

VERA RAIČEVIĆ¹, BLAŽO LALEVIĆ¹,
DRAGOLJUB DABIĆ², DRAGAN KIKOVIĆ³,
LJUBINKO JOVANOVIĆ⁴, MIOMIR NIKŠIĆ¹

Stručni rad
UDC:631.461.1.001.7:628.353.1=861

Mikroorganizmi u bioremedijaciji zemljišta i voda

Analiza efluenata iz hemijske i petrohemijske industrije pokazala je da ovi efluenti sadrže različite količine toksičnih materija. Zbog toga je neophodno da industrije primene jedan ili više postupaka za uklanjanje toksičnih materija. Bioremedijacija je proces u kome se koriste mikroorganizmi za uklanjanje ili degradaciju toksičnih supstanci do manje toksičnih ili netoksičnih supstanci. Cilj ovog rada bio je pregled bioremedijacionih tehnologija i najvažnijih rezultata u pogledu primene mikroorganizama u bioremedijaciji zemljišta i voda kontaminiranih naftnim ugljovodonicima, policikličnim aromatičnim ugljovodonicima, aromatičnim jedinjenjima, teškim metalima i otpadnim materijama.

Ključne reči: mikroorganizmi, bioremedijacija, zemljiše, voda

UVOD

Rapidna ekspanzija i ubrzan razvoj hemijske industrije u XX veku, posebno u poslednjih 30 godina, usloveli su i povećanje količine i kompleksnosti toksičnih otpadnih materija. U isto vreme, odgovarajuće nadležne institucije počele su da se bave problemom zagađenja životne sredine, a industrijske kompanije kontrolisanjem izlivanja i ispuštanja otpadnih toksičnih materija u životnu sredinu [29]. Slučajevi velikih ekoloških katastrofa (Bopal, Černobil, progresivno pogoršanje kvaliteta vodenih ekosistema i uništavanje četinarskih šuma u Evropi i SAD-u) i druge akcidentne situacije, izazvane, pre svega, radom industrijskih postrojenja, doveli su do niza ekoloških problema, za čije rešavanje su angažovani stručnjaci iz različitih oblasti. Njihovi pokušaji, prvenstveno usmereni ka smanjenju proizvodnje toksičnih otpadnih materija, dali su doprinos razvoju tzv. bioremedijacionih tehnologija, kao jedne od mogućnosti za detoksifikaciju industrijskih efluenata.

Bioremedijacija predstavlja proces u kojem se koristi metabolički potencijal mikroorganizama (bakterije, gljive i dr.) u cilju prečišćavanja kontaminiranih područja [25]. Pri ovom procesu, mikroorganizmi posredstvom svojih enzima razgrađuju (metabolišu) organske kontaminante iz zemljišta ili voda i transformišu ih u krajnje netoksične proizvode, pre svega do ugljen dioksida i vode.

Tehnologije bioremedijacije, stvaranjem optimalnih uslova za rast mikroorganizama i uvećavanje njihove brojnosti, potpomažu detoksifikaciju određenih količina kontaminanata. Za uspešnije obavljanje procesa bioremedijacije, potrebno je poznavati karakteristike kontaminanta, lokaliteta i mikroorganizama [23]. Od ovih parametara zavisi i dužina trajanja bioremedijacije, koja često može da dostigne i više godina. Pojedini lako biodegradibilni kontaminanti mogu se razgraditi i za manje od godinu dana, dok se kontaminati velikih molekularskih težina razgrađuju znatno duže.

Najvažnije karakteristike kontaminanta koje je potrebno determinisati su mogućnost biodegradacije, rastvorljivost u vodi, koeficijent sorpcije zemljišta i hemijska reaktivnost.

Karakterizacija i opisivanje lokaliteta podrazumevaju determinisanje dubine i areala rasprostranjenja kontaminanta, koncentraciju kontaminanta u lokalitetu, tip zemljišta ili klasa voda sa svojim osobinama (pH, sadržaj organske materije, sadržaj makro- i mikroelemenata itd.), prisustvo ili odsustvo supstanci koje su toksične za mikroorganizme, prisustvo drugih akceptora elektrona itd.

Kada su mikroorganizmi u pitanju, potrebno je, pre svega, da oni budu aktivni, tj. da imaju sposobnost biodegradacije određenog kontaminanta i da njihova populacija u lokalitetu bude dovoljno velika, kako bi se što efikasnije kontaminant razgradio.

Različite vrste mikroorganizama razgrađuju različite kontaminante (tabela 1) i preživljavaju pri različitim uslovima.

Adresa autora: ¹Poljoprivredni fakultet Zemun, ²Rafinerija nafte Pančevo, ³Poljoprivredni fakultet Lešak, ⁴Centar za multidisciplinarnu studiju Beograd

Tabela 1.- Klase organskih jedinjenja koja podležu bioremedijaciji

Klasa	Primer	Prioritetni procesi biodegradacije	
		aerobni	anaerobni
Monohlorna aromatična jedinjenja	hlorobenzen	+	
«BTEX» (benzen, toluen, ksilen)		+	+
Nehalogenovani fenoli i krezoli	2-metil fenol	+	+
Policiklični aromatični ugljovodoni	kreozot	+	
Alkani i alkeni	benzin	+	
Polihlorni bifenioli (PCB)	trihlorobifenil	+	+
Hlorofenoli	pentahlorofenol	+	+
Azotna heterociklična jedinjenja	piridin	+	+
Hlorisani rastvarači			
Alkani	hloroform	+	+
Alkeni	trihloroetilen	+	+

(Izvor: [13])

U procesu bioremedijacije mogu učestvovati *autohtoni* mikroorganizmi, koji su izolovani sa dotičnih kontaminiranih lokaliteta. Stimulisanje rasta autohtonih mikroorganizama postiže se obezbeđivanjem odgovarajuće temperature, kiseonika i hranljivih materija. Ukoliko biološka aktivnost, potrebna za degradaciju pojedinih polutanata i kontaminanata, nije ustanovljena, kontaminiranim lokalitetima se dodaju kulture *egzogenih* mikroorganizama (prethodno uspešno testiranih na prisustvo različitih kontaminanata) izolovane sa drugih lokaliteta.

Bioremedijacija je proces koji se može obavljati u aerobnim i anaerobnim uslovima. U aerobnim uslovima mikroorganizmi koriste kiseonik i transformišu mnoge kontaminante do ugljen dioksida (CO₂) i vode (H₂O), stvarajući pri tome sopstvenu ćelijsku biomasu. U anaerobnim uslovima se, u zavisnosti od vrste mikroorganizama i uslova, stvaraju različiti proizvodi razgradnje kontaminanata. U opštem slučaju kontaminanti se transformišu do metana, malih količina ugljen dioksida i gasovitog vodonika. Pri sulfatiredukujućim uslovima nastaje elementarni sumpor, dok nitratiredukujući uslovi favorizuju nastanak gasovitih oblika azota.

U nekim slučajevima, neki kontaminanti se mogu razgraditi do intermedijera ili krajnjih proizvoda, koji su manje, podjednako ili više toksični od

početnog kontaminanta. Primer za to je trihloroetilen (TCE), koji se, u anaerobnim uslovima pomoću mikroorganizama, razgrađuje do veoma otpornog i toksičnijeg vinil hlorida. Vinil hlorid se, međutim, vrlo lako može razgraditi u aerobnim uslovima.

Bioremedijacija se može obavljati na dva načina: *in situ* i *ex situ*. *In situ* bioremedijacija zasniva se na tretiranju kontaminiranog zemljišta ili voda na istoj lokaciji gde je utvrđeno prisustvo kontaminanata. *Ex situ* bioremedijacija zahteva iskopavanje kontaminiranog zemljišta ili ispušavanje kontaminiranih voda pre bioremedijacionog tretmana.

Osnovni cilj aerobne *in situ* bioremedijacije je obezbeđivanje kiseonika i hranljivih elemenata neophodnih za razvoj mikroorganizama u cilju što efikasnije degradacije kontaminanata. Ovoj grupi metoda, između ostalog, pripadaju i bioventilacija i ubacivanje vodonik-peroksida. Kod sistema bioventilacije vazduh iz atmosfere se ubrizgava u kontaminirano zemljište ili vodu a kiseonik, koji na ovaj način dospeva u sistem, koriste mikroorganizmi za sopstvene biosinteze, kao i degradaciju kontaminanta. Ubacivanjem vodonik-peroksida i njegovim kruženjem kroz kontaminirano zemljište, obezbeđuje se kiseonik koji stimulatивно deluje na mikroorganizme, koji, svojom aktivnošću, doprinose degradaciji kontaminanta.

Ex situ tehnike bioremedijacije su brže, lakše se kontrolišu i omogućavaju razgradnju šireg spektra kontaminanata nego pri bioremedijaciji *in situ*. Ove tehnike podrazumevaju iskopavanje i tretman kontaminiranog zemljišta pre, a ponekad i nakon obavljanja bioremedijacije. Najčešći način bioremedijacije *ex situ* jeste mešanje kontaminiranog zemljišta sa odgovarajućim količinama vode u posebnoj «bioreaktoru» uz dodatak mikroorganizama.

Bioremedijacione tehnike se uspešno mogu koristiti za remedijaciju zemljišta, mulja i podzemnih voda kontaminiranih ugljovodonicima poreklom iz naftne industrije, organskim rastvaračima, pesticidima i drugim organskim materijama.

Informacije iz oblasti molekularne ekologije mogu biti korisne za razvoj metoda bioremedijacije i procenu njenog uticaja na životnu sredinu. Ove informacije imaju posebnu primenu u procesu bioaugmentacije, odnosno unošenja egzogenih mikroorganizama u kontaminirano zemljište ili podzemne vode.

Biodegradacija metana. Korišćenjem molekularne filogenetske analize markirane DNK, uspešno su izolovani i identifikovani metanotrofni mikroorganizmi, koji aktivno razgrađuju metan [8, 18]. Ovi mikroorganizmi su veoma važni sa aspekta

redukcije emisije metana iz zemljišta ili sedimena, kao i degradacije trihloretilena.

Biodegradacija marinskih naftnih ugljovodnika. Ispitivanja peščanih obala kontaminiranih naftnim ugljovodnicima omogućila su izolaciju i identifikaciju bakterija iz podklase *Proteobacteria* [15]. Sličan eksperiment obavljen je i na obalama norveškog Arktika i doprineo je svrstavanju izolovanih mikroorganizama u grupe *Pseudomonas* i *Cycloclasticus* [7]. Osim toga, iz morske vode kontaminirane naftom izolovane su mikrobne populacije koje pripadaju podklasi *Proteobacteria* i rodu *Alcanivorax* [3]. Rast ovih bakterija na pomenutom lokalitetu bio je veoma izražen, što ukazuje da su naftni ugljovodnici u marinskim ekosistemima podložni biodegradaciji.

Biodegradacija policikličnih aromatičnih ugljovodnika. U anaerobnim uslovima, ova klasa organskih jedinjenja je vrlo otporna na degradaciju. Međutim, iz izdani kontaminiranih ovim ugljovodnicima i hlorisanim rastvaračima, izolovani su filotipovi genetski najbliži rodovima *Syntrophus* i *Methanosaeta* [4]. Slične populacije izolovane su i iz izdani koje, osim ovih ugljovodnika, sadrže i alkane [17, 28]. U aerobnim uslovima, proces biodegradacije ovih ugljovodnika obavljaju bakterije iz rodova *Burkholderia*, *Sphingomonas* i *Mycobacterium* [6, 10].

Biodegradacija aromatičnih jedinjenja. Do preciznijih podataka o biodegradaciji ove klase organskih jedinjenja došlo se u poslednjih 10 godina. Posebna pažnja posvećena je BTEX-jedinjenjima (benzen, toluen, etilbenzen i ksilen) i metil tercijernom butil etru (MTBE). Istraživanja su pokazala da mikroorganizmi mogu da koriste jedinjenja tipa BTEX za svoje biosinteze i da na taj način vrše njihovu degradaciju. Primarna uloga u ovom procesu pripada bakterijama iz roda *Pseudomonas* [9, 11] i gljivama iz roda *Cladophialophora* [16]. Sa druge strane, posle niza neuspešnih pokušaja, konstatovano je da mikroorganizmi mogu da razgrade MTBE [19]. Dalja istraživanja su pokazala da postoji jedan relativno širok spektar mikroorganizama koji obavlja biodegradaciju MTBE-a u aerobnim [12, 22] i anaerobnim uslovima [14, 21].

Biodegradacija teških metala. Poslednjih godina, kontaminacija životne sredine teškim metalima predstavlja ozbiljan problem. Praćenjem preživljavanja bakterijskih populacija u sredinama kontaminiranih teškim metalima, došlo se do rezultata koji ukazuju da ove populacije mogu da koriste metale kao akceptore elektrona [2, 20]. Jedan od primera je rastvorljivi šesterovalentni uran (U^{6+}), koga neki mikroorganizmi mogu da transformišu u nerastvorljivi četvorovalentni oblik (U^{4+}). U ovakvim okol-

nostima, mikroorganizmi izazivaju taloženje urana, smanjujući na taj način njegovu koncentraciju i mobilnost u podzemnim vodama. Neke bakterijske populacije mogu toksičan oblik hroma, Cr(VI) redukovati u netoksičan Cr(III) oblik [5]. U formiranju mikrobni populacija koje vrše detoksifikaciju zemljišta i voda kontaminiranih teškim metalima, pomažu i metode genetičkog inženjeringa. Genetski modifikovana *Ralstonia eutropha* smanjuje toksični efekat Cd^{2+} na rast biljaka duvana [24].

Biodegradacija otpadnih materija. Mikrobnim konzorcijumi uključeni u tretman otpadnih voda, predstavljaju jedno od glavnih polja aktivnosti mikrobne ekologije. Najviše pažnje u ovoj oblasti posvećeno je analizi strukture bakterijskih populacija koje se koriste u bioremedijaciji fenolnih materija [26, 27] i rizoremedijaciji otpadnih voda primenom amonijum oksidirajućih bakterija [1].

ZAKLJUČAK

Bioremedijacija se, i pored svojih prednosti, još uvek smatra tehnologijom u razvoju. Osnovni razlozi za ovu tvrdnju leže u problemima pri izvođenju bioremedijacije, koji se, pre svega, ogledaju u velikoj prirodnoj otvorenosti ekosistema na koji deluju različiti faktori (tip i količina kontaminanta, klimatski faktori, hidrogeodinamika itd.). Ovi problemi su i razlog «zaostalosti» bioremedijacije u odnosu na ostale naučno potkovane tehnologije. Zbog toga je neophodno sticanje znanja i iskustava u pogledu formiranja najefikasnijih mikrobni populacija sposobnih za bioremedijaciju, kao i izučavanja odnosa mikrobni populacija sa činiocima spoljne sredine. U skladu sa tim, broj informacija o mikrobni populacijama sposobnim za bioremedijaciju konstantno raste. Mada znanja o bioremedijaciji nisu kompletirana, iz do sada poznatih rezultata mogu se izvući opšti zaključci. U svakom slučaju, izučavanje osobina mikrobni populacija je od suštinskog značaja sa aspekta poboljšanja bioremedijacionih tehnologija.

LITERATURA

- [1] Abd El Haleem, D., von Wintzingerode, F., Moter, A., Moawad, H., Gobel, U.B., Lett. Appl. Microbiol., 31: 34-38, 2000.
- [2] Brim, H., Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Mergeay, M., Smalla, K., Can. J. Microbiol., 45: 326-338, 1999.
- [3] Chang, Y. J., Stephen, J.R., Richter, A. P., Venosa, A. D., Bruggemann, J., MacNaughton, S. J., Kowalchuk, G.A., Haines, J. R., Kline, E., White, D. C., J. Microbiol. Methods, 40: 19-31, 2000.

- [4] Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., Pace, N.R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3869-3877, 1998.
- [5] Golić, Zorica, Raičević, Vera, Antić-Mladenović, S., Kiković, D., Jovanović, Lj., In: *Proceedings of the IInd International Symposium of Ecologists of the Republic of Montenegro, Kotor* (Eds. Pesic V., Hadziablahovic S, 315-320, 2006.
- [6] Grosser, R. J., Friedrich, M., Ward, D. M., Inskeep, W.P., (2000): *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2695-2702, 2000.
- [7] Grossman, M. J., Prince, R.C., Garrett, R.M., Garrett, K. K., Bare, R.E., O'Neil, K.R., Sowlay, M.R., Hinton, S.M., Lee, K., Sergy, G.A. et al., *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Edited by Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 775-787, 2000.
- [8] Henckel, T., Friedrich, M., Conrad, R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1980-1990, 1999.
- [9] Hojaj, S., Byungho H., Sang-Seob L., Sung-Ho K. (2005): *Biodegradation*, 16: 319-327, 2005.
- [10] Kanaly, R. A., Bartha, R., Watanabe, K., Harayama, S., (2000): *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4205-4211, 2000.
- [11] Lalević, B., Jovanović, Lj., Kuburović, N., Nikšić, M., Kiković, D., Marinković, N., Kljujev, I., *Zbornik apstrakata 11. kongresa Društva za proučavanje zemljišta Srbije i Crne Gore, Budva*, 129, 2005.
- [12] Lalević, B., Jovanović, Lj., Nikšić, M., Kiković, D., Raičević, V., *Zbornik radova konferencije "Saradnja istraživača različitih struka na području korozije i zaštite materijala"*, Tara, 2005.
- [13] Lalli, C., Russell, M., www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/gwprimer/bioreact/bior.html, 1996.
- [14] Landmeyer, J.E., Chapelle, F.H., Bradley, P. M., Pankow, J. F., Church, C. D., Tratnyek, P. G., *Ground Water Monitoring & Remediation*, Fall, 93-102, 1998.
- [15] MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A. D., Davis, G.A., Chang, Y.J., White, D.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3566-3574, 1999.
- [16] Prenafeta-Bold'u, F. X., Ballerstedt, H., Gerritse, J., Grotenhuis, J. T. C., *Biodegradation*, 15: 59-65, 2004.
- [17] Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R., Widdel, F., *Environ. Microbiol.*, 1: 145-157, 1999.
- [18] Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., Murrell, J.C., *Nature*, 403: 646-649, 2000.
- [19] Salanitro, J.P., Diaz, L.A., Williams, M.P., Wisniewski, H.L., *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (7): 2593-2596, 1994.
- [20] Sandaa, R.A., Enger, O., Torsvik, V., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3293-3297, 1999.
- [21] Somsamak, P., Cowan, R.M., Häggblom, M. M., *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 259-264, 2001.
- [22] Steffan, R. J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C. W., Zhang, D., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (11): 4216-22, 1997.
- [23] USEPA, US Solid waste and EPA 542-F-96-007: 1-4, 1996.
- [24] Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V., Fernandez, L.A., *Nat. Biotechnol.*, 18: 661-665, 2000.
- [25] Watanabe, K., *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 237-241, 2001.
- [26] Watanabe, K., Teramoto, M., Harayama, S., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2813-2819, 1999.
- [27] Whiteley, A. S., Bailey, M.J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2400-2407, 2000.
- [28] Zengler, K., Richnow, H.H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W., Widdel, F., *Nature*, 401: 266-269, 1999.
- [29] http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/courses/BIO_343/lecture/bioremed.html

ABSTRACT

MICROORGANISMS IN SOIL AND WATER BIOREMEDIATION

Analyse of effluents from the chemical and petrochemical industries shows that effluent contain various amount of toxic components. This means that the obligation of industries is application of one or a few treatments for removal of toxic compounds. Bioremediation is a treatment process that uses microorganisms in order to removing or degrading hazardous substances into less toxic or nontoxic substances. The aim of this paper is review of bioremediation technologies and most important results about of microorganisms application in order to soil and water bioremediation contaminated by oil hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic compounds, heavy metals and waste materials.

Key words: *microorganisms, bioremediation, soil, water*