

SNEŽANA DJORDJEVIĆ¹, ŽELJKO DŽELETOVIĆ²,
DRAGANA STANOJEVIĆ³, ZVONKO RADAN⁴

Originalni naučni rad
UDC:614.8.086.4:628.472.3/.4

Mikrobiološke i biohemijske osobine deposola RB “Kolubara”

Određivane su mikrobiološke i biohemijske osobine deposola RB Kolubara na kome je izvršena rekultivacija, formiranjem biljnih zajednica breza, beli bor i jabučnjak. Mikrobiološke analize obuhvatile su određivanje brojnosti sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama, a biohemijske određivanje aktivnosti ureaze, dehidrogenaze, biomase, ugljenika i fosfora. Deposoli “RB Kolubara” u zavisnosti od formiranih biljnih sastojina u cilju rekultivacije su razlikuju po mikrobiološkim i biohemijskim osobinama. Kod deposola RB Kolubara u sastojini breza ukupan broj mikroorganizama, brojnost gljiva, celulolitskih mikroorganizama, aminoheterotrofa, Azotobacter-a, aktivnost ureaze, dehidrogenaze, biomasa C i P i je veći u odnosu na sastojnu beli bor, kod koje je utvrđena veća brojnost aktinomiceta. Ukupan broj mikroorganizama, brojnost gljiva, aminoheterotrofa, aktinomiceta, celulolizatora i biomasa C u deposolima je na nivou vrednosti za prirodna zemljišta, dok je aktivnost ureaze, dehidrogenaze i biomase P manja. Brojnost Azotobacter chroococcum u deposolima je mala a u nekim lokalitetima nije konstatovana.

Ključne reči: deposol, rekultivacija, biljna zajednica, mikroorganizmi

UVOD

Nestašica naftinih derivata nameće potrebu povećane proizvodnje i korišćenja uglja, što ima za posledicu oštećenje zemljišta, uništavanje biljnog pokrivača i zagađenje životne sredine. Površinskom eksploatacijom uglja narušava se prvobitna struktura i sklop zemljišta, deponuju različiti geološki materijali [1], stvara specifičan reljef i mikroreljef i uslovi za eroziju i klizišta [2]. Deposoli imaju izrazito nisku proizvodnu vrednost, zbog nedostatka ili veoma malog sadržaja humusa [3], hranjivih elemenata N i P, nepovoljnog vodno - vazdušnog režima, mehaničkog sastava [4] i toksičnih koncentracija teških metala [5]. Ovo ima za posledicu i promene u kvantitativnom i kvalitativnom sastvu mikrobnih populacija i njihove biohemijske aktivnosti.

Rekultivacijom, uz primenu odgovarajućih agrohemijskih i agromeliorativnih mera, agrotehnikom i plodoredom useva, moguće je uticati na formiranje humusno - akumulativnog površinskog sloja jalovina odnosno adsorptivnog kompleksa i uticati na njegovu plodnost [6]. U ovom dugom i složenom procesu veoma značajnu ulogu imaju populacije mikroorganizama, koje učestvuju u važnim biohemijskim procesima: sintezi i razlaganju humusa, hidrolizi organskih jedinjenja, mobilizaciji hranljivih elemenata, reakcijama oksido- redukcije i ostalim procesima koji su vezani za evoluciju zemljišta i formiranje njegove efektivne plodnosti.

Adrese autora: ¹Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Nemanjina 6, Beograd- Zemun, ²INEP, Institut za primenu nuklearne energije, Banatska 31-b, Zemun, ³Biounik doo, Razvojno proizvodni centar, Šimanovci, ⁴Fermopromet, Majške Međe - Bolman, Hrvatska

Primljeno za publikovanje: 17. 08. 2013.

Prihvaćeno za publikovanje: 23. 11. 2013.

Enzimi u zemljištu učestvuju u procesima metabolizma i transfera energije, a njihova aktivnost je značajan pokazatelj biološke aktivnosti u ekosistemu [7]. Zemljišna mikrobiološka biomasa koja čini 2 - 3 %, ukupnog organskog ugljenika u zemljištu, predstavlja labilnu frakciju organske materije i značajno skladište hraniva [8] koje će pod uticajem heterotrofnih mikroorganizama, ponovo postati pristupačno biljkama i mikroorganizmima [9]. Na taj način mikroorganizmi, i njihovi enzimi učestvuju u kruženju C i ciklusu hranljivih elemenata u ekosistemu.

Cilj ovog rada se ispita brojnost i aktivnost pojedinih sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama, aktivnost enzima i biomasa C i P u deposolima, RB “Kolubara” na kojima su formirane različite sastojine biljnih zajednica u cilju rekultivacije.

MATERIJAL I METODE

Uzorci deposola za mikrobiološke i biohemijske analize uzimani su iz RB Kolubara, i to sa lokaliteta: Vidikovac gde je formirana satojna belog bora stara više od 16 godina, Polje D gde je satojna breze stare 7 godina i Polje D gde je jabučar star 7 godina. Uzorci zemljišta su uzimani sa dubine 0 – 20 cm i 20 – 40 cm.

Analitičke metode

Mikrobiološke i biohemijske analize obuhvatile su određivanje brojnosti sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama, aktivnosti enzima i biomase C i P u deposolima. Rezultati su izraženi u g apsolutno suvog zemljišta (105°C). Brojnost mikroorganizama i biomasa C i P određivana je u tri ponavljanja, a aktivnost enzima u dva.

Brojnost mikroorganizama određivana je indirektnom metodom razredjenja, zasejavanjem odgovarajućeg razredjenja na selektivne hranjive podloge i to:

1. Ukupan broj mikroorganizama na agarizovanom ekstraktu zemljišta, [10].
2. Gljive na čapekovom agaru
3. Aktinomcete na sintetičkom agaru sa saharozom
4. Aminoheterotrofa na meso-peptonskom agaru,
5. Celulolitskih mikroorganizama na Waksman-Carey agaru.
6. *Azotobacter chroococcum* na Fjodorovom agaru.

Aktivnost enzima određivana je u uzorcima deposola koji su sušeni na vazduhu, sejani kroz sito < 2 mm i nakon 24 časa analizirani.

Aktivnost ureaze određivana je metodom [11], i izražavana u $\mu\text{mol NH}_4\text{-N g}^{-1}\text{s}^{-1}$,

Aktivnost dehidrogenaze određivana je metodom Tabatabai [12], a izražavana u $\mu\text{g TPF g}^{-1}\text{24h}$.

Biomasa C fumigaciono - ekstrakcionom metodom [13]. Uzorci deposola su sejani kroz sito (< 2mm), i inkubirali na 25°C, 7 dana, pri vlažnosti od 40% WHC. Nakon inkubacije uzorci su fumigovani sa bezalkoholnim CHCl_3 , 24 časa [14]. Posle fumigacije i odstranjivanja hloroforma deposoli su ekstrahovani sa 0,5 M K_2SO_4 , [15]. Nefumigovana kontrola je bila u istim uslovima, za vreme fumi-

gacije. Organski C u ekstraktu određivan je dihromatnom digestijom [16]. Ekstrabilni C je određivan iz razlike u iznosu C u fumigovanim i nefumigovanim uzorcima, a konvertovan je u biomasu C pomoću faktor kEC 0.38 [17].

Biomasa P određivana je metodom opisanoj u literaturi [18]. Nakon početne inkubacije uzoraka u vlažnim uslovima u prisustvu natronskog kreča, 10 dana, uzorci su fumigovani. Mikrobiološki P ekstrahovan je sa 0,5M, NaHCO_3 , pH 8,5. i određivan metodom [19]. Korekcija adsorbovanog P za vreme ekstrakcije izvršena je po [18].

REZULTATI I DISKUSIJA

Ukupan broj mikroorganizama, pokazatelj biogenosti zemljišta u ispitivanim deposolima je na nivou prosečnih vrednosti za prirodna zemljišta.

Utvrđen je veći ukupan broj mikroorganizama u sastojni breza i to visoko signifikantno u odnosu na ostale lokalitete. U sastojni beli bor ukupan broj mikroorganizama opada veoma značajno sa dubinom. Međutim, u sastojku breza na većoj dubini utvrđen je veći ukupan broj mikroorganizama.

Tabela 1 - Brojnost sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama u deposolima RB "Kostolac", RB "Kolubara" i RB "Kosovo"

Broj Uzorka	Ukupan broj mikroorg. 10^7 g^{-1}	Gljive 10^3 g^{-1}	Aktinomicete 10^5 g^{-1}	Aminoheterotrofi 10^7 g^{-1}	Celulolitski mikroorga. 10^5 g^{-1}	Azotobac-ter sp 10^1 g^{-1}
1	1.765	62.55	2.20	0.976	0.651	0.00
2	0.420	12.68	1.66	0.253	0.193	1.04
3	3.910	26.45	0.80	2.282	0.851	0.00
4	6.936	69.84	0.47	2.417	1.172	1.54

Gljive su heterotrofni mikroorganizmi koji imaju značajnu ulogu u procesima transformacije svežih organskih ostataka i sintezi humusa. Brojnost gljive opada sa dubinom u sastojni beli bor. Međutim u sastojni breza utvrđena je veća brojnost gljiva na dubini 20–40 cm. Brojnost gljiva je u proseku veća u sastojini breze.

Aktinomicete kao alkalofilna grupa mikroorganizama su veoma dobro zastupljene u deposolu RB "Kolubara". Brojnost aktinomiceta je najveća kod Jabučara i to značajno u odnosu na sastojine beli bor i breza, između kojih razlike u brojnosti nisu statistički značajne. Zastupljenost aktinomiceta je veća u sastojini beli bor u odnosu na sastojinu breza.

Brojnost aminoheterotrofa, fiziološke grupe mikroorganizama koja transformiše organska azotna jedinjenja, u ispitivanim deposolima je na nivou prirodnih zemljišta.

Brojnost aminoheterotrofa u deposolima RB "Kolubara" je visoko signifikantno veća u sastojinama breze u odnosu na beli bor i Jabučar.

Između brojnosti aminoheterotrofa i ukupnog broja mikroorganizama utvrđena je veoma značajna korelativna zavisnost ($r = 0,89^{**}$). Značajna zavisnost između brojnosti ove dve grupe mikroorganizama potvrđena je i u radu [20].

Celulolitski mikroorganizmi kojima pripadaju gljive, bakterije i aktinomicete, su dobro zastupljene u ispitivanim deposolima (tabela 1). Na lokalitetima RB "Kolubara" najveća brojnost celulolizatora utvrđena je kod sastojine breze na obe dubine i to veoma značajno u odnosu na Jabučar i sastojinu belog bora. Brojnost ove grupe mikroorganizama u sastojini belog bora je manja na dubini od 20 - 40 cm.

Azotobacter chroococcum, koji je u našim zemljištima najbrojniji asimbiotni azotofiksator [21] veoma je malo zastupljen u deposolima (tabela 1). U rekultivisanim odlagalištima jalovine u podmoskovskom basenu aktivnost nitrogenaze nije ustanovljena [22]. U deposolima RB "Kolubara", Azotobakter je konstatovan kod Jabučara, a u sastojini breza i beli bor samo na dubini 20 - 40 cm. Azotobakter je posebno osetljiv i za svoje razviće

zahteva posebne uslove spoljašnje sredine: neutralna zemljišta, dobro obezbeđena fosforom, kalijumom i nizom mikroelemenata.

Ureaza, koja transformiše ureu do CO_2 i NH_3 , je enzim koju učestvuje u procesima kruženja azota u zemljištu. Zemljišna ureaza se imobilizuje na humus ili minerale gline [23], čime se štiti od inaktivacije [24]. Aktivnost ureaze u deposolima je niska u

odnosu na prosečne vrednosti aktivnosti ureaze u površinskim slojevima prirodnih zemljišta [25].

Na lokalitetima RB Kolubara najveća aktivnost ureaze utvrđena je u sastojini breze i belog bora na dubini od 0 - 20 cm i ona se visoko signifikantno razlikovala u odnosu na jabučar. Aktivnost ovog enzima veoma značajno opada sa dubinom u sastojinama beli bor i breza.

Tabela 2 - Biohemijske osobine deposola RB "Kolubara"

Broj uzorka	UREAZA $\text{pmol NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ s}^{-1}$	DEHIDRO-GENAZA $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ 24h}$	BIOMASA C ekstrabilni C $\mu\text{g g}^{-1}$	BIOMASA P $\mu\text{g P g}^{-1}$
1	0.446	45.83	328.95	11.87
2	0.041	61.66	710.39	9.72
3	0.513	58.33	1421.05	11.78
4	0.076	54.17	1102.63	9.33
5	0.202	76.08	2118.22	10.33
Lsd: 0.01	0.154	4.91	308.50	5.082
0.05	0.114	3.611	223.90	3.739

Dehidrogenaza koja učestvuje u procesima humifikacije [26] i transformacije ksenobiotika [27] je jedan od značajnih pokazatelja ukupne biološke aktivnosti u zemljištu [28].

Aktivnost dehidrogenaze u ispitivanim deposolima je niža u odnosu na prosečnu aktivnost dehidrogenaze u prirodnim zemljištima i varira od $45.83 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ 24h}$ do $76.08 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ 24h}$ do, (tabela 2). Lukina [22] ističe da je aktivnost dehidrogenaze i katalaze u kiselim deposolima ne dostiže nivo aktivnosti u izluženom černoze mu ni posle primene organskih i mineralnih đubriva.

Kod RB "Kolubara" najveća aktivnost dehidrogenaze utvrđena je kod Jabučara i ona se veoma značajno razlikovala u odnosu na sastojnu breza i beli bor. U sastojini breze aktivnost dehidrogenaze je značajno veća na dubini od 0 - 20 cm, a u sastojini belog bora na dubini 20 - 40 cm.

Biomasa C određivana je pomoću dve metode, fumigaciono - inkubacione [14] i fumigaciono ekstrakcione [13]. Između vrednosti biomase C određene ovim metodama utvrđena je veoma značajna korelativna avisnost ($r = 0.85^{**}$) (graf.1), što je potvrdio i T a t e *et al.* [13].

Kod deposola RB "Kolubare" najveća biomasa C utvrđena je kod Jabučara ($2118.22 \mu\text{g C g}^{-1}$) i ona se visoko signifikantno razlikovala u odnosu na ostale lokalitete. U sastojini breze na obe dubine biomasa C je veoma značajno veća u odnosu na sastojinu beli bor (tabela 2).

Biomasa P kod ispitivanih deposola je manja u odnosu na prirodna zemljišta [7] (tabela 2). Kod deposola RB Kolubara razlike u biomasi P između sastojina beli bor i breza nisu statistički značajne. Kod oba lokaliteta biomasa P je manja na dubini od 20 - 40 cm.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti sledeće:

- Deposoli RB "Kolubara" se razlikuju po mikrobiološkoj i biohemijskoj aktivnosti.
- Ukupan broj mikroorganizama, brojnost gljiva, aminoheterotrofa, aktinomiceta, celulozatora i biomasa C u deposolima je na nivou vrednosti za prirodna zemljišta, dok je aktivnost ureaze, dehidrogenaze i biomase P manja. Brojnost *Azotobacter chroococcum* u deposolima je mala a u nekim lokalitetima nije konstatovana.
- Kod deposola RB Kolubara u sastojini breza ukupan broj mikroorganizama, brojnost gljiva, celulozatorskih mikroorganizama, aminoheterotrofa, *Azotobacter-a*, aktivnost ureaze, dehidrogenaze, biomasa C i P i je veći u odnosu na sastojnu beli bor, kod koje je utvrđena veća brojnost aktinomiceta.

LITERATURA

- [1] Resulović, H. (1982): Neke specifičnosti procesa pedodinamike i pedogeneze u deposolima. Zemljište i biljka, Vol. 31, 357 - 363.
- [2] Antonović, G.M. (1980): Oštećenje zemljišta i problemi njihove zaštite. Zemljište i biljka, Vol. 29, 29-106.
- [3] Dželetović Ž., Filipović R., Stojanović D., Vučković M., Djurdjević M., Lazarević M. (1995): Agrohemijska ispitivanja odlagališta jalovine Petka" ugljenokopa "Čirikovac" radi rekultivacije njegove površine. Rudarski glasnik 3 -4, 23 - 30.
- [4] Filipović R., Kotlajić, M., Simić, S. (1981): Uticaj mineralnih đubriva na rinos nekih ratarskih kultura na zemljištima oštećenim rudarskim aktivnostima. Zb. gozdarstva in lesarstva, L. 19, št.1, s.273 - 290, Ljubljana.
- [5] Dželetović Ž., Lazarević M., Djurdjević, M. (1991): Rekultivacija odlagališta lotacijske jalovine olovo - cinkove rude u Gračanici. IX Jugoslovenski naučni simpozijum Oštećenja zemljišta i problemi njegove zaštite. Zbornik izvoda radova, 47 - 48. Tuzla.

- [6] Filipović R., Simić S., Kotlajić M., Lazarević M., Mihailović M., (2009): Analiza i rezultati dosadašnjih istraživanja rekultivisanih površina jalovina površinskih kopova basena Kolubara.
- [7] Sarathachandra S.U., Perrott K.W., Upsdel M. P. (1984): Microbiological and biochemical characteristics of a range of New Zealand soils under established pasture. *Soil Biol. Biochem.* 16, No 2, 177-183.
- [8] Jenkinson D.S., Davidson S.A. and Powlson D.S. (1979): Adenosine triphosphate and microbial biomass in soil. *Soil Biol. and Biochem.* 1, 21 - 527.
- [9] Voroney R.P., Paul E. A. (1984): Determination of kc and kn in situ for calibration of the chloroform fumigation - incubation method. *Soil Biol. and Biochem.* 16. No.1, 9- 14.
- [10] Pochon Z. (1954): Manuel technique d analyse microbiologique du soil. Paris.
- [11] Tabatabai M.A., Bremner J.M. (1972): Assay of urease activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4, 479 - 487.
- [12] Tabatabai M.A. (1982): Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis, Part 3* (A.L. Page, Ed.), pp. 903- 946. American Society of Agronomy, Madison.
- [13] Tate K.R., Ross D.J., Feltham C.W. (1988): A direct extraction method to estimate soil microbial C: Effects of experimental variables and same calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.* 20, No. 3, 329 - 335.
- [14] Jenkinson D.S and Powlson D.S. (1976): The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. and Biochem.* 8, 209 - 213.
- [15] Brookes P C., Landman A., Pruden G., Jenkinson D. S. (1985): Chloroform fumigation and release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. and Biochem.* 17, No. 6, 837 - 842.
- [16] Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S (1987): An exact extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, No. 6, 703 - 707.
- [17] Joergensen G.R. (1996): The fumigation – extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k EC value. *Soil Biol. Biochem.* vol. 28, No.1, pp. 25 - 31.
- [18] Brookes P.C., Powlson D.S., Jenkinson D.S (1992): Measurement of Microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. and Biochem* 14, 319 - 329.
- [19] Murphy J., Riley J.P. (1992): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- [20] Djordjević S. (1994): Influence of various fertilization regimes on number of microorganisms in soil under maize monoculture. *Zemljište i biljka*, Vol. 43, No. 2, 79 - 87.
- [21] Todorović M., Trifković V. (1990): Izdvajanje i identifikacija asimbiotnih azotofiksatora iz različitih tipova zemljišta. *Mikrobiologija*, Vol. 27, No. 1, 53 - 62.
- [22] Lukina N.N. (1991): Fermentativna aktivnost rekultiviranih otbalov v Podmoskovskom ba-sejne. *Vestnik Moskovskogo universiteta - erija 17: Počvovedenie*, No. 1: 63 - 66. Moskva.
- [23] McLaren, A.D., Pukite, A.H. and Barshad, I. (1975): Isolation of humus with enzymatic activity from soil. *Soil Sci.* 119, 178 - 180.
- [24] Burns, R.G., El-Sayed, M.H. and McLaren, A. D. (1972): Extraction of a urease - active organo - complex from soil. *Soil Biol. Biochem.* 4 . 107 - 108.
- [25] Djordjević S., Bogdanović V., Stojanović S., Djordjević A. (1997): Enzimatska aktivnost zemljišta njihovih varijeteta Zapadne Srbije. IX Kongres JDPZ: Uredjenje, korišćenje i očuvanje zemljišta za 21. vek. *Zbornik radova*, 401 - 410, Novi Sad.
- [26] Flaing, W. (1955): Yur Blidungsmoglichkeit von Huminsuren aus Lignin, *olzorchung* 9, 14.
- [27] Bollag, J.M. (1983): Cross - coupling of humus constituents and xenobiotic substances. In *Aquatic and Terrestrial Humic Substances* (R.F. Christman and E. T. Gjessing Eds), pp.127 - 141. *Ann. Arbor Science*, Ann Arbor.
- [28] Govedarica, M., Jarak, M. (2005): *Mikrobiologija zemljišta*. Novi Sad. s.189.

ABSTRACT

MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF DEPOSOLS RB "KOLUBARA"

Both microbiological and biochemical properties of "deposol" at "Kolubara" Mining Complex, recultivated by plant communities of birch and white pine, were studied. With respect to microbiological investigations, the number of systematic and physiological groups of microorganisms was estimated, while biochemical studies comprised determination of urease and dehydrogenase activity and evaluation of carbon and phosphorus biomass. The "deposols" at "Kolubara" Mining Complex differed in their microbiological and biochemical properties, depending on plant communities, formed in order to recultivate these soils. Birch community "deposols" expressed higher values than white pine community "deposols" regarding following parameters: total number of microorganisms, number of fungi, number of cellulolytic microorganisms, number of aminoheterotrophs, number of Azotobacter spp., urease and dehydrogenase activity, and both carbon and phosphorus biomass. Conversely, the white pine community "deposols" expressed higher value of number of Actinomycetes than birch community "deposols". Total number of microorganisms, number of fungi, aminoheterotrophs, actinomycetes, and cellulolytic microorganisms, and carbon biomass in "deposols" was at the level of values of those parameters in natural soils. Parameters concerning both urease and dehydrogenase activity and phosphorus biomass were lower. Number of Azotobacter chroococcum was extremely small at all examined "deposols", while it was not even detected at certain localities.

Key words: *deposol, recultivated, communities of birch, microorganisms.*

Scientific paper

Received for Publication: 17. 08. 2013.

Accepted for Publication: 23. 11. 2013.