

BLAŽO LALEVIĆ¹, VERA RAIČEVIĆ¹,
DRAGOLJUB DABIĆ², LJUBINKO JOVANOVIĆ³,
DRAGAN KIKOVIĆ⁴, SVETLANA ANTIĆ-MLADENOVIĆ¹

Originalni naučni rad
UDC:631.427.2:502.75:665.6.002.68=861

Mikrobni diverzitet zemljišta zagađenih organskim jedinjenjima poreklom iz naftne industrije

U petrohemijskoj industriji nastaju potencijalno opasne i toksične materije, koje je potrebno ukloniti ili transformisati nizom fizičkih, hemijskih i bioloških procesa. Cilj ovog rada bio je ispitivanje mikrobnog diverziteta zemljišta kontaminiranog organskim jedinjenjima poreklom iz naftne industrije. Sadržaj organskog ugljenika u zemljištu ukazuje na prisustvo organskih zagađivača poreklom iz naftne industrije. Ispitivani uzorci nisu zagađeni teškim metalima i mikroelementima. Brojnost bakterija se povećavala dodatkom ekstrakta zemljišta, dok se zastupljenost gljiva smanjivala. Izolovane vrste bakterija i gljiva se mogu koristiti u procesima bioremedijacije kontaminiranih zemljišta.

Ključne reči: mikrobni diverzitet, organska jedinjenja, naftna industrija

UVOD

Opstanak živih bića na Zemlji direktno je povezan sa kvalitetom njihovog života. Čovek je oduvek smatrao da prirodna bogatstva može neograničeno da koristi. Međutim, eksploatacija prirodnih bogatstava često je vršena neplanski i nemarno, što je dovelo do niza problema na planeti. Jedan od tih problema je i kontaminacija životne sredine, čiji su najvažniji uzročnici hemijska i petrohemijska industrija i industrijska i poljoprivredna proizvodnja i prerada.

U petrohemijskoj industriji, tokom procesa proizvodnje i prerade nafte i naftnih derivata, nastaju različiti tečni efluenti, pre svega ugljovodonici sa 1-40 ugljenikovih atoma. Ove komponente, koje obuhvataju ciklična i aromatična jedinjenja, predstavljaju potencijalno opasne i toksične materije [8]. Prebacivanje ovih materija na nove lokacije ili njihovo spaljivanje su neke od metoda sa većim brojem nedostataka, pogotovo kada je u pitanju zaštita životne sredine i zdravlje ljudi [1].

Biodegradacija uz pomoć prirodnih mikrobnih populacija predstavlja jedan od prvih koraka za transformaciju različitih organskih polutanata prisutnih u životnoj sredini [7], uključujući niz fizičkih, hemijskih i bioloških procesa [10, 6]. Fizički i hemijski procesi značajno utiču na degradaciju pojedinih komponenti, ali i biološka aktivnost je važan činilac najvećeg broja transformacija organskih jedinjenja u zemljištu.

Adresa autora: ¹Poljoprivredni fakultet Zemun, ²NIS Rafinerija nafte Pančevo, ³Centar za multidisciplinarnu studiju Univerziteta u Beogradu, ⁴Poljoprivredni fakultet, Lešak

Imajući u vidu ulogu mikroorganizama u kruženju organske materije i regulisanju ishrane, može se konstatovati da kontaminacija nema nepovoljan uticaj samo na mikroorganizme, već i na gajene biljke, prirodnu vegetaciju i čitav ekosistem [5]. Zbog toga mikrobiološka aktivnost predstavlja značajan indikator stepena zagađenosti zemljišta [2, 4]. Osim toga, i merenje enzimske aktivnosti predstavlja značajan parametar za procenu ukupne mikrobiološke aktivnosti [9], čime se dolazi do kompletnih podataka o ulozi mikroorganizama u kontaminiranim zemljištima [3].

Na osnovu navedenog, cilj ovog rada bio je ispitivanje mikrobnog diverziteta na zemljištima kontaminiranim organskim zagađivačima.

MATERIJAL I METODE

Za ova istraživanja uzeti su uzorci kontaminiranih zemljišta sa lokaliteta HIP Petrohemije Pančevo i NIS Rafinerije nafte Pančevo.

Sa lokaliteta HIP Petrohemije uzeti su uzorci zemljišta sa lokacija Flotacija, Bazen za stabilizaciju i Izlaz.

Sa lokaliteta NIS Rafinerije nafte uzeti su uzorci zemljišta sa lokacija Bistrik, Autopunilište i Čvrsti taložnik.

Standardnim hemijskim metodama određene su najvažnije hemijske osobine uzoraka (pH, sadržaj azota, fosfora, kalijuma, ugljenika, mikroelemenata i teških metala).

Ukupan broj mikroorganizama određen je na podlozi 10 puta razblažen TSA, kao i na istoj podlozi uz dodatak ekstrakta zemljišta.

Ukupan broj gljiva određen je na podlozi roze bengal streptomycin agar (RBSA), kao i na istoj podlozi uz dodatak ekstrakta zemljišta.

Identifikacija bakterija obavljena je primenom API (Biomerieux, France) i APIWEB sistema.

Izolacija i identifikacija gljiva obavljena je na podlogama sladni agar i čapek kvašćev agar (CYA) uz dodatak mikroelemenata, primenom ključa za identifikaciju gljiva [11].

REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Rezultati hemijskih analiza ukazuju na veliku heterogenost ispitivanih uzoraka. Hemijske analize zemljišta pokazuju da je reakcija sredine neutralna do blago alkalna. Relativno visok sadržaj organskog ugljenika u uzorcima zemljišta prouzrokovan je i prisustvom različitih organskih jedinjenja poreklom iz naftne industrije. Heterogenost ispitivanih uzoraka je posebno izražena kada su u pitanju sadržaji pristupačnih formi fosfora i kalijuma (tabela 1).

Tabela 1 – Hemijske karakteristike zemljišta (pH, C, N, R, K)

Lokacija	pH		Organski C (%)	Ukupni N (%)	P ₂ O ₅ (mg/100 g)	K ₂ O (mg/100 g)
	H ₂ O	n KCl				
Petrohemija - Flotacija	7,22	7,10	10,52	0,159	35	5,0
Petrohemija - Bazen za stabilizaciju	7,61	7,34	1,53	0,150	20	39
Petrohemija - Izlaz	7,36	7,30	3,06	0,223	306	23,2
Rafinerija - Bistrik	7,76	7,51	1,81	0,134	3,2	14,3
Rafinerija - Autopunilište	7,34	7,21	3,90	0,257	140	45
Rafinerija - Čvrsti taložnik	-	-	17,45	0,154	-	-

Tabela 2 – Hemijske karakteristike zemljišta (mikroelementi i teški metali)

Lokacija	Fe %	Mn ppm	Zn ppm	Cu ppm	Co ppm	Cr ppm	Pb ppm	Ni ppm	Cd ppm
Petrohemija - Flotacija	1,73	275	371	64	5	39	94	76	0,80
Petrohemija - Bazen za stabilizaciju	0,69	612	51	14	10	32	15	39	0,02
Petrohemija - Izlaz	1,40	399	234	26	7	41	44	50	0,90
Rafinerija - Bistrik	2,94	743	63	20	12	29	18	60	0,05
Rafinerija - Autopunilište	3,26	795	91	29	12	38	59	48	0,15
Rafinerija - Čvrsti taložnik	32,59	1377	223	389	35	312	301	314	0,34

Ukupni sadržaj mikroelemenata i teških metala u zemljištu nalazi se ispod maksimalno dozvoljenih vrednosti za nezagađena zemljišta (tabela br. 2), osim čvrstog taložnika (Rafinerija).

Mikrobiološke analize ispitivanih uzoraka ukazuju na različito prisustvo mikrobnih populacija, pre svega bakterija i gljiva (tabela 3). U cilju stimulanja autohtone mikroflore, hranljivim podlogama dodat je ekstrakt zemljišta koji potiče sa pomenutih lokaliteta.

Najveći broj bakterija zabeležen je u uzorku Čvrsti taložnik, dok je gljiva najviše u Autopunilištu. Dodavanje ekstrakta uglavnom je uticalo na povećanje ukupnog broja bakterija (osim u uzorku Autopunilišta), dok je zastupljenost gljiva uglavnom opadala, osim u uzorcima Bistrik i Autopunilište.

Tabela 3 – Ukupan broj bakterija i gljiva u uzorcima zemljišta

Lokacija	TSA (x10 ⁶)	TSA + ekstrakt zemljišta (x10 ⁶)	RBSA (x10 ³)	RBSA + ekstrakt zemljišta (x10 ³)
Petrohemija - Flotacija	88,15	96,07	14,07	8,15
Petrohemija - Bazen za stabilizaciju	62,60	62,80	56,84	42,81
Petrohemija - Izlaz	85,14	90,76	74,60	57,94
Rafinerija - Bistrik	54,43	71,55	61,17	68,73
Rafinerija - Autopunilište	107,10	79,42	134,06	139,86
Rafinerija - Čvrsti taložnik	230,43	353,19	62,27	52,01

Iz pomenutih uzoraka identifikovan je jedan izolat bakterija i to *Staphylococcus haemolyticus* 3ost.

Na podlogama sladni agar i čapek kvaščev agar (CYA) obavljena je identifikacija gljiva. Iz ispitivanih uzoraka zemljišta izolovani su sledeći izolati gljiva: *Moniliella sualveolens* 8 izl, *Paecilomyces variotii* 135 v i 135 bč, *Penicillium crustosum* 134 tz, *Mucor hiemalis* 139 ž, *Penicillium griseofulvum* 132 ž, *Trichoderma harzianum* 76, *Stachybotrys chartarum* 132 tz, *Aspergillus terreus* 137 i 142, *Trichoderma viride* 113 i *Aspegillus ustus* 138 z. Ove gljive predstavljaju autohtone mikrobne populacije koje se mogu koristiti u procesu bioremedijacije tj. Uklanjanja ili transformacije organskih zagađivača iz kontaminiranih zemljišta.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata, može se konstatovati sledeće:

- Rezultati hemijskih i mikrobioloških analiza pokazuju veliku heterogenost ispitivanih uzoraka zemljišta.
- Reakcija sredine uzoraka zemljišta je neutralna do blago alkalna. Visok sadržaj organskog ugljenika u zemljištu ukazuje na prisustvo organskih zagađivača poreklom iz naftne industrije.
- Dodavanje ekstrakta uticalo je na povećanje broja bakterija, odnosno smanjenje zastupljenosti gljiva.
- Izolovane i identifikovane vrste gljiva i bakterija mogu se koristiti u procesu bioremedijacije zagađenih zemljišta.

LITERATURA

- [1] Baheri, H., Meysami, (2001): Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil., *J. Hazard. Mater. B*, 89, 279–286, 2001.
- [2] Insam, H., Hutchinson, T. C., Reber, H. H., Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora, *Soil Biol. Biochem.*, 28, 691–694, 1996.
- [3] Kennedy, A.C., Smith, K.L., Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: Collins, H. P., Robertson, G. P., Klug, M. G. (Eds.), *The Significance and Regulation of Soil Diversity*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 75–86, 1995.
- [4] Kuperman, R. G., Margaret, M. C., Soils heavy metals concentrations: microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem, *Soil Biol. Biochem.* 29, 179–190, 1997.
- [5] Ladd, J. M., Foster, R. C., Nannipieri, P., Oades, J. M., Soil structure and biological activity. In: Stotzky, G., Bollag, J. M. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. 9. Marcel Dekker Inc., New York, 23–78, 1996.
- [6] Lalević, B., Raičević, V., Dabić, D., Jovanović, Lj., Nikšić, M., Antić-Mladenović, S., Kiković, D., Kuburović, N., Bioremediation of refinery sludge by microbial population, *The sixth european meeting on environmental chemistry EMEC6*, abstract book, 242, 2005.
- [7] Leahy, J. G., Colwell, R. R., Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiol. Rev.* 54 (3), 305–315, 1990.
- [8] Marin, J. A., Hernandez, T., Garcia, C., Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity, *Environmental Research*, 98, 185–195, 2005.
- [9] Nannipieri, P., Greco, S., Ceccanti, B., Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag, J. M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. 6. Marcel Dekker, New York, 1990.
- [10] Pope, D. F., Matthews, J. E., Bioremediation using the land treatment concept, USEPA/600/R-93/164. Robert S. Kerr, Environmental Research Laboratory. US Environmental Protection Agency, Ada, OK, 1993.
- [11] Samson, R. A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J. C., *Introduction to food-acid airborne fungi*, Seventh edition, 2004.

ABSTRACT

The petrochemical industry, during the petroleum-refining process, generates a different hazardous effluents. The use of the natural biological, chemical and physical processes in the petroleum-contaminated soil is necessary to transform this potentially dangerous waste product. The aim of this paper was to investigate the microbial diversity of soil polluted by organic compounds. The organic carbon content indicate the presence of organic compounds originated from oil industry. The soil samples was not polluted by heavy metals nor microelements. The number of bacteria increased in addition of soil extract, but the number of fungi decreased. Isolated strains of bacteria and fungi can be used for bioremediation process of contaminated soils.

Key words: *microbial diversity, organic compounds, oil industry*