim cementom. Materijali koji se sastoje od Pozolana (kao što su pepeo i prašina iz peći) mešaju se sa kontaminiranim materijalom, u prisustvu vode i alkalnih rastvora. U ovakvim uslovima može doći do taloženja teških metala. Ostatak podleže, sa delom organskog zagađivača, postupku solidifikacije.

Vitrifikacija. Zagađeno zemljište se enkapsulira u masu koja je staklasta. Prednost je u tome što može da se izvodi i *in situ* i *ex situ*. Zasniva se ubacivanjem elektroda koje su grafitne, u zemljište. Dolazi do zagrevanja elektroda električnom energijom uz primenu generatora koji su jaki pri čemu se postiže temperatura od 1600 do 1800 °C . Na ovim temperaturama se stvaraju stakleni blokovi usled topljenja zemlje. Masa se hladi i tako ohlađeni podležu pirolizi i redukuju se do gasova. Teški metali su, u staklenoj masi, stabilizovani. Ova metoda se primenjuje u slučajevima kada je zemljište kontaminirano radioaktivnim materijalom.

2.3.3. Termalni tretman

Ova tehnologija, koja pokazuje visok stepen efikasnosti, zasnovana je na zagrevanju zagađenog zemljišta u pećima, gde se tretman odvija na temperaturama čiji se opseg kreće od 800 – 1200 °C , sa ciljem obezbeđivanja oksidacije organskih isparljivih suspcstanci u cilju postizanja oksidacije koja će biti potpuna. (Ding et al. 2019)

2.3.4. Biosorpcija

Biosorpcija je tehnologija koja je sa ekološkog aspekta prihvatljiva i ima veliku primenu u uklanjanju jona metala iz kontaminirane vodene sredine, pokazujući istovremeno pored ekološke prihvatljivosti i ekonomičnost. Prednosti se prvenstveno ogledaju u tome da ovom tehnologijom mogu u potpunosti da se zamene metode koje su konvencionalne i na taj način predstavlja alternativno rešenje u poređenju sa fizičkim i hemijskim metodama zbog svoje isplativosti i ekološke prihvatljivosti. (Singh et al. 2023)

Sušтина biosorpcije je korišćenje algi, mikrobne biomase, ostataka biljaka i agro-otpada. Konkretno primenu u biosorpciji imaju aktivni ugalj, ljuske pšenice i pirinča, kora od banana, citrusi, nanočestice zelene boje, poljoprivredni otpad. Ovi ostaci i materijali imaju veliki površinski karakter što doprinosi povećanju apsorpcionog kapaciteta teških metalnih jona, iz kontaminirane životne sredine. (Singh et al. 2024)

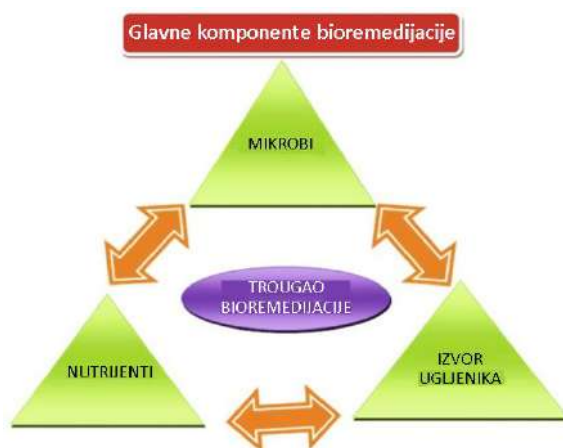
Prednosti biosorpcije kao metode izbora je mogućnost regeneracije biosorbenta i njegova ponovna upotreba. Ovom metodom se postiže sekvencijalno neorganskih i organskih kontaminanata od strane biomase. Ono što je bitno jeste da se koriste materijali koji su prirodni ili otpadni industrijski produkti nastali pri dobijanju biomase u procecu fermentacije ili na primer u procesu prerade algi što ima praktičnu primenu. Proizvodnja biomase je ekonomski isplativa i dobija se u jednostavnim procesima koji ne zahtevaju velika sredstva ulaganja. Međutim, ako u datoj situaciji nije moguće dobiti ekonomski isplativu i korisnu biomasu pribegava se morfološkim i genetskim promenama mikrobne populacije u cilju povećanja adsorpcionih sposobnosti. Sposobnost metabolički aktivnih ćelija da veže metalne jone zavisi od nekoliko faktora koji podrazumevaju starost ćelije i varijabilnosti koje se javljaju u ishrani i u samoj životnoj sredini. Ono što je ograničavajuće jeste to, da može doći do akumulacije jona metala u ćelijskim strukturama što rezultuje smrtnošću ćelije. Značaj korišćenja biomase se ogleda u tome što njegova efikasnost ne opada tokom vremena, nema štetnog uticaja na životnu sredinu i na ljudsko zdravlje jer nema oslobađanja toksina kao produkata metaboličke aktivnosti. Ono što predstavlja opšti problem je odlaganje biosorbenta, a neki od načina su spaljivanje ili deponovanje koji predstavljaju ekološke i tehničke izazove, koje treba detaljno razmotriti. (Priya et al. 2022)

2.4. Bioremedijacija

Zagađenost životne sredine ima negativan uticaj na ekosistem i na zdravlje ljudi, istovremeno predstavljajući sveprisutni globalni problem. Razvoj tehnologija koje će omogućiti čišćenje i koje su visokoeffikasne predstavlja rešenje pitanja kontaminacije i njenog uticaja. Tradicionalne metode su ograničene i neprecizne. Višestruko inherentni i visokodimenzionalni problemi kontrole kod ekoloških sistema zahtevaju razvoj strategija koje su inovativne. Za ublažavanje

štetnih uticaja na životnu sredinu zbog ograničenih mogućnosti mikrobnih agenasa dolazi se do činjenice da je bioremedijacija strategija kojom se smanjuju toksični efekti kontaminanta na zagađenu životnu sredinu. Bioremedijacija je optimalno efikasna, ali se njen potencijal zanemaruje. Osnova bioloških sistema se sastoji od dinamike koja je zamršena pa s toga optimizacija konvencionalnih pristupa može biti dosta otežana, jer ovi sistemi se odlikuju veoma složenom prirodom. (Alolaiyan et al. 2024)

Bioremedijacija je proces u kome zagađivači koji su sve prisutni u životnoj sredini (sedimenti, podzemne vode i zemljište) mogu biti biološkim putem razgrađeni odnosno prevedeni u manje toksične ili ne toksične forme. Da bi se postiglo prethodno navedeno neophodno je da se ispune uslovi bioremedijacionog trougla (Slika 2.5) odnosno da postoji prisustvo mikroorganizma, nutrijenta i izvora ugljenika. (Paul et al. 2021)



Slika 2.5 Trougao bioremedijacije
Adaptirano iz Savitha i saradnici (Savitha et al. 2022)

Takođe, bioremedijacija prema definiciji, koju je dala *US EPA* Agencija za zaštitu životne sredine može da se definiše i kao „Upotreba živih organizama za čišćenje ili uklanjanje zagađivača iz tla, vode ili otpadnih voda; upotreba organizama kao što su neštetni insekti za uklanjanje poljoprivrednih štetočina ili suzbijanje bolesti drveća, biljaka i baštenskog zemljišta“. (Wang et al. 2021)

U procesu bioremedijacije glavnu ulogu imaju mikroorganizmi odnosno gljivice, bakterije i kvasci. Za bioremedijaciju se može reći da se odvija prirodno gde mikroorganizmi imobilizuju uzročnike kontaminacije. Efikasnost odvijanja procesa bioremedijacije zavisi u velikoj meri od uslova u životnoj sredini (pritisak, temperatura, retencionog kapaciteta vode, dostupnosti kiseonika, pH i dr.) od kojih zavisi rast i aktivnost mikrobne populacije, što podrazumeva i uticaj na uslove koji vladaju u životnoj sredini kako bi se ostvario bolji rast mikroorganizama i bolja i brža dekontaminacija komponenti uzročnika zagađenja. (Beškoski et al. 2011)

Predmet velikog broja eksperimenata i studija su bile tehnike bioremedijacije sa ciljem procene efikasnosti i primenjivosti svake od njih u efikasnijem uklanjanju konkretnog zagađivača (ugljevodonici, organski zagađivači, polimeri i derivati polimera, teški metali). Nakon izvođenja opsežnih studija i na osnovu dobijenih rezultata i izvršene analize došlo se do zaključka da je konzorcijum mikroorganizama dao rezultate koji su zadovoljavajući u bioremedijaciji ugljovodonika i teških metala. U biorazgradnji polimera korišćeni su sojevi bakterija koji su pokazali sposobnost biorazgradnje datih polimera, dok su se druge studije bazirale na primeni konzorcijuma mikroorganizama gde se pored smanjenja koncentracije

zagađivača postiglo i smanjenje trajanja procesa sa devedeset na trideset dana što je potvrdilo da je simbioza opcija koja je održiva. (Mendoza-Burguete et al. 2023)

Bioremedijacione tehnike su efikasne i raznovrsne u procesu sanacije kontaminirane lokacije. Raznovrsnost, struktura i prisutnost mikrobne populacije u zagađenoj sredini utiče na uspešnost primenjene bioremedijacione tehnike ukoliko su drugi faktori prisutni u datoj sredini povoljni za odvijanje metaboličkih aktivnosti i za rast. Ono što treba uzeti u obzir u zavisnosti od izabrane bioremedijacione tehnike jeste da se ne mogu smatrati "čarobnim metkom" za sanaciju zagađenih staništa, iako je poslednjih dvadeset godina sprovedeno niz simulacija i razvoja novih strategija bioremedijacije. (Martins et al. 2022)

Potencijal mikroorganizama u procesu sanacije zagađivača zavisi od prirode i uslova životne sredine. Može se reći da je glavna prednost bioremedijacije u odnosu na ostale fizičke i hemijske tehnike u tome što je jeftina i potpuno neškodljiva za životnu sredinu. (Lakhani et al. 2022)

Evidentno je da su se istraživanja u poslednjih dvadesetak godina koncipirala na izučavanju perspektiva i mogućnosti primene procesa bioremedijacije na degradaciju kontaminanata. Proces komparacije troškova za remedijacione tehnologije u zavisnosti od raznovrsnosti scenarija je veoma težak jer se scenariji mogu razlikovati kako u geohemijskom, geološkom aspektu tako i u pogledu uslova zagađivača i specifičnosti kontaminiranog lokaliteta. (Tedesco et al. 2024)

Međutim, nasuprot prethodnim navodima bioremedijacija je najisplativija sanaciona tehnologija sa rasponom cena po kubnom metru od 5 do 300 američkih dolara (\$), dok fizičko-termički tretmani zahtevaju ulaganja koja iznose u rasponu od 600 – 2000 \$/m³, što je znatno veći trošak nego kod bioremedijacije. (Bianco et al. 2023)

U slučaju bioremedijacije najviše finansijskih sredstava iziskuje, u slučaju *ex-situ* bioremedijacije, bagerovanje, transport sedimenta do mesta sladištenja i daljeg tretmana. Kada je reč o *in-situ* bioremedijaciji zahtevi su minimalni u pogledu snage i opreme, jer su odabrane bakterijske kulture glavni i ključni u izvođenju i primeni tehnologija bioremedijacije. Druge remedijacione strategije su zasnovane na hemijskim tretmanima za razliku od bioremedijacione koja je prava zelena tehnologija. (Tedesco et al. 2024)

2.4.1. Mikrobna bioremedijacija

Značajnu zabrinutost predstavlja ubrzana industrijalizacija i povećana antropogena aktivnost što rezultuje povećanjem nivoa zagađenja. Bioremedijacija je proces koji se često koristi za sanaciju kontaminirane životne sredine zbog toga što je lako prisutna i relativno brza. Jednostavno se karakteriše, a mikroorganizmi za svoju ishranu koriste više različitih zagađujućih supstanci. Mikrobima posredovana remedijacija je razgradnja organskih kontaminanta do ugljen-dioksida i vode ili do prevođenja u manje toksične oblike. Ova tehnika je od velikog značaja, za životnu sredinu. (Wani et al. 2022)

Proces bioremedijacije se može odvijati na mestu kontaminacije (*in-situ*) ili van mesta zagađenja (*ex-situ*).

Za *in-situ* i *ex-situ* bioremedijacioni pristup je bitan metabolizam mikroba. Bioremedijacija *in-situ* je od značaja za dekontaminaciju vodenog ekosistema i kontaminiranog zemljišta. Ekonomičnost *in-situ* pristupa se odvija na mestu kontaminacije bez iskopavanja zagađenog

lokaliteta i zasnovan je na mehanizmima dekontaminacije koji ugljučuju mikrobiološki metablički potencijal. *Ex-situ* pristup se koristi za degradaciju hemijskih kontaminanata, van mesta kontaminacije. Prethodni navod ukazuje da je *ex-situ* metod ekonomski skuplji u poređenju sa *in-situ*. (Paul et al. 2021) *In-situ* remedijaciona tehnika se odvija na mestu nastanka kontaminacije i zasniva se na dodavanju mikrobnih kultura, bioventilaciji i na obradi zemljišta. *Ex-situ* remedijacija zahteva bioreaktor, remedijacione halde ili tankove. (Miletic 2013; Zhang et al. 2020a) Lokalizacija procesa zavisi od nekoliko ključnih faktora koji se zasnivaju na prirodi samog konatminanta, njegove koncentracije, ekonomskog aspekta, prirode zagađenog lokaliteta, zahvaćenosti kontaminirane lokacije zagađivačem i od politike zasnovane na zaštiti životne sredine. Uspešnost odvijanja procesa zavisi od nekoliko abiotičkih faktora i to od temperature, koncentracije kiseonika, pH. (Alori et al. 2022)

Optimalni uslovi za rast mikroba obezbeđuje se u bioreaktorima. Interakcija mikroorganizama sa zagađivačem se ostvaruje u svakom koraku zbog njihove sveprisutnosti zahvaljujući kojoj oni razlažu zagađivač u procesu metabolizma, uz promene ruta do kojih može, a i ne mora da dođe i na taj način je omogućeno kanalisanje kontaminanta u metablički put zasnovan na biotransformaciji i degradaciji. Metode bioremedijacije se zasnivaju na korišćenju kataboličkih puteva degradacije, akumulacije (npr. PCB, PAH, radionuklidi, ugljovodonici (npr. ulje) i metali). (Tekere 2019)

2.4.1.1. Tretman otpada aerobnim mikroorganizmima

Tretman otpada aerobnim mikroorganizmima se zasniva na prisustvu kiseonika koji predstavlja terminalni akceptor kiseonika čiji su donori neorganske supstance ili pak organske što rezultuje proizvodnjom biološki dostupne energije. Ovaj način tretmana otpada je izuzetno efikasan za tretman ksenobiotika (alifatični ugljovodonici i njihovi derivati) kao i za hlorovana alifatična jedinjenja (metil-, etil-, metilen i etilen hloridi), aromatične ugljovodonike i za njihove derivate (benzen, toluen, ftalat, etilbenzol, ksileni i fenol), halogenovana aromatična jedinjenja (hlorfenoli, dioksini i srodne grupe, polihlorovani bifenili, DDT i sl.), policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), jedinjenja sa nitro grupama (herbicidi i otpad koji je kontaminiran eksplozivima), AZO boje kao i organofosfatni otpad, a sve u skladu sa propisima koje je donela EPA 2003. godine. (Kumar et al. 2023)

2.4.1.2. Tretman čvrstog otpada aerobnim mikroorganizmima

Najjednostavniji tretman otpada aerobnim mikroorganizmima je kompostiranje kojim se organske materije, koje se odlikuju nestabilnošću, prevode u proizvode koji su stabilni kao što je humus koji se koristi kao organsko đubrivo a može se primenjivati i u regeneraciji zemljišta. Ovim vidom tretmana znatno se smanjuje količina čvrstog otpada ali i neprijatni mirisi jer se uništavaju patogeni (termofilno kompostiranje). Kompostiranje ima pozitivan uticaj na biološka, hemijska kao i na fizička svojstva zemljišta pa iz tog razloga ima sve veću primenu u poljoprivredi gde se iz čvrstog komunalnog otpada dobija organski kompost. Na kvalitet komposta značajno utiče dizajn postrojenja u kome se vrši kompostiranje, poreklo i količina sirovine, vremena sazrevanja komposta kao i od same tehnologije kompostiranja. (Heydarpour and Farhangi 2022)

2.4.1.3. Aerobni tretman tečnog otpada

Zasniva se na tretmanu otpadnih voda u bioreaktorima mešanim rezervoarima za biomasu koja je suspendovana u otpadnoj vodi ili je u obliku biofilma na površini bioreaktora. Ovaj vid tretmana je jedan od starijih biotehnoloških tretmana otpada koji i pored svojih ograničenja (npr. vazdušni kompresori koji raspršuju biomasu i predstavljaju glavno ekonomsko ograničenje) i danas ima široku primenu uz veliki broj modifikacija, jer je sistem jednostavan i za instalaciju i za projektovanje. (Narayanan and Narayan 2019)

2.4.1.4. Aerobni tretman gasovitih otpada

Ova biotehnologija ima primenu u uklanjanju organskih rastvarača (hloroform, trihloretilen, hloropropan, ksileni, ugljen-tetrahlorid, itd.) koji se odlikuju biorazgradivošću. Organski rastvarači koji se na ovaj način mogu tretirati su oni koji se odlikuju neprijatnim mirisom i koji su otrovni i u svome sastavu imaju sumpor kao što je vodonik-sulfid kao i izduvni ventilacioni gasovi, iz industrijskih proizvodnih pogona a koji takođe imaju u svome sastavu sumpor. Na ovaj način mogu da se tretiraju i gasovi koji sadrže formaldehid, amonijak i supstance koje su niske molekulske mase.

2.4.1.5. Anaerobni tretman otpada

Primenom anerobnog procesa tretmana otpada dolazi do formiranja niskoenergetskih jedinjenja (ugljen-dioksida i vode) gde dolazi takođe i do gubitka energije, koja odlazi u vazduh i smatra se da se gubi oko dvadeset puta više energije nego kod primene anaerobnog procesa kojim se dobijaju proizvodi visoke energije (npr. metan). Metan se spaljivanjem može koristiti kao izvor energije i tako imajući primenu u napajanju gasnih uređaja ili motora koji se odlikuju unutrašnjim sagorevanjem ili se može koristiti za proizvodnju električne energije. (Sattler 2011)

2.4.1.6. In-situ bioremedijacija

Stimulacijom bakterija koje su već prisutne u životnoj sredini da razlažu kontaminant uz prisustvo kiseonika i hranjivih materija kroz vodu i zagađeno zemljište predstavlja osnov *in-situ* bioremedijacije. *In-situ* bioremedijacija ima veliku primenu kod saniranja kontaminiranog zemljišta ili podzemnih voda i to naročito u saniranju zasićenog zemljišta i podzemnih voda kao i nezasićenih vodenih slojeva. Brzina izvođenja *in-situ* bioremedijacije zavisi od prirode zagađivača i specifičnosti kontaminirane sredine odnosno od raznovrsnosti mikrobne populacije, koncentracije i distribucije kontaminanata, kinetike reakcije, sadržaja vlage, pH, temperature, dostupnosti hranjivih materija. Za *in-situ* metodu važi da je ekonomičnija i ekonomski isplativija u poređenju sa metodama koje imaju primenu u sanaciji kontaminiranog zemljišta i vodonosnih slojeva organskim hemikalijama gde spada primena hlorisanih rastvarača i ugljovodonika, neorganskih kontaminanata, npr. nitrata, teških metala i slično. Ovom metodom postiže se potpuna dekontaminacija, zahteva se manje opreme, bezopasna je po ljudski život i zahteva manje troškove izvođenja.

In-situ bioremedijacija se može klasifikovati na dva načina (Mondal et al. 2024):

1. Intrizična. Zasniva se na procesima dekontaminacije kontaminanata koji su prirodni bez promena uslova koji vladaju u sredini. Zasnovana je na stimulisanju autohtone mikrobne populacije koja je prisutna uz uvođenje kiseonika i hranjivih materija što dovodi do povećanja metaboličke aktivnosti autohtone vrste prirodnih, nativnih mikroorganizama. Ovaj metod je zasnovan na smanjenju toksičnosti kontaminanata.
2. Konstruisana (ili projektovana) bioremedijacija. Suština ove metode je podsticanje mikrobnog rasta kroz promenu fizičko-hemijskih uslova odnosno kroz njihovo poboljšanje, što će imati pozitivan uticaj na rast mikroba. Ima primenu kod tretmana zemljišta, vodenih sedimenata i podzemnih voda.

Prednosti *in-situ* bioremedijacije:

- *In-situ* bioremedijacijom se mogu prevesti organski zagađivači u netoksične supstance. Pored toga veoma je bezbedna za ljudski život.
- Moguća je istovremen tretman kontaminanata koji su rastvoreni i sorbovani.
- Vreme potrebno za tretman podzemnog zagađenja je kraće u *in-situ* bioremedijaciji od procesa pumpanja i tretiranja
- Ovim metodom može se tretirati veća količina zemljišta.

Nedostaci *in-situ* bioremedijacije su:

- Dugotrajan proces, zbog sezonska razlika u mikrobnoj aktivnosti i problema koji se javljaju u korišćenju aditiva, za tretman, u prirodnom okruženju
- U nekim situacijama, ova bioremedijacija se može pretvoriti u nekontrolisanu i minimalno upravljivu.

2.4.1.7. *Ex-situ* bioremedijacija

Za degradaciju organskog zagađivača iz zagađenog zemljišta i vode koristi se biološki proces označen kao *ex-situ* bioremedijacija. Za sprovođenje ove metode zemljište se iskopava i transportuje na nadzemnu površinu gde će se primenom autohtonih mikroba vršiti tretman uklanjanja kontaminanta. Ova metoda zavisi od vrste kontaminanta i zemljišta, dubine kontaminacije, stepena kontaminiranosti i geografskog položaja, kao i od ekonomskog aspekta. Efikasnost bioremedijacije se može poboljšati poboljšanjem karakteristika zemljišta odnosno omogućavanjem ravnomerne distribucije hranjivih materija, oksigenacijom i kontrolom vlage koja mora biti optimalna. (Varjani et al. 2018)

Ex-situ bioremedijacija se može izvesti na dva načina (Mosca Angelucci and Tomei 2016):

1. Slurry-phase bioremedijacija je kontrolisan proces i podrazumeva bioremedijaciju u bioreaktorima. Zasniva se na tretmanu kontaminiranog iskopanog zemljišta koje se meša sa aditivima i vodom u bioreaktoru. Na ovaj način se obezbeđuje efikasna interakcija kontaminanta i mikroba, stvarajući optimalne uslove.
2. U čvrstoj fazi (eng. *solid phase*) suština je u iskopavanju zemljišta koje se stavlja na posebno projektovane gomile gde se obezbeđuju uslovi ventilacije koje je bitno za mikrobno disanje. Voda se prska po površini gomile sa ciljem obezbeđivanja vlage.

Nedostatak je što je neophodno obezbediti veću površinu za izvođenje procesa i traje duže, u poređenju sa *in-situ* metodama.

Prednosti i nedostaci *ex-situ* bioremedijacije (Varjani et al. 2018):

- Jednostavan i pogodan tretman, za širok spektar zagađivača.
- Nije pogodan za zagađenje teškim metalima ili hlorisanim ugljovodonicima kao što su trihloretilen.
- Dalja obrada je neophodna za nepropusno zemljište kao što su glina i mulj.



Slika 2.6 Proces *ex-situ* bioremedijacije.

(A) Priprema bioremedijacione gomile – halde; (B) Inokulacija i biostimulacija halde
Slika je preuzeta iz Stanojević i saradnici (Stanojevic et al. 2023) uz saglasnost koautora

2.4.1.8. Mobilizacija i imobilizacija

Mehanizmi uklanjanja zagađivača iz životne sredine se mogu podeliti u dve kategorije na mobilizaciju i imobilizaciju. Mobilizacija se zasniva na bioluženju, bioaugmentaciji, enzimskoj redukciji, enzimskoj oksidaciji. Imobilizacija podrazumeva komplekiranje, bioakumulaciju, biosorpciju i precipitaciju. Pri mineralizaciji zagađivač se transformiše u uljen-dioksid i vodu ili druge metabolite. Imobilizacijom se jedinjenja prevode u oblike nedostupne u datoj sredini (npr. prevođenje nitratnog u organski azot). Ima veliku primenu u bioremedijaciji teških metala u veoma zagađenim sredinama. (Ayilara and Babalola 2023)

Imobilizacija se može izvoditi i *ex-situ* i *in-situ*. *Ex-situ* se zasniva na premeštanju kontaminiranog zemljišta na drugu lokaciju kako bi se podvrglo procesu imobilizacije jona metala od strane mikroorganizama. Dok se *in-situ* proces odvija na mestu zagađenja. Mikroorganizmi kao što su *E. asburiae* i *B. cereus* imaju ulogu u imobilizaciji jona teških metala. Mikroorganizmi se formiranjem efluksne i hidrofobne pumpe štite spoljašnje membranske ćelije, tokom mikrobiološki posredovane bioremedijacije. (Ayilara and Babalola 2023)

2.4.1.9. Ubrzavanje bioremedijacije

Mikrobna bioremedijacija se može ubrzati na više načina (Sharma 2024):

Bioventiliranje (eng. Bioventing). Mogućnost za poboljšavanje bioremedijacije i obezbeđivanje prozračnosti zemljišta, vodonosne zone i podzemnih voda na ekonomski isplativ način, postiže se bioventingom. Na ovaj način povećava se potencijal biorazgradnje lakih i srednjih ugljovodoničnih destilata. Ovaj tip bioventing sistema su tako dizajnirani da je omogućeno optimizovanje prenosa kiseonika i efikasnost njegovog korišćenja pri čemu se njihov rad odvija pri brzinama protoka koje su dosta niže nego što je to slučaj kod standardne ekstrakcije zemljišne pare. Dva glavna faktora bitna za funkcionisanje bioventing sistema su propustljivost vazduha i mikrobna aktivnost *in-situ*. (Sharma 2024)

Biostimulacija. Nova saznanja iz oblasti geofizike, izotopa i mikrobne biologije biostimulacija je metod izbora u bioremedijaciji ugljovodonika. U slučaju biostimulacije koriste se postojeći mikroorganizmi koji su prilagođeni uslovima u životnoj sredini tačnije u podzemnoj površini. Na dostupnost aditiva utiče geologija u podzemnoj površini i dodavanjem aditiva nativnoj zajednici mikroba postiže se povećanje brzine razlaganja ugljovodonika. (Sharma 2024)

Mnogi faktori kao što su temperatura, vlažnost, koncentracija hranjivih materija, kiseonik, koncentracija i prisustvo kontaminanta utiču na ograničenje odvijanja procesa bioremedijacije. Ta ograničenja se mogu premostiti modifikacijom uslova sredine kako bi se bioremedijacija ubrzala kroz stimulaciju bakterija prisutnih na mestu kontaminacije. Uvođenjem u postojeći sistem akceptora elektrona i hranjivih materija koji su prisutni u malim količinama i ograničavaju aktivnost mikroba postiže se ubrzanje procesa. Akceptori elektrona i hranjive materije se uvode u obliku melase, i podrazumevaju azot, fosfor, kiseonik, ugljenik i azot. Biostimulacija kao prirodan proces remedijacije poboljšava i doprinosi procesu razgradnje zagađivača optimizacijom uslova (aeracija, pH, kontrola temperature, unošenje hranjivih materija). To je odgovarajući proces za uklanjanje naftnih kontaminanata iz zemljišta i za koju je neophodno poznavanje sposobnosti degradacije od strane autohtonih vrsta i dobro poznavanje uslova životne sredine sobzirom da su i mikrobi i uslovi životne sredine u direktnoj povezanosti sa procesom kinetike degradacije, *in-situ*. (Omokhagbor Adams et al. 2020)

Glavna prednost biostimulacije se ogleda u odvijanju procesa od strane mikroba koji su nativni i prisutni na mestu kontaminacije i prilagođeni uslovima i ravnomerno su raspoređeni. (Omokhagbor Adams et al. 2020)

Nutritijentima obogaćeni mikrobi ubrzavaju i poboljšavaju proces bioremedijacije i razgradnju ugljovodonika i nafte uz povećanje metaboličkih aktivnosti usled povećanja brojnosti mikrobne populacije. (Omenna et al. 2024)

Od podzemne, lokalne geologije zavisi i uspešnost unošenja aditiva gde je bitno obezbediti njihovu dostupnost u svim slojevima sredine. U slučajevima kada je litologija terena takva da je nepropusna što je u slučajevima prisutva sitnozrnastog materijala (npr. nabijena glina) onemogućava ravnomernu raspodelu aditiva u podzemnim slojevima što smanjuje i njegovu dostupnost mikrobima. Heterotrofni mikroorganizmi su podstaknuti unosom hranjivih materija i predstavljaju konkurenciju sa mikroflorom koja je rezidentna. (Omokhagbor Adams et al. 2020)

Sprovedena ispitivanja uspešnosti bioremedijacije zasnovana na značaju biostimulacije su pokazala da dodavanjem hranjivih materija (P i/ili N), sa ciljem izbegavanja metaboličkih

ograničenja, rezultovalo je porastom metaboličkih parametara mikroorganizama (autohtonih). (Smith et al. 2015)

Bioreaktori. Tretman kontaminanta *ex-situ* podrazumeva upotrebu bioreaktora, poljoprivredno zemljište, kompostiranje, anaerobnu digestiju, tretman čvrste faze, biosorpciju. Kod *in-situ* tretmana dekontaminacija zagađivača se odvija na samoj lokaciji gde je kontaminacija prisutna. Bioremedijacija koja se odvija u reaktoru, gde se tretman otpada (kontaminirana voda, mulj, sediment, zemljište) tretira kroz projektovani sistem. U ovoj vrsti tretmana kada je u pitanju kontaminirano zemljište primenjuje se bioventing i biostimulacija. Pod bioreaktorima se smatraju posebno konstruisani uređaji u kojima se razvijaju i istovremeno i odvijaju biohemijski procesi, pod strogo kontrolisanim uslovima kao što su pritisak, temperatura, snabdevanje i koncentracija hranjivih materija, pH. Imaju veliku primenu u različitim industrijskim granama u proizvodnim procesima ili u tretmanu otpadnih voda. Zahvaljujući istraživanjima došlo se do saznanja da bioreaktori mogu biti i biljke i to u slučajevima proizvodnje npr. ugljenih-hidrata, proteina i lipida. (Sharma 2024)

Biofilteri. Biofilteri se svrstavaju u porozne nosače, a sama tehnologija se zasniva na reakcijama ekstrakcije i detoksikacije teških metala koji se odlikuju specifičnim performansama. Pojedinačne ili mnogobrojne kolonije mikroorganizama se povezuju i ujedinjuju sa nosačem i stvaraju na njemu biofilme. Ovim je omogućen i tretman teških metala čak i u slučajevima stabilnih kontaminanata. (Cabrera et al. 2011; Datta et al. 2022)

Bioaugmentacija. Podrazumeva uvođenje konzorcijuma mikroorganizama na mesto zagađenja u cilju poboljšanja performansi dekontaminacije. Suština ovog procesa koji se smatra vodećim i jako bitnim u odvijanju bioremedijacije je uklanjanje velikog spektra teških metala na efikasan način, u cilju povećanja broja autohtonih mikroba na mestu zagađenja. Na ovaj način se postiže ubrzanje procesa bioremedijacije. Ovim se postiže uklanjanje teških metala dugoročno. Dobijeni laboratorijski rezultati su pokazali da je ovaj proces manje efikasan na terenu nego što je efikasan u laboratorijskim uslovima. Rezultat je zasnovan na smanjenju održivosti, ograničenom disperzijom i smanjenom efikasnošću i sposobnošću konzorcijuma mikroorganizama za razliku od autohtonih mikroba koji se već nalaze na kontaminiranom lokalitetu. Da bi unešeni konzorcijum pokazao svoju efikasnost i samim tim opstao u novoj sredini neophodno je njegovo prilagođavanje postojećim uslovima bilo da je reč o abiotičkim ili biotičkim. Bakterije izolovane iz zagađenog zemljišta i otpadnih voda predstavljaju dobre agenske jer imaju sposobnost prilagođavanja izmenjenim uslovima životne sredine. (Perera et al. 2023)

Pri bioaugmentaciji mikroorganizmi mogu da zamene već prisutne mikroorganizme koji imaju niži potencijal biorazgradnje ili kao dopuna u slučajevima povećanja stepena biorazgradnje i biodostupnosti zagađivača u procesu koji je ubrzan. Bioaugmentacijom se, takođe, postiže i prevazilaženje sledećih potencijalno ograničavajućih faktora: (i) prisustvo „neposlušnih” jedinjenja ili nusproizvoda koji su toksični – uvođenje mikroorganizama sa specifičnim putevima razgradnje, (ii) ograničena prostorna distribucija degradativnog konzorcijuma – proširenje oblasti inokulacije i upotreba mikroorganizama koji poboljšavaju mikrobiološku distribuciju, u matriksu, zemljišta (kvasci ili gljive sa filamentoznim rastom) i (iii) zagađivači koji se karakterišu niskom biodostupnošću—bioaugmentacija ćelijama koje proizvode biosurfaktante ili jedinjenja koja mogu da indukuju/pojačaju kometabolizam unutar nativnog konzorcijuma. (Csutak and Corbu 2023)

Bioaugmentacija na terenu i pod kontrolisanim uslovima izvođenja predstavlja veliki izazov za sprovođenje zbog klimatskih uslova, remedijacije, koncentracije supstrata, odnosa mikroba.

Smatra se da sprovođenje daljih istraživanja i analizom dobijenih podataka i primenom genetskog inženjeringa, sistemske biologije i nanotehnologije može doprineti napredovanju odvijanja bioremedijacije na viši nivo. (Muter 2023)

Bioagumentacija je od 1970. godine uvedena kao alternativno rešenje u bioremedijaciji naftom kontaminiranih lokacija. Razlog uvođenja bioagumentacije je pretpostavka da postojeći autohtoni mikrobi nemaju kapacitet razlaganja velikog broja mogućih suspcstrata koji su prisutni u nafti ili da usled izloženosti stresu imaju smanjenu sposobnost degradacije. Uvedeni mikroorganizmi moraju imati sposobnost da razgrade naftne komponente, uz održivost kako stabilnosti što se tiče genetike i da zadrže svoju održivost tokom skladištenja i da prežive. (Omokhagbor Adams et al. 2020)

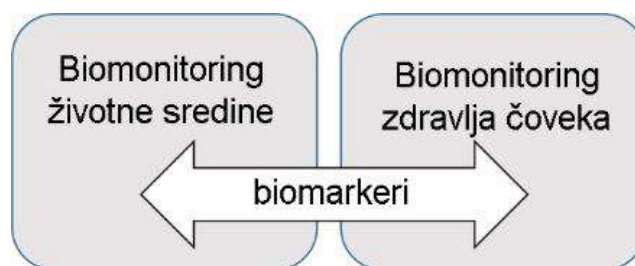
Za obezbeđivanje inokuluma, za bioagumentaciju, bitno je izolovati čiste kulture mikroorganizama iz sredine koja je kontaminirana. Konzorcijum mikroorganizama koji u svome sastavu sadrži različite sojeve mikroba sa različitim metaboličkim aktivnostima i interakcijama koje su sintrofičke daje bolje rezultate od čistih kultura, obzirom na složenost sastava sirove nafte. (Spini et al. 2018) Ono što je pokazano u eksperimentalnim uslovima jeste značaj kataboličkih interakcija gljivičnih i bakterijskih kultura na povećanje degradabilne stope dizela i PAH-ova. (Wang et al. 2011) Obzirom na dostupnost karakterizacija mikroorganizama i izvršenih identifikacija postoji jako malo podataka o prirodnoj zajednici mikroorganizama ugljovodonično kontaminiranog zemljišta kao i o njihovoj dinamici naročito tokom obogaćivanja konzorcijom kontaminiranog lokaliteta, i to sojevima velike efikasnosti. (Spini et al. 2018)

Sa biološkog aspekta mikrobna bioremedijacija je održiva i najisplativiji način sanacije u kome ne nastaje sekundarno zagađenje. (Alvernia et al. 2021)

2.4.1.10. Biomonitoring bioremedijacije

Suština biomonitoringa je evoluciono praćenje promena koje su nastale u životnoj sredini zasnovano na mikroorganizmima koji kvalitativno ili kvantitativno dovode do promena. Za otkrivanje hemikalija i zagađivača, u različitim kontaminiranim sredinama biomonitoring se sprovodi na svim organizacionim nivoima – ekosistemske, tkivne, ćelijske i molekularne. Za detekciju tačno određenih jedinjenja primenjuje se genetska modifikacija u cilju dobijanja odgovarajućih biosenzora. (Meyer et al. 2023)

Definicija biomarkera se zasniva na kvantitativnim merama promena u biološkim sistemima u poređenju sa statusom pre izlaganja kontaminaciji. Biomarkeri se odnose uglavnom na nivoe niže biološke organizacije kao što su fiziološki, molekularni, ćelijski, itd. Biomarkeri zagađenja mogu se definisati kao kvantitativne mere promena u biološkom sistemu (npr. fiziološki, metabolički, ćelijski) u odnosu na njegov normalan status kao odgovor na izloženost zagađivačima. Efekti zagađivača su najpre vidljivi na nižim ćelijskim nivoima. Biomarkeri (ćelijski i metabolički) predstavljaju vrstu ranog upozorenja na kontaminante i pre njihovog integrisanja u sistem. Na ovaj način biomarkeri obezbeđuju informacije koje su biološke i precizne vezano za uticaj kontaminanta na funkcionisanje izloženog organizma. Primena biomarkera je u poslednjem periodu u fokusu, jer su od značaja kako za životnu sredinu i dalja naučna istraživanja tako i za kontrolu i praćenje zdravlja ljudi (Slika 2.7). (Lionetto et al. 2019)



Slika 2.7 Biomarkeri kao alati za povezivanje ekološkog i ljudskog biomonitoringa
Adaptirano iz Lioneto i saradnici (Lionetto et al. 2019)

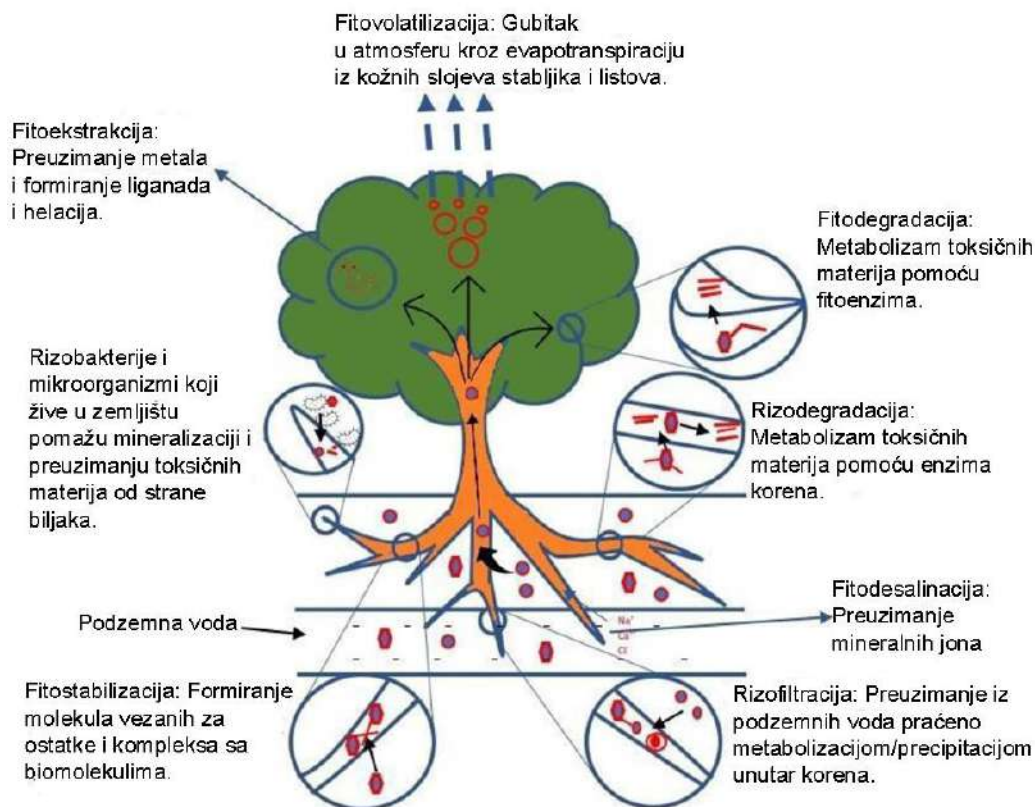
2.4.2. Fitoremedijacija

Bioremedijaciju mogu da vrše i zelene biljke koje mogu da uklone uzročnik zagađenja iz vode ili zemljišta procesom apsorpcije od strane korena i zatim akumulacijom u zelenim delovima biljke. Bioremedijacija podrazumeva remedijaciju koja se zasniva na interakciji biljka/mikrob (fitoremedijacija i remedijacija mikroorganizmima) gde je evidentna razlika u mehanizmu imobilizacije, degradacije i uklanjanja kontaminanta. (Wang et al. 2021)

Ovaj način remedijacije se zasniva na interakcijama biljnih vrsta u cilju smanjenja toksičnih izolacionih efekata (fiziološki, hemijski, biološki i mikrobiološki). Zasniva se na interakcijama zagađenih lokacija. Modifikacijom, ekstrakcijom i izolacijom izvlače se radionuklidi i metali. Degradacijom i stabilizacijom se uklanjaju hemijski kontaminanti. Značajna je primena fitoremedijacije u tretmanju kontaminiranog, tla, zemljišta, otpadnih voda. Za opisivanje fitoremedijacije koriste se zelena remedijacija, agroremedijacija i botano-remedijacija kao i vegetativna remedijacija. Uspešnost fitoremedijacije zavisi od nekoliko faktora medijuma, uslova, biljaka i kontaminanata. Zasniva se na isplativosti i ekološkoj prihvatljivosti biljne vrste koja se koristi. Biljke koncentrišu jedinjenja i elemente iz svoje okoline metabolišući molekule u svojim ćelijama i tkivima. Suština je u bioakumulaciji kontaminanta u životnoj sredini (zemljište, vazduh, voda) i u njihovoj razgradnji i prevođenju u manje opasne oblike u procesu biorazgradnje. (Azubuike et al. 2016)

Jedan od nedostataka fitoremedijacije je nedostatak informacija i smanjenju doprinosa mehanizama fitoremedijacije što bi se postiglo odgovarajućim izborom biljke i iznalaženjem načina za stalno poboljšavanje karakteristika tehnologija korišćenih u fitoremedijaciji kao i odgovarajućim informacijama zasnovanim na izvodljivosti i sredstvima koja bi doprinela poboljšanju procesa fitoremedijacije. (Kafle et al. 2022)

Prednost fitoremedijacije kao zelene metode koja je u suštini zasnovana na solarnim metodama, predstavlja metodu izbora u poređenju sa tehnikama koje su konvencionalne. Sanacija otpadnih voda primenom vodenih biljaka je metoda koja je primenjiva preko tristotine godina. Fitoremedijacija je zasnovana na dve tehnike i to na tehnologiji izgrađenih močvara i hidroponskoj tehnologiji. Hidroponska tehnologija je tehnologija koja se bavi primenom više biljnih vrsta u akumulaciji i razgrađivanju organskih, neorganskih i drugih zagađivača prisutnih u vodenoj sredini. Primenom ove tehnologije obezbeđuju se biološki mehanizmi i putevi koji su prirodni i kojima se postiže razgradnja i asimilacija u tkivima floema i ksilema obezbeđujući visoku efikasnost pri čemu je izbegnuto stvaranje mulja za razliku od do sada primenjenih tehnika koje su bile tradicionalne. Ova tehnika je isplativa sa stanovišta nižih troškova izvođenja, manjeg unosa energije, protok zavisi od gravitacije, proizvedena biomasa i ostali faktori koji čine ovu tehniku pre svega isplativom. (Agrahari and Kumar 2024)



Slika 2.8 Procesi fitoremedijacije i povezane funkcije
Adaptirano iz Kafle i saradnici (Kafle et al. 2022)

2.4.3. Zooremedijacija

Zooremedijacija je metoda bioremedijacije koja koristi životinjske vrste za uklanjanje ili smanjenje zagađivača u vodi, zemljištu ili sedimentima. Dok bioremedijacija obično uključuje mikroorganizme i biljke, zooremedijacija se oslanja na sposobnost životinja da filtriraju, akumuliraju ili metaboliziraju zagađivače iz okruženja. Najčešće korišćene vrste u zooremedijaciji uključuju ribe, školjke, crve, insekte, rakove i puževe. Na primer, školjke poput dagnji i ostriga poznate su po svojoj sposobnosti da filtriraju velike količine vode i uklanjaju zagađivače iz mora, dok zemljani crvi doprinose stabilizaciji tla i smanjenju koncentracije toksina. U nekim slučajevima, rakovi i puževi mogu metabolisati naftne derivite ili organske zagađivače, pomažući u čišćenju sedimenta. Zooremedijacija se primenjuje u prečišćavanju reka, jezera i obalnih područja, kao i u remedijaciji zagađenih tala i sedimenta u vlažnim zonama. Prednost ove metode je što omogućava prirodnu detoksikaciju ekosistema bez agresivnih hemijskih intervencija, čime pomaže obnavljanju biodiverziteta u zagađenim sredinama. (Gifford et al. 2007)

Prednosti zooremedijacije su brojne, a najvažnije uključuju (Gifford et al. 2007):

- **Prirodna metoda:** Zooremedijacija koristi životinje koje su već deo ekosistema, čime se smanjuje potreba za uvođenjem veštačkih ili hemijskih sredstava koja bi mogla narušiti prirodni balans. (Hou et al. 2021)

- **Održiva i ekološki prihvatljiva:** Ova metoda smanjuje upotrebu toksičnih hemikalija i smanjuje emisije ugljen-dioksida koje prate druge metode remedijacije, čineći je ekološki prihvatljivijom.
- **Poboljšanje biodiverziteta:** Upotreba organizama za čišćenje zagađenja može doprineti obnavljanju i očuvanju biodiverziteta, jer ova metoda podržava prirodne procese oporavka ekosistema.
- **Široka primena:** Zooremedijacija se može koristiti u različitim okruženjima, uključujući vodene ekosisteme, zemljište i sediment, što je čini fleksibilnom metodom za različite vrste zagađenja.
- **Nizak trošak:** U poređenju sa konvencionalnim metodama remedijacije koje zahtevaju skupu opremu i hemikalije, zooremedijacija je često ekonomičnija, jer koristi životinjske vrste koje prirodno žive u tim oblastima.
- **Minimalno narušavanje okoline:** Ova metoda ne zahteva veliki infrastrukturni zahvat ili mehaničke intervencije, čime se izbegavaju potencijalne štete za ekosistem tokom procesa remedijacije.
- **Efikasnost u filtraciji i akumulaciji zagađivača:** Mnoge životinjske vrste, posebno filtratori poput školjki, mogu ukloniti značajne količine zagađivača iz vode, pomažući u prečišćavanju velikih količina vode bez potrebe za složenom tehnologijom.

Iako zooremedijacija ima mnoge prednosti, postoje i neki nedostaci koje treba uzeti u obzir:

- **Ograničena primena:** Zooremedijacija je najefikasnija u specifičnim ekosistemima, poput vodenih staništa. U sušnim ili veoma zagađenim sredinama, gde životinje teško opstaju, njena primena može biti ograničena.
- **Spor proces:** U poređenju sa hemijskim metodama remedijacije, zooremedijacija može biti sporija jer se oslanja na prirodne procese filtracije i bioakumulacije zagađivača, što može zahtevati više vremena za postizanje željenih rezultata.
- **Osetljivost organizama:** Životinje korišćene u zooremedijaciji mogu biti osetljive na visoke koncentracije zagađivača, što može dovesti do uginuća ili smanjenja efikasnosti procesa. Takođe, te životinje mogu postati toksične za predatore ili ljude ako akumuliraju velike količine zagađivača.
- **Neprikladnost za složene zagađivače:** Zooremedijacija nije podjednako efikasna za sve vrste zagađivača. Složeni, toksični ili teški metali, kao i određene hemikalije, mogu biti preteški za biološki sistem životinja koje učestvuju u procesu.
- **Ekološki rizici:** Uvođenje novih životinjskih vrsta radi remedijacije može narušiti lokalni ekosistem, posebno ako te vrste postanu invazivne ili potisnu domaće vrste. To može izazvati poremećaje u ekološkoj ravnoteži.
- **Kontrola zagađivača:** Zooremedijacija ne eliminiše uvek zagađivače u potpunosti, već ih može samo akumulirati ili premestiti. U slučajevima gde životinje nakupljaju zagađivače, potrebni su dodatni koraci za sigurno upravljanje tim organizmima kako bi se sprečila sekundarna kontaminacija.

- **Klimatski i sezonski uticaji:** Efikasnost zooremedijacije može varirati u zavisnosti od klimatskih uslova i sezonskih promena. Na primer, zimi, niže temperature mogu smanjiti biološku aktivnost organizama, čime se usporava proces remedijacije.

Zooremedijacija se smatra ekonomičnijom metodom u poređenju sa mnogim drugim tehnologijama remedijacije, posebno zbog niskih troškova održavanja i prirodne uloge organizama u procesu, ali njena cena može varirati u zavisnosti od kompleksnosti zagađenja i potreba za monitoringom i upravljanjem ekosistemom.

2.5. Zagađenje životne sredine različitim zagađivačima – toksični efekti na čoveka

2.5.1. Zagađenje životne sredine naftnim zagađivačima

Poznato je da je naftna industrija okosnica nacionalne industrije mnogih zemalja, ali nasuprot tome mnoge aktivnosti vezane za istraživanja, transport i upotrebu nafte imaju štetan uticaj po životnu sredinu jer se pri ovim aktivnostima formira otpad i oslobađaju se teški metali. Sve to predstavlja veliki izazov u tretmanu otpada i kasnijem odlaganju, jer su mnoga istraživanja pokazala da je saniranje petrohemijskog otpada veliki izazov. (Jednak Berić et al. 2024)

Velika količina naftnih zagađivača utiče je na promenu karakteristika kako zemljišta tako i vode. U zavisnosti od karakteristika zemljišta i od vrste odnosno karakteristika zagađivača zavisi i stepen zagađenosti. Primenom različitih metoda koje uključuju hemijske, fizičke i biološke može se smanjiti uticaj zagađivača ili potpuno obezbediti njihovo uklanjanje, međutim ovo ne važi potpuno za naftne zagađivače jer se pokazalo i dokazalo da i pored primene različitih ispitanih, istraženih tehnika i tehnologija postiže se samo delimično uklanjanje ovog zagađivača. Međutim, jedan od načina izbegavanja kontaminacije zemljišta je praćenje koncentracije nafte u zemljištu i sprečavanje promena osobina zemljišta. Promena sastava zemljišta ima uticaja na floru i faunu u zavisnosti od koncentracije kontaminanta i interakcije zemljišta sa zagađivačem odnosno od dužine izloženosti. Istraživanja novije generacije su dovela do saznanja da bez obzira na koncentraciju da istrošeno motorno ulje ima negativne posledice na karakteristike zemljišta, kao i inhibitorne efekte na floru. (Khalefah et al. 2024) Ponašanje kontaminanata u životnoj sredini sa velikom preciznošću se prati određivanjem njegove koncentracije i sastava u različitim vremenskim periodima. (Jovancevic et al. 2008)

U slučajevima oštećenja rafinerijskih instalacija, uticaj na životnu sredinu u pogledu zagađenja može dostići velike razmere gde su posledice dugotrajne. Otpad koji nastaje u rafinerijskim postrojenjima je veoma kompleksnog sastava obzirom da se sastoji od naftnih derivata, nafte, katalizatora iz procesa hidrodosulfurizacije i pomoćnih sredstava za skupljanje naftnih kontaminanata, npr. rečni pesak. (Jednak Berić et al. 2024)

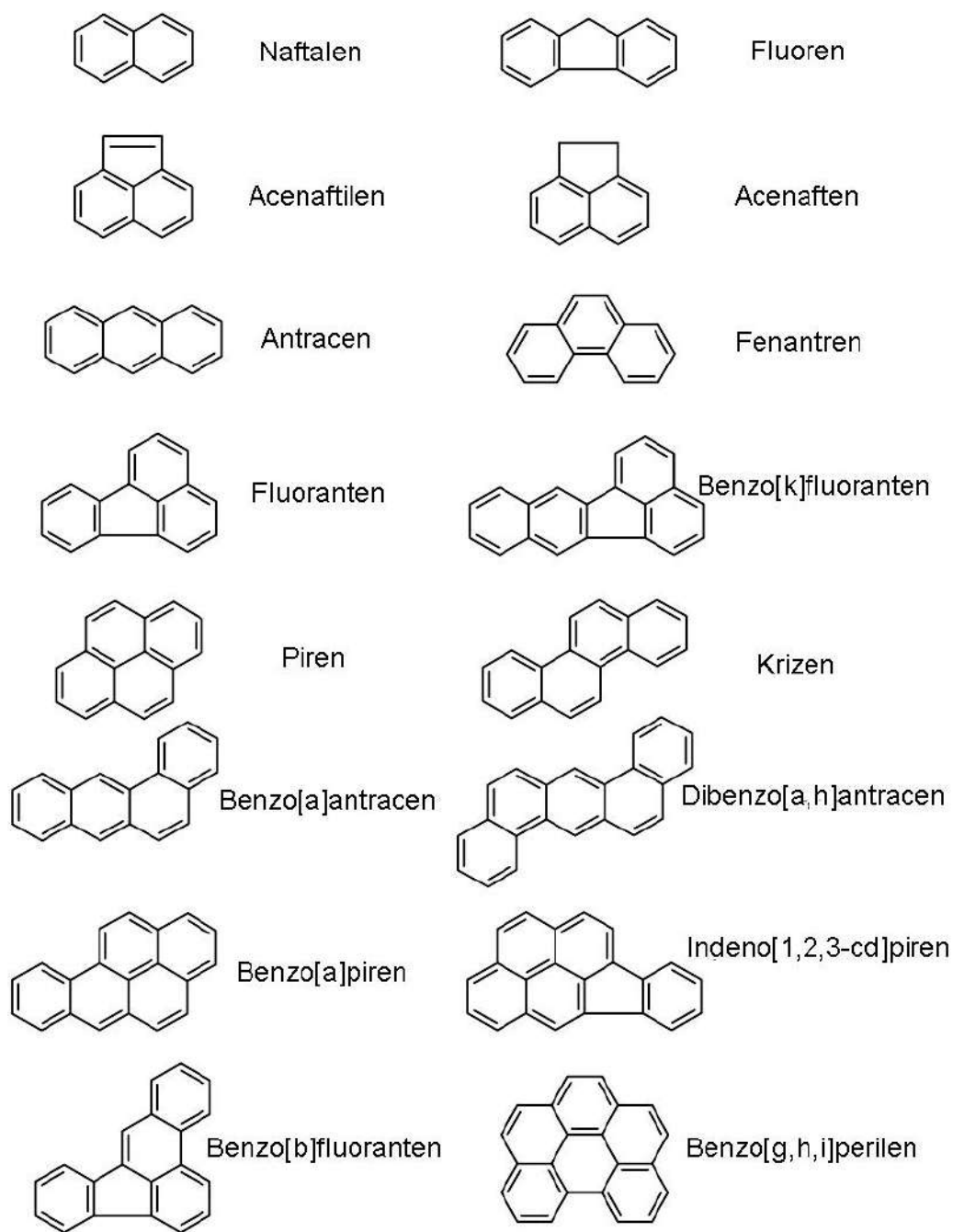
Čineći jednu trećinu svoje površine zemlja, kao i voda, predstavlja stanište koje je raznoliko za veliki broj živih bića. Ali, čovek je svojom aktivnošću doveo do velikih i značajnih promena u vodenim ekosistemima uvodeći različite zagađivače. Nafta i prirodni gas čine oko 50% svetske primarne energije i to od 2018. godine, gde je njihovim uvođenjem u ekosisteme narušeno javno zdravlje kao i životna sredina. U vodenoj sredini usled istraživanja nafte, skladištenjem i nesrećama koje se odvijaju na otvorenom moru praćene su čestim, akcidentnim izlivanjem sirove nafte pri čemu ona postaje glavni izvor zagađenosti i ispoljava negativni uticaj na vodeni ekosistem. (Khalefah et al. 2024)

Nedavna ekološka katastrofa koja se krajem avgusta početkom septembra 2019. godine koja predstavlja najveću katastrofu ovih razmera u tropskim regionima priobalja. U severoistočnom i jugoistočnom Brazilu došlo je do curenja sirove nafte što se negativno odrazilo na čak 950 plaža koje su dugačke i po nekoliko hiljada kilometara. Biološki sistemi su svojom aktivnošću pretvorili sirovu naftu u suspendovane sitne kapljice koje formirane na vodenoj površini onemogućavaju prolazak sunčeve svetlosti, što se negativno odražava na odvijanje procesa fotosinteze i smanjenje koncentracije kiseonika neophodnog za odvijanje života pod vodom. Na ovaj način narušen je i lanac ishrane što obuhvata i čoveka. (Sharma et al. 2024)

2.5.2. Zagađenje životne sredine PAH-ovima

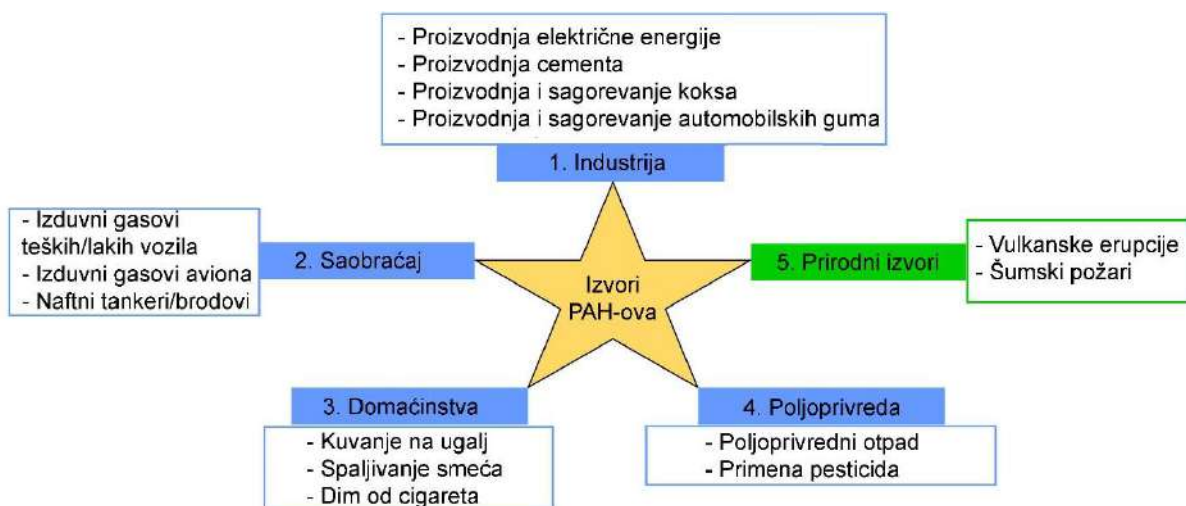
Naziv policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) predstavlja zajednički naziv za onu klasu jedinjenja koja sadrži 2-7 kondenzovanih aromatičnih nesuptituisanih prstenova. Prstenovi se sastoje od atoma vodonika i atoma ugljenika, dajući veliki broj jedinjenja koja se razlikuju. (Milic et al. 2016)

PAH-ovi su čvrsta jedinjenja koja mogu biti bezbojna, žućkasta ili bela. Raspored prstenova može biti linearan, ugaoni ili formirati klastere. U zavisnosti od broja prstenova PAH se klasifikuju na sledeći način: lake molekulske težine (LMV PAH; sa dva ili tri aromatična prstena) koji formiraju gasovitu fazu i PAH visoke molekulske težine (HMV PAH; sa četiri ili više aromatičnih prstenova) koji su u vidu čestica. Sledeća podela je na osnovu strukture prstenova i to na: alternativni PAH, nastali su fuzijom šest ugljenikovih benzenskih prstenova, dok nealternativni PAH poput fluorena sadrže fuziju šest ugljeničnih benzenskih prstenova zajedno sa dodatnim prstenom koji sadrži manje od šest ugljenikovih atoma. Na postojanost utiču p elektroni koji su gusto raspoređeni na prstenovima čineći da PAH-ovi budu dosta otporniji na nukleofilni napad. Godine 1983. Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (USEPA) proglasila je 16 PAH-ova zagađivačima visokog prioriteta. Glavne karakteristike PAH-ova su niska rastvorljivost u vodenoj sredini, visoka tačka ključanja i topljenja i nizak pritisak. Sa prastom molekulske težine i u zavisnosti od strukture smanjuje se njihova rastvorljivost a povećava se lipofilnost. Na slici (Slika 2.9) su prikazane hemijske strukture 16 PAH jedinjenja imenovanih od strane US EPA. (Fähnrich et al. 2002)



Slika 2.9 Hemijske strukture 16 PAH jedinjenja imenovanih od strane US EPA
Adaptirano iz Fährnich i saradnici (Fährnich et al. 2002)

Smatra se da je reč o stotinama različitih vrsta isparljivih jedinjenja koja vode poreklo od prirodnih (vulkanske erupcije, biogene reakcije koje se odvijaju u biljakama i bakterijama) i antropogenih izvora. Antropogeni izvori PAH-ova su nepotpuno sagorevanje naftnih derivata i njihovo ispuštanje, sagorevanjem uglja, spaljivanje biomase, kućnog i industrijskog otpada, topljenje aluminijuma (Slika 2.10). Ova jedinjenja dospevaju u životnu sredinu gde se asimiluju dovodeći do ozbiljnih zagađenja. (Milic et al. 2016; Yemele et al. 2024)



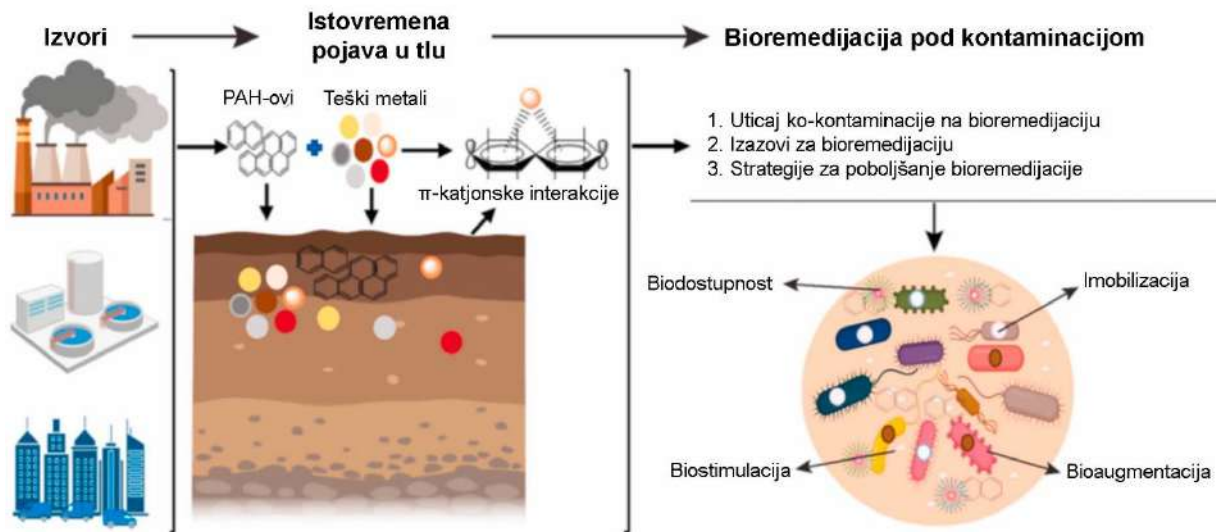
Slika 2.10 Različite vrste izvora emisije policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH)
Adaptirano iz Patel i saradnici (Patel et al. 2020)

Obzirom da PAH-ovi imaju veliki uticaj na opšte zdravlje i na životnu sredinu, značajno je razumeti njihovu složenu funkciju, kao i putanje njihove izloženosti i mehanizme uticaja, što istovremeno predstavlja osnovu za promene u zakonodavstvu i pronalaženje adekvatnih strategija za njihovo uklanjanje. (Venkatraman et al. 2024) Toksičnost PAH-ova zavisi od nekoliko faktora kao što su rastvorljivost, isparljivost, struktura i hidrofobnost. Sa porastom molarne mase raste i lipofilnost kao i hidrofobnost PAH-ova.

Sprovedenjem različitih, opsežnih, istraživanja u cilju smanjenja ili uklanjanja štetnog delovanja PAH-ova na životnu sredinu došlo se do nekoliko remedijacionih tehnika koje su imale svoje prednosti i mane. Fizičke i hemijske tehnike imaju velike nedostatke kao što su regulatorni zahtevi, visoki troškovi i složenost same tehnike.

Za razliku od fizičkih i hemijskih tehnika remedijaciona tehnika se oslanja na karakteristike PAH-ova (tip, koncentracija, biodostupnost), na zagađenost područja, na parametre zagađenosti životne sredine (pH, temperatura, koncentracija kiseonika) kao i na ekologiju mikroorganizama (sposobnost razgradnje, specifičnost mikrobnog susprata).

Nova istraživanja su pokazala da se PAH-ovi nalaze u koegzistenciji sa teškim metalima što karakteriše industrijske oblasti i nastaju kao rezultat antropogenog delovanja i neadekvatnim upravljanjem zagađenjem (stara, povučena vozla, loša kontrola emisije u industrijskim postrojenjima). Sinergističko i citotoksično delovanje PAH-ova i teških metala poslednjih godina predstavlja veliki globalni problem što je rezultovalo ulaganjem resursa u dalja istraživanja. Istraživanja su pokazala da je zemljište veoma zagađeno PAH-ovima i teškim metalima koji se vezuju za čestice (organske i mineralne) koje su prisutne normalno u zemljištu (Slika 2.11). Prisustvo ovih zagađivača u zemljištu dovodi do narušavanja ekosistema i negativnog uticaja na zdravlje ljudi, bilnog i životinskog sveta, što se u današnje vreme sve više dokumentuje. (Ali et al. 2022)



Slika 2.11 Bioremedijacija zemljišta zagađenog PAH-ovima i teškim metalima
Adaptirano iz Ali i saradnici (Ali et al. 2022)

Obzirom da PAH-ovi u velikoj meri ispoljavaju svojstva koja na živi svet mogu delovati mutageno ili pak kancerogeno, dovodi do velike zabrinutosti na svetskom nivou. Ovaj tip genotoksičnih supstanci dovodi do oksidativnog stresa i samim tim do oštećenja DNK i promena u procesu odvijanja replikacije molekula DNK što dovodi do kancerogenosti i mutacija. Nedavne studije koje su sprovedene pokazale su da usled zagađenosti životne sredine PAH-ovima dolazi do znatnog narušavanja strukture DNK molekula, kod školske dece čije su obrazovne ustanove udaljene svega 500 m od puteva koji su prometni. Rana izlaganja dečijeg organizma ovim supstancama dovode do razvoja hroničnih bolesti u kasnijem dobu. Materije koje su toksične i koje su prisutne u životnoj sredini dovode do postepenog razvoja kancera i hroničnih bolesti gde je do razvoja kliničke manifestacije potrebno da prođe nekoliko godina pa čak i decenije. Istraživanja su dala dokaz da će izloženost po organizam štetnim materijama u dečijem dobu, sa većom verovatnoćom dovesti do razvoja bolesti nego ista ili pak slična izloženost u kasnijem životnom dobu. (Hisamuddin et al. 2022)

Za merenje koncentracije PAH uspešno se pokazalo lišće drveća. Porozna, inertna površina sa bogatim lipidnim sadržajem što odlikuje koru od drveta, odlikuje se dobrim kapacitetom vezivanja odnosno akumulacijom PAH-ova. Ovaj pristup sa ovim tipom matrice se dosta retko koristi. Vezivanje PAH-ova za vegetativne biljne delove zavisi od vrste biljke kao i od karakteristika (morfoloških, hemijskih i fizioloških) svake biljne vrste.

U oblastima latinske Amerike nalaze se dve vrste drveća koje su široko rasprostranjene *Sambucus nigra* (*S. nigra*, drvo ili žbun iz porodice *Adokaceae*) i *Acacia melanoksilon* (*A. melanoksilon*, drvo iz porodice *Fabaceae*) čiji se delovi koriste u biomonitoringu pojedinih zagađivača vazduha (teški metali), ali dobijeni rezultati i sprovedena istraživanja su dosta oskudna. (Alexandrino et al. 2024)

2.5.3. Zagađenje životne sredine teškim metalima

Čak i pri malim koncentracijama teški metali mogu da dovedu do zabrinutosti obzirom na opasne uticaje na ekosistem. Zbog svoje ne biorazgradivosti, bioakumulacije u organima tačnije u tkivima i biomagnifikacije predstavljaju ozbiljnu pretnju po živi svet. Izvori teških metala su prikazani na slici (Slika 2.12).



Slika 2.12 Izvori zagađenja teškim metalima
Adaptirano iz Kapahi i Sachdeva (Kapahi and Sachdeva 2019)

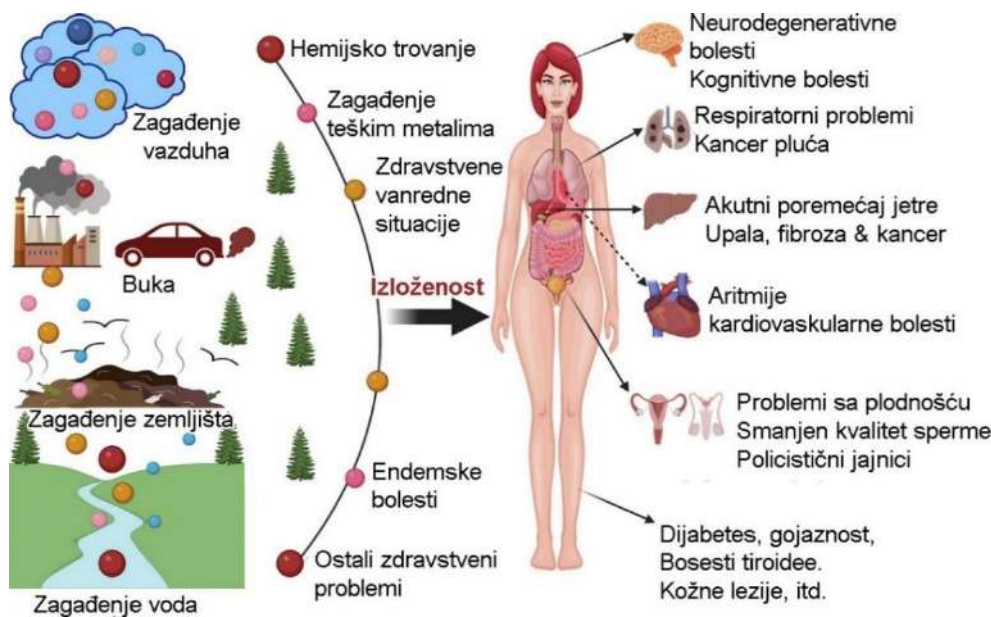
Širom sveta zagaćenost životne sredine teškim metalima predstavlja veliki problem. Iako se teški metali u koncentracijama koje su veoma niske tačnije u tragovima smatraju mikronutritijentima, životna sredina je kontaminirana i metalima u tragovima, koji pokazuju veliki opseg potencijalne toksičnosti kako kod ljudi tako i u životnoj sredini, jer dovode do mortaliteta i morbiditeta. (Abo-Alkasem et al. 2023; Özkara and Akyıl 2018)

Poznato je da reke imaju veoma važnu ulogu u različitim procesima, biogehemijskim putevima u okeanima, u sedimentacionim procesima u moru isporučujući na godišnjem nivou 20 milijardi tona metričkog nanosa do okeana. Vodena sredina ima veoma važnu ulogu u transportu i prihvatanju kontaminanata, u ovom slučaju metala, koji se adsorpcijom koja je fizičko-hemijska akumuliraju u vodi prisutnim sedimentima i to sve u zavisnosti od prirode supstance koja se adsorbuje i od prirode matriksa adsorbenta odnosno sedimenta. Vodeni sistemi utiču na dinamiku reke. Prisustvo kontaminanata kao što su teški metali utiče negativno na plovne puteve i na žive organizme kao i na vodoprivredu i vodene resurse i time ugrožavaju

hemijski i ekološki status koji su bitna tačka za Evropsku okvirnu direktivu o vodama, gde se ubraja i reka Vrbas. (Przulj et al. 2022)

Toksičnost kako teških metala tako i metala u tragovima postaje veliki globalni problem u velikom broju svetskih zemalja. (Özkara and Akyıl 2018) Jedan od glavnih zagađivača životne sredine teškim metalima su rafinerije nafte gde kao prilog tome govori činjenica da se upravo iz petrohemijske industrije dobije oko 800. 000 tona otpada u čvrstom stanju koga u velikom procentu čine katalizatori. (Jednak Berić et al. 2024)

Smatra se da zagađenost metalima može biti prikrivena, nepovratna i pre svega trajna. Ovaj tip zagađenja ispoljava svoj negativan uticaj kako na kvalitet vazduha, zemljišta i vode već ulazi i u lanac ishrane ljudi i životinja. Antropogene aktivnosti (industrija, sagorevanje fosilnih goriva, transport, itd.) doprinose da teški metali dospeju u životnu sredinu za čije se komponente vezuju što podrazumeva i biotičke sisteme. Teški metali dospevaju u organizam direktno (konzumiranjem kontaminirane vode, udisanjem prašine) ili indirektno što podrazumeva ishranu povrćem koje je raslo na kontaminiranom zemljištu. Za kadmijum i bakar je potvrđeno da predstavljaju otrove kumulativnog karaktera i ispoljavaju svoju veliku toksičnost gde usled česte i dugotrajne izloženosti npr. kadmijumom dolazi do razvoja adenokarcinoma na plućima, preloma kostiju, lezija proliferativne prirode na prostati, periferne neuropatije, tumora kože, vaskularnih bolesti. Direktnim gutanjem zemlje, udisanjem čestica prašine i konzumiranjem kontaminirane hrane teški metali direktno ulaze u ljudski organizam ispoljavajući svoje štetne efekte gde su prvi simptomi povraćanje, dijareja, mučnina, bol u stomaku, glavobolja, metalni ukus u ustima. (Özkara and Akyıl 2018)



Slika 2.13 Posledice izloženosti zagađenju

Adaptirano iz Sharma i saradnici (Sharma et al. 2023)

Usled narušavanja vodenog ekosistema postoji velika opasnost koja dovodi do narušavanja funkcionisanja gastrointestinalnog sistema i česte pojave zaraznih bolesti. (Sharma et al. 2023)

Do zagađenja zemljišta može doći namerno (navodnjavanje otpadnim vodama, đubriva, olovna boja, kanalizacioni mulj, izlivanja destilata nafte, deponije otpada, itd.) ili slučajno (plavljenje vodenih ekosistema, kao i na primer nezgodama vozila koji prevoze toksične hemikalije). Obzirom da se teški metali odlikuju postojanošću i samim tim su slabo ili uopšte nerazgradivi i u tim slučajevima ne mogu da se degraduju mikrobnim ili hemijskim putem i tada ostaju u

zemljištu dugo predstavljajući rizik za biljni i životinjski svet i za čoveka i dovode do promena u svojstvima zemljišta (pH, boja, hemijske karakteristike, poroznost) i do zagađenosti vode. (Sharma et al. 2023)

Stopa zagađenosti zemljišta je u 2016. godini iznosila 16,1 % gde je veliki stepen zagađenosti poreklom od teških metala i to najviše od hroma, žive, olova i arsena. Najveći udeo u stepenu zagađenja imaju hrom i arsen, čineći 40 % zagađenosti zemljišta (poljoprivrednog). Stepenu zagađenosti zemljišta se ne može meriti ili posmatrati eksplicitno, ali predstavlja veliki izazov za naučnu javnost. Ovaj tip zagađivača ne podleže degradaciji (hemijskoj i mikrobiloškoj) kao što je to slučaj sa organskim zagađivačima. Teški metali se dugo akumuliraju i predstavljajući pretnju za život i normalno funkcionisanje ekosistema i ljudskog organizma. Na osnovu ovoga se može reći da je kontrola i sanacija zagađenosti kao i nastavak daljeg istraživanja od suštinskog značaja za funkcionisanje ekosistema. (Wang et al. 2022)

Razvojem različitih grana industrije dovelo je do zagađenosti vodenih sistema. Istraživanja su pokazala da korišćenje otpadnih voda iz industrijskih postrojenja ima negativan uticaj na osobine vode. Otpadna voda iz industrije koja je ispuštena u životnu sredinu pre nego što je prethodno tretirana, je penasta i često obojena i sadrži toksične boje, alkalije, boje i teške metale. U industrijama galvanizacije koncentracije nikla i hroma prelaze referentne vrednosti. Gvožđe, cink, mangan i bakar su karakteristični za industriju kože i prisutni su u nedozvoljenim koncentracijama u otpadnim vodama. (Kapahi and Sachdeva 2019)

U kanalizaciji se teški metali nalaze u visokim koncentracijama jer ne podležu procesu razgradnje usled tretmana otpadne vode. Međutim, uvođenje zakonske regulative i primenom tehnologija koje su razvijene sa ciljem smanjenja koncentracije zagađivača pre ispuštanja u konačni recipijent. Teški metali u vodenoj sredini ulaze u lanac ishrane kroz vodene sisteme (flora, fauna) utičući na predatore (veće ribe, ptice, sisari, ljudi) migrirajući i prenoseći zagađivač. (Briffa et al. 2020)

Svetska zdravstvena (SZO) i Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (USEPA) dodelila je gornju granicu za različite teške metale koji mogu biti prisutni u vodi (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 Gornje dozvoljene granice za različite teške metale

Metal	Simbol	WHO ($\mu\text{g/L}$)	USEPA ($\mu\text{g/L}$)
Kadmijum	Cd	3	5
Olovo	Pb	10	15
Hrom	Cr	50	100
Živa	Hg	1	2
Cink	Zn	1000	1000
Bakar	Cu	2000	1300
Nikl	Ni	20	/
Aluminijum	Al	200	200
Mangan	Mn	100	50
Gvožđe	Fe	300	300
Arsen	As	10	10

Adaptirano iz Abo-Alkasem i saradnici (Abo-Alkasem et al. 2023)

Teški metali dovode do stvaranja slobodnih radikala koji dovode do oštećenja DNK molekula, peroksidacije lipida. Narušena je homeostaza kalcijuma kao posledica promena odnosno oštećenja mebrane. Dosadašnja istraživanja koja se odnose na stvaranje slobodnih radikala su sprovedena u slučaju gvožđa, bakra, hroma, kadmijuma i nikla. Nikl, kadmijum i hrom su prepoznati kao kanceorgen. (Briffa et al. 2020)

Ceo sistem zaštite životne sredine na globalnom, svetskom nivou treba da ima cilj sa ublaži ili ukloni uticaj različitih zagađivača na zdravlje čoveka. To se može postići ulaganjima i primenom pravila i propisa kojima se prvenstveno odnose na adekvatno zbrinjavanje otpada, smanjenje nivoa zagađenja a pre svega na podizanje svesti civilizacije kroz održivu praksu i čistije izvore energije i to na globalnom nivou. (Sharma et al. 2023)

Hemijska precipitacija, elektrohemijsko uklanjanje i jonska razmena predstavljaju samo neke od konvencionalnih pristupa za uklanjanje teških metala iz vode kojima se postiže nepotpuno uklanjanje metala, pri čemu nastaje toksičan mulj i imaju velike zahteve u pogledu energije. Iz prethodno navedenog potrebno je pronaći efikasna i prihvatljiva rešenja sa ekološkog aspekta (npr. biološki, nanotehnološki pristup, korišćenje biopolimera). (Zamora-Ledezma et al. 2021)

Zagađenje životne sredine na globalnom nivou predstavlja međunarodno pitanje javnog zdravlja jer problemi zagađenja životne sredine su posledica društvenog zakonodavnog i ekonomskog aspekta kao posledica brze urbanizacije i industrijalizacije koja dostiže ogromne razmere širom sveta. (Manisalidis et al. 2020)

2.6. Bioremedijacija životne sredine zagađene naftom i derivatima nafte

Degradacija organskih supstanci mikroorganizmina predstavlja bitan proces transformacije koji se tokom poslednjih godina efikasno koristi u sanaciji naftom kontaminiranih sredina, u prisustvu mikrobnih zajednica koje obezbeđuju efikasniji i uspešniji proces biorazgradnje. (Avdalović et al. 2021)

Odabir tehnike za uklanjanja nafte i derivata nafte zavisi od sadržaja nafte i od karakteristika kontaminirane lokacije na kojoj je došlo do izlivanja nafte. Metode zasnovane na kontrolisanju izlivanja nafte i njenih derivata u životnu sredinu su ispitane, istražene i opisane. Uobičajne, metode i tehnike se zasnivaju na primeni plutajućih barijera, posudama za sakupljanje, hemijskim disperzantima, fizičkom razlaganju odnosno degradaciji, primeni surfaktanata. Hemijske metode eliminacije zagađivača su brže dosta od fizičkih metoda ali se zasnivaju na upotrebi hemikalija i sredstava koja su u većini slučajeva toksični. (Sayed et al. 2021)

Za zemljište i sedimente nije definisana koncentracija organskih, nativnih, supstanci kao što su npr. bitumen/ulje koji se karakterišu kao rastvorni u organskim rastvaračima i njihove koncentracije mogu da se kreću od 0 (sediment bez organskih supstanci) do 100 % (sediment sa primesama ulja, površinsko). U ovaj opseg ulaze one koncentracije koje se nalaze u više vrsta sedimenata ili u naslagama, površinskih, škriljaca ili uglja koji se odlikuju različitim nivoima karbonifikacije. Na osnovu prethodno navedenog nije moguće da se odredi maksimalno dozvoljena koncentracija za kontaminante ove vrste u zemljištu i u sedimentima. Evidentno je da je nemoguće odrediti koncentraciju organske supstance u ekstraktu i to nije relevantan parametar za određivanje prisustva kontaminanta (npr. ulja) jer ne može da se proceni poreklo organske supstance samo na osnovu količine ekstrakta. (Samelak et al. 2018)

Sredine kontaminirane ugljovodonicima odlikuju se alkalnim ili kiselim pH, visokim ili niskim temperaturama, visokim pritiskom i koncentracijom soli. Mikrobi koji pokazuju potencijal u razgradnji ugljovodonika imaju sposobnost prilagođavanja i mogu da napreduju i rastu u ovim sredinama istovremeno imajući bitnu ulogu u tretmanu sredina koje su ekstremno kontaminirane. Dokazano je da se transformacija ili mineralizacija odnosno putevi biorazgradnje odvijaju u ekstremno kontaminiranim sredinama i uključuju razgradnju velikog spektra jedinjenja ugljovodoničnog porekla što podrazumeva halogenovana i nitrovana jedinjenja, kao i alifatična jedinjenja. (Margesin and Schinner 2001)

Uticaji na životnu sredinu koji nastaju kao posledica izlivanja jedinjenja ugljovodonika mogu se identifikovati određivanjem koncentracije ukupnih ugljovodonika (Total Petroleum Hydrocarbon-TPH). (Alvernia et al. 2021) TPH predstavlja indikator za kvantifikaciju kontaminacije koji u slučaju izlivanja ugljovodonika nafte može imati vrednosti od 20-50 g kg⁻¹, u zemljištu, gde ta koncentracija može imati negativne posledice po ekosistem i zdravlje ljudi. (Baniyasi and Mousavi 2018)

U hladnim ekosistemima odvija se proces biorazgradnje i na taj način omogućava se biotretman otpadnih voda, zahvaljujući prisustvu mikroorganizama i njihovoj sposobnosti prilagođavanja. Termofilni organizmi (uglavnom bacili) su korisni u procesu biorazgradnje ugljovodoničnih jedinjenja niske rastvorljivosti. Za bioremedijaciju pustinjskog zemljišta kontaminiranog naftom glavni su autohtoni termofili. Biološki posredovana razgradnja u slanim močvarama i industrijskim vodama koje su kontaminirane aromatičnim ili hlorisanim ugljovodonicima je od interesa za odvijanje procesa biološkog tretmana odnosno bioremedijacije. (Margesin and Schinner 2001)

Proučavanje biomarkera u slučajevima kontaminacije naftnim polutantima je korisno sa aspekta procene njegove dalje sudbine i formacijama sedimenta što podrazumeva i podzemne i površinske vode. Migracije nafte kroz formiranje vodeno-vlažnih sedimenata su moguće kroz praćenje zastupljenosti i distribucije biomarkera aromata i alkana pod uslovima koji vladaju u životnoj sredini kao i uslova koji vladaju u laboratoriji. (Samelak et al. 2018)

Mikroorganizmi koji razgrađuju ugljovodonike metaboliše samo određene ugljovodonike. Iz tog razloga potrebno je prisustvo velikog broja različitih vrsta mikroorganizama da bi remedijacija bila efikasna. Tokom remedijacije dolazi do promene koncentracije svake vrste posebno. (Ollivier and Magot 2005)

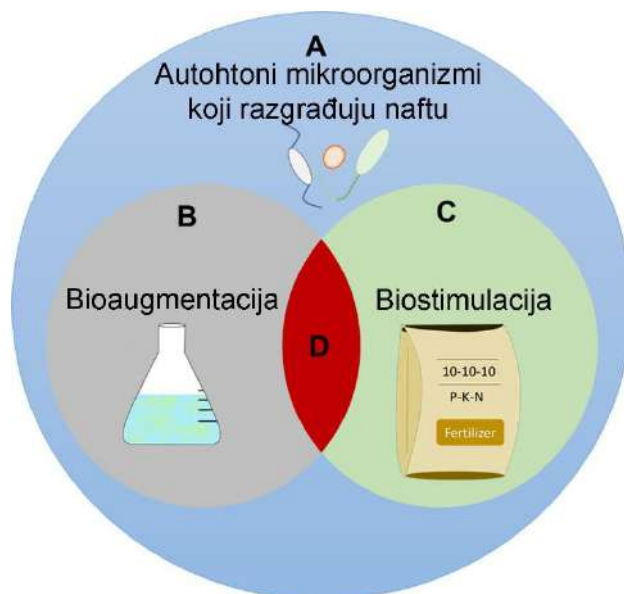
Tako npr. ukoliko dođe do izlivanja dominantne su vrste mikroba (bakterije – *Alcanivoraxa*, *Actinomyces*, *Gordonia*; cijanobakterije – *Anabaena*, *Plectonema*, *Aphanocapsa*; gljive – *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Candida*), koje će prvo razgraditi alkane. Kada se relativna koncentracija alkana smanji, nakon par nedelja kako je došlo do izlivanja, postaju dominantne vrste koje degraduju PAH-ove itd. (Tabela 2.6) Ograničenost bioremedijacije je u pogledu sposobnosti metabolisanja nafte od strane autohtonih mikroorganizama i brzine prilagođavanja mikrobnog konzorcijuma.

Tabela 2.6 Primeri mikrobnih razgrađivača nafte

Mikroorganizmi	Rod	Komponenta nafte koju mikroorganizam razgrađuje
Bakterije	<i>Alcanivorax</i>	n-alkani (C8 – C32)
	<i>Actinomyces</i>	n-alkani
	<i>Bacillus</i>	n-alkani (C13 – C30), aromati
	<i>Gordonia</i>	n-alkani
	<i>Marinobacter</i>	n-alkani
	<i>Pseudomonas</i>	n-alkani (C14 – C30), ostaci
	<i>Cycloclasticus</i>	aromati
	<i>Rhodococcus</i>	n-alkani (C13 – C17), aromati
	<i>Staphylococcus</i>	aromati
Cijanobakterije	<i>Anabaena</i>	n-alkani
	<i>Aphanocapsa</i>	n-alkani i aromati
	<i>Microcoleus</i>	aromati
	<i>Oscillatoria</i>	aromati
	<i>Nostoc</i>	aromati
	<i>Plectonema</i>	n-alkani i aromati
Alge i dijatomeje	<i>Amphora</i>	aromati
	<i>Chlamydomonas</i>	aromati
	<i>Chlorella</i>	aromati
	<i>Dunaliella</i>	aromati
	<i>Prototheca</i>	aromati
	<i>Ulva</i>	aromati
Gljive	<i>Aspergillus</i>	n-alkani i aromati
	<i>Candida</i>	n-alkani i aromati
	<i>Fusarium</i>	n-alkani i aromati
	<i>Penicillium</i>	n-alkani (C11 – C25) i aromati
	<i>Trichoderma</i>	n-alkani i aromati

Adaptirano iz Pete i saradnici (Pete et al. 2021)

Brojnost vrsta koje učestvuju u remedijaciji zavisi od više faktora i to od vremenskih uslova, faktora ekosistema, saliniteta, dostupnost izvora ugljenika, temperature, koncentracije kontaminanta. Da bi process bio što uspješniji pristupa se bioagumentaciji i biostimulaciji, kao i njihovom kombinacijom (Slika 2.14). (Pete et al. 2021)



Slika 2.14 Biorazgradnja nafte

(A) Biorazgradnja je proces kroz koji autohtoni mikroorganizmi koji razgrađuju naftu konzumiraju ili razgrađuju različite komponente nafte izlivenne u morskim sredinama. (B) Bioaugmentacija za naftne izlive je metoda za poboljšanje biorazgradnje naftnih izliva dodavanjem uzgajanih mikroorganizama koji razgrađuju naftu. (C) Biostimulacija naftnih izliva je metoda poboljšanja biorazgradnje naftnih izliva dodavanjem nutrijenata koji ograničavaju rast, poput azota i fosfora, obično u obliku đubriva. (D) Preklapanje, kombinacija bioaugmentacije i biostimulacije za poboljšanje biorazgradnje naftnih izliva.

Adaptirano iz Pate i saradnici (Pete et al. 2021)

Bioremedijacija kontaminirane životne sredine, na osnovu istraživanja, se oslanja na dobijene podatke na osnovu naučno-istraživačkih studija koje se oslanjaju na činjenicu da se veliki broj ugljovodoničnih polutanata razgrađuje u prisustvu populacija autohtonih mikroba, pri čemu nastaju voda i ugljen dioksid kao produkti razgradnje. Mikroorganizmi u ulju su sveprisutni, a takođe uspešnost bioremedijacije u poređenju sa ostalim fizičko-hemijskim metodama je efikasna naročito kada je reč o nafti i rafinisanim proizvodima koji su biorazgradivi. Međutim, kada je reč o uljima, postoje jedinjenja koja su slabo razgradiva ili ne razgradiva što predstavlja ograničavajući faktor bioremedijacije u sanaciji kontaminacije naftom. (Solevic et al. 2011)

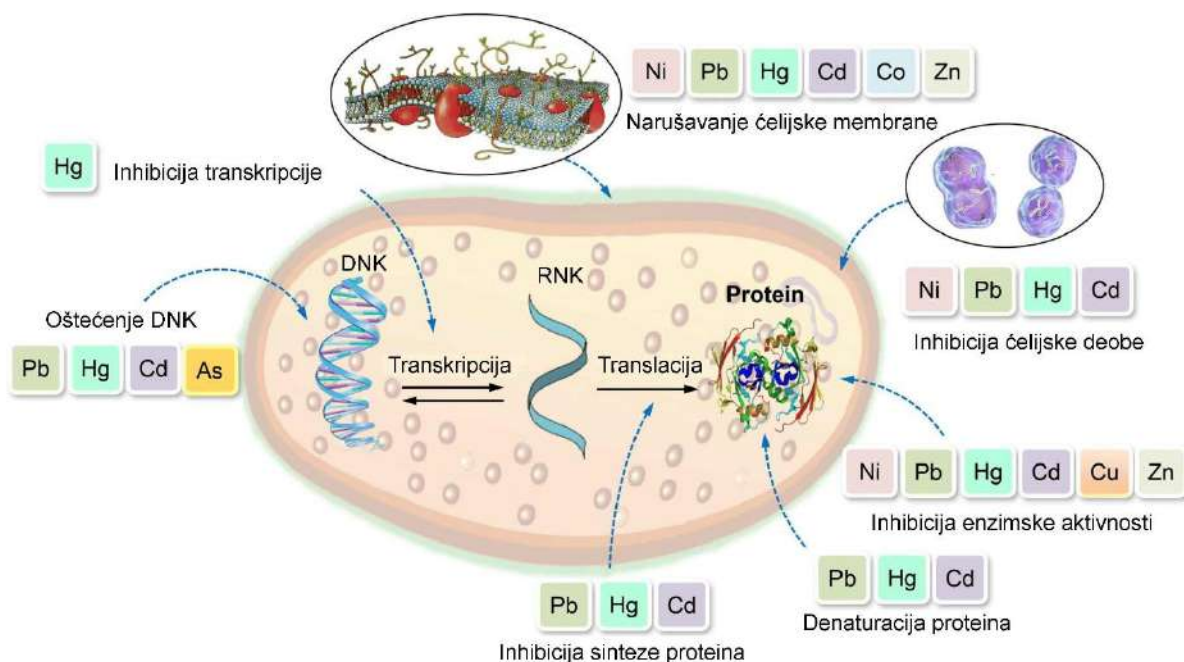
Nafta je složena mešavina različitih ugljovodonika i jedinjenja azota, sumpora i kiseonika, što i odgovara činjenici da je potrebno spovesti studije da bi se odredili optimalni uslovi za izvođenje procesa i definisali mikroorganizmi koji će doprineti uspešnosti izvođenja bioremedijacije što je uslovljeno činjenicom da se svaka klasa jedinjenja i pojedinačna jedinjenja različito razlažu u zavisnosti od uslova. (Ali et al. 2013)

Biorazgradnja ugljovodoničnih jedinjenja se zasniva na stvaranju intermedijernih, transformacionih proizvoda kao što su kinoni, kateholi. Ukoliko se izluče tokom biorazgradnje PAH-ova predstavljaju prekursore za humifikacioni proces. (Avdalović et al. 2021; Jednak et al. 2017)

2.7. Toksični efekat teških metala na mikrobne ćelije

Toksičnost teških metala zavisi od više faktora, zasnovanih na degradaciji funkcija enzima što ima za posledicu smrtnost, dolazi do poremećaja u jonskoj regulaciji, uticaj na strukturi proteina i DNK molekula, dolazi do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species* – ROS). Na primer, bakar ima ulogu u stvaranju ROS, igrajući ulogu nosača elektrona koji je rastvorljiv. Pod dejstvom teških metala citoplazmatski proteini, lipidna jedinjenja, DNK molekuli i proteini se oštećuju. (Igiri et al. 2018)

Teški metali utiču na enzimsku aktivnost, na koju imaju uticaja i karakteristike kontaminiranog zemljišta kao što su organski sadržaj, pH i hemijski sastav. Negativan uticaj zemljišta nastaje kao rezultat smanjenja aktivnosti enzima i to katalaze, lipolitičke aktivnosti i enzima ureaze. Sa smanjivanjem bioraspodivnosti kadmijuma, olova i bakra u zemljištu koje je tretirano dolazi do povećane enzimске aktivnosti što ukazuje na to da postoji korelacija koja je inverzna u pogledu enzimске aktivnosti i koncentracije teških metala. (Matinian et al. 2020)



Slika 2.15 Toksičnost teških metala

Adaptirano iz Abd Elnabi i saradnici (Abd Elnabi et al. 2023)

2.8. Mikroorganizmi koji učestvuju u bioremedijaciji

Mikrobiološka ekologija ili ekologija mikroorganizama je nauka o mikroorganizmima i njihovim interakcijama sa drugim mikroorganizmima i okolinom, jer veliki broj različitih mikroorganizama živi zajedno, u kompleksnom odnosu sa drugim mikrobima, biljkama i životinjama. Mikrobi su najsitnija bića na Zemlji, ali uprkos svojoj maloj veličini, imaju ogroman uticaj na nas i našu okolinu. (Stolp 1988)

Mikroorganizmi su kolonizovali planetu Zemlju mnogo pre ljudi. Igraju bitnu ulogu u zemljištu, morima i okeanima. Ciklično kretanje skoro svih materija na planeti Zemlji je pod uticajem mikrobnih procesa, a klima i atmosfera naše planete u velikoj meri zavise od ovih procesa.

Ogromna raznovrsnost mikroorganizama i kompleksnost sredine u kojoj žive je pravi izazov za naučnike. Ekologija ovih zajednica nije ni približno dobro poznata kao kod složenih biljaka i životinja, a jedan od razloga je to što je do sada poznato i opisano samo 1% mikroorganizama.

Zemljišne bakterije zajedno sa gljivama su eksperti za reciklažu. Tokom miliona godina uspevale su da spreče akumulaciju organskih materija u zemlji i vodi. S obzirom da ne mogu da razlože kompleksne sintetičke sastojke kao što je polimerna plastika ili neke polihlorovane ugljovodonike, treba biti pažljiv tokom odlaganja ovakvog otpada. Alternativa bi mogla da bude genetska modifikacija mikroorganizama, kako bi stekli sposobnost da odstrane i ovu vrstu nerazloživih materija iz prirode.

Ubrzana industrijalizacija i urbanizacija je takođe dovela do oslobađanja toksičnih metala i radionukleoida u biosferu, koji ozbiljno utiču na metabolizam živih organizama i predstavljaju permanentnu pretnju zdravlju. Neke bakterije mogu da otklone ili imobilišu ove toksične materije: *Citrobacter* kadmijum (Shim et al. 2015), *Acidithiobacillus ferrooxidans* srebro (Zhang et al. 2020d), *Pseudomonas aeruginosa* uranijum (Sar and D'Souza 2001), *Micrococcus luteus* stroncijum (Ilyas et al. 2020), *Saccharomyces cerevisiae* uranijum (Zhang et al. 2020c).

Samo nekoliko vrsta bakterija može da vrši azoto-fiksaciju. Mikrobnna fiksacija atmosferskog azota u zemljištu, vrše bakterije, poput *Azotobacter* i bakterije koje žive u simbiozi sa biljkama, kao što su *Rhizobium*. U vodenoj sredini, cijanobakterije, kao što je *Nostoc*, fiksiraju atmosferski azot. (Do Nascimento et al. 2015)

Važna uloga nekih mikroorganizama je simbioza sa biljkama. *Azoracis* je bakterija koja živi u simbiozi sa biljkama iz familije leguminoza. Ova bakterija konvertuje azot iz zemljišta u formu koju ove biljke koriste. Sada se proučava kako bi ovaj tip simbioze mogao da se koristi u konceptu gajenja drugih, za ljudsku ishranu važnih, biljaka u cilju boljih prinosa bez korišćenja veštačkih đubriva. (Muhammad et al. 2019)

U morima i okeanima, koji predstavljaju specifično stanište zbog mnogobrojnih faktora kao što su salinitet, nizak nivo nutritijenata u otvorenim okeanima, specifični lanci ishrane, niske temperature i povećanje pritiska sa dubinom, odvija se veliki spektar mikrobnih procesa.

Raznovrsnost mikrobnih procesa se poklapa sa raznovrsnošću bakterijskih vrsta koji ih pokreću. Ovi mikroorganizmi su u stanju da smanje koncentraciju i oksidišu sumporna i azotna jedinjenja, ali i problematična, kao što su petroleum ili mnogobrojni pesticidi koji dospevaju u mora i okeane.

Istraživanja u oblasti ekologije mikroorganizama obuhvataju uticaj okoline na mikrobiološki rast i razvoj. Pored fizioloških i hemijskih promena u okolini, biološka adaptacija omogućava bakterijama i arheama da optimizuju upotrebu dostupnih nutritijenata neophodnih za rast. (Barton and Northup 2011)

Mikrobiološka populacija je u stanju da toleriše i da se razvija pod različitim ekološkim uslovima, uključujući staništa sa ekstremnim uslovima, kao što su vruća vrela i slana jezera. Razumevanje ekoloških faktora koji kontrolišu rast mikroba i opstanak nudi uvid u distribuciju mikroorganizama u prirodi i mnoge studije mikrobne ekologije su bazirane na ispitivanju adaptivnih karakteristika, koje dozvoljavaju određenim mikrobnim vrstama da funkcionišu u pojedinim staništima.

U okviru staništa neki mikroorganizmi su autohtoni, pune funkcionalne niše u ekosistemu, a drugi su alohtoni (strani), preživljavaju u staništu, ali ne popunjavaju ekološke niše. Zbog svoje raznovrsnosti i široke distribucije, mikroorganizmi su izuzetno važni u ekološkim procesima. Dinamične interakcije između mikrobiološke populacije i njihovog okruženja i metaboličke aktivnosti mikroorganizama su od suštinskog značaja za podršku produktivnosti i održavanje kvaliteta životne sredine ekosistema. Mikroorganizmi su ključni za degradaciju životne sredine i za održavanje ekološke ravnoteže ekosistema.

Različite interakcije između mikroorganizama, biljaka i životinja obezbeđuju stabilnost unutar biološke zajednice datog staništa i obezbeđuju očuvanje raspoloživih resursa i ekološke ravnoteže. Interakcije između mikrobioloških populacija mogu imati pozitivne ili negativne efekte, mogu dovesti do poboljšanja sposobnosti populacije da preživi ili da utiču na ograničavanje gustine naseljenosti. Prenos ugljenika i energije, koji se nalaze u organskim jedinjenjima dovodi do formiranja integrisane strukture (foodweb). (Allesina et al. 2008) Mikrobiološka dekompozicija mrtvih biljaka i životinja i delimično razložene organske materije, ukazuje na to da je foodweb odgovoran za konverziju organskih materija do ugljen dioksida.

Mikrobiološka ekologija može da nam pokaže naše mesto u kosmosu – kako je život nastao i kako se razvio. Studije mikrobne ekologije mogu nam pomoći da unapredimo naše živote preko upotrebe mikroba u očuvanju prirodne sredine, proizvodnji hrane, bioinženjeringu korisnih proizvoda, kao što su antibiotici, prehrambeni dodaci i hemikalije. (ISME n.d.)

Jedan od važnih zadataka u budućnosti bi bio razvitak boljih metoda za proučavanje i opis ovih vrsta, proučavanje njihove ekofiziologije i njihove funkcionalne uloge koju imaju u okviru prirodne interakcije između organizama. Naučnici veruju da bi populacija mikroba mogla biti od velike koristi u stabilizaciji ekosistema.

Mikroorganizmi imaju sposobnost bioremedijacije i u aerobnim uslovima pokazujući visok stepen sposobnosti razgradnje složenih organskih jedinjenja. U bakterije koje imaju sposobnost aerobne razgradnje pesticida, poliaromatičnih jedinjenja, alkalne ugljovodonije spadaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* i *Micobacterium*. Glavni ograničavajući faktor za odvijanje bioremedijacije u aerobnim uslovima je prisustvo kiseonika. (Gojgic-Cvijovic et al. 2012; Milic et al. 2009)

Za bioremedijaciju PAH-ova, hlorisanih rastvarača i jedinjenja hlora trihloretilena, hloroforma koriste se amfibijske bakterije koje imaju sposobnost prevođenja zagađivača u manje toksičnu formu. (Bala et al. 2022)

Mikroorganizmi koji razgrađuju razne polutante su navedeni u donjim tabelama (Tabela 2.7 - Tabela 2.10). Sve tabele su adaptirane iz Abatenh i saradnici. (Abatenh et al. 2017)

Tabela 2.7 Interakcija mikroorganizama i ugljovodonika

Mikroorganizmi	Jedinjena
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Monociklični aromatični ugljovodonici, benzen, toluen, etilbenzen i ksileni, fenolna jedinjenja.
<i>P. alcaligenes P. mendocina i P. putida P. veronii, Achromobacter, Flavobacterium, Acinetobacter</i>	Petrol i dizel policiklični aromatični ugljovodonici, toluen.
<i>Pseudomonas putida</i>	Monociklični aromatični ugljovodonici, npr. benzen i ksilol.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Bifenil i trifenilmetan.
<i>A. niger, A. fumigatus, F. solani i P. funiculosum</i>	Ugljovodonici.
<i>Coprinellus radians</i>	PAH-ovi, metilnaftaleni i dibenzofurani.
<i>Alcaligenes odorans, Bacillus subtilis, Corynebacterium propinquum, Pseudomonas aeruginosa</i>	Fenol
<i>Tyromyces palustris, Gloeophyllum trabeum, Trametes versicolor</i>	Ugljovodonici
<i>Candida viswanathii</i>	Fenantren, benzopiren
Cijanobakterije, zelene alge, dijatomi i <i>Bacillus licheniformis</i>	Naftalen
<i>Acinetobacter sp., Pseudomonas sp., Ralstonia sp. and Microbacterium sp.</i>	Aromatični ugljovodonici
<i>Gleophyllum striatum</i>	Piren, antracen, 9-metilantracen, dibenzotiofen, lignin peroksidaza.

Tabela 2.8 Grupe mikroorganizama važne za bioremedijaciju nafte

Mikroorganizmi	Jedinjenja
<i>Fusarium</i> sp.	Nafta.
<i>Alcaligenes odorans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium propinquum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nafta.
<i>Bacillus cereus</i> A	Dizel ulje.
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> i <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sirova nafta.
<i>B. brevis</i> , <i>P. aeruginosa</i> KH6, <i>B. licheniformis</i> i <i>B. sphaericus</i>	Sirova nafta.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Arthobacter</i> sp i <i>Bacillus</i> sp	Dizel ulje.
<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Citrobacter koseri</i> i <i>Serratia ficaria</i>	Dizel uglje, sirova nafta.

Tabela 2.9 Mikroorganizmi koji učestvuju u bioremedijaciji teških metala

Mikroorganizmi	Jedinjenja
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Teški metali, olovo, živa i nikl.
<i>Cunninghamella elegans</i>	Teški metali.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Mn ²⁺ i Cu ²⁺
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CBAM5	Kobalt, bakar, hrom i olovo.
<i>Microbacterium profundi</i> Shh49T	Fe
<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Terichoderma</i> sp., <i>Microsporium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.	Kadmijum
<i>Geobacter</i> spp.	Fe(III), U(VI)
<i>Bacillus safensis</i> (JX126862) sojevi (PB-5 i RSA-4)	Kadmijum
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aeromonas</i> sp.	U, Cu, Ni, Cr
<i>Aerococcus</i> sp., <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Pb, Cr, Cd

Tabela 2.10 Potencijalni biološki agensi za degradaciju pesticida

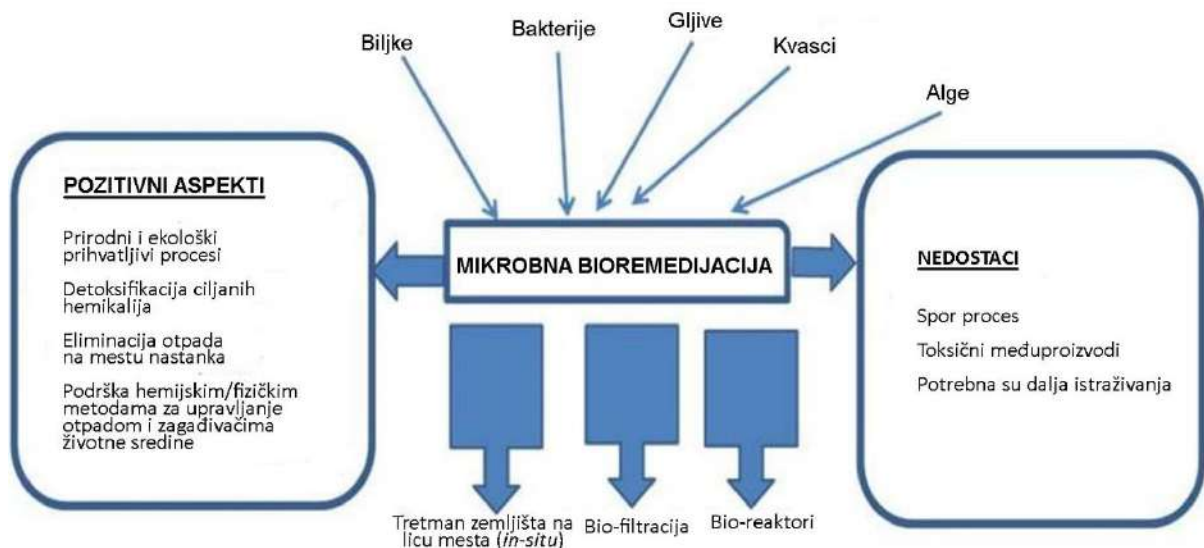
Mikroorganizmi	Jedinjenja
<i>Bacillus, Staphylococcus</i>	Endosulfan
<i>Enterobacter</i>	Hlorpirifos
<i>Pseudomonas putida, Acinetobacter sp., Arthrobacter sp.</i>	Ridomil MZ 68 MG, Fitoraz WP 76, Decis 2.5 EC, malation
<i>Acenotobacter sp., Pseudomonas sp., Enterobacter sp. i Photobacterium sp.</i>	Hlorpirifos i metil paration

2.9. Bioremedijacija životne sredine zagađene teškim metalima

Teški metali su elementi čija je gustina veća od 5 g/cm^3 . U ovu grupu spadaju i metaloidi i metali čija je atomska masa veća od 4000 kg/m^3 ili 5 puta veću od vode. Nekoliko metala kao što su kadmijum, hrom, kobalt, bakar, olovo, nikl, živa, vanadijum, kalaj i cink se javljaju kao kontaminanti u životnoj sredini. Uglavnom se nalaze u nerastvorljivom obliku što podrazumeva da se nalaze u obliku karbonata, silikata, oksida, sulfida, a ukoliko su u rastvorljivom obliku tada su u obliku soli. Teški metali kada su prisutni u jonskom obliku (Pb^{2+} , Hg^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+}) grade komplekse sa biomolekulima predstavljajući najotrovnije kontaminante. (Abo-Alkasem et al. 2023) Usled kontaminacije zemljišta teškim metalima mikrobna populacija je podložna promenama jer su u tim slučajevima ćelije pod stresom izazvanim metalima i potrebna je veća količina energije što rezultuje i smanjenje koncentracije ugljenika. (Verma and Kuila 2019) Glavni razlog porasta kontaminacije životne sredine je posledica povećane urbanizacije i industrijalizacije. (Sonker et al. 2024) Prema izveštajima Evropske agencije za zaštitu životne sredine industrija, a naročito proizvodnja i upotreba energije ima najveći doprinos u emitovanju kadmijuma žive i olova. (Abo-Alkasem et al. 2023)

Teški metali se odlikuju velikom gustinom i visokom toksičnošću i pri niskim koncentracijama pa kao takvi, iako su prirodni elementi mogu se svrstati u potencijalno velike kontaminante, jer se ne mogu razložiti ili biorazgraditi. U tim slučajevima ostaju trajno u životnoj sredini utičući na metaboličke aktivnosti živog sveta pri čemu se karakterišu kao kontaminanti visoke kategorije.

Bioremedijacija zasnovana na mikrobnoj populaciji je ocenjena kao izvodljiva sa ekonomskog aspekta dajući rezultate koji su obećavajući u pogledu eliminacije organskih jedinjenja (npr. ugljovodonici nafte) i teški metali odnosno njihovi joni, iz kontaminirane životne sredine (Slika 2.16).



Slika 2.16 Pozitivne i negativne strane bioremedijacije u odnosu na druge remedijacione tehnologije

Adaptirano iz Zango i saradnici (Zango et al. 2020)

Monitoring u kontaminacije životne sredine je zasnovan na praćenju nacionalnih i EU propisa u pogledu poređenja dobijenih vrednosti ukupnog sadržaja teških metala sa propisanim zakonodavnim vrednostima odnosno referentnim i graničnim vrednostima. (Relić et al. 2011) Proces bioremedijacije daje stepen prečišćenosti od čak 98%. Veliki stepen efikasnosti bioremedijacije je u sanaciji sredina koje su kontaminirane naftom i derivatima nafte ali veliki potencijal u sanaciji pokazuje i u dekontaminaciji sredina koje su zagađene i toksičnim jedinjenjima. (Stanojevic et al. 2023)

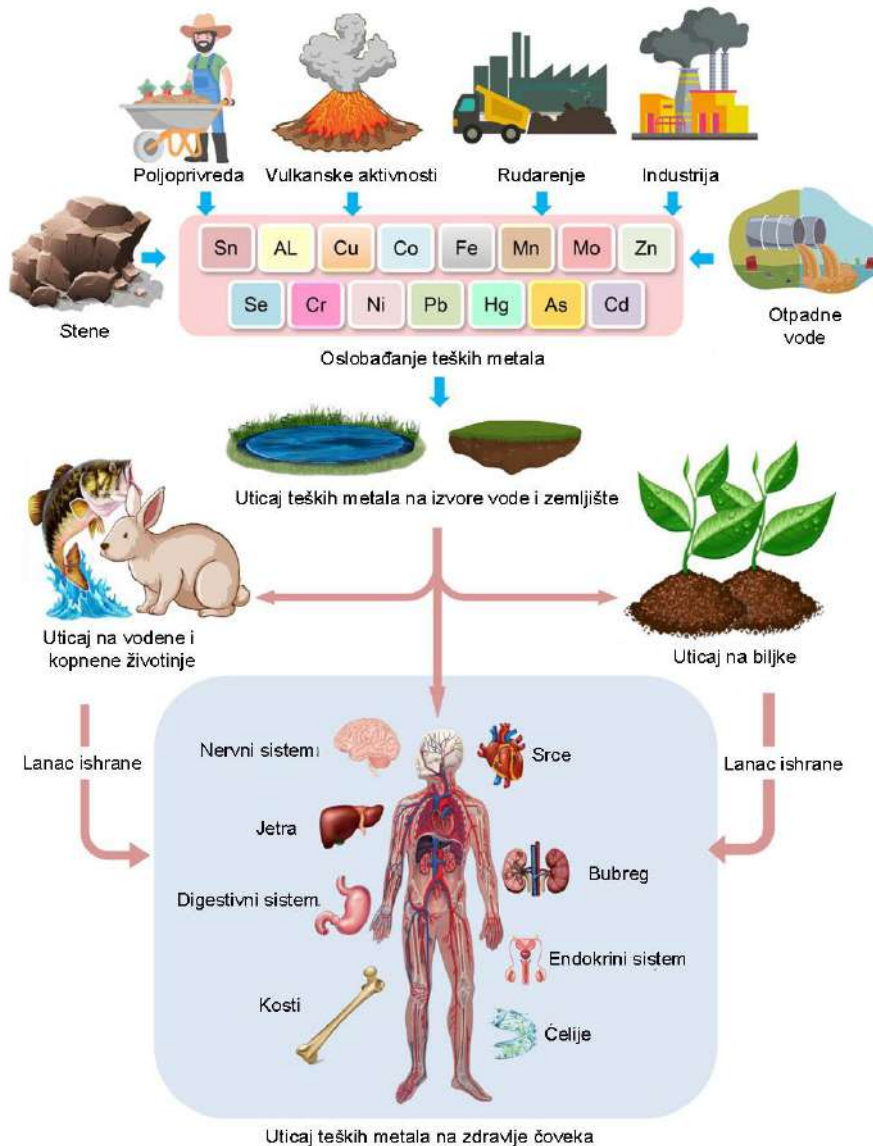
Tretman toksičnih hemikalija zasnovan na biološkom tretmanu uz efikasno praćenje mikrobioloških procesa i njihovim upravljanjem, u početku u laboratorijskim kontrolisanim uslovima, uz poznavanje štetnog odnosno toksičnog delovanja teških metala na mikrobnu populaciju (bakterije i populacija gljiva) postiže se efikasna aktivnost *in situ* bioremedijacije. (Zango et al. 2020)

Poznato je da neki teški metali imaju bitnu ulogu u biološkim procesima koji se odvijaju u ljudskom organizmu, ali prekomerno unošenje teških metala može imati negativne, neočekivane posledice po funkcionisanje organizma i odvijanje fizioloških funkcija. Pored zdravstvenih prednosti došlo se do saznanja da teški metali imaju kancerogene karakteristike. Metali ulaze u životnu sredinu različitim aktivnostima, ulazeći u lanac ishrane, izazivajući negativne efekte na funkcionisanje sistema ćelija i dovodeći do razvoja kancerogenih promena.

Obzirom na osobine teških metala kao što su rastvorljivost, oksido-redukcione osobine i složene osobine, proces razgradnje teških metala stvara veliku zabrinutost. Jedinjenja teških metala se u ekosistemu pojavljuju kao prirodni materijali, specifične težine 5 i atomske težine između 63,5 i 200,6. To su jedinjenja velike gustine i odlikuju se toksičnošću i pod malim koncentracijama. (Alabssawy and Hashem 2024)

Zagađenost životne sredine teškim metalima nastaje kao posledica ljudskog delovanja. Kao rezultat tog delovanja dolazi do povećanja njihove koncentracije što uključuje i biološke metale koji su toksični i to kadmijuma, hroma, arsena, žive, kao i druge teške metale sa toksičnošću koja može biti biotička i tu spadaju vanadijum, bakar, nikel, cink i drugi.

Kontaminacija životne sredine teškim metalima postaje sveprisutnija u svetu predstavljajući ozbiljnu pretnju po živi svet uzimajući u obzir da je ova vrsta kontaminacije teška za otkrivanje zbog toga što se ne odlikuje bojom i mirisom. Posledice po životnu sredinu nisu trenutne, ali usled promene klimatskih uslova ili pak sastava usled prevazilaženja praga tolerancije od strane životne sredine posledice mogu biti velikih razmera. Često je poređenje ovog tipa kontaminacije sa tempiranom bombom. Ovaj vid kontaminacije opstaje dug vremenski period i teško ga je sanirati uz zahtevanje metoda sanacije koje su duge i koje su izuzetno materijalno skupe jer je reč o kompleksnoj kontaminaciji prouzrokovanoj od kombinacije više teških metala. (Reddy et al. 2024) Osim toga metali putem lanca ishrane veoma lako dospevaju u ljudski organizam (Slika 2.17). (Abd Elnabi et al. 2023)



Slika 2.17 Poreklo i uticaj teških metala na čoveka putem lanca ishrane
Adaptirano iz Abd Elnabi i saradnici (Abd Elnabi et al. 2023)

Poznato je da mikrobnja populacija ima veoma bitnu ulogu u biogeohemijskom ciklusu metala. Pored toksičnog efekta metala mikroorganizmi su razvili mehanizme za smanjenje toksičnosti metala ili pak visok stepen tolerancije. Zahvaljujući tim mehanizmima mikroorganizmi mogu da prežive u prisustvu teških metala. U bakterijama je do sada nađeno oko pet različitih mehanizama otpornosti na teške metale (González Henao and Ghneim-Herrera 2021) i to:

- 1) Ekstracelularne barijere: ćelijski zid, plazma membrana ili kapsula mogu sprečiti ulazak metalnih jona u ćeliju;
- 2) Aktivni transport jona metala (efluks): čine mehanizam za izvoz toksičnih metala iz citoplazme koji uključuju proteine koji pripadaju familijama: ATPaze P-tipa, CDF (Cation Diffusion Facilitator) i RND (Resistance, Nodulation, Cell Division) ;
- 3) Ekstracelularna sekvestracija: sastoji se u akumulaciji jona metala ćelijskim komponentama u periplazmi, spoljašnjoj membrani ili kompleksiranju metalnih jona kao nerastvorljivih jedinjenja;
- 4) Intracelularna sekvestracija: zasniva se na akumulaciji metala u ne-biodostupnim oblicima unutar citoplazme da bi se sprečilo izlaganje esencijalnim ćelijskim komponentama, postoje dva primera za ovaj oblik otpornosti na metal: proizvodnja metalotioneina u *Sinechococcus* sp. i proteini bogati cisteinom u *Pseudomonas* sp. (Rouch et al. 1995; Silver and Phung 1996) i
- 5) Reoksidacija metalnih jona. Oksidacija metala kao što su bakar i arsen je takođe važan mehanizam detoksikacije.

Bakterije su razvile mehanizme borbe protiv dejstva toksičnosti metala koji se klasifikuju kao molekularni i biohemijski. Molekularni mehanizmi se zasnivaju na postojanju genetskih determinanti odgovornih za otpornost na metalne jone. Genetske determinante su često smeštene na ekstrahromozomskim genetskim delovima ili na hromozomu. Dok se biohemijski mehanizmi zasnivaju na interakciji sa vanćelijskim jonima metala koji su rastvorljivi i omogućavaju toleranciju mikroorganizama na osnovu mobilizacije, detoksikacije metala, imobilizacije, transporta, transformacije i distribucije. Otpornost bakterija se može pretpostaviti i na osnovu minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). MIC se definiše kao najniža koncentracija metala koja inhibira rast bakterija. (González Henao and Ghneim-Herrera 2021)

Način na koji mikroorganizmi intereaguju sa teškim metalnim jonima delimično zavisi od toga da li su eukarioti ili prokarioti. Eukarioti su osetljiviji na toksične metale od prokariota. U prisustvu otrovnih koncentracija, nekoliko mehanizama otpornosti se aktivira. Na primer: proizvodnja peptida iz porodice metal-vezujućih proteina, regulacija intracelularne koncentracije metala, sa izraženim proteinskim transportom ligand-metalnih kompleksa iz citoplazme na unutrašnjost vakuola i isticanje metalnih jona kroz jonske kanale prisutne u ćelijskom zidu. U bakterijama, ovi mehanizmi tolerancije često su kodirani plazmidima, koji olakšavaju svoju disperziju od ćelije do ćelije. (Pieper and Reineke 2000)

Metode bioremedijacije se uspešno koriste u cilju uklanjanja teških metala iz životne sredine. Eliminacija teških metala iz životne sredine, se zasniva na metodama apsorpcije-adsorpcije metalnih jona i smanjenju neželjenih efekata. Mikrobi (bakterije, gljive, kvasci, alge i drugo) imaju veliku ulogu u smanjenju koncentracije jona metala i u tu svrhu se koriste ljuska kokosa, kora drveta, piljevina, otpad iz poljoprivrede, seme, morske alge, itd. Menjajući jonsko stanje dolazi do promene u rastvorljivosti, bioraspoloživost i kretanju teških metala u zemljištu i u vodenoj sredini. Enzimskim putem, tačnije katalizom dolazi do povećanja rastvorljivosti metala što podrazumeva promenu oksidacionog stanja i prelazak sa višeg na niži stepen oksidacionog stanja.

Teški metali se u mikrobnom organizmu transportuju membranski povezanim transportnim mehanizmima prevodeći ih u manje toksične oblike. Mikroorganizmi koriste procese biosorpcije, biotransformacije i bioluženja u sredinama sa povećanim koncentracijama metala. (Pande et al. 2022)

Da bi se procenio stepen kontaminacije u fluvijalnim sedimentima obzirom na složenost procesa potrebni su različiti hemijski, biološki i fizički podaci. Često su biološki podaci nedostupni, pa se za procenu kontaminacije teškim metalima primenjuju smernice za procenu kvaliteta sedimenta (SKG) ili kvantitativni indeks pod kojim se podrazumeva indeks obogađivanja u poređenju sa referentnom vrednošću, što podrazumeva prosečnu koncentracija škrljaca, regionalno i/ili lokalno poreklo i drugo. (Grba et al. 2015)

Tabela 2.11 Različite vrste toksičnosti teških metala i njihovi štetni efekti na zemljište, biljke i ljude

Teški metal	Toksična forma	Zemljište	Biljke	Zdravstveni rizik
Cd	Cd ²⁺	Uništava mikrobe; sprečava preuzimanje organskog materijala; menja fizičke i hemijske osobine zemljišta.	Smanjuje dužinu korena i biomase; sprečava klijanje semena i ograničava provodljivost stabla.	Negativno utiče na funkciju bubrega; ometa funkcionisanje polnih hormona; deluje kao endokrini disruptor.
Pb	Pb ²⁺	Menja pH vrednost zemljišta; utiče na sposobnost apsorpcije zemljišta i smanjuje plodnost.	Smanjuje sadržaj hlorofila; smanjuje sadržaj proteina; izaziva skraćenje listova i oštećuje DNK.	Encefalopatija utiče na centralni nervni sistem, kardiovaskularni i cirkulatorni sistem.
Cu	Soli Cu	Gubitak aktivnosti ureaze; uticaj na dinamiku mikroba i smanjenje sposobnosti oksidacije.	Ometanje rasta korena; smanjenje dužine izdanka i polipeptida; promene u sadržaju lipida.	Ometa normalan metabolizam i utiče na funkciju bubrega.
Zn	Zn ²⁺	Menja pH zemljišta; nivo bikarbonata i organskog materijala; blokira funkciju enzima.	Devijacija u funkciji enzima; blokada transporta elemenata i međuvenska hloroza.	Respiratorni problemi.

Adaptirano iz Pande i saradnici (Pande et al. 2022)

Eliminisanje teških metala mikrobnom aktivnošću može biti ekonomski i ekološki ograničeno. Da bi se odabrala odgovarajuća bioremedijacija tehnika koja će dati dobre rezultate potrebno je uzeti u obzir sledeće: prisustvo hranjivih materija (azot, sumporno gvožđe, fosfat, kalijum) koje će podstaći rast mikrobnih ćelija i njihov metabolizam i proizvodnju enzima neophodnih za razlaganje zagađivača; ekonomski efekat od koga zavisi bioremedijacioni kontinuitet što podrazumeva da je potrebno da troškovi budu niži da bi proces bio izvodljiv i sa ekonomskog aspekta; priroda zagađivača (čvrst, tečan polučvrst ili isparljiv, organski, neorganski) i od prirode zagađivača odnosno njegove toksičnosti (toksičan, netoksičan), teški metali, PAH-ovi, hlorovani rastvarači, pesticidi); pH, temperatura i drugi fizičko-hemijski faktori, vlaga. Na brzinu i stepen biorazgradnje utiče i pravilan odabir parametara, obzirom da ovi parametri imaju uticaj na rast mikrobne ćelije što je u korelaciji sa efikasnošću uklanjanja zagađivača;

raznovrsnost mikroba (*Aeromonas*, *Flabobacteria*, *Pseudomonas*, *Bacili*, *Micobacteria*, *Streptomices*, itd.). Prisustvo kiseonika koji ima naročito veliku ulogu i biološkoj razgradnji ugljovodoničnih i drugih kontaminanata u aerobnim ili anaerobnim uslovima. (Sayqal and Ahmed 2021)

U poređenju sa organskim kontaminantima, razgradnja teških metala se zasniva na konverziji metala u manje toksične oblike ili dolazi do smanjenja mobilnosti metala. Procesom biomineralizacije dolazi do formiranja kristala intra-intercelularno ili pak ekstracelularno, a kristalna morfologija se dosta razlikuje od neorganske. Na ovaj način dolazi do formiranja minerala i fizičko-hemijskih promena metala i jedinjenja metala.

Jedan od primera je *E. coli* koja biomineralizuje platinu i konvertuje $PtCl_4$ u mikro/nanočestice metala pri čemu se olakšava rastvaranje, taloženje i transport platine i dolazi do promena u disperziji i koncentraciji platine u okruženju na površini. (Lin et al. 2023)

Na osnovu prethodnih navoda bioremedijacija se može definisati kao mehanizam koji dovodi do biosorpcije, degradacije i biotransformacije kontaminanata zahvaljujući mikrobnj aktivnosti. Svrstava se kao isplativa i prihvatljiva sa ekološkog aspekta u odnosu na hemijske (fiksacija, hemijsko ispiranje, promena pH zemljišta) i fizičke (zamena zemljišta, termička sanacija, pranje zemljišta) metode. U slučajevima kontaminacije sa PAH-ovima i teškim metalima dolazi do ograničenosti u pogledu mikrobne aktivnosti i biodostupnosti zbog složenosti interakcija PAH-ova i teških metala, što dovodi do narušavanja membranske ćelijske strukture, aktivnosti sa aspekta gena, enzima utičući na metaboličku aktivnost i na desetkovanje populacije mikroba. (Ali et al. 2022)

Čiste kulture mikroorganizama u procesu bioremedijacije su pokazivale manju efikasnost i sposobnost razgradnje složenih kontaminanata zbog slabe prilagodljivosti i otežanog održavanja čistih kultura što je otežavalo analize i skrining. Istraživanja su pokazala da je efikasnost bioremedijacije veća pri primeni mešovitih mikrobnih kultura (simbioza dva ili više mikroorganizama), jer je tada i povećan bioremedijacioni kapacitet. Primenom mešovitih kultura takođe postiže se uklanjanje i sekundarnih zagađivača koji nastaju u degradacionim reakcijama ili u reakcijama konverzije. Obzirom da u slučajevima zagađenja teškim metalima dolazi do kontaminacije sa više metalnih jona mešana mikrobna kultura omogućava bolju eliminaciju teških metalnih jona nego što bi to bio slučaj sa čistom kulturom. (Jeyakumar et al. 2022)

Glavni izvori enzima, u zemljištu, su životinjski i biljni otpad kao i mikroorganizmi. Enzimi su prisutni kao slobodni ili pak vezani i stabilizovani na površini gline i na organskim supstancama poreklom iz zemljišta. Enzimi koji su indikatori zagađenosti zemljišta teškim metalima dele se na: oksidoreduktaze, npr. dehidrogenaza – DH i hidrolaze, npr. β -D-glukozidaza - β -D-GLU, fosfataza – PHO, ureaza – URE i arilsulfataza – ARIL. (Dale and Beyeler 2001)

Enzimska aktivnost i teški metali tj. njihova koncentracija su u negativnoj korelaciji, pa se iz tog razloga ova korelacija koristi za identifikaciju zagađenosti zemljišta teškim metalima. Za aktivnost enzima i za odvijanje procesa u mikrobni ćelijama najvažniji su teški metali i njihova bioraspoloživost. Uticaj koncentracije metala nije u vezi sa prisutnošću (koncentracijom) kontaminanta u zemljištu. (Jeyakumar et al. 2022)

Koncept bioraspoloživosti po ISO 11074:2015, se može definisati i kao: „*Bioraspoloživost je stepen do kojeg hemikalije u tlu mogu biti apsorbovane ili razložene od strane ljudi ili drugih*

organizama ili mogu stupiti u interakciju sa biološkim sistemima''. (ISO 11074:2015 Soil quality - Vocabulary 2015)

2.10. Faktori koji utiču na bioremedijaciju

Kontrolisanje i optimizovanje odvijanja procesa bioremedijacije za eliminisanje zagađivača iz životne sredine je složen proces zasnovan na više faktora. Postoje tri osnovna faktora koji su ključni za proces bioremedijacije i to su (Varjani et al. 2018):

- Hemijski faktori (biorazgradnja i biodostupnost zagađivača),
- Faktori životne sredine (hranljivi sastojci, temperatura, sadržaj kiseonika, pH, tip zemljišta, dostupnost vode),
- Populacija mikroorganizama.

2.10.1. Hemijski faktori

2.10.1.1. Bioraspoloživost zagađivača

Bioraspoloživost se definiše kao koncentracija toksičnih materija koju organizmi koriste i razgrađuju. Bioraspoloživost se sagledava kao mogućnost kontakta između mikroorganizma i zagađujuće supstance. Brzinu razgradnje kontrolišu brzina difuzije, desorpcije ili rastvaranja. Lako biodostupni kontaminanti su oni koji su polarni i rastvorljivi u vodi. Za ostvarivanje interakcije između mikroorganizma i zagađivača koriste se agensi koji su površinski aktivni. (Varjani et al. 2018)

2.10.1.2. Biorazgradljivost zagađivača

Od hemijske strukture organskih molekula koji su prisutni u kontaminiranoj sredini zavisi da li proces bioremedijacije biti uspešan. Organski molekuli se teško metabolišu kao što je to slučaj sa ksenoforima, u slučajevima supstitucije vodonika sa hlorom, cijano-vodoničnom grupom, nitritnim i sulfitnim grupama. Može se reći da kontaminanti koji sadrže ksenofore se teško razgrađuju ili pak ne razgrađuju zbog svoje otpornosti. U većini reakcija metabolizma primenjuju se enzimi. Tako npr. enzimi oksigenaze pokazuju veliki afinitet ka aromatičnim ugljovodonicima kao posledica nespecifičnog afiniteta prema supstratu. (Varjani et al. 2018)

Toluen dioksidaze razgrađuju više od 100 raznih jedinjenja, što podrazumeva i jedinjenja kao što su hlorobenzen, nitrobenzen. Esteraze razaraju estarske veze u prisustvu vode; depolimeraze hidrolizuju polimere; dehalogenaze uklanjaju atome halogena kao što su hlor i zamenjuju ih sa hidroksilnim grupama; dekarboksilaze koje uklanjaju karboksilne grupe (tj. dekarboksilacija), hidrataze koji dodaju vodu alkenima pretvarajući ih u sekundarne alkohole; glutation S-transferaza koja prenosi tiol grupe; racemaze koje katalizuju L i D-amino interkonverzije kiselina i konačno CoA-ligaze, koja dodaje -S-CoA masnim kiselinama tokom beta-oksidacije. (Uqab et al. 2015)

Tabela 2.12 Potencijal biodegradacije različitih vrsta organskih jedinjenja

Vrsta jedinjenja	Potencijal biodegradacije
Prosti ugljovodonici, C1 – C15	Veoma lako
Alkoholi, fenoli, amini	Veoma lako
Kiseline, estri, amini	Veoma lako
Ugljovodonici, C12 – C20	Umereno lako
Etri, monohlorovani ugljovodonici	Umereno lako
Halogenovana i nehalogenovana isparljiva organska jedinjenja (VOC)	Umereno lako
Halogenovana i nehalogenovana slabo isparljiva organska jedinjenja	Umereno lako
Ugljovodnici, veći od C20	Umereno teško
Polihlorovani ugljovodonici	Umereno teško
PAH, PCB, pesticidi i herbicidi	Umereno teško

Adaptirano iz Uqab i saradnici (Uqab et al. 2015)

2.10.2. Faktori životne sredine

2.10.2.1. Temperatura

Temperatura ima veliki uticaj na kontrolisanje enzimske aktivnosti mikroorganizama što bitno utiče na brzinu dekontaminacije. Sa svakim povećanjem temperature za nekih 10°C enzimska aktivnost se udvostručuje. Uočen je rast mikrobne ćelije ukoliko je opseg temperature 10–38 °C. Takođe, ukoliko je temperatura iznad neke vrednosti može doći do smrti ćelije. Temperatura u *in-situ* procesima se teško kontroliše, za razliku od *ex-situ* procesa. (Varjani et al. 2018)

Nakon izvršenih istraživanja došlo se do saznanja da brzina razgradnje ugljovodoničnih jedinjenja zavisi od temperature kontaminirane lokacije. Kod psihrofila je za rast optimalna temperatura ispod 20 °C, za mezofile je optimalna temperatura u opsegu 15–45 °C; a za termofile je optimalna temperatura iznad 50 °C za razgradnju ugljovodonika. Sa porastom temperature raste bioraspoloživost, rastvorljivost, difuzija i aktivnost enzima mikrobnih organizama, a ukoliko je temperatura iznad 40 °C dolazi do smanjenja rastvorljivosti kiseonika. Kod aerobnih organizama se u tim slučajevima amanjuje metabolička aktivnost i u tim slučajevima membrane ćelija postaju osetljivije na ugljovodonike pri čemu dolazi do smanjenja koncentracije razgrađenih ugljovodonika. U situacijama kada je temperatura niža povećava se viskozitet ulja, što odovodi do smanjenja isparljivosti toksičnih ugljovodonika niske molekulske težine, dolazi do pada rastvorljivosti, povećava se toksičnost kontaminanta, izostaje maksimalan kapacitet enzimske aktivnosti što za posledicu ima da se mikrobna aktivnost odlaže. U uslovima niske temperature procesi razgradnje mogu da se poboljšaju dodavanjem biosurfaktanata koji će imati uticaja na rastvorljivost i viskozitet kontaminanta odnosno ugljovodonika. Da bi se postigao potpun stepen razgradnje ugljovodonika potrebno je naći optimalan opseg temperature. (Kebede et al. 2021)

2.10.2.2. pH

Optimalna pH vrednost za odvijanje bioremedijacionog procesa se kreće od 5, 5 do 8, 0. U ovome opsegu najveći stepen aktivnosti pokazuju heterotrofne bakterije. Fizičko-hemijske osobine staništa, hemijske osobine kontaminanta, odnos između mikroba su parametri koji

imaju uticaja na pH. pH ima uticaja na propusnost i disperziju zemljišta. Za pronalaženje optimalnog pH opsega koriste se bazne ili kisele supstance obzirom da tokom bioremedijacije dolazi do promena vrednosti pa je iz tog razloga potrebno stalno praćenje i po potrebi podešavanje pH vrednosti da bude u optimalnom opsegu. (Varjani et al. 2018)

Na promenu vrednosti pH utiče proizvodnja i taloženje bakterijskog otpada. Promena se odnosi na promene ove vrednosti kod zemljišta ukoliko je kontaminirano ugljovodoničnim polutantima, što ima indirektan uticaj na rastvorljivost kontaminanta, bioraspoloživost, dostupnost hranjivih materija i na aktivnost mikroba. U raznim studijama se je došlo do podataka da se ugljovodonični polutanti razgrađuju i pri opsegu pH od 2 – 5,5 u pri pH 7,5 – 10. Efektivna degradacija se može postići i pri vrednosti pH od 5,2 – 7,0; a najveća degradaciona sposobnost je izražena pri vrednosti od 7,5. Optimalna pH vrednost je od značaja u pogledu regulacije enzimske aktivnosti, mikrobne aktivnosti i ima uticaj na ugljovodoničnu biorazgradnju. Najveći efekat bioremedijacije ugljovodonika je pri pH vrednosti od 5 do 8. (Kebede et al. 2021)

2.10.2.3. Hranljive materije

Uvođenjem hranjivih materija (azot, ugljenik, kiseonik i fosfor), pri *in-situ* bioremedijaciji, dolazi do povećanja aktivnosti populacije autohtonih mikroba na kontaminiranoj lokaciji. Pored hranjivih komponenti, optimalnog pH, vlage i dr. dolazi do povećanja metaboličke aktivnosti od strane mikrobne ćelije i samim tim do brže dekontaminacije. Izračunavanjem odnosa ugljenika prema azotu i fosforu dobijaju se potrebe za fosforom i azotom C : N : P blizu 100 : 10 do 5 : 1. Mnogi autori smatraju da su optimalni uslovi pri izvođenju eksperimenta sledeći C : N : P \approx 70 : 3 : 0,6 ili 8 : 1 : 0,07, za odvijanje bioremedijacije sirove nafte koja je različitog porekla. Da bi se postigli optimalni uslovi predložena su đubriva na bazi parafinizedane uree i oktilofosfat u odnosu C : N : P = 100 : 10 : 1. U slučajevima postojanja mešavine ulja u vodi gde je u ovom slučaju specifična potreba za hranjivim materijama predlaže se odnos C : N : P = 800 : 13 : 1. Vrednosti za kompostiranje su u opsegu za C / N od 30 – 40. Isporuka hranjivih materija se ostvaruje primenom injekcionih bunara ili cevi koje su perforirane. U ovim slučajevima dolazi do povlačenja podzemnih voda iz bunara niz gradijent koncentracije. Dopuna hranjivih materija je bitna za biostimulaciju gde dostupnost hranjivih materija zavisi od njihove rastvorljivosti i brzinom ubrizgavanja. (Uqab et al. 2015)

2.10.2.4. Sadržaj vlage i dostupnost vode

Prisustvo vlage u kontaminiranom zemljištu je bitno zbog prenosa gasova, pokretljivosti mikroorganizama, bioraspoloživosti kontaminanta, faze rasta mikrobne ćelije. Povećano prisustvo vlage ima negativan uticaj na ulazak atmosferskog kiseonika što može da utiče na metaboličke procese i odražava se na rast mikrobne ćelije. U laboratorijskim uslovima se rade ispitivanja količine vlage koja je prisutna kako bi se dobili podaci o prisustvu vode bitne za metaboličke aktivnosti. (Varjani et al. 2018)

Vlaga koja je prisutna u zemljištu formirajući vodeni film predstavlja sredinu u kojoj se odvija transport hranjivih materija i ima ulogu u otklanjanju otpadnih proizvoda koji su nastale kao posledica metaboličke aktivnosti. U prisustvu kontaminanta kao što su ugljovodonična jedinjenja dolazi do smanjenja poroznosti i smanjenja kapaciteta zadržavanja vode od strane zemljišta. Prethodno navedeno ima za posledicu smanjenje mikrobne aktivnosti jer postoji

direktna proporcionalnost između aktivnosti mikroba i vode, tj. sa smanjenjem sadržaja vlage smanjuje se mikrobna aktivnost, a kada je vlažnost visoka ograničen je prenos kiseonika. Optimalna vlažnost je u opsegu od 50 do 75 %, 30 do 90 % i 50 – 80 %. U uslovima visoke vlažnosti iznad navedenih vrednosti smanjuje se mikrobna aktivnost i smanjuje se koncentracija kiseonika koji je neophodan za obezbeđivanje aerobnih uslova. Iz prethodnih navoda bitno je obezbediti odgovarajuću vlažnost u sredinama zagađenim ugljovodonicima kako bi aktivnost mikroba bila podstaknuta, a samim tim i razgradnja ugljovodonika. (Kebede et al. 2021)

2.10.3. Populacija mikroorganizama u bioremedijaciji

Populacija mikroorganizama je od velikog značaja u bioremedijaciji kontaminanata vode i zemljišta. Izvršena je klasifikacija mikroorganizama na ligninolitičke, gljive, aerobne, metilotrofe, i anaerobne. Gljive se odlikuju sposobnošću degradacije toksičnih kontaminanata iz životne sredine, a jedan od primera je *Phanaerochaete chrisosporium*. Za rast aerobnih mikroorganizama potrebno je prisustvo kiseonika. Neke od aerobnih mikroorganizama su bakterije *Pseudomonas*, *Micobacterium*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*. Oni koriste kontaminante kao izvor energije i izvor ugljenika. Metilotrofi kao izvor energije i ugljovodonika koriste metan i svrstavaju se u aerobne bakterije. Kod anaerobnih bakterija rast i razvoj se odvija bez prisustva kiseonika i bitne su u bioremedijaciji. (Varjani et al. 2018)

Upotreba mikroorganizama koji su genetski modifikovani (GMO) u bioremedijaciji još uvek nije istražena. GMO do danas nisu imali primenu u remedijaciji lokacija koje su komercijalne. Projekti bioagumentacije koriste mikroorganizme koji su već dostupni u prirodi odnosno životnoj sredini. U projektima fitoremedijacije transgene biljke se već primenjuju. (Uqab et al. 2015)

3. MATERIJAL I METODE

Ovaj rad je imao za cilj da istraži da li je moguća bioremedijacija rafinerijskih supstrata koji su nastali namernom destrukcijom instalacija (u toku bombardovanja rafinerije 1999. godine), a mogu nastati i u incidentnim situacijama. Ti supstrati su sadržavali katalizatore za hidrodesulfurizaciju (HDS), a oni su u sebi imali teške metale. Ovi katalizatori su u obliku perlica veličine od 5 do 10 mm i heterogeno su raspoređeni u otpadu. U stvarnim uslovima može se proizvesti velika količina takvog otpada, koji sadrži razne supstance i postoji stvarna potreba za remedijacijom ovog tipa otpada.

Deo ove studije je sproveden na model supstratu u pilot postrojenju u objektu kompanije specijalizovane za bioremedijaciju kontaminirane sredine.

U prvom delu istraživanja bilo je neophodno odrediti da li postoji toksični ili inhibitorski efekat metala na konzorcijum mikroorganizama, a u drugom delu je praćena sudbina kobalta i molibdena tokom bioremedijacije otpadnih katalizatora iz rafinerijskog postrojenja. Zanimalo nas je da li dolazi do promene u obliku teških metala tokom bioremedijacije. Mešavina supstrata sadržala je frakcije teškog lož ulja, otpadne HDS katalizatore bazirane na kobaltu i molibdenu, rečni pesak i piljevinu mekog drveta.

3.1. Ispitivanje inhibitornog efekta HDS katalizatora na mikroorganizme

3.1.1. Uzorci katalizatora za HDS

U studiji su korišćene tri vrste katalizatora za desulfurizaciju, koje su okarakterisane kao opasan otpad iz rafinerije i potiču iz naftne rafinerije u Srbiji. Deklarisana svojstva, sastav i proizvođač bili su nepoznati. Sva tri katalizatora bila su u obliku suvih praškova sastavljenih od malih kuglica prosečnog prečnika od nekoliko milimetara (do 10 mm), pri čemu su bile vidljive i neke mehanički zdrobljene kuglice. Kod dva od tri katalizatora vizuelno je identifikovana kontaminacija uljem i derivatima.

3.1.2. Konzorcijum mikroorganizama

Konzorcijum mikroorganizama, koji se sastoji od bakterijskih sojeva i jedne plesni iz roda *Penicillium* je ranije izolovan iz naftnog mulja iz rafinerije. Proces izolacije, identifikacije i kultivacije opisan je u radovima Milić i saradnika i Gojgić-Cvijović i saradnika. (Gojgić-Cvijović et al. 2012; Milic et al. 2009) Konzorcijum je obuhvatao sojeve bakterijskih rodova *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Rhodococcus sp.* i plesni *Penicillium sp.*

3.1.3. Analitičke metode

Svi rastvarači i hemikalije bili su HPLC kvaliteta.

3.1.3.1. Analiza osnovnih hemijskih parametara

Sadržaj vlage u katalizatorima određen je korišćenjem higrometra MOC-120H (Shimadzu Co., Japan) sa programom sušenja uzoraka na 105 °C tokom 1,5 h. (ISO 11465 1993) pH vrednost katalizatora analizirana je u demineralizovanoj vodi prema standardnoj metodi za određivanje pH u zemljištu. (ISO 10390 2005) Merenje je izvršeno na digitalnom pH metru pH 300i sa kombinovanim elektrodom (WTW, Nemačka). Gubitak pri žarenju određen je gravimetrijski žarenjem na 800 °C tokom 2 h. Originalni suvi praškasti katalizatori potom su tretirani kako bi se uklonile sve supstance rastvorljive u heksanu (supstance koje se mogu ekstrahovati n-heksanom; HES) korišćenjem automatskog analizatora VARIO-EL III CHNS-O Analizator (Elementar, Nemačka). Zatim je elementalni sastav (ugljenik, azot i sumpor) katalizatora iz kojih su uklonjene HES određen standardnom volumetrijskom metodom, merenjem zapremine generisanog ugljen-dioksida. (ISO 10693 1995) HES su određeni prema EPA metodi. (US EPA SW-846 Test Method 9071B 1998) Ukupni sadržaj naftnih ugljovodonika (TPH) ekstrahovan je prema ISO standardu (ISO 16703 2004) i gravimetrijski određen prema DIN standardu. (DIN EN 14345-12 2004) Svi rezultati su prosečne vrednosti dva nezavisna merenja.

3.1.3.2. Određivanje metala (Fe, Mo, Co, Ni i W) u katalizatorima

Sadržaj metala u rastvoru (priprema je opisana kasnije) određen je spektrometrijom emisije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) koristeći Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija) spektrometar opremljen RACID86 Charge Injector Device (CID) detektorom, koncentracionim nebulizatorom, kvarcnim plamenikom i aluminijumskim injektorom, što je omogućilo detekciju fluorovodonične kiseline. (Radojkovic et al. 2014) Ukupni sadržaj metala određen je nakon razlaganja smešom kiselina za digestiju (Ju et al. 2022), a metali su određeni direktno u vodenim ekstraktima (bez razlaganja). Ukupan sadržaj odabranih elemenata ekstrahovan je metodom mikrotalasno podržane digestije kiseline US EPA 3051A (US EPA 2007) koristeći napredni sistem za digestiju mikrotalasima ETHOS 1 (Milestone, Italija) sa HPR-1000/10S visokopritisnim segmentiranim rotorom. Svi rezultati prikazani su kao prosečne vrednosti tri nezavisna merenja.

3.1.3.3. Analiza rendgenske difrakcije (XRD, X-ray)

Za analizu rendgenske difrakcije korišćen je rendgenski difraktometar PW-1710 (PHILIPS, Holandija) sa zakrivljenim grafitnim monohromatorom i scintilacionim detektorom. Intenziteti difraktovane $\text{CuK}\alpha$ rendgenske radijacije ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) merili su se na sobnoj temperaturi u intervalima od $0,05^\circ 2\theta$ i vremenu od 0,5 s i to u rasponu od 4 do $65^\circ 2\theta$. Faze prisutne u uzorcima identifikovane su na osnovu dobijenih vrednosti intenziteta radijacije (I) i međuravanskih rastojanja (d), kao i poređenjem sa podacima iz literature i JCPDS standardima. (Ali et al. 2020) Orijentisani uzorci su testirani pomoću prah difraktometra u rasponu od $3\text{--}15^\circ 2\theta$ sa korakom od $0,02^\circ$.

3.1.3.4. Ekstrakcija rastvorenih frakcija metala

Vodeni ekstrakt katalizatora dobijen je na sledeći način: 30 g mlevenog katalizatora suspendovano je u $0,3 \text{ dm}^3$ demineralizovane vode. Suspenzija je kuvana 30 minuta, a nakon hlađenja filtrirana je prvo kroz kvalitativni, a zatim kroz kvantitativni filter papir. Bistri filtrat dopunjen je demineralizovanom vodom do 1 dm^3 . Sadržaj suve materije i metala u konačnim rastvorima određen je kao što je gore opisano.

3.1.3.5. Ispitivanje inhibitornog efekta metala na konzorcijum mikroorganizama

Nakon određivanja sadržaja metala u vodenim ekstraktima katalizatora, pripremljeni su rastvori na osnovu koncentracije najzastupljenijeg metala u koncentraciji koja odgovara maksimalno dozvoljenim koncentracijama za taj metal u zemljištu, prema važećim nacionalnim direktivama. ('Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu' 2019) Koncentracija drugih metala zavisila je od koncentracije dominantnog metala.

Inhibitorni efekat je istraživan metodom difuzije u bunarima na inokuliranim dvostruko slojevitim agar pločama sa slojem Mueller-Hinton agara i sladnog agara (1:1) u Petrijevim šoljama prečnika 90 mm. pH vrednost oba agar medijuma podešena je na $6,0 \pm 0,1$.

Konzorcijumi mikroorganizama su kultivisani iz zamrznutih zaliha na kosom agaru (iskošene epruvete sa agarom) na istom hranljivom medijumu kao za evaluaciju inhibitornog efekta tokom 72 sata na 28°C . Zatim su kultivisani mikroorganizmi isprani sa kosih ploča u sterilni slani rastvor kako bi se proizvele suspenzije mikroorganizama korišćene za testiranje inhibicije metala. Sterilni fiziološki rastvor korišćen je kao kontrola. Kod kontrolnog uzorka sa fiziološkim rastvorom mikroorganizmi su brojani nakon 72 sata, kada je uzorak sadržao $5,5 \times 10^8$ jedinica koje formiraju kolonije (colony forming units, cfu) cm^{-3} .

Određivanje inhibitornog efekta sprovedeno je korišćenjem dvostruko slojevitih agarnih ploča. Prvo je 1 cm^3 suspenzije mikroorganizama dodato na dno Petrijeve posude, nakon čega je dodat sloj Mueller-Hinton agara. Nakon geliranja, dodat je sloj sladnog agara, a nakon hlađenja, Petrijeve posude su držane u frižideru 1 sat na $4\text{--}6^\circ \text{C}$ kako bi se omogućila difuzija testiranih metala. Svaki uzorak je ispitan u tri primerka.

3.2. Bioremedijacija složenog rafinerijskog supstrata

Ova studija je sprovedena na polu-pilot postrojenju sa većim sadržajem svih komponenti nego što se može naći u incidentnim situacijama u rafinerijskim postrojenjima. (Miletić et al. 2017) Istražen je potencijal za bioremedijaciju teških metala poreklom iz HDS katalizatora. Ovi katalizatori su u obliku kuglica veličine od 5 do 10 mm i heterogeno su raspoređeni u otpadu. U stvarnim uslovima, može se generisati velika količina takvog otpada, koja sadrži različite supstance, uključujući HDS katalizatore i postoji stvarna potreba za remedijacijom ove vrste otpada. Studija je sprovedena u postrojenju kompanije koja je specijalizovana za bioremedijaciju kontaminirane okoline.

3.2.1. Model supstrat – smeša polutanata

Kao supstrat, napravljena je veštačka smeša zagađivača (~65 kg) od teške frakcije nafte (1,95 kg), otpadnog HDS katalizatora na bazi kobalta i molibdena kao izvora toksičnih metala (~8,88 kg), piljevine (~5,42 kg) i neoprani rečni pesak (~48,75 kg). Ova smeša supstrata približno je odgovarala matrici koju smo tretirali u našem prethodnom istraživanju. (Miletić et al. 2017)

Svaka komponenta je analizirana zasebno, a zatim su sve komponente pomešane korišćenjem industrijske mešalice. Nakon mešanja, analiza je ponovo obavljena. Zbog velike količine uzorka, kuglice HDS katalizatora nisu mogle biti pretvorene u prah i ostale su u svom originalnom obliku. Prilikom određivanja masa svih komponenti, vodilo se računa da glavni zagađivači, kao što su teška frakcija nafte, kobalt i molibden, budu iznad vrednosti za remedijaciju definisanih srpskim zakonima. Dakle, proizvedeni veštački supstrat spadao je u kategoriju opasnog otpada u odnosu na ukupne naftne ugljovodonike (TPH) (25 g kg^{-1}), kobalt (240 mg kg^{-1}) i molibden (200 mg kg^{-1}).

3.2.2. Dizajn eksperimenta

Studija je sprovedena u polivinilhloridnim (PVC) kontejnerima sa perforiranim dnom. Zapremina supstrata bila je 50 L (~65 kg), a debljina sloja supstrata bila je 25 cm. Kontejneri su bili zaštićeni od direktne sunčeve svetlosti i atmosferskih padavina time što su držani u zatvorenoj hali. Tokom studije, reakciona smeša nije mešana. Prosečna temperatura tokom studije bila je jednaka temperaturi vazduha (između 22 i 25°C). Studija je izvedena korišćenjem dve varijante supstrata:

- Supstrat kojem smo dodali hranljive supstance za biostimulaciju (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i KCl da se postigne optimalan odnos C:N:P = 100:10:1:0.1) (Beškoski et al. 2011) i inokulisali ga biomasom zimogenog konzorcijuma mikroorganizama (vidi sledeći odeljak). Voda iz česme je dodavana u supstrat kako bi se zasitio u odnosu na svoj kapacitet zadržavanja vode (dok voda ne procuri iz kontejnera) na početku i jednom mesečno. Rastvor za biostimulaciju i biomasa su pomešani u supstrat pre formiranja sloja u kontejneru radi dobre homogenizacije. Supstrat (test) je označen kao T-0 i T-6, što odgovara početku i nakon 6 meseci bioremedijacije.

- Kontrolni supstrat bio je isti zagađeni supstrat, ali bez dodavanja hranljivih supstanci ili biostimulacije; kontrolni supstrat je označen kao C-0 i C-6, što odgovara početku i nakon 6 meseci bioremedijacije.

Ovako pripremljeni uzorci služili su kao osnovni uzorci iz kojih su kasnije uzimani poduzorci za analizu.

Svi hemikalije i reagensi korišćeni u studiji bili su analitičkog kvaliteta.

3.2.3. Priprema biomase zimogenog konzorcijuma mikroorganizama

Sastav mikrobne zajednice u zagađenoj sredini u velikoj meri zavisi od tipa zagađenja i stoga se može smatrati vrstom indikatora zagađenja. Takva mikrobna zajednica je najbolje prilagođena tim uslovima i samim tim najpogodnija za upotrebu u bioremedijaciji. (Zhang et al. 2020b) Takav sastav mikrobne zajednice nazivamo zimogenim ili autohtonim i u njemu smo odredili broj mikroorganizama (prema grupama). Konzorcijum zimogenih mikroorganizama je izolovan iz otpada koji je sadržao preostalo gorivo i otpadni katalizator. Konzorcijum je odgajan u obogaćenom mineralnom medijumu (10% v/v) (Löser et al. 1998) koji je sadržao preostalo gorivo (2 g L^{-1}) izolovano iz supstrata.

Konzorcijum izolovanih mikroorganizama, kako je opisano u prethodnom istraživanju (Beškoski et al. 2011), korišćen je kao inokulum za pripremu biomase. Biomasa je umnožena (Beškoski et al. 2011) u istom mineralnom medijumu sa gorivom u Erlenmajerovim sudovima i mešana na laboratorijskoj mućkalici. Zapremina biomase korišćene za inokulaciju 50 L supstrata bila je 5 L. Inhibitorni efekat metala na konzorcijume prethodno je opisan. (Jednak Berić et al. 2023)

3.2.4. Uzorci za analizu

Uzorci za analizu pripremljeni su iz cele mase supstrata četvrtanjem do mase od ~1 kg. Dva poduzorka su pripremljena na isti način smanjenjem količina na ~100 g. (Campos-M and Campos-C 2017)

3.2.5. Osnovne mikrobiološke analize

U svim mikrobiološkim radovima poštovana su pravila rada u mikrobiološkoj hemiji, a za pripremanje podloga upotrebljavane su supstance čistoće *pro analysi*. (Gojgić-Cvijović and Vrvic 2003)

3.2.5.1. Određivanje broja mikroorganizama

Broj mikroorganizama je određivan zasejavanjem serijskih razblaženja na agar ploče. Ploče su inkubirane na 28°C. Utvrđena su četiri tipa mikroorganizama:

- hemoorganoheterotrofne bakterije (CH) na hranljivom agaru;

- **kvasci i plesni (YM)** na sladnom agaru;
- **anaerobne hemoorganoheterotrofne bakterije (AN)** na hranljivom agaru pod anaerobnim uslovima sa 0,5% glukoze;
- **degradatori ugljovodonika (HD)** na mineralnom medijumu koji sadrži 2 g standardnog D2 dizel goriva u 1 L medijuma.

Ukupne izrasle kolonije hemoorganoheterotrofnih mezofilnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija, kao i ukupne anaerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije, brojane su nakon 48 sati. Kvasci i spore plesni brojani su nakon 72 sata, dok su kolonije mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike brojane nakon 7 do 8 dana.

3.2.5.2. Priprema mikrobioloških podloga

Sve podloge su napravljene tako što su navedene komponente suspendovane ili rastvorene u destilovanoj vodi, a zatim sterilisane u autoklavu na 0,10 MPa tokom 20 minuta, osim ako nije drugačije navedeno.

U svim podlogama pH se podešava dodatkom H₂SO₄ (1M) ili NaOH (1M)

- Podloga za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija

Ukupne hemoorganoheterotrofne mezofilne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije su određivane na hranljivom agaru (HA). Hranljivi agar je pripremljen rastvaranjem suve podloge prema uputstvu proizvođača.

Sastav podloge (g/L):

Pepton-1 „Torlak“	15 g	Kalijum-fosfat	0,3 g
Mesni ekstrakt „Torlak“	3 g	Agar	18 g
Natrijum-hlorid	5 g	pH ≈ 7	

- Podloga za određivanje broja kvasaca i plesni

Ukupan broj kvasaca i spora plesni je određivan na sladnom agaru (SL) koji je pripreman rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača.

Sastav podloge (g/L):

Sladni ekstrakt „Torlak“	30 g	Agar	15 g
Pepton „Torlak“	5 g	pH ≈ 5,7	

- Podloga za određivanje broja ukupnih anaerobnih mezofilnih hemoorganoheterotrofnih bakterija

Ukupne anaerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije su određivane na hranljivom agaru sa 0,5% glukoze (HAG) zasejavanjem u anaerobnim uslovima.

iv. Podloga za određivanje ukupnog broja bakterija koje razgrađuju ugljovodonike (Milcic-Terzic et al. 2001, 2000)

Mikroorganizmi što razlažu ugljovodonike su određivani na mineralnoj ugljovodoničnoj podlozi sa dizelom D2 (UG) kao jedinim izvorom ugljenika.

Sastav podloge (g/L):

Amonijum nitrat	1 g	Agar	16 g
Kalijum-hidrogen fosfat	0,25 g	Demineralizovana voda	1 L
Ekstrakt zemlje	50 mL	pH \approx 6,5-7,5	

Nakon sterilizacije ohlađenoj podlozi u sterilnoj zoni je dodavan dizel D2 u količini 2000 ppm tj. 2 g ili 2,35 mL.

3.2.5.3. Identifikacija mikroorganizama API testovima

Mikroorganizmi su identifikovani korišćenjem numeričkog sistema analitičkog profilnog indeksa (API Rapid 20 E, API 20 NE i API Coryne) (API; BioMerieux). API (analitički profilni indeks) testovi su sprovedeni prema uputstvima proizvođača "BioMérieux Industry" (Marcy l'Etoile, Francuska)¹. API trake sastoje se od 20 mini-tuba koje sadrže dehidratizane supstrate. Proizvodi bakterijskog metabolizma izazivaju promenu boje u ovim mini-tubama (bilo spontano ili dodavanjem reagensa). Dobijeni rezultati formiraju biohemijski profil koji se analizira pomoću softvera za identifikaciju.

API 20NE sistem je standardizovana mikrometoda kombinovana od 8 konvencionalnih testova i 12 testova asimilacije za identifikaciju Gram-negativnih rodova koji ne pripadaju *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*) u periodu od 48h.

API Rapid 20E je standardizovani sistem za identifikaciju *Enterobacteriaceae* za 4 sata, uglavnom oksidaza negativnih i Gram-negativnih bakterija. Neke Gram-negativne bakterije koje ne pripadaju *Enterobacteriaceae* i oksidaza su pozitivni (*Aeromonas* i *Vibrio*), su identifikovani sa Rapid 20E.

API Coryne je standardizovan sistem za identifikaciju korinebakterija u toku 24h.

3.2.6. Osnovne hemijske i fizičko-hemijske analize

Analizirani su sledeći parametri:

- pH čvrstih uzoraka je meren u suspenziji pripremljenoj od homogenizovanog uzorka i prokuvane demineralizovane vode u odnosu 1:2,5, nakon 30 minuta mešanja na

¹ Anonymus, API Technical Manual, Procedure manual, Toronto medical laboratories/Mount Sinai Hospital Microbiology Department, Microbiology Department Policy & Procedure Manual, Toronto, 2005

magnetnoj mešalici prema standardnoj metodi. (ISO 10390 2005) Merenje je izvedeno digitalnim pH-metrom (tip pH 300i) proizvođača "WTW" (Weilhem, Nemačka) sa kombinovanim elektrodom istog proizvođača.

- Vlažnost. Procenat higroskopne vlage je određivan vlagomerom (model MOC-120H) firme Shimadzu Co., Japan, sa programom sušenja uzorka na 105 °C tokom 1,5 sati. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja. (ISO 11465 1993)
- Sadržaj ukupne organske supstance i pepela na 550°C. Određivano je u porcelanskim tiglovima spaljivanjem organske supstance uzorka u peći na datoj temperaturi. Iz sadržaja pepela se računa organska supstanca.
- Retencioni vodni kapacitet (kapacitet zadržavanja vode) - RVK. Određivan je po standardnoj ISO metodi. (ISO 11274 1998)
- Sadržaj ugljenika, azota i sumpora je određen elementarnom analizom pomoću CHNS/O elementarnog analizatora (Vario EL III, Elementar, Langensfeld, Nemačka).
- Neorganski ugljenik je određen volumetrijskom metodom. (Burt 2004; Pansu and Gautheyrou 2006; Wilke 2005)
- Organski ugljenik je izračunat kao razlika između ukupnog ugljenika i neorganskog ugljenika.
- Dostupni fosfor je određen korišćenjem rastvora amonijum-laktata. (Jakab 2020)
- Sadržaj huminskih kiselina. Huminske kiseline su izolovane po izmenjenoj standardnoj proceduri (ISO 5073 1999) sa rastvorom natrijum-pirofosfata, a taložene sa hlorovodoničnom kiselinom. Za izolovanje huminskih kiselina, 40 g uzorka zemljišta osušenog na vazduhu tretirano je sa 200 mL rastvora NaOH/Na₄P₂O₇. Huminske kiseline su ekstrahovane u ključalom vodenom kupatilu tokom 2 sata uz često mešanje kako bi se obezbedila precipitacija nerastvorljivih supstanci. Nakon toga, tamno-smeđi rastvor je ohlađen do sobne temperature i filtriran kroz filter papir. Huminske kiseline su precipitovane iz supernatanta zakišeljavanjem sa 6M hlorovodoničnom kiselinom do pH 1. Zatim je suspenzija ponovo filtrirana, a huminske kiseline ostaju u talogu.

3.2.7. Praćenje naftnih frakcija

Frakcije nafte koje su proučavane bile su srednje supstance rastvorne u n-heksanu (*eng.* n-Hexane Extractable Substances – HES) i ukupni naftni ugljovodonici (*eng.* Total Petroleum Hydrocarbons – TPH). HES se određuje po EPA metodi (US EPA SW-846 Test Method 9071B 1998), dok su TPH određeni prema DIN EN (DIN EN 14345-12 2004) kao i prema ISO/TR. (ISO 11046 1994)

Za određivanje sadržaja ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH) u uzorcima na početku i kraju studije korišćen je gasni hromatograf sa plameno jonizujućim detektorom (GC-FID; Agilent 7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Hromatografski parametri su bili sledeći: injektovanje na 60°C u pećnici (sa temperaturom injektora na 250°C i temperaturom detektora na 300°C), održavanje na toj temperaturi 1 min, zatim programirano povećanje temperature od

4°C/min do dostizanja 300°C. Kao noseći gas korišćen je vodonik brzinom od 30 cm/s. Obrada podataka vršena je pomoću ChemStation softvera (ver. LTS 01.11, Agilent Technologies).

Za identifikaciju funkcionalnih grupa ugljovodonika u uzorcima kontaminiranim sirovom naftom, korišćena je infracrvena spetrometrija sa Fourierovom transformacijom (FT-IR) upotrebom FT-IR spektrometra Thermo Nicolet 6700 (International Equipment Trading Ltd, Waltham, MA, USA) uz ugrađeni Omnic Paradigm softver (ver. 1.7 - Build 363, Thermo Electron Corp., Langensfeld, Nemačka). Za spektralnu analizu korišćen je Omnic Spectra softver (ver. 7.3, service Pack 1 (SP1), Thermo Electron Corp.).

¹H NMR spektrogrami TPH-a snimljeni su na instrumentu Varian model Gemini 2000 (Varian, Oxford, Velika Britanija) na frekvenciji od 200 MHz za ¹H jezgro. Uzorci su rastvoreni u NaOD u D₂O rastvoru.

3.2.8. Određivanje kobalta i molibdena

U ovoj studiji, metali su određivani na više načina:

- Određivanje ukupnog sadržaja metala.
- Sekvencijalna ekstrakcija metala radi određivanja distribucije i specijacije metala unutar različitih geohemijskih frakcija uzorka. Sekvencijalna metoda ekstrakcije omogućava identifikaciju načina na koji su metali vezani u uzorku, pružajući uvide u njihovu mobilnost, biološku dostupnost i potencijalni uticaj na životnu sredinu.
- Ekstrakcija metala Mehlich-ovim postupkom korišćena je za procenu biološke dostupnosti metala u uzorcima.
- Metoda luženja – kako bismo procenili potencijal ispiranja metala iz uzorka. Podaci o luženju su ključni za razumevanje ponašanja metala u kontaminiranim sredinama. Oni pružaju dragocene uvide u mobilnost, biološku dostupnost i uticaj zagađivača na životnu sredinu, što je od suštinskog značaja za odabir i dizajn efikasnih strategija remedijacije.

3.2.8.1. *Određivanje ukupnog sadržaja metala korišćenjem optičkog emisionog spektrometra sa induktivno sprengnutom plazmom (ICP-OES)*

Priprema uzoraka – mikrotalasna digestija. Da bi se odredio ukupni sadržaj metala, uzorci su dispergovani mešavinom destilovane vode i Na₂CO₃ (1:2, m/m), a zatim luženi sa HCl (37%, p.a., Sigma–Aldrich). (Balcerzak 2002) Pripremljene smeše su digestirane pomoću ETHOS 1, naprednog sistema za mikrotalasnu digestiju (MILESTONE SRL, Sorisole, Italija), sa HPR-1000/10S visokopritisnim segmentiranim rotorom. Oko 10 mL svakog uzorka je tačno izmereno u čiste posude od politetrafluoroetilena (PTFE) i zatim zagrevano mikrotalasnom energijom 35 minuta. Temperatura je kontrolisana pomoću unapred određenog programa snage (0–1000 W). Tipično, temperatura je podignuta na 200°C u prvih 15 minuta, održavana na 200°C narednih 20 minuta, a zatim brzo hlađena. Nakon hlađenja, rastvor je razblažen na fiksnu zapreminu (25 mL) u normalnom sudu. Ultračista voda sa provodljivošću od 0,05 μS cm⁻¹ je pripremljena korišćenjem Barnstead GenPure Pro (ThermoFisher Scientific, Langensfeld, Nemačka).

Instrumentalna analiza. U svim rastvorima pripremljenim za određivanje kobalta i molibdena, ovi elementi su određeni prema uputstvima proizvođača instrumenta. Sadržaj metala je određen pomoću optičkog emisionog spektrometra sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES iCAP-6500 Duo ICP; ThermoFisher Scientific, Altrincham, UK) koji je bio opremljen sa RACID86 charge injector device (CID) detektorom. Za kalibraciju su korišćena dva multielementna plazma standardna rastvora: Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; i Molybdenum, plasma standard solution, Specpure, Mo 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Alpha Aesar GmbH & Co KG, Emmerich am Rhein, Nemačka). Kvantifikacija je izvedena u triplikatima ($n = 3$) na emisionim linijama sa minimalnim spektroskopskim interferencijama: Co II 228,616 nm i Mo II 204,598 nm. Relativna standardna devijacija je bila RSD $<0.5\%$, sa koeficijentima korelacije kalibracionih kriva $> 0,99$. Granice detekcije (LOD) su bile 0.10–0.15 $\mu\text{g L}^{-1}$, a granice kvantifikacije (LOQ) su bile 0.18–0.24 $\mu\text{g L}^{-1}$. Kontrola kvaliteta (QC) je uključivala korišćenje sertifikovanog referentnog materijala (CRM): EPA Method 200.7 LPC Solution (ULTRA Scientific, North Kingstown, RI, USA), sa oporavkom izmerenih koncentracija u rasponu od 99,2 do 101,5%.

3.2.8.2. Sekvencijalna ekstrakcija kobalta i molibdena

Kobalt i molibden su sekvencijalno ekstrahovani u pet frakcija: izmenljivi (exchangeable), vezani za karbonate, vezani za Fe–Mn okside, vezani za organsku materiju i rezidualni po proceduri opisanoj od strane Tesiera i saradnika (Tessier et al. 1979), uz modifikacije metode koje su opisane od strane Sakan. (Sakan 2010)

3.2.8.3. Ekstrakcija metala Mehlich-ovim postupkom

Za ekstrakciju dostupnog molibdena i kobalta korišćen je Mehlich 3 reagens. (Mehlich 1984)

Mehlich 3 reagens se sastoji od 0,2 mol L^{-1} etilendiamintetra sirćetne kiseline (EDTA). Uzorak je ekstrahovan dodavanjem 25 mL Mehlich 3 reagensa na 2,5 g uzorka osušenog na vazduhu u 100-mL Erlenmajerovom sudu. Smeša je mućkana 5 minuta na laboratorijskom mućkalici, a zatim filtrirana kroz filter papir srednje poroznosti. Sadržaj kobalta i molibdena je određen korišćenjem ICP-OES-a (kao što je prethodno opisano – Poglavlje 3.2.8.1).

3.2.8.4. Luženje kobalta i molibdena

Metali su ispirani 24 h na mućkalici u dejonizovanoj vodi (odnos čvrste i tečne faze = 1 : 10) (Burt 2004; Yukselen and Alpaslan 2001), a zatim određivani korišćenjem ICP-OES-a (Poglavlje 3.2.8.1).

3.2.9. Određivanje faznog sastava uzoraka pomoću X-ray difrakcije

Uzorci su analizirani pomoću X-ray difraktometra (model PW-1710, Philips, Cambridge, MA, USA) sa zakrivljenim grafitnim monohromatorom i scinitilacionim brojačem. Intenziteti difraktovanih $\text{CuK}\alpha$ X-zraka ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) su određivani na sobnoj temperaturi, u intervalima od $0.02^\circ 2\theta$, sa vremenom merenja od 1 sekunde i u opsegu od 4 do $65^\circ 2\theta$. X-ray cevi su bile napajane naponom od 40 kV i strujom od 30 mA, dok su otvori za usmeravanje

primarnog i difraktovanog snopa bili 1° i 0.1 mm, respektivno. Na osnovu dobijenih vrednosti I i d , i korišćenjem standarda ICDD (International Centre for Diffraction Data) i JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards), identifikovane su faze ili minerali prisutni u uzorcima. Uzorak je pripremljen tako što je teški ostatni naftni proizvod odvojen ekstrakcijom sa n-heksanom, a piljevina je uklonjena sa površine suspenzije u vodi nakon odvajanja naftne frakcije. Na taj način je dobijena mešavina peska i katalizatora za analizu X-ray difrakcijom.

3.2.10. Statističke metode obrade rezultata

Svi rezultati su preračunati na osnovu suve supstance. Budući da su većina osnovnih hemijskih i fizičko-hemijskih analiza u laboratoriji obavljane rutinski, iz uzoraka su pripremljena dva poduzorka (kako je ranije opisano). Poduzorci su analizirani u duplikatu (osim kod određivanja metala, koje je rađeno u triplikatu), uz kontrolu pomoću r-karata, detaljno opisanih i prihvaćenih od strane Nordic Innovation Centre–Nordtest (Magnusson et al. 2018), dok je merna nesigurnost izračunata prema Magnusson i saradnici. (Magnusson et al. 2017)

Merne nesigurnosti određivanja pojedinih parametara su:

- pH je 0.2;
- vlaga 0.5%;
- organska supstanca 0.5%;
- HES u zemlji 10%;
- TPH u zemlji 10%.

Određivanje metala iz prethodno pripremljenih uzoraka obavljeno je u tri ponavljanja, kao što je ranije opisano. Relativna standardna devijacija (RSD) za određivanje metala pomoću ICP-OES bila je $<0.5\%$.

Nesigurnost uzorkovanja nije uzeta u obzir jer bi to zahtevalo zasebno istraživanje, ali je uvek najveća i u zemljištima se kreće do 50%. (Ramsey and Argyraki 1997)

4. REZULTATI

4.1. Rezultati ispitivanja inhibitornog efekta metala na mikroorganizme

4.1.1. Osnovni hemijski parametri i sadržaj metala u katalizatorima

Rezultati osnovne analize katalizatora prikazani su u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Osnovne hemijske osobine ispitivanih katalizatora

	Katalizator 1	Katalizator 2	Katalizator 3
<i>Osobina/hemijski indikator</i>			
Sadržaj vlage na 105 °C (%)	4.0	9.8	12.5
pH	3.7	3.5	2.8
Gubitak žarenjem at 800 °C (%)	8.80	14.25	6.00
HES (g kg ⁻¹)	5.29	1.76	< 0.01
TPH (g kg ⁻¹)	2.26	0.63	< 0.01
<i>Sadržaj elemenata (%)</i>			
Ukupni ugljenik	2.27	0.64	< 0.1
Organski ugljenik	2.27	0.50	< 0.1
Neorganski ugljenik	< 0.1	0.14	< 0.1
Ukupni azot	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Ukupni sumpor	2.21	3.19	0.87
Sumpor nakon odvajanja HES (% od ukupnog sumpora)	2.13 (96.4)	3.16 (99.1)	< 0.01 (0.0)
Sumpor rastvoren u vodi (% od ukupnog sumpora)	0.08 (3.6)	0.03 (0.9)	< 0.1 (100)
<i>Gvožđe i toksični elementi (mg/kg)</i>			
Gvožđe i toksični elementi (mg kg ⁻¹)	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Gvožđe	21455	52146	56680
Molibden	7753	17124	18649
Kobalt	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Nikl	< 0.1	< 0.1	< 0.1

Svi rezultati su izraženi u odnosu na suhu supstancu (osim pH vrednosti i sadržaja vlage)

Svi katalizatori su imali pH vrednost između 2,8 i 3,7, što znači da su prošli kroz procese zakišeljavanja. Gubitak pri žarenju nije odgovarao sadržaju naftnih komponenti ili organskog ugljenika, što znači da je deo katalitičke mase, uglavnom sumpor, bio degradiran tokom zagrevanja. Ovo je potvrđeno ukupnim sadržajem sumpora i odnosom gubitka pri žarenju. Katalizatori 1 i 2 bili su kontaminirani naftom i derivatima; katalizator 1 je bio pretežno kontaminiran sirovom naftom, što je pokazano HES-om, koji je približan indikator sadržaja nafte. HES i odnos sa TPH pokazali su da je sadržaj TPH-a bio oko 43% za katalizator 1 i samo oko 36% za katalizator 2, koji je takođe sadržao neorganski ugljenik u obliku karbonata; ovo nije komponenta katalizatora, već se formira tokom procesa njegove inaktivacije i razgradnje. Katalizator 2 je sadržao najviše ukupnog sumpora, a katalizator 3 najmanje. Međutim, katalizatori 1 i 2 su pretežno sadržali konstitutivni sumpor, koji je nerastvorljiv u vodi i može se identifikovati iz sadržaja sumpora nakon HES separacije. Kod katalizatora 3, ukupna količina sumpora bila je rastvorljiva u vodi. Ovo ide u prilog činjenici da je katalizator 3 bio u velikoj meri neaktivan i da je sumpor bio nekonstitutivni. Prisustvo azota ispod granice kvantifikacije ukazuje na nizak sadržaj azota u sirovom nafti koja se rafinira u rafineriji.

Sva tri katalizatora bila su tipa molibden-kobalt i nisu sadržala gvožđe, nikal ili volfram kao katalitičke metale. Katalizator 3 je imao najviši, a katalizator 1 najniži ukupni sadržaj molibdena. Isti odnos je utvrđen i u pogledu sadržaja kobalta.

Raspodela metala između ekstrahovanih (vodenih) i neekstrahovanih (čvrstih) faza prikazana je u Tabeli 4.2. Koncentracija molibdena u vodenom ekstraktu bila je ista kao i ukupni sadržaj ovog metala. Sadržaj kobalta bio je najviši za katalizator 2. Ukupna količina supstanci ekstrahovanih vodom bila je najviša za katalizator 2, a najniža za katalizator 3. Količine supstanci ekstrahovanih kuvanjem vode, kao u našoj metodi ekstrakcije, su nesrazmerne sadržaju metala u čvrstim materijalima. (Tereshchenko 2015) Ovaj fenomen je posledica prisustva kristalne vode, jer je dehidracija na bilo kojoj određenoj temperaturi ograničena. Kristalna voda je uglavnom higroskopna voda, tj. oblik vode koja je u ravnoteži sa sadržajem vodene pare u okolini. (Tereshchenko 2015)

Tabela 4.2 Raspodela metala između ekstrahovanih (vodenih) i neekstrahovanih (čvrstih) faza

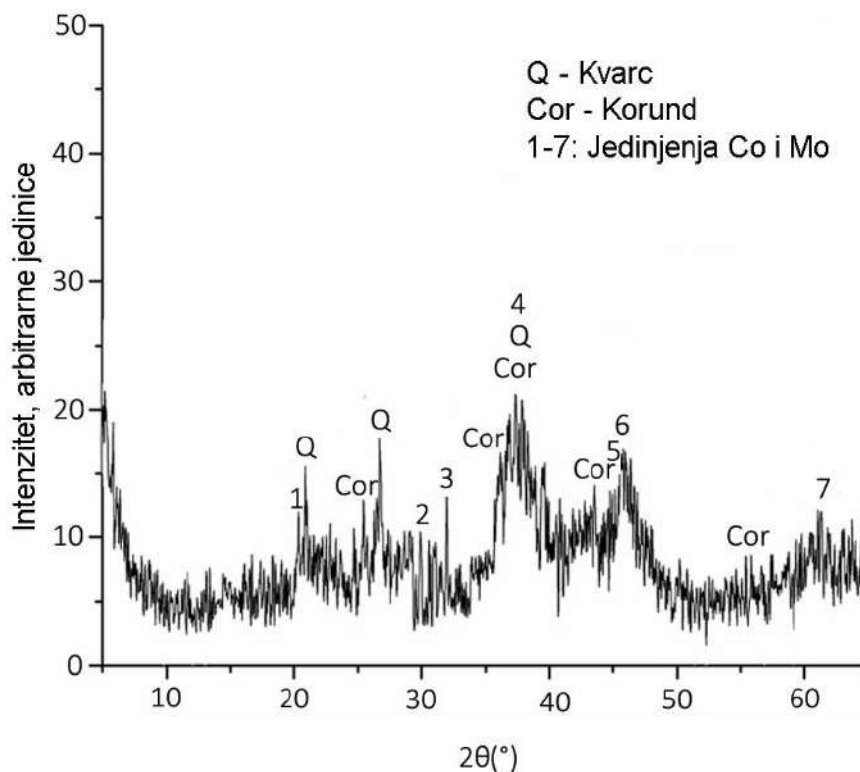
	Katalizator 1	Katalizator 2	Katalizator 3
Koncentracija metala u vodenoj fazi, mg dm⁻³			
Molibden	232	734	1032
Kobalt	193	401	263
Ekstrahovana supstanca, mg kg⁻¹			
Ukupno	275513	378805	97006
Koncentracija metala u ekstrahovanoj supstanci, mg kg⁻¹ (%)			
Molibden	7714 (2.8)	24622 (6.5)	34437 (35.5)
Kobalt	6337(2.3)	13258 (3.5)	8730 (9.0)
Koncentracija ekstrahovanih metala, mg kg⁻¹ (%)			
Molibden	7714 (36.0)	24622 (46.9)	34405 (60.7)
Kobalt	6336 (81.3)	13357 (78.0)	8765 (47.0)
Koncentracija neekstrahovanih metala, mg kg⁻¹ (%)			
Molibden	13741 (64.0)	27524 (53.1)	22275 (39.3)
Kobalt	1417 (18.7)	3767 (22.0)	9884 (53.0)

Sve vrednosti za metale izražene su u miligramima i prema propisima zaokružene na ceo broj, a procenti su zaokruženi na jednu decimalu, po principu zaokruživanja naviše. Proširene merne nesigurnosti za metale su $\pm 0,5$ mg, a za procenete $\pm 0,05\%$.

Koncentracija i sadržaj ekstrahovanog molibdena bili su najviši u katalizatoru 3, a najniži u katalizatoru 1, tj. sadržaj neekstrahovanog metala bio je u obrnutom odnosu kod ova dva katalizatora. Kobalt je najbolje ekstrahovan u katalizatoru 2, zatim slede katalizatori 3 i 1 tim redosledom. Međutim, sadržaj ekstrahovanog kobalta bio je najniži u katalizatoru 3, zatim u katalizatoru 2, dok je najviše ekstrahovan metal bio u katalizatoru 1. Ovi podaci, u okviru raspodele sumpora među svakim katalizatorom, dokazuju da su tri katalizatora bila različitih tipova i da su bila podvrgnuta različitim stepenima habanja. Rezultati pokazuju da je katalizator 2 bio najviše inaktiviran, a katalizator 3 najmanje inaktiviran.

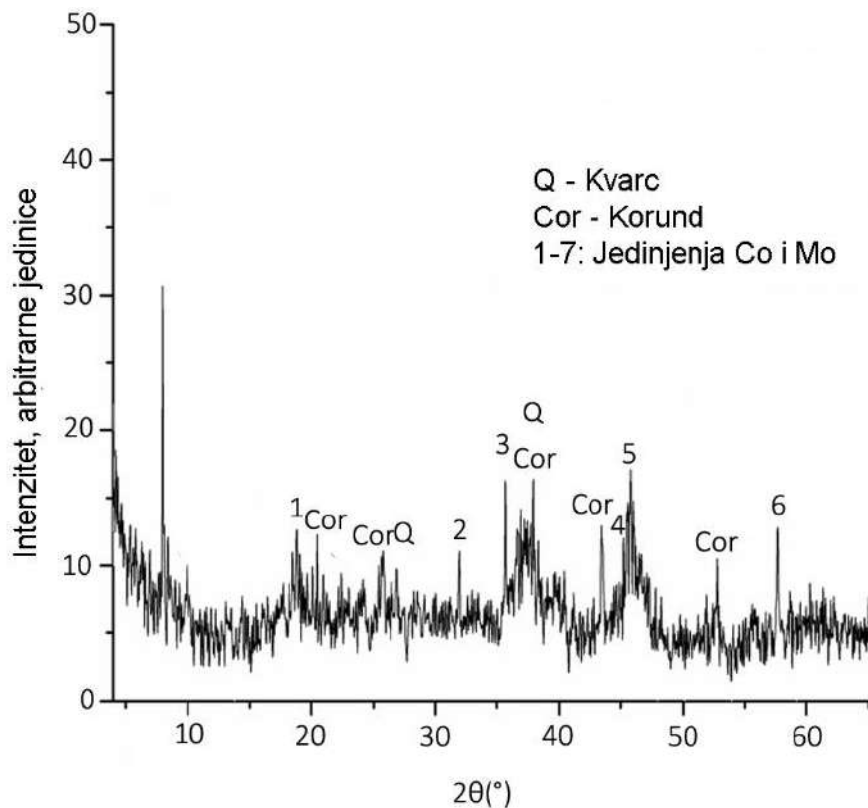
4.1.2. Rezultati XRD-a katalizatora

Rendgenski difraktogram katalizatora 1 prikazan je na Slici 4.1, koja pokazuje da su dominantne kristalne faze korunda (Al_2O_3) i kvarca (SiO_2), koji su nosioci molibdenovih i kobaltnih spojeva i njihovih sulfida koji imaju katalitičku aktivnost. Sve kristalne faze imale su nizak stepen kristalnosti, što se može videti iz oblika difraktograma pri uglovima do $^\circ 2\theta$. Ova oblast u difraktogramu bila je pretežno dominantna amorfnim supstancama.



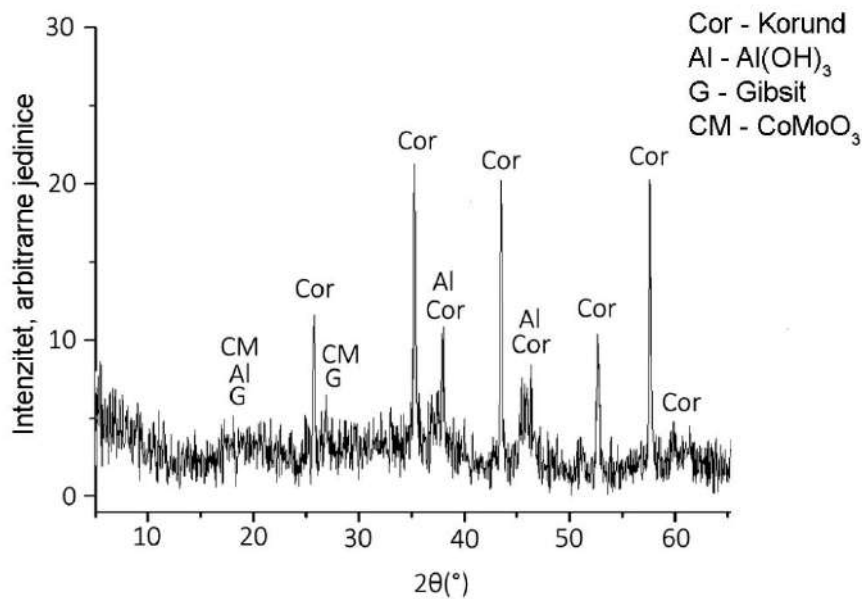
Slika 4.1 Difraktogram orijentisanog prah uzorka za katalizator 1
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2023)

U katalizatoru 2 otkrivene su dve dominantne kristalne faze: korund i silicijum dioksid. Najčešća faza bila je modifikacija silicijum dioksida koja spada u zeolite. Dominantne faze bile su nosioci katalitičkih komponenti. Katalitičke faze molibdena, kobalta i njihovih sulfida bile su izraženije u katalizatoru 2 (**Error! Reference source not found.**). Pored kristalnih faza, u katalizatoru 2 prisutna je bila i amorfna faza pri $^\circ 2\theta$. Stepen kristalnosti svih faza u katalizatoru 2 bio je veoma nizak, što se može uočiti prema obliku difraktograma prikazanom na Slici 4.2.



Slika 4.2 Difraktogram orijentisanog prah uzorka za katalizator 2
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2023)

Rendgenski difraktogram katalizatora 3 značajno se razlikovao od prethodna dva, jer je sadržao samo aluminijumske spojeve kao dominantne kristalne faze: korund, gipsit $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ i modifikacije gipsita. Stepennost kristalnosti korunda, koji je bio najdominantnija faza u katalizatoru 3, bio je relativno nizak, iako je kristalnost drugih faza takođe bila niska. Minerali aluminijuma su nosioci katalitičkih komponenti, kobalt (II) molibdenit (CoMoO_3), što se jasno može videti na difraktogramu (Slika 4.3). Osim toga, za ovaj katalizator je takođe karakteristično da ne sadrži sulfide katalitičkih komponenti, što je potvrđeno elementalnom organskom analizom ostatka nakon HES ekstrakcije, tj. najmanja količina vodom ekstrahovanih supstanci bila je u katalizatoru 3.



Slika 4.3 Difraktogram integralnog prah uzorka za katalizator 3
 Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2023)

4.1.3. Rezultati ispitivanja inhibitorynog efekta HDS katalizatora na konzorcijum mikroorganizama

Ispitivanje inhibitorynog efekta metala je urađeno sa izolovanim mikrobiološkim konzorcijumom i različitim koncentracijama molibdena i odgovarajućim koncentracijama kobalta (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Rast mikrobnog konzorcijuma na tri različita katalizatora

Koncentracija molibdena [mg dm ⁻³]	250	500	750	1500	3000	6000
<i>Katalizator 1</i>						
Odgovarajuća koncentracija kobalta [mg dm ⁻³]	208	417	625	1250	2500	5000
cfu/cm ³	4.1×10^8	4.6×10^8	6.7×10^7	6.8×10^7	4.4×10^7	5.2×10^7
<i>Katalizator 2</i>						
Odgovarajuća koncentracija kobalta [mg dm ⁻³]	139	278	417	833	1667	3333
cfu/cm ³	5.2×10^8	5.2×10^8	2.3×10^8	8.3×10^7	6.4×10^7	4.9×10^7
<i>Katalizator 3</i>						
Odgovarajuća koncentracija kobalta [mg dm ⁻³]	64	128	192	385	769	1538
cfu/cm ³	5.3×10^8	5.6×10^8	4.0×10^8	9.8×10^7	7.7×10^7	8.0×10^7

Kod svih ispitivanih koncentracija metala posmatran je rast mikroorganizama. Najmanji rast mikroorganizama zabeležen je nakon 24 sata, ali je značajno više rasta zabeleženo nakon 48 sati. Nakon 72 sata, mikrobiološka biomasa je prevazišla komore koje su sadržale metalne rastvore i fiziološku kontrolu. Stoga, za mikrobiološki konzorcijum, nije primećen toksičan efekat molibdena ili kobalta pri bilo kojoj ispitivanoj koncentraciji metala, što ukazuje da bi konzorcijum mogao biti efikasan za bioremedijaciju naftnih zagađivača.

Prema srpskim nacionalnim propisima o ograničavajućim vrednostima zagađivača, štetnih i opasnih materija u zemljištu, ograničavajuća vrednost je 3 mg kg⁻¹ za molibden i 9 mg kg⁻¹ za kobalt, dok je vrednost za remedijaciju molibdena 200 mg kg⁻¹, a za kobalt 240 mg kg⁻¹. ('Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu' 2019)

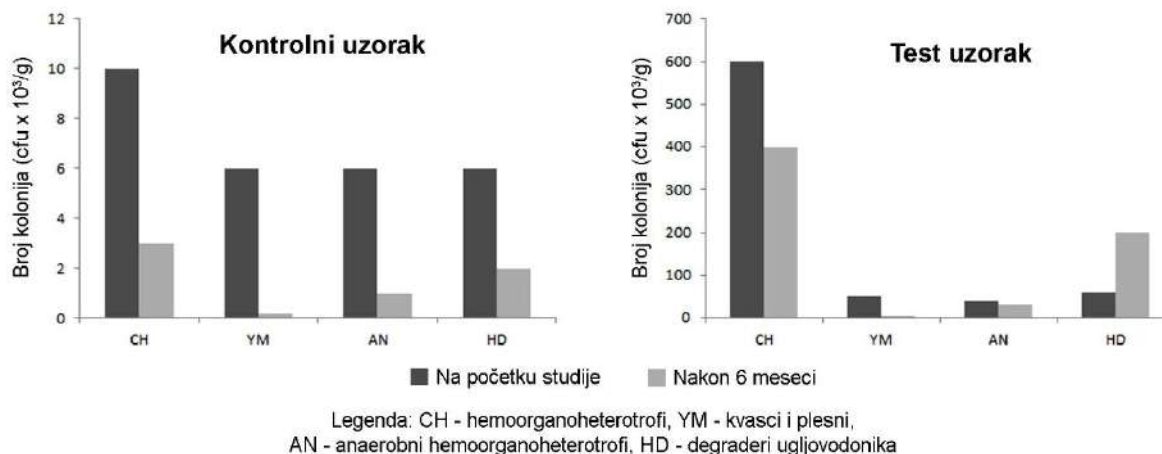
Sve ispitivane koncentracije molibdena i kobalta bile su iznad dozvoljenih koncentracija za opasni i neopasni otpad u Srbiji ('Pravilnik o kategorijama, ispitivanju i klasifikaciji otpada' 2021) i nisu inhibirale rast izolovanog konzorcijuma mikroorganizama korišćenog za bioremedijaciju. Iskorišćeni katalizatori, prema katalogu klasifikacije otpada, pripadali su grupi opasnog otpada sa brojem 06 04 05*.

4.2. Rezultati bioremedijacije složenog rafinerijskog supstrata

4.2.1. Osnovne mikrobiološke analize

Identifikovane su sledeće izolovane kulture iz zymogenog mikrobnog konzorcijuma: *Rhodococcus* sp., *Achromobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. i *Stenotrophomonas* sp.

Grafički prikaz broja mikroorganizama na početku i nakon bioremedijacije dat je slici (Slika 4.4), dok su vrednosti prikazane u Tabeli 4.4.



Slika 4.4 Grafički prikaz broja mikroba na početku studije i nakon 6 meseci
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

Tabela 4.4 Broj mikroorganizama izolovanih na početku i nakon bioremedijacije

Parametar	Jedinica	C-0	C-6	T-0	T-6
CH	cfu*/g	1×10^4	3×10^3	6×10^5	4×10^5
YM		6×10^3	2×10^2	5×10^4	4×10^3
AN		6×10^3	1×10^3	4×10^4	3×10^4
HD		6×10^3	2×10^3	6×10^4	2×10^5

* Colony forming units

CH - hemoorganoheterotrofi; YM – kvasci i plesni; AN – anaerobni hemoorganoheterotrofi; HD – degraderi ugljovodonika; C-0 i C-6 – kontrolni uzorci na početku studije i nakon 6 meseci, T-0 i T-6 – test uzorci na početku studije i nakon 6 meseci

Mali broj mikroorganizama u svim slučajevima ukazuje na nisku mikrobiološku aktivnost. U test uzorku, broj mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike (HD) povećao se tokom bioremedijacije.

4.2.2. Osnovne hemijske i fizičko-hemijske analize

Rezultati osnovnih analitičkih rezultata su predstavljani u tabeli 4.5.

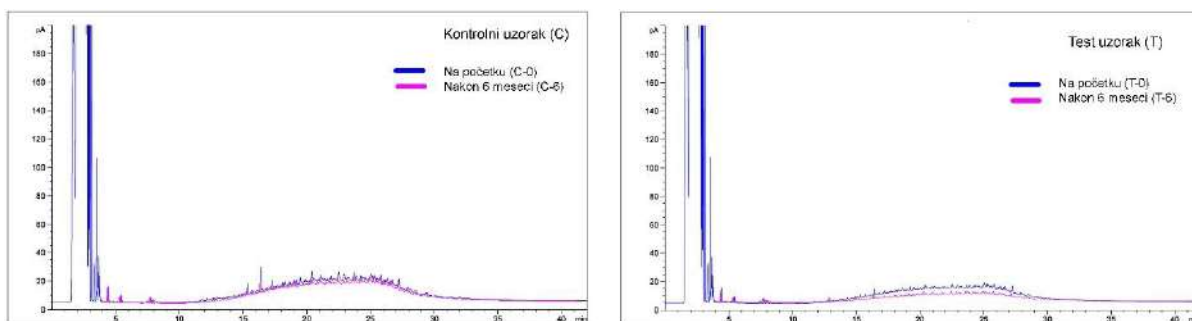
Tabela 4.5 Rezultati osnovnih hemijskih i fizičko-hemijskih analiza

Parametar	ΔU	C-0	C-6	T-0	T-6	
pH	0,2	5,7	6,2	5,4	5,5	
Vlaga, %	0,5%	2,34	10,18	25,06	24,79	
Organske supstance (550°C), %	0,5%	17,46	16,63	16,70	14,10	
Pepeo (550°C), %	0,5%	82,54	83,37	83,30	85,90	
HES, g/kg	10%	38,807	38,002	37,516	35,626	
TPH, g/kg	10%	24,585	23,987	22,974	18,020	
Huminske kiseline	10%	2,073	2,225	2,242	2,852	
Analiza elemenata, %	C _{tot}	0,5%	7,06	6,11	7,60	6,82
	C _{in}	0,5%	0,74	0,60	0,93	0,74
	C _{org}	0,5%	6,32	5,51	6,67	6,08
	N	0,5%	0,03	0,01	0,80	0,82
	S	0,5%	0,23	0,24	0,24	0,23
Dostupni fosfor (ortofosfat), mg/kg	1%	1,2	1,4	71,1	73,8	
C _{org} : N : P		51400:211:1	/	94:11:1	/	

Sve vrednosti su preračunate u masenim procentima (m/m %) i sve vrednosti se preračunate na osnovu suve supstance (izuzev pH). Procenti kod elementalne analize se se odnose na ukupni sadržaj elemenata u odnosu na masu uzorka, gde su C_{tot} je ukupni ugljenik, C_{in} je neorganski ugljenik, dok je C_{org} organski ugljenik. C_{org} : N : P je određivan na početku studije. ΔU je merna nesigurnost

Vlažnost u kontrolnom uzorku na početku je bila niska, a na kraju bioremedijacije bila je u ravnoteži sa vlažnošću vazduha. U inokulisanom uzorku na početku i kraju, vlažnost je odgovarala kapacitetu za zadržavanje vode. Sadržaj HES, TPH i ukupnih organskih supstanci bio je niži u oba uzorka na kraju studije, ali su ove razlike bile veće u bioaugmetiranom supstratu, što ukazuje da je bioremedijacija bila efikasnija u test supstratu nego u kontroli. Smanjenje sadržaja HES, što je pokazatelj ukupnog sadržaja nafte i derivata, bilo je više od 5%, dok je smanjenje sadržaja TPH bilo blizu 22% tokom bioremedijacije, za razliku od kontrolnih uzoraka gde su ove vrednosti bile oko 2 i 2,5% (Slika 4.5).

Hromatogrami TPH-ova dobijeni GC-FID analizom na početku i na kraju bioremedijacije prikazani su na slici (Slika 4.5).



Slika 4.5 Hromatogrami TPH-ova dobijeni GC-FID analizom na početku i na kraju bioremedijacije

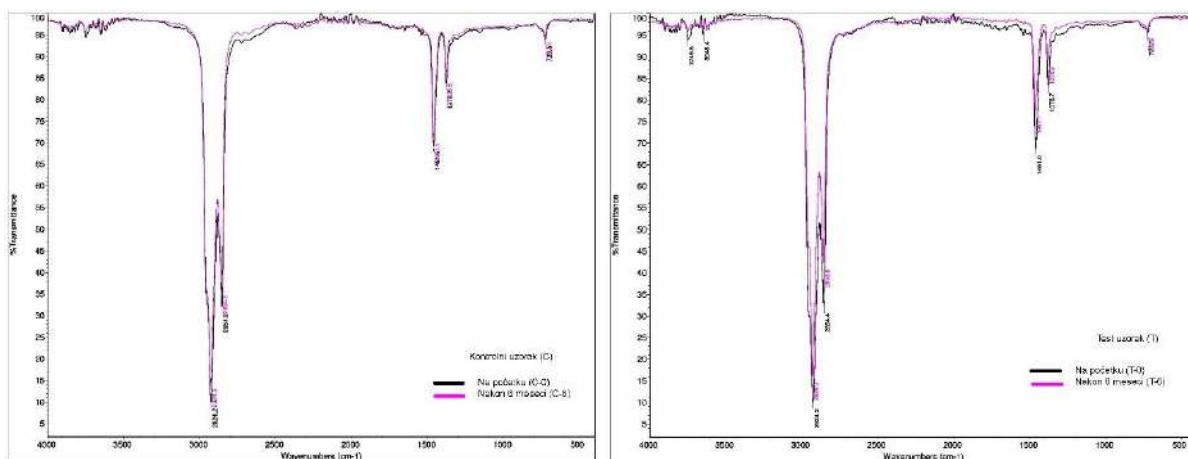
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

Dobijeni rezultati su bili očekivani, s obzirom na to da je povoljan odnos organskog ugljenika, ukupnog azota i dostupnog fosfora bio podešen biostimulacijom i on iznosi 100 : 10 : 1 (Beškoski et al. 2011), što potvrđuje i broj mikroorganizama (Tabela 4.4).

Ostali pokazatelji (kao što su sadržaj HES, TPH i huminskih kiselina) prikazani u tabeli (Tabela 4.5) takođe ukazuju na to da su intenzivniji mikrobiološki procesi nastupili u bioaugmentisanom supstratu.

Razlike u početnim sadržajima između C-0 i T-0 posledica su nemogućnosti efikasne homogenizacije uzoraka od 1 kg supstrata.

Tipični FT-IR spektri svih uzoraka (Slika 4.6) se neznatno razlikuju, uglavnom u veličini vrhova.



Slika 4.6 FT-IR spektri ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH) iz kontrolnih i test uzoraka

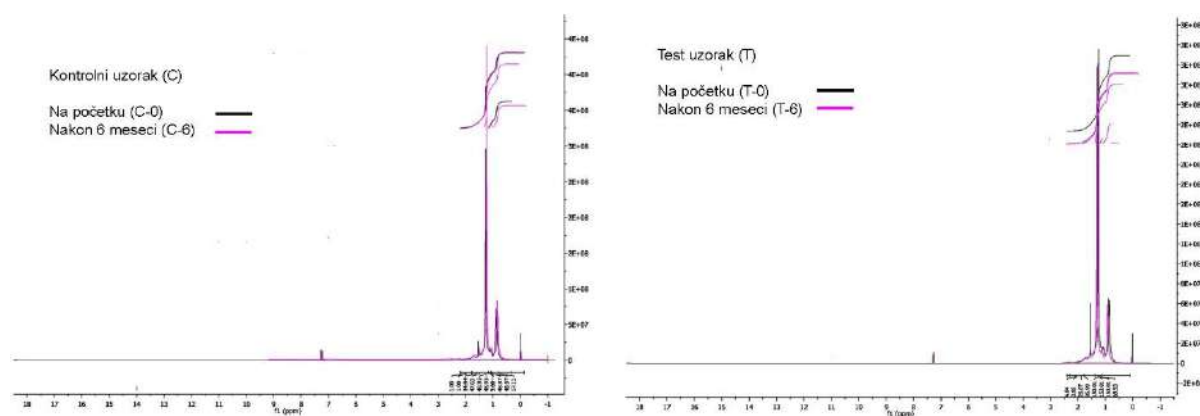
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

FT-IR spektri ukupnih naftnih ugljovodonika (TPH) bili su uglavnom karakterisani signalima ugljovodoničnih grupa. Međutim, primećeni su i slabi signali, verovatno od funkcionalnih grupa koje su prisutne kao nečistoće u uzorcima. Signali na 2924 i 2854 cm^{-1} odgovaraju C–

H vibracijama istezanja u alifatičnim (pravolinijskim ili razgranatim) ugljovodonicima. Pik na $\sim 1461\text{ cm}^{-1}$ može biti posledica C–H savijanja vibracija u metilnim ili metilenskim (CH_2) grupama. Signal na 1376 cm^{-1} takođe može odgovarati C–H vibracijama savijanja u metilnim ili metilenskim (CH_2) grupama, ili C–H savijanju vibracija u aromatičnim ugljovodonicima.

Mali signal na 723 cm^{-1} mogao bi biti posledica različitih vibracija, ali u kontekstu TPH-a, verovatno je reč o vibraciji savijanja aromatičnih ugljovodonika.

Alifatični vodonici u ugljovodoničnim lancima u ^1H NMR spektru (Slika 4.7) obično se pojavljuju kao kompleksan multiplet u oblasti od 0,5 do 2,5 ppm. Precizan izgled ovog multiplleta može varirati u zavisnosti od stepena grananja, prisustva prstenova i dužine lanca ugljovodoničnih molekula. Vodonici u blizini sumpornih atoma u tiolnim ($-\text{SH}$) grupama, koji se obično pojavljuju kao široki pikovi u oblasti od 2,0 do 2,5 ppm, mogli bi biti prisutni. Aromatični vodonici u uzorku obično se pojavljuju kao skup oštih pikova u oblasti od 6,0 do 8,5 ppm.

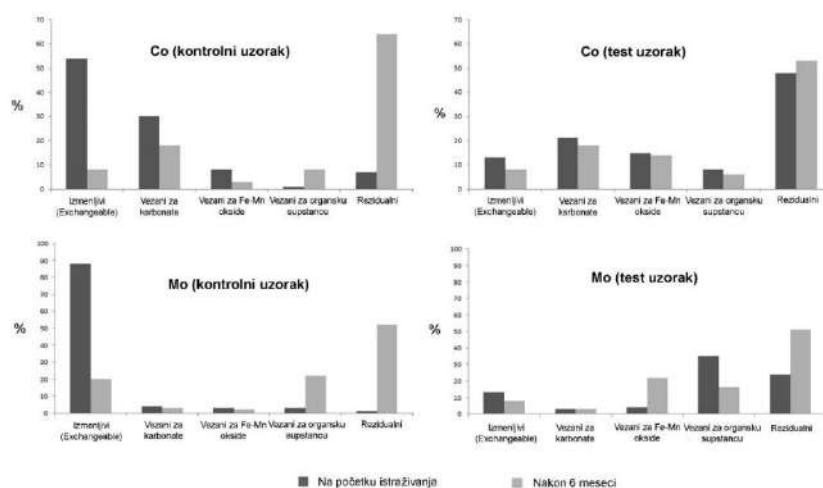


Slika 4.7 Spektar ^1H NMR za ukupne naftne ugljovodonike (TPH) iz kontrolnih i test uzoraka
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

4.2.3. Određivanje kobalta i molibdena

Tokom studije uočen je sledeći trend kod sekvencijalne analize (Slika 4.8, Tabela 4.6):

- Na početku istraživanja, većina kobalta i molibdena bila je u izmenjivim frakcijama, dok je nešto manji deo kobalta bio vezan za karbonate. Najmanje količine kobalta bile su vezane za organsku supstancu, dok je najmanje molibdena bilo vezano za Fe–Mn okside.
- Nakon 6 meseci bioremedijacije, najzastupljenije forme kobalta i molibdena bile su rezidualne, dok su najmanje količine ovih metala bile vezane za Fe–Mn okside.



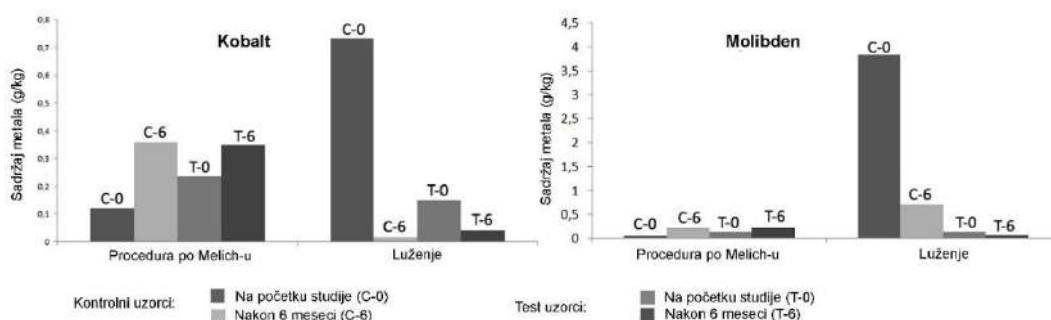
Slika 4.8 Sekvencijalna ekstrakcija kobalta i molibdena
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

Tabela 4.6 Sadržaj kobalta i molibdena u različitim formama sekvencijalno ekstrahovanih uzoraka (u % u odnosu na sadržaj ukupnog metala određenog metodom po Mehlich-u)

Fraction	Units	C-0		C-6		T-0		T-6	
		Co	Mo	Co	Mo	Co	Mo	Co	Mo
Exchangeable	%	54	88	8	20	13	13	8	8
Bound to carbonates		30	4	18	3	21	3	18	3
Bound to Fe-Mn oxides		8	3	3	2	15	4	14	22
Bound to organic matter		1	3	8	22	8	35	6	16
Residual		7	1	64	52	48	24	53	51
Melting procedure	g/kg	1,97	7,21	2,190	7,493	2,015	7,352	2,130	7,385

Merna nesigurnost za određivanje metala iz poduzoraka je manja od 0,5%, ali se pretpostavlja da je merna nesigurnost uzorkovanja veća od 50%.

Kada je određivan sadržaj metala metodom po Mehlich-u (Slika 4.9), pokazalo se da je sadržaj kobalta i molibdena u svim slučajevima povećan tokom bioremedijacije.



Slika 4.9 Određivanje kobalta i molibdena metodom po Mehlich-u i luženjem
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

Kada su metali određivani leaching metodom, sadržaj oba metala opao je tokom 6 meseci bioremedijacije (Slika 4.9, Tabela 4.7).

Rezultati takođe potvrđuju promenu oblika ispitivanih metala u kontrolnim i bioaugmentiranim supstratima (Tabela 4.6).

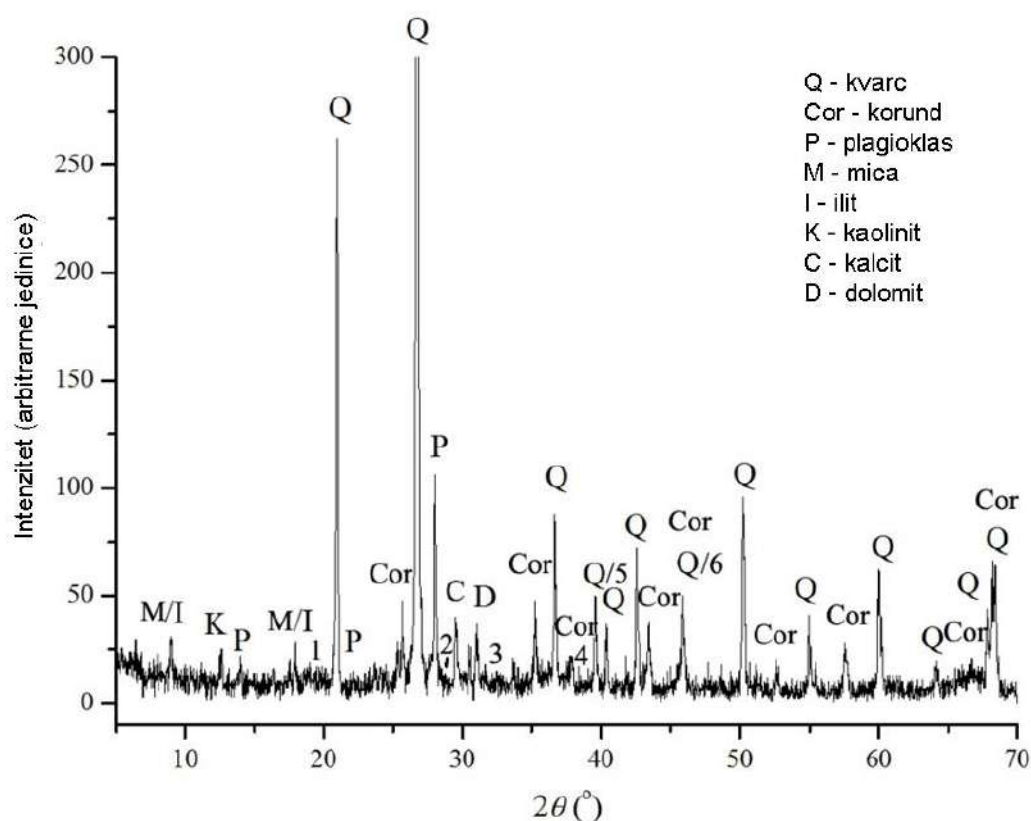
Tabela 4.7 Sadržaj kobalta i molibdena (g/kg) određen metodom po Mehlich-u i luženjem

Procedura	C-0		C-6		T-0		T-6	
	Co	Mo	Co	Mo	Co	Mo	Co	Mo
Po Mehlich-u	0,120	0,052	0,359	0,219	0,236	0,140	0,349	0,220
Luženje	0,733	3,839	0,016	0,708	0,150	0,145	0,040	0,064

Merna nesigurnost za određivanje metala iz poduzoraka je manja od 0,5%, ali se pretpostavlja da je merna nesigurnost uzorkovanja veća od 50%.

4.2.4. Rezultati analize rendgenskom difrakcijom

Početni testovi na smeši peska i HDS katalizatora su izvedeni pomoću rendgenske difrakcije kako bi se potvrdilo prisustvo HDS katalizatora (Slika 4.10).



Slika 4.10 Difraktogram mešavine peska i HDS katalizatora

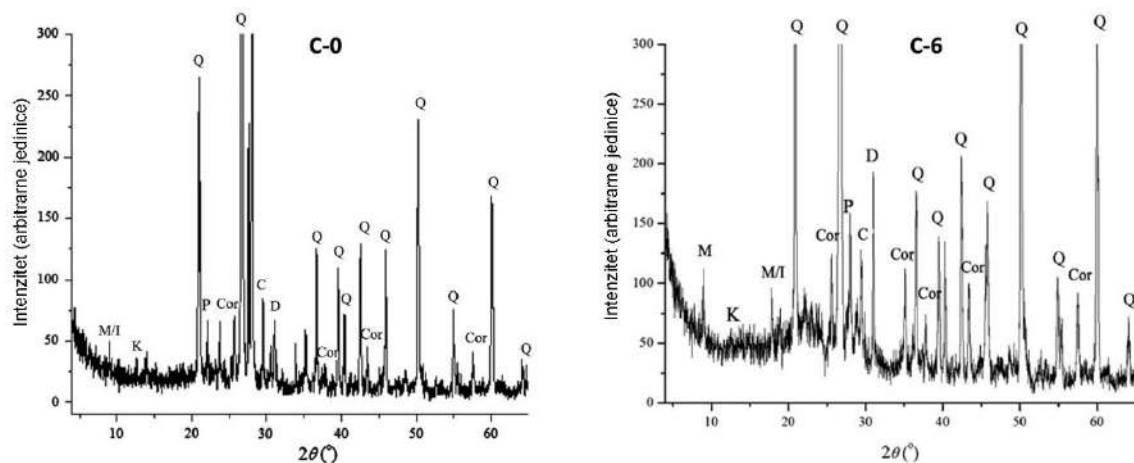
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

Na difraktogramu se vide signali za korund (JCPDS 46-1212)², koji predstavlja nosač katalizatora, dok su signali označeni brojevima 1–6 povezani sa Co–Mo fazom HDS

² Broj kartice u bazi podataka za praškastu difrakciju (Powder Diffraction File, PDF) je identifikovan kao JCPDS 46-1212 za korund. Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), Swarthmore, PA, USA.

katalizatora. Neki od ovih signala su nedovoljno diferencirani, dok se drugi poklapaju sa signalima dominantnih minerala.

U uzorku C-0 identifikovane su sledeće kristalne faze (minerali): kvarc (SiO_2) (JCPDS 46-1045), kalcit (CaCO_3) (JCPDS 05-0586), dolomit ($(\text{Ca,Mg})(\text{CO}_3)_2$) (JCPDS 36-0426), korund (Al_2O_3), mica ili ilit ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{F,OH})_2$) (JCPDS 70-1869), $(\text{F,OH})_2\text{-K}(\text{Mg,Fe})_3(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{F,OH})_2$ / $(\text{K,H}_3\text{O})(\text{Al,Mg,Fe})_2(\text{Si,Al})_4\text{O}_{10}[(\text{OH})_2, (\text{H}_2\text{O})]$ (JCPDS 26-0911) i kaolinit ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) (JCPDS 29-1488). Najdominantniji mineral je bio kvarc (Slika 4.11) (JCPDS 46-1045).



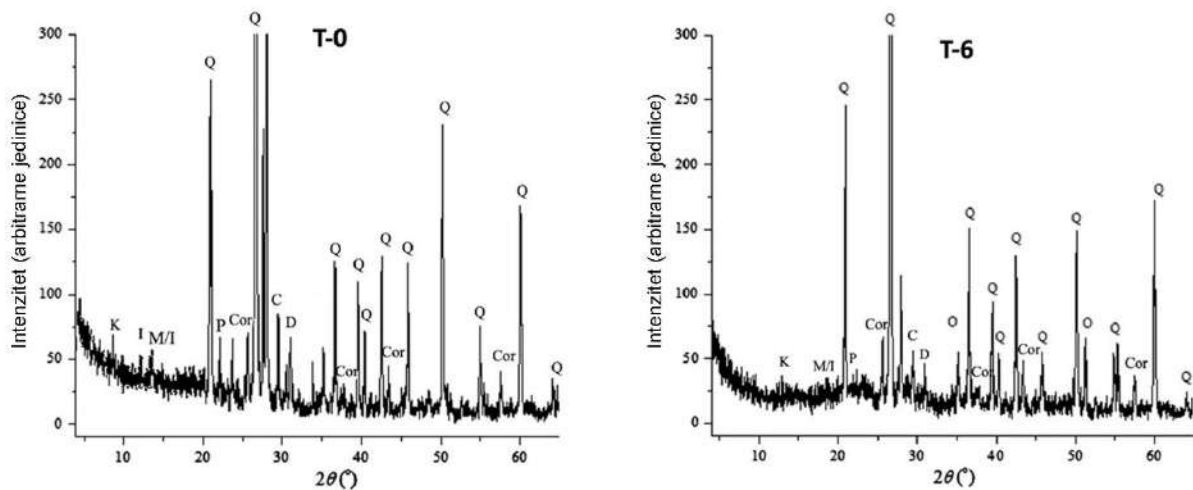
Slika 4.11 Difraktogrami kontrolnih uzoraka. Q-kvarc, Cor-korund, P-plagioklaz, M-mica, I-ilit, K-kaolinit, C-kalcit, D-dolomit

Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

U uzorku C-6 detektovane su sledeće kristalne faze (minerali): kvarc, korund, karbonati i mica. Najzastupljeniji mineral bio je kvarc, dok su korund, karbonati i mica bili značajno manje zastupljeni. Među karbonatima, najdominantniji su bili kalcit i dolomit.

Doprinosi kristalnih faza (minerala, mereni samo polukvantitativno) bili su sledeći: ~80% kvarca, 5–10% korunda, ~5% karbonata (ukupno kalcit i dolomit) i 1–2% mice. (Slika 4.11)

U uzorku T-0 su detektovane sledeće kristalne faze: kvarc, kalcit, dolomit, korund, mica ili ilit, i kaolinit. Najzastupljeniji mineral bio je kvarc. Uzorak T-0 je sadržao interstratifikovane gline (povišena osnovna linija na malim uglovima 2θ) (Slika 4.12). U uzorku T-6 su detektovane sledeće kristalne faze: kvarc, kalcit, dolomit i korund, pri čemu je kvarc bio najdominantniji (Slika 4.12).



Slika 4.12 Difraktogrami test uzoraka. Q-kvarc, Cor-korund, P-plagioklaz, M-mica, I-ilit, K-kaolinit, C-kalcit, D-dolomit
Adaptirano iz Jednak Berić i saradnici (Jednak Berić et al. 2024)

Difraktogrami kontrolnog supstrata na početku i na kraju bioremedijacije su praktično ostali nepromenjeni, što ukazuje na nisku intenzivnost mikrobioloških procesa. Zbog prisustva amorfne faze (piljevine i preostalog loživog ulja), signali za Co–Mo fazu nisu mogli biti identifikovani (Slika 4.12).

U bioaugmentiranom uzorku na početku, difraktogram je bio skoro isti kao kod C-0. Nakon 6 meseci bioremedijacije, signali za glinene frakcije (kaolinit i illit) postali su izraženiji, što je verovatno rezultat mikrobioloških transformacija primarnih u sekundarne silikate. Mikroorganizmi, posebno bakterije i gljive, proizvode organske kiseline poput limunske, oksalne i glukonske kiseline, koje mogu hemijski da troše primarne silikatne minerale kao što je feldspat. Ove kiseline mogu helatirati metalne katjone (npr. Al, Fe, Mg) iz mineralne strukture, što dovodi do razgradnje primarnih minerala. (Drever and Stillings 1997)

5. DISKUSIJA

U delu ove doktorske teze, gde smo ispitivali inhibitorni efekat tri vrste HDS katalizatora na rast konzorcijuma mikroorganizma smo videli da svi katalizatori sadrže metale kobalt i molibden. Na osnovu faznog sastava detektovanog pomoću X-ray difraktograma, svi komponente u katalizatorima pokazuju nisku kristalnost, što predstavlja još jedan dokaz zasićenja svih katalizatora.

Sva tri katalizatora su prethodno klasifikovana kao nerekiclabilan opasan otpad. Međutim, rezultati prikazani u ovoj studiji sugerišu da bi se oni mogli efikasno reciklirati hidrometalurškim postupkom, tj. ekstrakcijom ključalom vodom. (Sun et al. 2022)

U drugoj seriji eksperimenata su se isptivale mogućnosti bioremedijacije složenih rafinerijskih supstrata koji su sadržavali teške metale kobalt i molibden.

Mikrobiološka analiza je pokazala prisustvo mikroorganizama uključenih u procese bioremedijacije. (Lukić et al. 2024) Iako rezultati ukazuju na nisku mikrobiološku aktivnost, broj mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike u testiranom uzorku je bio u porastu.

Osnovne fizičko-hemijske i hemijske analize pokazuju da tokom bioremedijacije dolazi do smanjenja sadržaja organskih supstanci, HES-a i TPH-a, dok se sadržaj huminskih kiselina povećava. Huminske kiseline su organski molekuli koji igraju ključnu ulogu u poboljšanju svojstava zemljišta, rastu biljaka i agronomskoj produktivnosti, te služe kao dobar indikator uspeha bioremedijacije. (Ampong et al. 2022) GC-FID hromatogrami i FT-IR spektrogrami TPH-a takođe ukazuju na smanjenje sadržaja ovih jedinjenja.

Verifikacija vrste HDS katalizatora postignuta je analizom rendgenske difrakcije.

Kao što se i očekivalo, uzorak se pokazao veoma heterogenim, što je posebno bilo očigledno u određivanju metala iz uzoraka. Kao što je pomenuto u delu Materijal i metode (Poglavlje 0) ove teze, korišćeni su granule HDS katalizatora koji namerno nisu usitnjene kako bi se prikazala realističnija slika otpada nastalog tokom incidenta u rafineriji. Tokom incidenta u rafineriji, velike količine raspršenog HDS katalizatora mešaju se sa drugim materijalima kao što su zemljište, pesak, prosuto ulje i njegovi derivati; jednostavno je nemoguće homogenizovati ga mlevenjem, te se mora pristupiti remediaciji takvog nastalog otpada.

Iz sekvencijalne analize metala evidentno je da tokom bioremedijacije dolazi do smanjenja izmenljive (exchangeable) frakcije, frakcije gde dolazi do vezivanja za karbonate i onih vezanih za Fe–Mn okside (osim za molibden), dok se pretežno povećava rezidualna frakcija.

Kobalt i molibden prisutni u izmenljivoj (exchangeable) frakciji su najlakše dostupni i mobilni. (Giacalone et al. 2005) Ovi metali su slabo vezani za površinu čestica tla ili sedimenta i lako se mogu zameniti sa drugim kationima u rastvoru. Njihova mobilnost i dostupnost su visoke, što ih čini veoma podložnim biološkom usvajanju i kontaminaciji vodenih sistema. U ovoj frakciji, metali su obično vezani putem ionske razmene na površinama minerala i organskog materijala.

Kobalt i molibden prisutni u frakciji vezanoj za karbonate u sekvencijalnoj analizi su oni koji su vezani za mineralne karbonate ili formiraju kompleksne spojeve sa karbonatima u tlu ili sedimentima. (Giacalone et al. 2005) Ova frakcija metala je umereno mobilna, što znači da su manje mobilni i dostupni u poređenju sa izmenljivim metalima, ali su još uvek podložni oslobađanju pod određenim uslovima. Oslobađanje metala iz ove frakcije može se dogoditi u kiselim uslovima pH, jer kiseline mogu degradirati karbonatne minerale i osloboditi vezane metale. To znači da ovi metali mogu postati mobilniji i dostupniji u slučaju zakišeljavanja tla ili sedimenta, što može biti rezultat kiselih kiša ili industrijskog zagađenja. Ovi metali

predstavljaju potencijalni rizik za životnu sredinu jer njihova mobilnost i bioisvoživost zavise od promenljivih hemijskih uslova.

Kobalt i molibden prisutni u frakciji vezanoj za Fe–Mn okside u sekvencijalnoj analizi su metali vezani za okside gvožđa (Fe) i mangana (Mn). Ova frakcija metala je manje mobilna u poređenju sa izmenljivim metalima i onima vezanim za karbonate, ali može postati mobilna pod specifičnim redoks uslovima. Metali u ovoj frakciji često su vezani putem adsorpcije ili koprecipitacije sa oksidima gvožđa i mangana. Oslobađanje metala iz ove frakcije može se dogoditi pod smanjenim uslovima, jer redukcija Fe(III) u Fe(II) i Mn(IV) u Mn(II) može dovesti do raspada oksidnih minerala i oslobađanja vezanih metala. To znači da ovi metali mogu postati mobilniji u anaerobnim ili slabo oksidacijskim uslovima, kao što su vodene sredine sa niskim sadržajem rastvorenog kiseonika ili zagađeni sedimenti. Metali vezani za Fe–Mn okside predstavljaju umereno mobilnu frakciju koja može biti značajna u ekološkom kontekstu, jer promene u redoks uslovima mogu značajno uticati na njihovu bioisvoživost i potencijalnu toksičnost.

Kobalt i molibden prisutni u rezidualnoj frakciji u sekvencijalnoj analizi su oni koji su najmanje mobilni i najteže se ekstrahuju iz zemljišta ili sedimenta. Ovi metali su obično čvrsto vezani za mineralnu matricu ili u obliku stabilnih mineralnih jedinjenja. Njihovo oslobađanje je moguće samo pod ekstremnim hemijskim uslovima, kao što su jaki kiseli rastvori ili termička obrada. Zbog svoje stabilnosti u rezidualnoj frakciji, ovi metali su generalno manje dostupni biološkim organizmima, što znači da imaju manji potencijal za toksičnost pod normalnim uslovima. (Giacalone et al. 2005; Tessier et al. 1979)

6. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske teze ispitivana je mogućnost mikrobne biodegradacije složenih supstrata koji u sebi osim zagađivača organskog porekla sadrže i teške metale.

U prvom delu eksperimenta bilo je neophodno ispitati da li sami katalizatori pokazuju inhibitorni (ili čak toksični) efekat na rast konzorcijuma mikroorganizama.

Rezultati istraživanja opisanog u ovoj tezi nedvosmisleno pokazuju da metali identifikovani u testiranim katalizatorima, molibden i kobalt, nisu štetni, jer nisu toksični za konzorcijum mikroorganizama.

U drugom delu teze, gde su ispitivane mogućnosti za bioremedijacijom teških metala u složenim rafinerijskim supstratima, količina organskih supstanci bila je viša u supstratu pre bioremedijacije. Nivoi HES-a i TPH-a su opali u bioaugmentiranom supstratu nakon bioremedijacije, što je rezultat nivoa mikrobiološke aktivnosti. Ova aktivnost je dovela do formiranja huminskih kiselina, čije su količine proporcionalno porasle nakon bioremedijacije, zajedno sa smanjenjem nivoa HES-a i TPH-a.

Sekvencijalna ekstrakcija kobalta i molibdena pokazala je da su se različite frakcije ovih metala promenile u bioaugmentiranom supstratu nakon bioremedijacije u poređenju sa početnim supstratom. Ove promene u metalima su verovatno zavisile od mikrobiološke aktivnosti, a tokom procesa bioremedijacije stvorene su stabilnije frakcije metala.

Iz svega navedenog može se zaključiti da tokom bioremedijacije zemljišta kontaminiranog teškim metalima mogu nastati stabilne frakcije ovih metala, koje su teže dostupne biološkim organizmima za asimilaciju.

Iskorišćeni katalizatori za desulfurizaciju 1 i 2 sadrže korund i kvarc. Katalizator 3 sadrži aluminijum hidroksid, a kao aktivnu komponentu, CoMoO_3 , verovatno u perovskitnim strukturama. (Li et al. 2021) Identifikovani metali u katalizatorima bili su molibden i kobalt. Na osnovu faznog sastava detektovanog rendgenskim difraktogramom, sve komponente u katalizatorima pokazuju nisku kristalnost, što je još jedan dokaz zasićenja katalizatora.

Iako su sva tri katalizatora prethodno klasifikovana kao neregulirani opasni otpad, rezultati prikazani u ovoj studiji sugerišu da bi se oni mogli efikasno reciklirati hidrometalurškim procesom, tj. luženjem ključalom vodom. (Sun et al. 2022) S obzirom na značajne primene metala koji čine katalizatore u industriji (npr. kobaltne soli se koriste za elektrode litijumskih baterija), bilo bi korisno za rafineriju da sprovede jednostavnu metodologiju za reciklažu i ponovnu upotrebu ili prodaju soli ovih dragocenih metala. To bi eliminisalo potrebu za klasifikacijom iskorišćenih katalizatora za HDS kao opasnog otpada i značajno smanjilo troškove zbrinjavanja zasićenih katalizatora u poređenju sa trenutnim troškovima.

Rezultati istraživanja opisanog u ovoj studiji nedvosmisleno pokazuju da metali identifikovani u testiranim katalizatorima, molibden i kobalt, nisu štetni, za konzorcijum mikroorganizama.

7. LITERATURA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M., 2017. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. *Open J. Environ. Biol.* **2**, 038–046. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>
- Abd Elnabi, M.K., Elkaliny, N.E., Elyazied, M.M., Azab, S.H., Elkhalfifa, S.A., Elmasry, S., Mouhamed, M.S., Shalamesh, E.M., Alhoriény, N.A., Abd Elaty, A.E., Elgendy, I.M., Etman, A.E., Saad, K.E., Tsigkou, K., Ali, S.S., Kornaros, M., Mahmoud, Y.A.-G., 2023. Toxicity of Heavy Metals and Recent Advances in Their Removal: A Review. *Toxics* **11**, 580. <https://doi.org/10.3390/toxics11070580>
- Abo-Alkasem, M.I., Hassan, N.H., Abo Elsoud, M.M., 2023. Microbial bioremediation as a tool for the removal of heavy metals. *Bull. Natl. Res. Cent.* **47**, 31. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01006-z>
- Agrahari, S., Kumar, S., 2024. Emerging and futuristic phyto-technologies for sustainable wastewater treatment with resource recovery and economical aspects. *J. Water Process Eng.* **65**, 105753. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105753>
- Al-Rubaye, A.H., Jasim, D.J., Jassam, S.A., Jasim, H.M., Ameen, H.F.M., Al-Robai, H.A., 2023. The Side Effect of Oil Refineries on Environment: As a mini Review. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **1262**, 022024. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1262/2/022024>
- Alabssawy, A.N., Hashem, A.H., 2024. Bioremediation of hazardous heavy metals by marine microorganisms: a recent review. *Arch. Microbiol.* **206**, 103. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03793-5>
- Alexandrino, K., Sánchez, N.E., Viteri, F., 2024. Levels and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) near hospitals and schools using leaves and barks of *Sambucus nigra* and *Acacia melanoxylon*. *Environ. Geochem. Health* **46**, 32. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01825-z>
- Ali, I., Al-Shafei, E.N., Al-Arfaj, A.A., Saleh, T.A., 2020. Influence of titanium oxide on the performance of molybdenum catalysts loaded on zeolite toward hydrodesulfurization reactions. *Microporous Mesoporous Mater.* **303**, 110188. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110188>
- Ali, M., Song, X., Ding, D., Wang, Q., Zhang, Z., Tang, Z., 2022. Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: Challenges and enhancement strategies. *Environ. Pollut.* **295**, 118686. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118686>
- Ali, R., Solevic-Knudsen, T., Antic, M., Beskoski, V., Vrvic, M., Schwarzbauer, J., Jovancicevic, B., 2013. Degradability of n-alkanes during ex situ natural bioremediation of soil contaminated by heavy residual fuel oil (mazut). *J. Serbian Chem. Soc.* **78**, 1035–1043. <https://doi.org/10.2298/JSC120829106A>
- Allesina, S., Alonso, D., Pascual, M., 2008. A General Model for Food Web Structure. *Science (80-.)*. **320**, 658–661. <https://doi.org/10.1126/science.1156269>
- Alolaiyan, H., Hayat, M., Shuaib, U., Razaq, A., Salman, M.A., Xin, Q., 2024. Optimizing bioremediation techniques for soil decontamination in a linguistic intuitionistic fuzzy framework. *Sci. Rep.* **14**, 15979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66863-8>
- Alori, E.T., Gabasawa, A.I., Elenwo, C.E., Agbeyegbe, O.O., 2022. Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment. *Front. Soil Sci.* **2**. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.937186>

- Alvernia, P., Utomo, S., Budhi Soesilo, T.E., Herdiansyah, H., 2021. The Use of Bioremediation Technology on Oil-Contaminated Soil. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **755**, 012061. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012061>
- Ampong, K., Thilakaranthna, M.S., Gorim, L.Y., 2022. Understanding the Role of Humic Acids on Crop Performance and Soil Health. *Front. Agron.* **4**. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.848621>
- Avdalović, J., Miletić, S., Božović, O., Šolević Knudsen, T., Stanković, D., Lugonja, N., Spasić, S., Joksimović, K., Dragičević, I., Vrvic, M.M., 2021. Study on the assessment of humification processes during biodegradation of heavy residual fuel oil. *Sci. Total Environ.* **797**, 149099. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149099>
- Ayilara, M.S., Babalola, O.O., 2023. Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Front. Agron.* **5**. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., 2016. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B.V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B.S., Tripathi, M., 2022. Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. *Toxics* **10**, 484. <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>
- Balcerzak, M., 2002. Sample Digestion Methods for the Determination of Traces of Precious Metals by Spectrometric Techniques. *Anal. Sci.* **18**, 737–750. <https://doi.org/10.2116/analsci.18.737>
- Baniasadi, M., Mousavi, S.M., 2018. A Comprehensive Review on the Bioremediation of Oil Spills. In 'Microbial Action on Hydrocarbons'. Springer Singapore, Singapore, pp. 223–254. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_10
- Barton, L.L., Northup, D.E., 2011. Microbial Ecology: Beginnings and the Road Forward. In 'Microbial Ecology'. Wiley, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1002/9781118015841.ch1>
- Beškoski, V.P., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., Šolević, T., Vrvic, M.M., Solević, T., Vrvic, M.M., Šolević, T., Vrvic, M.M., 2011. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) - A field experiment. *Chemosphere* **83**, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>
- Bianco, F., Race, M., Papirio, S., Esposito, G., 2023. A critical review of the remediation of PAH-polluted marine sediments: current knowledge and future perspectives. *Resour. Environ. Sustain.* **11**, 100101. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2022.100101>
- Bosio, V., Viera, M., Donati, E., 2008. Integrated bacterial process for the treatment of a spent nickel catalyst. *J. Hazard. Mater.* **154**, 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.095>
- Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R., 2020. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* **6**, e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- Burt, R., 2004. Soil Survey Laboratory Methods Manual, V. 4.0. ed. US Department of Agriculture - National Resources Conservation Service.
- Cabrera, G., Ramírez, M., Cantero, D., 2011. Biofilters. In 'Comprehensive Biotechnology'. Elsevier, pp. 303–318. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00408-6>
- Campos-M, M., Campos-C, R., 2017. Applications of quartering method in soils and foods. *Int. J. Eng. Res. Appl.* **7**, 35–39. <https://doi.org/10.9790/9622-0701023539>

- Cébron, A., Borreca, A., Beguiristain, T., Biache, C., Faure, P., 2022. Author Correction: Taxonomic and functional trait-based approaches suggest that aerobic and anaerobic soil microorganisms allow the natural attenuation of oil from natural seeps. *Sci. Rep.* **12**, 11506. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15752-z>
- Corona, B., Shen, L., Reike, D., Rosales Carreón, J., Worrell, E., 2019. Towards sustainable development through the circular economy—A review and critical assessment on current circularity metrics. *Resour. Conserv. Recycl.* **151**, 104498. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104498>
- Csutak, O., Corbu, V.M., 2023. Bioremediation of oil-contaminated soil by yeast bioaugmentation. In 'Advances in Yeast Biotechnology for Biofuels and Sustainability'. Elsevier, pp. 395–447. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95449-5.00010-2>
- Dale, V.H., Beyeler, S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecol. Indic.* **1**, 3–10. [https://doi.org/10.1016/S1470-160X\(01\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S1470-160X(01)00003-6)
- Datta, S., Dey, D., Dey, S., Mallick, A., Barman, M., 2022. Metal oxidizing microbes and potential application in bioremediation of soil and water. In 'Metals Metalloids Soil Plant Water Systems'. Elsevier, pp. 309–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91675-2.00015-9>
- DIN EN 14345-12, 2004. Characterization of waste - Determination of hydrocarbon content by gravimetry.
- Ding, D., Song, X., Wei, C., LaChance, J., 2019. A review on the sustainability of thermal treatment for contaminated soils. *Environ. Pollut.* **253**, 449–463. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.118>
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U.B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B.P., Rai, J.P., Sharma, P.K., Lade, H., Paul, D., 2015. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability* **7**, 2189–2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- Drever, J.I., Stillings, L.L., 1997. The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **120**, 167–181. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03720-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03720-X)
- El-Naggar, A.Y., El-Fadly, A.E.-A.M., Mustafa, Y.M., Ebiad, M.A.E.-S., Ibrahim, E.S.A., 2014. Petroleum in View of its Classification, Assay and Analysis. International E – Publication, Indore, India.
- Fährnich, K.A., Pravda, M., Guilbault, G.G., 2002. IMMUNOCHEMICAL DETECTION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs). *Anal. Lett.* **35**, 1269–1300. <https://doi.org/10.1081/AL-120006666>
- Giacalone, A., Gianguzza, A., Orecchio, S., Piazzese, D., Dongarrà, G., Sciarrino, S., Varrica, D., 2005. Metals distribution in the organic and inorganic fractions of soil: a case study on soils from Sicily. *Chem. Speciat. Bioavailab.* **17**, 83–93. <https://doi.org/10.3184/095422905782774892>
- Gifford, S., Dunstan, R.H., O'Connor, W., Koller, C.E., MacFarlane, G.R., 2007. Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends Biotechnol.* **25**, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.12.002>
- Gojgić-Cvijović, G., Vrvić, M.M., 2003. Praktikum za mikrobiološku hemiju. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.

- Gojic-Cvijovic, G.D., Milic, J.S., Solevic, T.M., Beskoski, V.P., Ilic, M. V., Djokic, L.S., Narancic, T.M., Vrvic, M.M., 2012. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation* **23**, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9481-1>
- González Henao, S., Ghneim-Herrera, T., 2021. Heavy Metals in Soils and the Remediation Potential of Bacteria Associated With the Plant Microbiome. *Front. Environ. Sci.* **9**. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.604216>
- Grba, N., Neubauer, F., Sajnovic, A., Stojanovic, K., Jovancicevic, B., 2015. Heavy metals in neogene sedimentary rocks as a potential geogenic hazard for sediment, soil, surface and groundwater contamination (Eastern Posavina and Lopare Basin, Bosnia and Herzegovina). *J. Serbian Chem. Soc.* **80**, 827–838. <https://doi.org/10.2298/JSC140317047G>
- H. Al-Dahhan, W., MA Mahmood, S., 2019. Classification of Crude Oils and its Fractions on the Basis of Paraffinic, Naphthenic and Aromatics. *Al-Nahrain J. Sci.* **22**, 35–42. <https://doi.org/10.22401/ANJS.22.3.05>
- Heydarpour, E., Farhangi, A.M., 2022. The Effect of Aerobic and Anaerobic Composting of Municipal Solid Waste (MSW) Generated on Agriculture. *Int. J. Waste Resour.* **12**, 1000492. <https://doi.org/10.35248/2252-5211.22.12.492>
- Hisamuddin, N.H., Jalaludin, J., Abu Bakar, S., Latif, M.T., 2022. The Influence of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Exposure on DNA Damage among School Children in Urban Traffic Area, Malaysia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, 2193. <https://doi.org/10.3390/ijerph19042193>
- Hou, J., Hu, C., White, J.C., Yang, K., Zhu, L., Lin, D., 2021. Nano–Zoo Interfacial Interaction as a Design Principle for Hybrid Soil Remediation Technology. *ACS Nano* **15**, 14954–14964. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05180>
- Hu, M., 2020. Environmental Behavior of Petroleum in Soil and its Harmfulness Analysis. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **450**, 012100. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/450/1/012100>
- Igiri, B.E., Okoduwa, S.I.R., Idoko, G.O., Akabuogu, E.P., Adeyi, A.O., Ejiogu, I.K., 2018. Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *J. Toxicol.* **2018**. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>
- Ilyas, S., Srivastava, R.R., Ilyas, N., 2020. Biosorption of Strontium from Aqueous Solutions. pp. 65–83. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15314-4_4
- ISME, n.d. What is microbial ecology? [WWW Document]. URL <https://www.isme-microbes.org/what-microbial-ecology> (accessed 8.26.24).
- ISO 10390, 2005. Soil quality — Determination of pH.
- ISO 10693, 1995. Soil quality — Determination of carbonate content — Volumetric method.
- ISO 11046, 1994. International standard: Soil quality - Determination of mineral oil content - Method by infrared spectrometry and gas chromatographic method. Geneva.
- ISO 11074:2015 Soil quality - Vocabulary, 2015.
- ISO 11274, 1998. Soil Quality – Determination of the water-retention characteristic – Laboratory methods.
- ISO 11465, 1993. Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis —

Gravimetric method.

- ISO 16703, 2004. Soil quality — Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography.
- ISO 5073, 1999. Brown coals and lignites — Determination of humic acids. Geneva.
- Jadhav, U., Hocheng, H., 2012. A review of recovery of metals from industrial waste. *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.* **54**, 159–167.
- Jakab, A., 2020. The ammonium lactate soluble potassium and phosphorus content of the soils of north-east Hungary region: a quantifying study. *DRC Sustain. Futur. J. Environ. Agric. Energy* **1**, 7–13. <https://doi.org/10.37281/DRCSF/1.1.2>
- Jednak Berić, T., Avdalović, J., Milić, J., Teofilović, V., Vrvić, M.M., Jovančićević, B., Miletić, S., 2023. The influence on microorganisms of heavy metals from refiner's spent desulphurisation catalysts. *Chem. Ecol.* **39**, 202–213. <https://doi.org/10.1080/02757540.2022.2158185>
- Jednak Berić, T., Vrvić, M.M., Lješević, M., Avdalović, J., Ilić, M., Crnković, D., Jovančićević, B., Miletić, S., 2024. Testing of the bioremediation on model substrates for complex refinery contaminants arising from accidental or deliberate facility damage. *Environ. Chem.* **21**. <https://doi.org/10.1071/EN23111>
- Jednak, T., Avdalović, J., Miletić, S., Slavković-Beškoski, L., Stanković, D., Milić, J., Ilić, M., Beškoski, V., Gojgić-Cvijović, G., Vrvić, M.M., 2017. Transformation and synthesis of humic substances during bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **122**, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.009>
- Jeyakumar, P., Debnath, C., Vijayaraghavan, R., Muthuraj, M., 2022. Trends in Bioremediation of Heavy Metal Contaminations. *Environ. Eng. Res.* **28**, 220631–0. <https://doi.org/10.4491/eer.2021.631>
- Jovancicevic, B., Antic, M., Vrvic, M., Ilic, M., Novakovic, M., Saheed, R.M., Schwarzbauer, J., 2008. Transformation of a petroleum pollutant during soil bioremediation experiments. *J. Serbian Chem. Soc.* **73**, 577–583. <https://doi.org/10.2298/JSC0805577J>
- Jovancicevic, B., Gajica, G., Veselinovic, G., Kasanin-Grubin, M., Solevic-Knudsen, T., Strbac, S., Sajnovic, A., 2022. The use of biological markers in organic geochemical investigations of the origin and geological history of crude oils (I) and in the assessment of oil pollution of rivers and river sediments of Serbia (II). *J. Serbian Chem. Soc.* **87**, 7–25. <https://doi.org/10.2298/JSC210701072J>
- Ju, T., Han, S., Meng, Y., Song, M., Jiang, J., 2022. Occurrences and patterns of major elements in coal fly ash under multi-acid system during microwave digestion processes. *J. Clean. Prod.* **359**, 131950. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131950>
- Kadhun, A.T., Albayati, T.M., 2022. Desulfurization techniques process and future challenges for commercial of crude oil products: Review. p. 030039. <https://doi.org/10.1063/5.0092049>
- Kafle, A., Timilsina, A., Gautam, A., Adhikari, K., Bhattarai, A., Aryal, N., 2022. Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environ. Adv.* **8**, 100203. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100203>
- Kapahi, M., Sachdeva, S., 2019. Bioremediation Options for Heavy Metal Pollution. *J. Heal. Pollut.* **9**. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191203>
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E.M., Kamaraj, M., Assefa, F., 2021. Factors Influencing the Bacterial

- Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. *J. Chem.* **2021**, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>
- Khalefah, A.R.M., Omran, I.I., Al-Waily, M.J.M., 2024. An Investigation on the Environmental Impact of Petroleum Refinery Effluent on Soil Pollution. *Int. J. Environ. Impacts* **7**, 41–46. <https://doi.org/10.18280/ije.070105>
- Kumar, A., Thakur, A.K., Gaurav, G.K., Klemeš, J.J., Sandhwar, V.K., Pant, K.K., Kumar, R., 2023. A critical review on sustainable hazardous waste management strategies: a step towards a circular economy. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **30**, 105030–105055. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29511-8>
- Lakhani, S., Acharya, D., Sakariya, R., Sharma, D., Patel, P., Shah, M., Prajapati, M., 2022. A comprehensive study of bioremediation for pharmaceutical wastewater treatment. *Clean. Chem. Eng.* **4**, 100073. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100073>
- Li, X., Zhao, H., Liang, J., Luo, Y., Chen, G., Shi, X., Lu, S., Gao, S., Hu, J., Liu, Q., Sun, X., 2021. A-site perovskite oxides: an emerging functional material for electrocatalysis and photocatalysis. *J. Mater. Chem. A* **9**, 6650–6670. <https://doi.org/10.1039/D0TA09756J>
- Lin, H., Zhou, M., Li, B., Dong, Y., 2023. Mechanisms, application advances and future perspectives of microbial-induced heavy metal precipitation: A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **178**, 105544. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105544>
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., 2019. Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring. *Open Biomark. J.* **9**, 1–9. <https://doi.org/10.2174/1875318301909010001>
- Löser, C., Seidel, H., Zehnsdorf, A., Stottmeister, U., 1998. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 631–636. <https://doi.org/10.1007/s002530051225>
- Lukić, M., Avdalović, J., Gojgić-Cvijović, G., Žerađanin, A., Mrazovac Kurilić, S., Ilić, M., Miletić, S., Vrvić, M.M., Beškoski, V., 2024. Industrial-scale bioremediation of a hydrocarbon-contaminated aquifer's sediment at the location of a heating plant, Belgrade, Serbia. *Clean Technol. Environ. Policy* **26**, 1785–1798. <https://doi.org/10.1007/s10098-023-02724-8>
- Magnusson, B., Hovind, H., Krysell, M., Lund, U., Mäkinen, I., 2018. Handbook of Internal Quality Control, Nordtest Report TR 569, 5th ed. Nordtest.
- Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M., Sahlin, E., 2017. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, Nordtest Report TR 537, 4th ed. Nordtest.
- Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., Bezirtzoglou, E., 2020. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front. Public Heal.* **8**. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014>
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 650–663. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>
- Martins, D.S., Estevam, B.R., Perez, I.D., Américo-Pinheiro, J.H.P., Isique, W.D., Boina, R.F., 2022. Sludge from a water treatment plant as an adsorbent of endocrine disruptors. *J. Environ. Chem. Eng.* **10**, 108090. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108090>

- Matinian, N.N., Gusareva, A.L., Bakhmatova, K.A., Sheshukova, A.A., 2020. Microbiological indicators and heavy metal concentration in ecological assessment of urban soils of Saint Petersburg, Russia. *Geogr. Environ. Sustain.* **13**, 214–223. <https://doi.org/10.24057/2071-9388-2019-63>
- Mehlich, A., 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **15**, 1409–1416. <https://doi.org/10.1080/00103628409367568>
- Mendoza-Burguete, Y., de la Luz Pérez-Rea, M., Ledesma-García, J., Campos-Guillén, J., Ramos-López, M.A., Guzmán, C., Rodríguez-Morales, J.A., 2023. Global Situation of Bioremediation of Leachate-Contaminated Soils by Treatment with Microorganisms: A Systematic Review. *Microorganisms* **11**, 857. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040857>
- Meyer, L., Guyot, S., Chalot, M., Capelli, N., 2023. The potential of microorganisms as biomonitoring and bioremediation tools for mercury-contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **262**, 115185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115185>
- Milcic-Terzic, J., Lopez-Vidal, Y., Vrvic, M.M., Saval, S., 2000. Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Water Sci. Technol.* **42**, 403–406. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0541>
- Milcic-Terzic, J., Lopez-Vidal, Y., Vrvic, M.M., Saval, S., 2001. Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Bioresour. Technol.* **78**, 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00156-5)
- Miletic, S., 2013. Research of polluted habitats as sources of microorganisms for bioremediation. University of Belgrade, Belgrade. <https://doi.org/10.2298/BG20131207MILETIC>
- Miletić, S., Jednak, T., Avdalović, J., Beškoski, V., Ilić, M., Gojgić-Cvijović, G., Vrvic, M.M.M., 2017. Bioremediation of complex pollutants from the oil industry containing cobalt and molybdenum catalysts. *Solid State Phenom.* **262 SSP**, 622–625. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.622>
- Milic, J., Avdalovic, J., Solevic-Knudsen, T., Gojgic-Cvijovic, G., Jednak, T., Vrvic, M., 2016. Initial microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **22**, 293–299. <https://doi.org/10.2298/CICEQ150606043M>
- Milic, J., Beskoski, V., Ilic, M., Ali, S., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M., 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium. *J. Serbian Chem. Soc.* **74**, 455–460. <https://doi.org/10.2298/JSC0904455M>
- Milicevic, Z., Marinovic, D., Gajica, G., Kasanin-Grubin, M., Jovanovic, V., Jovancicevic, B., 2017. Organic geochemical approach in the identification of oil-type pollutants in water and sediment of the River Ibar. *J. Serbian Chem. Soc.* **82**, 593–605. <https://doi.org/10.2298/JSC161129022M>
- Mirsal, I.A., 2008. Soil pollution: Origin, monitoring & remediation. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-70777-6>
- Mondal, K., Kumar, S., Singh, A.K., Najjar, I.N., Thakur, N., Chandra Mondal, K., Das, S., 2024. Overcoming industrial challenges in microbial bioremediation. In 'Functional Metagenomics'. Elsevier, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98372-3.00005-8>
- Mosca Angelucci, D., Tomei, M.C., 2016. Ex situ bioremediation of chlorophenol contaminated soil: comparison of slurry and solid-phase bioreactors with the two-step polymer extraction-bioregeneration process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **91**, 1577–1584. <https://doi.org/10.1002/jctb.4882>

- Muhammad, S., Abbas, Z., Bashir, S., Qadir, G., Khan, S., 2019. Nitrogen Fixation with Non-Leguminous Plants. *Spec. J. Agric. Sci.* **5**, 35–44.
- Muter, O., 2023. Current Trends in Bioaugmentation Tools for Bioremediation: A Critical Review of Advances and Knowledge Gaps. *Microorganisms* **11**, 710. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030710>
- Narayanan, C.M., Narayan, V., 2019. Biological wastewater treatment and bioreactor design: a review. *Sustain. Environ. Res.* **29**, 33. <https://doi.org/10.1186/s42834-019-0036-1>
- Do Nascimento, M., Sanchez Rizza, L., Arruebarrena Di Palma, A., Dublan, M. de los A., Salerno, G., Rubio, L.M., Curatti, L., 2015. Cyanobacterial biological nitrogen fixation as a sustainable nitrogen fertilizer for the production of microalgal oil. *Algal Res.* **12**, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.017>
- Ollivier, B., Magot, M. (Eds.), 2005. Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, DC, USA. <https://doi.org/10.1128/9781555817589>
- Omenna, E.C., Omage, K., Ezaka, E., Azeke, M.A., 2024. Bio-augmentation and bio-stimulation with kenaf core enhanced bacterial enzyme activities during bio-degradation of petroleum hydrocarbon in polluted soil. *Sci. Rep.* **14**, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50882-y>
- Omokhagbor Adams, G., Tawari Fufeyin, P., Eruke Okoro, S., Ehinomen, I., 2020. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegrad.* **3**, 28–39. <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5>
- Özkara, A., Akyıl, D., 2018. Environmental Pollution and Pollutants on the Ecosystem: A Review. *Turkish J. Sci. Rev.* **11**, 11–17.
- Pande, V., Pandey, S.C., Sati, D., Bhatt, P., Samant, M., 2022. Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystem. *Front. Microbiol.* **13**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2006. Handbook of Soil Analysis. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-31211-6>
- Patel, A.B., Shaikh, S., Jain, K.R., Desai, C., Madamwar, D., 2020. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Front. Microbiol.* **11**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>
- Paul, O., Jasu, A., Lahiri, D., Nag, M., Ray, R.R., 2021. IN SITU AND EX SITU BIOREMEDIATION OF HEAVY METALS: THE PRESENT SCENARIO. *J. Environ. Eng. Landsc. Manag.* **29**, 454–469. <https://doi.org/10.3846/jeelm.2021.15447>
- Perera, I.C., Mauran, S., Wickramasinghe, P.M., 2023. Bioremediation of heavy metals using yeast. In 'Advances in Yeast Biotechnology for Biofuels and Sustainability'. Elsevier, pp. 475–501. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95449-5.00004-7>
- Pete, A.J., Bharti, B., Benton, M.G., 2021. Nano-enhanced Bioremediation for Oil Spills: A Review. *ACS ES&T Eng.* **1**, 928–946. <https://doi.org/10.1021/acsestengg.0c00217>
- Petrova, D., Lyubimenko, V., Ivanov, E., Gushchin, P., Kolesnikov, I., 2022. Energy Basics of Catalytic Hydrodesulfurization of Diesel Fuels. *Catalysts* **12**, 1301. <https://doi.org/10.3390/catal12111301>
- Pieper, D.H., Reineke, W., 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 262–270. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00094-X)

- Pravilnik o kategorijama, ispitivanju i klasifikaciji otpada [WWW Document], 2021. . *Sl. Glas. RS*, br. 56/2010, 93/2019 i 39/2021. URL <https://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik-kategorijama-ispitivanju-klasifikaciji-otpada.html>
- Priya, A.K., Gnanasekaran, L., Dutta, K., Rajendran, S., Balakrishnan, D., Soto-Moscoso, M., 2022. Biosorption of heavy metals by microorganisms: Evaluation of different underlying mechanisms. *Chemosphere* **307**, 135957. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135957>
- Przulj, S., Radojicic, A., Kasanin-Grubin, M., Pesevic, D., Stojadinovic, S., Jovancicevic, B., Veselinovic, G., 2022. Distribution and provenance of heavy metals in sediments of the Vrbas River, Bosnia and Herzegovina. *J. Serbian Chem. Soc.* **87**, 519–530. <https://doi.org/10.2298/JSC210608070P>
- Radojkovic, M., Zekovic, Z., Dojcinovic, B., Stojanovic, Z., Cvetanovic, A., Manojlovic, D., 2014. Characterization of *Morus* species in respect to micro, macro, and toxic elements. *Acta Period. Technol.* 229–237. <https://doi.org/10.2298/APT1445229R>
- Ramsey, M.H., Argyraki, A., 1997. Estimation of measurement uncertainty from field sampling: implications for the classification of contaminated land. *Sci. Total Environ.* **198**, 243–257. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)05456-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)05456-9)
- Reddy, K.V., Ranjit, P., Priyanka, E., Maddela, N.R., Prasad, R., 2024. Bioremediation of heavy metals-contaminated sites by microbial extracellular polymeric substances – A critical view. *Environ. Chem. Ecotoxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2024.05.002>
- Relić, D., Đorđević, D., Sakan, S., Anđelković, I., Miletić, S., Đuričić, J., 2011. Aqua regia extracted metals in sediments from the industrial area and surroundings of Pančevo, Serbia. *J. Hazard. Mater.* **186**, 1893–1901. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.086>
- Roote, D.S., 1998. Technology Status Report In Situ Flushing. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburgh, PA.
- Rouch, D.A., Lee, B.T.O., Morby, A.P., 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 132–141. <https://doi.org/10.1007/BF01569895>
- Rouhani, S.H.R., Davarkhah, R., Zaheri, P., Mousavian, S.M.A., 2020. Separation of molybdenum from spent HDS catalysts using emulsion liquid membrane system. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* **153**, 107958. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107958>
- Sakan, S., 2010. A new approach in the use of microelements as tracers for identification and differentiation of natural and anthropogenic impacts in the sediments. University of Belgrade, Belgrade. <https://doi.org/10.2298/BG20100608SAKAN>
- Samelak, I., Balaban, M., Vidovic, N., Koljancic, N., Antic, M., Solecic-Knudsen, T., Jovancicevic, B., 2018. Application of alkane biological markers in the assessment of the origin of oil pollutants in the soil and recent river sediments (River Vrbas, Bosnia and Herzegovina). *J. Serbian Chem. Soc.* **83**, 1167–1175. <https://doi.org/10.2298/JSC180501061S>
- Sar, P., D'Souza, S.F., 2001. Biosorptive uranium uptake by a *Pseudomonas* strain: characterization and equilibrium studies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 1286–1294. <https://doi.org/10.1002/jctb.517>
- Sattler, M., 2011. Anaerobic Processes for Waste Treatment and Energy Generation. In 'Integrated Waste Management - Volume II'. InTech. <https://doi.org/10.5772/17731>

- Savitha, T., Khalifa, A.Y.Z., Sankaranarayanan, A., 2022. Biofilm interceded microbial prospecting of bioremediation. In 'Bioprospecting of Microbial Diversity'. Elsevier, pp. 371–391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90958-7.00028-5>
- Sayed, K., Baloo, L., Sharma, N.K., 2021. Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 2226. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052226>
- Sayqal, A., Ahmed, O.B., 2021. Advances in Heavy Metal Bioremediation: An Overview. *Appl. Bionics Biomech.* **2021**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/1609149>
- Sharma, A.K., Sharma, M., Sharma, A.K., Sharma, M., Sharma, M., 2023. Mapping the impact of environmental pollutants on human health and environment: A systematic review and meta-analysis. *J. Geochemical Explor.* **255**, 107325. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2023.107325>
- Sharma, D.P. (Ed.), 2024. Research Trends in Environmental Science (Volume - 16). AkiNik Publications. <https://doi.org/10.22271/ed.book.2706>
- Sharma, K., Shah, G., Singhal, K., Soni, V., 2024. Comprehensive insights into the impact of oil pollution on the environment. *Reg. Stud. Mar. Sci.* **74**, 103516. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.103516>
- Shim, J., Kim, J.-W., Shea, P.J., Oh, B.-T., 2015. Biosorption of Cadmium by *Citrobacter* sp. JH 11-2 Isolated from Mining Site Soil. *Sep. Sci. Technol.* 150629114738007. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1041978>
- Silver, S., Phung, L.T., 1996. BACTERIAL HEAVY METAL RESISTANCE: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.753>
- Singh, V., Ahmed, G., Vedika, S., Kumar, P., Chaturvedi, S.K., Rai, S.N., Vamanu, E., Kumar, A., 2024. Toxic heavy metal ions contamination in water and their sustainable reduction by eco-friendly methods: isotherms, thermodynamics and kinetics study. *Sci. Rep.* **14**, 7595. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58061-3>
- Singh, V., Singh, J., Singh, N., Rai, S.N., Verma, M.K., Verma, M., Singh, V., Chivate, M.S., Bilal, M., Mishra, V., 2023. Simultaneous removal of ternary heavy metal ions by a newly isolated *Microbacterium paraoxydans* strain VSVM IIT(BHU) from coal washery effluent. *BioMetals* **36**, 829–845. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00476-4>
- Smith, E., Thavamani, P., Ramadass, K., Naidu, R., Srivastava, P., Megharaj, M., 2015. Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: Evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **101**, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.029>
- Snellinx, S., Van Meensel, J., Farahbakhsh, S., Bourgeois, L., Mertens, A., Lauwers, L., Buysse, J., 2021. Waste treatment company decision-making in a complex system of markets influenced by the circular economy. *J. Clean. Prod.* **328**, 129672. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129672>
- Solevic, T., Novakovic, M., Ilic, M., Antic, M., Vrvic, M., Jovancicevic, B., 2011. Investigation of the bioremediation potential of aerobic zymogenous microorganisms in soil for crude oil biodegradation. *J. Serbian Chem. Soc.* **76**, 425–438. <https://doi.org/10.2298/JSC100531033S>
- Sonker, S., Fulke, A.B., Monga, A., 2024. Recent trends on bioremediation of heavy metals; an insight with reference to the potential of marine microbes. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*

<https://doi.org/10.1007/s13762-024-05673-x>

- Speight, J.G., 2017. Handbook of Petroleum Refining. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Spini, G., Spina, F., Poli, A., Bliex, A.-L., Regnier, T., Gramellini, C., Varese, G.C., Puglisi, E., 2018. Molecular and Microbiological Insights on the Enrichment Procedures for the Isolation of Petroleum Degrading Bacteria and Fungi. *Front. Microbiol.* **9**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02543>
- Stanojevic, A.B., Vrvic, M., Száková, J., Miletić, S., 2023. Evaluation of the ex-situ bioremediation of the petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Bioremediat. J.* 1–11. <https://doi.org/10.1080/10889868.2023.2283580>
- Stolp, H., 1988. Microbial Ecology: Organisms, Habitats, Activities. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sun, R., Gao, Y., Yang, Y., 2022. Leaching of heavy metals from lead-zinc mine tailings and the subsequent migration and transformation characteristics in paddy soil. *Chemosphere* **291**, 132792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132792>
- Tanveer, M., Khan, S.A.R., Umar, M., Yu, Z., Sajid, M.J., Haq, I.U., 2022. Waste management and green technology: future trends in circular economy leading towards environmental sustainability. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **29**, 80161–80178. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23238-8>
- Tedesco, P., Balzano, S., Coppola, D., Esposito, F.P., de Pascale, D., Denaro, R., 2024. Bioremediation for the recovery of oil polluted marine environment, opportunities and challenges approaching the Blue Growth. *Mar. Pollut. Bull.* **200**, 116157. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116157>
- Tekere, M., 2019. Microbial Bioremediation and Different Bioreactors Designs Applied. In 'Biotechnology and Bioengineering'. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83661>
- Tereshchenko, A.G., 2015. Deliquescence: Hygroscopicity of Water-Soluble Crystalline Solids. *J. Pharm. Sci.* **104**, 3639–3652. <https://doi.org/10.1002/jps.24589>
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* **51**, 844–851. <https://doi.org/10.1021/ac50043a017>
- Trejo, F., M, R., Ancheyta, J., 2008. CoMo/MgO–Al₂O₃ supported catalysts: An alternative approach to prepare HDS catalysts. *Catal. Today* **130**, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.10.105>
- Uqab, A., Syeed, M., Saleemm, F., Ruqeya, N., 2015. Factors Affecting Bioremediation. *J. Res. Dev.* **15**, 102–109.
- Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu [WWW Document], 2019. . *Sl. Glas. RS*", br. 30/2018 i 64/2019. URL <https://www.paragraf.rs/propisi/uredba-granicnim-vrednostima-zagadjujucih-stetnih-opasnih-materija-zemljistu.html>
- US EPA, 2007. US Environmental Protection Agency. Method 3051A: Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils. Test Methods Evaluation Solid Waste. Washington, DC.
- US EPA SW-846 Test Method 9071B, 1998. n-Hexane Extractable Material (HEM) for Sludge, Sediment, and Solid Samples.

- Varjani, S.J., Agarwal, A.K., Gnansounou, E., Gurunathan, B. (Eds.), 2018. *Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management 'Energy, Environment, and Sustainability*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7485-1>
- Venkatraman, G., Giribabu, N., Mohan, P.S., Muttiah, B., Govindarajan, V.K., Alagiri, M., Abdul Rahman, P.S., Karsani, S.A., 2024. Environmental impact and human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and remedial strategies: A detailed review. *Chemosphere* **351**, 141227. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141227>
- Verma, S., Kuila, A., 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environ. Technol. Innov.* **14**, 100369. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Wang, M., Chen, S., Jia, X., Chen, L., 2021. Concept and types of bioremediation. In 'Handbook of Bioremediation'. Elsevier, pp. 3–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819382-2.00001-6>
- Wang, X.-B., Chi, C.-Q., Nie, Y., Tang, Y.-Q., Tan, Y., Wu, G., Wu, X.-L., 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresour. Technol.* **102**, 7755–7761. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.009>
- Wang, Z., Luo, P., Zha, X., Xu, C., Kang, S., Zhou, M., Nover, D., Wang, Y., 2022. Overview assessment of risk evaluation and treatment technologies for heavy metal pollution of water and soil. *J. Clean. Prod.* **379**, 134043. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134043>
- Wani, A.K., Akhtar, N., Sher, F., Navarrete, A.A., Américo-Pinheiro, J.H.P., 2022. Microbial adaptation to different environmental conditions: molecular perspective of evolved genetic and cellular systems. *Arch. Microbiol.* **204**, 144. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02757-5>
- Wilke, B.-M., 2005. Determination of Chemical and Physical Soil Properties. In 'Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. Soil Biology, Volume 5' (Eds. Margesin, R., Schinner, F.). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 47–95. https://doi.org/10.1007/3-540-28904-6_2
- Yemele, O.M., Zhao, Z., Nkoh, J.N., Ymele, E., Usman, M., 2024. A systematic review of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution: A combined bibliometric and mechanistic analysis of research trend toward an environmentally friendly solution. *Sci. Total Environ.* **926**, 171577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171577>
- Yukselen, M.A., Alpaslan, B., 2001. Leaching of metals from soil contaminated by mining activities. *J. Hazard. Mater.* **87**, 289–300. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00277-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00277-1)
- Zamora-Ledezma, C., Negrete-Bolagay, D., Figueroa, F., Zamora-Ledezma, E., Ni, M., Alexis, F., Guerrero, V.H., 2021. Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. *Environ. Technol. Innov.* **22**, 101504. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>
- Zango, U.U., Yadav, M., Sharma, V., Sharma, J.K., Panwar, S., Dan, S., Sharma, A.K., 2020. Microbial Bioremediation of Heavy Metals: Emerging Trends and Recent Advances. *Res. J. Biotechnol.* **15**, 164–178.
- Zhang, C., Wu, D., Ren, H., 2020a. Bioremediation of oil contaminated soil using agricultural wastes via microbial consortium. *Sci. Rep.* **10**, 9188. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66169-5>
- Zhang, F., Zhang, H., Yuan, Y., Liu, D., Zhu, C., Zheng, D., Li, G., Wei, Y., Sun, D., 2020b. Different response of bacterial community to the changes of nutrients and pollutants in sediments from an urban river network. *Front. Environ. Sci. Eng.* **14**, 28. <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1207-3>

Zhang, J., Chen, X., Zhou, J., Luo, X., 2020c. Uranium biosorption mechanism model of protonated *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Hazard. Mater.* **385**, 121588. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121588>

Zhang, Y., Li, Q., Liu, X., 2020d. Role of Ag⁺ in the Bioleaching of Arsenopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Metals (Basel)*. **10**, 403. <https://doi.org/10.3390/met10030403>

Biografija

Tanja (Radmila) Jednak Berić rođena je 25. juna 1988. godine u Glini, R. Hrvatska. Osnovnu školu i srednju medicinsku je završila u Valjevu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine kao redovan student, a diplomirala u aprilu 2013. godine sa prosečnom ocenom 7,42 sa završnim radom pod naslovom *“Ispitivanje mikrobicidnog dejstva metala, iz katalizatora za desulfurizaciju nafte, na konzorcijumu mikroorganizama izolovanih iz različitih otpadnih materijala”*. Master studije na istom fakultetu završila je u septembru 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,60 i odbranila master rad pod naslovom: *“Ispitivanje formi metala iz otpadnih katalizatora naftne industrije tokom bioremedijacije”*. Doktorske studije upisala je 2015. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor biohemijskih nauka.

Od 2013. do 2020. godine bila je zaposlena u bioremedijacijonoj kompaniji BREM GROUP DOO Beograd kao Rukovodilac zaštite životne sredine, a od 2015. do 2020. godine u kompaniji NRK INŽENJERING DOO Beograd obavljala je i poslove Tehničkog rukovodioca laboratorije za ispitivanje prema ISO 17025:2017. Od 2020. do danas zaposlena je u konsultantskoj kompaniji KVADRIKOM DOO Beograd kao stručnjak za zaštitu životne sredine gde se bavi i poslovima bezbednosti i zdravlja na radu i zaštite od požara, uz implementaciju ISO standarda.

Do sada je prezentovala svoje rezultate na različitim skupovima u zemlji i inostranstvu i publikovala dva rada u sklopu doktorske disertacije u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i dva saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34).

Tanja Jednak Berić je udata i ponosna majka trogodišnjeg Nikole i dvogodišnje Lenke.

Objavljeni radovi u sklopu doktorske disertacije

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. T. Jednak Berić, M.M. Vrvic, M. Lješević, J. Avdalović, M. Ilić, D. Crnković, B. Jovančičević, S. Miletić; Testing of the bioremediation on model substrates for complex refinery contaminants arising from accidental or deliberate facility damage. *Environmental Chemistry* 21 (2024). <https://doi.org/10.1071/EN23111>.
2. T. Jednak Berić, J. Avdalović, J. Milić, V. Teofilović, M.M. Vrvic, B. Jovančičević, S. Miletić; The influence on microorganisms of heavy metals from refiner's spent desulphurisation catalysts. *Chemistry and Ecology* 39 (2023) 202–213. <https://doi.org/10.1080/02757540.2022.2158185>.

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. T. Jednak Berić, M. Ilić, J. Avdalović, J. Milić, B. Jovančičević, M.M. Vrvic, S. Miletić; Microbiological degradation and transformation of complex refinery waste caused by violent destruction of installations, in: *Electron. Abstr. B. FEMS Conf. Microbiol., Serbian Society of Microbiology, Belgrade, Serbia, 2022: pp. 734–735.* <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/5328>.
2. T. Jednak, M.M. Vrvic, S. Miletić, J. Avdalović, M. Ilić, J. Milić, V. Beškoski; Investigation of Inhibitory Effect of Molybdenum and Cobalt in the Isolated Microorganism Consortia Which is Used in Bioremediation, in: *Electron. Abstr. B. FEMS Online Conf. Microbiol., Serbian Society of Microbiology, 2020: p. 456.* <https://cer.ihtm.bg.ac.rs/handle/123456789/4962>.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тања Једнак Берић
Број индекса ДБ 08/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биоремедијација сложених рафинеријских супстрата насталих инцидентно или намерном деструкцијом инсталација: испитивања на модел супстрату

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Тања Једнак Берић
Број индекса	ДБ 08/2015
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Биоремедијација сложених рафинеријских супстрата насталих инцидентно или намерном деструкцијом инсталација: испитивања на модел супстрату
Ментори	Проф. др Бранимир Јованчићевић Др Срђан Милетић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биоремедијација сложених рафинеријских супстрата насталих инцидентно или намерном деструкцијом инсталација: испитивања на модел супстрату

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.