



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



Мирна Штрбац

**МИКРОБИОЛОШКА РЕМЕДИЈАЦИЈА
ЗЕМЉИШТА КОНТАМИНИРАНОГ НАФТОМ**

Мастер рад

Нови Сад, 2016.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



Кандидат:
Мирна Штрбац, дипл. инг.

Ментор:
доц. др Симонида Ђурић

**МИКРОБИОЛОШКА РЕМЕДИЈАЦИЈА
ЗЕМЉИШТА КОНТАМИНИРАНОГ НАФТОМ**

Мастер рад

Нови Сад, јануар, 2016.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. ЗАГАЂЕЊЕ ЗЕМЉИШТА НАФТОМ И ДЕРИВАТИМА НАФТЕ	3
2.2. МИКРООРГАНИЗМИ У ЗЕМЉИШТУ	8
2.3. ТРАНСФОРМАЦИЈЕ НАФТНОГ ЗАГАЂИВАЧА У ЗЕМЉИШТУ	10
2.4. УТИЦАЈ НАФТЕ НА ЗЕМЉИШНУ МИКРОФЛОРУ	12
2.5. ЗНАЧАЈ МИКРООРГАНИЗАМА У РЕМЕДИЈАЦИЈИ ЗЕМЉИШТА	13
2.5.1. Фактори који утичу на ефикасност биоремедијације	15
2.5.2. Механизми и производи разградње угљоводоника	28
2.5.3. Предности и ограничења биоремедијације	36
3. РАДНА ХИПОТЕЗА	38
4. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	39
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА	40
5.1. ПОСТАВЉАЊЕ ОГЛЕДА	40
5.2. ИЗОЛАЦИЈА И ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ	41
5.2.1. Метода агарних плоча	41
5.2.2. Одређивање бројности испитиваних група микроорганизама	42
5.3. ОДРЕЂИВАЊЕ ДЕХИДРОГЕНАЗНЕ АКТИВНОСТИ ЗЕМЉИШТА	45
5.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	46
6. РЕЗУЛТАТИ РАДА И ДИСКУСИЈА	47
6.1. УТИЦАЈ НАФТНОГ ДЕРИВАТА НА БРОЈНОСТ ИСПИТИВАНИХ ГРУПА МИКРООРГАНИЗАМА	47
6.2. УТИЦАЈ НАФТНОГ ДЕРИВАТА НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА ДЕХИДРОГЕНАЗЕ	68

7. ЗАКЉУЧАК	71
8. ЛИТЕРАТУРА	73
9. ПРИЛОГ	81



РЕЗИМЕ

Земљиште је све чешће изложено утицају нафте и њених производа који на различите начине доспевају у животну средину као последица антропогених активности. Микроорганизми који су способни да разлажу природно присутне угљоводонике у земљишту, могу да разлажу и угљоводонике који потичу од нафтног загађивача.

Биоремедијација је заснована на природном поступку-биодеградацији и представља оптимизовану биодеградацију која је базирана на два биолошка процеса: расту и кометаболизму. Главни фактори за успешну биоремедијацију су: присуство метаболички способне микробиолошке популације, повољни услови за раст микроорганизама и одговарајућа количина хранљивих материја и контаминаната.

Циљ истраживања је да се изврши процена биоремедијационе способности аутохтоних група микроорганизама из земљишта које је контаминирано нафтом и да се испита њихова ефективност у сврху биоремедијације земљишта.

Експеримент је изведен у виду земљане културе различитих клонова топола у стаклари Природно-математичког факултета, Департмана за биологију и екологију, Универзитета у Новом Саду. Резнице клонова топола: клон 1: *Populus x euramericana* cl. 129/81, клон 2: *Populus x euramericana* cl. "Pannonia" и клон 3: *Populus deltoides* cl. В-81, су посађене у земљиште са различитим нивоима загађења: 0, 5 и 20 г дизела/кг земљишта. Узорци земљишта су узети у временском периоду на 15, 30, 60 и 90 дана са почетним узорцима који су узети 3. 06. 2014. Микробиолошке анализе су рађене у лабораторији за микробиологију, Департмана за ратарство и повртарство, Пољопривредног факултета у Новом Саду.

Испитиване су следеће групе микроорганизама: укупан број бактерија, бројност амонификатора, бројност бактерија из родова: *Pseudomonas* sp. и *Bacillus* sp., бројност актиномицета, гљива и *Azotobacter* sp. Испитивана је и активност ензима дехидрогеназе у земљишту.

Код укупног броја бактерија, аминокхетеротрофа и актиномицета, након 30 дана огледа су утврђене значајне разлике у бројности и то: код укупног броја бактерија значајно смањење бројности у контроли у односу на варијанте у којима је примењена нафта, и код аминокхетеротрофа и актиномицета, је утврђено значајно повећање бројности у варијанти у којој је примењено 20 г дизел горива, што значи да биодеграбилна једињења нафте након почетне резистентности, услед аклиматизације микробиолошке популације, бивају деградована.

Код гљива и *Azotobacter sp.* нису утврђене статистички значајне разлике у бројности између варијаната.

Присуство биљака је имало позитиван утицај на активност ензима дехидрогеназе у варијантама са нафтом, посебно у варијанти D 20.

Кључне речи: нафта, биодеградација, биоремедијација

ABSTRACT

Soil is increasingly exposed to the impact of oil and its products which in various ways reach to the environment as a result of anthropogenic activities. Microorganisms that are able to decompose naturally present hydrocarbons in the soil can also decompose hydrocarbons which are coming from oil pollutants.

Bioremediation is based on the natural procedure-biodegradation and it represents optimized biodegradation which is based on two biological processes: growth and cometabolism. Main factors for successful bioremediation are: presence of metabolically capable microbiological population, convenient conditions for growth of microorganisms and appropriate amount of nutrients and contaminants.

The main aim of the research is evaluation of the bioremediation ability of indigenous microorganism groups in the soil that is contaminated with oil and examination of their effectiveness for the purpose of the bioremediation of the soil.

Experiment was performed in the form of earthy culture of different poplar clones in greenhouse on Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, University of Novi Sad. Cuttings of poplar clones: clone 1: *Populus x euramericana* cl. 129/81, clone 2: *Populus x euramericana* cl. "Pannonia" and clone 3: *Populus deltoides* cl. B-81, were planted in a plot with different levels of pollution: 0, 5 and 20 g of diesel / kg soil. Samples of the soil were taken on 3. 06. 2014. and after that in period of 15, 30, 60 and 90 days. Microbiological analysis were made in laboratory for microbiology on Department of Crop Science, Faculty of Agriculture in Novi Sad.

Analyzed groups of microorganisms are: total number of bacteria, number of ammonifiers, number of bacteria of the genus *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.*, number of actinomycetas, fungi and *Azotobacter sp.* Also, activity of dehydrogenate enzymes in the soil was tested.

In total amount of bacteria, aminoheterotrophs and actinomycetas significant changes were found after 30 days in their number: with total amount of bacteria was found significant

reduction of the number in control comparing to the variants in which was used oil, and with aminoheterotrophs and actinomycetas it was determined increase in the number in variant in which was used 20 g of diesel fuel, which means that biodegradable compounds of oil after initial resistance, due to the acclimation of microbiological population, were degraded.

With fungi and *Azotobacter sp.* wasn't found statistically significant differences in the number of variants.

The presence of plants had a positive effect on the activity of dehydrogenase enzymes in variants with diesel oil, in particular, in the variant D 20.

Key words: oil, biodegradation, bioremediation

1. УВОД

Земљиште као природна површинска творевина представља основно средство пољопривредне производње и један је од најважнијих природних ресурса. Квалитет пољопривредних производа великим делом зависи од земљишта па очување хемијских, физичких и микробиолошких својстава земљишта, има еколошки и економски значај.

Земљиште је еколошки систем, састављен из три фазе: чврсте, течне и гасовите које су међусобно повезане и представља станиште за разноврсне и бројне микроорганизме који имају централну улогу у метаболичкој активности земљишта. Микроорганизми су веома хетерогена и најбројнија група организама и њихова бројност, активност и биодиверзитет су поуздани индикатори квалитета и здравља пољопривредног и непољопривредног земљишта (Милошевић, 2008; Милошевић и сар., 2008).

Природно је да се у земљишту дешавају промене, јер је земљиште сложен и динамичан систем, производ педогенетских фактора, али на те промене у данашње време у великој мери утиче човек са својом активношћу. Земљиште непрестано подлеже променама које постепено доводе до нових квалитета земљишта, а земљиште се споро образује и неправилним коришћењем брзо се деградира.

Квалитетно и здраво земљиште је резултат равнотеже процеса одрживости и деградације (Милошевић и сар., 2007). Деградација земљишта се може дефинисати као скуп процеса узрокованих активношћу човека, који смањују садашњи, а и будући потенцијал земљишта (Нешић, 2010) и може бити деградација одношењем и деградација *in situ* (Секулић и сар., 2003). Деградација *in situ* може бити хемијска као што је загађење

земљишта органским полутантима, физичка и биолошка која подразумева поремећај у биолошкој активности земљишта.

Земљиште је све више изложено утицају различитих токсичних материја које могу негативно утицати на микроорганизме, животиње и биљке који чине биолошку компоненту земљишта (Јарак и Чоло, 2007). До поремећаја биолошке активности у површинским слојевима земљишта долази при доспевању различитих хемијских материја, а најчешће хемикалије су угљоводоници нафте, у количинама које су веће од њихове уобичајене количине, неопходне за кружење материје у датом екосистему.

Са појавом нафте као енергента дошло је до интензивног привредног раста и данашња цивилизација почива на примени нафте. Нафта и њени деривати користе се као горива и употребљавају се као сировина у хемијској индустрији. Бушотине и складишта нафте су један од главних типова локализованих извора загађења и чине 26,4% у укупном броју идентификованих локалитета, а у оквиру индустрије, нафтна индустрија има највећи удео са 59,2% у локализованом загађењу земљишта (<http://www.sepa.gov.rs>).

Нафтни загађивач који је доспео у земљиште пре свега инхибира раст биљака и смањује плодност пољопривредног земљишта, а миграцијом кроз земљиште може доспети и до подземних вода. Дизел гориво, које је један од главних продуката прераде нафте и извора загађења у животној средини, има негативне ефекте на биохемијске, физичке и хемијске карактеристике земљишта.

Земљиште је универзални природни пречистач, колоидни филтар (Миљковић, 1996), а микроорганизми имају и посебан еколошки значај, у поправци деградираних земљишта (Јарак и сар., 2005). Коришћење биолошких организама (микроорганизама) у циљу решавања еколошких проблема, као што је органско загађење земљишта, представља процес биоремедијације. За микроорганизме загађујуће супстанце представљају супстрат за раст, па тако и угљоводоници нафте се разграђују до нетоксичних супстанци и на крају минерализују до угљен-диоксида и воде (Alexander, 1999; Das and Chandran, 2011).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. ЗАГАЂЕЊЕ ЗЕМЉИШТА НАФТОМ И ДЕРИВАТИМА НАФТЕ

Квалитет земљишта се односи на његова хемијска, физичка и биолошка својства, а биотичка својства рефлектују његово здравље (Doran and Safley, 1997). Термином здраво земљиште детерминише се еколошки приступ проучавању животне средине, производња високих и квалитетних приноса пољопривредних биљних врста уз чување биолошке равнотеже у природи (Кастори и сар., 2006). Смањење биолошке активности узрокује промене хемијских и физичких својстава земљишта што постепено доводи до смањења његове плодности и способности за нормално одвијање процеса разлагања, а тиме и кружења материје у природи (Јарак и Чоло, 2007).

Нафта и њени деривати су један од највећих загађивача земљишта и животне средине уопште. Од укупне количине произведене нафте годишње, процењено је да око 0,1% доспева у животну средину као резултат антропогених активности (Ward et al., 2003). Процењено је да око 5 милиона тона сирове нафте и њених деривата доспе у животну средину сваке године (Hinchee and Kitte, 1995).

Нафта, као природни производ, на месту настанка, није загађивач. Нафта (сирови петролеум, земно уље, камено уље) је уљаста течност која се налази у седиментним слојевима Земљине коре. О пореклу нафте постоји више теорија, које могу да се сврстају у две групе: теорија о абиогеном и биогеном пореклу нафте. Данас преовладава мишљење да је нафта органског порекла, настала од остатака биљног и животињског материјала. У раној фази трансформације органске супстанце најинтензивнија је микробиолошка

активност. Угљени хидрати, протеини и лигнин се на малим дубинама и под благим условима за које нису карактеристичне повишене температуре и притисци, разлажу углавном дејством микроорганизама, а знатно мањи део органске супстанце се уграђује у седименте. Претпоставља се да се од укупне органске супстанце биосфере, пошто она доспе у површинске делове геосфере, само 0,01 - 0,1% задржи у седиментним стенама (Новаковић, 2013).

Састав нафте зависи од места налажења. Нафта је врло сложена смеша великог броја хемијских једињења. Највећи део нафте чине угљоводоници (95-98%), а остатак су поларна једињења сумпора (алкил-сулфиди, меркаптани, циклични сулфиди), азота (супституисани пиридини, карбозоли, индоли, пироли и амиди), кисеоника (нафтенске киселине, алифатичне киселине, феноли и др.) и металоорганска једињења (у чији састав најчешће улазе гвожђе, бакар, ванадијум и никл) (Виторовић, 1987). У елементарном саставу по проценту масе нафте доминира угљеник (83-87%), затим водоник (10-14%), кисеоник (0,1-1,5%), сумпор (0,5-6%), азот (0,1-2%) и метали (<1000 mg/l) (Малетић, 2010). У просеку нафта се састоји од 85% угљеника, 13% водоника и 2% азота, сумпора и кисеоника (Hunt, 1995).

Основну масу нафте чине три групе угљоводоника: парафински (алкански) угљоводоници (15-60%), нафтенски (циклопарафински) угљоводоници (30-60%) и ароматични угљоводоници (3-30%) (<http://www.petroleum.co.uk/composition>). Асфалтних компонената има око 6%. Олефинских угљоводоника практично нема у сировој нафти, али су присутни у продуктима њене прераде (Малетић, 2010).

Карактеристике нафте условљене су геолошким условима њеног формирања. У зависности од извора, конзистенција сирове нафте може варирати од лаке, испарљиве течности до вискозне, получврсте супстанце. Густина нафте је, без обзира на порекло нафте, увек мања од густине воде и креће се између 670-980 kg/m³. У зависности од садржаја парафина, вискозност нафте се креће у широком дијапазону од 10 до 800 × 10⁻⁶ m²/s. Ова особина је веома значајна са аспекта изливања нафте и транспорта у земљишту, јер условљава њену брзину и начин кретања кроз порозну средину (Веселиновић и сар., 1995; Малетић, 2010).

До загађења земљишта нафтом и дериватима долази услед експлоатације, прераде, транспорта, складиштења, коришћења нафте, а не малим делом и при акцидентним изливањима (Бешкоски и сар., 2012).

Загађивање земљишта нафтом и дериватима је најчешће последица ерупција на бушотинама, просипања угљоводоника по површини земље, пуцања или пропуштања нафтовода, пропуштања резервоара и друге опреме, у рафинеријама, складиштима деривата и на бензинским пумпама, радионицама аутомобила и трактора итд. (Michalcewicz, 1995; Малетић, 2010). Приликом производње сирове нафте, осим, акцидентних ситуација изливања нафте приликом црпљења и транспорта, велики проблем је и депоновање исплачног муља-исплаке из нафтних бушотина (Кастори и сар., 2006). Сирова нафта се прерађује применом различитих технолошких поступака, при чему се добија велики број производа и полупроизвода.

Производи који се добијају дестилацијом сирове нафте могу се грубо разврстати у три групе: горива, мазива и остало (Бешкоски и сар., 2012). Највећи део нафте, око 84%, користи се за производњу горива која се користе као извори енергије (<http://www.eia.gov/>). Дизел-гориво је један од главних продуката прераде нафте и извора загађења у животној средини (Lawson et al., 2012) и употреба тешке механизације у пољопривреди доводи до веће потрошње дизел горива (Wyszkowski et al., 2004).

Нафта и деривати нафте се различито понашају када доспеју на површину земљишта. Сирова нафта има већу густину и вискозитет и спорије се креће кроз земљиште у односу на деривате који брже продиру у дубље слојеве земљишта и тако представљају већу опасност за загађење дубљих слојева земље и подземне воде. Поред карактеристика нафте и деривата, на њихово кретање кроз земљиште утичу и карактеристике земљишта, клима, вегетација и присутна микрофлора (Марковић и сар., 1996).

Угљоводоници нафте и њених деривата модификују физичка и хемијска својства земљишта и ова једињења су у великој мери одговорна за измењену плодност земљишта (Tyczkowski, 1993; Iwanow et al., 1994). Изливањем нафте на површину земљишта долази до нарушавања његове структуре, затварања пора и слепљивања честица земљишта. Тиме се мења режим кретања и количине кисеоника што изазива изумирање аеробних

организама који својим утицајем разарају педолошки слој (Марковић и сар., 1996; Рончевић, 2007). Земљиште загађено нафтом губи своју биолошку активност и можда неће бити у могућности да се опорави више од десет година (Sparrow and Sparrow, 1988; Racine, 1993; Wyszowska et al., 2001).

Нафта која се излила на површину земљишта мигрира на следећи начин: прво се нафта креће наниже кроз незасићено земљиште под утицајем гравитације. У овој фази нафта се креће и бочно под дејством капиларних сила. Након достизања нивоа подземне воде нафта се креће у три фазе: као гасна фаза изнад загађене воде, као чиста фаза и као фаза растворених угљоводоника. Хоризонтално и вертикално кретање у делу земљишта изнад подземне воде зависи од порозности тла и природе угљоводоника од којих је састављена нафта (Димкић и сар., 1999).

Токсични ефекти нафтног загађивача зависе, пре свега, од његовог хемијског састава али значајан утицај имају и особине средине у којој је дошло до изливања (Новаковић, 2013). У великим концентрацијама, угљоводоници који чине сирову нафту и њене деривате су отровни за многе живе организме, укључујући и људе. Нафтни угљоводоници се ланцем исхране преносе на све организме независно од начина њиховог доспевања у животну средину. Посебно значајни у погледу токсичности су хлоровани, ароматични и полициклични ароматични угљоводоници (Cerniglia, 1992; Harvey, 1997). Лакше сирове нафте или продукти рафинације добијени из ње су токсичнији од тежих сирових нафти одговарајућих деривата, јер теже нафте имају већу просечну молску масу. Код угљоводоника сличне молске масе, токсичност се разликује за различите групе угљоводоника. Токсичност расте у низу: алкани, алкени, циклоалкани, аромати и полициклични ароматични угљоводоници (Расулић, 2007).

Изведена су бројна испитивања утицаја сирове нафте на екосистеме као целине, на живот и раст биљака и на човека. Резултати ових испитивања нису једнозначно показали да дуготрајно излагање дејству угљоводоника утиче на продуктивност екосистема. Само неки од резултата указују да испуштени угљоводоници утичу на екосистеме. Сви испитани случајеви показују да се по уклањању угљоводоника екосистем регенерише, иако процес уклањања може да траје и неколико година, али регистрована је акумулација угљоводоника у неким животињским врстама.

Угљоводоници испуштени на земљиште, продиру у ризосферу где се налази коренов систем биљака, и делују на њих (Расулић, 2007). Поред тога што се погоршавају биохемијске и физичко-хемијске особине земљишта, угљоводоници такође ограничавају раст и развој биљака, чије нутритивне и технолошке вредности могу бити ниске и често под знаком питања (Wyszkowski et al., 2004). Већ неколико процената ових једињења у земљишту спречава раст биљака. Ослобођени угљоводоници при ерупцијама на бушотинама, честа просипања на великим складиштима нафте и деривата, или у рафинеријама, проузрокује дугорочније успоравање раста четинарских шума у кругу од 2 км око извора загађивања (Расулић, 2007).

У истраживању са биљком жуте лупине, повећавајући садржај загађења земљишта са дизел горивом, повећале су се концентрације фосфора, натријума, магнезијума и калцијума у надземним деловима и корену жуте лупине. Већа контаминација је такође била одговорна за смањен принос надземних делова и корена жуте лупине као и за акумулацију азота у надземним деловима и калијума у корену усева. Принос жуте лупине је био у корелацији са степеном контаминације земљишта дизел горивом, типом земљишта, азотном исхраном и органом биљке. Дизел гориво је имало јачи утицај на надземне делове биљке у односу на корен (Wyszkowski et al., 2004).

На бројне физиолошке процесе у биљкама као што су: транспирација, дисање, фотосинтеза и транслокација, утиче негативно контаминација нафтом (Baker, 1971). Поред индиректног утицаја преко земљишта (Racine, 1993; Iwanow et al., 1994; Wyszkowska et al., 2002), угљоводоници из нафтних производа могу такође директно да утичу на биљке, замазивањем корена биљке масним материјама што ограничава транспирацију и дисање биљкама, смањујући пропустљивост ћелијских мембрана и метаболичке конверзије што доводи до промена у хемијском саставу, и на крају кроз токсични утицај неких угљоводоника на биљке (Pezeshki et al., 2000). Након продора у биљку, уље се креће у интерцелуларном простору и понекад у васкуларном систему. Ћелијске мембране се оштећују продирањем молекула угљоводоника, што доводи до цурења садржаја ћелије и уласка уља. Уља смањују стопу транспирације, највероватније блокирањем стома и интерцелуларног простора. То такође може бити и разлог за смањење фотосинтезе које настаје, иако постоје нека друга могућа објашњења као што су ремећење мембране

хлоропласта и инхибиција проузрокована акумулацијом крајњег производа. Утицаји нафте на дисање су разнолики, али се повећано дисање често јавља, могуће услед оштећења митохондрија. Нафта инхибира транслокацију у биљкама вероватно физичким блокирањем. Степен штетности наведених ефекта зависи од састава и количине нафте, еколошких услова и биљне врсте (Baker, 1970).

2.2. МИКРООРГАНИЗМИ У ЗЕМЉИШТУ

У земљишту су у великом броју заступљене различите групе микроорганизама (бактерије, гљиве, алге, протозое, вируси), нарочито из групе бактерија и гљива. Микроорганизми земљишта су хетерогена група коју чине аероби и анаероби, хетеротрофи, аутотрофи, сапрофити, симбионти и паразити, и представљају један од најважнијих фактора у систему земљиште-биљка (Радивојевић и сар., 2007).

Микроорганизми насељавају сваку честицу и пору земљишта, који својом активношћу учествују у стварању и одржавању земљишта и његове плодности. Микроорганизми чине од 0,1 до 5% целокупне органске материје земљишта (Јарак и Ђурић, 2008). Биомаса микроорганизама износи 0,5 до 5 тона по хектару ораничног слоја земљишта, а према резултатима Звјагинцев (1994), биомаса микробиолошког порекла може да достигне и до 20 тона по хектару (Јарак и сар., 2005).

Микробиолошки угљеник чини око 1-3% укупног органског угљеника, микробиолошки азот 1-5% укупног азота, а микробиолошки фосфор 0,5-11% укупног фосфора у земљишту (Saring and Steibrger, 1995; Beck et al., 1997; Moore et al., 2000). Сматра се да је микробиолошка биомаса значајна и зато што је покретач процеса синтезе и разградње, укључујући и процесе разградње загађивача (Dalal, 1998; Jenkinson et al., 2004). Кроз биомасу се осликава комплетно стање микробиолошке заједнице, па се овај параметар користи за рано утврђивање промена које настају у неком еколошком систему (Dalal, 1998; Hargreaves et al., 2003; Ladd et al., 2004).

Дисање земљишта је показатељ активности микроорганизама и показује интензитет аеробног и анаеробног метаболизма и дисање се заједно са микробиолошком биомасом користи за рано утврђивање поремећаја у екосистему (Anderson and Domsch, 1990, 1993; Jones and Ananyeva, 2001; Радивојевић и сар., 2003, 2007).

У укупним трансформацијама у земљишту, микроорганизми учествују са чак 60-80%. Они учествују у трансформацијама свих органских и неорганских једињења у земљишту, омогућују циклусе угљеника, азота и других неопходних елемената односно имају централну улогу у процесу кружења материје, минерализацијом органске материје обезбеђују хранива за биљке, одржавају ниво органске материје и структуру земљишта, повећавају аерацију и пропустљивост земљишта, чувају квалитет и исправност земљишта, контролишу патогене организме и смањују количину токсичних материја у земљишту (Јарак и Ђурић, 2008).

Захваљујући њиховим метаболичким процесима у земљишту одвија се кружење материје, синтеза и минерализација хумуса и исхрана биљака, па се микроорганизми користе као један од показатеља плодности земљишта (Јарак и сар., 2005). Микроорганизми имају значајну улогу и у стратегијама адаптација и повећању толерантности пољопривредних биљних врста на абиотичке стресове. Највећи утицај ублажавања абиотичких стресова на биљку имају микроорганизми који насељавају ризосферно земљиште кроз продукцију егзополисахарида и формирањем биофилма (Милошевић и Маринковић, 2011).

Микроорганизми у земљишту имају различите потребе за изворима и врстама хранљивих материја, еколошким условима и др. Пошто се земљишта разликују по тим својствима, у сваком типу земљишта доминирају они микроорганизми који у њему налазе најоптималније услове за свој метаболизам. Уопштено важи правило да у киселим земљиштима доминирају гљиве, у неутралним бактерије, а у базним алге и актиномицете (Јарак и сар., 2005). За све типове земљишта карактеристично је да се број микроорганизама смањује са дубином. Највећа бројност и активност је у слоју дубине до 40 цм где има највише органске материје, довољно влаге и кисеоника (Јарак и Чоло, 2007).

Свако нарушавање оптималних физичких, хемијских и биолошких особина земљишта директно се одражава на микробиолошку активност па се микроорганизми могу користити као показатељи деградације земљишта (Јарак и сар., 2005). Бактерије, гљиве и актиномицете су показатељи ефективне и потенцијалне плодности и биолошке деградације земљишта (Радивојевић и сар., 2007).

Бактерије су најбројнија група у земљишту и зато се њихов број користи као укупан број микроорганизма (Јарак и Говедарица, 2003). Бројност им се, у зависности од услова средине, креће од неколико милиона до неколико милијарди по граму апсолутно сувог земљишта. Бактерије су изузетно значајне за педогенезу, стварање и одржавање плодности земљишта. То је најразноврснија систематска група микроорганизма, коју чине углавном хетеротрофи. Према морфолошким и физиолошким својствима, бактерије су сврстане у три групе: „праве бактерије“, цианобактерије и зракасте бактерије-актиномицете. „Праве бактерије“ су најбројније у земљишту и оне су значајне за кружење азота, угљеника, сумпора, фосфора и других елемената (Јарак и Чоло, 2007).

Гљиве су хетеротрофни организми, углавном сапрофити. Према изгледу вегетативне ћелије разликују се кончасте гљиве- микромицете и елипсасте гљиве- квасци. Бројност гљива се креће од 50000 до 100000 у једном граму апсолутно сувог земљишта. Према процесима које врше у земљишту, гљиве су груписане у три групе: разлагачи, мутуалисти и паразити (Јарак и Чоло, 2007). До сада је откривено око 80000 врста. Посебно је значајна улога гљива у разградњи сложених органских молекула (Милошевић и сар., 2001; Imberger and Chiu, 2002).

2.3. ТРАНСФОРМАЦИЈЕ НАФТНОГ ЗАГАЂИВАЧА У ЗЕМЉИШТУ

Нафта и њени деривати када се нађу у животној средини, подлежу различитим абиотичким и биотичким трансформацијама. Ове трансформације значајно мењају састав нафтног загађивача, а услед тога и његове физичке и хемијске особине. Процеси

трансформације могу довести до потпуне деградације полазних једињења у такве крајње производе као што су угљен-диоксид, вода и друга неорганска једињења (ЕРА, 1984).

Абиотички губици настају физичким одстрањивањем појединих класа једињења из нафтног загађивача процесима испаравања, сорпције, спирања и растварања. Абиотичке трансформације укључују реакције као што су хидролиза, фотодеградација и оксидо-редукција, које хемијским процесима модификују или потпуно разграђују контаминанте (Rodgers et al., 1999). У зависности од врсте реакције и од структуре једињења, ови процеси могу дати производе који могу бити мање токсични, а у неким случајевима и токсичнији од полазних молекула (ЕРА, 1996). Адсорпција има кључну улогу у судбини многих органских материја у животној средини (Weber and Weed, 1974). Следећа абиотичка трансформација је хемијска деградација: реакције хидролизе и оксидо-редукције. Фотодеградација има ограничено значење за небиолошку разградњу у земљишту јер се одвија на површини и уопштено, само једињења која апсорбују сунчево зрачење изнад 285 nm се очекује да се подвргну фоторазградњи (Armstrong and Konard, 1974; ЕРА, 1984).

Биотички процеси укључују ингестију од стране живих организама и микробиолошку деградацију. Хемијске деградационе реакције су релативно неважне у односу на биолошку деградацију. Биодеградација уз помоћ природних микробних популација представља један од првих корака за трансформацију различитих органских полутаната присутних у животној средини (Leahy and Colwell, 1990).

Многи микроорганизми поседују ензимску способност разграђивања угљоводоника. У незагађеној, природној средини ови микроорганизми пре свега користе угљоводонике који су природно произведени од стране алги, биљака и других организама; супстрате као што су угљени хидрати и протеини. Према неким проценама, ови микроорганизми у незагађеној животној средини обухватају мање од 1% укупне микробиолошке популације (Atlas, 1981). Нормално, у земљишту 0,1% микробиолошке популације користи угљоводонике (Wilkinson et al., 2002; Van Hamme et al., 2003).

2.4. УТИЦАЈ НАФТЕ НА ЗЕМЉИШНУ МИКРОФЛОРУ

Неке врсте микроорганизама могу да користе нафту као извор угљеника и енергије, неке врсте нафта убија или инхибира, док на неке врсте не утиче (Угринов и Стојанов, 2010).

Прва реакција микроорганизама када дођу у контакт са нафтом у земљишту је смањење активности услед смањене доступности ваздуха. Ова смањена активност потиче од селективног штетног утицаја нафте на аеробне бактерије и гљиве у земљишту, што оставља отпорне и прилагодљиве сојеве микроорганизама да се умножавају (Odu, 1981).

Активност, бројност и разноврсност микроорганизама као најзначајније компоненте биолошке фазе земљишта, су биоиндикатори токсичних ефеката на биолошку активност земљишта (Милошевић и сар., 2007). Кључни чиниоци и индикатори биолошке деградације су: биодиверзитет, азотни циклус, акумулација загађивача и промена редокс потенцијала земљишта (Sims, 1990; Кастори и сар., 2006).

Средине загађене ароматичним једињењима, алифатичним угљоводонцима, су најчешће контаминирани и тешким металима. Са друге стране, овакве средине су добар извор бактерија са способношћу преживљавања у тешким условима. С обзиром на број и распрострањеност бактерија у односу на друге организме, бактерије представљају доминантне организме у загађеним екосистемима (Curtis et al., 2002). Процентуални удео угљоводоник оксидујућих бактерија у укупној бројности хетеротрофних бактерија у контаминираним земљишту обично рефлектује степен аклиматизације микробиолошке популације на услове контаминираним земљишта (Balba et al., 1998). Земљишта са нижим нивоима загађења показују већи број и разноврсност микроорганизама (Bossert and Bartha, 1984; Dean-Ross, 1989; Leahy and Colwell, 1990).

Нафта и производи који настају у току производње и коришћења нафте имају дуготрајан утицај на земљишну микрофлору, инхибирају циклус угљеника (разлагање целулозе) и циклус азота, посебно нитрификацију и азотофиксацију (Јарак и Чоло, 2007). *n*-алкани кратког низа (C_5 – C_{10}) су веома токсични према микроорганизмима, зато што

теже као растварачи да поремете структуру липидне мембране (Бешкоски и сар., 2012). Као и у случају нижих алкана, нижи циклоалкани као циклопропан, циклобутан и циклопентан имају изразито токсично дејство на микроорганизме услед дестабилизације липидне мембране. Такође *n*-алкани средње дужине ланца су мање токсични од *n*-алкана велике дужине ланца (дужих од 30 C атома) или циклоалкана (Угринов и Стојанов, 2010).

Присуство високих концентрација нафтних органских конституената и тешких метала у земљишту могу бити токсичне и инхибирати раст и репродукцију микроорганизама одговорних за биодеградационе процесе. Уопштено, концентрација укупних нафтних угљоводоника изнад 50.000 мг/кг, или токсичних метала изнад 2500 мг/кг се сматрају инхибиторним или токсичним за већину микроорганизама (ЕРА, 1994). Високе концентрације контаминанта у земљишту не морају увек изазивати негативне ефекте, а да ли ће високе концентрације изазвати токсичне ефекте на микробиолошку популацију зависи и од хемијског састава као и процеса којима је нафтно загађење подлегло (Trindade et al., 2005).

2.5. ЗНАЧАЈ МИКРООРГАНИЗАМА У РЕМЕДИЈАЦИЈИ ЗЕМЉИШТА

Технологије за уклањање нафтних загађујућих супстанци из земљишта и његово „излечење“ (ремедијацију) могу бити абиотичке (физичке, хемијске и термичке) и биотичке (биоремедијација у ширем смислу). Могу се применити на месту загађења (*in situ*) и изван места загађења (*ex situ*) (Костић, 2007; Бешкоски и сар., 2012).

Основни циљ аеробне *in situ* биоремедијације је обезбеђивање кисеоника и хранљивих елемената неопходних за развој микроорганизама у циљу што ефикасније биодеградације контаминаната. *Ex situ* технике биоремедијације су брже и лакше се контролишу, омогућавају разградњу ширег спектра контаминаната. Најчешћи начин биоремедијације *ex situ* је мешање контаминаног земљишта са одговарајућим количинама воде у посебном биореактору уз додатак микроорганизама (Раичевић и сар., 2007).

Под технике које доводе до уклањања загађења путем њихове деградације или трансформације спадају оне које користе хемијске реакције или биолошке процесе. Технике засноване на биолошким реакцијама су пасивна (природна) и техничка биоремедијација (биостимулација и биоаугментација) - биореактори са суспензијом, примена биогомила, површинска обрада земљишта, компостирање, биопроветравање и биопродување, примена органских биофилтера, постављање непокретних реактивних баријера, фиторемедијација и др. (Далмација и сар., 2004; Рончевић, 2007).

Природна (спонтана) биоремедијација подразумева редукцију концентрације загађења природним процесима и ослања се на природне способности присутних микробиолошких заједница у земљишту. Примењује се када је природни степен биодеградације загађења бржи од степена миграције загађења (Sara, 2003). Биоремедијација је економски исплатива, зелена технологија и у свету се биолошке методе користе дуги низ година, па тако у третману загађења угљоводоникима нафте, биоремедијацији припада око 25% од свих ремедијационих поступака (Boopathy, 2000; Philp and Atlas, 2005; Бешкоски и сар., 2012). У ужем смислу под биоремедијацијом се сматра ремедијација уз помоћ микроорганизама, а у ширем смислу уз помоћ биљака-фиторемедијација. Један од типова фиторемедијације представља фитостимулација (биоремедијација подпомогнута биљкама) која подразумева стимулацију микробиолошке деградације кроз активност биљке у зони корена (Macek et al., 2000).

Као биолошки агенси се најчешће користе микроорганизми. Биоремедијација је процес у коме се користе непатогени микроорганизми за уклањање токсичних супстанци до мање токсичних интермедијера или нетоксичних супстанци. При томе се користи метаболички потенцијал микроорганизама (бактерије, гљиве и др.) у циљу пречишћавања контаминираног земљишта (Watanabe, 2001). Биоремедијација обухвата микробиолошку деградацију и детоксикацију земљишта од штетних супстанци и загађивача као што су: органски загађивачи (нафта, нафтни деривати, пестициди, детерџенти, полимери, феноли, органски растварачи); вештачка ђубрива, тешки метали и други токсични елементи и једињења и радионуклиди (Бобић, 2005).

Основни пут за уклањање нафтних угљоводоника у природи је биодегградација (Alexander, 1999; Das and Chandran, 2011). Биоремедијација је комплексан процес и

микроорганизми посредством својих ензима разграђују (метаболишу) органске контаминанте из земљишта и трансформишу их у мање токсична једињења или се потпуно разграђују до угљен-диоксида и воде (Раичевић и сар., 2007). Угљоводоници из нафте служе као извор нутријената и енергије за раст и развој микроорганизама, који их разграђују до нафтенских киселина, алкохола, фенола, хидропероксида, карбонилних једињења (алдехиди и кетони), естара и на крају до угљеник(IV)-оксида и воде (Eglinnton, 1975; Марковић и сар., 1996; Угринов и Стојанов, 2010).

2.5.1. Фактори који утичу на ефикасност биоремедијације

Успостављање биоремедијационог система односно биодеградација нафтног загађивача у земљишту зависи од: природе самог загађења (природе и количине угљоводоника), карактеристика земљишта, процеса који утичу на биодоступност угљоводоника (старење, секвестрација и комплексирање) и присутне микробиолошке заједнице у земљишту (CISB, 1993; EPA, 1994; Alexander, 1995; Бешкоски и сар., 2012).

Нафтни угљоводоници као супстрати за биоремедијацију

Нафта је сложена смеша различитих угљоводоника и сродних компоненти који се уобичајено групишу у четири фракције: засићена фракција, ароматична фракција, једињења азота, сумпора и кисеоника и асфалтени (Balba et al., 1998; Виторовић и Јованчићевић, 2005; Hocking, 2005; Рајковић, 2009). Засићени угљоводоници који су присутни у нафтама су: алкани (*n*-алкани и изопреноиди), опште формуле C_nH_{2n+2} и циклоалкани који садрже један или више прстенова, опште формуле C_nH_{2n} . Ова једињења су у нафтној индустрији позната као нафтени. Ароматична фракција углавном садржи моно- и полицикличне угљоводонике, опште формуле C_nH_{2n-6} , који могу да имају и алкил-бочни низ. Једињења азота, сумпора и кисеоника су поларна једињења која садрже један или више хетероатома у структури. Асфалтени су поларна, високомолекуларна једињења која могу садржати већи број хетероатома и генерално имају ароматичну структуру (Бешкоски и сар., 2012).

Физичке и хемијске карактеристике нафте утичу на степен и брзину њене деградације (Haus et al., 2001). Горива и мазива, иако хомогенија по саставу од сирове нафте, садрже молекуле различитих физичко-хемијских карактеристика. Разлике су у молекулској маси, тачки кључања, растворљивости у води, хидрофобности, густини и вискозитету (Speight, 2005). Најважније карактеристике контаминанта које је потребно детерминисати су: могућност биодегградације, растворљивост у води, коефицијент сорпције земљишта и хемијска реактивност (Раичевић и сар., 2007).

Ефикасност биоремедијације је у директној вези са хемијском структуром загађујуће супстанце. Услед структурне разноврсности код угљоводоника постоје разлике у брзини и степену деградације микробиолошким путем (Atlas, 1984). Што је компликованија структура конституената нафтних продуката то је мања брзина биолошког третирања (Balba et al., 1998). Брзина микробиолошке разградње је различита за различита једињења присутна у нафтном загађивачу и опште је прихваћено да се брзина смањује у низу n -алкани > рачвасти алкани > рачвасти алкени > n -алкил ароматична једињења мале молекулске масе > ароматична једињења са једним прстеном > циклични алкани > полициклични ароматични угљоводоници > асфалтени (Peters et al., 2005; Jovančičević et al., 2007; Ward et al., 2009; Šolević et al., 2011; Бешкоски и сар., 2012).

n -алкани се разграђују брже од других група једињења, али међу појединим члановима хомологичког низа постоје разлике у биоразградивости. n -алкани дугог низа асимилирају се лакше од n -алкана кратког низа. Такође n -алкани средње дужине ланца су мање токсични и брже се разграђују од n -алкана велике дужине ланца (дужих од 30 C атома) или циклоалкана (Угринов и Стојанов, 2010). Од свих фракција нафтних угљоводоника, n -алкани средње дужине (C_{10} - C_{25}) се најбрже биоразграђују и преферирани су супстрат од стране микроорганизама. n -алкани дугог низа (C_{25} - C_{40}) су хидрофобна чврста једињења која се тешко разграђују због њихове лоше растворљивости у води и мале биодоступности, рачвасти алкани се такође деградирају знатно спорије од одговарајућих нормалних алкана, нарочито при ниским температурама (Balba et al., 1998).

Засићена и ароматична фракција мале молекулске масе нафте је биодеградибилнија од ароматичне фракције велике молекулске масе. Степен деградације ароматичних угљоводоника се смањује са повећањем броја кондензованих ароматичних прстенова.

Брзина биодеградације циклоалкана је променљива, али је углавном мања од брзине деградације алкана (Atlas, 1981).

Високо кондензоване ароматичне и циклопарафинске структуре, смоле, битумен и асфалтни материјали су најрезистентнији на биодегградацију. Сматра се да је овакав резидуални материјал након деградације нафте и њених производа аналоган и чак се може сматрати хуминским материјама. Због њихових инертних карактеристика, нерастворљивости и сличности са хумусним материјалом, мало је вероватно да ова једињења представљају опасност за животну средину (Balba et al., 1998; Loeher et al., 2001; Ivančev-Tumbas et al., 2004; Brassington et al., 2007; Stroud et al., 2007; Малетић, 2010).

Као посебан фактор од утицаја на биодегградацију може се разматрати концентрација појединачних компонената у нафти. Поједина једињења у високим концентрацијама, нпр. фенол, не могу бити разграђени због њихове токсичности, док при ниским концентрацијама подлежу биоразградњи (Рончевић, 2007). Супротно, веома ниске концентрације органског материјала ће резултирати смањеном микробиолошком активношћу. Ако је концентрација нафтних угљоводоника већа од 10.000 мг/кг, или је концентрација токсичних метала већа од 2500 мг/кг земљиште треба разблажити чистим земљиштем да би се контаминанти разблажили, тако да просечна концентрација буде испод токсичног нивоа. Циљне вредности укупних нафтних угљоводоника испод 1000 мг/кг се генерално не могу постићи биоремедијацијом (EPA, 1994).

Карактеристике земљишта

Било о ком типу биоремедијације да се ради, успешно успостављање процеса чишћења на загађеном локалитету ометано је хетерогеношћу земљишта и тешкоћом осматрања. Погодно земљиште је оно које је могуће контролисати. Код спонтане биоремедијације нема никаквих интервенција. Природне карактеристике земљишта код техничке биоремедијације су мање важне него код спонтане биоремедијације јер се користи технологија за манипулацију природним условима (Угринов и Стојанов, 2010).

Контрола и оптимизација процеса биоремедијације нафтног загађивача у земљишту је комплексна и зависи од више фактора. То су: садржај хранљивих супстанци, присуство кисеоника или других акцептора електрона, садржај влаге, температура, *pH* вредност земљишта, присуство сурфактаната и текстура земљишта (ЕРА, 1994; Бешкоски и сар., 2012).

Нутријенти су есенцијални за метаболизам органских материја од стране микроорганизама (Norris and Eckenfelder, 1991; Oh et al., 2001). Висока концентрација угљоводоника узрокује екстремно високи однос C:N, C:P или оба што је непогодно за раст микроорганизама, па је уобичајено да се хранљиве супстанце додају у земљиште ради успостављања оптималног масеног односа (Atlas, 1995; Vidali, 2001). Међутим, вишак одређених нутријената (нпр., фосфата и сулфата) може успорити микробијални метаболизам. Типичан C:N:P однос креће се у опсегу од 100:10:1 до 100:10:0,5 у зависности од специфичних конституената и микроорганизама укључених у биодеградациони процес (ЕРА, 1994). За оптималан раст микроорганизама потребно је да угљеник, азот, фосфор и калијум буду у масеном односу C:N:P:K=100:10:1:0,1 што је приближно односу ових елемената у биомаси (Boopathy, 2000).

Најбрже и најкомплетније разлагање већине органских загађивача па тако и нафтних угљоводоника одвија се под аеробним условима. Доступност кисеоника зависи од интензитета укупне микробиолошке потрошње и типа земљишта. Да би се повећала концентрација кисеоника у загађеној средини користе се различите методе (Rittman and McCarty, 2000). У аеробним условима микроорганизми користе кисеоник и трансформишу многе контаминанте до угљен-диоксида и воде, стварајући при томе сопствену ћелијску биомасу. Анаеробна деградација се одвија знатно спорије од аеробне, али је значајна у условима снижене концентрације кисеоника (Alexander, 1999; Van Hamme et al., 2003; Ward et al., 2009). У анаеробним условима се, у зависности од врсте микроорганизама и услова, стварају различити производи разградње контаминаната (Раичевић и сар., 2007).

За нормалан раст микроорганизама у земљишту потребни су влажни услови, али прекомерна влага земљишта, ограничава кретање ваздуха кроз површинске слојеве, а тиме редукује доступност кисеоника који је есенцијалан за аеробне метаболичке процесе. Земљиште у суштини треба да је влажно али не и мокро. Идеални опсег за влажност

земљишта за процес биоремедијације је између 12-30%, или 40-80% сатурационог капацитета земљишта (EPA, 1994; Rittman and McCarty, 2000; Бешкоски и сар., 2012).

Температура утиче на: способност микроорганизама да деградују загађиваче, микробни раст, састав микробних заједница и на брзину деградације загађивача. Такође, од температуре зависи и вискозитет, ратворљивост, физичка природа и хемијски састав нафтног загађивача (Alexander, 1999; Das and Chandran, 2011). Биодеградација угљоводоника се може одвијати у широком опсегу температуре, јер су изоловани психрофилни, мезофилни и термофилни микроорганизми који користе угљоводонике нафте као једини извор угљеника и електрона (Obuekwe et al., 2001; Aislabie et al., 2006; Бешкоски и сар., 2012). Доказано је да микробијална активност у земљишту значајно опада на температурама испод 10⁰ Ц. Микробијална активност већине бактерија важних за биодеградацију нафтних угљоводоника такође опада на температурама већим од 45⁰ Ц. У опсегу од 10⁰ Ц до 45⁰ Ц, брзина микробиолошке активности се обично удвостручава на сваких 10⁰ Ц. Због тога што температура земљишта варира са амбијенталном температуром, постојаће одређени периоди током године када се бактеријски раст, а са тим и деградација контаминаната смањује (EPA, 1994).

pH вредност земљишта одређује тип микроорганизама који су на располагању за биодеградацију. Већини бактерија одговара неутрална средина, а гљивама слабо кисела средина (Alexander, 1999; Rittman and McCarty, 2000). Већина биооксидационих процеса је ограничена са *pH* земљишта која се креће у опсегу од 5-9 (Norris and Eckenfelder, 1991). Обично је оптимално *pH* за биоремедијацију у границама од 6 до 8 (Alexander, 1999; Rittman and McCarty, 2000).

Сурфактанти су једињења која смањују површински напон воде и повећавају растворљивост хидрофобних супстанци у води. Угљоводоници се везују за честице земљишта, па сурфактанти у порама земљишта помажу процес десорпције неполарних једињења са честица земљишта, повећавајући на тај начин њихову биоусвојивост. Иако је утврђено да се биосурфактанти граде у земљишту, углавном се сматра да се *in situ* при биоремедијацији не постиже ефективна концентрација сурфактаната (Бешкоски и сар., 2012).

Текстура земљишта утиче на пермеабилност, садржај влаге и укупну густину земљишта. Фино спрашена земљишта су мање пропустљива од земљишта са крупним честицама. Земљишта са ниском пермеабилношћу су обично слепљена и отежавају дистрибуцију и транспорт воде, хранљивих супстанци и ваздуха. Оваквом земљишту се приликом биоремедијације могу додати агенси (слама или пиљевина) ради постизања жељене текстуре. На брзину и степен деградације загађивача утиче и тип контаминираниог земљишта, садржај глине и органске супстанце, као и удео појединих фракција песка. Земљиште у коме се у већој количини налазе песак и шљунак поседује добру дренажну способност, тј. врло кратко задржава воду и пропустљиво је за ваздух (Alexander, 1999; Philp and Atlas, 2005).

Процеси који утичу на биодоступност угљоводоника у земљишту

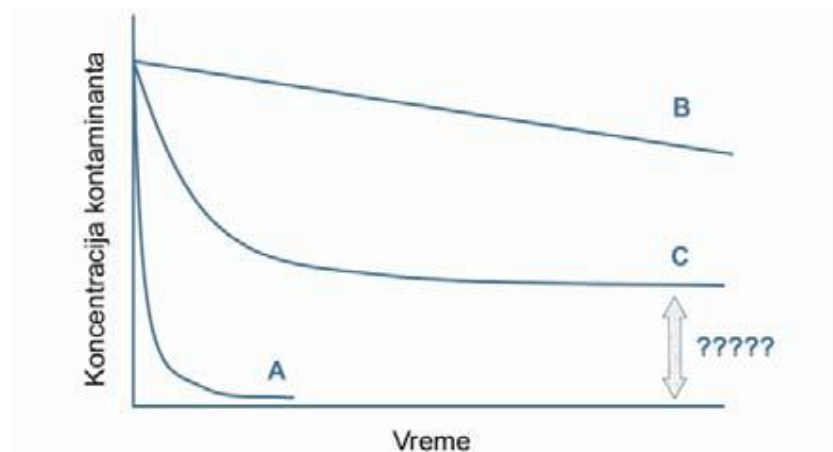
Термин „биодоступност“ односи се на фракцију хемикалија у земљишту која се може усвојити или трансформисати живим организмима. Биодоступност се разликује између организама и једнаких врста. Два фактора одређују количину хемикалија која је биодоступна: брзина трансфера посматраног једињења до живе ћелије и брзина усвајања и метаболизам (интристичка активност ћелија) (Bosma et al., 1997).

Судбина и понашање угљоводоника у земљишту зависи од типа земљишта (садржај минералне и органске материје) и физичко-хемијских особина контаминанта (растворљивост у води, поларност, хидрофобност, липофилност и молекулска структура контаминанта) (Reid et al., 2000a).

Угљоводоници присутни у нафти спадају у групу „хидрофобних органских материја (НОС).“ То је свеобухватни појам који обухвата широк опсег једињења органских ксенобиотика која су обично слабо растворна у води. У ова једињења спадају једноставна алифатична, циклична и ароматична једињења (углавном *BTEX*), полиароматични угљоводоници (*PAH*) и полихлоровани бифенили (*PCB*). Земљиште има важну улогу у судбини ових једињења у животној средини и представља „одвод“ за ове контаминанте (Малетић, 2010).

Након доспевања на земљиште, органски контаминанти се губе биодеградацијом, личингом или волатализацијом, или се могу акумулирати у биоти земљишта или бити задржани секвестрацијом са земљишном минералном и органском материјом. Контаминанти се из земљишта могу уклањати различитим брзинама и до различитог степена (Semple et al., 2003).

Слика 1. Теоријске криве губитка контаминаната из земљишта



(Semple et al., 2003)

А представља водо растворне, лако мобилне и биодеградабилне контаминанте; **В** представља високо резистентне компоненте; **С** представља бифазно понашање већине контаминаната у земљишту, где се губитак јавља али нестаје са временом. Ако органске компоненте које су доспеле на земљиште нису комплетно уклоњене личингом, волатализацијом или деградацијом, онда се њихова интеракција са компонентама земљишта мора размотрити.

Са повећањем времена контакта између контаминаната и земљишта, опада хемијска и биолошка доступност загађујуће супстанце, а овај процес се често назива „старење“ (Hatzinger and Alexander, 1995). Током времена лако доступна фракција (лако екстрактабилна или биодоступна фракција) се смањује на бифазан начин, што значи да се нешто деградира или губи из земљишта, а нешто се трансформише у резистентну фракцију (Macleod and Semple, 2000). На интеракцију између земљишта и хидрофобних органских контаминаната утиче органска материја из земљишта, њена количина (Hatzinger and

Alexander, 1995) и њена природа (Piatt and Brusseau, 1998); неоргански конституенти (Ball and Roberts, 1991a,b; Mader et al., 1997), а нарочито дистрибуција пора и структура (Nam and Alexander, 1998); микробиолошка активност (Guthrie and Pfaender, 1998) и концентрација контаминанта (Divincenzo and Sparks, 1997; Малетић, 2010).

Главни механизми старења су сорпција и дифузија (колективно назване секвестрација), које представљају интеракцију између контаминаната и чврсте фракције у земљишту, углавном минералне и органске фракције (Xing and Pignatello, 1997; Schlebaum et al., 1998). Ова интеракција заједно са физичко-хемијским особинама контаминанта, у великој мери одређује брзину и степен старења у земљишту (Alexander, 2000).

Органски контаминанти генерално пролазе кроз две кинетичке фазе у земљишту. Иницијално, део контаминанта може бити сорбован брзо (реда величине минута или неколико сати), док се преостала фракција сорбује знатно спорије током недеља или месеци (Xing and Pignatello, 1997). Иницијална, брза сорпција је последица везивања водоничним везама и ван дер Валсовим силама, механизми који се одвијају моментално након контакта контаминанта са површином земљишта. Органски контаминанти се у земљишту најчешће везују ковалентним везама, што резултује стварањем скоро иреверзибилне инкорпорације у земљиште (Gevao et al., 2000).

Два концепта су предложена за описивање секвестрације хидрофобних органских контаминаната у земљишту: дифузија у органску материју и сорпционо-успорена дифузија у поре. Земљишна органска материја садржи гумену и стакласту фазу и обе ове фазе садрже места за растварање. За стакласту фазу се сматра да садржи круте отворе где контаминанти могу интерреаговати са органском материјом. Контаминант на тај начин дифундује у комплексну структуру (Xing and Pignatello, 1997). Дифузија контаминанта кроз порну воду у земљишту је успорена сорпцијом на површини нано- и микропора у земљишту које садржи мало органске материје. Већина земљишта садрже мноштво пора са дијаметрима 20 нм и мањим. Овакве поре су мале да би омогућиле најмањим бактеријама (1 μm), вишим организмима, или власима корења (7 μm) да продру до њих. Из тог разлога контаминант који је смештен у оваквим порама заштићен је од „напада“ биоте из земљишта и није биодоступан. Контаминанти који су подлегли процесу секвестрације и

старења нису доступни за биодеградацију у земљишту чак иако су свеже додата једињења још увек биодеградабилна (Alexander, 1995).

Присутност и деградационе особине микроорганизама у земљишту

Један од кључних механизма за уклањање органских контаминаната из земљишта је катаболичка активност микроорганизама (Pritchard and Bourquin, 1984). Од различитих врста микроорганизама, бактерије, квасци и кончасте гљиве представљају главне разлагаче угљоводоника. Утврђено је да алге и протозое немају значајну улогу у деградацији угљоводоника (O'Brien and Dixon, 1976; Bossert and Bartha, 1984).

Деградационе способности микроорганизама су условљене катаболичким генима и ензимима (Khomenkov et al., 2008; Бешкоски и сар., 2012). Микроорганизми поседују различите механизме за адаптацију на хидрофобне супstrate као што су: модификација ћелијске мембране, производња површински активних супстанци или употреба ефлукс пумпи за смањење концентрације токсичних компоненти (Van Hamme, 2004).

Микрофлора земљишта има различит капацитет за усвајање хидрофобних органских материја. Ова катаболичка активност је примарно последица ко-евољуције земљишне микрофлоре и природних органских материја, које имају хемијску структуру аналогну посматраним хидрофобним органским материјама (Dagely, 1975). Брзина микробијалне декомпозиције ових материја у земљишту је функција неколико фактора, појединачног или њихове комбинације, а то су: доступност контаминаната организмима који имају способност да их деградирају, број присутних деградирајућих микроорганизама и њихова активност у земљишту и молекулска структура контаминанта (MacLeod et al., 2001).

Процеси који контролишу евољуцију катаболичких активности у земљишту нису у потпуности разјашњени. Катаболичка активност се може развити усвајањем следећих процеса: индукције или депресије специфичних ензима; развојем нових метаболичких способности преко генетских промена, трансформације или мутације плазмида; и селективно обогаћивање организама који имају способност да трансформишу циљане

контаминанте (Spain and van Veld, 1983; Pritchard and Bourquin, 1984). Сматра се да је адаптација контролисана концентрацијом хидрофобних органских контаминаната која интерреагује са микрофлором, као и дужином контактеног времена контаминанта и земљишта (Bosma et al., 1997; Alexander, 2000; Macleod et al., 2001). Изостанак катаболичке активности може бити последица споријег трансфера контаминанта од земљишта до микроорганизама као последице великог садржаја органске материје у земљишту (Macleod and Semple, 2002).

За слабо растворне контаминанте, биодеградација је генерално спорија него за растворније контаминанте, јер се контаминанти брже расподељују са чврстом фазом земљишта (Bosma et al., 1997). Микроорганизми могу да усвајају контаминанте из течне фазе директним контактом ћелија са органским контаминантом, или са субмикрометарским честицама диспергованим у течној фази (Nakahara et al., 1977). Микробијална интеракција са хидрофобним органским контаминантима укључује два процеса: физичке или хемијске компоненте укључене у кретање контаминанта у физичку средину, у релацији са микроорганизмима, и биолошке компоненте укључене у метаболизам контаминанта. Релативна важност ових механизма зависи од јачине секвестрације контаминанта и од брзине деградације. Присуство деградирајућих микроорганизама мења десорпциону брзину контаминаната са сорбоване површине. Промена се дешава због тога што микроорганизми усвајају контаминанте који су лако доступни преко течне фазе што доводи до десорпције контаминаната са чврсте површине у течну фазу (Bosma et al., 1997).

Доминантни родови микроорганизама који разграђују угљоводонике нафте су код бактерија: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* и *Bacillus*, код квасаца: *Rhodotorulla*, *Candida*, *Sporobolomyces* и *Aureobasidium*, а код плесни: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Phanerochaete* (Cerniglia and Sutherland, 2001; Kuhad and Gupta, 2009; Бешкоски и сар., 2012). Бактерије имају најважнију улогу у деградацији нафтног загађивача и делују као примарни разлагачи угљоводоника који потичу од просуте нафте (Brito et al., 2006).

Када се нафта излије у животну средину, врло је вероватно да је у том екосистему већ присутна мала популација микроорганизама, која ће разградити угљоводоничне загађиваче (Милић и сар., 2007). Да би се повећала брзина биолошке разградње, технологија биоремедијације укључује стварање оптималних услова у загађеном земљишту за раст одређених микроорганизама и увећавање њихове бројности, који својим метаболичким активностима уклањају токсичне супстанце из земљишта. Успостављање одговарајућих услова, који подстичу раст потребних микроорганизама, постиже се:

- додавањем нутријената и извора енергије (најчешће соли азота и фосфора) и
- подешавањем еколошких фактора (присуство кисеоника, одговарајућа влажност, температура, *pH* вредност итд).

Биоремедијација се пре свега врши уз коришћење микрофлоре која је већ присутна у загађеном земљишту, аутохтоним микроорганизмима. Под претпоставком да су микроорганизми који насељавају загађено земљиште адаптирани на такву средину, потребно је ту адаптацију стимулирати додавањем нутријената и обезбеђивањем оптималних физичко-хемијских услова који погодују микроорганизмима. У биостимулацији као додатак хранљивих супстанци се може користити минерално ђубриво или ђубриво органског порекла (Das and Chandran, 2011).

Приликом избора нутријената потребно је водити рачуна о времену њиховог задржавања у земљишту. Сви потребни елементи за процес биооксидације у земљишту су скоро увек присутни у вишку изузев азота и фосфора. Потреба за нутријентима зависи од тога у којој се мери обнављају нутријенти, која количина загађења је преведена у угљен-диоксид и која количина нутријената већ постоји на локалитету (Угринов и Стојанов, 2010). Већина истраживача препоручује да се примењује 3-10 кг азота и 0,3-1 кг фосфора на 100 кг биодеградабилног органског угљеника. Извор фосфора је најчешће со фосфорне киселине, а извор азота може бити амонијумова со, нитратна со, уреа или комбинација различитих супстанци. Употреба нутријената може да повећа ниво нитрата у подземној води. Ортофосфати могу да проузрокују таложење гвожђа, калцијума и магнезијума. Ако се користе соли натријума, глиновито земљиште може да набрекне и смањи пропустљивост за воду и ваздух (Рончевић, 2007).

Нутријенти мање лимитирају спонтану биоремедијацију него електрон-акцептори. Већина комерцијалних биоремедијационих пројеката користи кисеоник као електрон-акцептор, иако се могу користити и други (нитрати, сулфати) (Norris and Eckenfelder, 1991). За повишење концентрације кисеоника у контаминираној средини користе се методе попут превртања, принудне аерације, механичког мешања, биовентилације, увођења ваздуха и додатком алтернативних извора кисеоника попут водоник-пероксида или најчешће магнезијум-пероксида (Rittman and McCarty, 2000).

Варијације температуре утичу на све биолошке процесе. Биоремедијациони систем не може бити практичан под веома топлим и веома хладним временским условима без контролисања температуре у земљишту. *In-situ* биоремедијациони процес често може тећи у прихватљивом температурном опсегу без предузимања мера ради контролисања температуре (Угринов и Стојанов, 2010).

Земљишту са *pH* вредности изнад оптималног опсега, пре биоремедијационог третмана се мора подесити *pH* реакција. Ако је земљиште киселије додаје се креч, а ако је сувише алкално *pH* вредност се подешава додавањем елементарног сумпора или амонијум-сулфата (Rittman and McCarty, 2000).

Појединачни микоорганизми имају способност да разграде само одређени број компоненти нафте, али мешане културе као што су микробне заједнице присутне у земљишту, омогућавају већи степен разградње. Постоје компоненте нафте које је могуће разложити само заједничким дејством већег броја микроорганизама, кометаболички. Осим микроорганизама који примарно разлажу нафту, у земљишту су присутни и други микоорганизми који за своју исхрану користе компоненте настале примарном разградњом нафте (Mishra et al., 2001; Horakova and Nemec, 2000).

У поступку биоремедијације, природни процеси биолошке разградње се могу убрзати ако је потребно и додавањем посебно припремљених култура микроорганизама. У случајевима када се захтева брзо пречишћавање земљишта или постојећом микрофлором није могућа потребна биодеградација, у загађену средину се додају претходно селекционисани припремљени микоорганизми. Овај процес додавања концентроване и специјализоване популације микроорганизама, појединачног соја или мешане културе у

земљиште назива се биоаугментација. Ова техника се користи за земљишта у којим је број микроорганизама мањи од 10^5 CFU/g (Mishra et al., 2001).

Микроорганизми који се употребљавају за биоаугментацију могу се изоловати са места контаминације (аутохтони микроорганизми) или се могу набавити из комерцијалних извора. Егзогени микроорганизми су изоловани са других локалитета, или набављени из комерцијалних извора, тестирани у лабораторији на биодеградацију одређених контаминаната, и уколико је биолошка активност добра, користе се за опоравак деградираних земљишта. Најпрактичније је употребити микроорганизме изоловане из земљишта које треба да буде деконтаминирано (Horakova and Nemec, 2000) јер су присутни микроорганизми адаптирани на услове средине и на евентуално присуство других загађујућих супстанци (Гојгић-Цвијовић и сар., 2012).

Мешане микробне културе имају предност због ширег деградационог потенцијала, синергизма и могућности кометаболизма. Најчешће се припрема мешана култура и након изолације из земљишта, умножава се у биореактору и као активна биомаса апликује на контаминирано земљиште. Овакав поступак означава се као реинокулација или аутохтона биоаугментација (Ueno et al., 2007; Бешкоски и сар., 2012).

Предложено је коришћење одређених врста гљива за деградацију органских конституената на основу лабораторијских тестова. Гљиве не метаболизују контаминанте, него се деградација одвија изван њихових ћелија. Оне деградирају лигнин, који им мора бити обезбеђен, обично у облику сламе или пиљевине помешане са земљиштем. У процесу деградације лигнина, гљиве лучше друге хемикалије које деградирају органске контаминанте, при чему овај процес представља ко-метаболизам. Лабораторијски тестови су показали да ова технологија може деградирати органске контаминанте испод границе детекције (EPA, 1994).

Процес додавања генетски модификованих организама са биодеградационим својствима – катаболичким генима, такође представља биоаугментацију. У појединим случајевима контаминант је супстанца коју није могуће разградити са присутном микрофлором загађеног земљишта и те супстанце су најчешће ксенобиотици, па се микроорганизми током еволуције нису прилагодили за њихову разградњу. За разградњу

таквих супстанци генетским инжењерингом су конструисани микроорганизми који се накнадно додају у контаминирану средину (Угринов и Стојанов, 2010).

Генетски инжењеринг се углавном користи за добијање бактеријских сојева са високом способношћу за разградњу теже деградабилних ароматичних једињења (Mrozik and Piotrowska-Seget, 2010; Das and Chandran, 2011). Аутохтони микроорганизми споро обављају процес биоремедијације земљишта од угљоводоника. Применом генетског инжењеринга стварају се нови сојеви бактерија које су у могућности да разграђују већи број различитих угљоводоника, као што су неки представници рода *Bacillus* који могу разлагати аромате, алкане дугих ланаца и фенил-уреу; *Nocardia spp.* разлаже нафтален, феноксиацетате и полицикличне аромате, а *Pseudomonas spp.* разлаже бензен, органофосфате, полицикличне ароматичне угљоводонике и др. (Јарак и Чоло, 2007).

У неким случајевима техника биоаугментације се показала као неуспешна (Thompson et al., 2005; Fantroussi and Agathos, 2005). Истраживања показују да се убрзо по апликацији број егзогених микроорганизама у испитиваном земљишту знатно смањи. Разлози за то могу бити разни: конкуренција између додатих и природно присутних микроорганизама, предаторство и др. Осим тога, земљиште је сложен хетероген систем па преживљавање и способност деградације код додатих микроорганизама зависе и од варирања у температури, садржаја воде, *pH* реакције или доступности контаминанта и хранљивих супстанци. Употреба носача као физичка потпора за биомасу омогућава боље преживљавање. Поред заштитне улоге носећи материјал треба да буде и нетоксичан за земљишне микроорганизме и инокуланте (Tyagi et al., 2011; Бешкоски и сар., 2012).

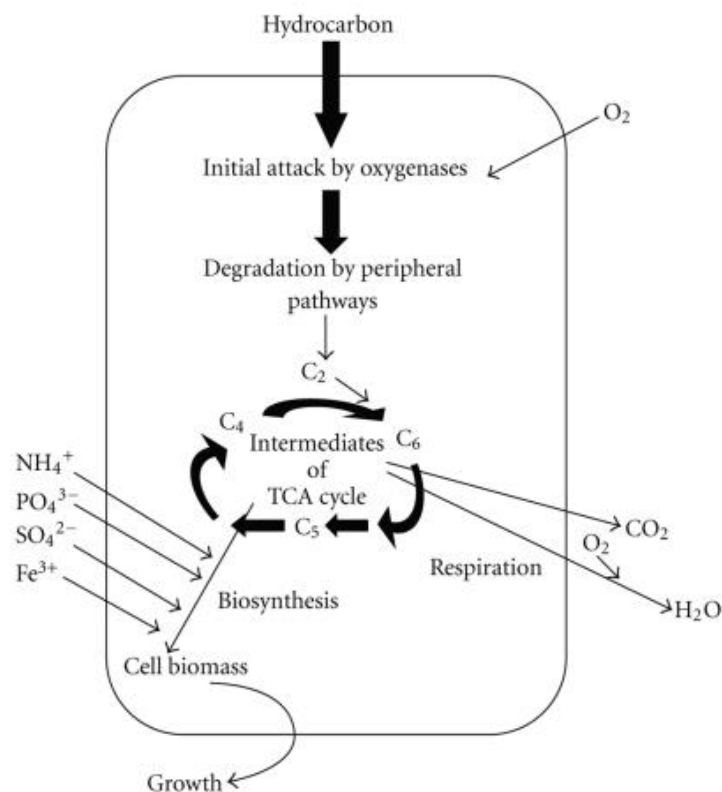
2.5.2. Механизми и производи разградње угљоводоника

Микроорганизми могу да користе различите угљоводонике, а најчешће се користе C_1 – C_{40} алкани; циклоалкани; бензен, толуен, етилбензен, ксилен (*BTEX*) и *PAH*. Од количине присутног кисеоника у земљишту зависи да ли ће се биоремедијација одвијати под аеробним или анаеробним условима (Alexander, 1999; Van Hamme et al., 2003; Ward et al., 2009).

Аеробна разградња

Аеробну разградњу врше аеробни микроорганизми од којих су најактивнији разлагачи угљоводоника: квасци из родова *Candida* и *Rhodotorulla*, кончасте гљиве из родова *Aspergillus* и *Penicillium* и бактерије из родова *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio* и *Arthrobacter* (Јарак и Чоло, 2007).

Кисеоник је, поред тога што је терминални акцептор електрона, један од кључних реактаната у почетним метаболичким путањама. У почетној биохемијској реакцији молекулски кисеоник се уграђује у супстрате помоћу ензима монооксигеназа (алифатични и неки ароматични угљоводоници) и диоксигеназа (ароматични угљоводоници) при чему настају примарни алкохол или катехол који се даље разлажу периферним метаболичким путањама до масних киселина које улазе у процес β -оксидације на који се даље наставља Кребсов циклус. Биосинтеза ћелијске биомасе започиње од централних прекурсорских метаболита, на пример ацетил-CoA, сукцината и пирувата (Singh and Ward, 2004).

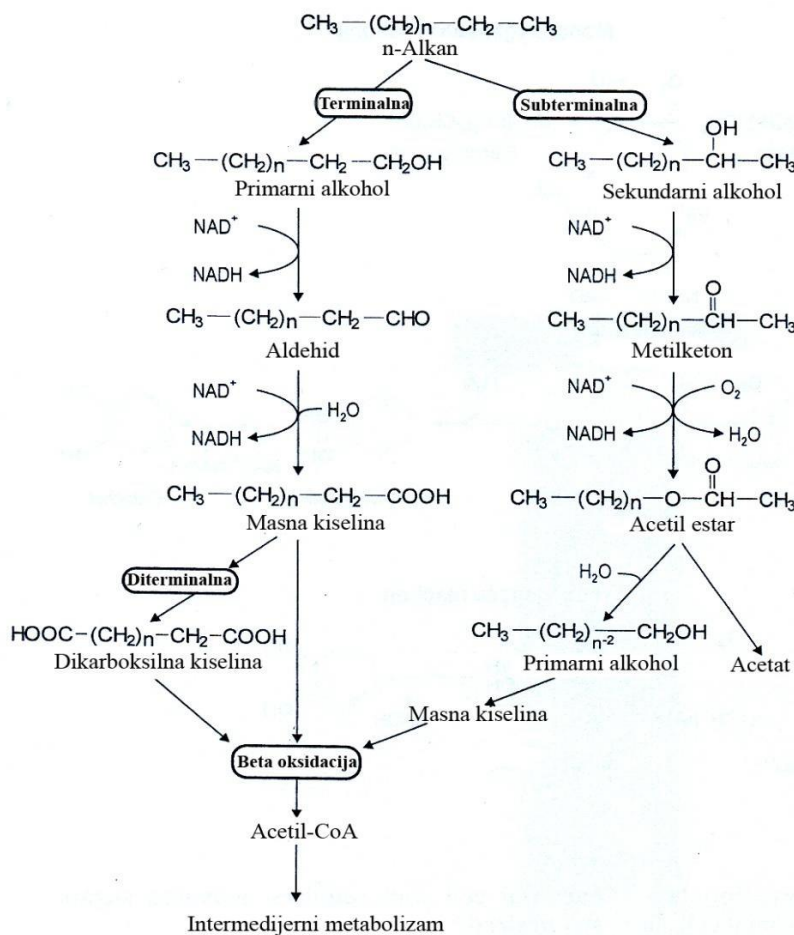


Слика 2. Главни принцип аеробне деградације угљоводоника (Das and Chandran, 2011)

Аеробне бактерије и гљиве поседују различите ензиме и катаболички различите путеве за разградњу органских једињења. Оксидација органске супстанце катализована је различитим ензимима оксигеназама, пероксидазама и лаказама. Постоје два типа оксигеназа: монооксигеназе које врше трансфер једног атома кисеоника у супстрат, а редукцију другог атома кисеоника у воду и диоксигеназе које инкорпорирају оба атома кисеоника у супстрат. Гљиве трансформишу широк спектар органских једињења користећи екстрацелуларне пероксидазе и лаказе (лигнолитичке гљиве) и интрацелуларне цитохром *P450* монооксигеназе (нелигнолитичке гљиве) (Cerniglia, 1997).

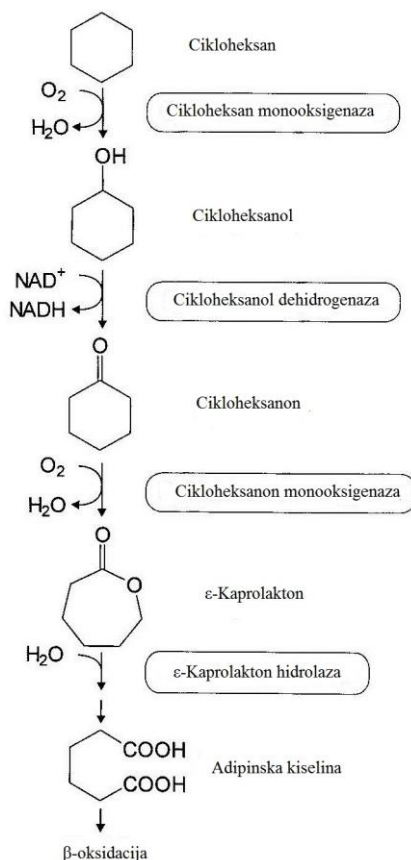
За разлику од гљива, бактерије користе специфичне катаболичке путеве, који почињу серијом различитих ензимски катализованих реакција тежећи да већи број угљоводоника трансформишу у мањи број интермедијера централних метаболичких путева. Полазна органска једињења се различитим периферним путевима преводе до централних интермедијера, као што су катехол и протокатехуат, који затим улазе у циклус трикарбонских киселина (Fritsche and Hofrichter, 2000). Биосурфактанти представљају хетерогену групу површински активних једињења и биодеградација се побољшава њиховим дејством услед повећања биодоступности контаминанта (Barkay et al., 1999).

Са порастом молекулске масе *n*-алкана долази до смањења њихове растворљивости, односно до смањења њихове биодоступности микроорганизмима. Терминална оксидација је главна путања оксидације *n*-алкана. Оксидацијом угљоводоничног низа настаје примарни алкохол који се даље оксидује алкохол-дехидрогеназом у алдехид. Алдехид-дехидрогеназа катализује оксидацију алдехида у масну киселину која се даље β -оксидацијом преводи у ацетил-CoA, који улази у циклус лимунске киселине. Метил рачвања у молекулу угљоводоника ометају β -оксидацију и захтевају дитерминалну оксидацију или друге заобилазне механизме. Дитерминална оксидација алкана је споредна путања деградације, при чему настаје дикарбоксилна киселина која се β -оксидацијом преводи у ацетил-CoA. Субтерминална оксидација је карактеристична за алкане кратког низа (C_3 - C_6), при чему се добија секундарни алкохол, који се оксидује у кетон. Кетон се даље преводи до естра. Естераза хидролизује естар до алкохола и масне киселине, која се даље метаболише β -оксидацијом (Van Beilen et al., 2003).



Слика 3. Путања деградације алкана (Авдаловић, 2015)

Циклоалкани се прво трансформишу до цикличних алкохола који се, затим, дехидратишу до одговарајућих кетона. Након тога, систем монооксидаза лактонизује прстен, док одговарајуће лактон хидролазе отварају прстен. Ова два ензима се никад не јављају код истих врста микроорганизама и зато није могуће изоловати чисте микробиолошке културе које могу да буду гајене искључиво на циклоалканима (Bartha, 1986). Синергистичким дејством више микроорганизама могућа је деградација различитих циклоалкана. Високо кондензована циклична једињења имају смањену биодеградабилност услед њихове структуре, физичког стања и смањене биодоступности микроорганизмима услед ниже растворљивости.

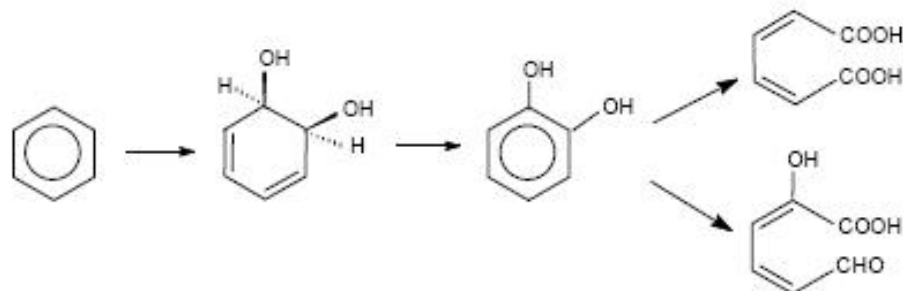


Слика 4. Механизам оксидације циклоалкана (Fritsche and Hofrichter, 2000)

Деградација ароматичних једињења подразумева њихову трансформацију до одређених међупроизвода као што су катехол, хомогентизат или протокатехуат неким од периферних путања. Настали међупроизводи се затим превode у неке од интермедијера циклуса лимунске киселине и даље се метаболишу у истом (Singer and Finnerty, 1984).

Почетни кораци, хидроксилација и дехидрогенација, су заједнички за све путање микробиолошке деградације моноароматичних угљоводоника. На овај начин се ароматични прстен превodi у катехол, централни интермедијер метаболизма ароматичних угљоводоника (Миличић-Терзић, 2001). Ароматична једињења се деградују на два различита начина уз коришћење различитих ензима. Прокариоти започињу деградацију ароматичних једињења нападом диоксигеназа, уграђивањем молекулског кисеоника, чиме настаје *cis*-дихидродиол. У случају оксидације бензена, следи дехидрогенација до катехола (Gibson et al., 1968). Потом долази до отварања прстена у орто или мета положају и настају

cis, *cis*-муконска киселина или 2-хидроксимуконил семиалдехид. Крајњи производи и орто (сукцинат и ацетил-СоА) и мета (ацеталдехид и пируват) цепања прстена катехола улазе у Кребсов циклус (Милић, 2011; Бешкоски и сар., 2012).



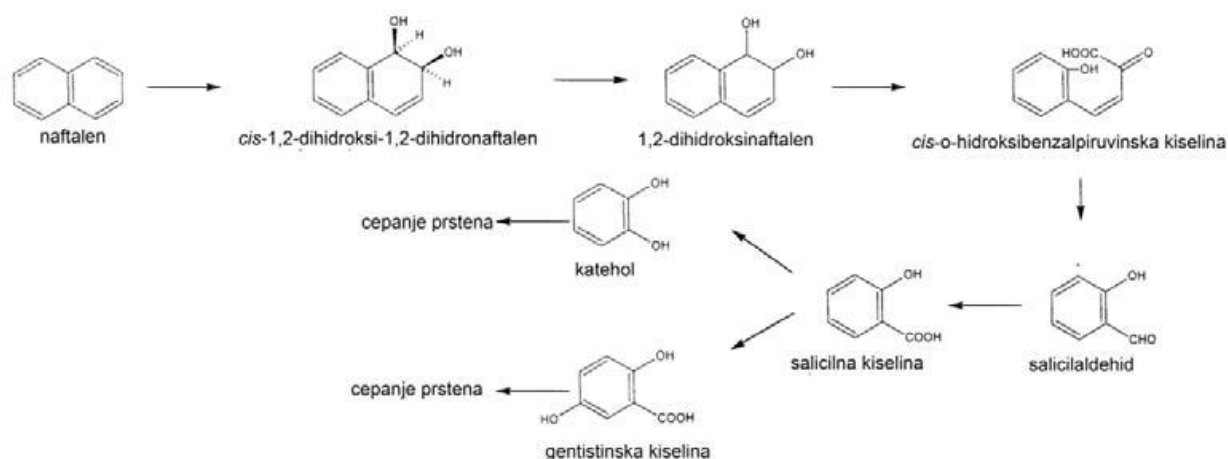
Слика 5. Биодеградација бензена бактеријама (Угринов и Стојанов, 2010)

Алтернативно, неки еукариоти као што су нелигнолитичке гљиве и неки прокариоти користе цитохром *P450*-монооксигеназу. Бензен се оксидацијом монооксигеназама преводи у арен-оксид који се преводи у *trans*-дихидродиол пре грађења катехола. Нелигнолитичке гљиве производе читав низ оксидованих метаболита који су мање токсични него полазне компоненте (Бешкоски и сар., 2012). Примери нелигнолитичких гљива које користе оксидативни пут посредован *P450*-монооксигеназама су: *Chrysosporium pannorum*, *Cunninghamella elegans* и *Aspergillus niger* (Bamforth and Singleton, 2005).

Код кондензованих полицикличних аромата деградација почиње деградацијом појединачних ароматичних прстенова. Полициклични ароматични угљоводоници мале молекулске тежине (са два или три прстена) су релативно волатилни, растворни и деградабилнији од *РАН* са великом молекулском масом. Високомолекуларни *РАН* (четири или више прстенова) јако се сорбују на земљишту и резистентнији су на микробиолошку деградацију (Малетић, 2010).

Биодеградација нафталена је најпотпуније проучена од свих полицикличних ароматичних угљоводоника због његове најједноставније структуре и највеће растворљивости и због тога што се нафтален-деградирајуће бактерије лако изолују. То су

обично грам-негативне бактерије и већина њих припада роду *Pseudomonas* (Mrozik et al., 2003). Бактерије прво оксидују нафтален инкорпорацијом оба атома кисеоника у ароматични молекул при чему се формира *cis*-1,2-дихидрокси-1,2-дихидронафтален. Нафтален диоксигеназе делују као мултикомпонентни систем ензима који је одговоран за формирање *cis*-дихидродиол нафталена (Cerniglia, 1984). Други корак у бактеријској оксидацији нафталена је конверзија *cis*-1,2-дихидрокси-1,2-дихидронафталена у 1,2-дихидрокси нафтален. Ова реакција је катализована са нафтален(+)-*cis*-дихидродиол дехидрогеназом и захтева NAD^+ као електрон акцептор. Следећи корак доводи до ензиматског отварања прстена 1,2-дихидрокси нафталена до *cis*-2-хидроксибензалпирувата, који се затим конвертује серијом дехидрогеназа до салицилата и пирувата. Салицилат се оксидује са салицилат хидролазом до катехола, који може подлећи орто или мета цепању у зависности од метаболизма бактерија (Dagley, 1971; Малетић, 2010).



Слика 6. Предложени пут оксидације нафталена неким врстама *Pseudomonas* бактерија (Mrozik et al., 2003)

Трициклични ароматични угљоводоници, антрацен и фенантрен, су широко распрострањени у животној средини. На пример, антрацен се може комплетно минерализовати са бактеријама *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Beijerinckia*, *Rhodococcus* и *Mycobacterium* при чему је иницијални оксигеновани интермедијер дихидрол (Mrozik et al., 2003).

Mycobacterium је бактерија за коју је показано да може да деградира пирен и бензо[α]пирен. Седам метаболита метаболизма пирена је идентификовано. Три продукта оксидације прстена: *cis*-4,5-пирендихидродиол, *trans*-4,5-пирендихидродиол и пиренол; као и четири продукта цепања прстена: 4-хидроксиперинафетенон, 4-фенантроинска киселина, фтална киселина и цинаминска киселина од којих је 4-фенантроинска киселина главни продукт метаболизма пирена. Постојање *cis*- и *trans*-4,5-дихидродиола указује на различите иницијалне путеве оксидативног „напада“ на пирен (Mrozik et al., 2003). *Mycobacterium* врсте су такође способне да формирају и неке нове метаболите као што су 6,6-дихидрокси-2,2бифенил дикарбоксилна киселина, што представља нови пут деградације пирена који укључује цепање оба централна прстена (Vila et al., 2001).

Комбинација ензима из лигнолитичких и нелигнолитичких гљива је кључна за потпуну минерализацију полицикличних ароматичних угљоводоника веће молекулске масе, као што су пирен и бензо[α]пирен. Лигнолитичке гљиве (нпр. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*) (Бобић, 2005; Ruiz-Duenas and Martinez, 2009) синтетишу екстрацелуларне манган- или лигнин- пероксидазе, као и лаказе које оксидују *PAH* неспецифичном радикалском реакцијом. Ови микроорганизми су од посебног значаја за деградацију слабо растворних супстрата који се не могу транспортовати кроз мембрану. Проучавањем утицаја лигнолитичких гљива на деградацију *PAH* показано је да се ови угљоводоници деградују у комбинацији са лигнолитичким ензимима, цитохром *P450* монооксигеназама и епоксид-хидролазама које врше комплетну минерализацију полазног једињења (Bamforth and Singleton, 2005). Производи деградације гљива су често неспецифични, непотпуни и често могу бити још токсичнији метаболити у односу на полазна једињења (Cerniglia, 1997).

Анаеробна разградња

У анаеробним условима, у општем случају контаминанти се трансформишу до метана, малих количина угљен-диоксида и гасовитог водоника (Раичевић и сар., 2007).

Код анаеробне деградације први корак представља увођење воде или фумарата уместо молекулског кисеоника. Мешаним културама микроорганизма могуће је

разградити: толуен, бензен, нафтален, фенантрен, *n*-алкане са више од шест угљеникових атома и рачвасте алкане (Khomenkov et al., 2008; Haritash and Kaushik, 2009). Анаеробна оксидација се одвија уз редукцију гвожђе (III)-јона, сулфата, оксида мангана или фумарата, затим денитрификацију, ензимима аноксигених фотосинтетских бактерија или синтрофним конзорцијумом водоничних и метаногених бактерија (Бешкоски и сар., 2012).

Многи истраживачи су предложили *n*-хексан као модел једињења за одређивање начина деградације *n*-алкана анаеробним микроорганизмима (Heider et al., 1999; Widdel and Rabus, 2001; Wilkes et al., 2003). Иницијални корак овог пута је активација *n*-алкана на C₂ позицији са фумаратом при чему се формира суцинат, који се даље активира са *HSCoA* и настаје суцинил-*CoA*. У овом последњем једињењу долази до прерасподеле угљеника и формира се малонил-*CoA*, који се затим декарбоксилује до 4-метилалкиноил-*CoA*, а затим следи β-оксидација до CO₂ као крајњег продукта (Wilkes et al., 2003). Приликом разградње ароматичних једињења централни интермедијер је бензоил-*CoA* чија даља деградација иде постепеним засићењем ароматичног прстена до пимелил-*CoA* који се затим комплетно разграђује до ацетил-*CoA* и молекула угљен-диоксида (Bamforth and Singleton, 2005; Haritash and Kaushik, 2009).

2.5.3. Предности и ограничења биоремедијације

Биоремедијација је у основи природан процес који се одвија спонтано у природним условима, ако су сви фактори и чиниоци присутни у земљишту. Биоремедијација се сматра погодном за уклањање различитих контаминаната из земљишта као што су угљоводоници пореклом из нафтне индустрије, органски растварачи, пестициди и друге органске материје. Број микроорганизма који учествују у биодеградацији повећава се у присуству контаминанта, а након деградације смањује се присуство ових популација (Vidali, 2001).

Предност биоремедијације је у томе да најмање нарушава животну средину, посебно као *in situ* технологија, и као својеврсан облик зелене технологије уклапа се у стратегију одрживог развоја. Биоремедијација се сматра безбедном технологијом која решава проблем загађења без складиштења отпада и подразумева трансформацију

загађивача у нетоксичне продукте (угљен-диоксид, вода и биомаса). При томе не ремети физичка, хемијска и биолошка својства земљишта. Осим тога, биоремедијација је економски исплатива технологија и цена биоремедијационих поступака је нижа у поређењу са алтернативним методама (Врвић, 2008; Бешкоски и сар., 2012).

Основно ограничење биоремедијационе методе је што се не може применити за деконтаминацију земљишта контаминираног токсичним супстанцама које нису биодеградабилне. Не може се употребити ни за ремедијацију земљишта са високом концентрацијом загађујућих супстанци. Још један од недостатака ове методе је што поступци трају дуже од осталих метода (Vidali, 2001; Бешкоски и сар., 2012).

Постоји низ фактора који ометају успешно успостављање процеса биоремедијације на загађеном земљишту. Загађење може бити “невидљиво” за микроорганизме ако је сувише ниска концентрација загађења, ако је загађење у неводеној фази, ако је адсорбовано за површину земље или у порама тако малим да их вода циркулацијом тешко испира. Органско загађење може бити покренуто додавањем сурфактаната. Мале количине сурфактаната смањују површински напон и загађење прелази у водену фазу, а када се примењују велике количине сурфактаната долази до спајања молекула сурфактаната у колоиде уз грађење мицела. Органско загађење раствара се у мицелама па биодеградација није повећана.

Загађење може бити токсично за микроорганизме. Нека токсична једињења могу бити разградљива у малим концентрацијама, али у великим концентрацијама у воденој фази могу да уништавају микроорганизме. Природна једињења могу да ометају процес биодеградације загађења због селективне разградње, а могу и да помажу уколико подстичу развој микроорганизама. Опасност представља и могућност настанка још токсичнијих производа од полазних једињења када не дође до потпуне деградације. Може се десити да је немогуће уклонити загађење до ниских концентрација (испод прописане граничне вредности), иако су услови за биодеградацију добри, јер може бити фаворизована нека друга реакција (Рончевић, 2007; Угринов и Стојанов, 2010).

3. РАДНА ХИПОТЕЗА

Микроорганизми у земљишту пре свега користе угљоводонике који су природно произведени од стране алги, биљака и других организама; супстрате као што су угљени хидрати и протеини. Према неким проценама, ови микроорганизми у незагађеном земљишту обухватају мање од 1% укупне микробиолошке популације. Микроорганизми који су способни да разграђују природно присутне угљоводонике у земљишту, могу да разграђују и угљоводонике који потичу од нафтног загађивача.

Под претпоставком да су микроорганизми, који насељавају загађено земљиште, адаптирани на такву средину и да удео микроорганизама који деградују нафту може прећи и 10% укупне микробиолошке популације након изливања нафте, ови микроорганизми су предмет истраживања као и услови који поспешују раст и повећавају бројност присутне микрофлоре.

4. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ истраживања је да се изврши процена биоремедијационе способности аутохтоних група микроорганизама из земљишта контаминираног нафтом и да се испита њихова ефективност у сврху биоремедијације земљишта.

Услед тога што се антропогеним деловањем често загађује земљиште и нарушава еколошка равнотежа, употреба микроорганизама у процесима биодеградације загађивача је у сталном порасту због великог биодиверзитета и катаболичког потенцијала. Способност земљишних микроорганизама да разграђују хидрофобне органске контаминанте је основно за квалитет и плодност земљишта. Микробијални катаболизам је принципијални механизам за уклањање контаминаната из земљишта.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

5.1. ПОСТАВЉАЊЕ ОГЛЕДА

Експеримент је изведен у виду земљане културе различитих клонова топола у стаклари Природно-математичког факултета, Департмана за биологију и екологију, Универзитета у Новом Саду.

Биљке су гајене у полуконтролисаним условима, са контролисаним заливањем и регулацијом температуре и спољашњим условима светлости. Као супстрат у коме су гајене биљке је коришћено земљиште из расадника Института за низијско шумарство и животну средину типа хумофлувисол. У циљу испитивања могућности ремедијације земљишта контаминираних нафтом, резнице клонова топола: клон 1: *Populus x euramericana* cl. 129/81, клон 2: *Populus x euramericana* cl. "Pannonia" и клон 3: *Populus deltoides* cl. В-81, су посађене у земљиште са различитим нивоима загађења: 0, 5 и 20 г дизела/кг земљишта. Третирање земљишта је обављено квашењем земљишта дизел горивом у циљу добијања задате концентрације, након чега је земљиште пребачено у саксије запремине 12 литара у које су посађене резнице топола. Након садње је извршено иницијално заливање, након чега су биљке заливане периодично у циљу одржавања приближно 70% ПВК.

5.2. ИЗОЛАЦИЈА И ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ

Узорци земљишта за микробиолошке анализе узети су асептичном техником у пет понављања, из различитих варијанти огледа и из сваке варијанте узето је око 500 г земљишта. Узорци су обележавани споља на цедуље са неопходним подацима и стављани у стерилне *PVC* кесе које су пренете у ручни фрижидер, а затим транспортоване до лабораторије за даље анализе.

Узорци су узети из земљишта без нафте и са 5 и 20 г нафте (дизел гориво) у временском периоду на 15, 30, 60 и 90 дана са почетним узорцима који су узети 3.06.2014. Из сваке варијанте огледа са клоновима биљке тополе, узети су узорци земљишта у три понављања, тако да је са узорцима земље без биљака, који су узети у једном понављању, било укупно 30 (27+3) узорака за анализу у сваком од укупно пет узимања.

Микробиолошке анализе су рађене у лабораторији за микробиологију, Департмана за ратарство и повртарство, Пољопривредног факултета у Новом Саду. Бројност испитиваних група микроорганизама одређена је индиректним методом, методом агарних плоча.

5.2.1. Метода агарних плоча

Бројност микроорганизама се одређује засејавањем одређене количине суспензије земљишта на селективне хранљиве подлоге за одређене врсте микроорганизама. Суспензија земљишта се припрема методом разређења. Засејане подлоге се инкубирају на одговарајућој температури, а након истека времена инкубације, одређује се број колонија. Код ове методе потребно је водити рачуна о избору правилног разређења, пошто различити типови земљишта својим физичким и хемијским својствима условљавају различит квантитативни и квалитативни састав микроорганизама. Број разређења зависи од бројности микроорганизама у испитиваном материјалу. Ако се очекује већа бројност микроорганизама, припрема се и већи број разређења. Узорак земљишта који се користио

за припрему разређења, осуши се на 105° Ц, у трајању од 4 сата, како би се израчунала апсолутно сува маса земљишта јер се број микроорганизама обично изражава на 1 г апсолутно сувог земљишта према формули (Јарак и Ђурић, 2006):

$$N \text{ (CFU/g сувог земљишта)} = a * b * c / d$$

где су:

N - број микроорганизама у 1 г апсолутно сувог земљишта

a - просечан број колонија израслих на засејаним Петри кутијама

b - коефицијент корекције на 1 мл (2 - ако је засејавање вршено са 0,5 мл или 5, ако је засејавање вршено са 0,2 мл)

c - разређења којим је извршено засејавање

d - маса једног грама апсолутно сувог земљишта из кога је извршено засејавање.

5.2.2. Одређивање бројности испитиваних група микроорганизама

Бројност микроорганизама у земљишту је велика и да би се одредио њихов број, супстрат се пре засејавања мора разредити у одређеној количини воде или физиолошког раствора (Јарак и Ђурић, 2006). Бројност микроорганизама одређена је методом децималног разређења, од 10^{-1} до 10^{-5} , засејавањем одговарајуће суспензије земљишта на селективне хранљиве подлоге за следеће групе микроорганизама:

1. Укупан број микроорганизама на земљишном агару
2. укупан број амонификатора на месопептонском агару (МРА)
3. број бактерија из рода *Pseudomonas sp.* на *King B* подлози
4. број бактерија из рода *Bacillus sp.* на *L*-агару
5. број актиномицета на синтетичком агару
6. број гљива на подлози по Чапеку

7. број бактерија из рода *Azotobacter sp.* на Фјодоровој подлози.

Израсле колоније на селективним хранљивим подлогама су пребројане и прерачунате на милилитар испитиваног супстрата по формули: $N = a * b * c$, а затим је бројност микроорганизама прерачуната на 1 г апсолутно сувог земљишта. Добијени подаци су логаритмовани и обрађени статистички.

1. Укупан број микроорганизама

Разређење се бира према својствима земљишта које се испитује и уколико су земљишта богата органском материјом користе се већа разређења: 10^{-6} , 10^{-7} . Ако су земљишта кисела или песковита користе се мања разређења: 10^{-3} , 10^{-4} (Јарак и Ђурић, 2006).

Укупан број микроорганизама одређен је на агаризованом земљишном екстракту (Poshon and Tardieux, 1962). Засејавање је вршено стерилном пипетом са 0,5 мл суспензије земљишта из 10^{-5} разређења, у празну Петри кутију и преливено са 10 мл растопљеног земљишног агара уз лагано ротирање кутије. Засејана подлога је инкубирана у термостату на 28°C пет дана. Након тог периода пребројане су израсле колоније.

2. Укупан број амонификатора

Бројност амонификатора одређена је на чврстом месопептонском агару (МРА), засејавањем са 0,5 мл суспензије земљишта из 10^{-5} разређења у празну петри кутију и сипано је 20 мл растопљене подлоге уз лагано ротирање. Инкубација је трајала три дана на температури 28°C , након чега су избројане израсле колоније.

3. Број бактерија из рода *Pseudomonas sp.*

Бројност бактерија из рода *Pseudomonas sp.* одређена је на *King*-овој подлози *B*, засејавањем са 0,5 мл суспензије земљишта из 10^{-2} разређења у празну петри кутију,

методом преливања инокулума. Инкубација је трајала 48 сати на 28° Ц након чега су избројане израсле колоније.

4. Број бактерија из рода *Bacillus sp.*

Бројност бактерија из рода *Bacillus sp.* је у прва два понављања одређена на високо диференцијалној подлози *L*-агару, а у осталим понављањима бројност је одређена на *King B* подлози заједно са *Pseudomonas sp.* Засејавање је вршено стерилном пипетом са 0,5 мл суспензије земљишта из 10⁻⁴ разређења у прва два понављања и из 10⁻² разређења у III, IV и V понављању, методом преливања инокулума. Инкубација је трајала 48 сати на 28° Ц након чега су избројане израсле колоније.

5. Бројност актиномицета

Број актиномицета је одређен на синтетичкој подлози по Красиљникову (1965). Разређење за засејавање одређује се према типу земљишта, то је најчешће 10⁻⁵ (Јарак и Ђурић, 2006). Засејавање је вршено стерилном пипетом са 0,5 мл суспензије земљишта из 10⁻⁵ разређења у празну петри кутију и преливено са 20 мл отопљене подлоге. Инкубација је трајала 7 дана на 28° Ц. Након тог периода пребројане су израсле колоније које су компактне, обрасле танким мицелијама, а многе су и пигментисане.

6. Бројност гљива

Бројност гљива одређена је на Czapek-Dox подлози. Засејавање је вршено стерилном пипетом са 0,5 мл суспензије земљишта из 10⁻⁴ разређења у празну петри кутију и преливено са расхлађеном отопљеном подлогом. Инкубација је трајала пет дана на 28° Ц и након тог периода израсле колоније су пребројане.

7. Број бактерија из рода *Azotobacter sp.*

Бројност *Azotobacter sp.* одређена је на Фјодоровој подлози (Anderson, 1958). Засејавање је вршено са 0,2 мл суспензије земљишта из 10^{-1} разређења методом фертилних капи. Растопљена чврста хранљива подлога се разлије у петри кутију и пипетом се узме 0,2 мл суспензије земљишта и распоређује у 25 до 50 једнаких малих капи по површини подлоге. Инкубација је трајала 48 сати на 28° Ц након чега су пребројане израсле колоније на местима где су стављане капи.

5.3. ОДРЕЂИВАЊЕ ДЕХИДРОГЕНАЗНЕ АКТИВНОСТИ ЗЕМЉИШТА

Дехидрогеназна активност земљишта одређивана је спектрофотометријском методом по Lenhard (1956), модификованој по Thalmann-у (1968). Ова метода се заснива на способности ензима дехидрогеназе (*DHA*) да водоник са супстрата преноси на безбојни *TTC* (1,3,5 трифенилтетразолијум хлорид) при чему га редукује и преводи у црвено обојени *TPF* (трифенил формазан). Активност дехидрогеназе одређује се на основу мерења интензитета црвене боје *TPF*-а.

Поступак методе се заснива на следећем: Одмери се по 10 г сувог земљишта просејаног кроз сито и ставља се у тамне флашице. Затим се дода 10 мл 0,5% раствора *TTC* у трис-пуферу, промеша и инкубира 24 сати у термостату на 30° Ц. Упоредо се на инкубацију ставља контролни узорак (слепа проба) који садржи само раствор *TTC* у трис-пуферу, без земљишта. Након инкубације у узорке и у контролу се дода 40 мл раствора за екстракцију да би се екстраховао *TPF*, промућка и инкубира још 2 сата на собној температури, и затим се профилира. Запремина филтрата треба да је идентична запремини раствора који се користе за прављење стандардне криве.

Очитавање се врши тако што се у једну кивету сипа слепа проба а у друге три филтрат. Прво се слепа проба стави на таласну дужину од 546 нм и скала се подеси на 0. Након тога се очитава интензитет црвене боје-екстинкција узорка. Очитане вредности се упоређују са очитаним вредностима на стандардној криви.

Активност дехидрогеназе се изражава у $\mu\text{g TPF}$ на г земљишта. Поступак је поновљен у пет понављања, у сваком понављању је било по 30 узорака.



Слика 7. Профилтрирани узорци припремљени за читавање

5.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Бројност испитиваних група микроорганизама прерачуната је на 1,0 грам апсолутно сувог земљишта, а бројност је потом логаритмована. Сви подаци обрађени су статистичким програмом StatSoft STATISTIKA 12.0, ANOVA Fisher-овим LSD тестом хомогености варијанси за једнофакторијални оглед са вероватноћом од $p=0,05$.

6. РЕЗУЛТАТИ РАДА И ДИСКУСИЈА

Микроорганизми у целокупној метаболичкој активности земљишта учествују од 60 до 90% (Lee, 1994). Сваки земљишни екосистем има своју карактеристичну микрофлору на коју утичу еколошки услови, биљна врста, начин коришћења и присуство загађивача (Милошевић и сар., 1997, 1999; Тинтор и сар., 2008).

Микроорганизми реагују на промене у земљишту, али се брзо и адаптирају на услове животне средине (Милошевић, 2008). Доминантност појединих група микроорганизама усмерава процесе синтезе, разградње и одређује квалитет земљишта (Higa and Parr, 1994; Милошевић и сар., 2003, 2003a; Милошевић, 2008).

6.1. УТИЦАЈ НАФТНОГ ДЕРИВАТА НА БРОЈНОСТ ИСПИТИВАНИХ ГРУПА МИКРООРГАНИЗАМА

Дизел горива су течна угљоводонична једињења, по фракционом саставу то су гасна уља која садрже до 500 различитих једињења. У дизел горива спадају фракције нафте, од петролеја до лаких уља. Према хемијском саставу то су сложене смеше великог броја различитих угљоводоника са C_8 до C_{26} атома у молекулу, као органских једињења сумпора, азота и кисеоника. Основу дизел горива чине молекули са C_{12} до C_{20} атома, који највећим делом испаравају у границама од 170°C до 350°C (Вуруна и Антоновић, 2005).

Дизел уље је вискозна течност, комплексна смеша и састоји се од око 30% парафина, 45% цикличних алкана и 25% ароматичних једињења (Curl and O'Connell, 1977; Gallego et al., 2001). Густина дизел горива се креће од 0,8 до 0,88 г/цм³ (Вуруна и Антоновић, 2005).

У површинским слојевима тла, гориво може бити адсорбовано на честицама, растворено у води, у гасовитом стању или као слободна течна фаза. Слободна течна фаза се образује само при већим концентрацијама изливања. Од расподеле по фазама земљишта зависи кретање (продирање) горива кроз површинске слојеве земљишта (ЕРА, 1996, 2004; Вуруна и Антоновић, 2005).

Утврђено је да се концентрације дизел горива мењају са временом након изливања у површинским слојевима земљишта (песковито земљиште). Такође је утврђено да се дизел гориво, као потенцијални загађивач, у првих шест недеља, углавном, задржава у површинском слоју дубине до 30 цм (Вуруна и Антоновић, 2005).

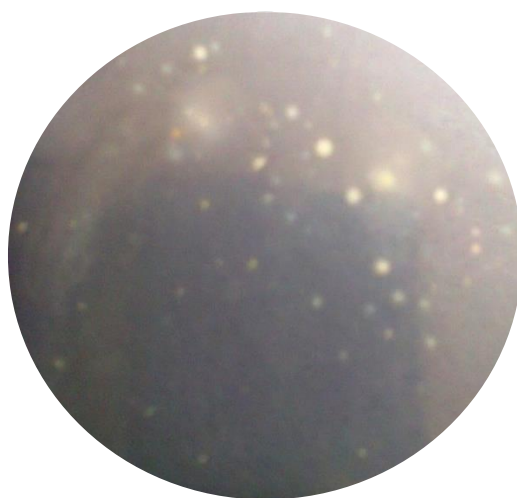
Физичко-хемијска својства различитих типова земљишта по хоризонтима профила значајно утичу на заступљеност микроорганизама. По дубини профила земљишта заступљеност и биодиверзитет микроорганизама се смањује (Милошевић и сар., 2003). Аеробни микроорганизми захтевају соли азота, фосфора, калијума, магнезијума, гвожђа и др. Највећи раст бактерија и гљива оксиданаса угљоводоника запажа се у температурном интервалу од 25–40⁰ Ц. Микроорганизми показују велику прилагодљивост на услове раста. Оптимални *pH* за микробиолошку разградњу се креће између 7 и 8,5. Међутим, промена киселости средине може утицати на промену доминантне врсте микроорганизама па тиме и услова за микробиолошку разградњу (Рончевић, 2007; Угринов и Стојанов, 2010).

1. Утицај дизел горива на укупан број микроорганизама у земљишту

Бактерије су најбројнија и најразноврснија систематска група па се њихов број користи као укупан број микроорганизама. Бројна истраживања су показала да се укупан број бактерија (Слика 8); може користити као показатељ опште биолошке активности

једног земљишта (Милошевић и сар., 2001; Imberger and Chiu, 2002; Радивојевић и сар., 2003; Радивојевић и сар., 2007).

У слоју земљишта до 30 цм дубине, бројност бактерија се креће од 10^8 до 10^9 по граму земљишта (Conklin, 2002; Кастори и сар., 2006). На бројност и активност бактерија у земљишту утичу: количина органске материје, pH вредност земљишта, количина кисеоника, други микроорганизми, биљке и др. Већи број бактерија су разлагачи органске материје, по правилу неутрофилни микроорганизми и већина захтева за свој метаболизам слободан кисеоник (Јарак и Чоло, 2007).



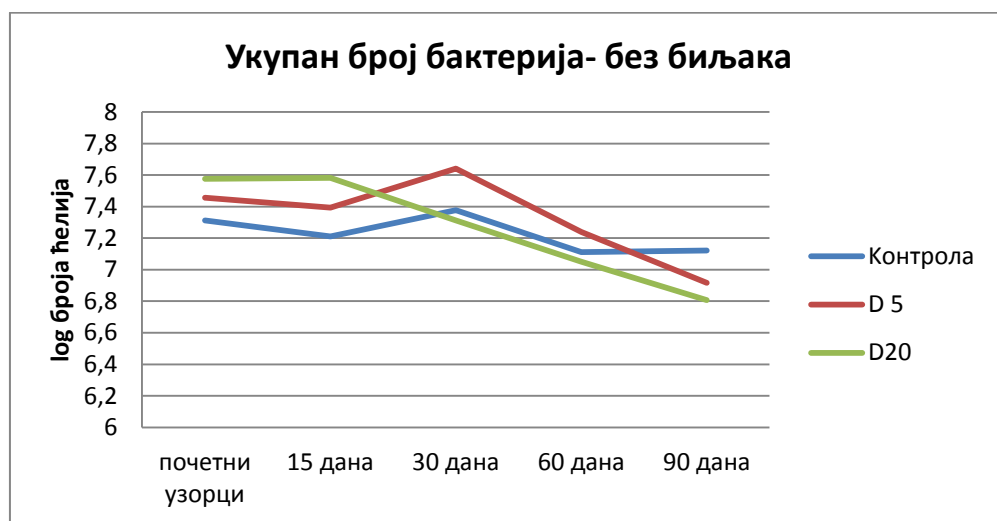
Слика 8. Изглед израслих колонија бактерија на земљишном агару (Фото орг.)

За ефикасну биодеградацију бројност микроорганизама у земљишту не би требало да је мања од 10^3 по граму земљишта. Бројност мања од 10^3 по граму земљишта указује на присуство токсичних концентрација органских или неорганских једињења. У том случају биоремедијација и даље може бити ефикасна ако се земљиште кондиционира у циљу смањивања токсичне концентрације и повећања бројности микроорганизама (ЕРА, 1994).

У овом истраживању укупан број бактерија кретао се од 35,03 до $1177,85 \times 10^5$ ћелија по граму земљишта. У варијанти огледа без биљака укупан број бактерија је највећи након 30 дана, у варијанти у којој је примењено 5 г нафте (D 5), а у варијанти са клоновима

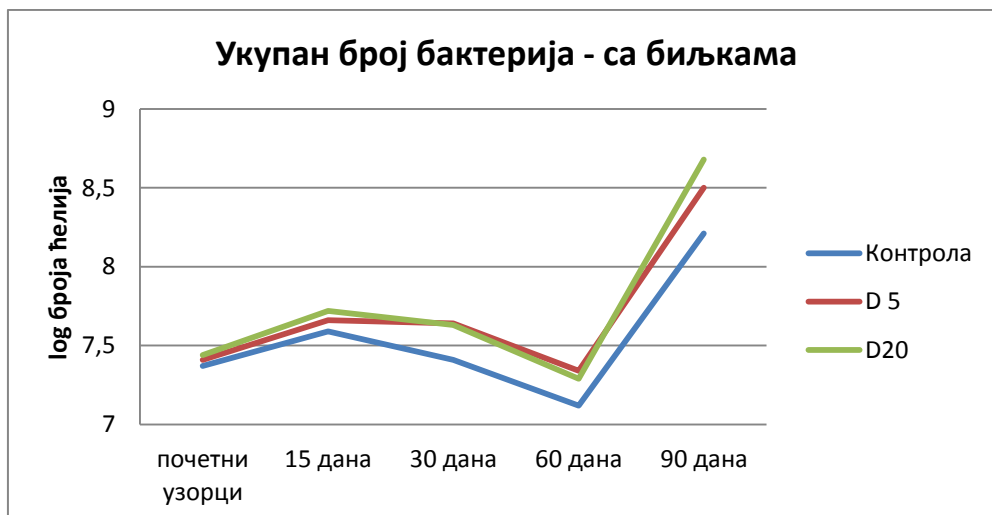
биљке тополе највећа бројност је након 90 дана, у варијанти у којој је примењено 20 г нафте (D 20) .

У варијанти огледа без биљака (Графикон 1) највећа заступљеност укупног броја бактерија у почетном периоду је у варијанти D 20 у односу на варијанту D 5 и контролу, а после 15 дана долази до постепеног смањења бројности. У варијанти D 5 бројност расте након 15 дана и достиже максимум након 30 дана, а после тог периода долази до постепеног смањења бројности. Крива контроле прати криву варијанте D 5 до 60 дана и након 90 дана уочава се да је највећа бројност у контроли, а најмања у варијанти D 20.



Графикон 1: Утицај дизел горива на укупан број бактерија (*log* броја) у варијанти огледа без биљака

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 2) уочава се да је током огледа најмања бројност у контролној варијанти и утврђено је значајно смањење укупног броја бактерија у контроли након 30 и 90 дана. Највећа бројност је након 90 дана у варијанти D 20. Такође је у почетном периоду и након 15 дана највећа бројност у овој варијанти у односу на варијанту D 5 и контролу, али та бројност није статистички значајна. Све три криве имају сличан ток и у свим варијантама се уочава да је најмања бројност након 60 дана, а после тог периода долази до наглог повећања бројности.



Графикон 2: Утицај дизел горива на укупан број бактерија (*log* броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

2. Утицај дизел горива на бројност аминохетеротрофа у земљишту

Аминохетеротрофи (Слика 9) обухватају аеробне, анаеробне, спорогене и аспорогене бактерије, гљиве и актиномицете који учествују у процесима амонификације-разградње и трансформације протеина и других органских азотних једињења у минералне или нове органске форме (Говедарица и Јарак, 1995; Јарак и Говедарица, 2003).

Разноврсност и неспецифичност аминохетеротрофа чине ову групу микроорганизама у земљишту бројном и бројни су у свим типовима земљишта. Број им се креће и до неколико милиона у граму земљишта. Као и већина микробиолошких процеса и амонификација се најбрже одвија у аеробним условима.

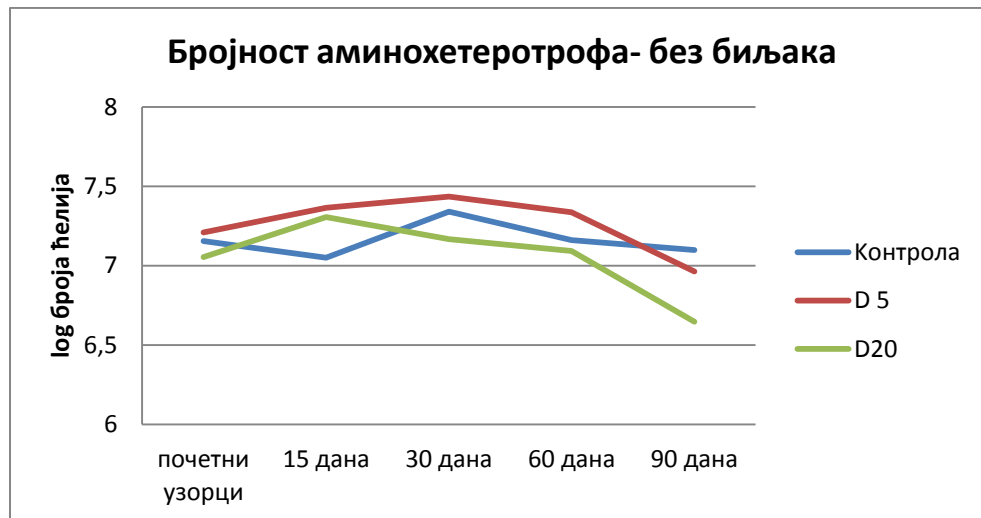
Разлагање протеина у земљишту се непрекидно одвија и у највећој мери зависи од количине, хемијског састава и порекла органске материје, количине азота у земљишту, односа угљеника и азота, удела и врсте глинених минерала и еколошких фактора (Јарак и Чоло, 2007).



Слика 9. Изглед израслих колонија аминохетеротрофа на месопептонском агару (Фото орг.)

Број аминохетеротрофа кретао се од 29,30 до $884,12 \times 10^5$ ћелија по граму земљишта. У варијанти огледа без биљака највећа бројност аминохетеротрофа је након 30 дана, у варијанти D 5, а у варијанти са клоновима биљке тополе највећа бројност је након 90 дана, у варијантама D 5 и D 20.

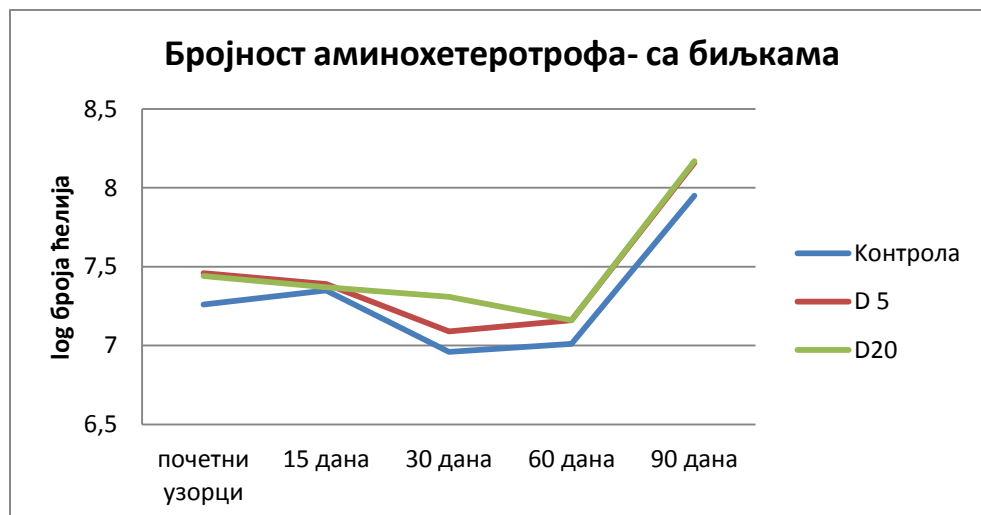
У варијанти огледа без биљака (Графикон 3) у почетном периоду највећа бројност аминохетеротрофа је у варијанти D 5 која расте до 30 дана када достиже максимум. После 30 дана долази до смањења бројности, нарочито после 60 дана. У варијанти D 20, у почетном периоду је најмања бројност у односу на варијанту D 5 и контролу, која расте првих 15 дана, а после 15 дана опада, нарочито после 60 дана. У контролној варијанти је у односу на варијанте D 5 и D 20 најмања бројност након 15 дана, а највећа након 90 дана, док је у варијанти D 20 најмања.



Графикон 3: Утицај дизел горива на бројност аминохетеротрофа (*log* броја) у варијанти огледа без биљака

Биодеградација не почиње одмах након што нафтни загађивач доспе у животну средину, већ је микроорганизмима потребно одређено време (обично 2 до 4 седмице) како би се умножили и прилагодили да користе специфична једињења. Након тога, уочава се нагли пораст микроорганизама који деградују нафту. Њихов удео може прећи и 10% укупне микробиолошке популације (Atlas, 1995).

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 4) уочава се да је од почетка до краја огледа најмања бројност у контролној варијанти са минимумом након 30 дана. Бројност аминохетеротрофа у свим варијантама нагло расте после 60 дана и највећа је након 90 дана. Након 30 дана највећа бројност је у варијанти D 20 у односу на варијанту D 5 и контролу и према статистичкој обради података, ово повећање бројности у варијанти D 20 је значајно, што указује да је аминохетеротрофима било потребно 30 дана како би се прилагодили да користе нафту. Остале разлике између варијанти нису статистички значајне.



Графикон 4: Утицај дизел горива на бројност аминохетеротрофа (*log* броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

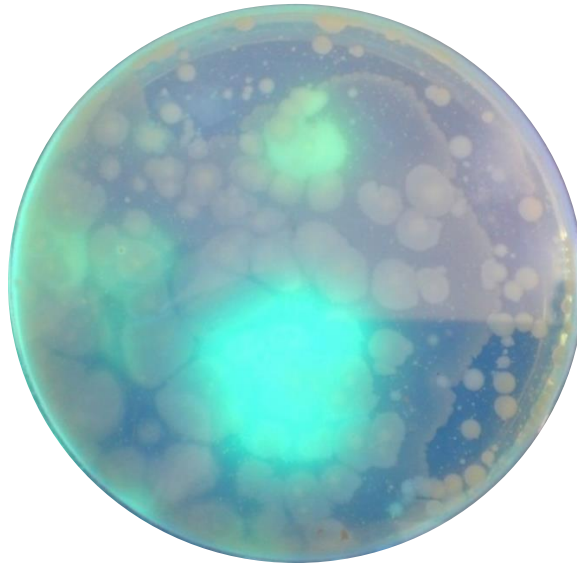
Бактерије које разлажу органска азотна једињења су веома бројне у земљишту и најзаступљенији родови су *Bacillus* и *Micrococcus*, затим *Pseudomonas* (Јарак и Чоло, 2007).

3. Утицај дизел горива на бројност *Pseudomonas* sp. у земљишту

Врсте из рода *Pseudomonas* (Слика 10) су штапићасте грам негативне, аеробне бактерије које стварају плавкаст, зеленкаст или смеђи пигмент. Хемоорганотрофи су и могу да користе различита органска једињења као извор енергије и угљеника: беланчевине, угљене хидрате, масти, хумусне материје итд. (Говедарица и Јарак, 1995).

Неке од врста као што су: *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. putida*, су изоловане да могу разлагати нафту (Oboh et al., 2006; Das and Chandran, 2011; Hamamura et al., 2013; Raed and Shima, 2014).

Pseudomonas (*Pseudomonas aeruginosa*) је једна од најпознатијих бактерија по производњи биосурфактаната рамнолипида (Beal and Betts, 2000; Rahman et al., 2003; Cameotra and Singh, 2008; Das and Chandran, 2011).



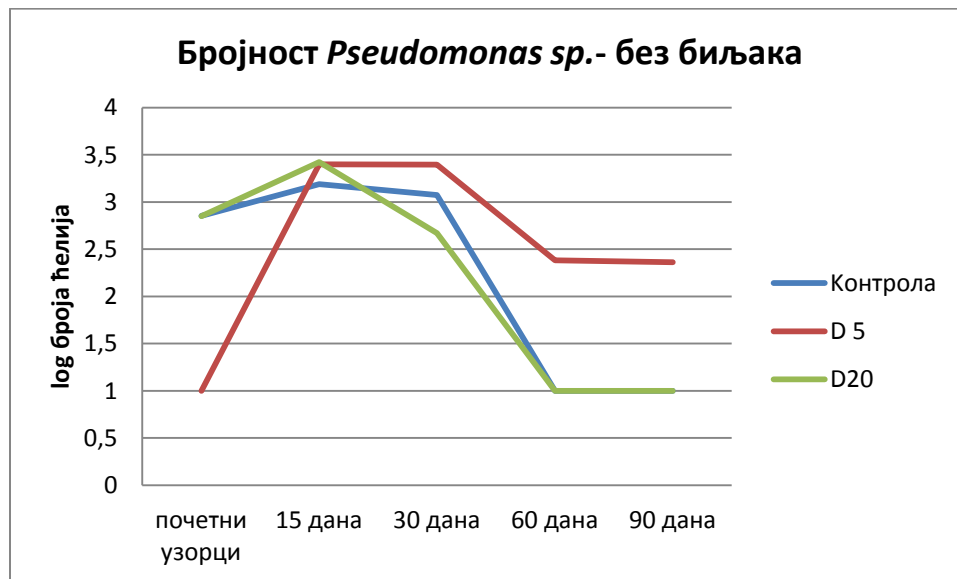
Слика 10. Изглед израслих колонија *Pseudomonas sp.* на *King B* подлози (Фото орг.)

Бројне студије бактеријског диверзитета у загађеним и незагађеним стаништима су показале да у незагађеним екосистемима организми са способношћу деградације петрохемијских угљоводоника, попут припадника рода *Pseudomonas*, чине мање од 0.1% популације бактерија које се могу култивисати, док у контаминираним стаништима псеудомонаде могу чинити и до 100% популације бактерија (Atlas, 1981).

Број бактерија из рода *Pseudomonas sp.* се у овом истраживању кретао од 0,00 до $160,40 \times 10^2$ ћелија по граму земљишта. У варијанти огледа без биљака највећа бројност је након 15 дана у варијантама D 5 и D 20. У варијанти са клоновима биљке тополе такође је највећа бројност након 15 дана, у варијанти D 5.

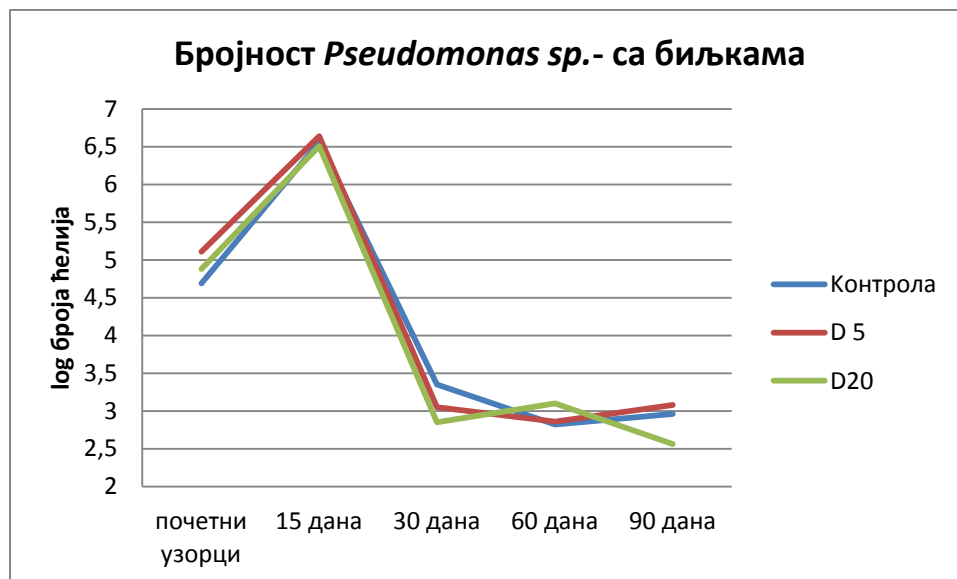
У варијанти огледа без биљака (Графикон 5) уочава се да је у почетном периоду у варијанти D 5 најмања бројност, која нагло расте након 15 дана и не мења се до 30 дана, а затим долази до смањења бројности и после 60 дана бројност остаје иста. У варијанти D 20 бројност је највећа након 15 дана, која се смањује до 60 дана и после остаје иста. У контролној варијанти такође долази до смањења бројности која се после 60 дана не мења, па се смањење бројности може протумачити да је неки други фактор у земљишту утицао на смањење бројности *Pseudomonas sp.* Бактеријама из овог рода је било потребно 15 дана да се прилагоде у варијантама D 5 и D 20 да користе нафту што се може протумачити да је

имало утицаја производња биосурфактаната. Главни фактори за успешну биоремедијацију су: присуство метаболички способне микробиолошке популације, повољни услови за раст микроорганизама и одговарајућа количина хранљивих материја и контаминаната (Vidali, 2001). Нафтни контаминант представља извор угљеника за микроорганизме, па је контаминирано земљиште углавном сиромашно у азоту и фосфору (Бешкоски и сар., 2012).



Графикон 5: Утицај дизел горива на бројност *Pseudomonas sp.* (log броја) у варијанти огледа без биљака

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 6) уочава се да су биљке утицале на то да су мање разлике у бројности између варијанти и највећа бројност *Pseudomonas sp.* је након 15 дана у свим варијантама, а после 15 дана долази до наглог смањења бројности, што указује да је неки други фактор у земљишту утицао на смањење бројности. *Pseudomonas sp.* се такође у присуству биљака прилагодио да користи нафту након 15 дана, као и у варијанти огледа без биљака.

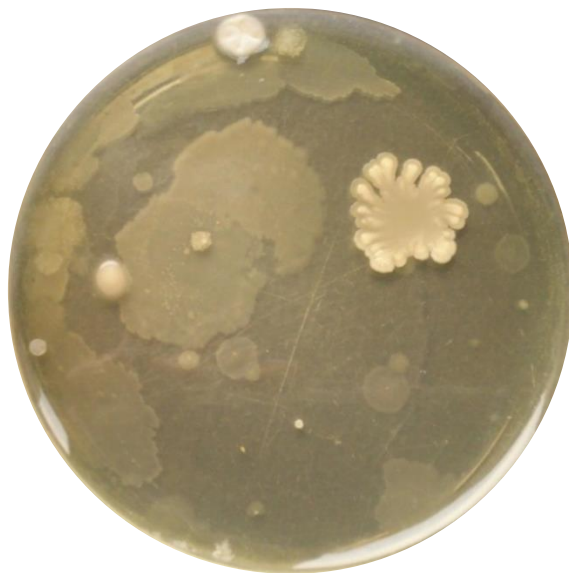


Графикон 6: Утицај дизел горива на бројност *Pseudomonas* sp. (log броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

4. Утицај дизел горива на бројност *Bacillus* sp. у земљишту

Бактерије из рода *Bacillus* (Слика 11) су штапићасте, грам позитивне, аеробне или факултативно анаеробне, способне да формирају ендоспоре. Најзначајније врсте су: *Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. megatorium*, *B. mycoides* и др. (Говедарица и Јарак, 1995).

Познато је да врста *Bacillus subtilis* синтетише биосурфактанте липопептиде као што је сурфактин (Singh et al., 2007; Бешкоски и сар., 2012).

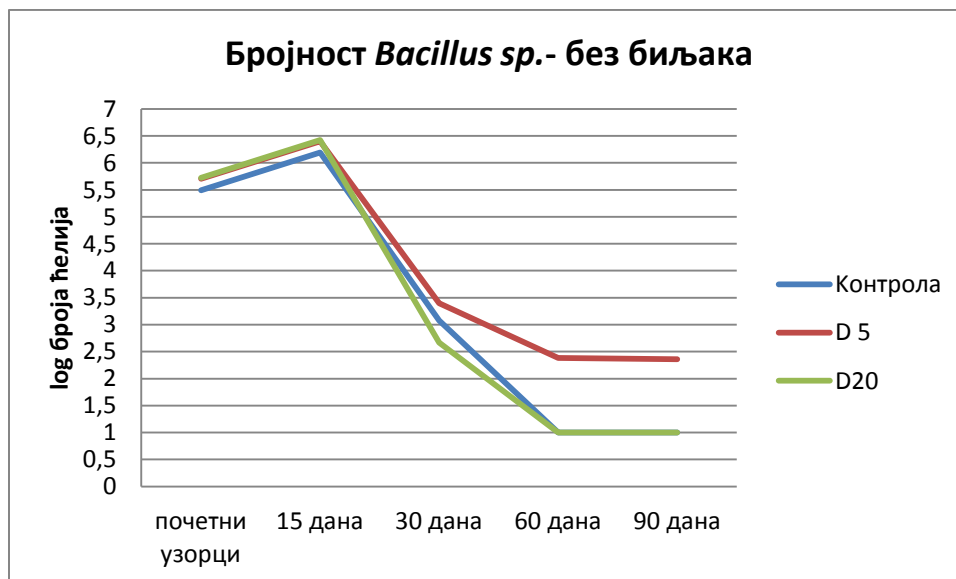


Слика 11. Изглед израслих колонија *Bacillus sp.* на *L*- агару (Фото орг.)

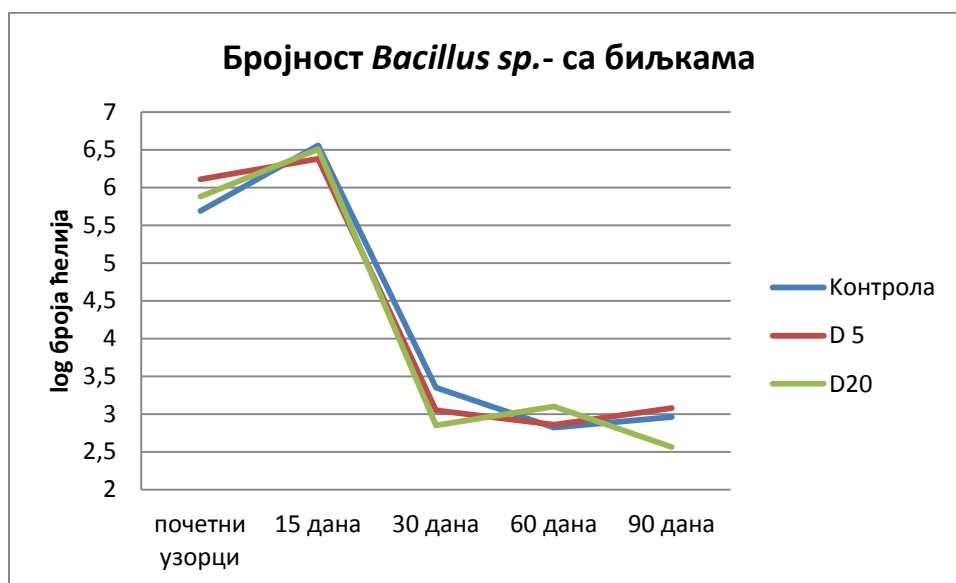
Бројност бактерија овог рода варира од 10^6 ћелија по граму у хладнијим и преко 10^8 ћелија у граму земљишта у топлијим областима (Alexander, 1977). У овом истраживању број се кретао од 0,00 до $878,21 \times 10^4$ ћелија по граму земљишта. У варијанти огледа без биљака највећа бројност *Bacillus sp.* је након 15 дана у варијанти D 20. У варијанти са клоновима биљке тополе највећа бројност је након 15 дана у контроли и у варијанти D 20.

Bacillus sp. је велики потрошач кисеоника и у варијанти огледа без биљака (Графикон 7) у свим варијантама бројност *Bacillus sp.* расте до 15 дана, а затим нагло опада. У почетку и након 15 дана бројност је највећа у варијанти D 20, а најмања у контроли па се може закључити да су се бактерије прилагодиле да користе нафту након 15 дана.

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 8) такође у свим варијантама бројност *Bacillus sp.* расте до 15 дана, а затим опада и уочава се да су криве бројности у варијантама огледа са и без биљака сличне, па се може закључити да је у земљишту најстабилнија бројност *Bacillus sp.*



Графикон 7: Утицај дизел горива на бројност *Bacillus sp.* (*log* броја) у варијанти огледа без биљака



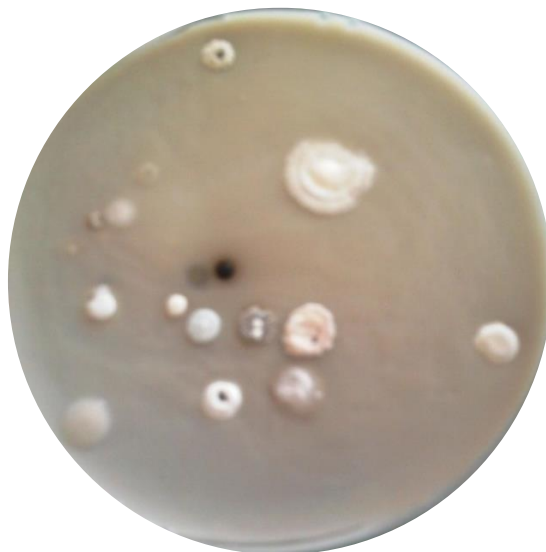
Графикон 8: Утицај дизел горива на бројност *Bacillus sp.* (*log* броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

5. Утицај дизел горива на бројност актиномицета у земљишту

Актиномицете (Слика 12) су специфична група бактерија које имају заједничка својства по којима се разликују од осталих бактерија. Имају кончаст облик ћелије који подсећа на хифу гљива. Колоније су им кожасте и чврсте конзистенције. Слично као и гљиве, формирају супстратни, надсупстратни и ваздушни мицелијум на коме се стварају спороноски са спорама (конидијама) (Јарак и Чоло, 2007). Актиномицете су хетеротрофни микроорганизми, углавном сапрофити и значајне су као учесници у трансформацијама органске материје у земљишту. Способне су да разлажу пектин, лигнин, ксенобиотику, материје које су знатно отпорније на микробиолошку разградњу (Радивојевић и сар., 2007).

Актиномицете по бројности у многим земљиштима су одмах иза правих бактерија (Takisawa et al., 1993). Бројност им се креће 1-10 милиона по граму апсолутно сувог земљишта (Јарак и Говедарица, 2003). Заступљеност актиномицета у плодним земљиштима може да се креће од 10^7 до 10^8 по граму земљишта (Кастори и сар., 2006).

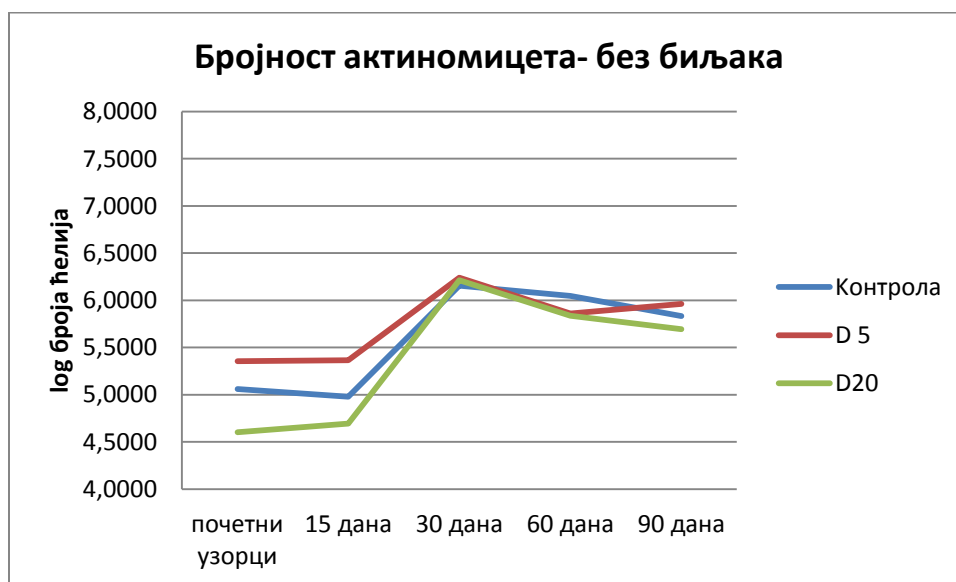
Родови актиномицета који су значајни за земљиште су: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Frankia*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Thermomonospora* и *Thermoactinomyces* (Јарак и Чоло, 2007).



Слика 12. Изглед израслих колонија актиномицета на синтетичком агару (Фото орг.)

Број актиномицета се кретао од 0,00 до $46,89 \times 10^5$ ћелија по граму земљишта. У варијанти огледа без биљака највећа бројност је након 30 дана у варијантама D 5 и D 20. У варијанти са клоновима биљке тополе највећа бројност је након 90 дана, у варијанти D 20.

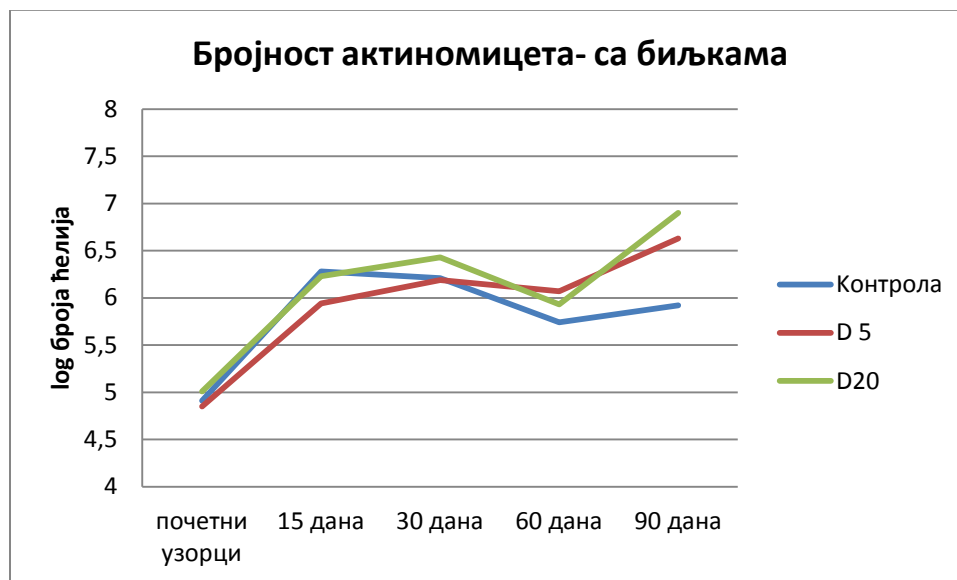
У варијанти огледа без биљака (Графикон 9) све три криве имају сличан ток и после 15 дана бројност актиномицета расте и највећа је након 30 дана у свим варијантама. До краја огледа бројност се незнатно смањује и након 90 дана највећа бројност је у варијанти D 5, а најмања у варијанти D 20.



Графикон 9: Утицај дизел горива на бројност актиномицета (*log* броја) у варијанти огледа без биљака

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 10) у свим варијантама бројност актиномицета расте до 15 дана, а након 30 дана утврђено је значајно повећање бројности у варијанти D 20 у односу на варијанту D 5 и контролу, што указује да су се актиномицете адаптирале да користе нафту. Након 60 дана, у свим варијантама се смањила бројност при чему је у контролној варијанти најмања бројност. Утврђено је значајно варирање у бројности између варијанти. Након 90 дана, у свим варијантама се повећала бројност и постоји статистички значајна разлика у бројности актиномицета између контроле и

варијаната у којима је примењена нафта, што се може протумачити да је нафта позитивно утицала на бројност актиномицета.



Графикон 10: Утицај дизел горива на бројност актиномицета (*log* броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

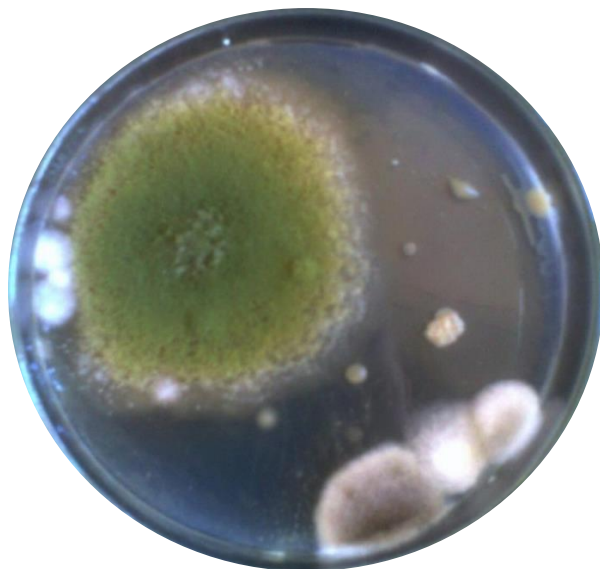
6. Утицај дизел горива на бројност гљива у земљишту

Гљиве су хетеротрофни ацидофилни микроорганизми, бројне су у земљиштима са великом количином органске материје. Аероби су, па су бројније у површинским слојевима земљишта (Јарак и Чоло, 2007). Влажност је веома важан фактор за развој велике већине гљива, јер се оне на сувим супстратима не развијају (Говедарица и Јарак, 1995).

Заступљеност гљива се креће од 10^5 до 10^6 по граму земљишта (Кастори и сар., 2006). Гљиве учествују у бројним биохемијским процесима, а посебно је значајна њихова улога у разградњи сложених органских молекула, као што је лигнин, и угљоводоничних прстенастих једињења у загађивачима. Разлагачи су сапрофитне гљиве које трансформишу мртву органску материју у биомасу својих ћелија, угљен-диоксид, органске киселине и др.

Као и бактерије ова група гљива значајна је за имобилизацију и чување хранива у земљишту.

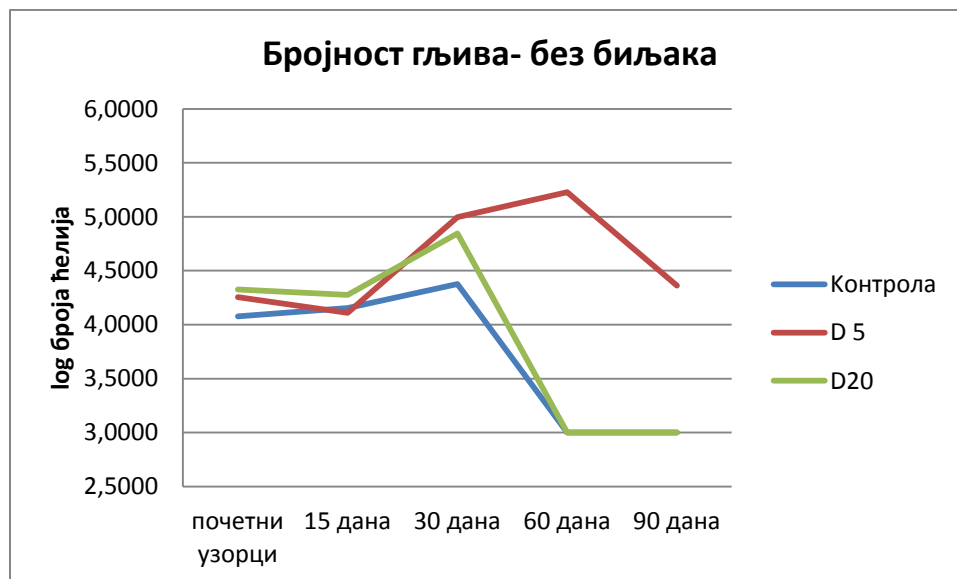
Најбројније гљиве разлагачи у земљишту су *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pleurotus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus* и др. (Јарак и Чоло, 2007).



Слика 13. Изглед израслих колонија гљива на Чапековом агару (Фото орг.)

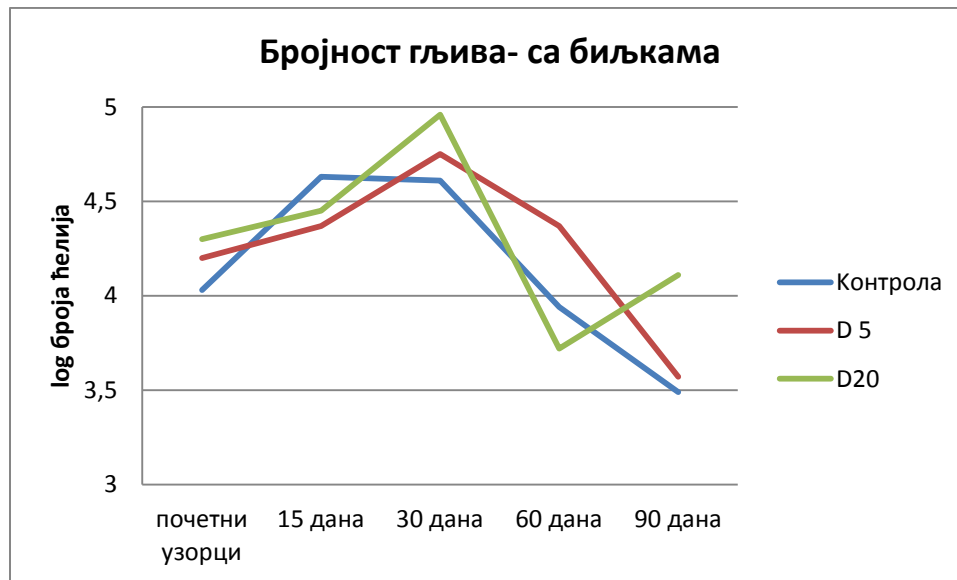
Укупан број гљива кретао се од 0,00 до $23,86 \times 10^4$ ћелија по граму земљишта. У варијанти огледа без биљака највећа бројност гљива је након 60 дана, у варијанти D 5. У варијанти са клоновима биљке тополе највећа бројност је након 30 дана, у варијанти D 20.

У варијанти огледа без биљака (Графикон 11) у почетном периоду највећа бројност гљива је у варијанти D 20, која расте после 15 дана, а затим после 30 дана нагло опада. У контролној варијанти на почетку огледа је најмања бројност у односу на варијанте D 5 и D 20, која расте до 30 дана, а после опада. Након 30 дана највећа бројност је у варијанти D 5 и након 60 дана достиже максимум, а затим опада.



Графикон 11: Утицај дизел горива на бројност гљива (*log* броја) у варијанти огледа без биљака

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 12) у почетном периоду највећа бројност гљива је у варијанти D 20 која расте и достиже максимум након 30 дана, а затим нагло опада. Након 90 дана, највећа бројност је у варијанти D 20. У контролној варијанти на почетку огледа је најмања бројност, а након 15 дана је највећа у односу на варијанте D 5 и D 20.. Након 90 дана, најмања бројност је у контроли. Крива варијанте D 5 прати криву варијанте D 20 до 30 дана, а затим бројност опада. Према статистичкој обради података не постоје значајне разлике у укупном броју гљива између варијанти D 5, D 20 и контроле.



Графикон 12: Утицај дизел горива на бројност гљива ($\log$ броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

7. Утицај дизел горива на бројност *Azotobacter* sp. у земљишту

Род *Azotobacter* је највише испитиван од свих слободних азотофиксатора и један је од најзначајнијих родова из ове групе микроорганизама. *Azotobacter* sp. је један од важних показатеља азотног биланса земљишта (Тинтор и сар., 2008).

Бактерије из рода *Azotobacter* (Слика 14) су аеробне, живе као слободне форме у земљишту, у ризосфери или на површини корена биљака и не изазивају морфолошке промене на корену (Радивојевић и сар., 2007). Ћелија им је обавијена капсулом која је обично већа од величине саме ћелије. Размножавају се деобом при чему добијају карактеристичан облик броја осам (Јарак и Чоло, 2007).

Угљеник и енергију добијају из органских једињења. Највећу активност имају у неутралним земљиштима и осетљиве су на киселу реакцију средине. Бројност овог рода се креће од неколико хиљада до неколико стотина хиљада по граму земљишта и бројнији је у нешто влажнијем земљишту. Род *Azotobacter* има способност да редукује елементарни азот из атмосфере прво до амонијака кога биљке најлакше усвајају, а затим га преводи до органског облика. Пошто захтева услове који одговарају већини биљака, *Azotobacter* се

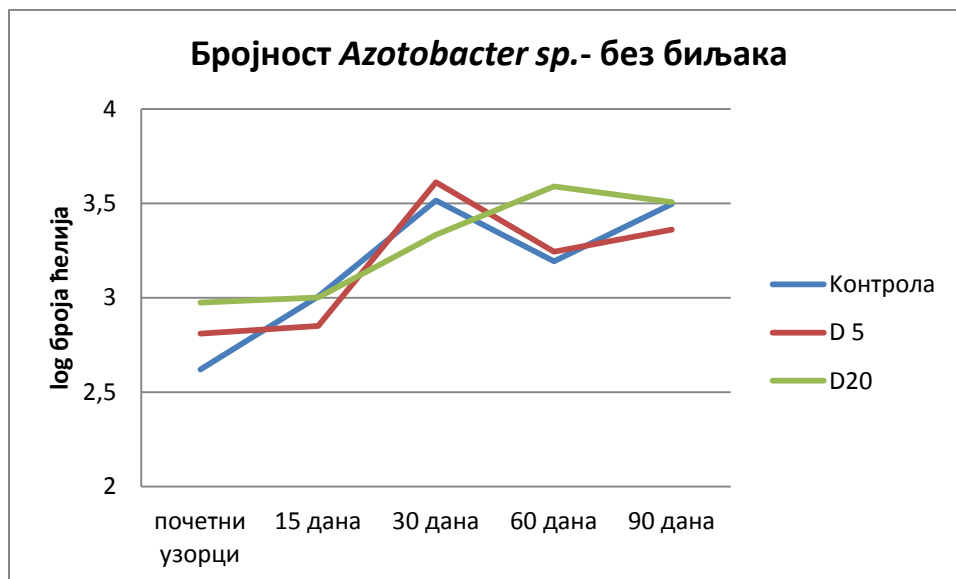
користи као показатељ плодности земљишта (Говедарица и Јарак, 1995; Милошевић и сар., 2001; Јарак и Чоло, 2007).



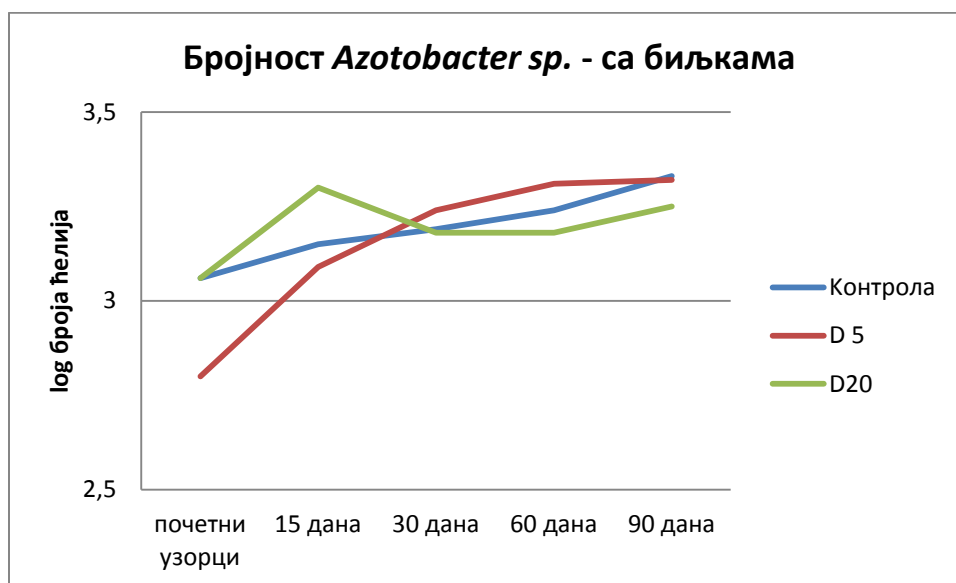
Слика 14. Изглед израслих колонија *Azotobacter sp.* на Фјодоровој подлози (Фото орг.)

Број *Azotobacter sp.* се кретао од 29,47 до $526,38 \times 10^1$ ћелија по граму земљишта. *Azotobacter* је добар индикатор опште биогености земљишта (Милошевић и сар., 1997; 2000; 2003). У варијанти огледа без биљака (Графикон 13) у почетном периоду највећа бројност *Azotobacter sp.* је у варијанти D 20, а након 30 дана највећа бројност је у варијанти D 5. После 30 дана бројност у контроли и у варијанти D 5 опада, док у варијанти D 20 расте.

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 14) уочава се да је у почетном периоду највећа бројност у варијанти D 20 и да је бројност *Azotobacter sp.* у варијантама током времена уједначенија, посебно после 30 дана. Према статистичкој обради података не постоје значајне разлике између варијанти.



Графикон 13: Утицај дизел горива на бројност *Azotobacter sp.* ($\log$ броја) у варијанти огледа без биљака



Графикон 14: Утицај дизел горива на бројност *Azotobacter sp.* ($\log$ броја) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

6.2. УТИЦАЈ НАФТНОГ ДЕРИВАТА НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА ДЕХИДРОГЕНАЗЕ

Одређивање дехидрогеназне активности земљишта може бити коришћено као једноставан метод за испитивање могућих инхибиторних ефеката контаминанта на микробиолошку активност земљишта (Bartha, 1986).

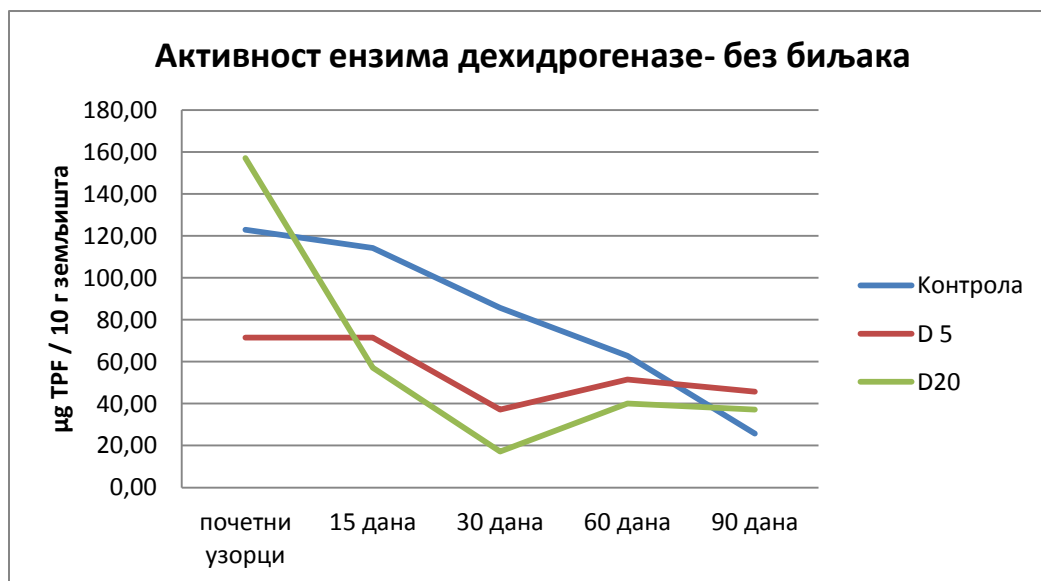
Ензими учествују у свим процесима кружења материје и енергије, стварања и одржавања плодности земљишта. Ензими се у земљишту налазе као екстрацелуларни-слободни или везани за минерале глине и хумусне колоиде, и интрацелуларни. Могу бити удружени са различитим биотичким и абиотичким компонентама (са ћелијама микроорганизама, кореном биљака) (Haziev and Gulko, 1991).

Активност слободних ензима у земљишном раствору је незнатна јер се брзо инактивирају услед денатурације, хидролизе или везивања за земљишне конституенте или колоиде (Rojo et al., 1990). Активност ензима осликава интензитет процеса који се одвијају у земљишту и зато се користе као показатељи опште биогености и плодности земљишта (Carbonelli et al., 2000; Benitez et al., 2004; Радивојевић и сар., 2007).

Разградњу органске материје у земљишту, која је у основи оксидо-редукциони процес, каталишу ензими дехидрогеназе и у земљишту су најчешће микробиолошког порекла. Дехидрогеназе су ензими који катализују реакцију одвајања водоника од различитих органских једињења и његово преношење до кисеоника (аеробне дехидрогеназе) или до органских једињења (анаеробне дехидрогеназе). Дехидрогеназе су конститутивни ензими свих микроорганизама па се на основу дехидрогеназне активности може проценити општа микробиолошка активност земљишта (Јарак и Ђурић, 2006).

Активност ензима дехидрогеназе зависи од укупне физиолошке активности микроорганизама, при чему већа активност дехидрогеназе указује на већи интензитет дисања односно минерализације органске материје у земљишту (Tabatabai, 1982; Benitez et al., 2004). У овом истраживању присуство биљака је имало позитиван утицај на активност ензима дехидрогеназе у варијантама у којима је примењена нафта.

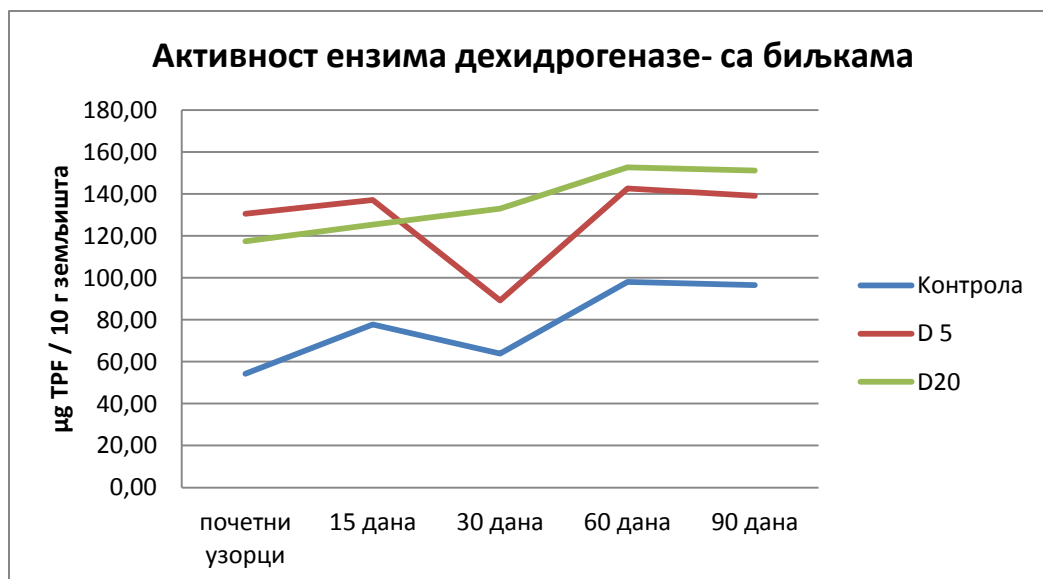
У варијанти огледа без биљака (Графикон 15) у почетку је дехидрогеназна активност највећа у варијанти D 20, која затим нагло опада и у овој варијанти је током огледа до 90 дана најмања активност, у односу на контролу и варијанту D 5. Након 15 дана и све до 90 дана је у контролној варијанти највећа активност ензима што указује да је нафта инхибиторно деловала, посебно у варијанти D20. Дехидрогеназна активност микроорганизама један је од најосетљивијих параметара за праћење токсичности земљишта (Кастори и сар., 2006). Крива контроле током времена има опадајући карактер, што се може објаснити недостатком супстрата за дисање, а варијанте D 5 и D 20 након 15 дана до краја огледа имају сличан ток, и најмање вредности су у обе варијанте забележене након 30 дана. Након 90 дана најмања активност дехидрогеназе је у контроли, а највећа у варијанти D 5.



Графикон 15: Утицај дизел горива на активност ензима дехидрогеназе ($\mu\text{g TPF} / 10 \text{ g}$ апсолутно сувог земљишта) у варијанти огледа без биљака

У варијанти са клоновима биљке тополе (Графикон 16) од почетка до краја огледа дехидрогеназна активност је најмања у контролној варијанти што указује да је у присуству биљака већи интензитет минерализације угљоводоника нафте. У почетном периоду и

након 15 дана највећа активност дехидрогеназе је у варијанти D 5 и постоји статистички значајна разлика у активности између контроле и варијаната D 5 и D 20. Након 30 дана, активност дехидрогеназе је највећа у варијанти D 20 и овај пораст активности је статистички значајан у односу на варијанту D 5 и контролу. До краја огледа активност је највећа у овој варијанти. У варијанти D 5 активност дехидрогеназе опада након 30 дана, па криве контроле и варијанте D 5 имају сличан ток. Након 60 дана утврђено је статистички значајно варирање у активности ензима између варијанти. На крају огледа не постоје статистички значајне разлике између варијаната.



Графикон 16: Утицај дизел горива на активност ензима дехидрогеназе ($\mu\text{g TPF} / 10 \text{ g}$ апсолутно сувог земљишта) у варијанти огледа са клоновима биљке тополе

7. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата истраживања могу се извести следећи закључци:

- Код укупног броја бактерија и аминохетеротрофа у варијанти огледа са клоновима биљке тополе од почетка до краја огледа најмања је бројност у контролној варијанти, а највеће вредности су забележене у варијанти у којој је примењено 20 г нафте.
- Према статистичкој обради података, код укупног броја бактерија, аминохетеротрофа и актиномицета, након 30 дана огледа су утврђене значајне разлике у бројности и то: код укупног броја бактерија значајно смањење бројности у контроли у односу на варијанте у којима је примењена нафта, и код аминохетеротрофа и актиномицета, је утврђено значајно повећање бројности у варијанти у којој је примењено 20 г нафте.

Из овога се може закључити да су биодеградабилна једињења нафте била разложена, након почетне резистентности, услед аклиматизације ових група микроорганизама.

- Утврђене су затим и након 60 дана статистичке значајне разлике у бројности актиномицета између варијанти, а у контроли је забележена најмања вредност. Након 90 дана, код укупног броја бактерија и актиномицета постоји значајно смањење бројности у контроли у односу на варијанте у којима је примењена нафта.
- Бактерије из рода *Pseudomonas* су се и у варијанти огледа без и са биљкама тополе, прилагодиле да користе нафту након 15 дана при чему је присуство биљака утицало на то да су мање разлике у бројности током огледа између варијанти. Ово брзо прилагођавање

Pseudomonas врста може се протумачити да је захваљујући производњи биосурфактаната, рамнолипида.

- Бактерије из рода *Bacillus* су се такође прилагодиле да користе нафту након 15 дана, што се такође може објаснити синтезом биосурфактаната, јер је познато да једна од најзначајнијих врста овог рода, *Bacillus subtilis*, синтетише биосурфактанте липопептиде као што је сурфактин. У овом истраживању, бројност *Bacillus* врста се показала као најстабилнија у земљишту.
- Код укупног броја гљива, највећа бројност је била након 30 дана у варијанти у којој је примењено 20 г нафте, али ово повећање бројности није статистички значајно.
- *Azotobacter sp.* је добар индикатор опште биогености земљишта и у почетном периоду огледа највећа бројност је била у варијанти са 20 г нафте, али не постоје статистички значајне разлике у бројности између варијанти. Присуство биљака је утицало да је бројност у варијантама током времена уједначенија.
- Када је у питању активност ензима дехидрогеназе, може се закључити следеће: у варијанти огледа без биљака, на почетку огледа, највећа активност ензима је у варијанти са 20 г нафте, а након 15 дана и све до 90 дана, у овој варијанти је најмања активност, док је у контролној варијанти највећа, што значи да је нафта инхибиторно деловала на активност дехидрогеназе. У варијанти огледа са биљкама тополе, од почетка до краја огледа, активност ензима је најмања у контроли, па се може закључити да је присуство биљака имало позитиван утицај на дехидрогеназну активност у варијантама у којима је примењена нафта. Након 30 дана забележена је највећа активност у варијанти са 20 г нафте и овај пораст активности је статистички значајан у односу на варијанту са 5 г нафте и контролу што потврђује да су се микроорганизми након 30 дана прилагодили да користе нафту. До краја огледа је у D 20 варијанти највећа активност ензима.

Из свега горе наведеног може се закључити да: пошто аминокхетеротрофи обухватају велику групу бактерија, гљива и актиномицета, у овом истраживању су најбољи биоремедијациони потенцијал показале бактерије и актиномицете.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Alexander, M. (1977.) : Introduction to Soil Microbiology, John Wiley and Sons, New York.
- Alexander, M. (1999): Biodegradation and Bioremediation. 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- Alexander, M. (2000): Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34. 4259–4265
- Atlas R. M. (1981): Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiological Reviews Vol. 45, No. 1.* 180-209
- Atlas R. M. (1991): Microbial hydrocarbon degradation- Bioremediation of oil spills. *Journal Chem. Tech. Biotechnol.* 52. 149-156
- Atlas, R. M. (1995): Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* 31. 178-186
- Авдаловић, Ј. (2015): Настанак земљишта у процесима биоремедијације. Докторска дисертација. Универзитет у Београду, Хемијски факултет. Београд.
- Baker, J. M. (1970): The effects of oils on plants. *Environ. Pollut.* (1). 27-44
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. (1998): Bioremediation of oil contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32. 155–164

- Bamforth, S.M., Singleton, I. (2005): Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80. 723–736
- Bartha, R. (1986): Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology* 12. 155-172
- Бешкоски, В., Гојгић-Цвијовић, Г., Милић, Ј., Илић, М., Милетић, С., Јованчићевић, Б., Врвић, М. (2012): Биоремедијација земљишта контаминираног нафтом и нафтним дериватима: микроорганизми, путање разградње, технологије (прегледни рад). Хемијска индустрија. Београд. 275-289
- Бобић, В. (2005): Онечишћење тла нафтним угљиководцима- биообнова: могућности, учинковитост, искуства (стручни рад). *Горива и мазива*, 44. INA d.d. Загреб. 9-34
- Boopathy, R. (2000): Factors limiting bioremediation technologies, *Bioresour. Technol.* 74. 63–67
- Bosma, T.N.P., Middelorp, P.J.M., Schraa, G., Zehnder, A.J.B. (1997): Mass transfer limitations of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environmental Science and Technology* 31. 248–252
- Cerniglia, C. E. (1992): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3. 351-368
- Cerniglia, C. E. (1997): Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 9 (5-6).
- Das, N., Chandran, P. (2011): Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International* 2011. 1-13
- Димкић, М., Здравковић, Ђ., Дамјановић, М., Раденковић, З. (1999). Упути за утврђивање интензитета сорбирања минералних уља на песковитом материјалу Макишке издани. Међународна конференција: "Вода за 21. век". Институт за водопривреду "Јарослав Черни", Београд.
- Ђокић, М., Биланцић, Н., Бришки, Ф. (2012): Поступци уклањања пестицида из околиша. Хемијска индустрија. Загреб. 341-348
- Đukić, D., Mandić, L. (2000): Microorganisms and Technogenic Pollution of Agroecosystem (review paper). *Acta Agriculturae Serbica*, Vol. V, 10; Faculty of Agronomy. Cacak. 25-46
- Ekpo, M. A., Ebeagwu, C. J. (2009): The effect of crude oil on microorganisms and dry matter of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*). *Scientific Research and Essay* Vol. 4. 733-739

- EPA (1984): Impact of high chemical contaminant concentrations on terrestrial and aquatic ecosystems: A state-of-the-art Review, U.S. Environmental Protection Agency.
- EPA (1994): How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites. A Guide for Corrective Action Plan Reviewers, U.S. Environmental Protection Agency.
- Fantroussi, S. I., Agathos, S. N. (2005): Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* 8. 268–275
- Fritsche, W., Hofrichter, M. (2000): Aerobic degradation by microorganisms. In: Klein, J. (Ed.), *Environmental Processes-Soil Decontamination*, Wiley-VCH, Weinheim. 146-155
- Gallego, J. L. R., Loredó, J., Llamas, J. F., Vázquez, F., Sánchez, J. (2001): Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* 12. 325-335
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., Basri, M. (2004): Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54. 61-67
- Говедарица, М., Јарак, М. (1995): Општа микробиологија. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет. Институт за ратарство и повртарство. Нови Сад.
- Hamamura, N., Ward, D. M., Inskeep, W. P. (2013): Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85. 168-178
- Haziev, F. H., Gulko, J. M. (1991): Fermentativnaja aktivnost počv agrocenozov i perspektivi ee izučenija. *Počvovedenie*, 8. 88-103
- Hinchee, E. R., Kitte, H. J. (1995): Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons. Columbus (OH). Battelle Press.
- Jain, P. K., Bajpai, V. (2012): Biotechnology of bioremediation- a review. *International Journal of Environmental Sciences Volume 3, No 1.* 535-549
- Јарак, М., Говедарица, М. (2003): Микробиологија. Пољопривредни факултет, Нови Сад.
- Јарак, М., Ђурић, С., Милошевић, Н., Милић, В., Мрковачки, Н., Маринковић, Ј. (2005): Микробиолошка активност – показатељ плодности и деградације земљишта (оригинални рад). *Економика пољопривреде*, 4., Друштво аграрних економиста Србије и Црне Горе, Савез

пољопривредних инжењера и техничара Југославије, Институт за економику пољопривреде Београд. Београд. 483-493

- Јарак, М., Ђурић, С. (2006): Практикум из микробиологије. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет. Нови Сад.
- Јарак, М., Чоло, Ј. (2007): Микробиологија земљишта. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет. Нови Сад.
- Јарак, М., Ђурић, С. (2008): Микроорганизми у земљишту у функцији одрживе пољопривреде. *Ћубрење у одрживој пољопривреди (Маја Манојловић)*. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет. Нови Сад. 98-117
- Karamanev, D. G. (1999): Biodegradation of soil contaminants. *Journal of Scientific & Industrial Research Vol. 58*. 764-772
- Кастори, Р., Kádár, I., Секулић, П., Богдановић, Д., Милошевић, Н., Пуцаревић, М. (2006): Узорковање земљишта и биљака незагађених и загађених станишта. Научни институт за ратарство и повртарство. Нови Сад.
- Лалевић, Б., Раичевић, В., Дабић, Д., Јовановић, Љ., Киковић, Д., Антић-Младеновић, С. (2007): Микробни диверзитет земљишта загађених органским једињењима пореклом из нафтне индустрије (оригинални научни рад). *Заштита материјала* 48, број 1. 37-40
- Lawson, I.YD., Nartey, E. K., Darko, D. A., Okrah, V. A., Tsatsu, D. (2012): Microbial degradation potential of some Ghanaian soils contaminated with diesel oil. *Agriculture and biology journal of North America* 3. 1-5
- Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54 (3). 305-315
- Macek, T., Macková, M., Káš, J. (2000): Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18(1). 23-34
- Macleod, C.J.A., Morriss, A.W.J., Semple, K.T., (2001): The role of microorganisms in ecological risk assessment of hydrophobic organic contaminants (HOCs) in soils. *Advances in Applied Microbiology* 48. 171–212

- Максимовић, Л., Милошевић, Н., Нешић, Љ., Зеремски, Т., Васин, Ј., Нинков, Ј., Граховац, Н. (2012): Загађеност земљишта Јужнобачког округа опасним и штетним материјама (прегледни чланак). *Ратар. Поврт.* 49, Институт за ратарство и повртарство. Нови Сад. 220-228
- Малетић, С. (2010): Карактеризација биодеградабилности нафтних угљоводоника у земљишту и биоремедијационих процеса у току третмана биогомилама и површинском обрадом. Докторска дисертација. Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет. Нови Сад.
- Маринковић, Ј., Милошевић, Н., Тинтор, Б., Васин, Ј. (2007): Заступљеност појединих група микроорганизама на различитим типовима земљишта (оригинални научни рад). *Зборник радова, Свеска 43*, Институт за ратарство и повртарство. Нови Сад. 319-327
- Милетић, С. (2013): Испитивање загађених станишта као извора микроорганизама за биоремедијацију. Докторска дисертација. Универзитет у Београду, Хемијски факултет. Београд.
- Милић, Ј., Гојгић-Џвијовић, Г., Илић, М., Шолевић, Т., Бешкоски, В., Јованчићевић, Б., Миловић, А., Врвић, М. (2007): Биоремедијациони потенцијал контаминираног земљишта. Центар за хемију-ИНТМ Београд, Хемијски факултет Београд.
- Milić, J. S., Beškoski, V. P., Ilić, M. V., Ali, S. A. M., Gojgić-Cvijović, G. Đ., Vrvic, M. M. (2009): Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium (original scientific paper). *Journal of the Serbian Chemical Society* 74 (4). 455-460
- Милошевић, Н., Говедарица, М., Секулић, П. (2003): Микробиолошка својства земљишта под поврћем на локалитету Бачко Градиште. *Зборник радова, Свеска 39*, Научни институт за ратарство и повртарство. Нови Сад. 101-107
- Милошевић, Н., Тинтор, Б., Ралев, Ј., Џвијановић, Г. (2006): Микробиолошка својства ритске црнице и депосла на локалитету Мокрин. *Зборник радова; Еколошка истина, Еко Ist'06*, Технички факултет у Бору- Универзитета у Београду. 285-289
- Милошевић, Н., Џвијановић, Г., Тинтор, Б. (2007): Микроорганизми као индикатори екотоксичности земљишта. *Зборник радова; Еколошка истина, Еко Ist'07*, Технички факултет у Бору- Универзитета у Београду. 247-251
- Милошевић, Н., Секулић, П., Тинтор, Б., Џвијановић, Г. (2008): Мониторинг здравља/квалитета земљишта у близини индустријских зона Војводине. *Зборник радова; Еколошка истина, Еко Ist'08*, Технички факултет у Бору- Универзитета у Београду. 276-280

- Милошевић, Н. (2008): Микроорганизми-биоиндикатори здравља/квалитета земљишта (прегледни рад). *Зборник радова, Свеска 45*, Институт за ратарство и повртарство. Нови Сад. 205-215
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., Lal, B. (2001): *In situ* bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium, *Curr. Microbiol.* 43. 328–335
- Moore, M. J., Klose, S., Tabatabai, M. A. (2000): Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. *Biol. Fertil. Soils*, 31. 200-210
- Mrozik, A., Piotrowska–Seget, Z., Labuzek, S. (2003): Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies Vol. 12.* 15–25
- Наранчић, Т. (2012): Метаболичка разноврсност бактерија изолованих из површинског речног седимента под утицајем петрохемијских ефлуената: *Pseudomonas* sp. TN301 као произвођач полихидроксиалканоата. Докторска дисертација. Универзитет у Београду, Биолошки факултет. Београд.
- Нешић, Љ., Белић, М., Ћирић, В. (2011): Одрживо коришћење и заштита земљишта Војводине. *Зборник радова Првог научног скупа "Заштита животне средине"*, Универзитет Educons, Факултет заштите животне средине, Сремска Каменица. 36-41
- Новаковић, М. (2013): Утицај биоремедијационих услова на биодеградацију засићених и ароматичних угљоводоника у загађивачима нафтног типа. Докторска дисертација. Универзитет у Београду, Хемијски факултет. Београд.
- Oboh, B. O., Ilori, M. O., Akinyemi, J. O., Adebuseye, S. A. (2006): Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from a Nigerian bitumen deposit. *Nature and Science*, 4(3). 51-57
- Pignatello, J. J., Xing, B. (1995): Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology* 30. 1-11
- Pritchard, P.H., Bourquin, A.W. (1984): The use of microcosms for evaluation of interactions between pollutants and microorganisms. *Advances in Microbial Ecology* 7.
- Радивојевић, Љ., Шантрић, Љ., Станковић-Калезић, Р. (2007): Пестициди у земљишту: деловање на микроорганизме (прегледни рад). Институт за пестициде и заштиту животне средине. Београд. 11-24

- Радивојевић, Љ., Шантрић, Љ., Јарак, М., Ђорђевић, С., Ђурић, С. (2007): Утицај хербицида на микроорганизме у земљишту. *Зборник резимеа радова*, Друштво за заштиту биља Србије. Београд.
- Raed, S. Al-Wasify, Shima, R. H. (2014): Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *International Journal of Bacteriology*. 1-8
- Раичевић, В., Лалевић, Б., Дабић, Д., Киковић, Д., Јовановић, Љ., Никшић, М. (2007): Микроорганизми у биоремедијацији земљишта и вода (стручни рад). *Заштита материјала*, 48, број 2. 49-52
- Расулић, Г. (2007): Нафта и животна средина – заштита, загађивање и ремедијација. Нафтна индустрија Србије, Панчево.
- Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T. (2000a): Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments – a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution* 108. 103–112
- Rittman, B., McCarty, P. (2000): *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, McGraw-Hill, New York.
- Рончевић, С. (2007): Карактеризација биоремедијационих процеса у земљишту и подземним водама загађеним нафтом и дериватима на локалитету Ратно острво. Докторска дисертација. Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет. Нови Сад.
- Semple, K. T., Morris, A. W. J., Paton, G. I. (2003): Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science Volume* 54. 809-818
- Singer, M. E., Finnerty, W.R. (1984) in: *Petroleum Microbiology* R.M. Atlas, Ed., Macmillan Publishing Company, New York.
- Singh, A., Ward, O. P. (2004): Biotechnology and Bioremediation – An Overview. *Soil Biology, Volume 2*, Biodegradation and bioremediation (ed. by. A. Singh and O. P.Ward), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sonawdekar, S. (2012): Bioremediation: A boon to hydrocarbon degradation. *International Journal of Environmental Sciences Volume* 2. 2408-2424

- Тинтор, Б., Милошевић, Н., Нешић, Љ., Јарак, М., Јокановић, С. (2007): Заступљеност Азотобактера у земљиштима Срема. *Зборник радова; Еколошка истина, Еко Ist'07*, Технички факултет у Бору- Универзитета у Београду. 233-236
- Тинтор, Б., Милошевић, Н., Секулић, П., Пуцаревић, М. (2008): Микробиолошка својства земљишта индустријских зона Панчева. *Зборник радова; Еколошка истина, Еко Ist'08*, Технички факултет у Бору- Универзитета у Београду. 297-301
- Trindade, P.V.O., Sobral, A.C.L., Rizzo, S.G.F., Leite, Soriano, A.U. (2005): Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soil from Brazil: a comparasion study. *Chemosphere* 58. 515–522
- Угринов, Д., Стојанов, А. (2010): Биоремедијација у третману загађеног земљишта (стручни рад). *Заштита материјала*, 51, број 4. 237-244
- Van Hamme J. D. (2004): Biodegradation and Bioremediation, Singh, A., Ward, O.P., (Eds.), Springer-Verlag, Berlin. 37–56
- Vidali, M. (2001): Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 73. 1163–1172.
- Ward, O., Singh, A., Van Hamme, J. (2003): Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30. 260-270
- Ward, O.P., Singh, A., Van Hamme, J.D., Voordouw, G. (2009) in: M. Schaechter (Ed.) Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed., Elsevier, Oxford. 443–457
- Wilson, S. C., Jones, K. C. (1993): Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution* 81. 229-249
- Wyszowski, M., Wyszowska, J., Ziółkowska, A. (2004): Effect of soil contamination with diesel oil on yellow lupine yield and macroelements content. *PLANT SOIL ENVIRON.*, 50 (5). 218-226
- Wyszowski, M., Wyszowska, J. (2005): Effect of enzymatic activity of diesel oil contaminated soil on the chemical composition of oat (*Avena sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.). *PLANT SOIL ENVIRON.*, 51 (8). 360-367
- Xing, B., Pignatello, J.J., (1997): Dual-model sorption of low-polarity compounds in glassy polyvinyl chloride and soil organic matter. *Environmental Science and Technology* 31. 792–799

9. ПРИЛОГ

Прилог садржи табеле са приказом података логаритамских вредности броја свих испитиваних група микроорганизама: укупног броја бактерија, броја амонификатора, гљива, актиномицета и *Azotobacter* sp., као и активности ензима дехидрогеназе у земљишту.

У табелама су приказане и просечне вредности логаритма броја испитиваних група микроорганизама из дела огледа где није било биљака – клонова тополе, као и резултате статистичке анализе ANOVA LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$) код варијанти са клоновима биљака тополе.

Таб. 1. Логаритам броја ћелија укупног броја бактерија у земљишту третираним нафтом (D5 и D20) на почетку (I), 15 дана (II), 30 дана (III), 60 дана (IV) и 90 дана (V) након примене нафте:

Варијанте	Топола	I	II	III	IV	V
Контрола	Клон 1	7,273901	7,795729	7,314745	6,875604	8,411728
		7,188659	7,256595	7,713778	6,95484	8,377012
		7,387693	7,442354	7,36733	7,254405	8,422108
	Клон 2	7,381743	7,549503	7,06108	7,58723	8,052044
		7,651234	7,660912	7,216556	7,280167	7,965572
		7,158588	7,615388	7,002517	7,457222	8,236969
	Клон 3	7,461275	7,690319	7,574252	7,168664	8,127844
		7,574629	7,69786	7,78954	6,696156	7,900978
		7,291852	7,590647	7,698092	6,836044	8,37789
D 5	Клон 1	7,203789	7,441031	7,741097	7,432424	8,386422
		7,427012	7,349343	7,753121	7,496157	8,89913
		7,200602	7,613204	7,403153	7,644843	8,62317
	Клон 2	7,319145	7,888858	7,760164	7,544412	8,19203
		7,513963	7,728885	7,901293	7,654283	8,768444
		7,516132	7,529988	7,678298	7,201186	8,641328
	Клон 3	7,844664	7,649316	7,42408	6,983869	7,966979
		7,547473	7,853313	7,395075	7,163919	8,23741
		7,100474	7,871626	7,684922	6,94683	8,832633
D 20	Клон 1	7,420272	7,587661	7,685863	6,678091	8,50974
		7,386386	7,626513	7,660549	7,342084	8,833721
		7,440202	7,792293	7,408725	7,667225	8,637511
	Клон 2	7,250063	7,727402	7,626709	7,723799	9,07109
		7,484578	7,741098	7,818591	6,544394	8,607323
		7,23134	7,608112	7,57776	7,459045	8,787136
	Клон 3	7,598317	7,769158	7,349984	7,190581	8,293522
		7,76146	7,782317	7,642036	7,568997	8,752496
		7,39202	7,845231	7,916306	7,477944	8,628577

Таб. 2. Просек укупног броја бактерија на варијанти без биљака и резултати статистичке анализе варијанти огледа са биљкама:

Без биљака	Почетни узорци	15 дана	30 дана	60 дана	90 дана
Контрола	7,311766	7,2098	7,3761	7,1108	7,1209
D5	7,456603	7,3936	7,6405	7,2399	6,9175
D20	7,576652	7,5820	7,3124	7,0500	6,8076
Са биљкама					
Контрола	7,37 а*	7,59 а	7,41 а	7,12 а	8,21 а
D5	7,41 а	7,66 а	7,64 б	7,34 а	8,5 б
D20	7,44 а	7,72 а	7,63 б	7,29 а	8,68 б

*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике измеђи варијанти, на основу LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$)

Таб. 3. Логаритам броја ћелија амонификатора у земљишту третираним нафтом (D5 и D20) на почетку (I), 15 дана (II), 30 дана (III), 60 дана (IV) и 90 дана (V) након примене нафте:

Варијанте	Топола	I	II	III	IV	V
Контрола	Клон 1	7,368457	7,540457	7,350957	6,628932	7,982912
		7,261209	7,335776	6,951139	7,512481	7,828535
		6,466874	7,400961	6,66836	6,573164	7,548982
	Клон 2	7,316241	7,621622	7,005563	7,405386	7,565378
		7,946512	7,495286	7,004926	7,001414	7,95399
		7,19335	7,439297	6,840666	7,059282	7,864583
	Клон 3	7,371664	6,845221	6,993381	7,334995	8,296986
		7,05175	7,251913	6,98506	6,842284	8,094798
		7,383367	7,250699	6,881023	6,739134	8,419282
D 5	Клон 1	7,616636	7,623371	6,990974	6,761038	8,085392
		7,657461	6,877075	7,358815	7,296027	8,060281
		7,598542	7,250026	7,139912	7,417739	8,131325
	Клон 2	7,706361	7,318056	6,713421	7,401451	7,778296
		7,374856	7,223735	7,125782	7,129909	8,140504
		7,298648	7,4536	7,410692	7,230345	7,834213
	Клон 3	7,035478	7,596259	6,804986	6,908618	8,830301
		7,315524	7,573133	7,110751	7,333277	8,148988
		7,560562	7,638272	7,196806	6,986339	8,434693
D 20	Клон 1	7,110642	7,930332	7,181158	6,632334	7,954677
		7,382107	7,267491	7,245118	7,174593	8,175864
		7,574901	7,228578	7,275514	7,416888	8,24306
	Клон 2	7,345781	7,426372	7,479046	7,354505	8,540648
		7,644279	7,600479	7,665484	6,845424	8,06078
		7,413681	6,943	6,931496	7,17098	8,27783
	Клон 3	7,489173	7,354185	7,358584	7,032218	8,23704
		7,507609	7,367672	7,262719	7,289687	8,174474
		7,462601	7,232741	7,415295	7,176914	7,924808

Таб. 4. Просек броја амонификатора на варијанти без биљака и резултати статистичке анализе варијанти огледа са биљкама:

Без биљака	Почетни узорци	15 дана	30 дана	60 дана	90 дана
Контрола	7,155419	7,0494	7,3399	7,1603	7,0978
D5	7,210621	7,3655	7,4364	7,3368	6,9632
D20	7,053773	7,3070	7,1673	7,0922	6,6479
Са биљкама					
Контрола	7,26 а*	7,35 а	6,96 а	7,01 а	7,95 а
D5	7,46 а	7,39 а	7,09 а	7,16 а	8,16 а
D20	7,44 а	7,37 а	7,31 б	7,16 а	8,17 а

*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике између варијанти, на основу LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$)

Таб. 5. Логаритам броја ћелија гљива у земљишту третираним нафтом (D5 и D20) на почетку (I), 15 дана (II), 30 дана (III), 60 дана (IV) и 90 дана (V) након примене нафте:

Варијанте	Топола	I	II	III	IV	V
Контрола	Клон 1	4,249767	4,665395	4,828079	3	3
		4,323357	4,381534	5,070326	4,699568	4,381377
		4,165844	4,359568	4,991666	3	3
	Клон 2	4,159894	4,660201	4,36211	4,405386	3
		4,451662	4,349158	4,973518	4,399354	3
		4,526565	4,661145	4,349304	3	3
	Клон 3	4,234491	4,66913	4,972192	5,089482	3
		4,176689	4,967482	4,98506	3	4,395828
		2	4,949669	3	4,836044	4,67892
D 5	Клон 1	4,249547	4,857454	4,689944	4,346064	3
		4,125982	4,399953	4,376544	3	4,361311
		4,376693	5,056901	4,36176	4,834162	4,969957
	Клон 2	4,250429	3	4,672028	4,329569	3
		4,161781	4,649704	5,16357	4,667511	3
		4,298648	5,117808	4,979328	5,042824	3
	Клон 3	3,859387	4,348286	4,884168	4,942477	3
		4,465287	3	4,386475	5,196104	4,833718
		3,986531	4,942207	5,22899	3	3
D 20	Клон 1	4,25677	4,863385	4,395828	3	4,363612
		4,456967	4,422393	4,983855	3	4,860593
		4,353052	4,67835	5,082389	4,646036	4,669028
	Клон 2	4,465921	4,666704	4,873382	4,682407	4,847508
		4,287298	5,069	5,377682	3	3
		3,869613	3	4,989488	3	4,862857
	Клон 3	4,319564	4,354185	4,827105	3	3
		4,27716	4,660102	5,053204	4,375873	3
		4,424812	4,375409	5,065047	4,784803	4,368505

Таб. 6. Просек броја гљива на варијанти без биљака и резултати статистичке анализе варијанти огледа са биљкама:

Без биљака	Почетни узорци	15 дана	30 дана	60 дана	90 дана
Контрола	4,0762	4,1554	4,376079	3	3
D5	4,2565	4,1103	4,997024	5,227626	4,361161
D20	4,3267	4,2756	4,845069	3	3
Са биљкама					
Контрола	4,03 а*	4,63 а	4,61 а	3,94 а	3,49 а
D5	4,2 а	4,37 а	4,75 а	4,37 а	3,57 а
D20	4,3 а	4,45 а	4,96 а	3,72 а	4,11 а

*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике између варијанти, на основу LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$)

Таб. 7. Логаритам броја ћелија актиномицета у земљишту третираним нафтом (D5 и D20) на почетку (I), 15 дана (II), 30 дана (III), 60 дана (IV) и 90 дана (V) након примене нафте:

Варијанте	Топола	I	II	III	IV	V
Контрола	Клон 1	5,334088	6,405758	6,430139	5,39794	5
		4,670145	6,381534	6,371356	5,87564	6,381377
		5,274184	5,83669	5,991666	5,39794	5
	Клон 2	4,159894	6,313413	6,140261	5,706718	5
		4,548572	6,349158	6,149609	5,700704	6,385788
		5,003686	6,615388	6,048274	5,644439	5
	Клон 3	4,933461	6,146251	6,324374	6,235528	6,805624
		5,079779	6,064392	6,383	5,696356	6,997888
		5,189547	6,389001	6,074843	5,960946	6,67892
D 5	Клон 1	4,922963	5,380333	6,593034	5,346353	6,687452
		5,125982	4	5,677574	6,081347	7,060281
		4,853815	5,835053	6,06073	6,503109	6,668927
	Клон 2	5,028581	6,266903	6,216096	6,174641	6,346932
		4,927698	6,047644	6,16357	5,843855	5
		4,509501	6,543776	6,331511	5,945961	7,070785
	Клон 3	4,683296	6,494414	6,009106	6,486572	6,364919
		4,708325	6,545104	6,340718	6,196176	7,259687
		4,940773	6,368176	6,338135	6,022428	7,258602
D 20	Клон 1	5,189824	5,988324	6,395828	5,376577	6,363612
		5,317305	5,899515	6,557886	5,818885	7,22857
		4,875931	5,97938	6,529548	6,044148	7,066969
	Клон 2	5,049498	6,143825	6,350503	6,080266	6,972447
		5,017676	6,67106	6,155834	5,845718	6,36181
		5,091461	6,34094	6,387428	5,815578	6,987796
	Клон 3	4,727049	6,584634	6,429165	6,178401	7,078678
		4,675101	6,058042	6,632988	5,977724	7,060531
		5,139294	6,375409	6,445259	6,261976	6,970565

Таб. 8. Просек броја актиномицета на варијанти без биљака и резултати статистичке анализе варијанти огледа са биљкама:

Без биљака	Почетни узорци	15 дана	30 дана	60 дана	90 дана
Контрола	5,0585	4,9793	6,1542	6,0463	5,8346
D5	5,3558	5,3655	6,2401	5,8596	5,9632
D20	4,6030	4,6948	6,2130	5,8369	5,6936
Са биљкама					
Контрола	4,91 а*	6,28 а	6,21 а	5,74 а	5,92 а
D5	4,85 а	5,94 а	6,19 а	6,07 а,б	6,63 б
D20	5,01 а	6,23 а	6,43 б	5,93 б	6,9 б

*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике између варијанти, на основу LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$)

Таб. 9. Логаритам броја ћелија *Azotobacter* sp. у земљишту третираним нафтом (D5 и D20) на почетку (I), 15 дана (II), 30 дана (III), 60 дана (IV) и 90 дана (V) након примене нафте:

Варијанте	Топола	I	II	III	IV	V
Контрола	Клон 1	3,033058	3,51818	3,292965	3,273544	3,248226
		3,721297	3,101693	2,883239	3,387542	3,256438
		3,107852	3,204666	3,0663	3,025461	3,327133
	Клон 2	3,284833	3,248473	3,492444	3,446779	3,148954
		2,469391	2,861042	3,392647	3,139716	3,288878
		3,43159	3,381305	3,252394	3,12143	3,417425
	Клон 3	3,185273	3,438138	3,273222	3,168664	3,601504
		2,495448	2,877305	3,059693	3,22443	3,437221
		2,8227	2,745549	3,029085	3,410075	3,267191
D 5	Клон 1	2,843781	3,100492	3,065608	3,221126	3,261484
		3,125982	2,752136	3,265846	3,403403	3,372035
		2,665489	3,153811	3,15764	3,346046	3,32214
	Клон 2	2,706361	3,238874	3,130666	3,21887	3,221994
		2,626668	3,302916	3,198332	3,106844	3,46381
		2,571649	2,913688	3,465404	3,218915	3,167696
	Клон 3	3,081236	3,337291	3,166714	3,47075	3,306927
		2,562197	2,808346	3,231573	3,411704	3,426635
		3,037683	3,243237	3,45393	3,384279	3,321654
D 20	Клон 1	3,35368	3,437416	3,225132	3,237399	3,280066
		3,173666	3,351812	2,955826	2,916115	3,383472
		3,194689	3,190233	3,299873	3,35573	3,473509
	Клон 2	3,039952	3,319916	3,11642	3,141045	3,069357
		3,229306	3,531398	3,307101	3,409695	2,96387
		2,936559	3,153853	3,086398	3,098139	3,583016
	Клон 3	2,541413	3,199283	3,371173	3,364657	3,269009
		3,027283	3,369795	3,183538	2,919941	3,139712
		3,060113	3,188322	3,125745	3,210772	3,108868

Таб. 10. Просек броја *Azotobacter* sp. на варијанти без биљака и резултати статистичке анализе варијанти огледа са биљкама:

Без биљака	Почетни узорци	15 дана	30 дана	60 дана	90 дана
Контрола	2,620306	3,005657	3,514382	3,192465	3,495739
D5	2,80922	2,850613	3,612448	3,242866	3,361161
D20	2,974592	3,000921	3,33409	3,590216	3,506542
Са биљкама					
Контрола	3,06 а*	3,15 а	3,19 а	3,24 а	3,33 а
D5	2,8 а	3,09 а	3,24 а	3,31 а	3,32 а
D20	3,06 а	3,3 а	3,18 а	3,18 а	3,25 а

*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике између варијанти, на основу LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$)

Таб. 11. Активност ензима дехидрогеназе ($\mu\text{g TPF} / \text{g}^{-1}$) у земљишту третираним нафтом (D5 и D20) на почетку (I), 15 дана (II), 30 дана (III), 60 дана (IV) и 90 дана (V) након примене нафте:

Варијанте	Топола	I	II	III	IV	V
Контрола	Клон 1	62,86	74,29	62,86	160,00	97,14
		42,86	62,86	42,86	94,29	142,86
		57,14	91,43	74,29	82,86	122,86
	Клон 2	57,14	88,57	42,86	142,86	157,14
		57,14	68,57	37,14	125,71	117,14
		62,86	77,14	20,00	77,14	117,14
	Клон 3	68,57	62,86	117,14	71,43	42,86
		54,29	80,00	85,71	57,14	28,57
		25,71	94,29	91,43	71,43	42,86
D 5	Клон 1	120,00	128,57	122,86	185,71	160,00
		57,14	114,29	134,29	185,71	157,14
		117,14	105,71	42,86	140,00	185,71
	Клон 2	117,14	108,57	68,57	220,00	177,14
		160,00	148,57	100,00	185,71	228,57
		122,86	131,43	100,00	168,57	185,71
	Клон 3	154,29	157,14	62,86	71,43	51,43
		177,14	222,86	100,00	54,29	65,71
		148,57	117,14	71,43	71,43	40,00
D 20	Клон 1	85,71	148,57	148,57	148,57	157,14
		105,71	117,14	114,29	137,14	145,71
		102,86	148,57	94,29	97,14	205,71
	Клон 2	134,29	157,14	214,29	271,43	154,29
		134,29	108,57	137,14	174,29	157,14
		120,00	57,14	114,29	171,43	128,57
	Клон 3	105,71	142,86	62,86	51,43	45,71
		122,86	120,00	188,57	191,43	128,57
		145,71	128,57	122,86	131,43	237,14

Таб. 12. Просечне вредности активности ензима дехидрогеназе ($\mu\text{g TPF} / \text{g}^{-1}$) у земљишту на варијанти без биљака и резултати статистичке анализе варијанти огледа са биљкама:

Без биљака	Почетни узорци	15 дана	30 дана	60 дана	90 дана
Контрола	122,86	114,29	85,71	62,86	25,71
D5	71,43	71,43	37,14	51,43	45,71
D20	157,14	57,14	17,14	40,00	37,14
Са биљкама					
Контрола	54,29 а*	77,78 а	63,81 а	98,1 а	96,51 а
D5	130,48 б	137,14 б	89,21 а	142,54 а,б	139,05 а
D20	117,46 б	125,4 б	133,02 б	152,7 б	151,11 а

*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике између варијанти, на основу LSD Fisher-овог теста хомогености варијанси за једнофакторијални оглед ($p=0,05$)