

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Marija M. Lukić

**Uklanjanje naftnih ugljovodonika iz vode i
sedimenta integralnim postupkom adsorpcije i
mikrobne degradacije**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Марија М. Лукић

**Уклањање нафтних угљоводоника из воде и
седимента интегралним поступком
адсорпције и микробне деградације**

докторска дисертација

Београд, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Marija M. Lukić

**Removal of petroleum hydrocarbons from
water and sediment by an integrated process
of adsorption and microbial degradation**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentori:

dr Vladimir Beškoski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Jelena Avdalović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Vladimir Beškoski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Jelena Avdalović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Branimir Jovančičević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Aleksandra Žerađanin, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Kristina Joksimović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: 24.09.2025. godine

...voljenim...
...ma gde bili...

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove disertacije je rađen u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju Katedre za biohemiju na Hemijskom fakultetu (HF), Univerziteta u Beogradu i na Institutu za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina (ITNMS) u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, redovnom profesoru, dr Vladimiru Beškospkom sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na neposrednom radu tokom izrade ove disertacije, kao i na korisnim smernicama koje su značajno doprinele njenom kvalitetu.

Svojoj dragoj mentorki, dr Jeleni Avdalović, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, zahvalna sam, osim na znanju koje mi je prenela, i na enormnom zalaganju, podršci i razumevanju koje je pokazala. Hvala Vam na svim rečima ohrabrenja, jer su one najviše doprinele da dođemo do zajedničkog cilja.

Zahvalnost dugujem i dr Gordani Gojgić-Cvijović, naučnom savetniku u penziji Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, na brojnim savetima koje mi je davala tokom eksperimentalnog rada, ali i tokom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se dr Branimiru Jovančićeviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, na korisnim sugestijama prilikom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se dr Aleksandri Žerađanin, naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, na korisnim savetima tokom praktičnog rada, kao i na direktnom rukovođenju molekularnim analizama rađenim na mikroorganizmima tokom izrade ove disertacije.

Dr Kristini Joksimović, naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, sam neizmerno zahvalna na rukovođenju jednim delom disertacije i to u oblasti respirometrijskih analiza, kao i što je uvek izlazila u susret kada bi mi zatrebala pomoć.

Dr Aleksandri Daković, naučnom savetniku ITNMS, i Mileni Obradović, istraživaču pripravniku na ITNMS, izražavam neizmernu zahvalnost na zajedničkoj saradnji prilikom karakterizacije adsorbenta u svim fazama istraživanja, a koja je značajno doprinela kvalitetu ove disertacije, kao i na nesebičnom gestu koji je, mogu slobodno da kažem, imao i presudnu ulogu u izradi doktorata.

Dr Srđanu Miletiću, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, veliko hvala na brojnim savetima, kao i na učešću u terenskim istraživanjima i održavanju pozitivnog duha.

Čini me veoma tužnom što dr Miroslavu M. Vrviću, nekadašnjem redovnom profesoru Hemijskog fakulteta i svom prvobitnom mentoru, zahvalnost izražavam posthumno. Uvek je nesebično delio svoja znanja i ideje, a njegovi gestovi su u značajnoj meri uticali na moj akademski put, ali i na neakademski život.

Zahvaljujem se gospodinu Mladenu Kukiću i gospodinu Milanu Raduloviću koji su omogućili saradnju sa BREM Group i NRK Inženjeringom na projektu in situ bioremedijacije i što su svojim bogatim iskustvom pomogli da prevaziđemo poteškoće koje su se javljale tokom procesa. Takođe sam zahvalna i nekadašnjim kolegama koji su učestvovali u terenskim aktivnostima, davali smernice, obezbeđivali da logistički sve bude besprekorno, i što su junački izdržali proces pripreme biomase. Veliko hvala Mirjani Vukašinović, Milanu Bogdanoviću, Srđanu Sokoliću, Nebojši Paviću, Vesni Jovanović, Dejanu Divniću, Leli Kovač, Milanu Kukiću, Ireni Gocev, Mladenu Laliću, Ivani Petrović i Nikoli Raduloviću.

Mojoj porodici i prijateljima izražavam duboku zahvalnost što su mi sve ove godine bili velika podrška i što su, više od mene, verovali da ću i ovaj poduhvat uspešno završiti.

Uklanjanje naftnih ugljovodonika iz vode i sedimenta integralnim postupkom adsorpcije i mikrobne degradacije

SAŽETAK

U ovoj disertaciji je predstavljen proces *in situ* bioremedijacije sedimenta i podzemne vode kontaminirane naftnim jedinjenjima na industrijskom nivou, kao i ispitivanje nove tehnološke procedure za uklanjanje rastvorne frakcije (WSF) dizela iz voda.

In situ bioremedijacioni tretman se sastojao od biostimulacije, bioaugmentacije i recirkulacije podzemne vode u zatvorenom sistemu. Za bioaugmentaciju je korišćen zimogeni konzorcijum mikroorganizama izolovan iz kontaminiranog sedimenta. Nakon bioaugmentacije udeo naftnih degradera u ukupnom broju hemoorganoheterotrofnih bakterija je porastao više od 60 puta u sedimentu, a broj naftnih degradera u podzemnoj vodi je održavan između 10^5 i 10^8 CFU/mL. Nakon jednogodišnje bioremedijacije, GC analiza je pokazala smanjenje sadržaja naftnih ugljovodonika u sedimentu za 82%, a u podzemnoj vodi za gotovo 100%. GCxGC-MS analiza sedimenta je pokazala stepen degradacije različitih grupa naftnih ugljovodonika: sterana (99,58%), izoprenoida (98,39%), derivata benzena (98,35%), alkana (97,17%) i terpana (49,32%). Eksponecijalni model degradacije za sediment je pokazao da je najveći stepen degradacije bio na dubinama od 8 do 10 m, sa prosečnom konstantom degradacije od 0,227, nezavisno od početne koncentracije naftnih ugljovodonika. Ovi rezultati pokazuju da je primenjeni *in situ* bioremedijacioni tretman bio vrlo efikasan u uklanjanju naftnih ugljovodonika iz podzemne vode i sedimenta u kontaktu sa podzemnom vodom.

U drugom delu disertacije je analizirana sposobnost prirodnog zeolita, čija je površina modifikovana pomoću kvaternarne amonijumove soli heksadeciltrimetilamonijum bromida (HDTMA-Br), za adsorpciju WSF dizela iz vode. Eksperimenti adsorpcije su izvedeni korišćenjem organozeolita u šaržnom sistemu sa početnim koncentracijama WSF dizela od 2,5 do 25 mg/L pri pH 6 i temperaturi od 20 °C. GC analiza je pokazala da je uklonjeno više od 90% WSF dizela, pri čemu je ravnoteža postignuta nakon 1 sata. Maksimalni kapacitet adsorpcije organozeolita za uklanjanje WSF dizela iz vode iznosio je 22,2 mg/g. Ravnotežni podaci su najbolje opisani linearnom izotermom, dok su se kinetički podaci dobro uklopili u model pseudo-drugog reda. Prirodni zeolit i organozeolit pre i posle adsorpcije WSF-a dizela okarakterisani su pomoću FTIR i SEM analize, kao i određivanjem zeta potencijala. Uspešnost adsorpcije WSF-a dizela potvrđena je i dodatnim testom ekotoksičnosti. Nakon adsorpcije je sproveden 15-dnevni eksperiment biodegradacije u šaržnim uslovima. Rezultati su pokazali da je ispitivani konzorcijum mikroorganizama, sastavljen od sojeva izolovanih i okarakterisanih u prvom delu disertacije, razgradio 80% adsorbovane zagađujuće supstance. Dodatne respirometrijske analize pokazale su da je, paralelno sa razgradnjom adsorbovane frakcije dizela, došlo i do razgradnje dugolančanih HDTMA jona na površini organozeolita, odnosno do regeneracije adsorbenta.

Ključne reči: *in situ* bioremedijacija, konzorcijum mikroorganizama, naftni ugljovodonici, frakcija dizela rastvorna u vodi, akvifer, organozeolit, adsorpcija, biodegradacija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Removal of petroleum hydrocarbons from water and sediment by an integrated adsorption and microbial degradation process

ABSTRACT

This dissertation presents an industrial-scale *in situ* bioremediation process of hydrocarbon-contaminated sediment and groundwater, as well as the examination of a new technological procedure for the removal of the water-soluble fraction (WSF) of diesel from water.

In situ bioremediation treatment consisted of biostimulation, bioaugmentation, and groundwater recirculation in a closed system. For bioaugmentation, a zymogenous microbial consortium, isolated from the contaminated sediment, was used. Following bioaugmentation, the proportion of hydrocarbon-degrading bacteria in total chemoorganoheterotrophs increased by more than 60-fold in the sediment, while the number of hydrocarbon degraders in the groundwater was maintained between 10^5 and 10^8 CFU/mL. GC analysis showed an 82% reduction in the hydrocarbon content in the sediment and an almost 100% reduction in groundwater after one year of bioremediation. GC-GC-MS analysis of the sediment showed the order of degradation of various hydrocarbon groups: steranes (99.58%), isoprenoids (98.39%), benzene derivatives (98.35%), alkanes (97.17%), and terpenes (49.32%). The exponential decay model for sediment showed the greatest decomposition rate of hydrocarbons occurred at depths of 8-10 m, with an average decay constant of 0.227, independent of the initial concentration of hydrocarbons. The results obtained show *in situ* bioremediation very effectively removes petroleum pollutants from groundwater and its associated sediments.

In the second part of the dissertation, the adsorption capacity of natural zeolite, modified with the quaternary ammonium salt hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA-Br) on the surface, for the removal of the WSF of diesel from water was analyzed. The adsorption experiments, with initial WSF concentrations of 2.5–25 mg/L, at pH 6 and at 20 °C, were performed in a batch system using organozeolite. GC analysis showed that more than 90% of the WSF of diesel was removed, reaching equilibrium after 1 h. The maximum adsorbed capacity of organozeolite for the removal of the WSF of diesel fuel from water under the tested conditions was 22.2 mg/g. Equilibrium data were most accurately described by a linear isotherm, whereas kinetic data were well fitted by the pseudo-second-order model. The natural zeolite and organozeolite before and after adsorption of the WSF of diesel were characterized by FTIR and SEM analysis, as well as zeta potential measurements. The efficiency of the adsorption was additionally confirmed by an ecotoxicity test. After the adsorption, a 15-day biodegradation experiment was carried out under batch conditions. The results showed that the examined microbial consortium, composed of strains isolated and characterized in the first part of the dissertation, degraded 80% of the adsorbed contaminant. Additional respirometric analyses showed that, in parallel with the degradation of the adsorbed diesel fraction, the degradation of the long-chain HDTMA ions at the surface of the organozeolite also occurred, i.e. the adsorbent was regenerated.

Key words: *in situ* bioremediation, microbial consortium, petroleum hydrocarbons, water-soluble fraction of diesel, aquifer, organozeolite, adsorption, biodegradation

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

SPISAK SKRAĆENICA

AAS – atomska absorpciona spektrofotometrija
AN – ukupni anaerobni mikroorganizmi
BTEX – benzen, toluen, etilbenzen i ksilen
BRP – bioremedijacioni potencijal
CEC – ukupni kapacitet za razmenu katjona
CMC – kritična koncentracija potrebna za formiranje micela
C:N:P odnos – odnos ugljenika, azota i fosfora
CoA – koenzim A
Cp – klinoptilolit
CPC – cetilpiridinijum hlorid
CRM – sertifikovani referentni materijal
ECEC – spoljašnji kapacitet za razmenu katjona
DDAB – didodecildimetilamonijum bromid
DDTMA – dodeciltrimetilamonijum bromid
DHDDMA – diheksadecildimetilamonijum bromid
DNAPL – gusta nevodena tečna faza
DSC – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
DTDDMA – ditetradecildimetilamonijum bromid
FABK – filtraciono/adsorpciona bioreaktorska kolona
Fe₃O₄/Bent/MWCNT – mešavina magnetnog bentonita/višezičnih ugljeničnih nanocevčica
Fe₃O₄/Bent/rGO – mešavina magnetnog bentonita/redukovanog grafen oksida
Fit – fitan
FTIR – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
FTIR-ATR – FTIR analiza sa smanjenom totalnom refleksijom
GC-FID – gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom
GCxGC-MS – sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
HAB – ukupne hemoorganoheterotrofne aerobne i fakultativno anaerobne mezofilne bakterije
HDTMA – heksadeciltrimetilamonijum
HDTMA-Br – heksadeciltrimetilamonijum bromid
IEB – injekciono-ekstrakcioni bunar
KP – kvasci i plesni
LNAPL – laka nevodena tečna faza
meq – miliekvivalent
Mt – montmorilonit
MWCNT – višezične ugljenične nanocevčice
Na-Mica-4 – sintetički liskun
NAPL – nevodena tečna faza
ND – mikroorganizmi naftni degraderi
NR – *Nocardia* i *Rhodococcus* spp.
NSO jedinjenja – jedinjenja koja sadrže azot, sumpor i kiseonik
ODA – oktadecilamin
ODTMA – oktadeciltrimetilamin
ODA-Mt – montmorilonit modifikovan pomoću oktadecilamina
ODA-Mica-4 – sintetički liskun modifikovan pomoću oktadecilamina
ODTMA-Mt – montmorilonit modifikovan pomoću oktadeciltrimetilamina
ODTMA-Mica-4 – sintetički liskun modifikovan pomoću oktadeciltrimetilamina

organo-Cp – organo-klinoptilolit
PAH – policiklični aromatični ugljovodonici
PmS-B - biougalj dobijen pirolizom koštica šljiva
Pr – pristan
Ps – *Pseudomonas* spp.
RB – radijalni kolektorski bunar, Renney bunar
RP – radna podloga
SDBAC – stearildimetilbenzilamonijum hlorid
SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija
SP1 – startna podloga 1
SP2 – startna podloga 2
TDS – ukupni rastvoreni elektroliti
TDMA – tetradeciltrimetilamonijum bromid
TG – termogravimetrija
TMA – tetrametilamonijum hlorid
TMPA – trimetilfenil amonijum
TPH – ukupni naftni ugljovodonici
TTAB-Mt – montmorilonit modifikovan pomoću tetradeciltrimetilamonijum bromida
WSF – frakcija rastvorna u vodi
XRPD – difrakcija rendgenskih zraka praha

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1. Akviferi	5
2.1.1. Hidrofizičke zone akvifera	5
2.1.2. Hidrodinamička klasifikacija akvifera	6
2.1.3. Hranjenje akvifera	7
2.2. Nafta i naftni proizvodi	9
2.3. Zagađenje životne sredine naftom i naftnim proizvodima	10
2.3.1. Zagađenje zemljišta	10
2.3.2. Zagađenje vode	11
2.4. Uklanjanje naftnog zagađenja iz zemljišta	13
2.4.1. Fizičko-hemijske metode	13
2.4.1.1. Termalna desorpcija	13
2.4.1.2. Spaljivanje	13
2.4.1.3. Piroлиза	13
2.4.1.4. Ispiranje zemljišta	14
2.4.2. Biološke metode	14
2.4.2.1. Halde	14
2.4.2.2. Bioprovetravanje	14
2.4.2.3. Enkapsulacija mikroorganizama	14
2.5. Uklanjanje naftnog zagađenja iz vodenih staništa	15
2.5.1. Mehaničke metode	15
2.5.2. Fizičko-hemijske metode	15
2.5.2.1. <i>In situ</i> spaljivanje	15
2.5.2.2. Upotreba surfaktanata	15
2.5.2.3. Upotreba učvršćivača	16
2.5.2.4. „Pump-and-treat“ metoda	16
2.5.2.5. Hemijska oksidoredukcija	17
2.5.2.6. Upotreba sorbenata	17
2.6. Bioremedijacija	19
2.6.1. Projektovana bioremedijacija	19
2.6.1.1. Biostimulacija	20
2.6.1.2. Bioaugmentacija	20
2.6.2. Primena mikroorganizama u bioremedijaciji	21
2.6.3. Metabolički putevi mikrobiološke razgradnje naftnih ugljovodonika	22
2.6.3.1. Razgradnja <i>n</i> -alkana	25
2.6.3.2. Razgradnja cikloalkana	26
2.6.3.3. Razgradnja aromatičnih ugljovodonika	27

2.6.3.4. Razgradnja alkina	28
2.6.3.5. Adicija fumarata	29
2.6.4. Faktori koji utiču na proces bioremedijacije zemljišta	31
2.6.4.1. Karakteristike zemljišta	31
2.6.4.2. pH	31
2.6.4.3. Temperatura	31
2.6.4.4. Trajanje zagađenja	31
2.6.4.5. Raspodela veličine čestica zemljišta	32
2.6.4.6. Sadržaj vlage	32
2.6.4.7. Hidraulična provodljivost	32
2.6.4.8. Svojstva zagađujućih supstanci	33
2.6.4.9. Biodostupnost	33
2.6.5. Faktori koji utiču na proces bioremedijacije voda	34
2.6.5.1. Temperatura	34
2.6.5.2. Nutrijenti	34
2.6.5.3. Sunčeva svetlost	35
2.6.5.4. Kiseonik	35
2.6.5.5. Pritisak	35
2.6.5.6. Sadržaj suspendovanih čestica	35
2.6.5.7. Salinitet	36
2.6.5.8. Električna provodljivost i ukupni rastvoreni elektroliti	36
2.7. Zeoliti	37
2.7.1. Klasifikacija zeolita	38
2.7.1.1. Klasifikacija zeolita na osnovu porekla	38
2.7.1.2. Klasifikacija zeolita na osnovu molarnog odnosa silicijuma i aluminijuma	39
2.7.1.3. Klasifikacija zeolita na osnovu veličine pora	39
2.7.2. Upotreba zeolita	39
2.7.2.1. U poljoprivredi	39
2.7.2.2. U zaštiti životne sredine	39
2.7.2.3. Upotreba zeolita u uklanjanju naftnih polutanata	40
2.7.2.4. Ostale upotrebe zeolita	40
2.7.3. Sinteza zeolita	40
2.7.3.1. Sinteza zeolita hidrotermalnom metodom	40
2.7.4. Modifikacija zeolita organskim surfaktantima	41
2.8. Modelovanje biosorpcije	43
2.8.1. Adsorpcione izoterme	43
2.8.1.1. Langmuir-ova izoterma	43
2.8.1.2. Freundlich-ova izoterma	44
2.8.2. Kinetika hemijskih reakcija	45
2.8.2.1. Model pseudo-prvog reda	45
2.8.2.2. Model pseudo-drugog reda	46
3. Materijal i metode	47
3.1. Uzorkovanje i analiza sedimenta i podzemne vode	48
3.1.1. Uzorkovanje sedimenta	48
3.1.2. Uzorkovanje podzemne vode	49

3.1.3. Analitičke metode	50
3.1.3.1. Određivanje sadržaja suve supstance u sedimentu	50
3.1.3.2. Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti sedimenta	50
3.1.3.3. Određivanje sadržaja organske supstance u sedimentu	50
3.1.3.4. pH vode	50
3.1.3.5. Električna provodljivost (κ) i ukupne rastvorene čestice (TDS) u vodi	51
3.1.3.6. Sadržaj rastvorenog kiseonika u vodi	51
3.1.3.7. Temperatura vode	51
3.1.3.8. Ekstrakcija TPH iz čvrstih uzoraka	51
3.1.3.9. Ekstrakcija TPH iz tečnih uzoraka	51
3.1.4. Mikrobiološke metode	51
3.1.4.1. Podloga za izolovanje ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB)	52
3.1.4.2. Podloga za izolovanje kvasaca i plesni (KP)	52
3.1.4.3. Podloga za izolovanje mikroorganizama-naftnih degradera (ND)	52
3.1.4.4. Podloga za izolovanje <i>Pseudomonas</i> spp. (Ps)	53
3.1.4.5. Podloga za izolovanje <i>Nocardia</i> i <i>Rhodococcus</i> spp. (NR)	53
3.1.4.6. Ray-ov mineralni medijum	54
3.1.4.7. Pomoćni mikrobiološki rastvori	54
3.1.4.8. Određivanje broja mikroorganizama i izolovanje čistih kultura	54
3.1.4.9. Taksonomska karakterizacija izolovanih mikroorganizama	55
3.1.4.10. Konstruisanje filogenetskog stabla	55
3.1.4.11. Priprema biomase za bioaugmentaciju	55
3.1.4.12. Priprema konzorcijuma mikroorganizama za biodegradacioni eksperiment	56
3.1.5. Strukturno-instrumentalne tehnike	57
3.1.5.1. Određivanje TPH gasnom hromatografijom (GC-FID)	57
3.1.5.2. Gasna-gasno masena hromatografija (GCxGC-MS)	57
3.1.6. Statistička analiza	57
3.2. Sinteza organozeolita	58
3.3. Karakterizacija zeolita i organozeolita	59
3.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrija (TG)	59
3.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	59
3.3.3. Zeta potencijal	59
3.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	59
3.4. Ispitivanje adsorpcije rastvorene frakcije dizela na organozeolitu spregnute sa biodegradacijom	60
3.4.1. Priprema zasićenog rastvora dizela u vodi	60
3.4.2. Adsorpcioni eksperimenti	60
3.4.3. Test ekotoksičnosti	60
3.4.4. Biodegradacioni eksperiment	61
3.4.5. Praćenje respiracije	61
4. Rezultati i diskusija	62
4.1. In situ bioremedijacioni tretman akvifera zagađenog ugljovodonicima naftnog tipa	64
4.1.1. Opis lokacije <i>in situ</i> bioremedijacionog procesa	64

4.1.2. <i>In Situ</i> bioremedijaciona tehnologija	66
4.1.3. Ukupni ugljovodonici nafte (TPH) u sedimentu i podzemnoj vodi	71
4.1.3.1. Sediment	71
4.1.3.2. Podzemna voda	76
4.1.4. Zimogeni konzorcijum mikroorganizama u sedimentu i podzemnoj vodi	78
4.1.4.1. Sediment	78
4.1.4.2. Podzemna voda	81
4.1.5. Fizičko-hemijski parametri podzemne vode	83
4.1.6. Eksponecijalni model degradacije TPH u sedimentu	85
4.2. Adsorpcija i biorazgradnja rastvorne frakcije dizela na organozeolitu	94
4.2.1. Karakterizacija organozeolita	94
4.2.1.1. FTIR analiza	96
4.2.1.2. DSC i TG analiza	97
4.2.2. Adsorpcija WSF dizela iz kontaminirane vode na organozeolit	99
4.2.2.1. Kinetika adsorpcije	99
4.2.2.2. Adsorpcione izoterme	101
4.2.3. Karakterizacija organozeolita nakon adsorpcije WSF dizela iz kontaminirane vode	104
4.2.3.1. FTIR analiza	104
4.2.3.2. Analiza zeta potencijala	105
4.2.3.3. SEM analiza	107
4.2.3.4. Test ekotoksičnosti	108
4.2.4. Biodegradacija i respiracija	109
4.2.4.1. Biodegradacija	109
4.2.4.2. Respiracija	111
5. Zaključci	113
6. Literatura	117

1. Uvod

Iako je globalni cilj da se poveća udeo energije dobijene iz zelenih/obnovljivih izvora, oko 33% ukupne potrošnje i dalje potiče iz sirove nafte i taj procenat ima tendenciju da raste (Afzal et al., 2019). Tokom procesa vađenja nafte, njenog transporta, skladištenja, kao i obrade i skladištenja njenih derivata, uvek postoji mogućnost njihovog ispuštanja u životnu sredinu. Pored toga, intenzivna urbanizacija, industrijski rast kao i vojna delovanja dovode do zagađenja zemljišta, sedimenta, površinskih i podzemnih voda, što za posledicu ima zagađenje ekosistema naftnim ugljovodonicima koje ostaje prisutno dug vremenski period (Bacosa et al., 2022; Bandura et al., 2017; Milić et al., 2024; Paliulis, 2021). Prisustvo naftnih jedinjenja u životnoj sredini predstavlja značajan rizik po zdravlje ljudi i ceo ekosistem (Danehpash et al., 2018; Vahabisani i An, 2021), te je neophodno preduzeti odgovarajuće mere kako bi se taj negativan efekat smanjio (Vahabisani i An, 2021). Prema dostupnim podacima, oko 80% vode koja se u Srbiji koristi za snabdevanje stanovništva potiče od podzemnih voda (Polomčić et al., 2011), a u Evropskoj uniji 75% (European Commission, 2008). Kako je sediment integralni deo akvifera i može da bude izvor zagađenja podzemnih voda, direktive Evropske unije daju smernice za rešavanje problema degradiranog kvaliteta sedimenta (European Union, 2000; 2008; 2013), dok je tek 2017. godine doneta i direktiva koja se bavi zaštitom i regeneracijom zemljišta (European Commission, 2017).

Tokom NATO bombardovanja SR Jugoslavije 1999. godine vojna dejstva su bila usmerena i na brojne lokacije za skladištenje nafte. Jedna od njih je bila i Toplana Novi Beograd, kada je uništen rezervoar R9 zapremine 40.000 m³, kao i rezervoari R2, R3, R4 (zapremine od 2.000-5.000 m³) u kojima su skladišteni benzin i mazut, pri čemu je došlo do ispuštanja velike količine naftnih polutanata u životnu sredinu. Tokom kasnijih istražnih radova je otkriveno da je došlo i do oštećenja transportne cevi za naftu, što je dodatno kontaminiralo sediment. Kako se u na datoj lokaciji nalaze podzemne vode iz kojih se Beograd snabdeva pijaćom vodom, bilo je neophodno redovno vršiti monitoring kvaliteta podzemnih voda i sedimenta. Tokom redovnog monitoringa 2015. godine otkriveno je da je koncentracija naftnih ugljovodonika u podzemnoj vodi i pripadajućem sedimentu prekoračila zakonske remedijacione vrednosti (Sl. glasnik, 2010), što je zahtevalo iznalaženje efikasnog rešenja koje bi uklonilo naftne polutante kako iz podzemne vode (procenjena zapremina 105.000 m³), tako i iz pripadajućeg sedimenta (procenjena zapremina 25.000 – 30.000 m³) (Vrvić et al., 2015).

U prvom delu doktorske disertacije će biti opisan *in situ* bioremedijacioni tretman podzemne vode i sedimenta (odnosno akvifera) na industrijskom nivou primenjen na lokaciji Toplane Novi Beograd. Proces se u osnovi sastojao od biostimulacije, bioaugmentacije i recirkulacije kontaminirane podzemne vode u zatvorenom sistemu. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je za bioremedijaciju najpovoljnije koristiti konzorcijum mikroorganizama, jer poseduju veći degradacioni kapacitet (Gojčić-Cvijović et al., 2012; Marić et al., 2015; Ossai et al., 2020), kao i da korišćenje zimogenog konzorcijuma, odnosno konzorcijuma sastavljenog od mikroorganizama izolovanih sa kontaminirane lokacije, skraćuje vreme potrebno za degradaciju polutanta (Łebkowska et al., 2011), te da se kombinacijom biostimulacije i bioaugmentacije postiže najviši stepen degradacije (Shahsavari et al., 2017).

U drugom delu disertacije biće predstavljen laboratorijski eksperiment u kom je ispitana nova tehnološka procedura prečišćavanja voda kontaminiranih rastvornom frakcijom dizela. Frakcije naftnih jedinjenja koje se rastvaraju u vodi (*engl. Water Soluble Fraction, WSF*) su toksične za akvatične organizme i mogu da imaju dugoročne posledice čak i na područja udaljena od inicijalnog mesta kontaminacije (Müller et al., 2019). Rastvorna frakcija dizela se sastoji od nekoliko toksičnih komponenti, kao što su policiklični aromatični ugljovodonici (*engl. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs*), benzen, toluen, etilbenzen i ksilen (*engl. benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene, BTEX*) jedinjenja, kao i teški metali (Santos et al., 2013), te je razvoj održivih metoda za uklanjanje ove frakcije postao jedan od prioriteta. Novije metode prečišćavanja kontaminiranih voda zasnivaju se na korišćenju različitih filtera na bazi prirodnih alumosilikatnih materijala koji su efikasni i ekološki i ekonomski prihvatljivi adsorbenti. Za razliku od glina, zeoliti poseduju rigidnu trodimenzionalnu strukturu koja

sprečava bubrenje i skupljanje čestica, što ih čini pogodnim adsorbentima za primenu u filtracionim sistemima (Haggerty i Bowman, 1994). Međutim, i pored toga što su izuzetno efikasni u procesu adsorpcije toksičnih elemenata (teških metala) i drugih katjonskih vrsta iz zagađenih voda, njihov kapacitet za uklanjanje organskih jedinjenja nije dovoljan za primenu u uklanjanju naftnih polutanata. Iz tog razloga se poslednjih godina ispituje efikasnost zeolita modifikovanih sufraktantima iz grupe kvaternarnih amonijumovih soli u procesu adsorpcije ugljovodonika naftnog porekla. Postupak opisan u drugom delu disertacije zasniva se na adsorpciji rastvorne frakcije dizela na zeolitu modifikovanom heksadeciltrimetilamonijum bromidom (HDTMA-Br), nakon čega dolazi do biodegradacije adsorbovanih polutanata. Kako se biodegradacija zagađujućih supstanci ne može vršiti nezavisno od biorazgradnje adsorbenta koji sadrži organsku fazu (dugolančane molekule kvaternarnih amonijumovih soli), hipoteza je da će i dugolančani organski katjoni koji se koriste za površinsku modifikaciju zeolita podleći mikrobiološkoj degradaciji. Kao rezultat ove kompleksne bioremedijacije biće degradirani polutant i regenerisani zeolit koji se može ponovo modifikovati i koristiti za adsorpciju drugih organskih molekula.

U cilju realizacije ove doktorske disertacije, bilo je neophodno sprovesti sledeće zadatke:

- ⊗ Genotipski okarakterisati mikroorganizme izolovane iz sedimenta kontaminiranog akvifera;
- ⊗ Izvršiti hemijsku i mikrobiološku analizu vode i sedimenta pre biostimulacije i bioaugmentacije;
- ⊗ Izvršiti hemijsku i mikrobiološku analizu vode i sedimenta nakon 6 i 12 meseci *in situ* bioremedijacionog procesa na industrijskom nivou;
- ⊗ Proceniti efikasnost *in situ* bioremedijacije akvifera zagađenog ugljovodonicima naftnog porekla;
- ⊗ Izvršiti karakterizaciju zeolita, sintezu i karakterizaciju organozeolita;
- ⊗ Proceniti efikasnost adsorpcije rastvorne frakcije dizela na organozeolitu;
- ⊗ Ispitati toksičnost vode kontaminirane rastvornom frakcijom dizela i vode nakon tretmana adsorpcijom;
- ⊗ Ispitati kinetiku procesa adsorpcije rastvorne frakcije dizela kao i mehanizam interakcije adsorbent-adsorbat;
- ⊗ Ispitati bioremedijacioni potencijal izolovanog konzorcijuma mikroorganizama za degradaciju adsorbovanog dizela, kao i za regeneraciju adsorbenta.

2. Pregled literature

2.1. Akviferi

Geološke formacije, potpuno ili delimično zasićene vodom između stena i peska, zemljišta i šljunka sposobne da akumuliraju i otpuštaju podzemne vode kroz sloj šljunka i naslage peska predstavljaju izdani. Izdan se u stručnoj praksi često naziva akvifer (*engl. aquifer*). Akviferi su prirodni filteri koji zadržavaju sediment i druge čestice iz vode (kao što su bakterije), obezbeđujući prirodno prečišćavanje podzemne vode. U zavisnosti od veličine pora zavisi i veličina čestica koje će biti zadržane. Prolaskom kroz sitne pore, podzemna voda gubi energiju duž svog toka, što vodi smanjenju hidrauličnog pritiska u smeru protoka.

2.1.1. Hidrofizičke zone akvifera

Hidrofizičke zone akvifera su prikazane na slici 2.1.

Zona aeracije

Zona aeracije (nadizdanska, nezasićena zona) obuhvata slojeve litosfere od površine zemlje do površine slobodnih podzemnih voda i izgrađena je od peska, šljunka i peskovitog šljunka, što obezbeđuje prisustvo različitih oblika poroznosti (pora, pukotina, kaverni) često ispunjenih vazduhom, parom i fizički vezanim i kapilarnim vodama. Zona aeracije obezbeđuje vezu podzemnih voda sa vodama atmosferskog porekla koje se infiltriraju u dublje delove litosfere, popunjavajući rezerve podzemnih voda. Sa druge strane, preko zone aeracije podzemna voda i isparava, odnosno, smanjuje se rezerva podzemnih voda. Zona aeracije se sastoji od tri pojasa: rudinskog, prelaznog i kapilarnog (Dokmanović, 2021).

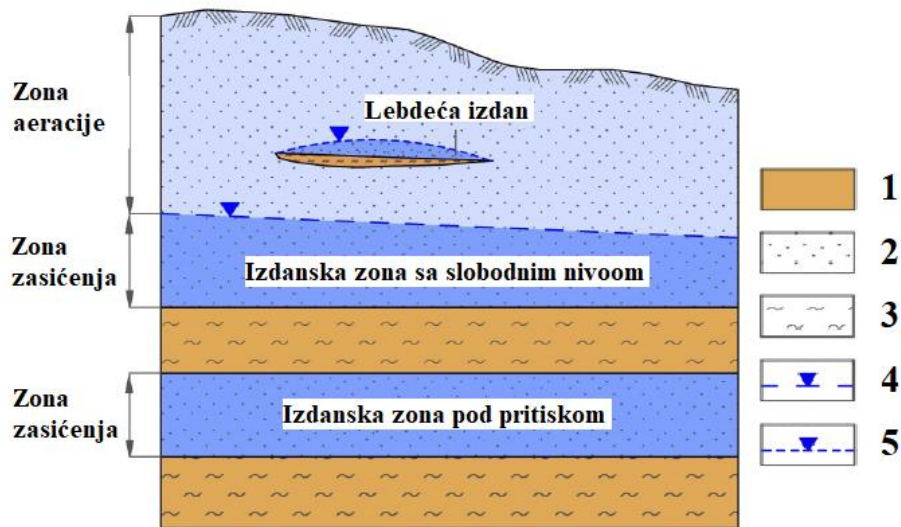
Rudinski pojas se nalazi na površini zone aeracije. Nakon padavina, izlučena voda se, delovanjem gravitacije, kreće na dole ka zoni zasićenja, tako da je u ovom pojasu slobodna voda kratko prisutna. Jedan mali procenat vode se fizički vezuje za čestice tla, predstavljajući zemljišnu vlagu.

Prelazni pojas je smešten između rudinskog i kapilarnog pojasa. Kao i u rudinskom pojasu, i u prelaznom pojasu se voda nalazi u vidu fizički vezane vode, dok je prisustvo vazduha u prelaznom pojasu znatno veće nego u rudinskom. Ukoliko se u prelaznom pojasu nalaze vodonepropusne stene, u tom slučaju može doći do formiranja lebdeće izdani, odnosno malih akumulacija slobodnih podzemnih voda čiji se nivo razlikuje od slobodnog nivoa podzemnih voda.

Kapilarni pojas se nalazi direktno iznad zone zasićenja slobodnim podzemnim vodama. Da bi se formirao kapilarni pojas, neophodno je da se u stenama nalaze kapilarne pore. Kako je ovaj pojas u direktnoj vezi sa zonom zasićenja, njegova dinamika je u direktnoj zavisnosti od kolebanja nivoa podzemnih voda.

Zona zasićenja podzemnim vodama

Zona zasićenja podzemnim vodama obuhvata delove litosfere ispod slobodnog nivoa podzemnih voda, odnosno između zone aeracije/vodonepropusnih stena ka površini i vodonepropusnih stena ka dubini (slika 2.1.). Voda se zadržava u prostorima između kamenja, peska, zemlje i šljunka. Koliko će akvifer da zadržava vodu zavisi od veličine kamenja i aranžmana istih sa česticama peska i šljunka. Slojevi rastresitih sitnijih čestica (kao što je pesak) zadržavaju više vode od slojeva sastavljenih od kamenja i čestica krupnije granulacije (Dokmanović, 2021).



Slika 2.1. Hidrofizičke zone akvifera: 1-vodonepropusna stena; 2-pesak; 3-glina; 4-slobodni nivo podzemnih voda; 5-nivo lebdeće izdani (prema Dokmanović, 2021)

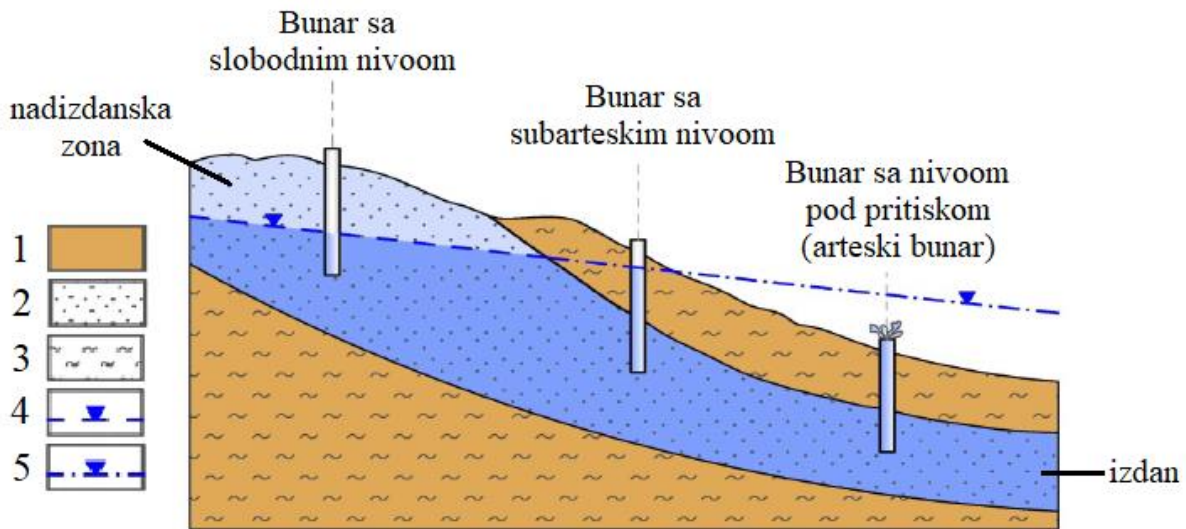
2.1.2. Hidrodinamička klasifikacija akvifera

Akviferi sa slobodnim nivoom

Akviferi sa slobodnim nivoom formiraju se u vodonosnim sredinama koje su pozicionirane na vodopropusnim ili relativno vodonepropusnim sredinama, a preko zone aeracije povezane sa atmosferom (slika 2.2.). Ovaj tip akvifera je široko rasprostranjen u prirodi. Površina nivoa izdani je u neposrednoj vezi sa atmosferom preko zone aeracije izgrađene od peska, što uslovljava da pritisak na površini slobodnih podzemnih voda bude jednak atmosferskom, te da klimatski faktori utiču na temperaturu, mineralizaciju, hemijski, gasni i bakteriološki sastav podzemnih voda. Nivo akvifera, odnosno površina slobodnih podzemnih voda, fluktuiru u zavisnosti od doticanja i oticanja vode iz akvifera (Dokmanović, 2021).

Akviferi sa nivoom pod pritiskom

Akviferi sa nivoom pod pritiskom nazivaju se još i arteskim akviferima. Ovaj tip akvifera formira se u vodonosnim geološkim sredinama pokrivenim vodonepropusnim ili relativno vodonepropusnim strukturama izgrađenim od gline. Pritisak koji postoji u ovom tipu akvifera dovodi do izdizanja nivoa podzemnih voda iznad vodonepropusne povlate, te bušenjem bunara voda izlazi pod pritiskom. Kako se akvifer sa nivoom pod pritiskom formira između vodonepropusne podine (donja granica akvifera) i povlate (gornja granica akvifera), zona aeracije izostaje kod ovog tipa akvifera. Usled odsustva zone aeracije, akviferi pod pritiskom su manje podložni uticaju klimatskih uslova, a samim tim i manje podložni zagađenju sa površine (Dokmanović, 2021).



Slika 2.2. Akvifer sa slobodnim nivoom i sa nivoom pod pritiskom: 1-vodonepropusna stena; 2-pesak; 3-glina; 4-slobodni nivo podzemnih voda; 5-nivo podzemnih voda pod pritiskom (prema Dokmanović, 2021)

2.1.3. Hranjenje akvifera

Hranjenje akvifera može biti prirodno, unapređeno, indukovano, slučajno i projektovano.

Prirodno hranjenje

Prirodno hranjenje akvifera je omogućeno atmosferskim padavinama (sneg i kiša), površinskim jezerima i rekama koje se filtriraju kroz pore u nezasićenoj zoni i infiltriraju nadole dok ne dođu do zasićene zone, kao i iz susednih akvifera. Brojni faktori utiču na stepen infiltracije vode u akvifer. Koliki procenat atmosferskih padavina će dopreti do podzemnih voda zavisi od atmosferskih prilika (temperature i vlažnosti vazduha, količine padavina), tipa reljefa, brojnosti i sastava vegetacije, dubine podzemnih voda (Bouwer, 2002, Dokmanović, 2021).

Unapređeno hranjenje akvifera

Osnovni pristup u ovakvom načinu hranjenja akvifera zasniva se na manipulaciji vegetacijom. Jedna od glavnih uloga korenskog sistema biljaka je, osim stabilizacije strukture zemljišta, zadržavanje vode. Biljke koje poseduju vrlo razvijene korenске sisteme zadržavaju i više vode. Kako bi se omogućilo da manja količina vode bude zadržana u zemljištu, odnosno da bi veća količina vode došla do podzemnih voda, biljke sa većim korenским sistemima bivaju zamenjene vegetacijom čiji je koren plitak. Na taj način se pospešuje povećanje zaliha podzemnih voda (Bouwer, 2002).

Indukovano hranjenje akvifera

U osnovi ovog načina prihranjivanja akvifera je postavljanje bunara blizu potoka ili reka. Kada nivo podzemnih voda opadne, rečna voda biva filtrirana kroz sediment aluvijona, što doprinosi i poboljšanju kvaliteta podzemnih voda (Bouwer, 2002; Sufyan et al., 2024).

Slučajno hranjenje akvifera

Usled različitih ljudskih aktivnosti dolazi do nenamernog hranjenja akvifera. Osim izlivanja voda iz sabirnih jama, drenaža nakon navodnjavanja jedan je od glavnih izvora slučajnog punjenja. Međutim, ovakav vid ljudskih aktivnosti može da dovede do kontaminacije podzemnih voda poljoprivrednim hemikalijama (Bouwer, 2002).

Projektovano hranjenje akvifera

Dva osnovna pristupa u projektovanom hranjenju akvifera obuhvataju tehnike za površinsko i podzemno punjenje. Površinske metode zasnivaju se na izgradnji brana, bazena, veštačkih močvara, u plavljenju određene regije, preteranom navodnjavanju itd. Osnovni princip je u tome da se poveća kontaktna površina između vode i zemljišta. Ovaj pristup se primenjuje za punjenje akvifera čija je nezasićena zona permeabilnija, odnosno voda migrira od površine ka većim dubinama dovoljnom brzinom da ne dolazi do preterane evaporacije vode. Kvalitet vode prolaskom kroz sediment biva poboljšan, jer organske materije, teški metali i bakterije ostaju vezane za čestice sedimenta (Bouwer, 2002; Sufyan et al., 2024).

Za punjenje akvifera sa nivoom pod pritiskom pristupa se metodama za podzemno punjenje, kao što je kopanje jama i bunara. Osnovni princip je da se iskopane jame ili bunari ispune sitnim šljunkom i grubim peskom, te da se voda cevima doprema do ovih struktura i prolaskom kroz ispunu filtrira pre nego što dospe do podzemnih voda (Bouwer, 2002; Sufyan et al., 2024).

2.2. Nafta i naftni proizvodi

Sirova nafta se sastoji od brojnih jedinjenja koja se mogu podeliti u nekoliko grupa. *Alkani* (parafini) su zasićeni ugljovodonici linearnog i razgranatog niza. Alkani dužine lanca od C5 – C10 se prerađuju u benzin, od C9 – C16 u dizel, kerozin i mlazna goriva, dok se alkani dužine >C16 prerađuju u motorna i lož-ulja. *Cikloalkani* (naftaleni) su zasićeni ugljovodonici u obliku prstena. Prilikom prerade nafte se od cikloheksana, supstituisanih ciklopentana i cikloheksana dobijaju prekursori za aromatične ugljovodonike. *Aromatični ugljovodonici* (areni) se sastoje od monoaromatičnih i policikličnih aromatičnih ugljovodonika (engl. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs*). Monoaromatična jedinjenja sadrže jedan benzenov prsten i u ovu grupu spadaju benzen, toluen, etilbenzen i ksilen (engl. *Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene, BTEX*). Oni su prisutni u lakšim frakcijama sirove nafte, ali u malim koncentracijama. Policiklični aromatični ugljovodonici su izgrađeni od dva ili više benzenovih prstena i neki od predstavnika su naftalen, antracen, fenantren, piren. Najzastupljeniji su u težim frakcijama sirove nafte. Ostatak čine *smole, asfalteni*, kao i organska jedinjenja koja sadrže azot, sumpor i kiseonik, poznatija kao *NSO jedinjenja* (engl. *Nitrogen-, Sulfur- and Oxygen-containing compounds, NSO*) (Bacosa et al., 2022; Chandra et al., 2013; Gojgić-Cvijović et al., 2012; Logeshwaran et al., 2018; Maletić et al., 2011; Ossai et al., 2020).

Na osnovu broja ugljenikovih atoma, naftni ugljovodonici se mogu klasifikovati u četiri frakcije: *frakciju 1* čine je isparljivi ugljovodonici (molekuli dužine C6 – C10); *frakcija 2* je sastavljena od srednje isparljivih i ugljovodonika koji se lako ekstrahuju (molekuli dužine C10 – C16); u *frakciju 3* se ubrajaju neisparljivi i ugljovodonici koji se teže ekstrahuju (molekuli dužine C16 – C34); dok u *frakciju 4* spadaju najmanje isparljivi ugljovodonici koji su nerastvorljivi i veoma teški za ekstrahovanje (molekuli dužine C35 – C50). Frakcije 1 i 2 su lakše frakcije i mogu da izazovu akutnu toksičnost zbog svoje visoke rastvorljivosti u vodi i bioaktivnosti (Khan et al., 2018; Logeshwaran et al., 2018).

Proces rafinisanja (prerade) nafte podrazumeva uklanjanje određenih jedinjenja iz sirove nafte i prilagođavanje vrste, strukture i sadržaja ugljovodonika u krajnjem proizvodu, a u skladu sa ciljnim proizvodom. Na primer, kako bi dizel gorivo bilo boljeg kvaliteta, neophodno je da sadržaj *n*-alkana bude veći od *izo*-alkana, jer *izo*-alkani imaju veći oktanski broj, a manji cetanski broj, što je sastav koji je poželjan kod benzina (Liu et al., 2023).

Sastav i koncentracija frakcije dizela koja se rastvara u vodi (engl. *Water Soluble Fraction, WSF*) zavisi od tehnološkog procesa prerade nafte za dobijanje dizela, kao i sastava dizela. Poznato je da se WSF sastoji od nekoliko toksičnih komponenti, kao što su PAH-ovi male molekulske težine (naftalen, fenantren), monoaromatični ugljovodonici (BTEX jedinjenja), fenoli, heterociklične komponente koje sadrže azot ili sumpor, kao i teški metali (Santos et al., 2013).

2.3. Zagađenje životne sredine naftom i naftnim proizvodima

Intenzivna urbanizacija i industrijski rast narušavaju prirodni balans i dovode do različitih tipova kontaminacije slatkovodnih izvora, podzemnih voda, sedimenta i zemljišta. Jedan od najvećih izvora zagađenja je naftna industrija. Nekontrolisano ispuštanje naftnih ugljovodonika u životnu sredinu je rezultat eksploatacije nafte i gasa, njihove prerade, transporta i skladištenja, kao i akcidenata koji rezultuju naftnim mrljama (Das i Chandran, 2011).

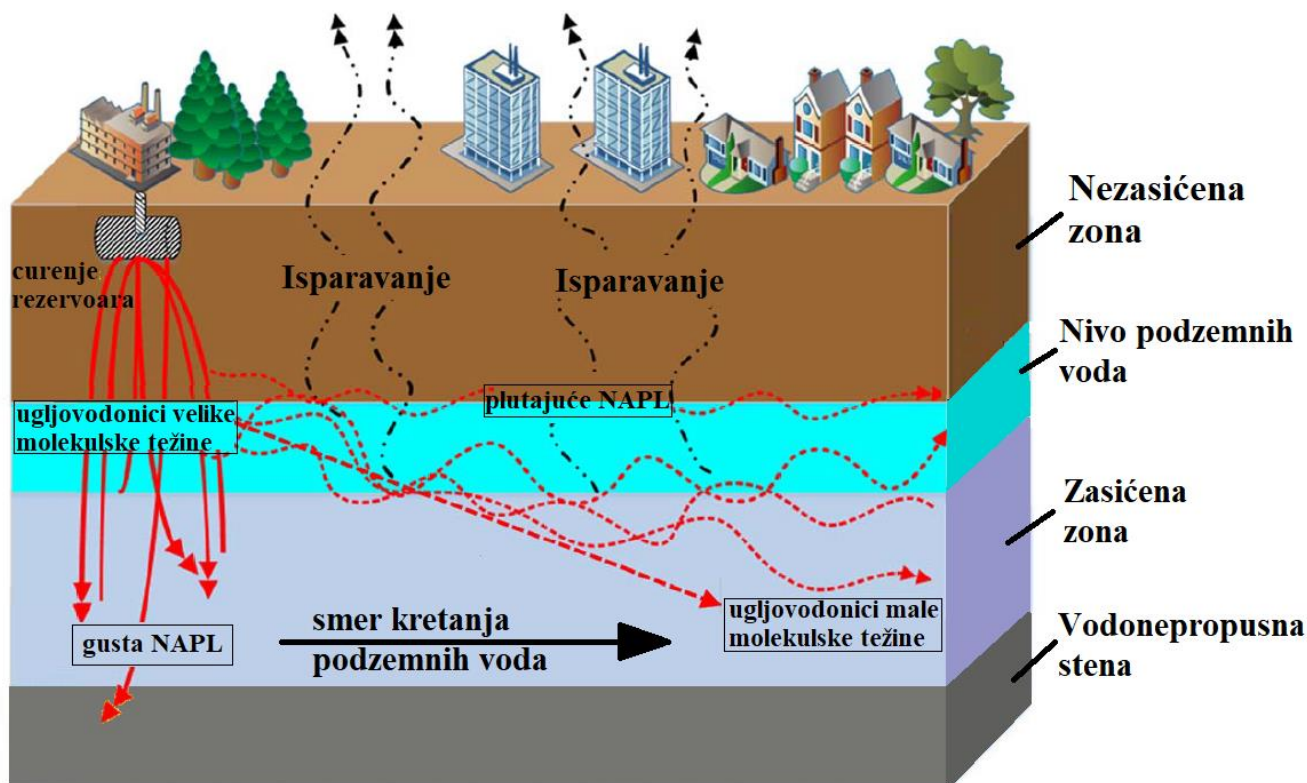
Kada ovi polutanti dospeju u zemljište, sediment, površinske i podzemne vode, oni predstavljaju veliku pretnju. Pored akutnih stanja koja se javljaju nakon izlaganja naftnim jedinjenjima, kao što su iritacija, mučnina i vrtoglavica, dugoročna kontaminacija može da ima različite toksične efekte na ljude i životinje, uključujući hemotoksične, kancerogene, teratogene, mutagene efekte koji dovode do dugoročnih oštećenja različitih sistema organa (Bacosa et al., 2022; Kehew i Lynch, 2011).

Nakon ispuštanja u životnu sredinu naftni ugljovodonici podležu različitim fizičkim, hemijskim i biološkim promenama. Ovi procesi uključuju isparavanje alifatičnih ugljovodonika manje molekulske težine u atmosferu, adsorpciju na čestice zemljišta i organske supstance, biotransformaciju, biodegradaciju, fotooksidaciju, emulzifikaciju. Šta će se od navedenog dešavati u mnogome zavisi od prirode, sastava, fizičkih i hemijskih osobina ugljovodonika (Abdel-Shafy i Mansour, 2016; Khan et al., 2018; Logeshwaran et al., 2018).

2.3.1. Zagađenje zemljišta

Nakon ispuštanja u životnu sredinu, ugljovodonici nafte prolaze kroz zemljište usled dejstva gravitacije i dolaze do podzemnih voda gde se šire lateralno (slika 2.3.). U zavisnosti od fizičko-hemijskih parametara naftni ugljovodonici u nezasićenoj zoni akvifera mogu da se rastvore u vodi, adsorbuju na čvrste organske čestice i čestice sedimenta, ispare ili formiraju nevodenu tečnu fazu (*engl. Non-Aqueous Phase Liquids, NAPLs*). U zavisnosti od gustine, NAPLs mogu dalje da se klasifikuju u laku nevodenu tečnu fazu (*engl. Light Non-Aqueous Phase Liquids, LNAPLs*) i gustu nevodenu tečnu fazu (*engl. Dense Non-Aqueous Phase Liquids, DNAPLs*) (Gupta i Gandhi, 2023; Logeshwaran et al., 2018). LNAPLs se šire površinom podzemne vode, dok DNAPLs padaju na dno akvifera i, iako se ne rastvaraju u vodi, mogu da ugroze zalihe podzemnih voda (slika 2.3.) (Romantschuk et al., 2023). Male kapljice naftnih ugljovodonika veće molekulske mase i manje mobilnosti koje ostaju u porama čestica zemljišta i adsorbovane na glini predstavljaju rezidualnu fazu koja se ponaša kao kontinuirani izvor zagađenja podzemne vode naftnim ugljovodonicima (Kehew i Lynch, 2011; Logeshwaran et al., 2018). Zbog svoje hidrofobnosti naftni ugljovodonici imaju visok afinitet ka organskoj materiji i bivaju adsorbovani na organske supstance u zemljištu i sedimentu (Logeshwaran et al., 2018).

Ugljovodonične zagađujuće supstance imaju različite efekte na teksturu zemljišta, njegovu kompaktnost, strukturu, zasićenu hidrauličnu provodljivost i hemijska svojstva zemljišta kao što je sadržaj minerala i teških metala. Kada dospeju u podzemnu vodu, lakše frakcije ugljovodonika plivaju na površini vode formirajući tanak površinski film, dok se teže frakcije akumuliraju u sedimentu na dnu akvifera (slika 2.3.) (Logeshwaran et al., 2018). Sezonske fluktuacije nivoa podzemnih voda dovode do konstantne migracije zagađujućih supstanci između nezasićene i zasićene zone akvifera. Kako je sediment integralna komponenta akvatičnih oblasti, on može da bude sekundarni izvor zagađenja.



Slika 2.3. Kretanje naftnih zagađujućih supstanci kroz zemljište i sediment nakon ispuštanja u životnu sredinu (prema Logeshwaran et al., 2018)

2.3.2. Zagađenje vode

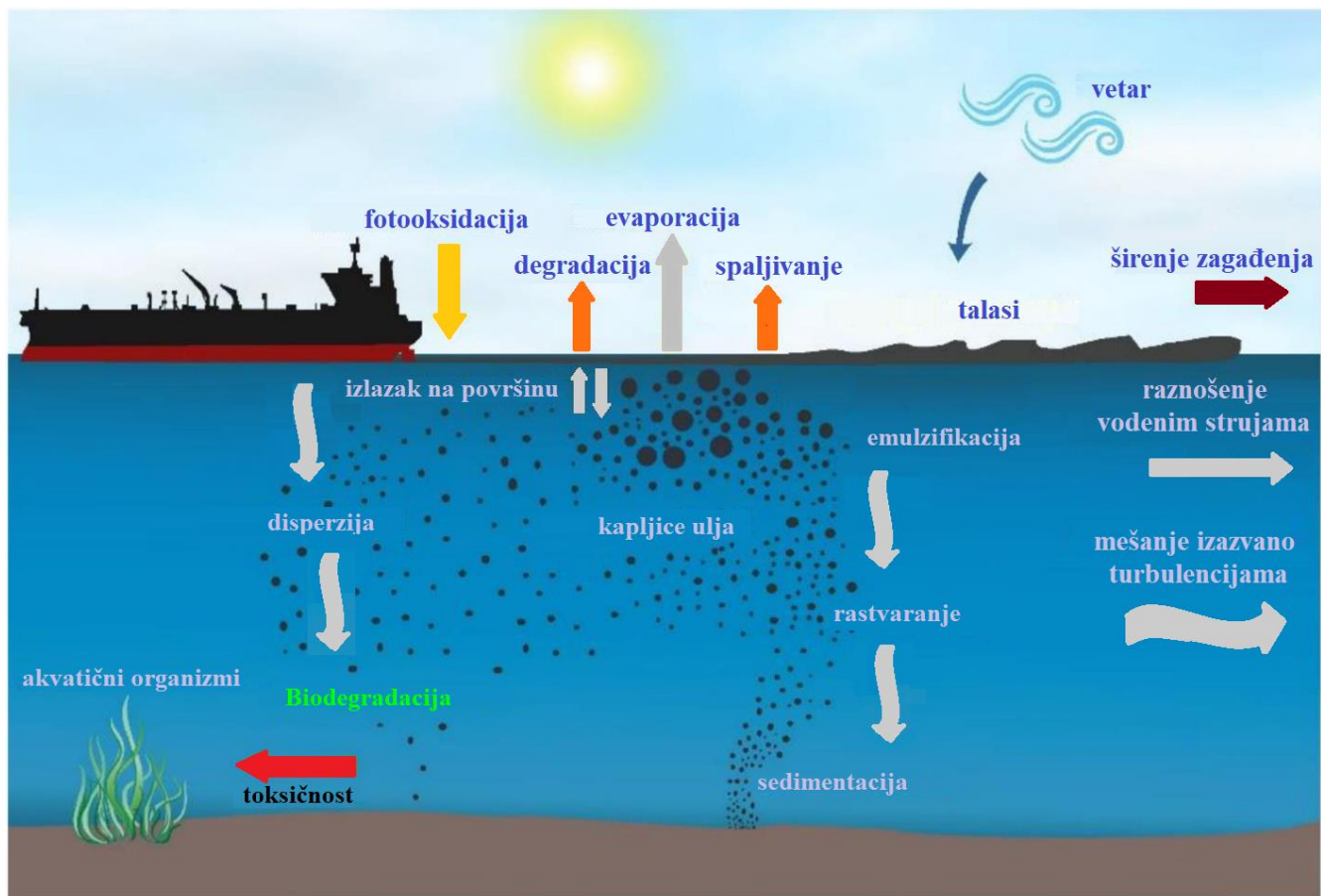
Kada dođe do ispuštanja nafte i naftnih derivata u slatkovodne ili marinske ekosisteme, najpre dolazi do evaporacije lako isparljivih frakcija (npr. alkana male molekulske mase i monoaromatičnih ugljovodonika).

Usled vetra i vodenog saobraćaja koji formiraju talase dolazi do mešanja nafte sa vodom, odnosno emulzifikacije, pri čemu nastaje emulzija tipa „voda u ulju“ i formiranja kapljica. Veće kapljice ostaju na površini dok manje mogu da potonu ispod površine i da, pod uticajem budućih turbulencija, ponovo isplivaju na površinu (Bacosa et al., 2022).

Naftni ugljovodonici mogu da budu adsorbovani na čestice peska i mulja i da padnu na dno ili da, pod delovanjem turbulencija, budu razneseni strujama na mesta udaljena od inicijalnog ispuštanja. Kada dospeju na dno ove čestice tokom vremena mogu da budu pokrivene sedimentom, što može da, u slučaju anaerobnih uslova, utiče na dalju sudbinu polutanta u smislu usporene degradacije ili čak potpunog odsustva iste, što za posledicu može da ima permanentno prisustvo kontaminanta u sedimentu.

Kao što je pomenuto, od posebnog interesa je WSF nafte, pre svega zbog toga što je izuzetno toksična za akvatične organizme, kao i zbog činjenice da može da ima dugoročne posledice na područja koja su udaljena od samog mesta inicijalnog akcidenta (Müller et al., 2019). Osim tehnološkog procesa za dobijanje dizela i sastava dizela, sastav i koncentracija WSF dizela zavisi i od svojstava i temperature vode.

Na slici 2.4. je prikazano kretanje i transformacija naftnih zagađujućih supstanci nakon ispuštanja u vodenu sredinu.



Slika 2.4. Kretanje i transformacija naftnih zagađujućih supstanci nakon ispuštanja u vodenu sredinu (prema Bacosa et al., 2022)

2.4. Uklanjanje naftnog zagađenja iz zemljišta

Naftno zagađenje iz zemljišta se može ukloniti fizičko-hemijskim i biološkim metodama.

2.4.1. Fizičko-hemijske metode

2.4.1.1. Termalna desorpcija

Termalna desorpcija je metoda fizičkog odvajanja isparljivih i poluisparljivih komponenata iz naftnih jedinjenja od čestica zemljišta. Kontaminirano zemljište se zagreva ili pod vakuumom ili u nekom gasnom nosaču. Termalna desorpcija može se u osnovi podeliti na termalnu desorpciju niske (100 – 300 °C) i visoke temperature (300 – 550 °C) (Vidonish et al., 2016). Niže temperature su pogodnije za uklanjanje isparljivih naftnih ugljovodonika, dok se više temperature primenjuju za teško isparljive frakcije (Cho et al., 2020).

Oprema za termalnu desorpciju je modularnog tipa, što znači da tretman može da se odvija *ex situ* (van mesta inicijalne kontaminacije) i *in situ* (na samoj kontaminiranoj lokaciji), ali zahteva veliku površinu za instalaciju. Takođe je tretman ograničen na dubine do 7 – 8 metara iz ekonomskih i operativnih razloga. Tokom tretmana u atmosferu se emituju štetni gasovi koji zatim predstavljaju novo zagađenje (Vidonish et al., 2016). Pored toga, zemljište tretirano termalnom desorpcijom ima narušenu teksturu, sadržaj minerala, hidrauličnu provodljivost, sposobnost zadržavanja vode, smanjen sadržaj organske materije kao i izmenjenu pH vrednost i sadržaj hranljivih supstanci. Takođe je i ponovno uspostavljanje mikrobne zajednice značajno usporeno (Lee et al., 2021).

2.4.1.2. Spaljivanje

Spaljivanjem kontaminiranog zemljišta na temperaturama između 870 – 1200 °C dolazi do potpune degradacije naftnih jedinjenja. Tokom spaljivanja je neophodno kontrolisati koncentraciju kiseonika da ne bi došlo do eksplozije u reakciji sa naftnim jedinjenjima (Ossai et al., 2020). Kako tokom spaljivanja nastaju toksični gasovi, kao što su CO, SO₂, N₂O, CO₂, emisije gasove je neophodno filtrirati pre ispuštanja u vazduh (Vidonish et al., 2016). Metoda spaljivanja nije primenljiva na zagađena zemljišta manje kubikaže, dok je ekonomska isplativost većih količina upitna, jer je spaljivanje tretman koji se odvija *ex situ*.

2.4.1.3. Piroliza

Piroliza podrazumeva zagrevanje kontaminiranog zemljišta na temperaturama između 400 – 1200 °C, što je temperatura slična primenjenoj temperaturi prilikom spaljivanja. Međutim, piroliza se odvija u uslovima bez kiseonika i zagrevanje se vrši indirektno. Sa povećanjem temperature najpre se uklanjaju ugljovodonici malih molekulskih masa. Na temperaturama između 250 – 300 °C nastaju slobodni radikali koji su visoko reaktivni, te dovode do daljeg procesa krakovanja ili do reakcija kondenzacije aromatičnih ugljovodonika. Kao produkt pirolize nastaje pepeo koji se može koristiti za obogaćivanje zemljišta ugljenikom (Vidonish et al., 2016).

2.4.1.4. Ispiranje zemljišta

Ispiranje zemljišta je jednostavna i efikasna metoda za uklanjanje različitih organskih polutanata iz zemljišta prilikom koje se koriste različite hemikalije, kao što su kiseline, baze, oksidujući agensi, kao i surfaktanti. Ova metoda može da se primeni *ex situ* i *in situ*, pri čemu svaka od njih ima svoje prednosti i mane. *Ex situ* je brži pristup, ali tom prilikom dolazi do preturbacija zemljišta, što utiče na floru i faunu tretirane lokacije. *In situ* tretman traje duže, ali su troškovi manji, jer nije neophodno iskopavati i transportovati velike količine kontaminiranog zemljišta. Sama metoda se zasniva na ekstrakciji i separaciji kontaminanta korišćenjem agenasa. Poslednjih godina se za ispiranje zemljišta sve više koriste surfaktanti, koji mogu biti katjonski, nejonski, anjonski, mešoviti kao i biosurfaktanti. Izbor surfaktanta zavisi od vrste kontaminanta, litološkog sastava zemljišta kao i od svojstava surfaktanta (Befkadu i Chen, 2018).

2.4.2. Biološke metode

2.4.2.1. Halde

Halde ili biološke gomile su projektovane *ex situ* remedijacione tehnologije koje omogućavaju tretman kontaminiranog zemljišta. One podrazumevaju formiranje gomile kontaminiranog zemljišta na podlozi koja ima dobru hidroizolaciju i sistem za sakupljanje tečnosti u slučaju curenja sa halde (Ossai et al., 2020). Tokom tretmana je neophodno obezbediti adekvatan sadržaj kiseonika (prevrtanjem/mešanjem gomile), vlažnost, pH, temperaturu kao i brojnost mikroorganizama i sadržaj hranljivih supstanci u formiranoj gomili (Adedeji et al., 2022). Kako se halde formiraju na otvorenim površinama, veoma su podložne uticaju spoljašnjih faktora. S toga je neophodno obezbediti zaštitu od sunca (UV zračenja), padavina, kao i omogućiti povoljne temperaturne uslove.

2.4.2.2. Bioprovetravanje

Osnovni princip bioprovetravanja je uvođenje vazduha bogatog kiseonikom u dublje, nezasićene slojeve zemljišta. Vazduh se uvodi pod niskim pritiskom kako bi se umanjilo isparavanje naftnih frakcija. Aeracija pospešuje rast i metabolizam aerobnih mikroorganizama (Ossai et al., 2020). Iako je ovaj pristup jednostavan i ekonomski isplativ, uvođenje vazduha pospešuje kretanje polutanta u zemljištu. Osim toga, bioprovetravanje je ograničeno na zemljišta i sedimente koji imaju dobru propustljivost i nije efikasno u tretiranju zemljišta kontaminiranih teškim ugljovodonicima (Adedeji et al., 2022).

2.4.2.3. Enkapsulacija mikroorganizama

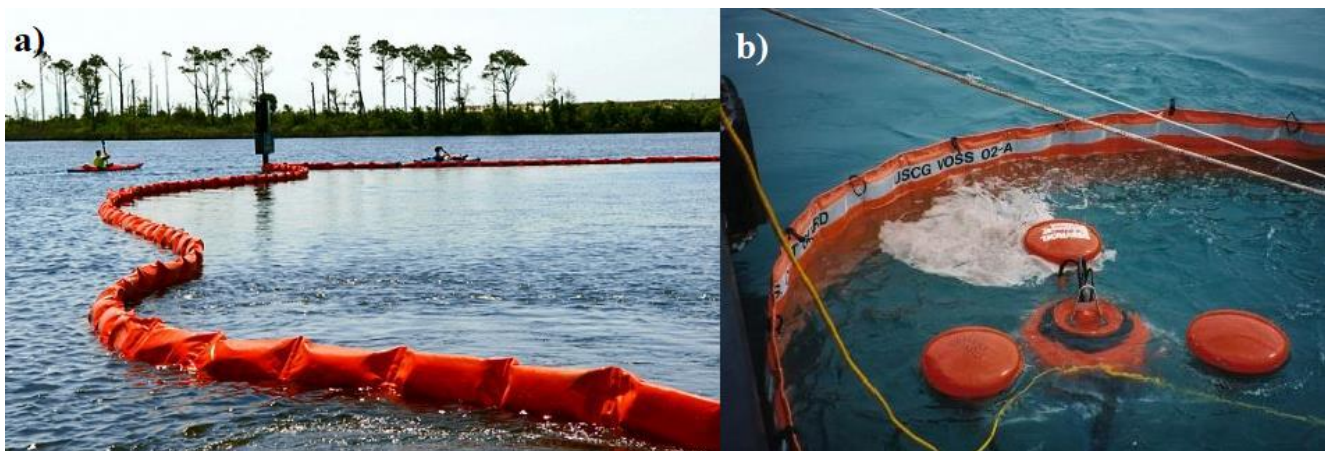
U osnovi ove metode nalazi se enkapsulacija odabranih sojeva mikroorganizama u porozna mikroznca (*engl. microbeads*) izgrađena od polimera koja su nerastvorna. Enkapsulacija ima za cilj da zaštiti mikroorganizme od negativnih i toksičnih uticaja kontaminanta, kao i drugih abiotičkih i biotičkih uticaja, dok poroznost istovremeno omogućava transport nutrijenata, kiseonika i kontaminanta unutar mikroznaca. Prilikom primene ove metode je važno odabrati odgovarajuću veličinu mikroznaca, jer neadekvatna veličina može sprečiti transport kiseonika i supstrata do mikroorganizama, te može dovesti do zapušavanja pora u zemljištu ukoliko su mikroznca veća od pora zemljišta (Park et al., 2021).

2.5. Uklanjanje naftnog zagađenja iz vodenih staništa

U zavisnosti od veličine vodene površine i geografske lokacije koja je zahvaćena naftnom mrljom, primenjuju se različite mehaničke, fizičke ili hemijske i biološke metode uklanjanja.

2.5.1. Mehaničke metode

Mehaničke metode podrazumevaju angažovanje specijalnih mašina (bumova, skimera, plutajućih brana i barijera), što je finansijski zahtevnija metoda. Najčešće se koristi kombinacija ovih metoda, odnosno, pomoću bumova i plutajućih brana se ograničava širenje naftnih mrlja (slika 2.5a.), da bi se zatim nafta pokupila skimerima (slika 2.5b.). Ove metode su primenljive u mirnim morima i vodenim površinama (Oliveira et al., 2021).



Slika 2.5. Primena bumova (a) i skimera (b) u uklanjanju naftne mrlje (preuzeto od Tewari i Sirvaiya, 2015)

2.5.2. Fizičko-hemijske metode

2.5.2.1. *In situ* spaljivanje

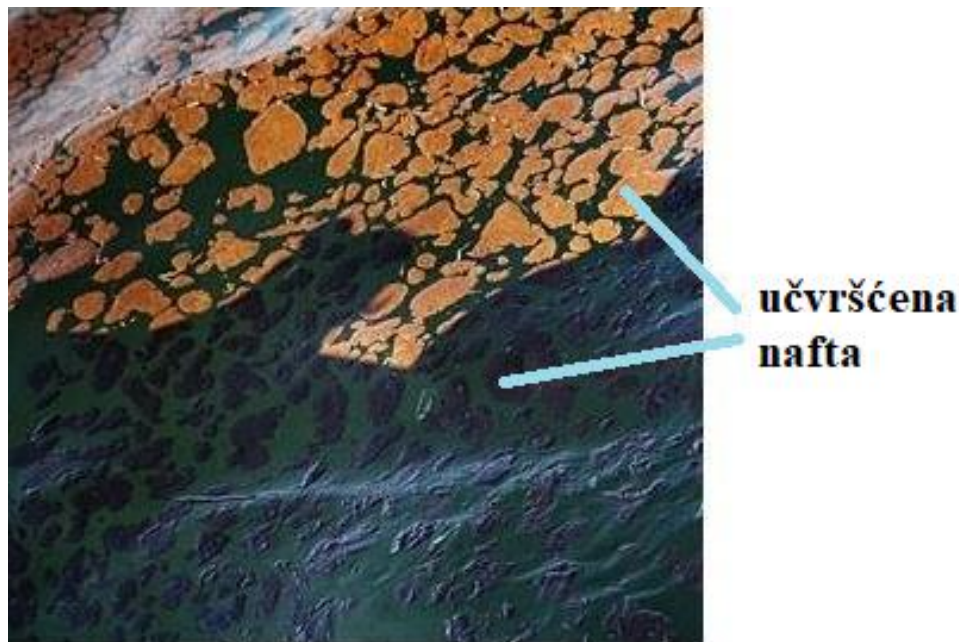
Primenjuje se neposredno nakon akcidenta pre nego što isparljive komponente počnu da se oslobađaju u atmosferu i pre nego što se naftna mrlja proširi. Prisustvo isparljivih komponenti je neophodno za sam postupak. Da bi ova metoda mogla da bude primenjena, neophodno je da je lokacija spaljivanja udaljena od naseljenih mesta, obale, zapaljivih objekata, kao i staništa živih organizama. Iako se ovom metodom za relativno kratko vreme može ukloniti značajna količina naftnog polutanta, visoka emisija CO, CO₂, SO₂ i PAH-ova predstavlja sekundarnu pretnju za životnu sredinu (Al-Majed et al., 2012; Bandura et al., 2017; Oliveira et al., 2021).

2.5.2.2. Upotreba surfaktanata

Zbog svog amfifilnog karaktera, površinski-aktivni agensi (surfaktanti) smanjuju međufazni napon između nafte i vode, što dovodi do disperzije i razređivanja nafte i olakšava mehaničko uklanjanje.

2.5.2.3. Upotreba učvršćivača

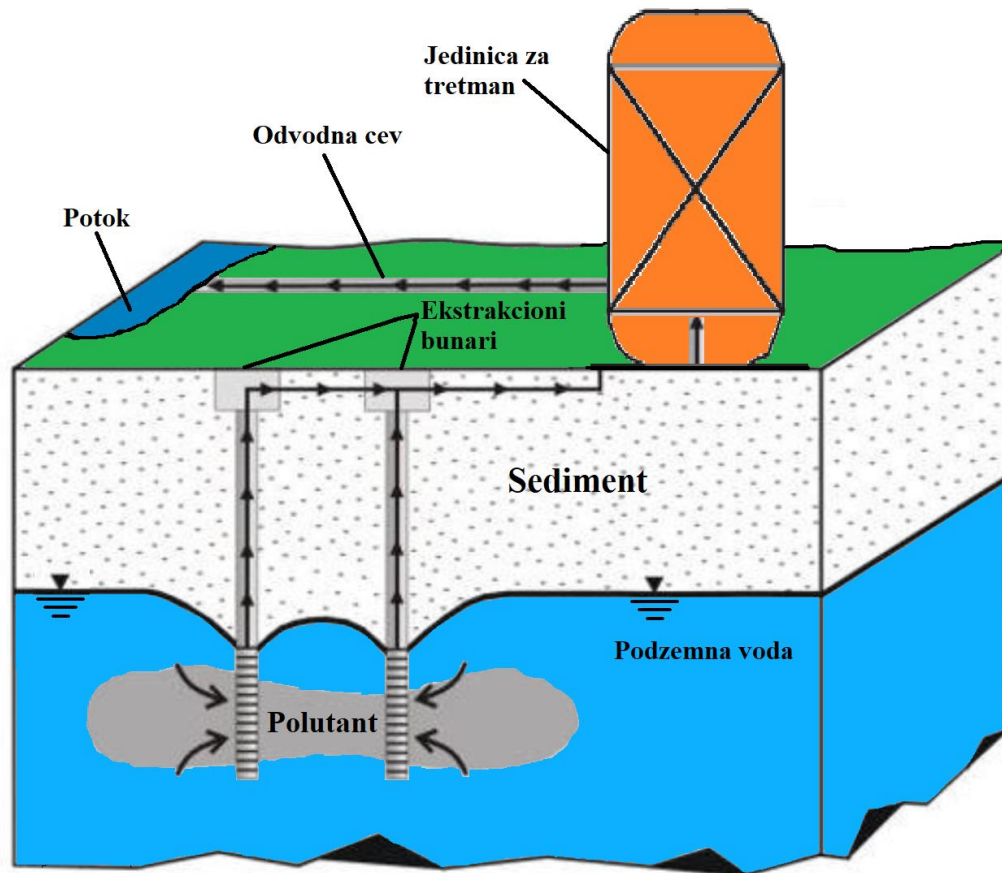
Učvršćivači su hidrofobni organski polimeri granularne strukture koji reaguju sa naftom i formiraju čvrstu strukturu koja pluta na površini vode i može se lako ukloniti mehaničkim putem (slika 2.6.). Međutim, kapacitet učvršćivača je veoma mali, što zahteva upotrebu velike količine materijala. Dodatni problem sa ovom metodom su potencijalna toksična svojstva učvršćivača, kao i poteškoće sa skladištenjem ovako nastale formacije (Bandura et al., 2017).



Slika 2.6. Naftna mrlja tretirana učvršćivačima (preuzeto od Hoang et. al., 2018)

2.5.2.4. „Pump-and-treat“ metoda

Metoda se koristi za uklanjanje naftnih polutanata, isparljivih i neisparljivih organskih jedinjenja i drugih štetnih supstanci iz podzemnih voda. Osnovni princip metode sastoji se u ispumpavanju podzemne vode na površinu i njen tretman nekom od fizičkih ili bioloških metoda (slika 2.7.). Efikasnost „pump-and-treat“ metode u uklanjanju naftnih zagađujućih supstanci zavisi, između ostalog, i od svojstva polutanta i trajanja zagađenja. Ukoliko se radi o podzemnim vodama koje nisu sveže kontaminirane, a prisutna je i NAPL frakcija, ova frakcija biva vremenom adsorbovana na čestice zemljišta i ponaša se kao konstantni izvor zagađenja (Ossai et al., 2020).



Slika 2.7. Šematski prikaz „pump-and-treat“ metode (prema Pietrangeli et al., 2024)

2.5.2.5. Hemijska oksidoredukcija

Metoda je bazirana na primeni različitih hemijskih oksidanata kao što su vodonik peroksid, kiseonik, permanganat kao i fero jon (Fe^{2+}) u cilju razgradnje naftnih polutanata u podzemnoj vodi i sedimentu. Uvođenjem oksidanata u podzemnu vodu dolazi do transformacije, destrukcije i prevođenja naftnih zagađujućih supstanci u neopasna jedinjenja koja se dalje mogu tretirati drugim metodama. U kojoj meri će metoda biti efikasna zavisi od kontakta oksidansa i kontaminanta, što je uslovljeno kretanjem podzemne vode, fluktuacijama nivoa podzemnih voda, kao i svojstvima zemljišta, što je detaljnije opisano u poglavljima 2.6.4. i 2.6.5. (Ossai et al., 2020).

2.5.2.6. Upotreba sorbenata

Naziv „sorbent“ potiče od latinske reči „*sorbere*“, što u prevodu predstavlja materijal koji upija tečnost dok se ne postigne ekvilibrijum ili tačka zasićenja (Oliveira et al., 2021). Upotreba sorbenata za uklanjanje naftnih zagađujućih supstanci iz vode dobija sve više pažnje poslednjih godina. Razlog je njihova univerzalna priroda, ekonomska isplativost, kapacitet za uklanjanje rastvorljivih i nerastvorljivih organskih polutanata, kao i mogućnost regeneracije adsorbenata i njihove ponovne upotrebe (Bandura et al., 2017; Danehpash et al., 2018; Leone et al., 2013; Oliveira et al., 2021). Sorbenti se koriste i za uklanjanje nafte i produkata njene prerade iz vode i, prema nekim izveštajima, njihov kapacitet

uklanjanja dostiže 99,9% (Danehpash et al., 2018). Veoma važna karakteristika adsorbenata je da ne dolazi do produkcije toksičnih nusproizvoda prilikom njihove upotrebe (Robles-Mora et al., 2021).

Sorbenti koji se koriste za uklanjanje organskih kontaminanata se mogu podeliti u tri grupe:

-*prirodni organski sorbenti*;

-*sintetički organski sorbenti (sintetički polimeri)*;

-*neorganski mineralni sorbenti*.

Od prirodnih organskih sorbenata najčešće se koriste biljni materijali i poljoprivredni otpad (kokosove ljuske, ljuske pirinča, ljuske banana, treset, piljevina, borova kora, klip kukuruza, ljuske od krompira itd.) (Adeola i Forbes, 2020; Bandura et al., 2017; Danehpash et al., 2018; Lamichhane et al., 2016; Madhubashani et al., 2021; Markiewicz et al., 2020; Urgel et al., 2024).

Od sintetičkih organskih polimera, polipropilen, polietilen, poliakrilat, polistiren i poliuretan su najviše zastupljeni (Bandura et al., 2017; Danehpash et al., 2018; Madhubashani et al., 2021).

Neorganski mineralni sorbenti su gline, zeoliti, pesak, pepeo, perlit, vermikulit, grafit, bentonit itd. (Bandura et al., 2017; Leone et al., 2013; Madhubashani et al., 2021). Mineralni neorganski sorbenti su prirodnog porekla i mogu da se koriste u granulanoj formi ili u formi praška, odnosno, veličina čestica je u rasponu od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara (Bandura et al., 2017). Osnovne prednosti neorganskih mineralnih sorbenata su njihova otpornost na kiselu-bazne promene i nezapaljivi karakter (Oliveira et al., 2021).

Zajedničko za mineralne i prirodne sorbente je da imaju relativno malu specifičnu gustinu (od 0,45 do 0,90 kg/dm³), efikasni su, lako dostupni i nisu štetni za životnu sredinu. Sintetički polimeri sa druge strane, iako imaju znatno veći kapacitet sorpcije naftnih polutanata (nekoliko desetina g/g), lako su zapaljivi, proces regeneracije je težak, a prilikom spaljivanja se oslobađaju toksične supstance u vazduh (Bandura et al., 2017).

Kako efikasnost sorbenata zavisi od velikog broja faktora, kao što su vremenski uslovi, zapremina kontaminirane vode, površina na kojoj se prostire naftna mrlja, oni se najčešće koriste nakon sakupljanja nafte skimerima ili na područjima blizu obala (Oliveira et al., 2021).

Termin sorpcija predstavlja dva procesa koja se simultano odigravaju u sorbentu: adsorpcija i apsorpcija (Madhubashani et al., 2021; Oliveira et al., 2021). *Adsorpcija* je proces pri kome se joni, atomi ili molekuli vezuju za površinu adsorbenta. Za razliku od adsorpcije, tokom procesa *apsorpcije* joni, atomi i molekuli se vezuju i na površinu i u unutrašnjost materijala putem fizičkih, hemijskih i/ili elektrostatičkih privlačenja (Adeola i Forbes, 2020; Danehpash et al., 2018; Madhubashani et al., 2021; Oliveira et al., 2021). Prilikom tretmana voda, ovaj proces se odigrava u međuprostoru između čvrstog adsorbenta i kontaminirane vode (Danehpash et al., 2018). Samoju adsorpciji nafte najviše doprinose Van der Waalsove sile. Kako se ove nekovalentne interakcije dešavaju između funkcionalnih grupa sorbenta i nepolarnih molekula nafte (Madhubashani et al., 2021), ovaj proces je reverzibilan (Lamichhane et al., 2016).

Kada se govori o apsorpciji, najvažnije svojstvo sorbenta je specifična zapremina pora. Međutim, faktori kao što su morfološke karakteristike površine materijala, veličina čestica i pora sorbenta, kao i funkcionalne grupe koje uključuju N-H, C-S, C=O, su elementi koji utiču na efikasnost sorpcije (Oliveira et al., 2021). Dodatni faktori koji utiču na sorpciju organskih molekula su temperatura, pH, koncentracija sorbata, vreme kontakta i druga fizičko-hemijska svojstva sorbata (Adeola i Forbes, 2020).

2.6. Bioremedijacija

Bioremedijacija je biološka metoda koja se primenjuje za uklanjanje različitih zagađujućih supstanci iz životne sredine. Naftni ugljovodonici mogu biti uklonjeni iz životne sredine jedino ako se prevedu u biomasu, organsku supstancu u zemljištu ili ako se mineralizuju u ugljen dioksid, karbonate, metan, neorganske soli i vodu (Blackburn i Hafker, 1993). Ovaj proces se prirodno dešava u prirodi kroz biodegradaciju od strane oleofilnih mikroorganizama (Logeshwaran et al., 2018). Primena bioremedijacije za uklanjanje različitih organskih polutanata iz različitih matriksa je poslednjih decenija snažno podržana i dobija sve više pažnje zbog svoje efikasnosti, isplativosti i ekološki prihvatljivih nusprodukata (Sayara i Sánchez, 2020). Dodatno, bioremedijacija ima ključnu ulogu u kruženju nutrijenata i razumevanju toksičnosti i sudbine zagađujućih supstanci (Gu, 2016). Postoje dva osnovna tipa bioremedijacije:

1. prirodno smanjenje, koje se dešava kada su uslovi sredine povoljni za bioremedijaciju bez ljudske intervencije. Prirodno smanjenje može biti prikladan pristup, ali samo u slučaju kada se proceni da nema rizika od širenja kontaminacije (Romantschuk et al., 2023);
2. projektovana bioremedijacija, koja se koristi kada je neophodno ili samo stimulisati već prisutne mikroorganizme, ili uz to uvesti i mikroorganizme koji poseduju metaboličke kapacitete za razgradnju datog kontaminanta (Maletić et al., 2013).

Prirodno smanjenje zahteva minimum troškova, održavanja i ima najmanji uticaj na životnu sredinu, ali je vremenski zahtevna.

2.6.1. Projektovana bioremedijacija

Ukoliko u kontaminiranoj sredini autohtona zajednica mikroorganizama poseduje metaboličke puteve za razgradnju datog polutanta, ali se njegova koncentracija ipak ne smanjuje, vrlo je verovatno da neki od faktora koji utiču na proces bioremedijacije (poglavlja 2.6.4. i 2.6.5.) nije optimalan i predstavlja usko grlo procesa degradacije (Romantschuk et al., 2023). U takvim slučajevima je projektovana bioremedijacija pristup koji se preferira, jer uključuje modifikaciju uslova sredine na kontaminiranim lokacijama u željenim intervalima ubrzavajući proces degradacije polutanta. Ove modifikacije se postižu *biostimulacijom* i *bioaugmentacijom* koje će biti detaljnije opisane u sledećim poglavljima.

Projektovana bioremedijacija može da bude *in situ* i *ex situ*. *In situ* bioremedijacija akvifera podrazumeva tretman zemljišta, sedimenta i podzemne vode na datoj lokaciji, dok *ex situ* metodologija podrazumeva premeštanje zemljišta i podzemne vode na drugu lokaciju radi tretmana (Talley i Sleeper, 1997). Uspešnost procesa bioremedijacije zavisi i od vremena kontaminacije. Zemljišta sa dužom, istorijskom kontaminacijom su komplikovanija za bioremedijaciju, jer su naftni ugljovodonici postali manje biodostupni zbog adsorpcije na čestice zemljišta.

Iako o konceptu *in situ* bioremedijacije regulatorna tela, pa i sami izvođači, u teoriji imaju pozitivno mišljenje, kada se dođe do koraka o odabiru remedijacione tehnologije, ovaj pristup biva izuzet iz razmatranja, pre svega zbog varijabilnih terenskih uslova koji utiču na trajanje samog procesa remedijacije, a koji mogu da dovedu do potencijalnih finansijskih gubitaka. Međutim, analiza sprovedenih bioremedijacionih tretmana u Finskoj je pokazala da se *in situ* metodom može ostvariti energetska, pa samim tim i finansijska, ušteda i do 30% (Nikunen et al., 2017).

Tokom bioremedijacije je neophodno vršiti monitoring parametara koji utiču na brzinu bioremedijacije, a koji obuhvataju pH, temperaturu, rastvoreni kiseonik, prisustvo akceptora elektrona, kao i brojnost mikrobne zajednice, kako bi tokom celokupnog procesa uslovi sredine mogli da se

održavaju optimalnim za rast i metabolizam mikroorganizama. Kada neki od ovih parametara izađe iz optimalnih opsega, vrši se korekcija biostimulacijom i bioaugmentacijom.

2.6.1.1. Biostimulacija

Biostimulacija podrazumeva dodavanje nutrijenata, akceptora elektrona, kao što su azot (N), fosfor (P), kalijum (K), kiseonika (O₂), zatim (bio)surfaktanata, (bio)polimera i đubriva kako bi se stimulisao rast i metabolička aktivnost mikrobnih populacija (Gojgić-Cvijović et al., 2012; Ossai et al., 2020; Sayara i Sánchez, 2020). Za bioremedijaciju istorijskih zagađenja, kao i u situacijama kada je neophodno brzo ukloniti zagađujuću supstancu, biostimulacija je poželjan pristup, jer skraćuje vreme potrebno da mikroorganizmi metabolišu polutant (Udume et al., 2023).

Najvažniji mikronutrijenti su azot i fosfor, a u kontaminiranim staništima brže dolazi do njihovog iscrpljivanja, što nepovoljno utiče na rast mikrobnih zajednica (Sánchez Mata et al., 2023). Pored toga, azot je češće ograničavajući faktor u zemljištu i pokazalo se da dodavanje azotnih jedinjenja poboljšava oksidaciju naftnih ugljovodonika skraćujući vreme potrebno za bioremedijaciju. U anaerobnim uslovima azotna jedinjenja imaju dvojaku funkciju – služe kao terminalni akceptor elektrona i aktivator naftnih ugljovodonika (pre svega alkana) za biodegradaciju (Sarkar et al., 2016). Međutim, odabir jedinjenja za biostimulaciju je veoma važan. Naime, usled povećane koncentracije organskog ugljenika u ekosistemima kontaminiranim naftnim ugljovodonicima biostimulacija pomoću uree je neefikasna zbog lančanih reakcija koje se odvijaju u zemljištu nakon biostimulacije. Hidrolizom uree nastaje amonijum karbonat koji povećava pH zemljišta, što za posledicu ubrzava proces hidrolize i formiranje amonijaka koji isparava, te dodati azot ne biva iskorišćen od strane bakterija (Romantschuk et al., 2023).

Za uspešnu bioremedijaciju je važno i da ciljni polutant bude ograničavajući faktor rasta, jer bi u tom slučaju sojevi sposobni da isti metabolišu bili u kompetitivnoj prednosti u odnosu na nedegradere. Kada se planira bioremedijacija naftnih zagađujućih supstanci, treba izbegavati dodavanje drugih izvora ugljenika kako bi mikroorganizmi kao glavni izvor ugljenika koristili naftna jedinjenja (Romantschuk et al., 2023). Osim toga, a u skladu sa gore navedenim, je neophodno optimizovati odnos ugljenika, azota i fosfora (*C:N:P odnos*) u zemljištu kako bi bili adekvatno iskorišćeni. Odnos C:N:P koji se pokazao kao veoma uspešan je 100:10:1 (Wu et al., 2019).

Upotreba organskih đubriva sa postepenim oslobađanjem ima prednost u odnosu na neorganska đubriva, jer se organski nutrijenti oslobađaju tokom dužeg vremenskog perioda, što povoljno utiče na rast mikroba i istovremeno poboljšava kvalitet zemljišta (Macci et al., 2016).

Kao što je već pomenuto, mikroorganizmima su naftni ugljovodonici koji su vezani za čestice zemljišta nedostupni za degradaciju. Kako bi prevazišli ovu prepreku, mikroorganizmi sintetišu biosurfaktante koji smanjuju površinski napon čineći polutante dostupnim. Kao i biosurfaktanti, sintetički surfaktanti pomažu emulzifikaciju kapljica nafte kao i desorpciju naftnih ugljovodonika sa čestica zemljišta čineći ih lako dostupnim za biodegradaciju (Romantschuk et al., 2023).

2.6.1.2. Bioaugmentacija

Bioaugmentacija podrazumeva inokulaciju kontaminirane sredine mikrobnom biomasom, pri čemu je poželjno da se inokulum sastoji od konzorcijuma mikroorganizama, jer konzorcijum ima veći degradacioni kapacitet zahvaljujući sinergističkom učinku i kometaboličkim putevima u odnosu na pojedinačne sojeve (Gojgić-Cvijović et al., 2012; Marić et al., 2015; Ossai et al., 2020). Iz navedenih razloga je bioaugmentacija u širokoj upotrebi za tretman zemljišta i vode zagađene naftnim ugljovodonicima (Lyon i Vogel, 2013; Marić et al., 2015; Nur Zaida i Piakong, 2018; Poi et al., 2018). Iako je ustanovljeno da konzorcijum mikroorganizama razgrađuje sirovu naftu znatno efikasnije od

pojedinačnih sojeva, još uvek nema dovoljno podataka koji bi opisali precizan mehanizam, tj. genetsku pozadinu koja stoji iza razgradnje pojedinačnih komponenti (Chen et al., 2020). Kako bi se bolje razumela organizacija mikrobnih zajednica, npr. određenih grupa mikrobnih sojeva koji učestvuju u procesu degradacije, molekularne tehnike su značajno sredstvo (Gu, 2003). Novi pristup bioaugmentaciji, u kom se katabolički geni prenose u autohtone populacije pomoću plazmida kao vektora, je u povoju (Garbisu et al., 2017). U poslednje vreme se razmatra i poboljšanje bioremedijacije korišćenjem sintetičke biologije koja se bazira na „rudarenju“ gena iz baza podataka i modifikaciji prirodnih ćelijskih procesa, pa samim tim i metaboličkih puteva za razgradnju specifičnih hemijskih komponenti. Međutim, ovaj pristup bi trebalo da se posmatra sa oprezom, jer nepoznati i potencijalno toksični nusproizvodi mogu nastati kao rezultat metabolizma datih jedinjenja (Jaiswal i Shukla, 2020).

Ponavljanje bioaugmentacije u određenim vremenskim razmacima korišćenjem konzorcijuma mikroorganizama izolovanog iz zagađenog zemljišta ima svoje prednosti, jer zimogeni mikroorganizmi formiraju veliku, aktivnu biomasu nakon inokulacije u zemljište, što skraćuje proces bioremedijacije (Łebkowska et al., 2011). U suštini se najviši stepen degradacije postiže kombinacijom biostimulacije i bioaugmentacije (Shahsavari et al., 2017). Za uspešnu bioaugmentaciju je od suštinskog značaja dobro planiranje i održavanje sistema stabilnim kako bi se inokulisana mikrobn biomasa održala (Amiri et al., 2007).

2.6.2. Primena mikroorganizama u bioremedijaciji

Već dugi niz godina se mikroorganizmi uspešno koriste u remedijaciji životne sredine, odnosno za uklanjanje različitih organskih polutanata (Lin et al., 2022), naftnih ugljovodonika ili teških metala (Avdalović et al., 2016; Pande et al., 2022) iz različitih matriksa. Ovo ukazuje na ogroman potencijal mikroba, što se može smatrati jednim od evolucionih kapaciteta planete za samoprečišćavanje. Upotreba mikroorganizama u bioremedijaciji je u porastu zbog njihovih raznolikih bioloških osobina i izuzetne sposobnosti da razgrade polutante, a koje su pod uticajem brojnih adaptivnih mehanizama, kao što su promene u strukturi ćelijske membrane, produkcija površinski aktivnih agenasa, kao i upotreba efluks pumpi kako bi se smanjila koncentracija toksičnih komponenti (Khomenkov et al., 2008; Van Hamme, 2004). Bakterije mogu da razgrade širok spektar ugljovodonika prisutnih u organskim polutantima (kao što je sirova nafta).

Poslednje studije su identifikovale više od 79 rodova bakterija naftnih degradera. Neke od ovih bakterija, kao što su *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Halomonas* (sintetiše egzopolisaharide koji smanjuju rastvorljivost PAH-ova, čineći ih podložnijim biodegradaciji), *Klebsiella*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pandora*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas*, *Zymomonas*, kao i arheje iz roda *Methanobacterium*, igraju važnu ulogu u degradaciji naftnih ugljovodonika (Imron et al., 2020; Radice et al., 2023; Szulc et al., 2014; Xu et al., 2018).

Pojedini sojevi su prisutni u veoma malom broju u nezagađenom staništu, dok se, nakon kontaminacije naftnim polutantima, njihov broj značajno povećava i oni postaju dominantni članovi zajednice. Primer takvih mikroorganizama su *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus*, *Oleispira* (Yakimov et al., 2007).

Iz morskih ekosistema su izolovane različite grupe mikroorganizama sposobne da metabolišu naftne ugljovodonike. Pored filamentoznih gljiva iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, kao i kvasaca koji pripadaju rodu *Candida*, bakterije rodova *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* i *Actinobacteria* čine značajnu komponentu zajednice naftnih degradera.

Jedan od novijih pristupa u pripremi biomase za bioremedijaciju je liofilizacija bakterija. Ovim postupkom se vijabilnost mikroorganizama može značajno produžiti, dok je sam postupak čuvanja i transporta olakšan, jer su liofilizirane bakterije u formi praha. Perdigão i saradnici su eksperimentalno ispitali vijabilnost liofiliziranih sojeva *Rhodococcus erythropolis* CPN 2, *R. erythropolis* CPN 3 i *Pseudomonas* sp. 1.7 L i pokazali da navedeni sojevi zadržavaju sposobnost degradacije naftnih ugljovodonika nakon inokulacije u kontaminiranu sredinu (Perdigão et al., 2021).

Fitoplankton u vodenim staništima ima ulogu u obogaćivanju atmosfere kiseonikom. Međutim, neki pripadnici zajednice (npr. mikroalga *Chlorella* spp.) imaju sposobnost i degradacije ugljovodonika poreklom iz nafte, tako da istovremeno dolazi do prečišćavanja staništa od zagađujućih supstanci, smanjenja CO₂ i oslobađanja O₂ u atmosferu (Radice et al., 2023). Takođe se pokazalo da frakcija dizela rastvorna u vodi ima veće toksično dejstvo na *Chlorella* spp. nego dizel. Toksični efekti se ostvaruju preko ugljovodonika male molekulske težine koji oštećuju ćelijsku membranu i ugrožavaju proizvodnju zaštitnih pigmenta (Ramadass et al., 2017).

Varjani i Upasani su izučavali potencijal *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 za biodegradaciju sirove nafte (Varjani i Upasani, 2016). U izveštaju je navedeno da je u periodu od 60 dana razgrađeno 60,63% ugljovodonika C8 – C36+. Međutim, kao što je pomenuto, neke komponente polutanta mogu biti razgrađene samo u kometaboličkim procesima, zahtevajući zajedničku aktivnost većeg broja mikroorganizama. Iz ovog razloga je za efikasniju biodegradaciju kompleksnih kontaminanata, kao što su naftne zagađujuće supstance, upotreba mikrobne zajednice, tj. konzorcijuma mikroorganizama tokom bioremedijacionog procesa od velike prednosti.

2.6.3. Metabolički putevi mikrobiološke razgradnje naftnih ugljovodonika

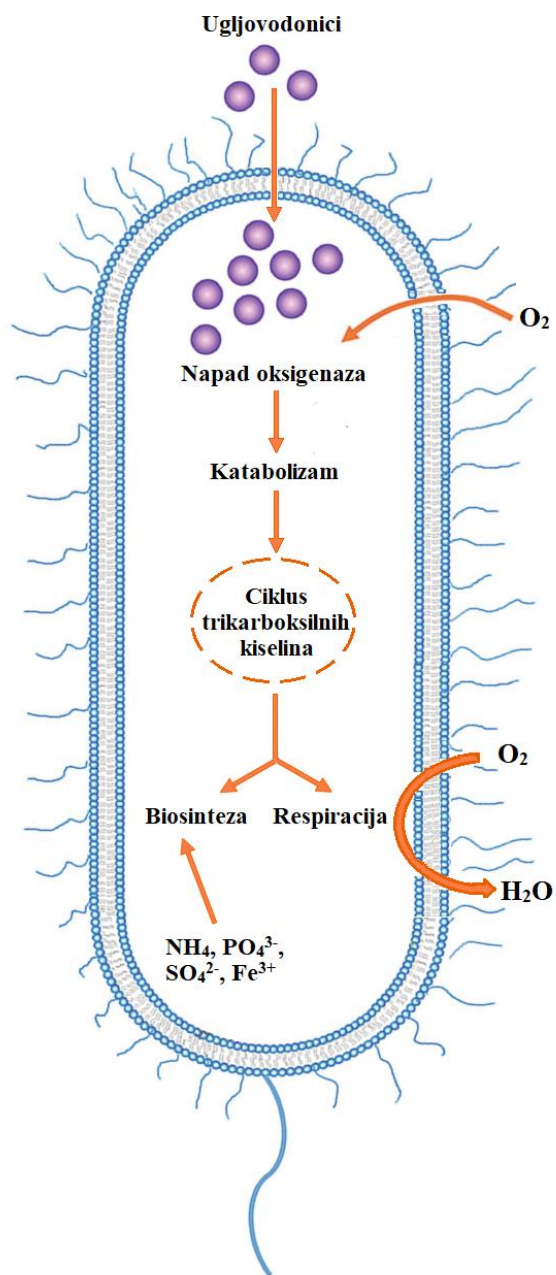
U metaboličkim procesima mikroorganizama su dominantni procesi oksido-redukcije. U zavisnosti od akceptora elektrona, biodegradacija može da bude:

- ⊗ aerobna – kao akceptor elektrona se koristi kiseonik i to je najbrži način degradacije;
- ⊗ anaerobna – elektroni se prenose na neorganske jone kao što su sulfati, nitrati, karbonati, ferijoni i ovaj proces je sporiji od aerobnog (Khan et al., 2018; Logeshwaran et al., 2018).

U sveže zagađenim zemljištima se nalazi veća koncentracija zasićenih i alifatičnih jedinjenja koja su najpodložnija mikrobnoj degradaciji, ali u isto vreme mogu biti izuzetno toksični za mikroorganizme (Maletić et al., 2011). Ovaj toksični efekat se odvija kroz interferenciju hidrofobnih ugljovodoničnih komponenti sa hidrofobnim slojem ćelijske membrane mikroorganizama, što dovodi do promena u konformaciji proteina i inhibicije enzima (Khan et al., 2018).

Nakon prvog kontakta mikroorganizama sa ugljovodonicima nafte prva faza ciklusa rasta mikroorganizama, lag faza, traje nešto duže nego obično, jer mikroorganizmi treba da se prilagode na ugljovodonike kao svoj izvor hrane i da sintetišu enzime i metabolite neophodne za degradaciju polutanta (Talley i Sleeper, 1997). Aerobna biodegradacija započinje oksidacijom ugljovodonika oksigenazama i peroksidazama stvarajući različite intermedijerne frakcije koje se delom koriste za biosintezu, dok se deo, pri potpunoj biodegradaciji, prevodi do ugljen dioksida i vode (slika 2.8.).

Glavni faktori koji ograničavaju ukupni stepen biodegradacije su: karakteristike zemljišta, svojstva zagađujućih supstanci, biodostupnost, broj i tip mikroorganizama, kao i razvoj katabolizma (Khan et al., 2018; Maletić et al., 2013).



Slika 2.8. Šema metaboličke degradacije naftnih ugljovodonika (prema Husseiny et al., 2023; Ossai et al., 2020)

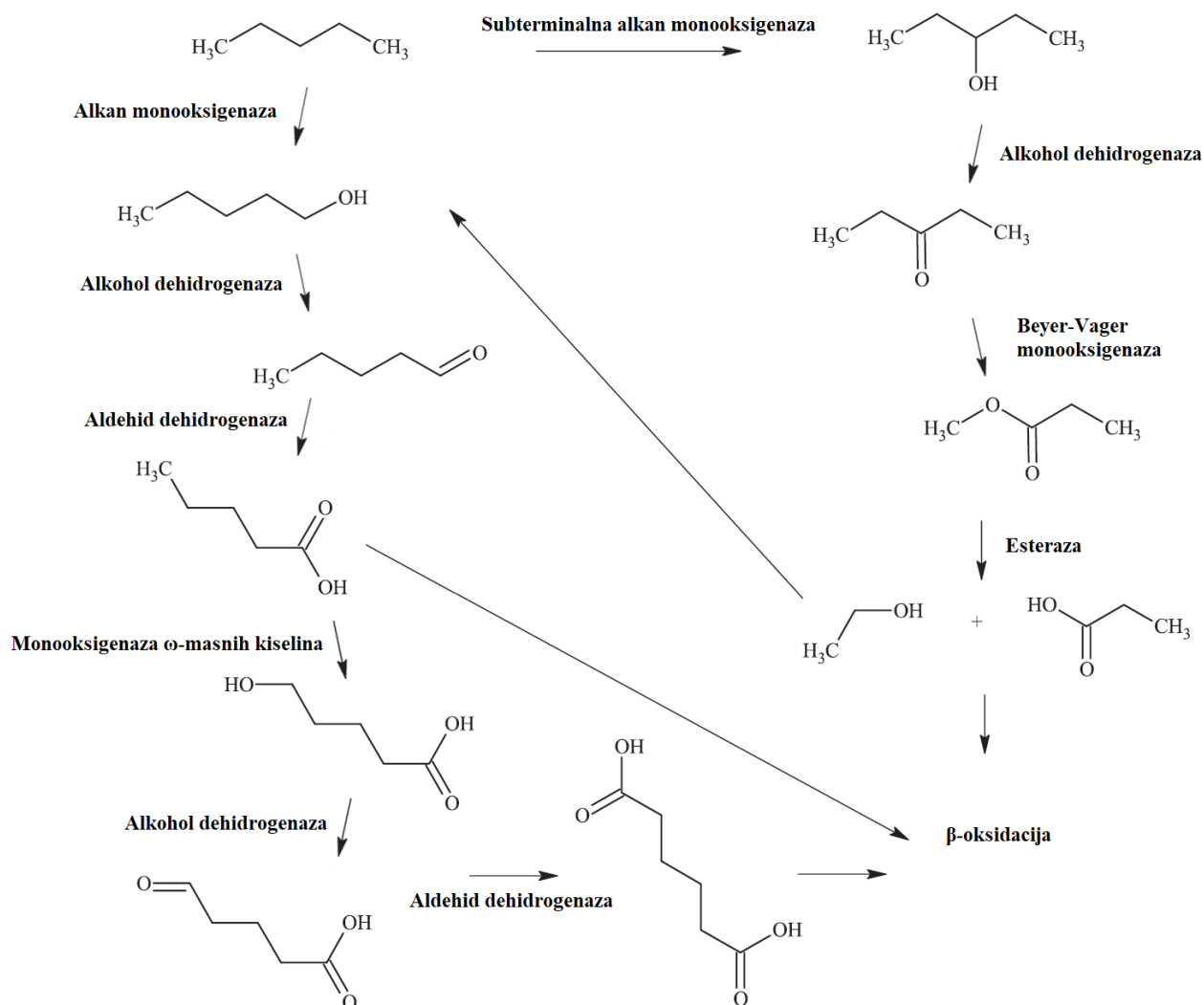
Mikroorganizmi, posebno bakterije, mogu da metabolišu naftne ugljovodonike pod aerobnim uslovima, pri čemu je kiseonik akceptor elektrona, ili pod anaerobnim uslovima, gde su akceptori elektrona nitrati, Fe(III) joni, sulfatni ili drugi joni (Victor et al., 2020). U procesu aerobne biodegradacije alifatičnih i aromatičnih (mono- ili policikličnih) ugljovodonika, oksigenaze (mono- ili dioksidaze) i peroksidaze igraju ključnu ulogu u aktivaciji C–H veze putem transfera jednog ili dva atoma kiseonika na supstrat (Boll et al., 2018; Laczi et al., 2020; Viktor et al., 2020). Kod gljiva su glavni oksidacioni enzimi citohrom P450 (CYP) monooksigenaze, članovi superfamilije hem-proteina (Daccò et al., 2020).

Ugya i saradnici su proučavali odgovor mikroalge *Chlorella* spp. na izlaganje naftnim ugljovodonicima. Kada se nađe u sredini kontaminiranoj naftnim polutantima, *Chlorella* spp. proizvodi saponine koji smanjuju površinski napon i omogućavaju nastajanje koloidne penaste strukture rastvora, što povećava biodostupnost polutanta. Istovremeno dolazi i do produkcije reaktivnih vrsta kiseonika koje, iako primarno nastaju kao stresni odgovor, u krajnjoj liniji doprinose razgradnji naftnih ugljovodonika (Ugya et al., 2021).

2.6.3.1. Razgradnja *n*-alkana

Oksidacija *n*-alkana može da bude terminalna i subterminalna, u zavisnosti od toga na kom delu lanca deluju monooksigenaze (Daccò et al., 2020; Mbachu et al., 2020). Prilikom terminalne oksidacije se formira primarni alkohol, koji se dalje transformiše dehidrogenazama u odgovarajući aldehid (slika 2.9.). Ovako nastali aldehid podleže dejstvu aldehid dehidrogenaze, pri čemu nastaje masna kiselina koja, ili direktno ulazi u proces β -oksidacije, ili se dalje monooksigenazom ω -masnih kiselina prevodi u alkohol, te daljim dejstvom alkohol- i aldehid dehidrogenaze prevodi u masnu kiselinu, koja zatim ulazi u proces β -oksidacije i ciklus trikarboksilnih kiselina (Krebsov ciklus) (slika 2.9.) (Daccò et al., 2020; Imron et al., 2020; Mbachu et al., 2020).

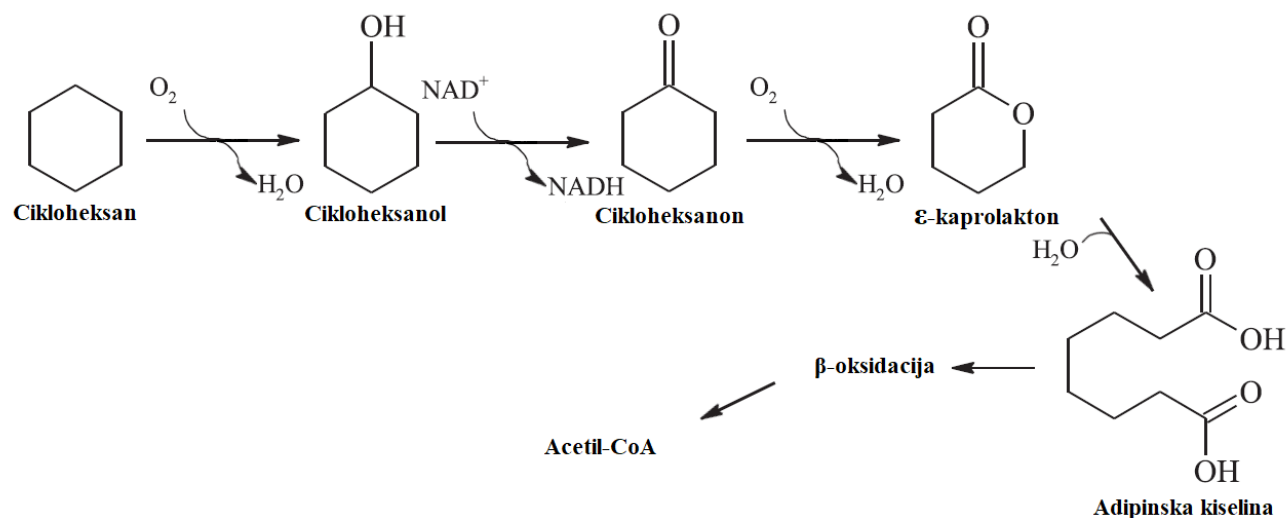
Pri subterminalnoj oksidaciji nastaje sekundarni alkohol koji se delovanjem dehidrogenaza prevodi odgovarajući keton. Beyer-Vagerova monooksigenaza prevodi ovako dobijeni keton u estar, koji esteraze dalje modifikuju u alkohol i karboksilnu kiselinu. U sledećem koraku ovako dobijena masna kiselina podleže β -oksidaciji, dajući produkte koji ulaze u ciklus trikarboksilnih kiselina gde se mineralizuju do ugljen-dioksida i vode (slika 2.9.) (Imron et al., 2020; Mbachu et al., 2020).



Slika 2.9. Biohemijski put razgradnje *n*-alkana na primeru *n*-pentana (prema Imron et al., 2020)

2.6.3.2. Razgradnja cikloalkana

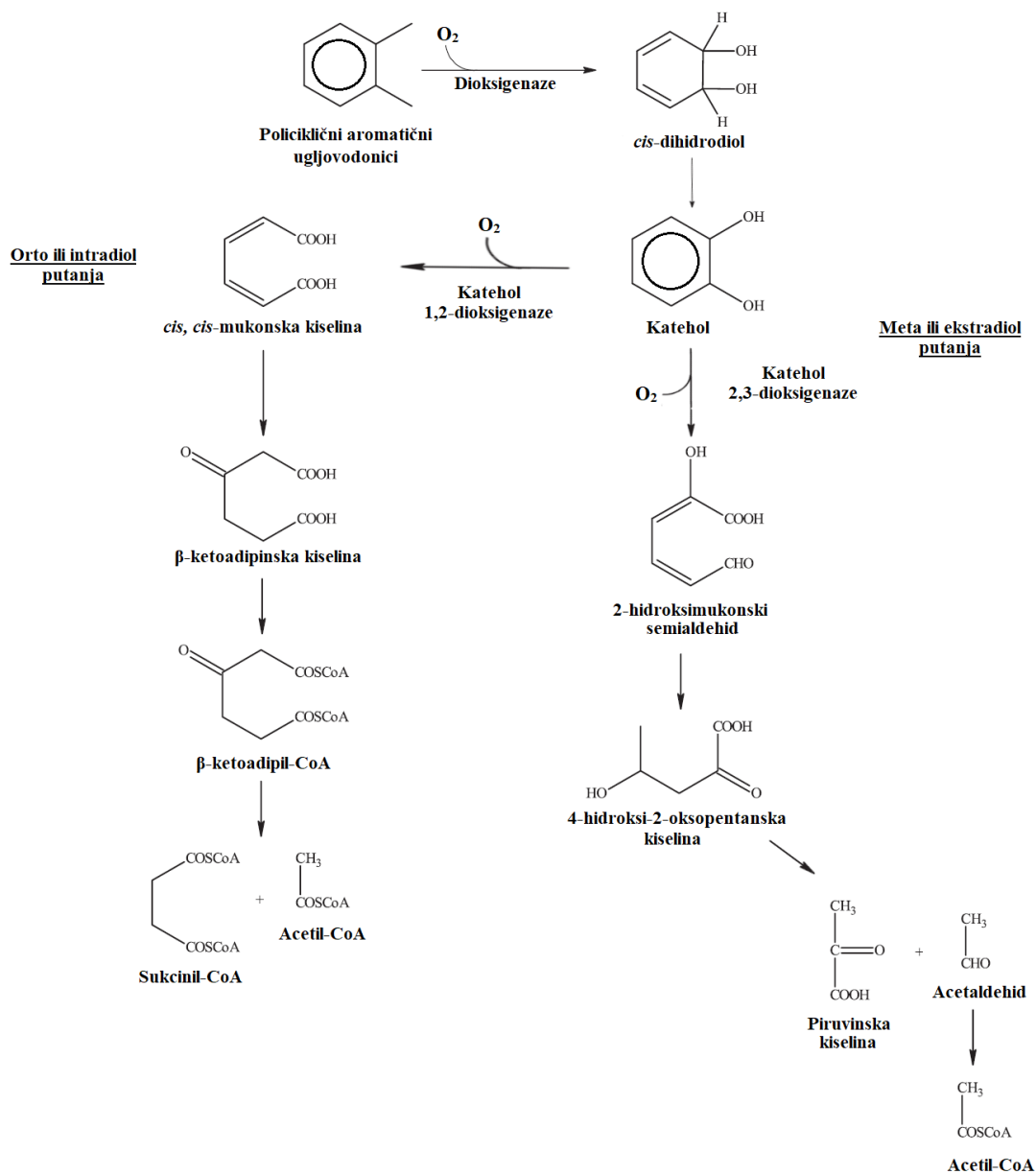
U prisustvu kiseonika cikloheksan monooksigenaza prevodi cikloheksan u cikloheksanol, koji dalje biva preveden u cikloheksanon delovanjem cikloheksanol dehidrogenaze (slika 2.10.). Cikloheksanon dalje podleže delovanju cikloheksanon monooksigenaze, pri čemu nastaje ϵ -kaprolakton koji se pomoću ϵ -kaprolakton hidrolaze prevodi u adipinsku kiselinu. Ovakom nastala adipinska kiselina se β -oksidacijom prevodi u acetil-koenzim A (*acetyl-CoA*), koji dalje ulazi u Krebsov ciklus (slika 2.10.) (Imron et al., 2020).



Slika 2.10. Biohemijski put razgradnje cikloalkana na primeru cikloheksana (prema Imron et al., 2020)

2.6.3.3. Razgradnja aromatičnih ugljovodonika

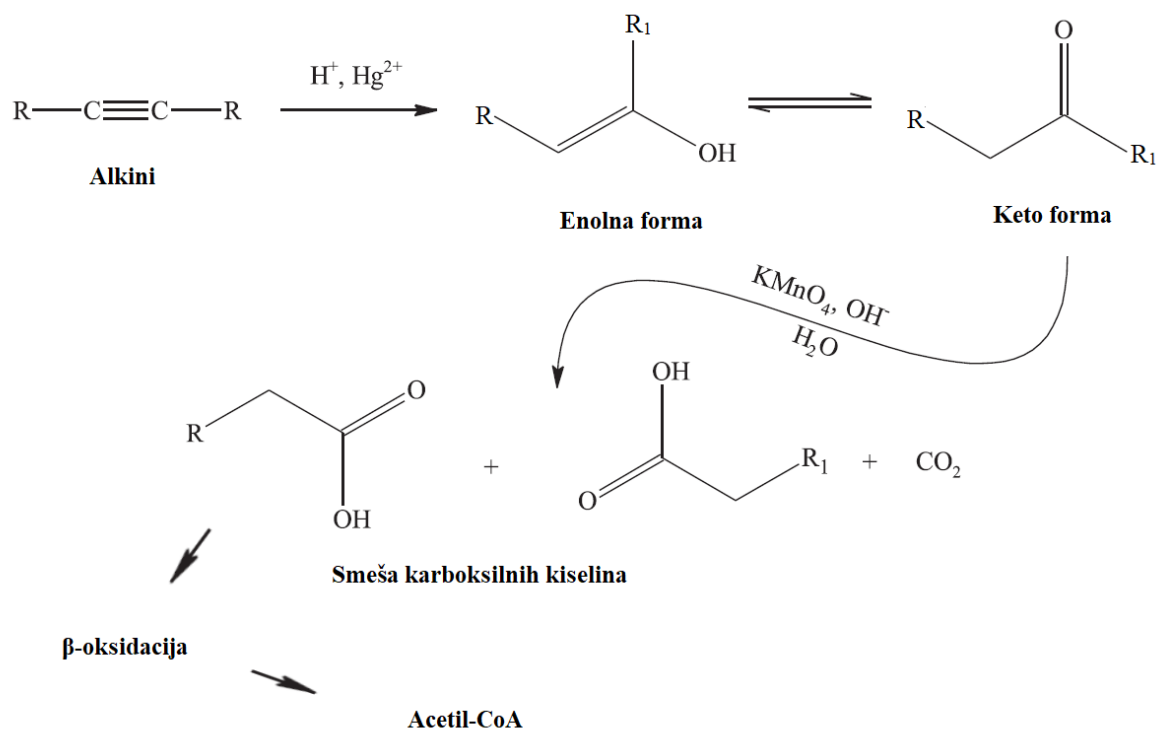
U procesu aerobne degradacije aromatičnih ugljovodonika, aromatični prsten se konvertuje u diol pomoću citohrom P450 mono oksigenaza, te dalje u katehol (slika 2.11.). Sledeći korak uključuje orto ili meta otvaranje prstena katehola delovanjem dioksidgenaza. Intradiol putanjom (orto otvaranjem prstena) nastaje *cis, cis*-mukonska kiselina, koja se dalje transformiše u β -ketoadipinsku kiselinu i β -ketoadipil-CoA. β -ketoadipil-CoA se dalje metaboliše do sukcinil-CoA i acetil-CoA. Ekstradiol putanja (meta otvaranje prstena) dovodi do nastanka 2-hidroksimukonskog semialdehida i 4-hidroksi-2-oktopentanske kiseline, koja se dalje metaboliše do piruvinske kiseline i acetaldehida. Ovako nastali acetaldehid se prevodi u acetil-CoA koji dalje ulazi u Krevsov ciklus (slika 2.11.) (Imron et. al., 2020; Laczi et al., 2020).



Slika 2.11. Biohemijski put razgradnje aromatičnih ugljovodonika na primeru *o*-ksilena (prema Imron et al., 2020)

2.6.3.4. Razgradnja alkina

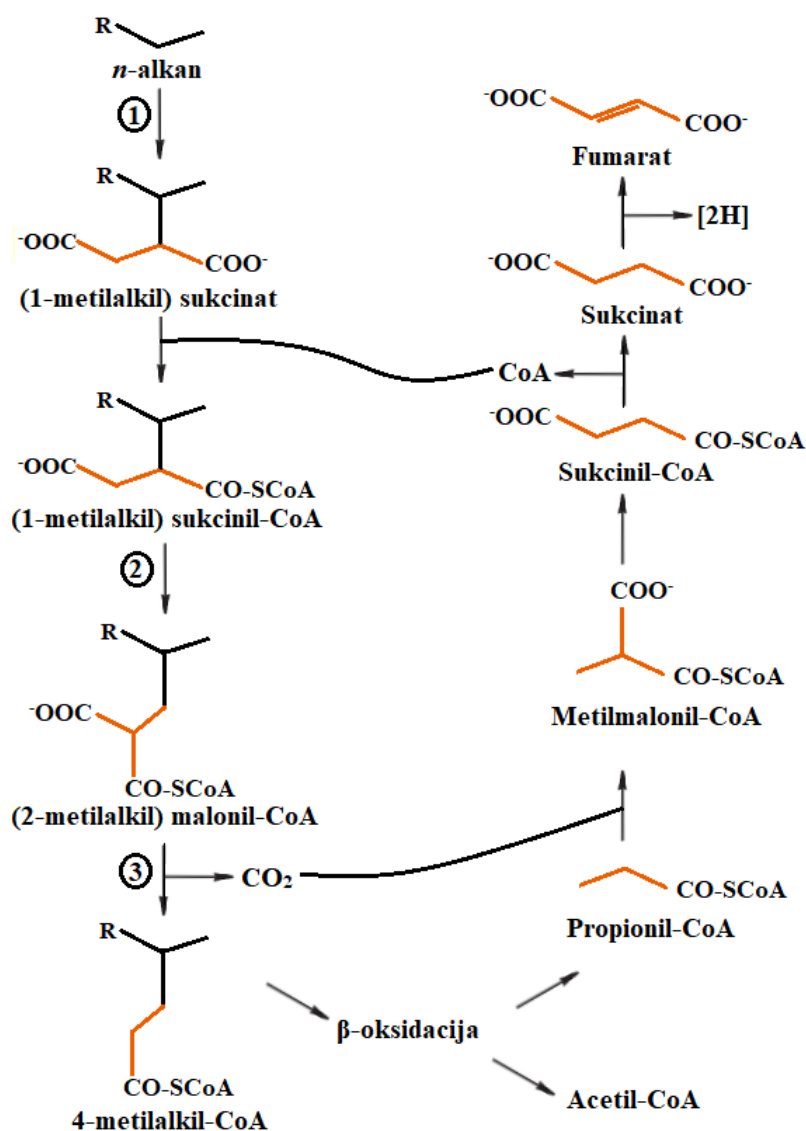
Da bi proces biodegradacije alkina mogao da započne, neophodno je prisustvo vode, H^+ i Hg^{2+} , kao i jake kiseline koja omogućava hidrataciju alkina. Katalizator ove reakcije je alkin hidrataza koja prevodi alkin u enol koji je nestabilan, te biva gotovo odmah preveden u odgovarajući keto oblik (slika 2.12.). Za oksidaciju ketona do karboksilnih kiselina pomoću karboksilaza neophodno je prisustvo permanganata kao jakog oksidujućeg jedinjenja. Ovako nastale karboksilne kiseline podležu β -oksidaciji kako bi bile prevedene u acetil-CoA koji dalje ulazi u Krebsov ciklus (slika 2.12.) (Imron et al., 2020).



Slika 2.12. Biohemijski put razgradnje alkina (prema Imron et al., 2020)

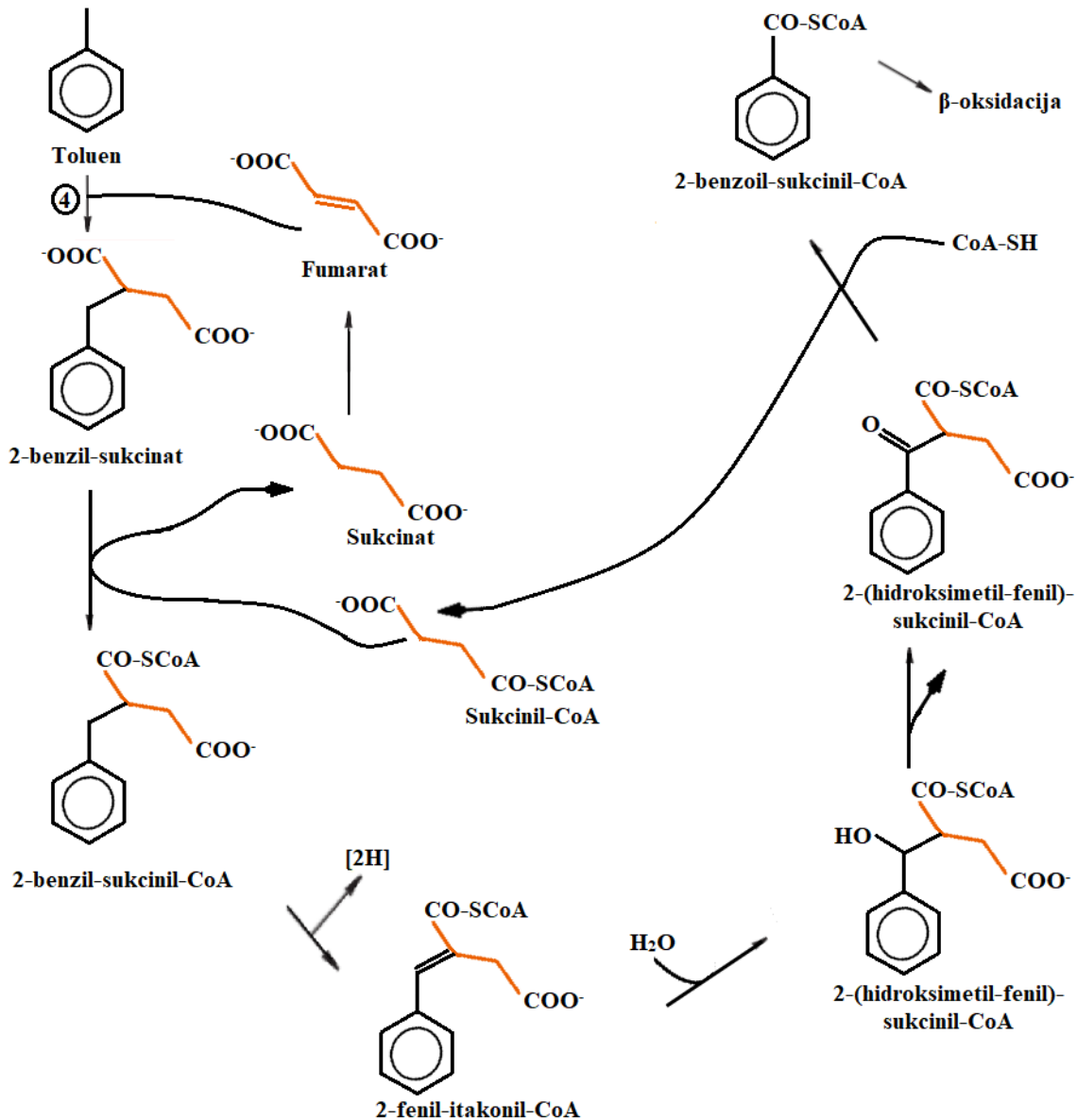
2.6.3.5. Adicija fumarata

U anaerobnim uslovima ugljovodonioci mogu da budu aktivirani putem nekoliko različitih reakcija: adicija fumarata, hidrosilacija nezavisna od kiseonika, karboksilacija, hidracija i reverzna metanogeneza (Boll et al., 2018; Laczi et al., 2020; Victor et al., 2020). Adicija fumarata je najbolje opisana od anaerobnih reakcija (slika 2.13.) (Boll et al., 2020, Ji et al., 2019). U reakciji sa *n*-alkanima, najpre se formira (1-metilalkil)-sukcinat, koji se dalje vezuje za acetil-CoA rearanžmanom ugljeničnog skeleta kako bi se formirao (2-metilalkil)-malonil-CoA. Dekarboksilaze konvertuju (2-metilalkil)-malonil-CoA u 4-metilalkil-CoA, koji dalje podleže β -oksidaciji. Tokom β -oksidacije, acetat i propionat se odvajaju od molekula kako bi se dalje koristili u lančanoj reakciji adicije fumarata (slika 2.13.) (Laczi et al., 2020).



Slika 2.13. Biohemijski put razgradnje u anaerobnim uslovima adicijom fumarata na *n*-alkane (prema Imron et al., 2020)

Adicija fumarata na aromatične komponente u perifernom putu uključuje konvertovanje aromata u benzilsukcinat, koji se dalje, preko 2-benzil-sukcinil-CoA i 2-fenil-itakonil-CoA, konvertuje do benzoil-sukcinil-CoA koji dalje ulazi u proces β -oksidacije (slika 2.14.) (Laczi et al., 2020).



Slika 2.14. Biohemijski put razgradnje aromatičnih ugljovodonika u anaerobnim uslovima adicijom fumarata na primeru toluena (prema Imron et al., 2020)

2.6.4. Faktori koji utiču na proces bioremedijacije zemljišta

Na efikasnost bioremedijacije utiču različiti fizičko-hemijski faktori sredine kao što su pH, temperatura, pritisak, izvor nutrijenata, sadržaj vlage, izvor ugljenika i energije, dostupnost i prisustvo donora i akceptora elektrona, sadržaj rastvorenog kiseonika, opterećenje zagađivačem i hidraulična provodljivost (Boopathy, 2000; Khalid et al., 2021; Mishra et al., 2021; Schuhmann et al., 2011).

2.6.4.1. Karakteristike zemljišta

Svojstva zemljišta koja predstavljaju ograničavajući faktor za biodegradaciju naftnih ugljovodonika su tekstura zemljišta, propustljivost, pH, kapacitet za zadržavanje vode, temperatura, sadržaj nutrijenata i sadržaj kiseonika. Tekstura zemljišta je veoma važna jer utiče na propustljivost i sadržaj vode. Gline imaju manju propustljivost i tendenciju da ometaju/sprečavaju transport i distribuciju vode, nutrijenata i kiseonika (Khan et al., 2018; Maletić et al., 2013). Takođe, ugljovodonici veće molekulske težine obično bivaju adsorbovani na glinu, te su nedostupni mikroorganizmima i ostaju kao trajni izvor zagađenja naftnim polutantima (Logeshwaran et al., 2018).

2.6.4.2. pH

Za većinu mikroorganizama je optimalan pH u opsegu 6 – 8 (Mishra et al., 2021) i veliki broj vrsta mikroorganizama preferira neutralan do alkalni pH (Imron et al., 2020). Iako ekstremne pH vrednosti (<3 i >9) kao i iznenadne promene pH vrednosti mogu inhibirati rast mikroba, i stoga blokirati bioremedijaciju (Talley i Sleeper, 1997), pojedine gljive i acidofilni mikrobi pokazuju veći biodegradacioni potencijal u kiselijim sredinama (Mishra et al., 2021).

2.6.4.3. Temperatura

Temperatura utiče kako na biološke procese, tako i na fizičko-hemijske procese. Povećanje temperature ubrzava (bio)hemijske reakcije, difuziju, rastvorljivost i isparljivost supstanci i smanjuje gustinu tečnosti. Temperatura, zajedno sa sadržajem vlage, utiče na dostupnost rastvorenog kiseonika, što je od ključne važnosti za metabolizam aerobnih mikroorganizama. Ova tri faktora utiču na stepen u kom će se mikrobna populacija raširiti u zemljištu (Mishra et al., 2021). Aktivnost mikroorganizama i stepen metabolizma opadaju relativno brzo kada su temperature iznad optimalne. Iako je za svaku vrstu optimalna temperatura drugačija, kada se govori o bioremedijaciji, optimalna temperatura za većinu mikroba je 25 – 35 °C (Kästner, 2002).

Temperatura ima veliki uticaj i na zagađujuću supstancu i na akceptore elektrona, što u mnogome određuje metabolizam mikroorganizama, pa time i brzinu i stepen degradacije polutanta. U površinskim slojevima zemljišta su temperaturne varijacije izraženije nego na dubinama od 1 – 2 m, dok je u sedimentu temperatura skoro konstantna, pa je očekivano da u zimskim mesecima procenat uklonjenih naftnih zagađujućih supstanci u površinskom sloju zemljišta bude manji u odnosu na dublje slojeve sedimenta (Romantschuk et al., 2023; Srivastava et al., 2014).

2.6.4.4. Trajanje zagađenja

U zemljištima koja su nedavno zagađena naftnim ugljovodonicima sadržaj zasićenih i alifatičnih komponenti koje su veoma podložne mikrobnjoj degradaciji, a koje istovremeno mogu biti toksične za mikroorganizme, je povećan (Maletić et al., 2011). Toksično dejstvo se odvija kroz interakcije

hidrofobnih komponenti naftnih ugljovodonika sa hidrofobnim slojem ćelijske membrane, što dovodi do fluktuacija u fluidima, promena u konformaciji proteina i inhibiciji enzima (Khan et al., 2018). Takođe, brojni faktori sredine određuju period aklimatizacije mikroba na supstrat (Boopathy, 2000).

Uočeno je i da je biodegradacija sveže zagađenih staništa brža u odnosu na istorijska zagađenja. Jedan od razloga za promenu u brzini i uspešnosti biodegradacije je činjenica da, sa vremenom, polutant postepeno migrira među čestice gline, čineći ga nedostupnim za mikroorganizme (Harms, 2011).

2.6.4.5. Raspodela veličine čestica zemljišta

Raspodela veličine čestica u zemljištu se koristi za procenu hidrauličnih svojstava zemljišta, kao što je zadržavanje vode i hidraulična provodljivost zasićenih i nezasićenih zemljišta (Arinze et al., 2022). Prilikom analize veličine čestica meri se maseni udeo gline, prašine, peska i šljunka u datom zemljištu. Smanjenjem veličine čestica raste specifična površina koja ima veliki uticaj na kapacitet zadržavanja vode, aeraciju, razlaganje organske materije, kao i snabdevanje nutrijentima.

Glina ima oko 10.000 puta veću površinu od peska, što za posledicu ima visok kapacitet zadržavanja vode, nisku aeraciju i visok stepen snabdevanja nutrijentima. Sa druge strane, pesak poseduje nizak kapacitet zadržavanja vode, dobru aeraciju, ali je snabdevanje nutrijentima veoma nisko.

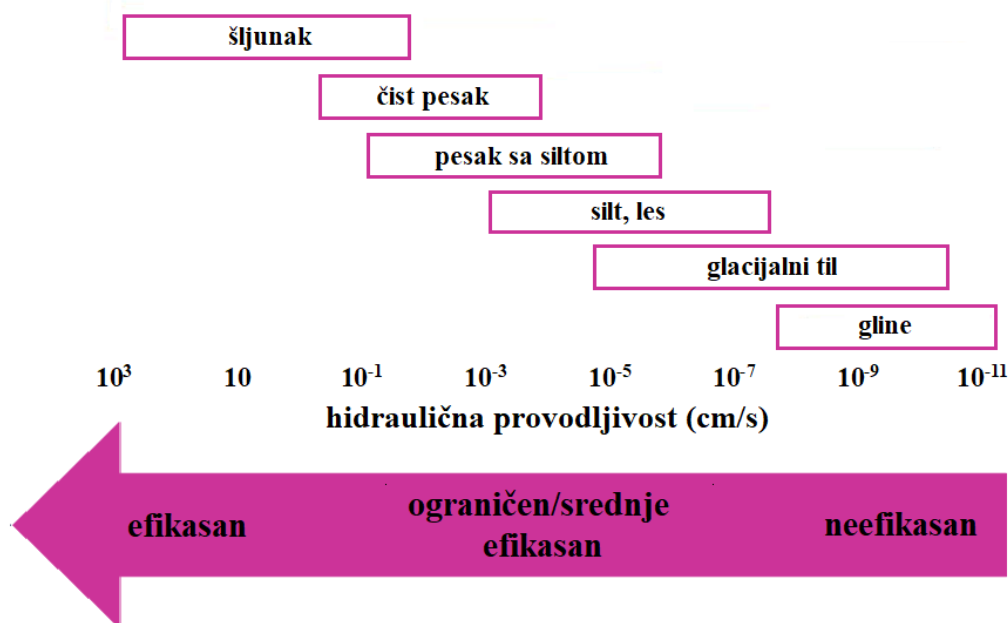
2.6.4.6. Sadržaj vlage

Za aktivnost mikroorganizama je sadržaj vlage ispod tačke saturacije (pore zemljišta u potpunosti popunjene vodom) veoma povoljan. Pri optimalnim temperaturama je rastvorljivost gasova u vodi najviša moguća, što podrazumeva veoma efikasno dopremanje kiseonika mikroorganizmima uz istovremeno preuzimanje CO₂. Prema nekim podacima, najviša aktivnost mikroorganizama je izmerena pri procentu vlage između 50 i 60% od ukupnog vodenog kapaciteta zemljišta. Veći sadržaj vlage je nepovoljan za rast aerobnih mikroorganizama, jer se smanjuje difuzija kiseonika, što smanjuje degradaciju (Kebede et al., 2021).

2.6.4.7. Hidraulična provodljivost

Pored broja mikroorganizama i prisustva nutrijenata na kontaminiranoj lokaciji, hidraulična provodljivost ima značajnu ulogu u određivanju potencijalne efikasnosti *in situ* biodegradacije sedimenta i podzemne vode i, kao što su Schuhmann i saradnici istakli, „zavisi od zemljišnog matriksa, tipa zemljišne tečnosti (gustine i viskoznosti) i relativne količine zemljišne tečnosti (saturacije) prisutne u zemljišnom matriksu“ (Schuhmann et al., 2011). Tako zemljišta bogata glinama imaju malu hidrauličnu provodljivost, dok je u peskovitim zemljištima vrednost ovog parametra veća. Hidraulična provodljivost utiče na distribuciju mikroorganizama, kiseonika i nutrijenata kroz sediment. Vrednosti hidraulične provodljivosti bi trebalo da budu između 10⁻⁶ i 10⁻⁴ cm/s kako bi proces bioremedijacije bio uspešno izveden. Ukoliko je hidraulična provodljivost manja, neophodno je angažovati dodatne pumpe koje bi obezbedile cirkulaciju vode, odnosno dopremanje nutrijenata, kiseonika i mikroorganizama do dubljih slojeva sedimenta (Shieh i Peralta, 2005).

Na slici 2.15. je predstavljen uticaj litološkog sastava zemljišta na vrednost hidraulične provodljivosti, kao i efikasnost transporta kroz zemljište pri različitim vrednostima ovog parametra. Kao što se može uočiti, u zemljištima bogatim glinama je, zbog male hidraulične provodljivosti, transport kroz zemljište veoma neefikasan, dok u zemljištima bogatim peskom i šljunkom nutrijenti, kiseonik i mikroorganizmi vrlo lako mogu da migriraju.



Slika 2.15. Uticaj litološkog sastava zemljišta na vrednost hidraulične provodljivosti, kao i efikasnost transporta kroz zemljište pri različitim vrednostima ovog parametra (prema Hazen, 2010)

2.6.4.8. Svojstva zagađujućih supstanci

Ugljovodonici male molekulske težine (C10 – C25), kao što su *n*-alkani, se lako degraduju. Razgranati alkani (*izo*-alkani), ciklični alkani (naftaleni) i aromatični ugljovodonici znatno teže podležu degradaciji (Gojgić-Cvijović et al., 2012; Khan et al., 2018). Aromatične komponente u dizelu, poznatije kao PAH-ovi, sadrže dva do šest aromatičnih prstenova. Oni imaju veoma veliki afinitet da se vezuju za organsku supstancu u zemljištu i sedimentu, što ih čini otpornijim na biodegradaciju (Imron et al., 2020; Logeshwaran et al., 2018).

2.6.4.9. Biodostupnost

Biodostupnost se najčešće definiše kao količina polutanta koja je prisutna u određenoj sredini, a koja može biti preuzeta od strane mikroorganizama i metabolisana. Biodostupnost igra važnu ulogu u brzini degradacije kontaminanta. Ukoliko je veoma niska, neće doći do biodegradacije, jer je neto rezultat između energije utrošene za metabolizam zagađujućih supstanci i energije koja se dobija ovim procesom nepovoljan. Ukoliko je biodostupnost relativno niska, ćelije će metabolisati polutant, ali tokom faze mirovanja, odnosno neće doći do uvećanja mikrobne mase, što posledično utiče na brzinu degradacije. U situaciji kada je količina biodostupnog kontaminanta dovoljna, mikroorganizmi će isti degradirati u fazi rasta, što će dovesti i do povećanja brojnosti mikrobne zajednice i daljeg povećanja biodegradacije zagađujućih jedinjenja (Maier, 2020).

Da bi zagađujuća supstanca bila preuzeta i metabolisana od strane mikroorganizama, trebalo bi da bude rastvorena u vodenoj fazi. Međutim, molekuli polutanata se često adsorbuju na čestice zemljišta, organsku supstancu prisutnu u zemljištu ili ulaze u mikropore zemljišnih čestica, čineći ih teško dostupnim za mikroorganizme. Sa vremenom se količina polutanta koja je adsorbovana povećava utičući na brzinu i uspešnost biodegradacije, što je opisano u poglavlju 2.3.1.

Za razliku od vodenih staništa, u kojima mikroorganizmi imaju mogućnost mobilnosti, u zemljištu i sedimentu su oni imobilisani i jedini način da stupe u kontakt sa polutantima je da isti budu dopremljeni vodom (npr. variranjem nivoa podzemnih voda u akviferu), molekulskom difuzijom ili preturbacijama zemljišta izazvanih kretanjem životinja, rastom korenja biljaka ili micelija gljiva (Harms, 2011).

2.6.5. Faktori koji utiču na proces bioremedijacije voda

2.6.5.1. Temperatura

Kao što je pomenuto, temperatura ima značajan uticaj na proces bioremedijacije. Fizičko-hemijska svojstva i sastav naftnog polutanta, kao i fiziološki procesi mikroorganizama su pod uticajem temperature. Pri višim temperaturama evaporacija naftnih ugljovodonika kao i njihova gustina su povećani, dok pri nižim temperaturama može da dođe do kristalizacije nekih naftnih komponenti, što onemogućava metabolički napad mikroorganizama. Iako su alkani podložniji biodegradaciji u odnosu na PAH-ove, u studiji Campo i saradnika je pokazano da je pri temperaturi od 5 °C uklonjeno više PAH-ova u odnosu na alkane (Campo et al., 2013). Ovo može biti posledica navedene kristalizacije jedinjenja koji sadrže više od 13 ugljenikovih atoma u svojoj strukturi pri temperaturama nižim od 5 °C (Campo et al., 2013).

Sastav mikrobne zajednice je takođe pod uticajem temperature. U eksperimentu sprovedenom na uzorku površinske vode uzorkovane iz Meksičkog zaliva Liu i saradnici su pratili dinamiku dominantnih rodova pri različitim temperaturama. Inicijalno su Cyanobacteria bile najzastupljenije (60,4%), dok je njihova brojnost na temperaturi od 4 °C pala na svega 10 – 30%, a dominantni ulogu preuzeli pripadnici roda *Sulfitobacter*. Sa porastom temperature (24 °C) predominantni rodovi su bili *Oleibacter* i *Alteromonas* (Liu et al., 2017).

Temperatura utiče i na koncentraciju rastvorenog kiseonika i njihov odnos je obrnuto proporcionalan, što može da odredi dominantan metabolički put razgradnje naftnih ugljovodonika u zagađenoj vodi, pa samim tim i vreme potrebno za remedijaciju.

2.6.5.2. Nutrijenti

Za rast mikroorganizama i njihovu aktivnost su, pored ugljenika (C), najznačajniji azot (N), fosfor (P) i kalijum (K), kao i njihov odnos. Dostupnost nutrijenata je podložna sezonskim promenama, pa je tako u proleće i leto morska voda bogata istim, dok njihova koncentracija opada u jesen i zimu. Pored toga postoje i varijacije u njihovoj dostupnosti u različitim delovima vodenog stuba, pa su tako dublji nivoi bogati sa N, P i K, dok njihova koncentracija opada u gornjim delovima vodenog stuba (Bacosa et al., 2022).

Iako su nutrijenti najznačajniji u procesu bioremedijacije, prilikom biostimulacije mora se voditi računa kako o njihovoj koncentraciji (visoke koncentracije N, P i K mogu inhibirati biodegradaciju), tako i o odnosu različitih nutrijenata, odnosno odnos se treba prilagoditi sastavu zajednice (različite zajednice imaju različite potrebe) (Bacosa et al., 2022).

Prisustvo naftnog zagađenja u vodenim staništima može da pospeši rast heterotrofnih bakterija, ali na autotrofni fitoplankton ima destruktivni uticaj. Međutim, ukoliko se izvrši biostimulacija to povećava ćelijski rast i može da skрати trajanje lag faze, održavajući na taj način brojnost i autotrofne populacije (Waikhom et al., 2020; Walworth et al., 2007).

2.6.5.3. Sunčeva svetlost

Pod delovanjem sunčeve svetlosti dolazi do fotooksidacije pojedinih jedinjenja, pri čemu su PAH-ovi najpodložniji ovom procesu. Takođe postoji i razlika u stepenu oksidacije PAH-ova u sirovoj nafti koja pliva na površini u obliku filma i frakcije rastvorne u vodi (WSF-a). Rastvorna frakcija kao i PAH-ovi supstituisani alkil grupama su znatno podložniji fotooksidaciji.

Sama fotooksidacija može da bude direktna i indirektna. Prilikom direktne fotooksidacije jedinjenja PAH-ova u sirovoj nafti direktno apsorbuju sunčevu svetlost i bivaju oksidovani, dok u indirektnoj fotooksidaciji sekundarni produkti apsorpcije sunčeve svetlosti (kao što su singlet kiseonik, hidroksil radikali i peroksi radikali) oksiduju druga jedinjenja (Bacosa et al., 2022).

2.6.5.4. Kiseonik

Iako degradacija naftnih ugljovodonika može da se odigrava i u anaerobnim uslovima, najveći procenat mikroorganizama razgrađuje polutante u prisustvu kiseonika, jer je aerobni put energetski isplativiji za ćeliju. U priobalnim predelima, gde dolazi do mešanja vode i sedimenta, vladaju pretežno aerobni uslovi, te je biodegradacija uspešnija. Sa druge strane, u slanim močvarama su dominantni anaerobni uslovi, jer je iscrpljivanje kiseonika izraženije, tako da se metabolizam naftnih ugljovodonika odigrava u anaerobnim uslovima, što produžava vreme potrebno za uklanjanje polutanta (Joye et al., 2014).

2.6.5.5. Pritisak

Hidrostatski pritisak se menja sa dubinom vode i on je direktno proporcionalan povećanju dubine. Poznato je da postoje organizmi koji su adaptirani na život u dubokim vodama mora i okeana, ali su oni i dalje nedovoljno istraženi zbog ekstremnih uslova koji vladaju u ovim ekološkim nišama. Međutim, poznato je da hidrostatski pritisak utiče na sposobnost mikroorganizama za biodegradaciju. Najveći procenat mikroorganizama koji su proučavani spada u grupu pijezosenzitivnih organizama, odnosno organizama čiji je rast i metabolizam smanjen pri povećanom pritisku. Pijezofilni i pijezotolerantni mikroorganizmi postižu svoj optimalan rast i metabolizam u uslovima povećanog hidrostatskog pritiska. U svojoj studiji Hackbusch i saradnici su proučavali uspešnost biodegradacije zasićenih i aromatičnih frakcija od strane *Rhodococcus* sp. PC20 soja pri različitim hidrostatskim pritiscima (Hackbusch et al., 2020). Rezultati su pokazali da je ovaj soj bio delimično uspešniji u degradaciji pri pritisku od 15 MPa nego pri atmosferskom, što govori u prilog tome da ovaj soj može biti klasifikovan kao pijezotolerantan.

2.6.5.6. Sadržaj suspendovanih čestica

Nakon izlivanja nafte u vodenu sredinu može da dođe do vezivanja kapljica nafte za suspendovane mineralne čestice u vodi, što dovodi do formiranja koagulata ulje-čestica. U prisustvu jona ovi koagulati dalje međusobno interaguju u procesu flokulacije formirajući veće agregate koji dalje mogu da se kreću duž vodenog stuba i da se istalože na dnu (Cui et al., 2021). Vezivanje naftnih ugljovodonika za čestice ima višestruke povoljne efekte na biodegradaciju. Sa jedne strane se adsorpcijom na mineralne čestice smanjuje toksično dejstvo naftnih ugljovodonika na mikrobe. Sa druge strane mikroorganizmi mogu da se vežu za čestice i na taj način dođu u kontakt sa polutantom formirajući biofilm. U koagulatima je odnos površine i zapremine dostupnih polutanata povećan, što pospešuje biodegradaciju.

Kapljice nafte mogu da se vežu i za bakterije, fitoplankton, zooplankton ili detritus, formirajući velike agregate koji se nazivaju morski sneg, a koji ima mrežastu strukturu izgrađenu od malih, vlaknastih, sluzavih niti. Međutim, ovakvi koagulati mogu da padnu na dno otežavajući proces uklanjanja zagađujućih supstanci (Bacosa et al., 2022).

2.6.5.7. Salinitet

Salinitet ima značajan uticaj na rastvorljivost naftnih ugljovodonika, njihovo vezivanje za suspendovane čestice kao i na metabolizam mikroorganizama (Bacosa et al., 2022). Povećan sadržaj soli menja morfologiju površine suspendovanih čestica utičući na mogućnost koagulacije, pa samim tim i flokulacije (Wang et al., 2023). Održavanje osmotskog pritiska je od ključnog značaja za svaku živu ćeliju. U vodama sa procentom saliniteta iznad 1 wt % je osmotski pritisak u ćelijama povećan, što može da prouzrokuje plazmolizu ili gubitak ćelijskih funkcija (Wang et al., 2023).

U slanim vodama mikroorganizmi regulišu osmotski pritisak promenom hidrofobnosti površine svojih ćelija. Pri niskom sadržaju soli je površina ćelije izrazito hidrofobna što olakšava vezivanje hidrofobnih organskih jedinjenja nafte i formiranje micela. Ovo za posledicu ima povećanu biodostupnost naftnih polutanata i njihovu biodegradaciju. Sa druge strane, povećanje saliniteta uzrokuje povećanu sekreciju ekstraćelijskih polimera, koji se najvećim delom sastoje od proteina i egzopolisaharida. Uloga proteina je da održe osmotski pritisak ublažavanjem efekata razlike u intraćelijskoj i ekstraćelijskoj koncentraciji jona, dok je uloga polisaharida, tj. njihovih polarnih grupa, da spreče dehidrataciju ćelije (Wang et al., 2023).

Različiti sojevi mikroorganizama su različito osetljivi na promenu saliniteta. Neadaptirani bivaju inhibirani sa povećanjem saliniteta, dok su halotolerantni sojevi sposobni da održe metaboličke procese, a neki od njih i da aktivno degraduju naftne polutante. Díaz i saradnici su pokazali da pojedinačni sojevi *Marinobacter* spp. (MR-1, MR-5 i MR-6), *Erwinia ananas* (MR-3) i *Bacillus* sp. (MR-4) mogu da degraduju naftne ugljovodonike u vodi sa povećanim sadržajem soli, te da je efikasnost degradacije ipak bila veća kada su ovi mikroorganizmi inokulisani kao konzorcijum (Díaz et al., 2000).

2.6.5.8. Električna provodljivost i ukupni rastvoreni elektroliti

Električna provodljivost (κ), koja se izražava u $\mu\text{S}/\text{cm}$, i ukupni rastvoreni elektroliti (*engl. Total Dissolved Solids, TDS*), koji se izražavaju u mg/L , su pokazatelji kvaliteta voda. Vrednosti električne provodljivosti zavise od koncentracije rastvorenih jona, dok TDS oslikava koncentraciju organskih i neorganskih jedinjenja rastvorenih u vodi. Vrednosti ova dva parametra su u međusobnoj zavisnosti koja se izražava formulom (1):

$$TDS = A \times \kappa \quad (1)$$

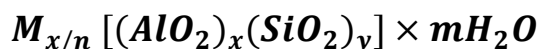
gde je A konstanta koja se najčešće koristi za opisivanje ovog odnosa i njena vrednost može da bude u opsegu od 0,55 do 0,9. Vrednost konstante A je viša u vodama koje sadrže više hlorida, dok je njena vrednost u vodama bogatim sulfatima niža. Promena vrednosti električne provodljivosti može da bude posledica promene koncentracije jona ili posledica promene odnosa pojedinačnih komponenti (Marandi et al., 2013).

Posmatrano u kontekstu bioremedijacije, uloga ova dva parametra se oslikava u efektima koje imaju na metabolizam mikroorganizama, jer su različiti joni neophodni za enzimske reakcije. Iz tog razloga je potrebno redovno pratiti vrednosti električne provodljivosti i TDS-a radi adekvatnog planiranja biostimulacije.

2.7. Zeoliti

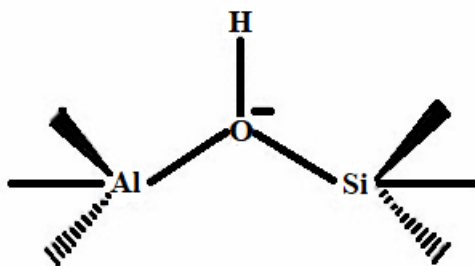
Zeoliti su alumosilikati koji imaju široku primenu. Prednost zeolita je ta što su oni prirodno rasprostranjeni, lako dostupni, ekonomski isplativi, netoksični, otporni na kiselo-bazne promene, nezapaljivi i mogu da se recikliraju ili lako regenerišu (Adeola i Forbes, 2020; Bandura et al., 2017; Danehpash et al., 2018; Oliveira et al., 2021; Xie et al., 2013).

Opšta hemijska formula zeolita je



gde je M katjon valence n koji neutrališe negativno naelektrisanu strukturu alumosilikata; x i y je ukupan broj $[SiO_4]^{4-}$ i $[AlO_4]^{3-}$ tetraedara u okviru jedne gradivne jedinice; m je broj molekula vode u šupljinama (Mgbemere et al., 2017).

Kristalna struktura zeolita se sastoji od primarnih gradivnih jedinica $[SiO_4]^{4-}$ i $[AlO_4]^{3-}$ tetraedara međusobno povezanih preko atoma kiseonika (Bandura et al., 2017) (slika 2.16.) koji formiraju takozvanu sekundarnu gradivnu jedinicu (Kordala i Wyszowski, 2024). Tetraedri formiraju kanale (0,3 – 3 nm u prečniku) u kojima su smešteni jono-izmenjivi katjoni alkalnih i zemnoalkalnih metala Ca^{2+} , Na^+ , K^+ ili Mg^{2+} . Izomorfnom supstitucijom tetravalentnog silicijuma trovalentnim aluminijumom se javlja negativno naelektrisanje u rešeci, što se kompenzuje vezivanjem nekog od navedenih jono-izmenjivačkih katjona, kao što su Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ i Na^+ (Torabian et al., 2010), koji dalje mogu biti zamenjeni organskim ili neorganskim katjonima iz rastvora u kome se sorbent nalazi (Bandura et al., 2017; Benkli et al., 2005; Kordala i Wyszowski, 2024). Najzastupljeniji prirodni zeolit je klinoptilolit koji poseduje dvodimenzionalnu strukturu izgrađenu od 8 i 10 prstenova. Katjoni koji ne učestvuju u izgradnji rešetke bivaju lako zamenjeni drugim katjonima iz okolnog rastvora, obezbeđujući zeolitima jonoizmenjivački karakter (Bandura et al., 2017). Osim katjona, u kanalima rešetke se nalaze i molekuli vode, tzv. zeolitne vode (Kordala i Wyszowski, 2024), koja se termičkim tretmanom može ukloniti bez narušavanja kristalne strukture zeolita.



Slika 2.16. Sekundarna gradivna jedinica zeolita (prema Mgbemere et al., 2017)

Fizičko-hemijska svojstva zeolita zavise od odnosa SiO_2/Al_2O_3 . Zeoliti sa većim udelom Al^{3+} imaju hidrofilniji karakter, veći kapacitet za razmenu jona i lakše interaguju sa polarnim jedinjenjima, dok se povećanjem udela Si^{4+} smanjuje hidrofilni karakter zeolita, a povećava afinitet za nepolarna jedinjenja i termostabilnost (slika 2.17.).

povećanjem odnosa Si/Al raste:

- termalna stabilnost
- hidrofobnost
- jačina kiselinskih centara
- afinitet za nepolarna jedinjenja
- otpornost na kiseline

smanjenjem odnosa Si/Al raste:

- hidrofilnost
- kapacitet za razmenu jona
- broj kiselinskih centara
- broj katjona van rešetke
- interakcija sa polarnim jedinjenjima

Slika 2.17. Uticaj promene odnosa Si/Al na fizičko-hemijska svojstva zeolita (prema Kordala i Wyszkowski, 2024)

Uspešnost zeolita u uklanjanju katjona iz rastvora zavisi od kapaciteta za razmenu katjona, koji zavisi od udela aluminijuma u strukturi zeolita. Ukupni kapacitet za razmenu jona se dobija eksperimentalno, a izražava se u miliekvivalentima (meq) metala po 100 g zeolita i on se razlikuje od teorijskog kapaciteta, koji se izvodi iz hemijske formule minerala. Razlog odstupanja teorijskog i praktičnog kapaciteta leži u činjenici da na kapacitet za razmenu jona utiču, pored hemijske formule, i struktura rešetke, jačina elektrostatičkog polja rešetke, priroda katjona, sastav i pH rastvora, uslovi pod kojima se odvija adsorpcija i dr. (Moshoeshoe et al., 2017).

2.7.1. Klasifikacija zeolita

Osnovna klasifikacija zeolita je na osnovu strukture rešetke, pri čemu svaki od tipova poseduje kôd od tri slova, a koji predstavlja izvorni materijal od kog je zeolit nastao.

2.7.1.1. Klasifikacija zeolita na osnovu porekla

Prema poreklu zeoliti mogu biti prirodni (nastali prirodnim geološkim procesima) i sintetički (nastaju hemijskim reakcijama između sintetičkih sirovina – natrijum silikata (Na_2SiO_3) i natrijum aluminata (NaAlO_2), ili se sintetišu od prirodnih materijala kao polaznih supstanci) (Bandura et al., 2017; Mgbemere et al., 2017). I prirodni i sintetički zeoliti su u širokoj upotrebi. Prednosti sintetičkih zeolita su manji sadržaj nečistoća, bolja hemijska i fizička svojstva, kao što su veća stabilnost i veća veličina pora, što omogućava adsorpciju većih molekula (Kordala i Wyszkowski, 2024). Međutim, prirodni zeoliti su stabilniji u kiselim sredinama, poseduju veću termičku stabilnost i ekonomski su prihvatljiviji.

2.7.1.2. Klasifikacija zeolita na osnovu molarnog odnosa silicijuma i aluminijuma

Prema molarnom odnosu silicijuma i aluminijuma zeoliti se mogu podeliti na:

- ⊗ nisko silikatne, Si/Al odnos 1,0 – 1,5 (Zeolit A, Zeolit X);
- ⊗ srednje silikatne, kod kojih je odnos Si/Al 2,0 – 5,0 (Zeolit L, Zeolit Y);
- ⊗ visoko silikatne, kod kojih je odnos Si/Al > 10 (Zeolit β, ZSM-5);
- ⊗ silikonska molekulska sita, kod kojih je Si/Al odnos >100.

Odnos Si/Al ima veliki uticaj na fizička i hemijska svojstva zeolita. Povećavanjem sadržaja silicijuma raste termalna stabilnost zeolita, hidrofobnost kristalne rešetke i kiselost, dok se, sa druge strane, sposobnost razmene jona, koja je proporcionalna broju $[AlO_4]^{3-}$ tetraedara, smanjuje (slika 2.17.) (Kordala i Wyszowski, 2024).

2.7.1.3. Klasifikacija zeolita na osnovu veličine pora

Prema veličini pora zeoliti se dele na:

- ⊗ zeolite sa ultravelikim porama (0,8 – 1,0 nm) (sadrže barem 14 Si i Al atoma);
- ⊗ zeolite sa velikim porama (0,6 – 0,8 nm) (sadrže 12 Si i Al atoma);
- ⊗ zeolite sa srednjim porama (0,45 – 0,6 nm) (sadrže 10 Si i Al atoma);
- ⊗ zeolite sa malim porama (0,3 – 0,45 nm) (sadrže 8 Si i Al atoma) (Kordala i Wyszowski, 2024).

2.7.2. Upotreba zeolita

2.7.2.1. U poljoprivredi

Svojstvo zeolita da zadržavaju vodu čini ih korisnim za upotrebu u poljoprivredi u cilju povećanja kapaciteta zemljišta da zadrži vodu. U periodu suše upotreba zeolita može da poveća šanse za održavanje useva. Takođe, pozitivan efekat se ogleda i u zaštiti zemljišta od erozije, povećanju hidraulične povodljivosti zemljišta, kao i povećanju aeracije. Vezivanjem zeolita za zemljište se povećava specifična površina čestica i poroznost, što, između ostalog, štiti zemljište od prevelikog gubitka organske supstance.

Upotreba zeolita može da smanji ispuštanje nitrata u podzemne vode, tako što vezuje katjone amonijuma i na taj način onemogućava prevođenje NH_4^+ u NO_3^+ od strane mikroorganizama.

Uzgajanje biljnih kultura je postalo nezamislivo bez upotrebe pesticida i herbicida, što ima negativne posledice na životnu sredinu. Upotrebom zeolita se obezbeđuje postepeno otpuštanje herbicida i smanjuje njihovo neželjeno širenje u zemljištu. Zeoliti mogu da smanje biljne bolesti tako što formiraju barijeru između biljnog organa i štetočine, kao i da pospeše fotosintezu postepenim otpuštanjem CO_2 .

Mešanje zeolita sa živinskom i stočnom prehranom dovodi do uklanjanja mikotoksina što pozitivno utiče na kvalitet jaja kod kokošaka i veće dobijanje na težini kod svinja. (Mgbemere et al., 2017).

2.7.2.2. U zaštiti životne sredine

Uklanjanje radioizotopa iz kontaminiranih voda je još jedno svojstvo zeolita. Pored radioizotopa, oni mogu da smanje bioakumulaciju teških metala u zemljištu, kao što su Co, Cr, Cu, Pb, Hg, kao i da iste uspešno uklone iz voda (Kordala i Wyszowski, 2024; Mgbemere et al., 2017).

Zeoliti se mogu upotrebiti i za apsorpciju gasova kao što su CH_4 , CO_2 , N_2O , NH_3 , H_2S i na taj način bi se mogao poboljšati kvalitet vazduha, posebno oko oblasti u kojima su farme. Katalitička svojstva zeolita čine ih pogodnim za redukciju azotnih oksida i isparljivih organskih supstanci, koji

nastaju kao nusprodukti pri spaljivanju fosilnih goriva i koji se oslobađaju iz fabrika za proizvodnju đubriva (Kordala i Wyszowski, 2024).

2.7.2.3. Upotreba zeolita u uklanjanju naftnih polutanata

Fizičko-hemijska svojstva zeolita, kao što su velika specifična površina, mehanička i termička stabilnost, visok kapacitet za izmenu jona, svojstva molekulskog sita, stabilnost rešetke, čini zeolite pogodnim za uklanjanje različitih vrsta polutanata (Adeola i Forbes, 2020; Rahman et al., 2022). Ipak, zeoliti pokazuju mali afinitet prema anjonskim oblicima metala kao i prema polarnim i nepolarnim organskim jedinjenjima (Muir et al., 2017; Xie et al., 2012). Oleofilnost zeolita se može postići na dva načina. Jedan način je povećanje adsorpcione moći minerala, što se postiže povećanjem pora, čime se omogućava uljima sa dužim ugljeničnim lancima da se pozicioniraju unutar rešetke. Drugi način je povećanje adsorpcione sposobnosti. To se postiže ili smanjenjem prečnika čestica, pa samim tim i pora, ili modifikacijama površine minerala, odnosno adsorpcijom neorganskih soli i organskih surfaktanata na površini zeolita (Lemić et al., 2006; Madhubashani et al., 2021; Muir et al., 2017; Oliveira et al., 2021; Robles-Mora et al., 2021; Xie et al., 2012). Zahvaljujući negativnom naelektrisanju površine minerala zeolita, ove modifikacije katjonskim surfaktantima su lako izvodljive (Lemić et al., 2006).

2.7.2.4. Ostale upotrebe zeolita

Zbog svoje termostabilnosti zeoliti mogu da se koriste i za gašenje hemijskih požara. Upotrebu su našli i u proizvodnji piva gde se koriste za uklanjanje viška enzima. U medicini mogu da se koriste za uklanjanje alkohola i teških metala iz organizma (Dolanc et al., 2023; Mgbemere et al., 2017), kao i pri hemodijalizi za uklanjanje NH_3 , dok postoje indicije da bi mogli da se koriste i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji za enkapsulaciju enzima (Mgbemere et al., 2017).

Zbog strukture zeolita, koja im obezbeđuje negativno naelektrisanje, različiti katjoni iz rastvora mogu da se vezuju na mesto jonoizmenjivih katjona. Vezivanjem amonijum hidroksida zeolit postaje protonovan, što dalje omogućava njegovu upotrebu kao kiselog katalizatora (Mgbemere et al., 2017).

2.7.3. Sinteza zeolita

Prilikom sinteze zeolita kao izvor silicijuma i aluminijuma mogu da se koriste sintetički ili prirodni polazni materijali. Kako su sintetički materijali skuplji, najčešći izbor su prirodni materijali kao što je glina, ugljena prašina, ljuska pirinča. Postoje tri osnovne metode sinteze zeolita: hidrotermalna, solvotermalna i jonotermalna metoda. Hidrotermalna metoda je najzastupljenija, te će biti ukratko opisana na primeru sinteze zeolita od gline kao polazne sirovine.

2.7.3.1. Sinteza zeolita hidrotermalnom metodom

Prilikom hidrotermalne sinteze zeolita kao rastvarač se koristi voda, dok rastvor baze služi kao izvor jonoizmenjivog katjona. Kristalizacija se odvija pri temperaturama u rasponu 90 – 180 °C.

Najpre se kalcinacijom na 550 °C u trajanju od 1,5 h struktura gline menja i isparljive materije bivaju uklonjene, čime se dobija metakaolinit. Zatim se metakaolinit meša u rastvoru NaOH pri temperaturi od 90 °C u trajanju od 4h. Intenzivno mešanje i visoka temperatura za svrhu imaju da olakšaju uvođenje Na^+ u stukturu. Višak NaOH se ispira destilovanom vodom, sediment se filtrira i suši na 110 °C 3h (Ugal et al., 2010). Variranjem parametara sinteze dobijaju se zeoliti različitih struktura i veličina pora.

2.7.4. Modifikacija zeolita organskim surfaktantima

Istraživanja ukazuju na to da su zeoliti, bez prethodnih modifikacija, izuzetno efikasni u procesu adsorpcije toksičnih elemenata (teških metala) i drugih katjonskih vrsta, kao što je amonijum, iz zagađenih voda. Zbog malog afiniteta zeolita prema nepolarnim organskim jedinjenjima, njihova površina se modifikuje organskim jedinjenjima kako bi se taj afinitet povećao (Muir i Bajda, 2016).

Poslednjih godina je modifikacija površine zeolita surfaktantima iz grupe kvaternarnih amonijumovih soli, odnosno sinteza organozeolita, postala atraktivno polje istraživanja. Ovi surfaktanti su organski katjoni dugog lanca koji poseduju trajno pozitivno naelektrisanje. Oni poseduju katjonsku grupu koja gradi „glavu“ molekula i dug ugljovodonični lanac koji formira „rep“ surfaktanta.

Tokom modifikacije zeolita joni surfaktanta mogu da se vežu za površinu minerala usled elektrostatičkih interakcija putem izmene sa katjonima natrijuma, kalijuma ili kalcijuma. Veličina organskih katjona je veća od dijametra pora zeolita, tako da se surfaktanti vezuju samo za njihovu spoljašnju površinu. Mešanjem rastvora amonijumove soli sa zeolitom može da se formira monosloj ili dvosloj surfaktanta na površini zeolita. Faktori koji određuju da li će se formirati mono- ili dvosloj su, pre svega, površinsko naelektrisanje zeolita, koncentracija surfaktanta u rastvoru i dužina lanca surfaktanta. Kada je, tokom modifikacije, količina surfaktanta ispod ili jednaka spoljašnjem kapacitetu za razmenu katjona (*engl. External Cation Exchange Capacity; ECEC*) zeolita, dolazi do formiranja monosloja, te je površina ovako dobijenih organozeolita hidrofobna, što čini ove modifikovane minerale pogodnim adsorbentima za različite vrste organskih hidrofobnih polutanata male polarnosti. Ukoliko je količina surfaktanta iznad ECEC vrednosti, na površini organozeolita dolazi do interakcija između hidrofobnih „repova“ molekula surfaktanta i formiranja dvosloja. U drugom sloju je orijentacija „glave“ surfaktanta ka rastvoru, što uzrokuje pozitivan naboj površine organozeolita, obezbeđujući mesta za adsorbovanje dodatnih anjona (Haggerty i Bowman, 1994; Szala et al., 2015).

Dužina lanca surfaktanta utiče na hidrofobnost molekula, odnosno na formiranje dvosloja, tj. duži lanci omogućavaju jače interakcije. Međutim, molekuli dužih lanaca (C22) često imaju tendenciju da formiraju micelle. Razlog leži u činjenici da duži lanci blokiraju mesta vezivanja i time utiču na krajnju strukturu formiranog sloja (Lemić et al., 2006; Muir i Bajda, 2016; Nutcharin, 2015; Xie et al., 2013). Takođe se pokazalo da je modifikacija sintetičkih zeolita uspešnija od prirodnih, što leži u činjenici da je struktura sintetičkih zeolita uniformnija (Muir i Bajda, 2016).

Formirani organski sloj na površini zeolita je hidrofoban i ponaša se kao rastvarač za nepolarna jedinjenja, što omogućava vezivanje nepolarnih jedinjenja za površinski organski sloj. Naftni kontaminanti, kao što su mašinsko ulje ili dizel, se zbog svoje gustine bolje vezuju za organski sloj modifikovanog zeolita (Muir i Bajda, 2016).

Postoji nekoliko studija koje opisuju adsorpciju različitih komponenti WSF-a (PAH i BTEX) na organozeolite. Na primer, Hedayati i Li su proučavali adsorpciju PAH-ova (antracena, fluorantena, fluorena, fenantrena i pirena) iz vodenog rastvora na prirodni zeolit koji je, pre modifikacije različitim amonijumovim solima, pretretiran sa NaCl (Hedayati i Li, 2020). Za modifikaciju su korišćeni cetilpiridinium hlorid (CPC), didodecildimetilamonijum bromid (DDAB), heksadeciltrimetilamonijum bromid (HDTMA-Br) i tetrametilamonijum hlorid (TMA). Rezultati su pokazali da adsorpcija PAH-ova zavisi od hidrofobnosti modifikovanih zeolita i π - π interakcija donor-akceptor elektrona sa jonima surfaktanta. Pretretirani zeoliti modifikovani sa CPC i DDAB su bili znatno efikasniji u adsorpciji PAH-ova od zeolita modifikovanih sa HDTMA i TMA. U drugoj studiji Wołowiec i saradnika zeolit sintetisan iz pepela i prirodni zeolit (klinoptilolit) modifikovani surfaktantima dodeciltrimetilamonijum bromidom (DDTMA), DDAB, tetradeciltrimetilamonijum bromidom (TDTMA), ditetradecildimetilamonijum bromidom (DTDDMA), HDTMA i diheksadecildimetilamonijum bromidom (DHDDMA) su ispitivani kao adsorbenti benzena, etilbenzena, toluena, *p*-ksilena (BTEX) i heksana (Wołowiec et al., 2017). Uočili

su da efikasnost uklanjanja zagađujućih jedinjenja prati sledeći redosled: heksan > etilbenzen > toluen > *p*-ksilen > benzen, kao i da adsorpcija raste sa povećanjem dužine ugljovodoničnog lanca surfaktanta.

Lemić i saradnici su proučavali uticaj temperature i pH na modifikaciju zeolita pomoću stearildimetilbenzilamonijum hlorida (SDBAC) i pokazali da su zeoliti modifikovani sa SDBAC stabilni u širokom opsegu pH vrednosti (pH 3 do pH 10), što omogućava njihovu širu upotrebu (Lemić et al., 2006).

Nakon adsorpcije naftnog polutanta na organozeolit, iskorišćeni sorbent se dalje tretira kao drugi opasni otpadi, a najčešće spaljivanjem. Ovaj pristup nije ekološki povoljan, jer se spaljivanjem u atmosferu oslobađaju toksične supstance i gasovi staklene bašte. Iz tog razloga je pristup bioremedijacije iskorišćenog organozeolita ekološki povoljniji.

2.8. Modelovanje biosorpcije

Kada su u rastvoru istovremeno prisutni adsorbent i rastvorene supstance (organska i neorganska jedinjenja), ove supstance teže da se vežu za graničnu površinu adsorbenta sve dok ne nastupi ravnotežno stanje, odnosno ravnoteža između vezanog i slobodnog adsorbata. Svaki adsorbent poseduje određeni maksimalni kapacitet adsorpcije koji se određuje eksperimentalno variranjem koncentracija adsorbenta i adsorbata u rastvoru, te se iz koncentracija vezanog i slobodnog adsorbata pri ekvilibrijumu dobijaju podaci za konstruisanje krive adsorpcione izoterme. Iz ove krive je moguće dobiti korisne podatke o maksimalnom kapacitetu adsorpcije datog adsorbenta (plato na krivi je signal da je adsorbent zasićen adsorbatom), kao i o afinitetu datog adsorbenta prema ispitivanom adsorbatu (nagib krive) (Wang i Guo, 2020a).

Za matematičku obradu dobijenih podataka se koriste različiti modeli. Za opisivanje procesa adsorpcije pri kojoj se formira monosloj, koriste se hemijske izoterme, dok se fizičke izoterme koriste za definisanje formiranja više slojeva (Wang i Guo, 2020a). Najčešće se koriste Langmuir-ov i Freundlich-ov model, koji opisuju maksimalan kapacitet adsorbenta za adsorpciju jednog adsorbata. Pored ovih modela u upotrebi su i Temkin-ov, Elovich-ov, Brunauer-Emmett-Teller-ov, Sips-ov, Redlich-Peterson-ov model i drugi (Wang i Guo, 2020a).

2.8.1. Adsorpcione izoterme

2.8.1.1. Langmuir-ova izoterma

Iako prvobitno razvijena za deskripciju fizičke adsorpcije gasova, ukoliko se ispune određeni uslovi, može da se koristi za kvantifikaciju adsorpcije iz rastvora i hemisorpcije. Neophodni uslovi su:

- ⊗ površina adsorbenta raspolaže ograničenim brojem mesta za vezivanje adsorbata koja je nepromenljiva, bez obzira na procenat pokrivenosti površine adsorbenta datim adsorbatom;
- ⊗ proces adsorpcije je reverzibilan;
- ⊗ za svako aktivno mesto se vezuje samo jedan molekul adsorbata do formiranja monosloja, što je istovremeno i maksimalna količina adsorbata koji se može vezati;
- ⊗ površina adsorbenta je homogena;
- ⊗ adsorbovana jedinjenja su imobilna i međusobno ne interaguju (Wang i Guo, 2020a).

Tada se Langmuir-ova izoterma predstavlja jednačinom (2):

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

gde je:

q_e adsorpcioni kapacitet u ekvilibrijumu (mmol/g ili mg/g);

q_m maksimalna količina adsorbata potrebna da se formira monosloj, odnosno dostigne maksimum adsorpcije (mmol/g ili mg/g);

K_L Langmuir-ova konstanta izoterme koja opisuje odnos između brzine adsorpcije i absorpcije (L/mmol);

C_e ravnotežna koncentracija (mmol/L ili mg/L).

Ako je K_L vrednost poznata, moguće je izračunati separacioni faktor R_L koji se opisuje jednačinom (3):

$$R_L = \frac{1}{1+K_L C_i} \quad (3)$$

gde je:

C_i inicijalna koncentracija adsorbata (mmol/L ili mg/L);

K_L je Langmuir-ova konstanta ravnoteže (L/mg);

R_L je bezdimenzionalna konstanta koja ukazuje na tip izoterme: nefavorizovana ($R_L > 1$), linearna ($R_L = 1$), favorizovana ($0 < R_L < 1$) ili ireverzibilna ($R_L = 0$) (Ayawei et al., 2017). Vrednost R_L ukazuje i da li je odabrani adsorbent pogodan i/ili selektivan za adsorpciju datog adsorbata.

2.8.1.2. Freundlich-ova izoterma

Freundlich-ova izoterma opisuje zavisnost između količine adsorbovane supstance i inicijalne koncentracije adsorbata na heterogenim površinama. Pri niskim koncentracijama adsorbata, ta zavisnost je linearna. Kada je koncentracija adsorbata visoka, površina adsorbenta biva zasićena, dok se pri srednjim koncentracijama adsorbat postepeno vezuje za površinu adsorbata. Ova izoterma se u velikom broju slučajeva može predstaviti jednačinom (4):

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (4)$$

Ovo je jednačina Freundlich-ove izoterme i primenjuje se pre svega za opisivanje fizičke adsorpcije gde je:

q_e adsorbovana količina adsorbata po jedinici mase adsorbenta (mmol/g ili mg/g);

K_f Freundlich-ova konstanta proporcionalna adsorpcionom kapacitetu;

C_e ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru (mmol/L ili mg/L);

$1/n$ empirijski parametar intenziteta adsorpcije koji opisuje energetska heterogenost površine.

Kada je $1/n = 1$, izoterma ima linearan oblik i slobodna energija adsorpcije se ne menja variranjem koncentracije adsorbata. Ova izoterma je primenljiva u slučajevima kada je koncentracija adsorbata veoma niska i tada ne dolazi do međusobnih interakcija između adsorbovanih jedinjenja.

Kada je $1/n < 1$, izoterma poseduje konveksan oblik, dok se sa povećanjem koncentracije adsorbata povećava i slobodna energija adsorpcije. Funkcionisanje sistema u kojima je adsorpcija smanjena pri niskim koncentracijama adsorbata se opisuje ovom izotermom. Približavanjem vrednosti $1/n$ nuli, povećava se energetska heterogenost površine adsorbata.

Kada je $1/n > 1$, tada izoterma dobija konkavan oblik, što ukazuje na smanjenje slobodne energije povećanjem koncentracije adsorbata. Ova izoterma se viđa kod sistema u kojima adsorbovane čestice stimulišu dalju adsorpciju.

2.8.2. Kinetika hemijskih reakcija

Prilikom ispitivanja hemijskih reakcija, bitni parametri koji se uzimaju u razmatranje su brzina i sam mehanizam odvijanja hemijskih reakcija. Podela hemijskih reakcija se može izvršiti na osnovu mehanizma - one mogu biti proste i složene, pri čemu se proste odvijaju u jednom koraku, dok je pri složenim reakcijama prisutno nekoliko uzastopnih koraka. Dalje se složene reakcije mogu podeliti na ravnotežne, uzastopne, paralelne, katalitičke i lančane. Sa aspekta fizičke hemije hemijske reakcije mogu biti homogene ili heterogene, te nepovratne i povratne (Šoštarić, 2016).

Heterogene hemijske reakcije su kompleksnije i zahtevnije za analizu od homogenih, jer se hemijske reakcije u heterogenim sistemima odigravaju na površini dve faze. Za razliku od homogenih reakcija, heterogene mogu da se odvijaju veoma brzo, što se objašnjava fenomenom adsorpcije molekula na površini čvrste faze, što uslovljava povećanje koncentracije reaktanata na tom mestu.

Kinetika transfera adsorbata se odigrava u nekoliko koraka. Najpre dolazi do kretanja adsorbenta iz tečne faze do graničnog sloja čestice adsorbenta, nakon čega nastupa spoljašnja difuzija, odnosno transport adsorbenta kroz granični sloj oko čestice, što je podstaknuto razlikom u koncentraciji adsorbata u rastvoru i na površini čestice. Nakon toga sledi preraspodela adsorbata unutar pora čestica adsorbenta (unutrašnja difuzija). Poslednji korak je adsorpcija adsorbata na aktivna mesta adsorbenta. Ukupna brzina procesa adsorpcije je određena brzinom najsporijeg koraka (Šoštarić, 2016; Wang i Guo, 2020b).

Za obradu eksperimentalnih podataka dobijenih proučavanjem adsorpcije koristi se nekoliko matematičkih modela. Osnovna podela kinetičkih modela je na one zasnovane na reakciji i zasnovane na difuziji. Proste hemijske reakcije se odvijaju brzinom reakcija prvog ili drugog reda. Međutim, kada je jedan od reaktanata u velikom višku, tako da ne određuje brzinu reakcije, takve reakcije se nazivaju reakcijama pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. Ovi modeli su zasnovani na reakciji.

2.8.2.1. Model pseudo-prvog reda

Model pseudo-prvog reda je jedan od najčešće korišćenih modela za opisivanje adsorpcije adsorbata na adsorbentu. Prema ovom modelu, jedan tip adsorbata se vezuje za jedno aktivno mesto gradeći adsorpcioni kompleks.

Jednačina modela pseudo-prvog reda se predstavlja sledećim izrazom (5):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (5)$$

gde su:

q_t i q_e količine adsorbenta adsorbovane u datom vremenu i pri ekvilibrijumu, redom (mg/g ili mmol/g);

k_1 konstanta brzine adsorpcije (g/mg min).

Daljim integraljenjem jednačine (5) za granične uslove $t=t$, $q_t=0$, $t=0$, $q_t=q_t$ ona dobija oblik (6):

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (6)$$

Radi lakše primene, jednačina (6) se prikazuje u linearnoj formi (7):

$$\ln(q_e - q_t) = -k_1 t + \ln q_e \quad (7)$$

Ovaj model je primenljiv za opisivanje početnih faza adsorpcije, jer nakon adsorpcije određenog procenta adsorbata dolazi do smanjenja adsorpcionih mesta (Šoštarić, 2016).

2.8.2.2. Model pseudo-drugog reda

Model pseudo drugog reda se predstavlja sledećim izrazom (8):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t)^2 \quad (8)$$

gde su:

q_t i q_e količine adsorbenta adsorbovane u datom vremenu i pri ekvilibrijumu, redom (mg/g ili mmol/g);

k_1 konstanta brzine adsorpcije (g/mg min).

Daljim integraljenjem jednačine (8) za granične uslove $t=t$, $q_t=0$, $t=0$, $q_t=q_t$ ona dobija oblik (9):

$$q_t = t / \left(\frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} \right) \quad (9)$$

$k_2 q_e$ i q_e su nagib i odsečak i oni se određuju sa grafičkog prikaza. Ovaj model je primenljiv za opisivanje hemisorpcije na čvrstim adsorbentima (Patil et al., 2024; Šoštarić, 2016).

3. Materijal i metode

3.1. Uzorkovanje i analiza sedimenta i podzemne vode

3.1.1. Uzorkovanje sedimenta

Za ovu studiju je ispitano 45 uzoraka sedimenta sakupljenih sa tri lokacije (B1, B2 i B3) u okviru oblasti C (slika 4.2. str. 66), identifikovane kao zona zagađenja naftnim ugljovodonicima, i to pri svakom periodu uzorkovanja. Uzorci sedimenta su sakupljeni na početku, nakon 6 meseci i nakon 12 meseci *in situ* bioremedijacije.

Na sve tri lokacije uzorci sedimenta su uzimani sa dubina od 0 do 15 m kao što je predstavljeno u tabeli 3.1. Uzorkovanje je izvođeno u skladu sa ISO 5667-1 (2006), ISO 5667-12 (2006) i ISO 18400-102 (2017) standardima. Sedimenti su uzorkovani sa reprezentativnih lokacija kao kompozitni uzorci. Svaki kompozitni uzorak je sakupljan „cik-cak“ metodom sa 10 nasumično odabranih mesta za određenu dubinu iz nabušenog jezgra date lokacije (slika 3.1.). Kompozitni uzorci su dalje prosejani kroz sito promera 2 mm, sakupljeni u staklene tegle i čuvane na 4 °C do analiza koje su sprovedene u roku od 12 – 24 h od momenta uzorkovanja (Avdalović et al., 2016).



Slika 3.1. Jezgro nabušeno na jednoj od lokacija sa vidljivim litološkim članovima pre uzimanja kompozitnih uzoraka

Tabela 3.1. Oznake uzoraka sedimenta po dubinama za tri lokacije

Dubina (m)	Uzorci sa lokacije B1	Uzorci sa lokacije B2	Uzorci sa lokacije B3
0-1	B1-1	B2-1	B3-1
1-2	B1-2	B2-2	B3-2
2-3	B1-3	B2-3	B3-3
3-4	B1-4	B2-4	B3-4
4-5	B1-5	B2-5	B3-5
5-6	B1-6	B2-6	B3-6
6-7	B1-7	B2-7	B3-7
7-8	B1-8	B2-8	B3-8
8-9	B1-9	B2-9	B3-9
9-10	B1-10	B2-10	B3-10
10-11	B1-11	B2-11	B3-11
11-12	B1-12	B2-12	B3-12
12-13	B1-13	B2-13	B3-13
13-14	B1-14	B2-14	B3-14
14-15	B1-15	B2-15	B3-15

3.1.2. Uzorkovanje podzemne vode

Pre uzorkovanja su mereni nivoi podzemnih voda, a zatim su uzorci podzemne vode crpljeni pomoću potapajuće pumpe u litarske PET flaše bez ftalata (slika 3.2a.) kako bi se izbeglo detektovanje signala ftalata prilikom gasne i gasno-masene analize, nakon čega su transportovani u laboratoriju i čuvani na 4 °C do analize koja je obavljena u roku od 24h. Istovremeno je, prilikom uzorkovanja za laboratorijsku analizu, podzemna voda sakupljana u staklene tegle kako bi se na licu mesta obavila merenja pH vrednosti, električne provodljivosti, ukupnih rastvorenih elektrolita (TDS), ukupnog rastvorenog kiseonika u vodi kao i temperature vode (slika 3.2b.).



Slika 3.2. Uzorci podzemnih voda po prijemu u laboratoriju (a) i terensko merenje fizičko-hemijskih parametara (b)

3.1.3. Analitičke metode

3.1.3.1. Određivanje sadržaja suve supstance u sedimentu

Sadržaj suve supstance određivan je u skladu sa SRPS ISO 11465 standardom (2002). Uzorak sedimenta je najpre homogenizovan, a zatim je oko 5 g uzorka preneto u stakleni vegeglas, prethodno osušen na 105 ± 5 °C do konstantne mase, i sušen preko noći na 105 ± 5 °C. Iz razlika u masi vlažnog i suvog uzorka je izračunat procenat suve supstance.

3.1.3.2. Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti sedimenta

Određivanje pH vrednosti je vršeno u skladu sa SRPS ISO 10390 standardom (2007). Uzorak sedimenta je suspendovan u prokuvanoj demineralizovanoj vodi u odnosu 1:2,5 (g/V) i homogenizovan u trajanju od 30 min na magnetnoj mešalici, nakon čega je izmerena pH vrednost pomoću voltmetra/pH-metra (model HQ411d, elektroda PHC28101, HACH).

3.1.3.3. Određivanje sadržaja organske supstance u sedimentu

Uzorak korišćen za određivanje suve supstance je najpre spaljen na plameniku do oslobađanja od belih para, zatim je prenet u porcelanski tigl ustaljene mase, a zatim žaren u peći na 550 °C do konstantne mase. Iz razlika u masama je izračunat sadržaj organske supstance u uzorku.

3.1.3.4. pH vode

pH vrednost vode je određena odmah nakon uzorkovanja u skladu sa SRPS EN ISO 10523 standardom (2016) pomoću digitalnog voltmetra/pH-metra (Hanna instruments).

3.1.3.5. Električna provodljivost (κ) i ukupne rastvorene čestice (TDS) u vodi

Terensko merenje provodljivosti i ukupnih rastvorenih čestica je mereno konduktometrom/TDS-metrom (model 44600, HACH) u skladu sa SRPS EN 27888 standardom (2009).

3.1.3.6. Sadržaj rastvorenog kiseonika u vodi

Sadržaj rastvorenog kiseonika je meren pomoću digitalnog oksimetra sa membranskom elektrodom (Oi 330i, WTW) u skladu sa US EPA Hach metodom 10360 (2006).

3.1.3.7. Temperatura vode

Temperatura uzoraka vode je merena pomoću digitalnog termometra (Elite, HANNA Instruments) u skladu sa US EPA 170.1 metodom (1974).

3.1.3.8. Ekstrakcija TPH iz čvrstih uzoraka

Ukupni naftni ugljovodonici (*engl. Total Petroleum Hydrocarbons, TPH*) iz čvrstih uzoraka su ekstrahovani u skladu sa ISO 16703 standardom (2004). Najpre je 5 – 10 g uzorka mešano sa 40 mL acetona i 20 mL *n*-heksana na rotacionoj mućkalici pri 180 rpm u trajanju od 1 h. Zatim je supernatant dekantovan u levak za odvajanje, te je ekstrakcija ponovljena sa istom količinom svežih reagenasa. Nakon toga je višak acetona iz ekstrakta neutralisan u dva ciklusa ispiranjem sa 100 mL destilovane vode. Organski sloj je sakupljan u erlenmajere sa anhidrovanim Na₂SO₄ i ostavljen preko noći kako bi se odstranio višak vode. Zatim su ekstrakti prečišćavani propuštanjem kroz komercijalno dostupne kolone punjene anhidrovanim Na₂SO₄ i Florisilom (Supelclean™ Florisil®/Na₂SO₄ SPE Tube, 52582-U, Sigma-Aldrich), te uparavani u struji azota. Ovako dobijeni ekstrakti su dalje analizirani gasnom hromatografijom sa plameno jonizujućim detektorom (*engl. Gas Chromatography with Flame Ionization Detector, GC-FID*) (poglavlje 3.1.5.1.) i sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (*engl. Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, GCxGC-MS*) (poglavlje 3.1.5.2.).

3.1.3.9. Ekstrakcija TPH iz tečnih uzoraka

Određivanje TPH u tečnim uzorcima rađeno je u skladu sa ISO 9377-2 standardom (2000). Najpre je u levku za odvajanje vršena ekstrakcija sa 3×50 mL *n*-heksana. Nakon odvajanja vodene i organske faze, *n*-heksanski ekstrakt je sakupljan u erlenmajere sa anhidrovanim Na₂SO₄ i ostavljen preko noći radi uklanjanja viška vode. Zatim su ekstrakti prečišćavani propuštanjem kroz komercijalno dostupne kolone punjene anhidrovanim Na₂SO₄ i Florisilom (Supelclean™ Florisil®/Na₂SO₄ SPE Tube, 52582-U, Sigma-Aldrich), te uparavani u struji azota. Ovako dobijeni ekstrakti su analizirani GC-FID metodom (poglavlje 3.1.5.1.).

3.1.4. Mikrobiološke metode

Sve mikrobiološke podloge za izolovanje, umnožavanje i određivanje broja mikroorganizama su pre upotrebe sterilisane u autoklavu na 121 °C u trajanju od 25 min.

3.1.4.1. Podloga za izolovanje ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB)

Za pripremanje podloge je korišćen komercijalni hranljivi agar i pripremljen je u skladu sa uputstvom proizvođača (Torlak, Srbija).

3.1.4.2. Podloga za izolovanje kvasaca i plesni (KP)

Za pripremu podloge je korišćen komercijalni sladni agar i pripremljen prema uputstvu proizvođača (Torlak, Srbija). Nakon sterilizacije u autoklavu dodat je streptomycin u koncentraciji 50 mg/L.

3.1.4.3. Podloga za izolovanje mikroorganizama-naftnih degradera (ND)

Za izolovanje bakterija degradera naftnih ugljovodonika korišćena je UG podloga (Löser et al., 1998) sledećeg sastava:

Amonijum hlorid	1,5 g/L
Kalijumdihidrogenfosfat	0,55 g/L
Dinatrijumhidrogenfosfat	0,135 g/L
Magnezijum(II) sulfat heptahidrat	0,25 g/L
<i>Rastvor mikroelemenata</i>	5 mL/L
pH	≈7

Nakon sterilizacije u autoklavu dodat je dizel u koncentraciji od 2000 ppm.

Rastvor mikroelemenata dobijen je rastvaranjem sledećih komponenti:

Dinatrijum EDTA	500 mg/L
Gvožđe(II) sulfat heptahidrat	200 mg/L
Borna kiselina	30 mg/L
Kobalt(II) hlorid heksahidrat	20 mg/L
Zinksulfat heptahidrat	10 mg/L
Mangan(II) sulfat monohidrat	3 mg/L
Natrijum molibdat dihidrat	3 mg/L
Nikl(II) sulfat heptahidrat	2 mg/L
Bakar(II) hlorid dihidrat	1 mg/L
10M HCl	1 mL/L
pH	≈7

pH vrednost je podešena rastvorom 1M NaOH.

3.1.4.4. Podloga za izolovanje *Pseudomonas* spp. (Ps)

Za izolovanje bakterija iz roda *Pseudomonas* korišćena je podloga sledećeg sastava (Collins et al., 2004):

Pepton	20 g/L
Magnezijum hlorid	1,4 g/L
Kalijum sulfat	10 g/L
Irgasan	25 mg/L
Agar	13,6 g/L
Glicerol	20 mL/L

3.1.4.5. Podloga za izolovanje *Nocardia* i *Rhodococcus* spp. (NR)

Za izolovanje *Nocardia* i *Rhodococcus* spp. korišćena je M3 agarozna podloga (Atlas, 2010) sledećeg sastava:

Kalijumdihidrogenfosfat	0,466 g/L
Dinatrijumhidrogenfosfat	0,732 g/L
Kalijum nitrat	0,01 g/L
Natrijum hlorid	0,29 g/L
Magnezijum(II) sulfat heptahidrat	0,1 g/L
Kalcijum karbonat	0,02 g/L
Gvožđe(II) sulfat heptahidrat	200 µg/L
Zinksulfat heptahidrat	180 µg/L
Mangan(II) sulfat tetrahidrat	20 µg/L
Natrium propionat	0,2 g/L
ili propionska kiselina	0,16 g/L

Nakon podešavanja pH natrijum hidroksidom dodat je

Agar	18 g/L
------	--------

pH vrednost treba da bude 7. Nakon sterilizacije u autoklavu u ohlađenu podlogu dodati su:

Aktidion	50 mg/L
TiaminHCl	4,0 mg/L

TiaminHCl je, pre dodavanja, sterilisan hladnom filtracijom.

3.1.4.6. Ray-ov mineralni medijum

Za biodegradacioni eksperiment pripremljen je Ray-ov mineralni medijum sledećeg sastava (Ray et al., 1999):

Kalijumdihidrogenfosfat	6,9 g/L
Dinatrijumhidrogenfosfat dodekahidrat	4,2 g/L
Magnezijum(II) sulfat heptahidrat	0,1 g/L
Rastvor mikroelemenata	3 mL/L
Amonijum hlorid	0,3 g/L
pH	≈7

Rastvor mikroelemenata je istog sastava kao što je opisano u poglavlju 3.1.4.3.

pH vrednost je podešena 1M rastvorom kalijum hidroksida do 7. Nakon dodavanja 4-nitrofenola medijum je sterilisan u autoklavu 20 min na 121 °C.

3.1.4.7. Pomoćni mikrobiološki rastvori

Fiziološki rastvor 0,9%

Fiziološki rastvor je pripremljen rastvaranjem 9,0 g natrijum hlorida u 1000 mL demineralizovane vode i korišćen za pripremu serijskih razblaženja.

Ekstrakt zemlje

Ekstrakt zemlje pripremljen je homogenizacijom 1000 g kontaminiranog sedimenta u 1000 mL česmenske vode i zagrevanjem do ključanja u trajanju od nekoliko minuta. Ohlađen i profiltriran rastvor korišćen je za pripremanje podloga.

3.1.4.8. Određivanje broja mikroorganizama i izolovanje čistih kultura

Za određivanje brojnosti mikroorganizama u uzorcima sedimenta i vode korišćena je metoda serijskih razblaženja (10^{-2} do 10^{-6}). Odgovarajuća razblaženja su preneti na adekvatne podloge i inkubirana na 28 °C u različitom vremenskom trajanju. Brojnost ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB) je praćena inkubacijom na hranljivom agaru u trajanju od 48h. Za određivanje broja *Pseudomonas* spp. (Ps) u sedimentu korišćen je agar za izolovanje *Pseudomonas* sojeva i vreme gajenja je bilo tri dana. Inkubacijom na sladnom agaru u trajanju od četiri dana određen je broj kvasaca i plesni (KP). M3 agar je korišćen za određivanje brojnosti *Nocardia* i *Rhodococcus* spp. (NR) u sedimentu, a UG podloga za degradere naftnih ugljovodonika (HD) pri inkubacionom period od 10 dana. Kako bi se obezbedila kontrola kvaliteta, mikrobiološki eksperimenti su izvođeni u skladu sa preporukama objavljenim od strane APHA (2018) u publikaciji „Standardne metode za ispitivanje vode i otpadne vode“. Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu.

Čiste kulture su dobijene prenošenjem pojedinačnih kolonija na odgovarajuće podloge metodom iscrpljenja.

3.1.4.9. Taksonomska karakterizacija izolovanih mikroorganizama

Mikroorganizmi izolovani iz uzoraka sedimenta su identifikovani sekvencionom analizom 16S rRNK gena. Genomska DNK je ekstrahovana korišćenjem DNeasy Blood & Tissue Kit (Nemačka) prema uputstvu proizvođača. 16S rRNK geni su umnoženi pomoću PCR-a korišćenjem 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') i 1492R (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') prajmera (Yoon et al, 2017). Umnoženi molekuli mikrobni DNK su prečišćeni pomoću QIAquick PCR Purification Kit (Nemačka) za prečišćavanje. Izolovane DNK su poslate u MacroGen (Holandija) na sekvencioniranje. Dobijeni rezultati su deponovani u NCBI GenBank (*eng. National Center for Biotechnology Information, NCBI*) bazi podataka i poređeni sa postojećim sekvencama upotrebom BLAST programa. Taksonomska analiza je sprovedena pomoću EzBioCloud 16S baze podataka (Yoon et al., 2017).

Sekvence 16S rRNK gena mikroorganizama izolovanih iz uzoraka sedimenta su deponovani u GenBank bazi podataka pod pristupnim brojevima MT081361.1, MT111834.1 do MT111839.1, MT116985.1 do MT116987.1, MT117005.1, MT117228.1, MT117235.1, MT122949.1 do MT122951.1, MT126610.1 do MT126612.1, MT256173.1 do MT256177.1.

3.1.4.10. Konstruisanje filogenetskog stabla

Filogenetsko stablo je konstruisano pomoću algoritma spajanja suseda (*engl. Neighbor-Joining, NJ*) korišćenjem Tamura-Nei metode računanja evolutivne udaljenosti, stepena varijacije između pozicija modelovanih gama distribucijom i bootstrap testom sa 500 replikata, uključenih u paket MEGA X programa (Felsenstein, 1985; Kumar et al., 2018; Saitou i Nei, 1987; Tamura i Nei, 1993).

3.1.4.11. Priprema biomase za bioaugmentaciju

Priprema biomase za bioaugmentaciju se sastojala od tri faze. Inicijalno je 20 g kontaminiranog sedimenta korišćeno za inokulaciju 200 mL Startne podloge 1 (SP1) (Löser et al., 1998), koja je zatim inkubirana u sterilnim uslovima na 28 °C na rotacionoj mućkalici pri 150 rpm u trajanju od 4 dana. Ova suspenzija je dalje korišćena za inokulaciju četiri erlenmajera sa 2000 mL Startne podloge 2 (SP2), nakon čega je inkubacija trajala četiri dana na 28 °C na rotacionoj mućkalici pri 150 rpm, takođe u sterilnim uslovima. Ovako dobijena fermentaciona kultura je korišćena za inokulaciju bioreaktora sa 800 L Radne podloge (RP). U ovoj fazi je propagacija vršena uz mešanje i aeraciju od 0,7 zapremina vazduha/zapremini medijuma u minuti pri ambijentalnoj temperaturi u trajanju od tri dana. U SP2 i RP dodavan je biodegradabilan, komercijalno dostupan biosurfaktant (BioSolve Clear, Westford, MA, USA) čija je uloga bila da poveća rastvorljivost naftnih ugljovodonika.

Startna podloga 1 (SP1) dobijena je rastvaranjem sledećih komponenti:

Amonijum hlorid	1,5 g/L
Kalijumdihidrogenfosfat	0,55 g/L
Dinatrijumhidrogenfosfat	0,135 g/L
Magnezijum(II) sulfat heptahidrat	0,25 g/L
Rastvor mikroelemenata	5 mL/L
Dizel	2 g/L
pH	≈7

Rastvor mikroelemenata dobijen je rastvaranjem sledećih komponenti:

Dinatrijum EDTA	500 mg/L
Gvožđe(II) sulfat heptahidrat	200 mg/L
Borna kiselina	30 mg/L
Kobalt(II) hlorid heksahidrat	20 mg/L
Zinksulfat heptahidrat	10 mg/L
Mangan(II) sulfat monohidrat	3 mg/L
Natrijum molibdat dihidrat	3 mg/L
Nikl(II) sulfat heptahidrat	2 mg/L
Bakar(II) hlorid dihidrat	1 mg/L
10M HCl	1 mL/L
pH	≈7

pH vrednost je podešena rastvorom 1M NaOH, nakon čega je izvršena sterilizacija podloge.

Startna podloga 2 (SP2) dobijena je rastvaranjem sledećih komponenti:

Pepton	7,5 g/L
Goveđi ekstrakt	1,5 g/L
Natrijum hlorid	2,5 g/L
Dikalijumhidrogenfosfat	0,2 g/L
Ekstrakt zemlje	25 mL/L
Biosurfaktant	1 g/L
Dizel	5 g/L
pH	≈7

Nakon sterilizacije u hladnu podlogu dodato je 30 mL dizela kako bi se favorizovao rast mikroorganizama naftnih degradera.

Radna podloga (RP) dobijena je mešanjem sledećih komponenti u bioreaktoru zapremine 1000 L:

Autolizat kvasca	12 g/L
Ekstrakt zemlje	100 mL/L
Dizel	5 g/L
Diamonijumfosfat	0,2 g/L
Biosurfaktant	1 g/L
pH	≈7

3.1.4.12. Priprema konzorcijuma mikroorganizama za biodegradacioni eksperiment

Odabrani sojevi mikroorganizama degradera naftnih ugljovodonika izolovanih i okarakterisanih kao što je opisano u poglavljima 3.1.4.8. i 3.1.4.9., redom, pre biodegradacionog eksperimenta su naneti na mineralni sladni agar koji je sadržao 2000 ppm dizela i inkubirani na 28 °C u trajanju od 7 dana.

3.1.5. Strukturno-instrumentalne tehnike

3.1.5.1. Određivanje TPH gasnom hromatografijom (GC-FID)

Koncentracija TPH je određivana gasnom hromatografijom na Agilent 7890A gasnom hromatografu sa plameno jonizujućim detektorom opremljenim HP-5 kolonom dimenzija $30\text{ m} \times 0,32\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$. Ekstrakti čvrstih uzoraka su injektovani pri temperaturi pećnice od $40\text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura injektora $250\text{ }^\circ\text{C}$, a detektora $300\text{ }^\circ\text{C}$) sa 1 minutom zadržavanja, a zatim je, u skladu sa programom, temperatura rasla $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ do postizanja temperature od $300\text{ }^\circ\text{C}$. Kao gas nosač je korišćen vodonik čiji je protok bio podešen na 30 cm/s (Avdalović et al., 2016).

Ekstrakti tečnih uzoraka su injektovani pri temperaturi pećnice od $60\text{ }^\circ\text{C}$ sa 1 minutom zadržavanja, a zatim je, u skladu sa programom, temperatura rasla $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ do postizanja temperature od $100\text{ }^\circ\text{C}$, te je, nakon 1 minuta zadržavanja, temperatura ponovo rasla brzinom $10\text{ }^\circ\text{C}$ do postizanja temperature od $310\text{ }^\circ\text{C}$ koja je održavana u trajanju od 15 min. Kao gas nosač je, takođe, korišćen vodonik čiji je protok bio podešen na 30 cm/s .

Podaci merenja su obrađeni pomoću softvera ChemStation (Agilent Technologies). Standardna kalibracija u pet tačaka je korišćena kako bi se utvrdila linearnost odgovora i izmerila koncentracija TPH. Pre analize, GC-FID je očišćen injektovanjem *n*-heksana, koji je istovremeno korišćen i kao slepa proba. Dodatno, za QA/QC (kontrola kvaliteta) je korišćen sertifikovani referentni materijal (*engl. Certified Reference Material*; CRM) sa koncentracijom ugljovodonika koja je odgovarala srednjim vrednostima studija, i preciznost je takođe procenjena za relativnu grešku.

3.1.5.2. Gasna-gasno masena hromatografija (GCxGC-MS)

Gasna-gasno masena analiza je rađena na GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan) sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografu sa masenim spektrometrom (GCxGC-qMS) opremljenim ZX2 termalnim sistemom modulacije (Zoex Corp.) kao što je opisano od strane Lama i saradnika (Lama et al., 2017). ZX2 modulator povezuje dve kolone: nepolarnu Rtx[®]-1 kolonu (RESTEK, Crossbond[®] izrađenu od 100% dimetil polisiloksana) dimenzija $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ sa srednje polarnom kolonom BPX50 (SGE Analytical Science) dimenzija $1\text{ m} \times 0,1\text{ mm} \times 0,1\text{ }\mu\text{m}$. Temperaturni program je započeo izotermnim korakom na $40\text{ }^\circ\text{C}$ tokom 1 min. Zatim je temperatura povećavana sa 40 na $300\text{ }^\circ\text{C}$ brzinom od $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Program se završio izotermnim korakom na $300\text{ }^\circ\text{C}$ tokom 15 min.

Modulacija primenjena za sveobuhvatnu GCxGC analizu obuhvatala je zamrzavanje petlje polarne kolone na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ uz pulseve vrelog mlaza azota od 300 ms na svakih 6000 ms. Podaci masenih spektara su prikupljeni pomoću Shimadzu GC/MS Real Time Analysis softvera, dok su GCxGC-MS podaci analizirani pomoću GCImage R2.8. (GCImage LLC) softvera, koji je sposoban da direktno čita GCxGC podatke dobijene GC-MS merenjem i prevede ih u dvodimenzionalnu sliku.

Proces degradacije je analiziran pretraživanjem svakog MS spektra u MS bibliotekama NIST 11, NIST 11s i Wiley 8. Detaljne analize ciljnih jedinjenja izvršene su u režimu selektivnog praćenja jona, koji je obuhvatao sledeće jonske hromatograme: $m/z=57, 71, 85$ (*n*-alkani, linearni i razgranati), $m/z=183$ (izoprenoidi), $m/z=191$ (terpani), $m/z=217$ (sterani), $m/z=91, 105, 119$ (alkilbenzeni). Svi rezultati su izraženi na bazi suve mase.

3.1.6. Statistička analiza

Statistička obrada podataka je rađena korišćenjem Statistica v.8 softvera, dok je prostorna analiza zasnovana na Kriging metodi obrađena pomoću Surfer v.12 softvera.

3.2. Sinteza organozeolita

Polazni materijal za sintezu organozeolita je bio prirodni zeolit poreklom iz nalazišta Zlatokop (Vranje, Srbija). Kvalitativna strukturna rendgenska difrakciona analiza (*engl. X-Ray Powder Diffraction analysis*, XRPD) je pokazala da je prirodni zeolit klinoptilolit (minimum 80%) sa malim količinama feldspata, kvarca i pirita (Daković et al., 2007). Ukupni kapacitet za razmenu katjona (*engl. Cation Exchange Capacity*, CEC) polaznog materijala je bio 139 meq/100 g, mereno amonijum hloridnom metodom, dok je spoljašnji kapacitet za razmenu jona (ECEC) bio 10 meq/100 g, određeno metodom Ming-a i Dixon-a (Daković et al., 2007).

Modifikacija površine zeolita jonima surfaktanta je izvedena u destilovanoj vodi koristeći katjonsku amonijumovu so heksadeciltrimetilamonijum bromid (HDTMA-Br). Za sintezu organozeolita je korišćen HDTMA surfaktant (čistoća $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) u količini ekvivalentnoj 100% ECEC vrednosti prirodnog zeolita, tako da je inicijalna koncentracija HDTMA bila 18,2 mmol/L, što je deset puta veća koncentracija od kritične koncentracije potrebne za formiranje micela (*engl. Critical Micelle Concentration; CMC*) za HDTMA (1,8 mmol/L) (Aloulou et al., 2019). Vodena suspenzija zeolita koncentracije 20% (w/v) je mešana sa rastvorom HDTMA (0,73 g/100 mL) na digitalnom homogenizatoru (T-18 Digital Homogenizer Ultra-Turrax, IKA-Werke GmbH) pri 9000 rpm u trajanju od 15 minuta na temperaturi 50 °C. Nakon modifikacije je suspenzija filtrirana i supernatanti su korišćeni za analizu oslobođenih neorganskih katjona i za analizu infracrvenom spektroskopijom sa Furijevom transformacijom (*engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR*). Dobijeni proizvod organozeolita je ispran destilovanom vodom i sušen na 60 °C. Oslobođeni katjoni (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} i Ca^{2+}) iz prirodnog zeolita su određeni atomskom absorpcionom spektrofotometrijom (*engl. Atomic Absorption Spectrophotometry; AAS*) (Analytic Jena Spekol 300).

3.3. Karakterizacija zeolita i organozeolita

3.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrija (TG)

Termalna analiza (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (*engl. Differential Scanning Calorimetry*; DSC) i termogravimetrija (TG)) prirodnog zeolita i organozeolita su sprovedene korišćenjem NETZSCH STA 449 F5 Jupiter instrumenta. Uzorci su zagrevani u atmosferi sintetičkog vazduha od 30 do 1000 °C sa stopom povećanja temperature od 10 °C/min. Pre analize uzorci su sušeni na 60 °C u trajanju od 2 h i nakon toga čuvani 24 h u desikatoru pri relativnoj vlažnosti od 75%.

3.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR analiza sa smanjenom totalnom refleksijom (*engl. Attenuated Total Reflection*; ATR) FTIR-ATR je sprovedena korišćenjem Nicolet iS50 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, SAD). FTIR spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi u spektralnom opsegu od 4000 – 400 cm⁻¹ sa 64 skena po spektru u rezoluciji od 2 cm⁻¹. Ovom metodom su detektovane promene u vibracionim frekvencijama dizela, zeolita, kao i organozeolita pre i nakon adsorpcije WSF dizela.

3.3.3. Zeta potencijal

Zeta potencijal je meren pomoću ZetasizerNano ZS90 (Malvern Instruments). Materijali su dispergovani u destilovanoj vodi (0,1 mg/mL) pomoću ultrazvučnog kupatila. Pre merenja uređaji su kalibrisani korišćenjem disperzije lateksa.

3.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija površine materijala je ispitivana pomoću JEOL JSM-7001F skenirajućeg elektronskog mikroskopa (*engl. Scanning Electron Microscopy*; SEM) (JEOL Ltd, Japan). Pre SEM analize uzorci su prekriveni provodnim slojem zlata formirajući elektroprovodljivi premaz debljine 15 nm. Tokom SEM analize je ubrzavajući napon elektrona iznosio 30 keV, a jačina struje 1 nA, što je obezbedilo da se snop primarnih elektrona nalazi na rastojanju od 6 mm. SEM mikrografije su snimane pri uvećanju od 50 000.

3.4. Ispitivanje adsorpcije rastvorne frakcije dizela na organozeolitu spregnute sa biodegradacijom

3.4.1. Priprema zasićenog rastvora dizela u vodi

Dizel gorivo je obezbeđeno iz lokalne benzinske stanice. Rastvor koji je korišćen u eksperimentima adsorpcije je pripremljen rastvaranjem 8 mL dizela u 1000 mL destilovane vode, nakon čega je suspenzija intenzivno mešana u trajanju od 12 h, a nakon toga ostavljena 12 h u levku za odvajanje kako bi se razdvojile faze. U eksperimentima adsorpcije korišćena je donja faza iz levka za odvajanje, odnosno rastvor zasićen sa WSF dizela.

3.4.2. Adsorpcioni eksperimenti

Za određivanje kinetike adsorpcije, 100 mL zasićenog rastvora dizela inicijalne koncentracije 25 mg/L je mešano u erlenmajeru zapremine 250 mL sa 0,1 g organozeolita u različitom trajanju: 5, 15, 30, 45 minuta, te 1, 2, 4, 6 i 24 h. Uzorci su inkubirani na rotacionoj mućkalici na 150 rpm pri temperaturi od 20 °C i pH vrednosti rastvora 6.

Testovi za određivanje adsorpcionih izoterma su izvođeni variranjem polazne koncentracije dizela od 2,5 do 25 mg/L, pri konstantnoj agitaciji na 150 rpm za ravnotežno vreme od 1 h. Uspešnost procesa adsorpcije je određena analiziranjem koncentracije dizela u erlenmajerima sa organozeolitom pre i nakon adsorpcije. Tečna i čvrsta faza iz svih erlenmajera su odvojene centrifugiranjem na 8000 rpm u određenom trajanju, nakon čega je dizel iz tečne faze ekstrahovan pomoću *n*-heksana ($\geq 99\%$, pogodan za GC/MS analizu, Sigma-Aldrich) kao što je opisano u poglavlju 3.1.3.9. Heksanski sloj je odvojen od vodenog sloja u staklenom levku za odvajanje, te je prečišćen propuštanjem kroz kolonu koja je sadržala anhidrovani Na₂SO₄ i Florisil (Supelclean™ Florisil®/ Na₂SO₄ SPE Tube, 52582-U, Sigma-Aldrich). Prečišćeni ekstrakt je uparavan u struji azota do zapremine od 1 mL, nakon čega je izvršena gasno-hromatografska analiza (Agilent 7890A, Agilent Technologies). Uslovi merenja su detaljnije opisani u poglavlju 3.1.5.1. Prikupljeni podaci su analizirani korišćenjem ChemStation softvera (verzija LTS 01.11, Agilent Technologies). Svi eksperimenti adsorpcije su izvođeni u dva ponavljanja, a efikasnost adsorpcije je data kao srednja vrednost. Maksimalno odstupanje od srednje vrednosti je bilo 4%.

3.4.3. Test ekotoksičnosti

Za procenu akutne toksičnosti vode kontaminirane sa WSF dizela, kako pre, tako i nakon tretmana sa organozeolitom, korišćena je bioluminiscentna bakterija *Aliivibrio fischeri* NRRL B-11177 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Duren). Test ekotoksičnosti je izveden u skladu sa ISO 11348-3 standardom (2007) korišćenjem BioFix® Lumi-10 kit-a (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Duren).

Bakterije su suspendovane u rastvoru za rekonstituciju u skladu sa uputstvom proizvođača, a zatim inkubirane pri temperaturi od 15 °C u različitim razblaženjima inicijalnog rastvora dizela koncentracije 25 mg/L (razblaženja 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125%). Bioluminiscencija je merena nakon 15 i 30 minuta inkubacije. Svi testovi su izvedeni u triplicatu i određene su efektivne koncentracije koje izazivaju 50% (EC₅₀) bioluminiscencije koje su korišćene za izradu grafikona.

3.4.4. Biodegradacioni eksperiment

Konzorcijum mikroorganizama korišćen za proces biodegradacije sastojao se od bakterijskih sojeva degradera naftnih ugljovodonika *Pseudomonas* sp. CHBE-44 (MT117228.1), *Pseudomonas* sp. CHBE-122 (MT081361.1) i *Achromobacter* sp. CHBE-82 (MT256175.1). Nakon inkubacije (poglavlje 3.1.4.12.) sojevi su preneti kao konzorcijum sa čvrste podloge u erlenmajer koji je sadržao 8 g organozeolita i 180 mg adsorbovanog WSF dizela u 50 mL Ray-ovog mineralnog medijuma (poglavlje 3.1.4.6.). Kontrola je sadržala 8 g organozeolita sa 180 mg adsorbovanog WSF dizela u 50 mL Ray-ovog mineralnog medijuma bez konzorcijuma mikroorganizama. Erlenmajeri su inkubirani na rotacionoj mućkalici na 150 rpm pri temperaturi od 28 °C u trajanju od dve sedmice. Uspešnost procesa biodegradacije je procenjena analiziranjem koncentracije dizela kako u erlenmajeru koji je sadržao konzorcijum mikroorganizama, tako i u kontrolnom uzorku. Ekstrakcija dizela sa organozeolita izvršena je u skladu sa ISO 16703 standardom (2004) (opisanom u poglavlju 3.1.3.8.), a koncentracija dizela određena na GC-FID uređaju (opisano u poglavlju 3.1.5.1.). Ekstrakcija dizela iz mineralnog medijuma određena je u skladu sa ISO 9377-2 standardom (2000) (opisano u poglavlju 3.1.3.9.), a koncentracija dizela određena GC-FID metodom (3.1.5.1.). Biodegradacioni eksperiment je izveden u duplikatu, a efikasnost biodegradacije je izražena kao srednja vrednost. Maksimalno odstupanje od srednje vrednosti bilo je manje od 9%.

3.4.5. Praćenje respiracije

Respiracija konzorcijuma mikroorganizama korišćenih u biodegradacionom eksperimentu praćena je pomoću zatvorenog sistema sa 12-kanalnim Micro-Oxymax respirometrom (Columbus Instruments) opremljenim paramagnetnim senzorom za kiseonik, infracrvenim senzorom za ugljen dioksid i računarom. Eksperimenti su izvedeni u svetlosno neprobojnim bocama zapremine 1000 mL (Duran). Eksperiment je bio dizajniran na sledeći način: prva boca je sadržala 100 mL Ray mineralnog medijuma, 8 g organozeolita, 180 mg adsorbovanog WSF dizela i konzorcijum mikroorganizama u koncentraciji od 10^6 CFU/mL. Druga boca je sadržala Ray mineralni medijum sa istim količinama organozeolita i mikroorganizama, u trećoj boci su se nalazili Ray mineralni medijum, organozeolit i adsorbovani WSF dizela, ali bez mikroorganizama, dok je u četvrtoj boci bio Ray mineralni medijum sa 8 g zeolita i konzorcijumom. Treća i četvrta boca su korišćene kao kontrole. Koncentracije O₂ i CO₂ u prostoru iznad tečnosti u bocama merene su u intervalima od 12 sati pumpanjem vazduha iz tog prostora kroz senzor. Eksperiment je trajao 28 dana i sproveden je na sobnoj temperaturi. Dobijeni rezultati obrađeni su pomoću Micro-Oxymax softvera (verzija 2.4.9), a potrošnja i proizvodnja gasova su izraženi u mL i opisani kao kumulativna potrošnja/proizvodnja.

4. Rezultati i diskusija

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje potencijala integralnog postupka adsorpcije i mikrobnog degradacije za uklanjanje naftnih ugljovodonika iz vode i sedimenta. U prvom delu doktorata opisan je *in situ* bioremedijacioni tretman akvifera zagađenog ugljovodonicima naftnog porekla. Tretman je zasnovan na biostimulaciji, bioaugmentaciji i recirkulaciji podzemne vode. Za potrebe bioaugmentacije, sa kontaminirane lokacije su izolovani i okarakterisani mikroorganizmi sposobni za degradaciju naftnih ugljovodonika, a nakon toga su umnoženi u bioreaktoru i, kao autohtoni konzorcijum, korišćeni za inokulaciju podzemnih voda. Inokulum sastavljen od autohtonih mikroorganizama skraćuje vreme potrebno za degradaciju polutanta, jer izostaje period aklimatizacije mikroorganizama na novu ekološku nišu (Łebkowska et al., 2011). Kako bi se pospešila cirkulacija i delimična aeracija podzemnih voda, kao i da bi se povećala verovatnoća kontakta mikroorganizama sa zagađujućim supstancama, obezbeđena je recirkulacija podzemnih voda u zatvorenom sistemu. Sezonsko variranje nivoa podzemnih voda omogućava dopremanje mikroorganizama i nutrijenata do kontaminiranog sedimenta. Ovo je veoma važno, jer u slučaju izostanka bioremedijacije sedimenta, nakon nekog vremena bi ponovo došlo do kontaminacije podzemnih voda, jer kontaminirani sediment predstavlja rezidualnu fazu koja se ponaša kao kontinuirani izvor zagađenja podzemnih voda (Kehew i Lynch, 2011; Logeshwaran et al., 2018).

Drugi deo doktorata je obuhvatio ispitivanja adsorpcionog kapaciteta organozeolita (zeolita modifikovanog dugolančanim kvaternarnim amonijumovim solima) za frakciju dizela rastvornu u vodi, kao i procenu biodegradacionog potencijala konzorcijuma mikroorganizama (izolovanih u prvoj fazi istraživanja) za degradaciju adsorbovane zagađujuće supstance.

4.1. *In situ* bioremedijacioni tretman akvifera zagađenog ugljovodonicima naftnog tipa

Podzemna voda predstavlja značajan izvor pijaće vode za veliki procenat ljudske populacije, pre svega u aridnim i poluaridnim oblastima. Čak i u Evropi, kao posledica klimatskih promena, zalihe površinskih voda se smanjuju, posebno u periodima godine kada je potreba za vodom povećana, te je značaj podzemnih voda postao znatno veći (Sufyan et al., 2024). Sa druge strane, i potreba za energijom se kontinuirano povećava. Iako se teži smanjenju oslanjanja na naftu i naftne derivate kao izvore energije (Asante-Sackey et al., 2022), višedecenijska eksploatacija, prerada i transport naftnih proizvoda je ostavila posledice na zemljište, sediment i vodu. Nakon ispuštanja u životnu sredinu, naftni ugljovodonici se kreću kroz zemljište adsorbujući se na zemljišne čestice, dok deo prolazi do podzemnih voda (Logeshwaran et al., 2018). Frakcija naftnih ugljovodonika koja ostaje u sedimentu predstavlja rezidualnu fazu koja se ponaša kao kontinuirani izvor zagađenja podzemnih voda (Kehew i Lynch, 2011; Logeshwaran et al., 2018). Razvijene su različite metode za prečišćavanje kontaminiranih voda i zemljišta, od kojih je bioremedijacija u prednosti zbog svoje efikasnosti, isplativosti i odsustva štetnih nusproizvoda. Takođe, projektovana bioremedijacija je brži proces od prirodne, jer se oslanja na biostimulaciju i bioaugmentaciju, i to najčešće upotrebom konzorcijuma mikroorganizama izolovanih sa kontaminiranog lokaliteta (Łebkowska et al., 2011). Ova zelena tehnologija ima značajne prednosti u odnosu na druge tehnologije kako u pogledu cene, tako i u pogledu efikasnosti u uklanjanju polutanata. Bioremedijacija najmanje narušava životnu sredinu i u potpunosti je u skladu sa principima održivog razvoja.

Tokom redovnog monitoringa kvaliteta podzemnih voda na lokaciji Toplane Novi Beograd utvrđeno je da je sadržaj naftnih ugljovodonika iznad bioremedijacionih vrednosti određenih Pravilnikom (Sl. glasnik, 2010). Kako se na ovoj lokaciji nalaze i radijalni kolektorski bunari (Renney bunari, RB) putem kojih se vrši vodosnabdevanje Beograda, bilo je neophodno primeniti adekvatnu i efikasnu tehnologiju kojom bi se uklonio polutant. Uzimajući u obzir procenjenu zapreminu kontaminirane vode (105.000 m³) i sedimenta (25.000 – 30.000 m³), kao i tehničko-tehnološke specifičnosti lokacije (veliki broj objekata, podzemne i nadzemne instalacije), tehnologije kao što su „pump-and-treat“, termalna desorpcija, kao i druge *ex situ* metodologije su finansijski i tehnički bile neprihvatljive.

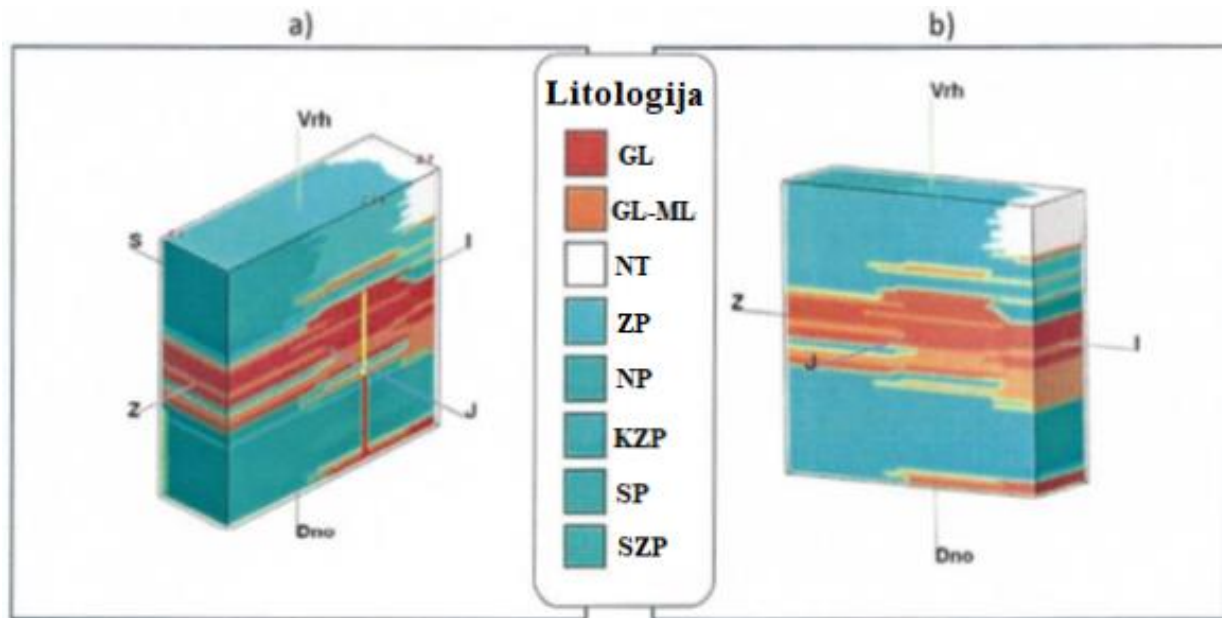
Odabrana *in situ* bioremedijaciona tehnologija na lokaciji Toplane Novi Beograd podrazumevala je instaliranje opreme koja nije zauzimala veliku površinu, jer je bilo neophodno omogućiti neometano funkcionisanje Toplane tokom višemesečnog trajanja tretmana. Takođe, nije bilo neophodno iskopavati kontaminirani sediment što je, osim finansijskih prednosti, veoma povoljno za zemljišnu floru i faunu.

4.1.1. Opis lokacije *in situ* bioremedijacionog procesa

Toplana Novi Beograd se nalazi na levoj obali reke Save na oko 1 km uzvodno od ušća Save u Dunav i pripada Opštini Novi Beograd. Reka Sava je preko svog korita, izgrađenog od šljunkovito-peskovitog sedimenta, u direktnoj hidrauličnoj vezi sa podzemnom vodom.

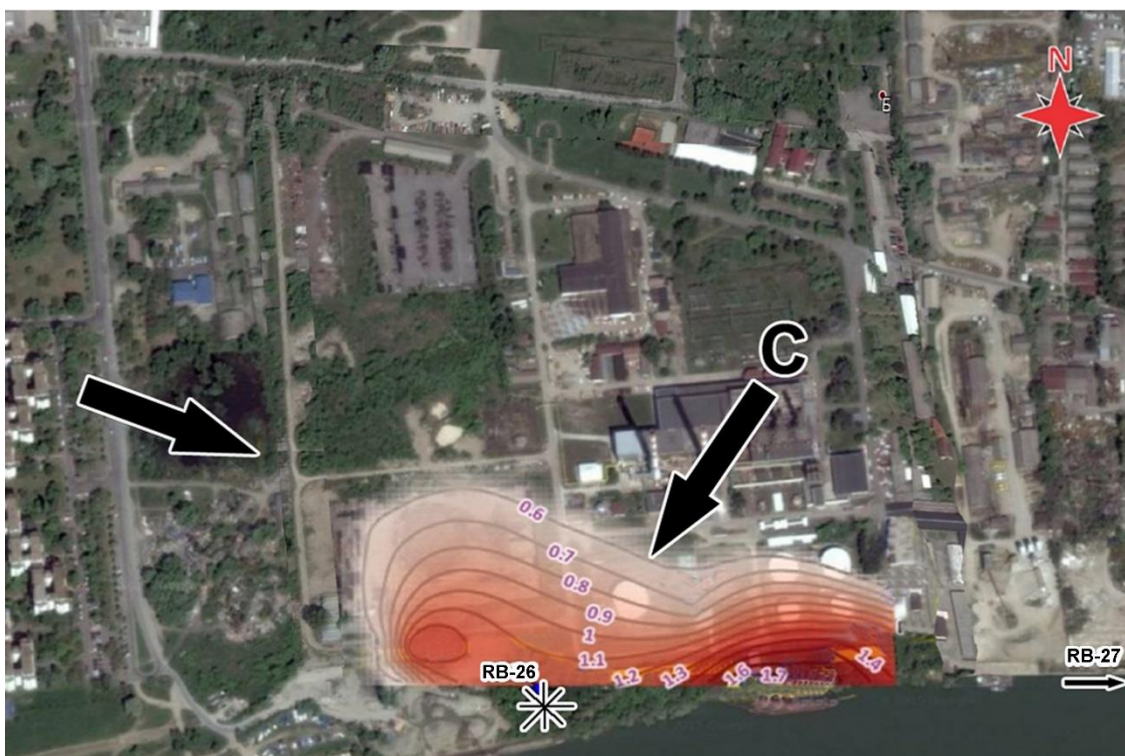
U zoni tretirane lokacije se kvartarne tvorevine nalaze na dubini do 27 m i čine ih tehnosol (odnosno tehnogeno zemljište nastalo nasipanjem terena) na površini, te slojevi šljunka, šljunkovito-peskoviti slojevi, zaglinjeni pesak i gline različitog stepena plastičnosti koji se međusobno smenjuju u litološkom profilu (slika 4.1.). Podinu kvartaru čine masne sivo-zelene tercijarne gline koje imaju debljinu od 74 m. U ovakvim sedimentnim strukturama je formiran akvifer sa slobodnim nivoom, odnosno akvifer pod pritiskom u zonama koje se nalaze ispod vodonepropusnih povlata.

Zahvaljujući sastavu kvartarnih tvorevina, odnosno velikom udelu peskovitih i peskovito-šljunkovitih elemenata, hidraulična provodljivost sedimenata na tretiranoj lokaciji je bila u intervalu od $5,4 \times 10^{-2}$ do $1,0 \times 10^{-1}$ cm/s, što je više od minimalne vrednosti neophodne za uspešan bioremedijacioni tretman (10^{-6} - 10^{-4} cm/s) (Shieh i Peralta, 2005).



Slika 4.1. Litološki model kvartara do dubine od 15 m; **GL**-glina male do srednje plastičnosti; **GL-ML** – uglavnom prašinasta glina; **NT** – nasut teren, heterogen; **ZP** – zaglinjeni pesak; **NP** – neraščlanjeni pesak; **KZP** – uglavnom krupnozrni pesak; **SP** – uglavnom sitnozrni pesak; **SZP** – uglavnom srednjezrni pesak; (prema Krmpotić et al., 2015)

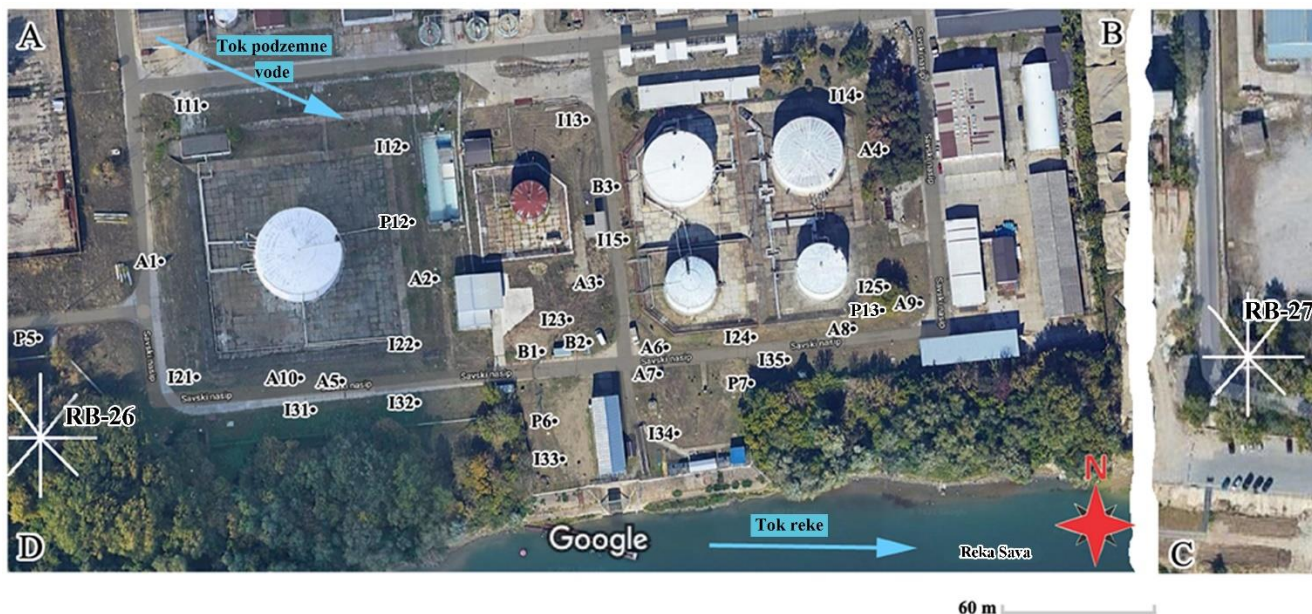
U skladu sa preliminarnim istraživanjima zagađenja naftnim ugljovodonicima konstruisan je model distribucije kontaminanta u podzemnoj vodi (slika 4.2.). Preliminarna studija je pokazala da je oblast C jako kontaminirana ugljovodonicima naftnog porekla. Kao što je već pomenuto, voda je „otisak prsta“ zagađene čvrste faze, jer se zagađenje prenosi u vodu kao rastvarač, i iz tog razloga su analize zemljišta u ovoj oblasti izvođene do dubine od 15 m. Ove dodatne analize su pokazale visoke nivoe zagađenja u sedimentu.



Slika 4.2. Model distribucije kontaminanta u podzemnoj vodi na području Toplane Novi Beograd. Izolinije označavaju koncentraciju kontaminanta; leva strelica pokazuje pravac kretanja podzemnih voda; desna strelica označava zonu kontaminacije (oblast C); RB predstavlja radijalne kolektorske bunare (Renney bunare) putem kojih se vrši vodosnabdevanje (prema Vrvić, 2015)

4.1.2. *In Situ* bioremedijaciona tehnologija

Podzemna voda i pripadajući sediment su podvrgnuti *in situ* bioremedijaciji korišćenjem biostimulacije i bioremedijacije. Tehnika se oslanjala na zatvoreni sistem injekciono-ekstrakcionih bunara (IEB) i deset filtraciono/adsorpcionih bioreaktorskih kolona (FABK) u eksternoj jedinici. Bunari su locirani u okviru zone C u regionu sa najvećom kontaminacijom. *In situ* bioremedijacija je primenjena u oblasti C opisanom sledećim koordinatama: A: N 44° 47' 58.30" E 20° 24' 31.68"; B: N 44° 47' 58.13" E 20° 24' 50.03"; C: N 44° 47' 51.81" E 20° 24' 32.13" i D: N 44° 47' 52.01" E 20° 24' 50.04" (slika 4.3.).



Slika 4.3. Prostorni raspored injekciono-ekstrakcionih bunara (I), filtraciono/adsorpcionih bioreaktorskih kolona (A), piježometara (P), lokacija uzorkovanja sedimenta (B) i radijalnih kolektorskih bunara (Renny bunara, RB) putem kojih se vrši vodosnabdevanje u okviru oblasti C

Slika 4.3. prikazuje injekciono-ekstrakcione bunare (I11, I12, I13, I14, I15, I21, I22, I23, I24, I25, I31, I32, I33, I34, I35) i FABK (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10) korišćene u procesu bioremedijacije, kao i tačke sa najvišom kontaminacijom (P5, P6, P7, P12, P13 su piježometri sa najvišom koncentracijom zagađujućih supstanci u podzemnoj vodi, dok su B1, B2 i B3 bušotine sa najvišom koncentracijom polutanta u sedimentu) u okviru oblasti C.

Bioremedijacioni sistem se sastojao od 15 bioremedijacionih bunara, koji su mogli da funkcionišu i kao injekcioni i kao ekstrakcioni bunari, i 10 FABK. Bunari su bili izgrađeni od PVC cevi prečnika 280 mm koje su postavljene do dubine podzemne vode i prilagođene tako da se spreči formiranje biofilma (slika 4.4.). FABK su bile ispunjene peskom i prirodnim, hidrofobnim, biodegradabilnim adsorpcionim materijalom. Slika 4.5. prikazuje detaljan šematski opis FABK, kao i operativnu FABK.

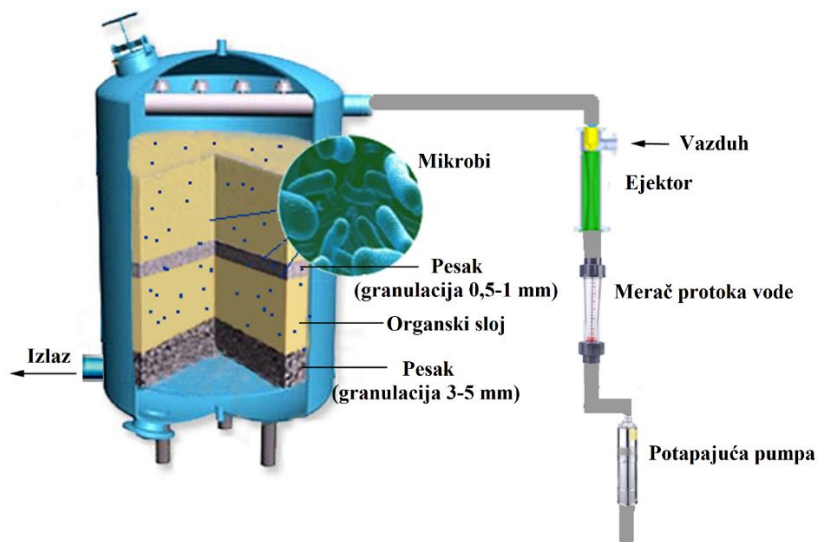


Slika 4.4. Izgled bunarske konstrukcije sa zaštitom od formiranja biofilma pre njene ugradnje u IEB (levo) i nakon ugradnje (desno)

Proces bioremedijacije se sastojao od tri faze:

1. biostimulacije
2. bioaugmentacije
3. recirkulacije podzemne vode u zatvorenom sistemu (Marić et al., 2015).

Bioremedijacioni sistem je bio organizovan u nekoliko bioremedijacionih jedinica. Svaka jedinica se sastojala od jednog ekstrakcionog i jednog injekcionog bunara sa jednom FABK između njih. Bioremedijaciona procedura je opisana dalje na primeru jedne bioremedijacione jedinice.



Slika 4.5. Šematski prikaz FABK sa detaljnim opisom strukture (levo) i realan prikaz operativne kolone (desno)

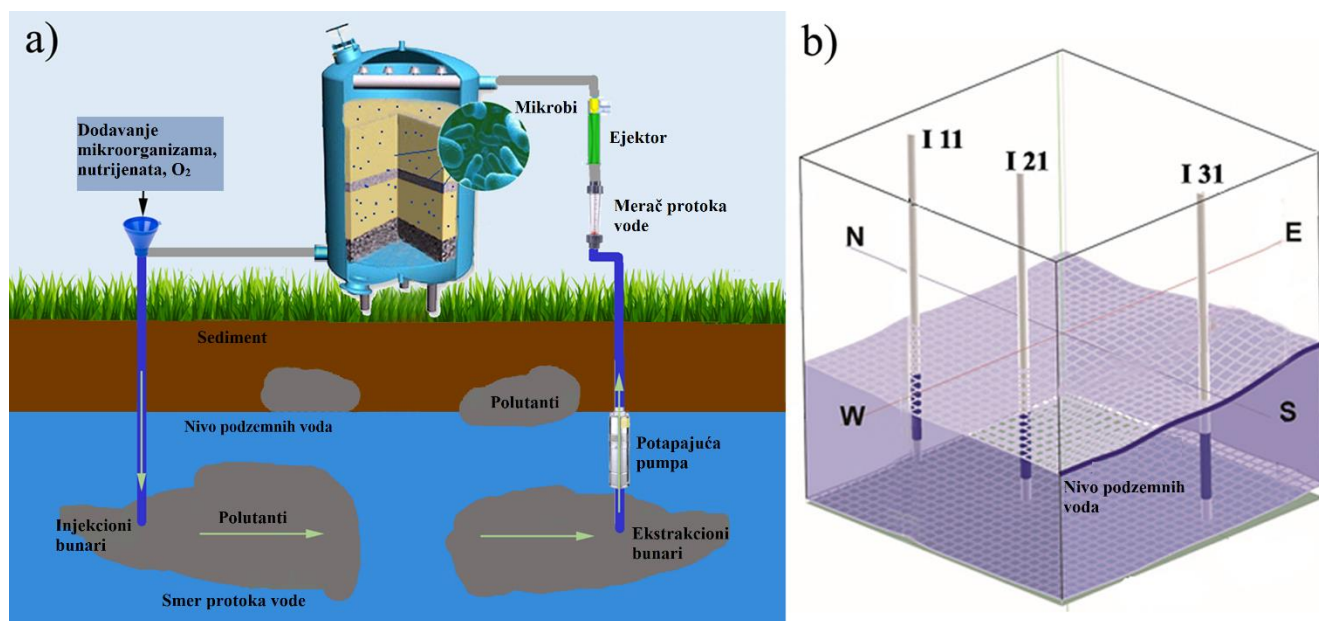
Prvi korak je podrazumevao aktivaciju akvifera pomoću oksidacionog agensa, što je, u našem pristupu, bio 30% w/v H_2O_2 (slika 4.6.). Nakon toga je kroz injekcioni bunar dodata biomasa konzorcijuma zimogenih mikroorganizama (izolovanih iz kontaminiranog sedimenta u okviru oblasti C i kultivisanih u bioreктору kao što je opisano u poglavlju 3.1.4.11.) (Bulatović et al., 2020; Marić et al., 2015). Kada bi koncentracija rastvorenog kiseonika pala ispod 3 mg/L, oksigenacija bi bila ponovljena. Kako je bilo neophodno da se populacija mikroorganizama u podzemnoj vodi održava između 10^5 i 10^8 CFU/mL, reinokulacija biomase je ponavljana kada kod bi brojnost populacije pala na oko 10^5 CFU/mL.



Slika 4.6. Prikaz operativnog IEB-a i aktivacije akvifera pomoću 30% w/v H_2O_2

Dalje, recirkulacija podzemne vode u ovom zatvorenom sistemu je postignuta na sledeći način: pomoću ekstrakcionih bunara je voda ispumpavana i pumpana dalje u FABK, gde je voda bila filtrirana i vraćana dalje u zemlju pomoću injekcionog bunara postavljenog uzvodno od FABK. Kao što je navedeno, FABK su bile ispunjene peskom i prirodnim, hidrofobnim, biodegradabilnim adsorpcionim materijalom. Uloga ovog materijala je bila dvostruka – da filtrira podzemnu vodu i da adsorbuje ugljovodonične polutante iz ispumpane podzemne vode, omogućavajući na taj način veliku specifičnu površinu na kojoj bi mogao da se formira film zimogenih mikroorganizama, čime se intenzivira biodegradacija polutanta. FABK je bila opremljena odgovarajućim ejektorskim sistemom za aeraciju (Bulatović et al., 2020; Marić et al., 2015). Slika 4.7. prikazuje zatvoreni sistem recirkulacije podzemnih voda i 3D profil injekciono-ekstrakcionih bunara.

Prosečan kapacitet ekstrakcije i injekcije po bunaru je bio 0,6 L/s i 0,3 L/s, redom.



Slika 4.7. Šematski prikaz zatvorenog sistema za recirkulaciju podzemnih voda (a) i 3D profil injekciono-ekstrakcionih bunara (b)

4.1.3. Ukupni ugljovodonici nafte (TPH) u sedimentu i podzemnoj vodi

4.1.3.1. Sediment

U tabeli 4.1. su prikazane koncentracije TPH u uzorcima sedimenta tokom procesa bioremedijacije za dubine 7-15 m za B1, 8-11 m za B2 i 6-10 m za B3, odnosno za dubine u kojima je koncentracija TPH bila viša od remedijacione vrednosti definisane Pravilnikom (Sl. glasnik, 2010).

Tabela 4.1. Koncentracije ugljovodonika u uzorcima sedimenta uzorkovanih sa lokacija B1, B2 i B3 na početku (a), nakon 6 meseci (b) i nakon 12 meseci (c) *in situ* bioremedijacionog procesa

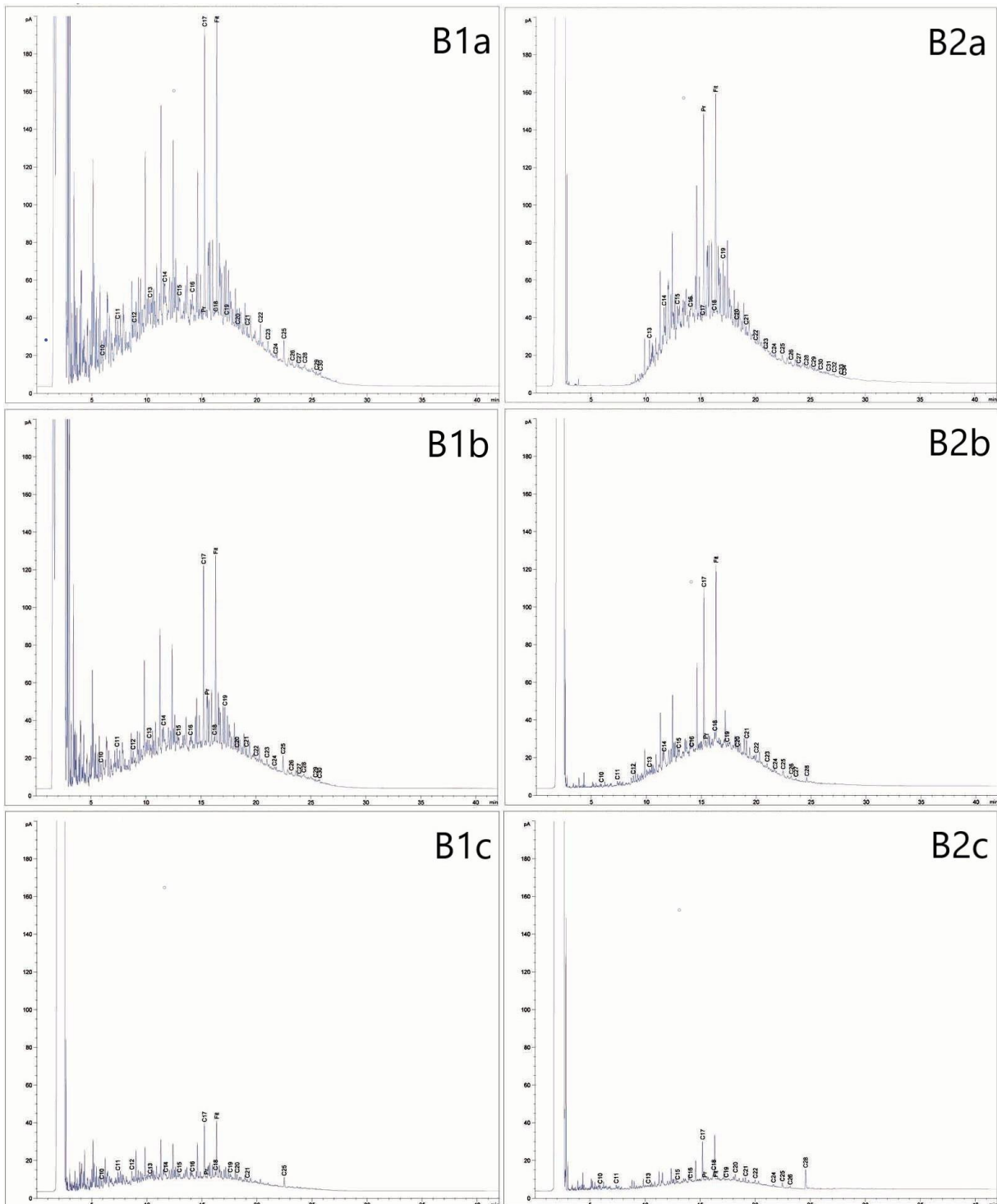
Bunar	Sadržaj ugljovodonika dužine lanca C10–C40 (mg/kg)		
	(a) na početku procesa	(b) nakon 6 meseci	(c) nakon 12 meseci
B1-8	5108*	145	158
B1-9	4969*	3084*	168
B1-10	4442*	686	67
B1-11	4183*	3640*	462
B1-12	4716*	2473*	758
B1-13	5079*	801	335
B1-14	5005*	611	600
B1-15	3342*	1756*	105
B2-9	2730*	1247*	52
B2-10	4085*	2361*	525
B2-11	3660*	2458*	243
B3-7	3380*	1412*	595
B3-8	2532*	562	359
B3-9	1838*	224	154
B3-10	452	1077*	523

* koncentracije ugljovodonika više od remedijacionih vrednosti definisanih nacionalnom legislativom (remedijaciona vrednost od 1000 mg/kg je granična vrednost za uzorke koji sadrže manje od 2% organske materije)

Tokom bioremedijacije je sadržaj TPH u uzorcima sa lokacije B1, B2 i B3 smanjen za 91,4% ($\pm 0,6\%$), 86,3% ($\pm 2,3\%$) i 68,4% ($\pm 1,8\%$) u odnosu na početnu koncentraciju, redom.

Na slici 4.8. su prikazani gasni hromatogrami ugljovodonika ekstrahovanih iz sedimenata (lokacija B1 i B2) na početku, nakon 6 meseci i nakon 12 meseci *in situ* bioremedijacionog procesa. Brojevi koji se nalaze pored oznake „C“, kojom se obeležava signal, označavaju broj C-atoma *n*-parafina. Signali označeni sa *Pr* i *Fit* potiču od izoprenoidnih ugljovodonika pristana (C19) i fitana (C20), redom,

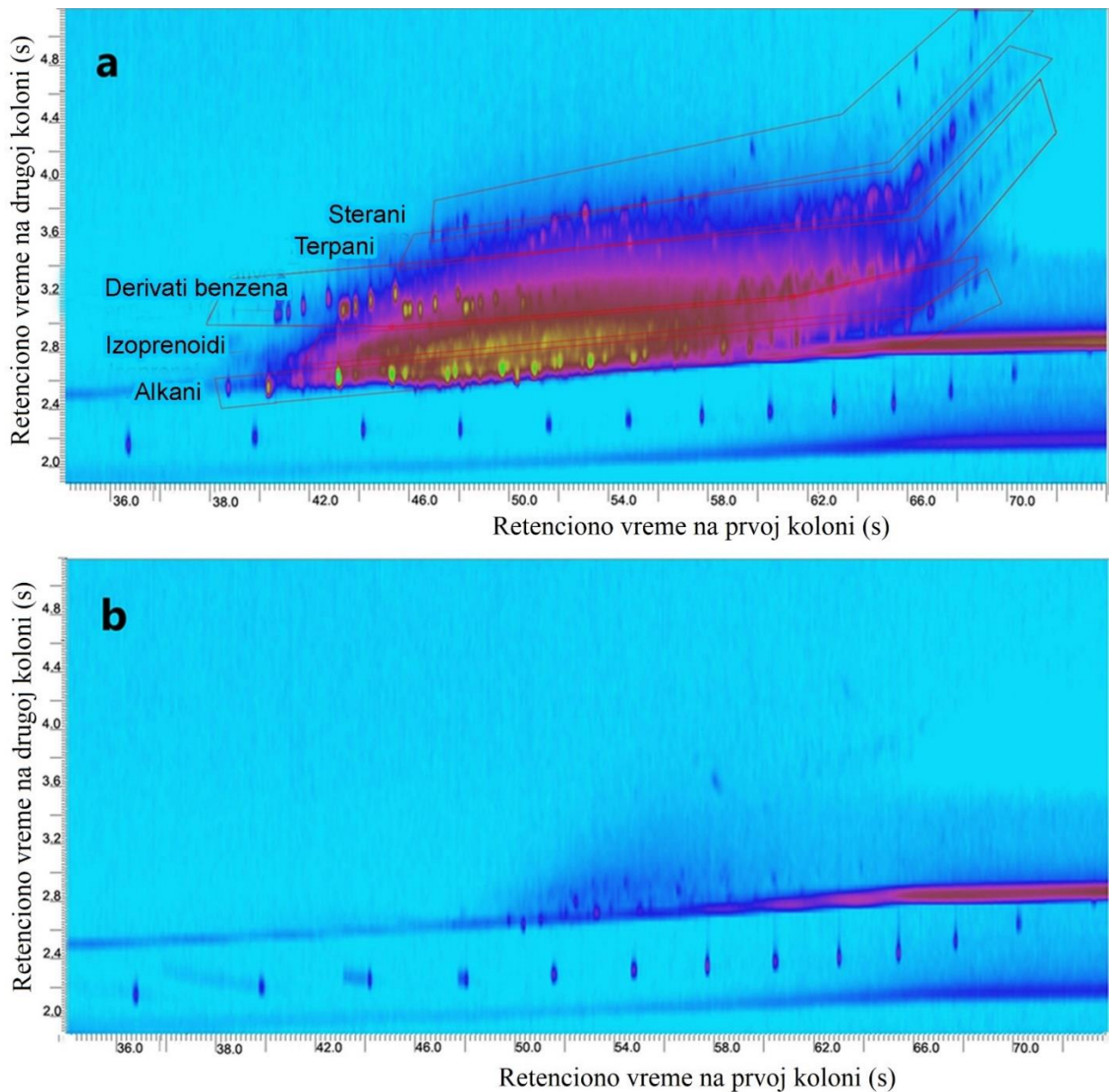
koji su, svi osim benzena, biomarkeri nafte i njenih derivata. U forenzičkoj hemiji i hemiji životne sredine oni predstavljaju dokaz o kontaminantima koji potiču od naftnih izvora.



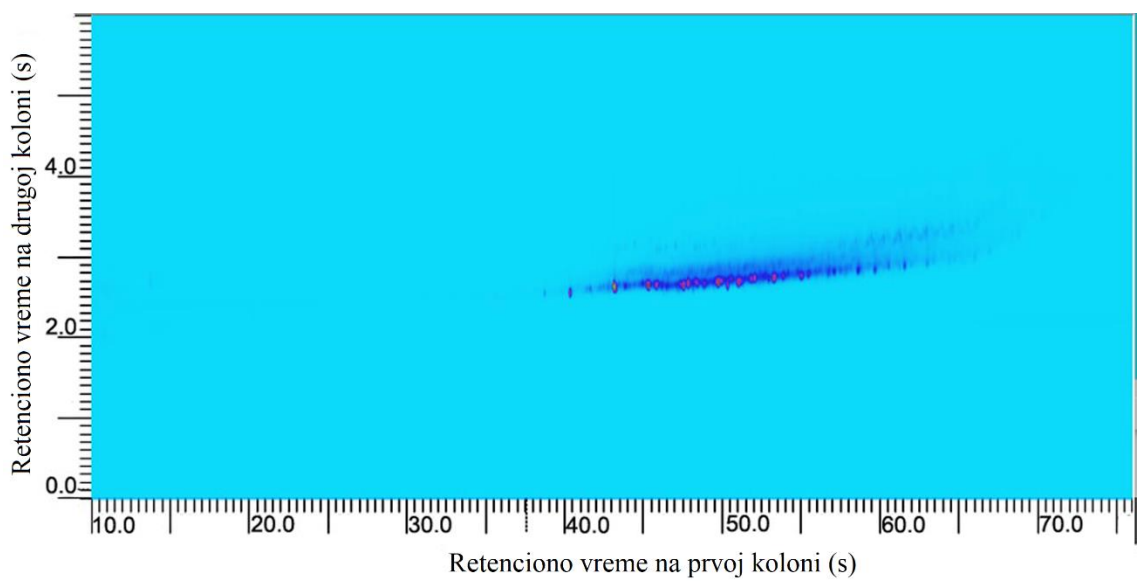
Slika 4.8. Gasni hromatogrami ekstrakata sedimenta (B1-kompozitni uzorak i B2-kompozitni uzorak) na početku (B1a i B2a), nakon 6 meseci (B1b i B2b), i nakon 12 meseci (B1c i B2c) *in situ* bioremedijacionog procesa

Kao što se može videti, tokom procesa *in situ* bioremedijacije uočene su značajne promene u koncentraciji TPH u sedimentu. Na kraju procesa bioremedijacije (slika 4.8. B1c i B2c) pikovi imaju zanemarljiv intenzitet u poređenju sa pikovima sa početka procesa.

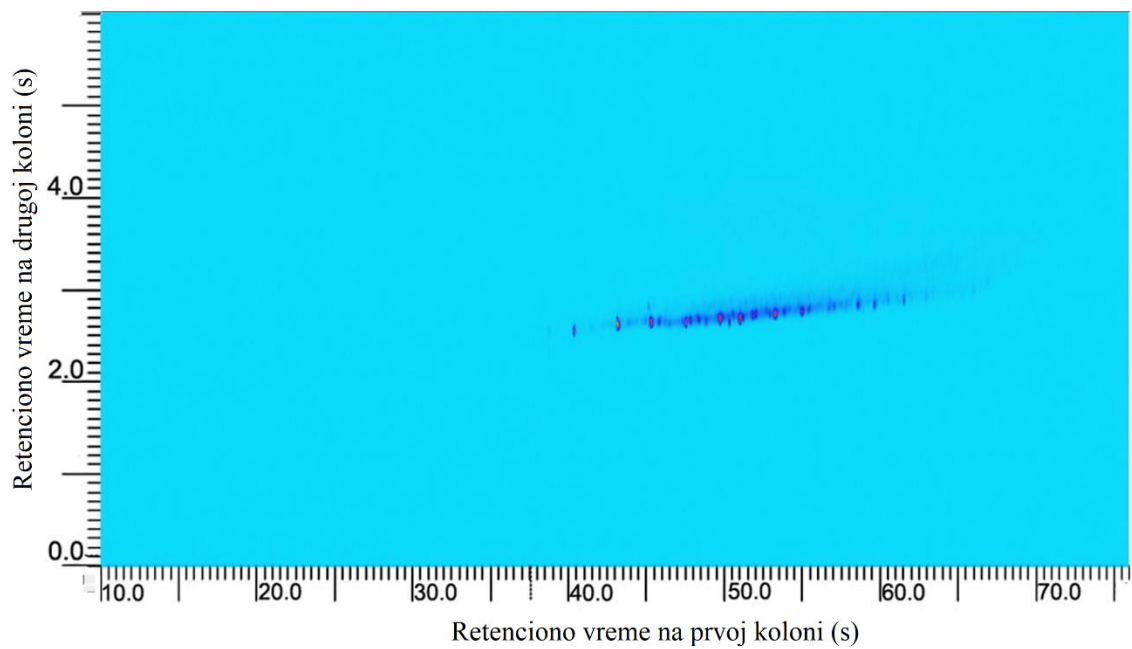
Dodatna GCxGC-MS analiza naftnih ugljovodonika ekstrahovanih iz sedimenta pre i posle *in situ* bioremedijacije pokazuje prisustvo sledećih komponenti: alkana, derivata benzena, izoprenoida, sterana i terpana. Različite zastupljenosti ovih ugljovodoničnih komponenti i njihova distribucija pre i posle *in situ* bioremedijacionog procesa su prikazane na slici 4.9. Redosled degradacije ovih komponenti tokom bioremedijacije je bio sledeći: sterani ($99,6 \pm 0,2\%$), izoprenoidi ($98,4 \pm 1,2\%$), derivati benzena ($98,4 \pm 1,2\%$), alkani ($97,2 \pm 2,3\%$) i terpani ($49,3 \pm 2,8\%$). Hromatogrami koji prikazuju ugljovodonične komponente naftnog zagađenja ekstrahovanog iz sedimenta na početku procesa bioremedijacije su prikazani na slikama 4.10-4.14.



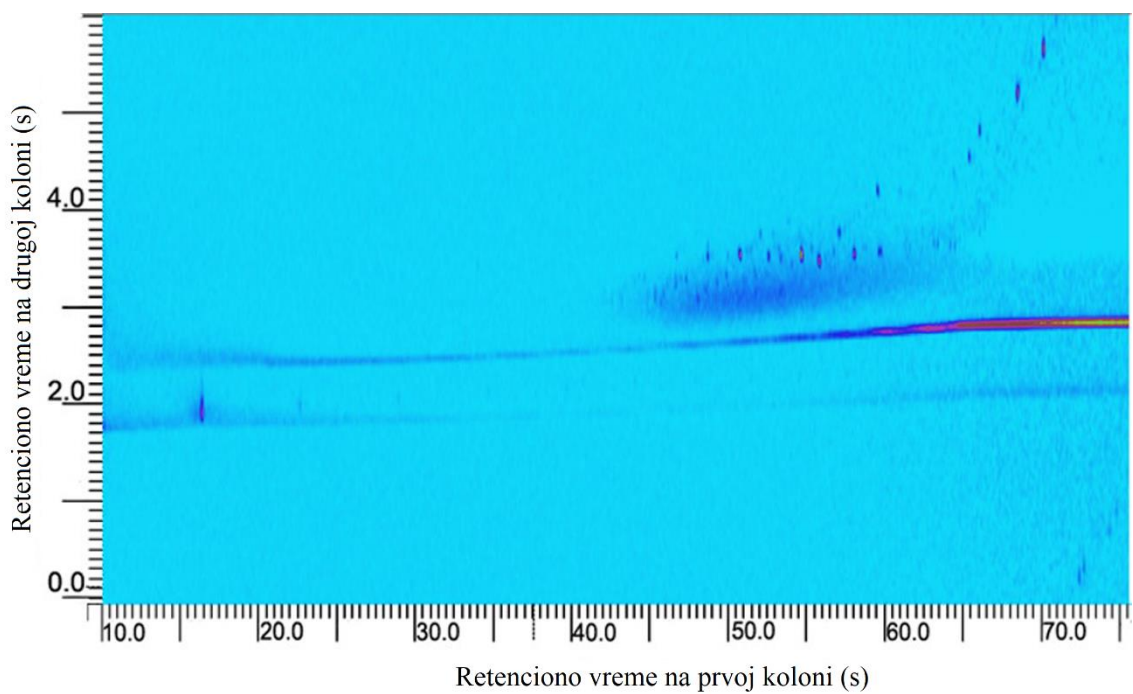
Slika 4.9. GCxGC-MS hromatogrami ekstrakata sedimenta pre (a) i nakon (b) *in situ* bioremedijacionog procesa



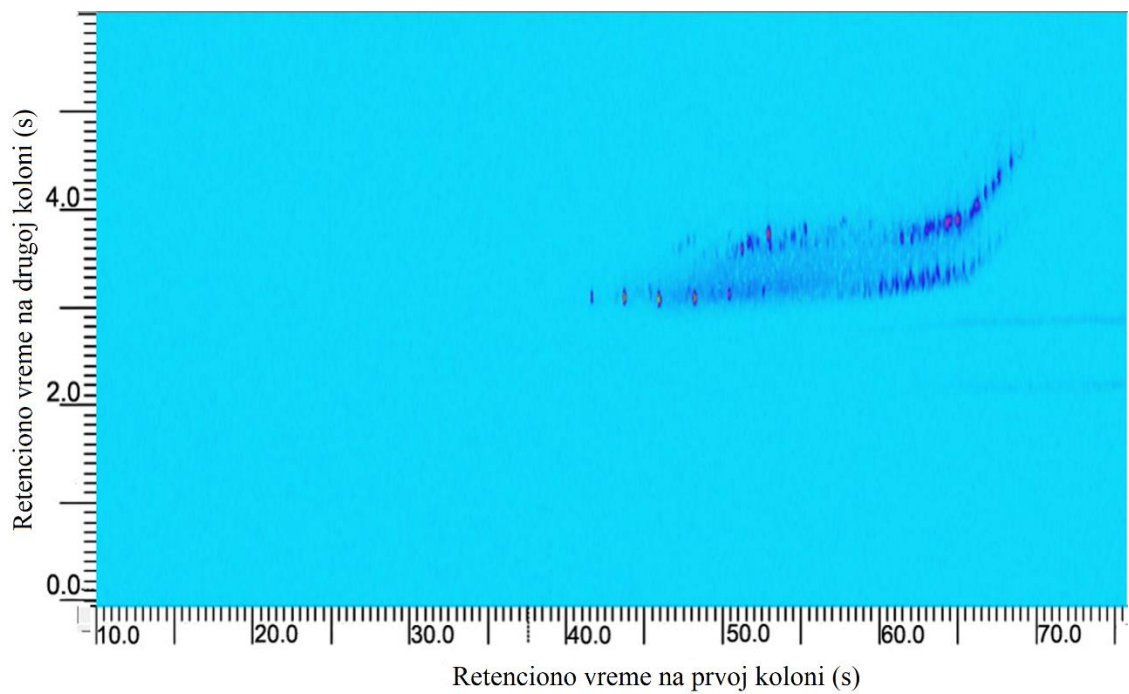
Slika 4.10. Distribucija i količina alkana na početku procesa *in situ* bioremedijacije



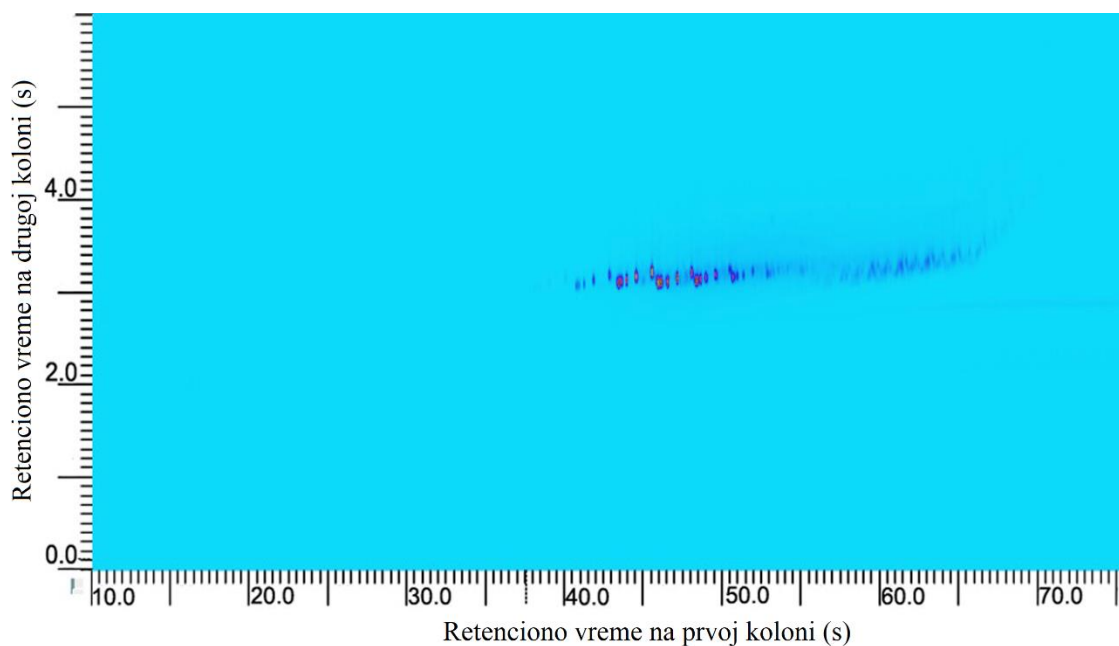
Slika 4.11. Distribucija i količina izoprenoida na početku procesa *in situ* bioremedijacije



Slika 4.12. Distribucija i količina terpena na početku procesa *in situ* bioremedijacije



Slika 4.13. Distribucija i količina sterana na početku procesa *in situ* bioremedijacije



Slika 4.14. Distribucija i količina derivata benzena na početku procesa *in situ* bioremedijacije

Pre početka bioremedijacionog tretmana visok stepen zagađenja sedimenta naftnim ugljovodonicima je izmeren na dubinama 7-15 m na lokaciji B1, 8-11 m na lokaciji B2 i 6-9 m na lokaciji B3. Koncentracija TPH u navedenim uzorcima je bila znatno iznad maksimalno dozvoljenih vrednosti propisanih Pravilnikom (Sl. glasnik, 2010). Visoki nivoi kontaminacije na datim dubinama su najverovatnije posledica curenja nafte iz transportnih cevi namenjenih distribuciji nafte, kao i uništavanja rezervoara za skladištenje mazuta tokom bombardovanja 1999. godine i dugogodišnjeg kretanja polutanta ka dubljim slojevima sedimenta. Tokom procesa bioremedijacije nivoi podzemnih voda su varirali između 6 i 9 metara, što znači da je kontaminirani sediment tokom celokupnog perioda bio u kontaktu sa podzemnom vodom. To je imalo pozitivne efekte na sam proces, jer je omogućilo dopremanje kiseonika, nutrijenata i mikroorganizama u kontaminirani sediment. Prisustvo mikroorganizama degradera naftnih ugljovodonika u sedimentu je najverovatnije doprinelo degradaciji polutanta, tj. obnavljanju sedimenta.

Prikupljeni rezultati na kraju bioremedijacije su pokazali da je koncentracija TPH na svim dubinama na sve tri ispitivane lokacije bila znatno ispod dozvoljenih vrednosti (Sl. glasnik, 2010). Najniži stepen degradacije postignut je na lokaciji B3, što je moguća posledica nižeg broja mikroorganizama u odnosu na B1 i B2.

4.1.3.2. Podzemna voda

U tabeli 4.2. su prikazane koncentracije TPH u uzorcima podzemne vode tokom procesa bioremedijacije za piježometre P5, P6, P7, P12 i P13, odnosno za piježometre u kojima je koncentracija TPH bila viša od remedijacione vrednosti od 0,6 mg/L (Sl. glasnik, 2010). Ovi piježometri se nalaze u zoni kontaminacije C i povećane koncentracije TPH su posledica migracije polutanta iz sedimenta u podzemnu vodu.

Tabela 4.2. Koncentracije TPH u uzorcima podzemnih voda uzorkovanih iz piježometara P5, P6, P7, P12 i P13 na početku (a) i nakon 12 meseci (b) *in situ* bioremedijacionog procesa

Piježometar	TPH (mg/L)	
	(a) na početku procesa	(b) nakon 12 meseci
P5*	1,39	<0,05
P6*	1,76	<0,05
P7*	1,57	<0,05
P12	0,70	<0,05
P13	1,22	<0,05

*Bulatovic et al., 2020

Tehnološko rešenje *in situ* bioremedijacije, koje se sastojalo od zatvorenog sistema za recirkulaciju vode, biostimulacije i bioaugmentacije, bilo je gotovo 100% uspešno u uklanjanju naftnog zagađenja iz podzemne vode (uklonjeno 98% zagađenja). Kao što je navedeno, da bi mikroorganizmi mogli da degraduju polutante, neophodno je da dođu u direktan kontakt sa njima. Recirkulacija podzemne vode uz filtriranje prolaskom kroz FABK je povećala verovatnoću ostvarivanja tog kontakta. Biostimulacija i bioaugmentacija konzorcijumom mikroorganizama izolovanih sa kontaminirane lokacije je obezbedila dodatne povoljne uslove za efikasnu mikrobiološku razgradnju naftnih zagađujućih supstanci.

4.1.4. Zimogeni konzorcijum mikroorganizama u sedimentu i podzemnoj vodi

4.1.4.1. Sediment

Mikrobiološka analiza je pokazala da je kontaminirani uzorak sedimenta iz zone C ispitivane lokacije sadržao značajan broj bakterija degradera ugljovodonika (10^3 - 10^4 CFU/g). Takođe, bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Nocardia-Rhodococcus*, koji su dobro poznati degraderi naftnih jedinjenja, su bili prisutni u značajnom broju (tabela 4.3.). Bakterije su izolovane u formi čiste kulture i određena je njihova taksonomska afilijacija. Slika 4.15. prikazuje reprezentativne članove degradera ugljovodonika izolovanih iz kontaminiranog sedimenta u okviru lokacije C i njihov filogenetski odnos.

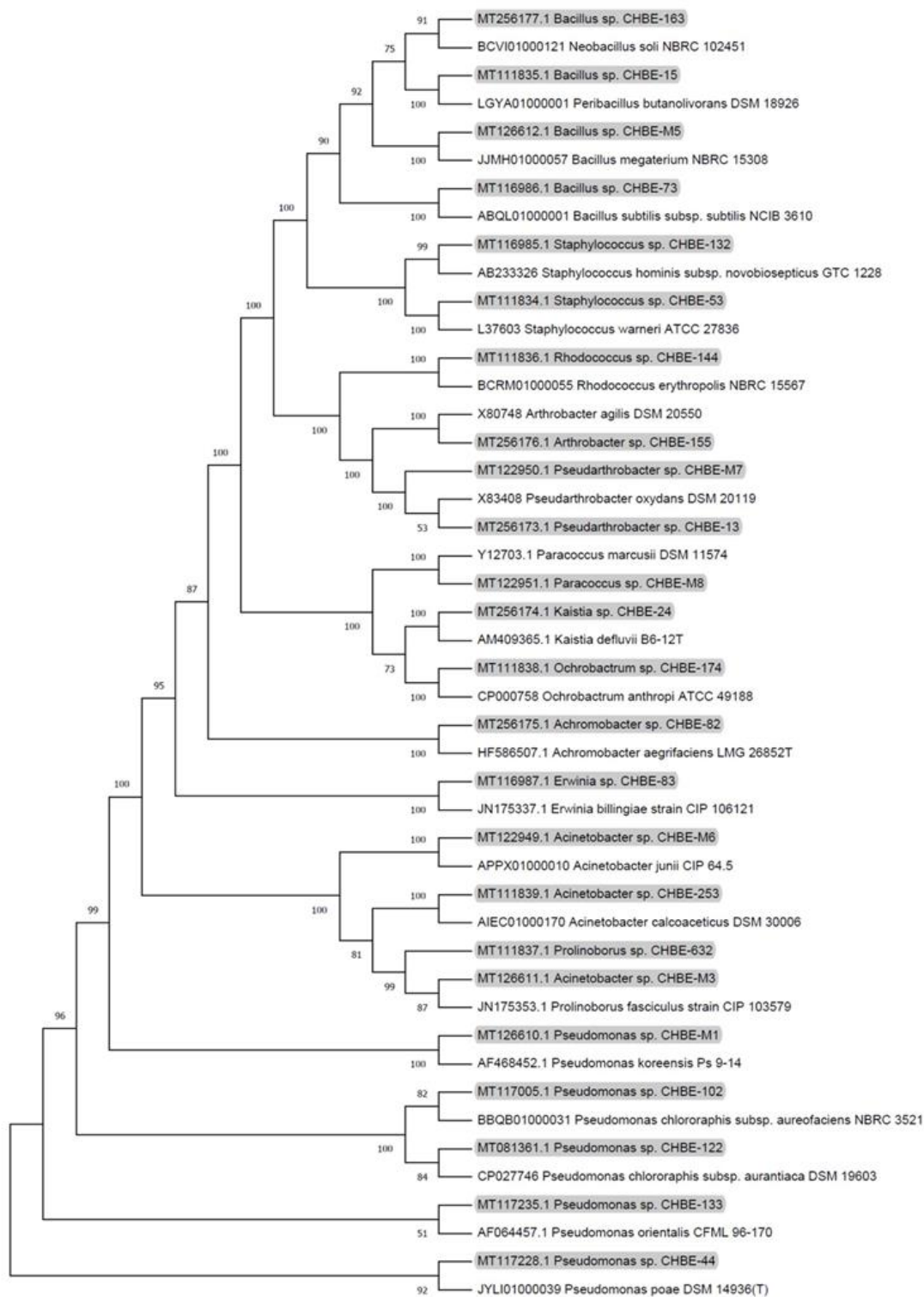
Tabela 4.3. Broj ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB), kvasaca i plesni (KP), *Pseudomonas* (Ps), naftnih degradera (ND) i *Nocardia-Rhodococcus* (NR) u uzorcima sedimenta

Bunar	HAB, (CFU/g)	KP, (CFU/g)	Ps, (CFU/g)	ND, (CFU/g)	NR, (CFU/g)
B1	$4,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$
B2	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$
B3	$6,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4$

Na početku bioremedijacionog procesa, određen je broj HAB i ND mikroorganizama. Na ispitivanoj lokaciji prikupljeni uzorci sedimenta su sadržali $6,4 \times 10^4$ - $4,0 \times 10^6$ CFU/g HAB i $5,6 \times 10^3$ - $5,6 \times 10^4$ CFU/g ND mikroorganizama (tabela 4.3.). U skladu sa preporukama US EPA (1995), ovaj broj ND mikroorganizama je bio iznad preporučenog minimuma neophodnog za adekvatnu i uspešnu *in situ* bioremedijaciju (1000 CFU/g). Međutim, bioremedijacioni potencijal (BRP), koji se definiše kao udeo bakterija naftnih degradera (ND) u ukupnom broju mikroorganizama i koji se izražava u procentima, je bio nizak.

Pet meseci nakon biostimulacije i reinokulacije broj ND bakterija je činio više od 63% HAB, znatno više nego na početku procesa. Nakon završetka bioremedijacije populacija ND bakterija je činila oko 19% HAB.

Srednje vrednosti mikroorganizama na dubinama sa visokim naftnim zagađenjem (dubine ispod 6 m) u ispitivanom sedimentu tokom procesa bioremedijacije, kao i njihov bioremedijacioni potencijal (BRP), prikazani su u tabeli 4.4.



Slika 4.15. Filogenetsko stablo spajanja suseda (NJ) zasnovano na 16S rRNA genima, korišćeno za prikazivanje filogenetskih odnosa bakterija izolovanih iz zagađenog sedimenta u oblasti C (označenih sivom bojom) i blisko povezanih tipičnih sojeva. Uključeni su i GenBank brojevi pristupa. Bootstrap vrednosti su izračunate „resampling“ metodom sa 500 replikacija i prikazane su u %

Tabela 4.4. Prosečna brojnost ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB) i naftnih degradera (ND) i njihov bioremedijacioni potencijal u ispitivanim uzorcima sedimenta na dubinama ispod 6 m na početku (a), nakon 6 meseci (b) i nakon 12 meseci (c) *in situ* bioremedijacionog procesa

Bunar		(a) na početku procesa	(b) nakon 6 meseci	(c) nakon 12 meseci
B1	HAB (CFU/g)	$4,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^9$	$4,3 \times 10^5$
	ND (CFU/g)	$5,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^8$	$8,1 \times 10^4$
	BRP	1	64	19
B2	HAB (CFU/g)	$2,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^5$
	ND (CFU/g)	$2,2 \times 10^4$	$8,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^4$
	BRP	1	72	20
B3	HAB (CFU/g)	$6,4 \times 10^4$	$5,8 \times 10^8$	$7,7 \times 10^4$
	ND (CFU/g)	$5,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^4$
	BRP	9	67	19

Kao što je navedeno ranije, nivo podzemnih voda je varirao između 6 m i 9 m ispod površine i izuzetno visoke koncentracije naftnih ugljovodonika su izmerene na dubinama većim od 6 m. Ovo ukazuje da je broj prisutnih mikroorganizama u ovoj oblasti najverovatnije bio od velikog značaja za proces bioremedijacije. Inicijalno određivanje bioremedijacionog potencijala u zoni kontaminacije je pokazalo da su brojni sojevi, prisutni u sedimentu i podzemnoj vodi na navedenoj lokaciji, sposobni da degradiraju date zagađujuće supstance. Kako bioaugmentacija alohtonim mikroorganizmima može biti neuspešna zbog dejstva abiotičkih i biotičkih faktora koji redukuju brojnost mikrobne populacije (Hosokawa et al., 2009), upotreba zimogenih mikroorganizama, koji su već adaptirani na rast u okruženju bogatom naftnim ugljovodonicima, je bolji izbor za bioaugmentaciju (Rizzo et al., 2020). Još jedan pozitivan aspekt korišćenja konzorcijuma mikroorganizama za bioaugmentaciju su kometabolički procesi, pri kojima potencijalno toksični međuprodukti degradacije, proizvedeni od strane jednog mikroorganizma, bivaju razgrađeni od strane drugog mikroorganizma u konzorcijumu (Garbisu et al., 2017). Stoga su autohtoni mikroorganizmi korišćeni za pripremu zimogenog konzorcijuma za bioaugmentaciju. Pomenuta bioaugmentacija proizvodi potentnu biomasu. Ovaj postupak je isplativ i ekološki prihvatljiv (Amiri et al., 2007; Holmquist i Decterov, 2019).

Treba naglasiti da su za analizu mikroorganizama prisutnih na kontaminiranoj lokaciji korišćene metode zasnovane na kultivaciji mikroorganizama. Ove tradicionalne metode pružaju nepotpune informacije o mikrobnim zajednicama i diverzitetu, jer mnogi mikroorganizmi ne mogu biti kultivisani/uzgojeni u laboratoriji (Stefani et al., 2015). Međutim, korišćenje ovih metoda za potrebe projekta su omogućile selekciju mikroorganizama sposobnih za rast u sredini bogatoj naftnim ugljovodonicima i aktivno učešće u degradaciji istih.

Kao što je i očekivano, broj ND mikroorganizama je, uprkos bioaugmentaciji, bio znatno redukovan na samom kraju procesa bioremedijacije. Razumna pretpostavka je da je smanjenje broja mikroorganizama odraz promene u diverzitetu supstrata za bioremedijaciju, jer istrošen izvor nutrijenata ograničava rast različitih vrsta mikroorganizama (Avdalovic et al., 2016).

4.1.4.2. Podzemna voda

Pre pristupanja procesu bioremedijacije određeno je prisustvo hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB), ukupnih anaeroba (AN), kvasaca i plesni (KP), naftnih degradera (ND) kao i njihov BRP u uzorcima podzemnih voda i njihove vrednosti su date u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Broj ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih mezofilnih bakterija (HAB), ukupnih anaeroba (AN), kvasaca i plesni (KP), naftnih degradera (ND), kao i njihov BRP u uzorcima podzemnih voda pre procesa *in situ* bioremedijacije

Pijezometar	HAB (CFU/mL)	AN (CFU/mL)	KP (CFU/mL)	ND (CFU/mL)	BRP (%)
P5	$1,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	7
P6	$4,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$	$5,2 \times 10^4$	9
P7	$1,6 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	11
P12	$1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	<100	$8,2 \times 10^3$	6
P13	$8,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	<100	$4,0 \times 10^3$	4

Rezultati su pokazali da je bioremedijacioni potencijal podzemne vode takođe bio nizak, te je bilo neophodno izvršiti bioaugmentaciju. Za potrebe bioaugmentacije podzemne vode pripremljena je biomasa koja je sadržala 5×10^9 CFU/mL HAB, $3,8 \times 10^9$ CFU/mL ND i $1,5 \times 10^8$ CFU/mL KP sa bioremedijacionim potencijalom od 79%.

Kako je monitoring uspešnosti bioaugmentacije podzemnih voda tokom procesa *in situ* bioremedijacije vršen analizom uzoraka sakupljenih iz IEB-a, bilo je neophodno utvrditi njihovo početno stanje pre inokulacije, kao i brojnost HAB i ND nakon inokulacije, što je predstavljeno u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Brojnost HAB i ND u uzorcima podzemne vode uzorkovane iz IEB-a pre (a) i nakon inokulacije biomase (b) i nakon 12 meseci (c) *in situ* bioremedijacionog procesa

IEB	(a) pre inokulacije			(b) nakon inokulacije			(c) nakon 12 meseci	
	HAB (CFU/mL)	ND (CFU/mL)	BRP (%)	HAB (CFU/mL)	ND (CFU/mL)	BRP (%)	HAB (CFU/mL)	ND (CFU/mL)
I11	400	100	25	$2,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	74	100	60
I12	$1,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	68	$2,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	73	700	30
I13	$1,3 \times 10^4$	2×10^3	16	$1,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	63	<100	180
I14	$3,3 \times 10^3$	1×10^3	30	$2,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	61	2×10^3	40
I15	$1,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	11	$2,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	48	800	30
I21	500	100	20	$1,5 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	60	<100	10
I22	900	300	33	$1,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	72	$2,8 \times 10^3$	10
I23	$5,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	22	$1,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	94	<100	<10
I24	$2,8 \times 10^3$	800	29	$2,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	57	100	<10
I25	$6,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	32	$2,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	62	$1,6 \times 10^3$	60
I31	400	100	25	$2,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	70	200	<10
I32	$1,5 \times 10^3$	1×10^3	67	$3,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	77	600	70
I33	$4,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	31	$2,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	76	100	<10
I34	$2,5 \times 10^3$	1×10^3	40	$1,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	79	$4,1 \times 10^3$	100
I35	$5,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	41	$1,1 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$	64	<100	90

Nakon inokulacije podzemne vode brojnost mikroorganizama je značajno porasla, kao što je bilo i očekivano. Takođe je prosečni bioremedijacioni potencijal porastao sa 32 na 69% (tabela 4.6.). Brojnost mikroorganizama je, zajedno sa fizičko-hemijskim parametrima, praćena na nedeljnom nivou, kako bi se, u slučaju smanjenja brojnosti mikroorganizama ispod 10^5 CFU/mL, pristupilo bioaugmentaciji. Nakon završetka procesa *in situ* bioremedijacije brojnost mikroorganizama u podzemnoj vodi se drastično smanjila (tabela 4.6.), što je i očekivano, uzimajući u obzir da je glavni izvor ugljenika, kao ograničavajući faktor rasta, bio nedostupan.

4.1.5. Fizičko-hemijski parametri podzemne vode

U tabeli 4.7. su prikazani fizičko-hemijski parametri podzemnih voda koji daju uvid u početno stanje podzemnih voda (označeni sa napomenom „na početku procesa“), a koji su važni za planiranje bioremedijacije i dinamike praćenja datih parametara tokom samog procesa, kao i njihove vrednosti nakon završetka *in situ* bioremedijacije.

Tabela 4.7. Opšti fizičko-hemijski pokazatelji podzemnih voda na početku (a) i nakon 12 meseci (b) *in situ* bioremedijacionog procesa

Pijezometar	t (°C)	pH	Rastvoreni kiseonik (mg/L)
P5 (a) na početku procesa	19,0	7,1	1,64
P5 (b) nakon 12 meseci	15,6	7,2	3,9
P6 (a) na početku procesa	18,1	7,2	0,85
P6 (b) nakon 12 meseci	14,7	7,4	1,7
P7 (a) na početku procesa	15,8	6,9	2,12
P7 (b) nakon 12 meseci	16,6	7,1	3,7
P12 (a) na početku procesa	18,5	7,1	1,84
P12 (b) nakon 12 meseci	15,7	7,4	2,8
P13 (a) na početku procesa	18,6	7,0	1,6
P13 (b) nakon 12 meseci	17,3	7,2	3,3

Tokom procesa *in situ* bioremedijacije monitoring fizičko-hemijskih parametara podzemnih voda je vršen analizom uzoraka sakupljenih iz IEB-a. S toga je bilo neophodno utvrditi njihovo početno stanje pre inokulacije, odnosno pre započinjanja biodegradacionog procesa od strane mikroorganizama. U tabeli 4.8. su date vrednosti praćenih parametara pre i nakon bioaugmentacije.

Tabela 4.8. Opšti fizičko-hemijski parametri u uzorcima podzemne vode uzorkovane iz IEB-a pre (a) i nakon inokulacije (b) biomase

IEB	(a) pre inokulacije			(b) nakon inokulacije		
	t (°C)	pH	Rastvoreni kiseonik (mg/L)	t (°C)	pH	Rastvoreni kiseonik (mg/L)
I11	25,4	7,5	3,42	25,3	7,8	5,3
I12	24,4	7,7	4,93	25,6	7,5	5,9
I13	21,2	7,7	6,25	23,4	7,5	3,9
I14	20,1	7,7	6,27	26,9	7,4	3,9
I15	24,0	7,6	5,41	23,6	7,8	4,6
I21	20,6	7,6	6,30	28,5	7,4	4,5
I22	23,1	7,7	6,28	26,3	7,4	3,9
I23	19,2	7,6	7,16	24,4	7,6	4,1
I24	22,7	7,5	6,56	23,6	7,5	3,7
I25	20,1	8,0	7,42	26,1	7,4	3,8
I31	20,4	7,7	6,48	26,7	7,5	2,6
I32	31,1	7,7	5,56	24,9	7,2	2,4
I33	21,2	8,0	6,85	24,9	7,3	3,9
I34	22,4	7,8	6,34	29,3	7,6	3,5
I35	19,0	7,7	5,51	24,3	7,3	3,1

Merenja fizičko-hemijskih parametara podzemnih voda pre započinjanja procesa *in situ* bioremedijacije su pokazala da su podzemne vode neutralne do blago bazne, a da se, odnosu na rastvoreni kiseonik, radi o sredinama koje su prirodno slabo aerisane (tabela 4.7.). Imajući u vidu da brojni faktori utiču na proces bioremedijacije, osim temperature, pH i rastvorenog kiseonika, na nedeljnom nivou su praćene i vrednosti električne provodljivosti (κ) i ukupnih rastvorenih čestica (TDS) kako bi se, u skladu sa dobijenim rezultatima, vršile korekcije i omogućilo mikrobnim populacijama da efektivno razgrade naftne polutante. Jer, ne samo niske vrednosti κ i TDS-a mogu da uspore ili zaustave rast mikroorganizama, previsoke vrednosti ovih parametara takođe imaju inhibitorno dejstvo, čak i na halofilne mikroorganizme (Hasanzadeh et al., 2020).

Kao što se može videti iz tabele 4.8., nakon inokulacije podzemnih voda došlo je do smanjenja koncentracije rastvorenog kiseonika, što sugerise da se on koristi za metaboličke procese aerobnih mikroorganizama. Takođe, kada bi, tokom procesa bioremedijacije, koncentracija rastvorenog kiseonika pala ispod 3 mg/L, ponavljane su kampanje oksigenacije. Recirkulacija podzemnih voda kroz zatvoreni sistem je omogućavala delimičnu aeraciju vode. Međutim, nakon započinjanja procesa mikrobne degradacije polutanata, koncentracija rastvorenog kiseonika je varirala zbog njegovog iskorišćavanja za enzimске reakcije.

4.1.6. Eksponecijalni model degradacije TPH u sedimentu

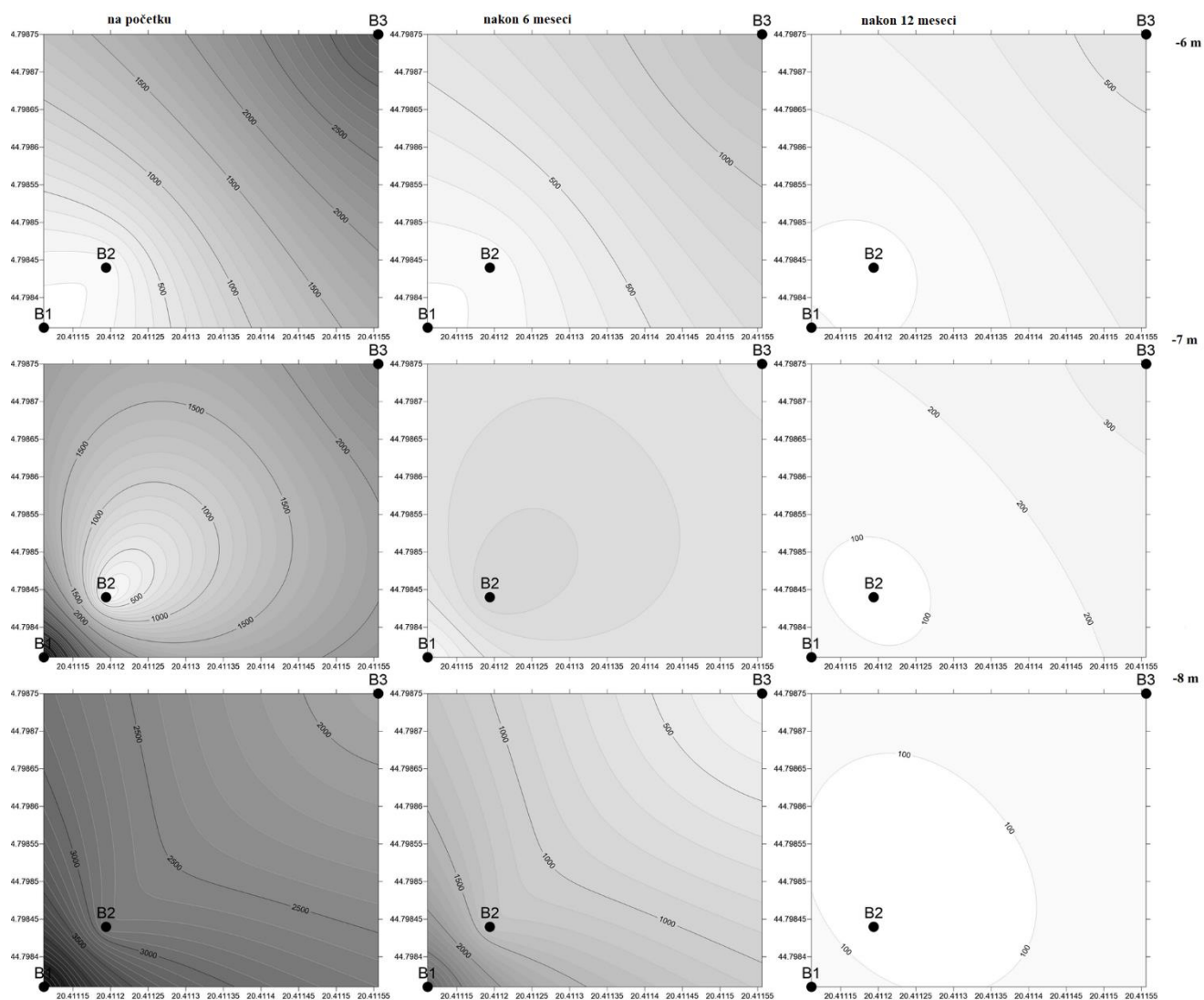
Srednja vrednosti sadržaja TPH (i deskriptivna statistika) u sedimentima za sve tri lokacije i za tri uzorkovanja tokom godine za dubine od 6 m do 15 m su prikazane u tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Srednja vrednost sadržaja TPH (mg/kg) i deskriptivna statistika za uzorke sedimenata iz B1 (dubine od 7 do 15 m), B2 (dubine od 8 do 11 m) i B3 (dubine od 6 do 9 m) uzete tokom tri ciklusa uzorkovanja (na početku procesa, nakon 6 meseci i nakon 12 meseci *in situ* bioremedijacionog procesa)

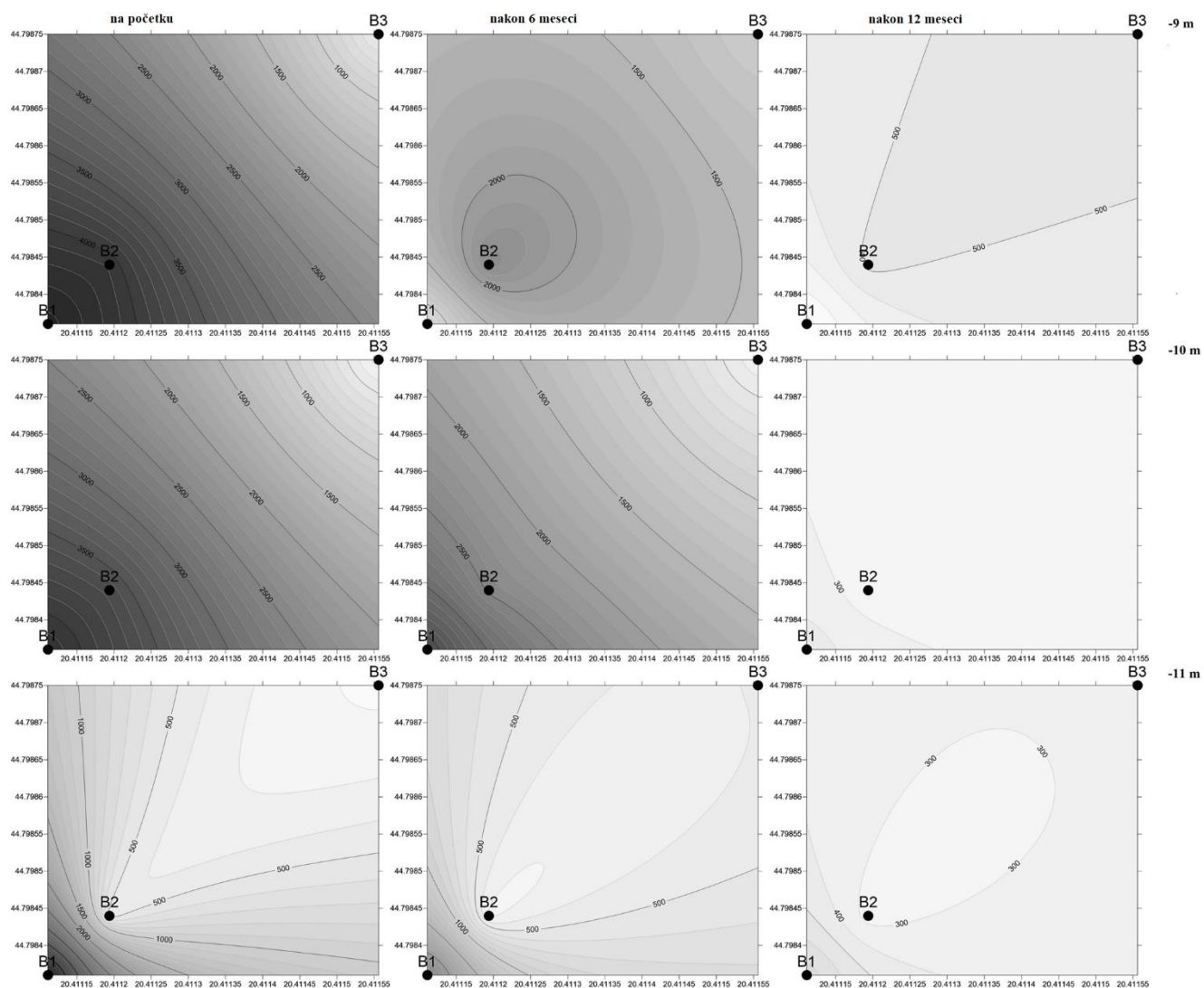
Bunar	N (Dubina h ₁ -h ₂)*	min	max	Sr. vrednost	St. dev.
B1 (na početku procesa)	8 (7-15 m)	3342	5108	4606	607
B1 (nakon 6 meseci)	8 (7-15 m)	145	3640	1650	1293
B1 (nakon 12 meseci)	8 (7-15 m)	67	758	332	253
B2 (na početku procesa)	3 (8-11 m)	2730	4085	3492	693
B2 (nakon 6 meseci)	3 (8-11 m)	1247	2458	2022	673
B2 (nakon 12 meseci)	3 (8-11 m)	52	525	273	238
B3 (na početku procesa)	3 (6-9 m)	1838	3380	2583	772
B3 (nakon 6 meseci)	3 (6-9 m)	224	1412	733	612
B3 (nakon 12 meseci)	3 (6-9 m)	154	595	369	221

*Dubine sa koncentracijama TPH većim od remedijacione vrednosti definisane nacionalnom legislativom

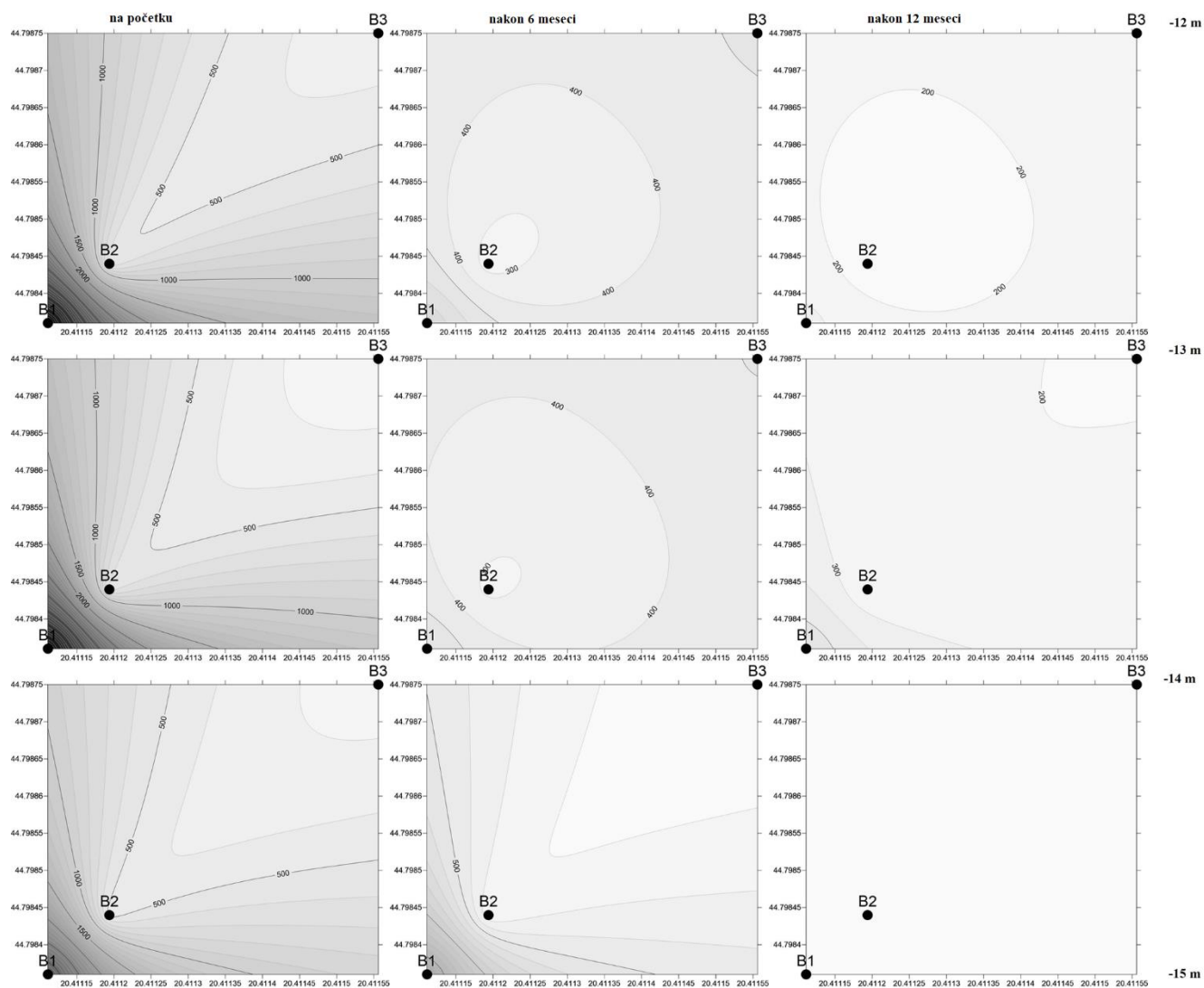
Slika 4.16. (iz praktičnih razloga podeljena na sliku 4.16a., 4.16b. i 4.16c) prezentuje prostorno-vremenski prikaz promene sadržaja TPH prema dubinama (posmatranih vertikalno od -6 m do -15 m dubine) u sedimentima sve tri bušotine, a u zavisnost od vremena uzorkovanja. Primenom matematičke procedure fitovanja dobijeni su parametri eksponencijalnog modela degradacije, koji opisuje vremensku zavisnost sadržaja TPH na svakoj dubini (tabela 4.10). Model eksponencijalne degradacije opisuje degradaciju ugljovodonika, pod pretpostavkom da konstanta degradacije β ostaje nepromenjena tokom vremena za svaku dubinu, tj. da ne zavisi od promene koncentracije tokom vremena.



Slika 4.16a. Prostorno-vremenski prikaz promene koncentracije TPH u odnosu na dubinu dat za dubine od -6 do -8 m. Brojevi pored izokonzentričnih linija predstavljaju prosečne vrednosti koncentracije TPH (mg/kg)



Slika 4.16b. Prostorno-vremenski prikaz promene koncentracije TPH u odnosu na dubinu dat za dubine od -9 do -11 m. Brojevi pored izokoncentričnih linija predstavljaju prosečne vrednosti koncentracije TPH (mg/kg)



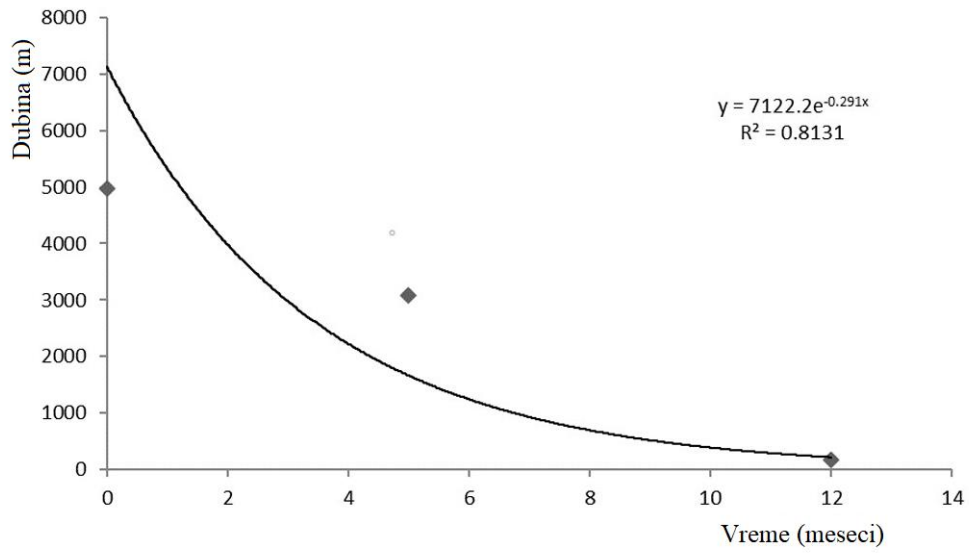
Slika 4.16c. Prostorno-vremenski prikaz promene koncentracije TPH u odnosu na dubinu dat za dubine od 12 do -15 m. Brojevi pored izokontričnih linija predstavljaju prosečne vrednosti koncentracije TPH (mg/kg)

Tabela 4.10. Inicijalna koncentracija TPH (C_0), koeficijent stepena degradacije (β) i vrednosti R^2 dobijene modelovanjem ($C_0 \text{eksp}-\beta \text{meseci}$) za odgovarajuće bušotine i dubine

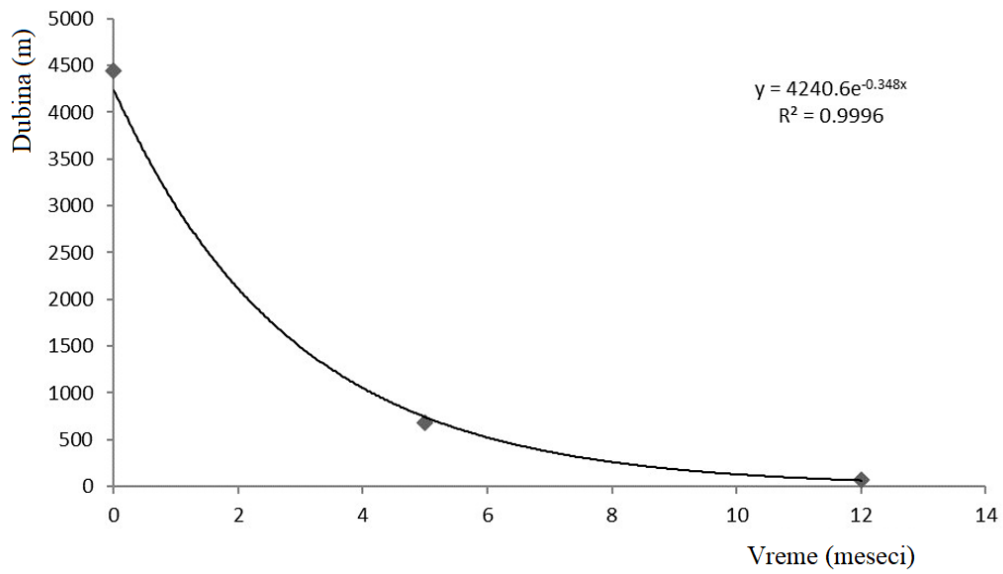
Bunar	Dubina (m)	Inicijalna koncentracija ugljovodonika (C_0) (mg/kg)	Koeficijent stepena degradacije (β) (1/meseci)	R^2
B1	7-8	2262	0,27	0,6427
	8-9	7122	0,291	0,9142
	9-10	4241	0,348	0,9989
	10-11	5647	0,191	0,8684
	11-12	4932	0,153	0,9948
	12-13	3857	0,220	0,9126
	13-14	3129	0,166	0,6699
	14-15	4546	0,296	0,9379
opseg β : 0,15-0,35				
B2	8-9	3813	0,338	0,9436
	9-10	4597	0,174	0,9725
	10-11	4853	0,233	0,9175
opseg β : 0,15-0,35				
B3	6-7	3191	0,143	0,9903
	7-8	1940	0,156	0,8493
	8-9	1216	0,197	0,7877
opseg β : 0,14-0,20				

Prosečna vrednost konstante β za sve tri lokacije iznosi 0,227. Model je pokazao visok stepen podudaranja sa izmerenim vrednostima ($R^2 > 0,8$ za 11 od 14 tačaka) (tabela 4.10.). Na slikama 4.17.-4.22. je dat grafički prikaz konstante brzine degradacije koja ilustruje model eksponencijalnog raspada.

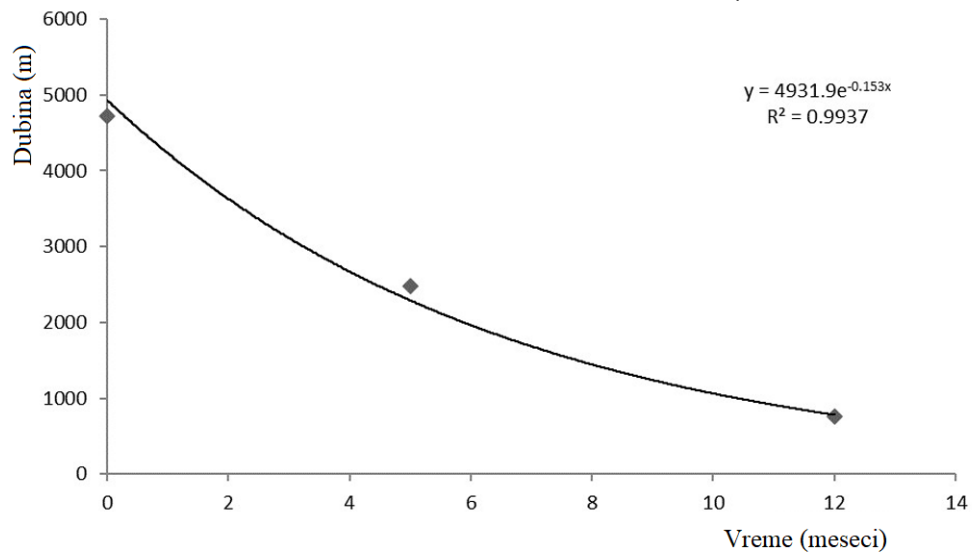
Iz eksponencijalnog modela degradacije rađenom za datu lokaciju, koji opisuje vremensku zavisnost biodegradacije naftnih ugljovodonika, konstanta degradacije je bila najviša za dubine 8 – 10 m u sve tri bušotine i nije zavisila od inicijalne koncentracije TPH (Desai et al., 2008; Hammershøj et al., 2019; Knightes i Peters, 2006; Stringfellow i Aitken, 1995). Podaci dobijeni iz modela degradacije pokazuju veliki stepen poklapanja sa izmerenim vrednostima TPH. Stoga je izvedena hipoteza da ovakav model može biti koristan za određivanje vremena koje je potrebno da se sadržaj naftnih ugljovodonika svede na maksimalne dozvoljene vrednosti.



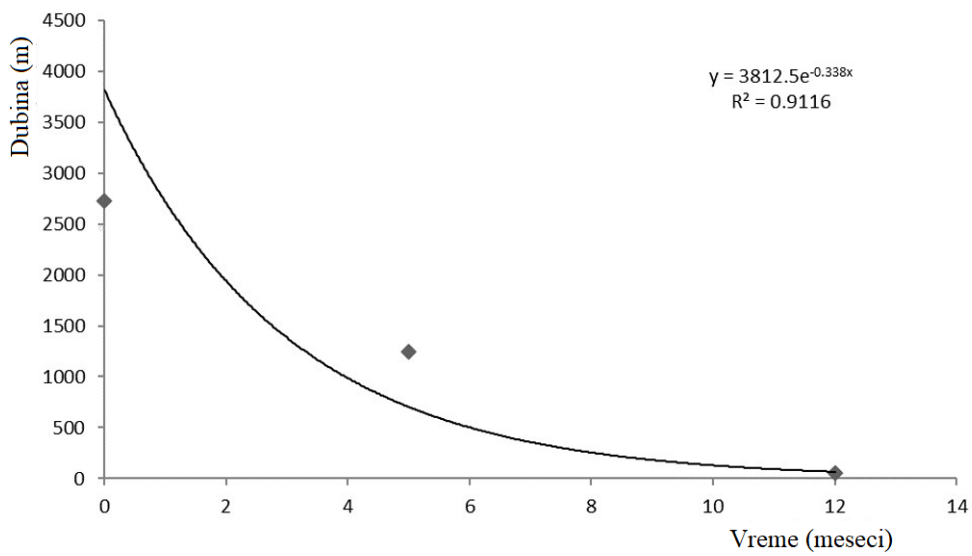
Slika 4.17. Grafik konstante brzine degradacije koji ilustruje eksponencijalni model degradacije za B1-9 m



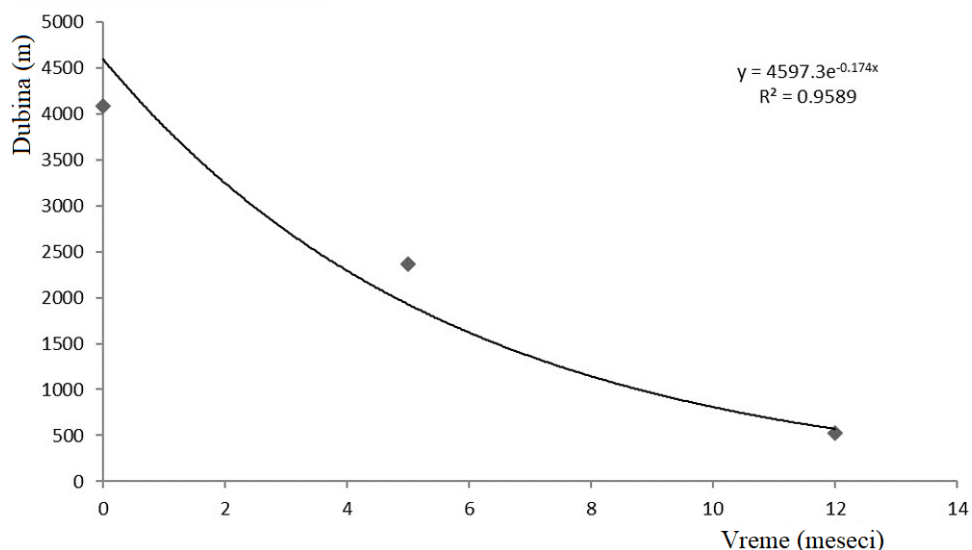
Slika 4.18. Grafik konstante brzine degradacije koji ilustruje eksponencijalni model degradacije za B1-10 m



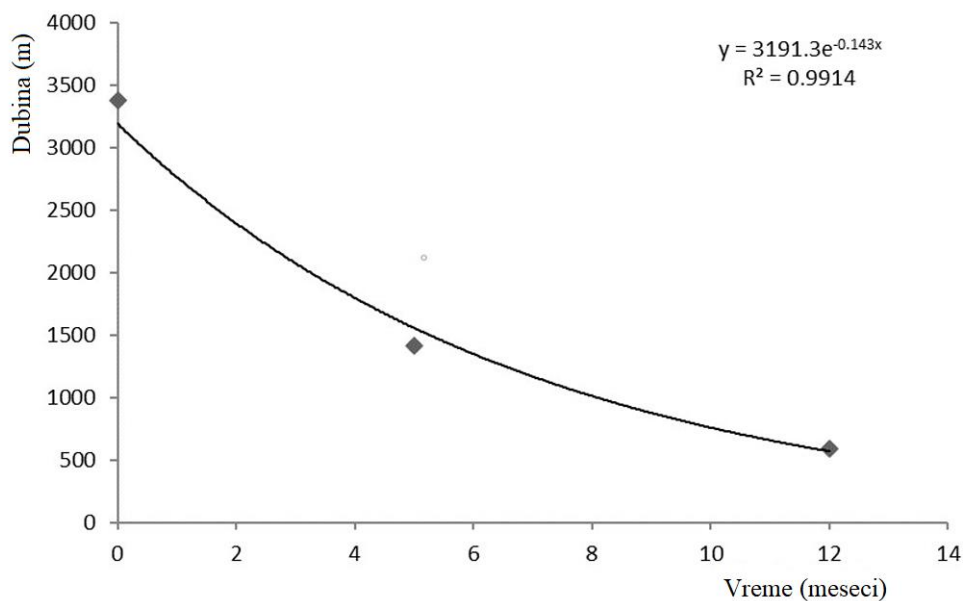
Slika 4.19. Grafik konstante brzine degradacije koji ilustruje eksponencijalni model degradacije za B1-12 m



Slika 4.20. Grafik konstante brzine degradacije koji ilustruje eksponencijalni model degradacije za B2-9 m



Slika 4.21. Grafik konstante brzine degradacije koji ilustruje eksponencijalni model degradacije za B2-10 m



Slika 4.22. Grafik konstante brzine degradacije koji ilustruje eksponencijalni model degradacije za B3-7 m

Opisani proces *in situ* bioremedijacije koji je primenjen na lokaciji Toplane Novi Beograd je isplativiji nego što je “pump-and-treat” (Ji et al., 2019). Adsorpcioni material iz FABK je, nakon završenog tretmana sedimenta i podzemnih voda, transportovan na haldu kako bi bio podvrgnut *ex situ* bioremedijaciji (Beskoski et al., 2011). Nakon tretmana, adsorbent je moguće koristiti za druge svrhe upravljanja otpadom, kao što je upotreba adsorbenta kao pokrivnog materijala za deponije čvrstog otpada.

Opisana bioremedijaciona procedura se može koristiti za tretman nedostupnih površina koje drugim tehnikama ne mogu biti tretirane. *In situ* bioremedijacija na industrijskom nivou omogućava tretman velikih količina vode i sedimenta gde alternativne tehnike kao što su termalna desorpcija (Zhao

et al., 2019), solidifikacija (Álvarez-Coronel et al., 2021), *ex situ* bioremedijacija (Bianco et al., 2020), ispiranje zemljišta (Befkadu i Chen, 2018) i enkapsulacija (Park et al., 2021), zbog tehničkih i ekonomskih razloga nisu primenljive.

Kao što je pokazano, bioremedijacija koja se sastoji od biostimulacije i reinokulacije u pravilno projektovanom, zatvorenom sistemu, može da ukloni adsorbovane naftne polutante zarobljene u česticama sedimenta. Nivoi TPH izmereni u podzemnoj vodi i sedimentu nakon završetka procesa *in situ* bioremedijacije bili su niži od zahtevanih prema Pravilniku (Sl. glasnik, 2010), što ukazuje da je proces uspešno obavljen.

4.2. Adsorpcija i biorazgradnja rastvorne frakcije dizela na organozeolitu

Poslednjih godina se dosta pažnje posvećuje frakciji naftnih ugljovodonika koja je rastvorna u vodi, pre svega zbog izuzetne toksičnosti za akvatične organizme, a posebno i zbog činjenice da može da ima dugoročne posledice na područja koja su udaljena od prvobitnog izlivanja (Müller et al., 2019). Upotreba sorbenata za prečišćavanje voda od naftnog zagađenja je u fokusu velikog broja istraživača. Jedan od novijih pristupa u rešavanju problema prečišćavanja zagađenih voda je upotreba različitih filtera na bazi prirodnih alumosilikatnih minerala. Oni su efikasni, a istovremeno ekološki i ekonomski prihvatljivi adsorbenti. Prirodni alumosilikatni minerali imaju široku primenu kao katjonski izmenjivači, zahvaljujući negativnom naelektrisanju rešetke i poroznosti strukture. Savremena istraživanja ukazuju na to da su navedeni minerali, bez prethodne modifikacije, visoko efikasni u procesu adsorpcije toksičnih metala i drugih katjonskih polutanata prisutnih u zagađenim vodama. Međutim, negativno naelektrisanje alumosilikatne rešetke minerala omogućava površinsku modifikaciju katjonskim površinski aktivnim supstancama (modifikatorima) u cilju povećanja i proširivanja adsorpcione efikasnosti. Dakle, kontrolisanim procesom modifikacije površine minerala organskim modifikatorima, kao što su dugolančani molekuli kvaternarnih amonijumovih soli, nastaju novi organomineralni kompleksi. Površina dobijenog kompleksa je hidrofobna što ovako modifikovane minerale čini pogodnim adsorbentima za razne organske polutante. Dostupnost, dobre hidrauličke osobine i relativno niska cena alumosilikatnog minerala podstiču dalja istraživanja u oblasti njihove primene kao filtera u prečišćavanju voda (Muir i Bajda, 2016).

Zbog svega gore navedenog, u drugom delu disertacije je prezentovan laboratorijski eksperiment nove tehnološke procedure za prečišćavanje voda kontaminiranih rastvornom frakcijom dizela. Postupak se zasniva na adsorpciji rastvorne frakcije dizela na zeolitu modifikovanom heksadeciltrimetilamonijum bromidom (HDTMA-Br), nakon čega dolazi do biorazgradnje adsorbovanih polutanata. S obzirom na to da se biorazgradnja zagađujućih supstanci ne može vršiti nezavisno od biorazgradnje adsorbenta, dugolančani organski katjoni koji se koriste za površinsku modifikaciju zeolita bivaju takođe mikrobiološki razloženi. Rezultat ove kompleksne bioremedijacije je degradirani polutant i regenerisani zeolit koji se može ponovo modifikovati i koristiti za adsorpciju drugih organskih molekula.

4.2.1. Karakterizacija organozeolita

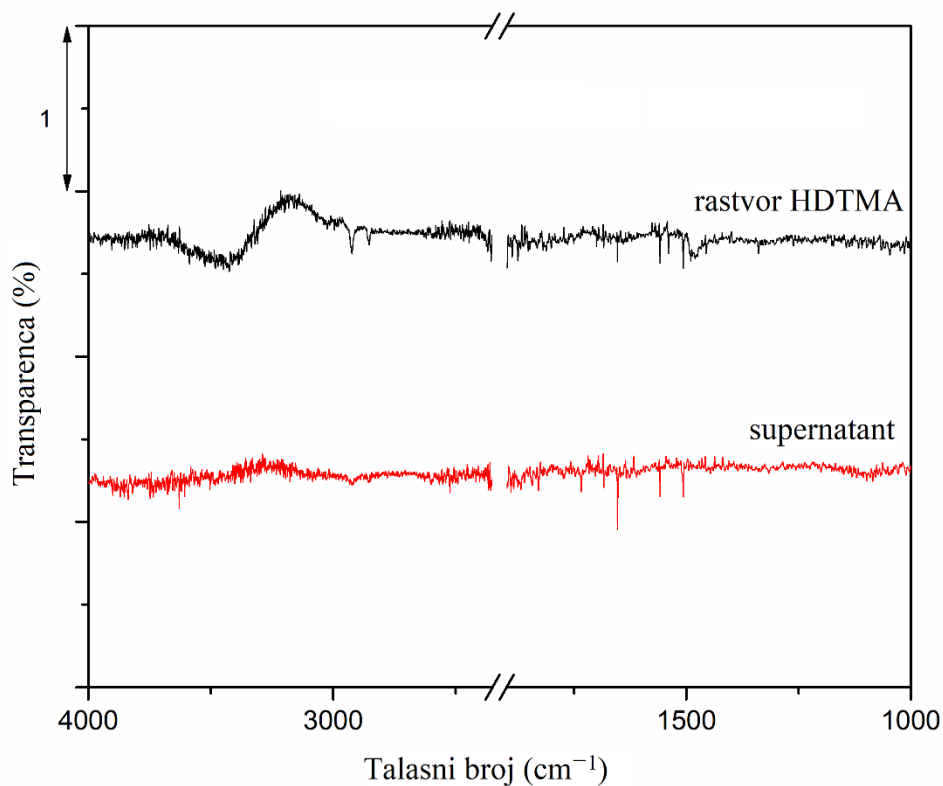
Adsorpcija organskih supstanci na površinu modifikovanog zeolita zavisi od količine surfaktanta primenjenog za modifikaciju i od početne koncentracije surfaktanta u rastvoru. Ako je početna koncentracija surfaktanta u rastvoru ispod CMC vrednosti (kritične koncentracije potrebne za formiranje micela), a količina surfaktanta koja se koristi za dobijanje organozeolita manja ili jednaka ECEC vrednosti (spoljašnjem kapacitetu za razmenu katjona) prirodnog zeolita, adsorpcija katjonskih surfaktanta na površini zeolita dešava se delovanjem Kulonovih sila i uspostavljanjem jakih elektrostatičkih veza, što za rezultat ima formiranje monosloja. U ovom slučaju, adsorbovani monomeri surfaktanta formiraju na negativno naelektrisanj površini zeolita sloj bogat organskim molekulima, čime ta površina postaje više hidrofobna. Međutim, ako je početna koncentracija surfaktanta iznad CMC vrednosti za dati surfaktant, može doći do aglomeracije jona surfaktanta adsorbovanih na površini zeolita i formiranja dvosloja ili admicelle, čak i kada je početna koncentracija surfaktanta ispod ECEC vrednosti (Li i Bowman, 1998).

Kako bi se potvrdila razmena jona između neorganskih katjona na spoljašnjoj površini zeolita i jona surfaktanta tokom pripreme organozeolita, određena je količina oslobođenih neorganskih katjona u supernatantima. Koncentracije oslobođenih katjona bile su sledeće: $K^+ = 0,11 \text{ meq}/100 \text{ g}$, $Na^+ = 1,38$

meq/100 g, $Mg^{2+} = 2,35$ meq/100 g i $Ca^{2+} = 3,84$ meq/100 g. Poređenjem ukupne količine oslobođenih katjona (7,68 meq/100 g) i ECEC vrednosti prirodnog zeolita (10 meq/100 g) pokazano je da je došlo do skoro potpune razmene jona. Blago niže količine oslobođenih katjona od ECEC vrednosti (spoljašnjeg kapaciteta za razmenu katjona) mogle bi ukazati na to da male količine neorganskih katjona nisu bile dostupne za jonsku razmenu sa surfaktantima. Takođe, dobro je poznato da orijentacija jona surfaktanta zavisi od količine surfaktanta na površini zeolita, te da pri manjoj količini surfaktanta korišćenoj za modifikaciju, joni surfaktanta usvajaju skoro horizontalni raspored (manju uređenost) na površini, dok pri većoj količini surfaktanta, oni poseduju perpendikularnu orijentaciju (veću uređenost). U ovom istraživanju, količina surfaktanta korišćena za modifikaciju bila je jednaka ECEC vrednosti prirodnog zeolita, a početna koncentracija surfaktanta bila je iznad CMC vrednosti za HDTMA. Stoga, male razlike između ukupne količine oslobođenih katjona i ECEC vrednosti mogu biti uzrokovane prisustvom micela surfaktanta u blizini površine zeolita, a koje su blokirale neke neorganske katjone na površini za jonsku razmenu.

4.2.1.1. FTIR analiza

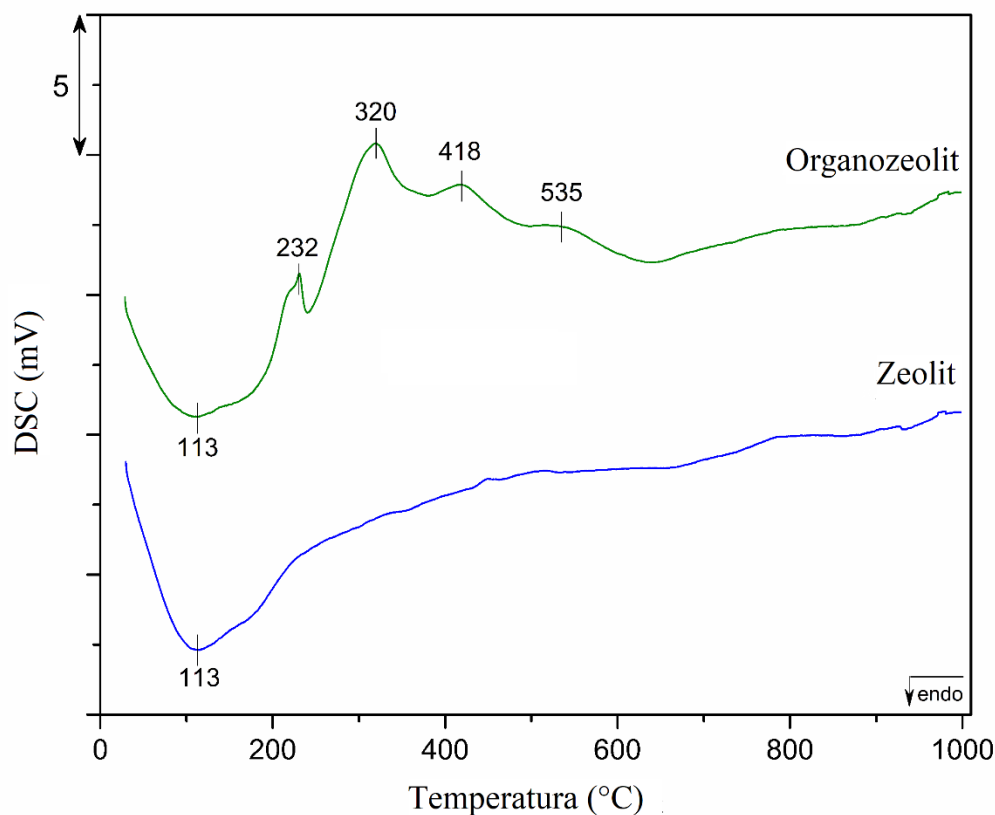
Uspešnost modifikacije prirodnog zeolita jonima HDTMA procenjena je upoređivanjem FTIR spektra čistog HDTMA rastvorenog u vodi (pri istoj koncentraciji koja je korišćena za pripremu organozeolita) sa spektrom supernatanta tokom pripreme organozeolita (slika 4.23.). Absorpcione trake koje potiču od čistog HDTMA (trake na 2850 i 2920 cm^{-1}), a koje se pripisuju vibracijama simetričnog i asimetričnog istezanja CH_2 metilenskih grupa alifatičnih lanaca (Slaný et al., 2019), bile su samo blago vidljive u supernatantu pripremljenog organozeolita. Ovo je potvrdilo uspešnost procesa modifikacije i da je ukupna količina surfaktanta koji je korišćen bila adsorbovana na površini zeolita, i to verovatno u obliku micela.



Slika 4.23. FTIR spektar HDTMA rastvorenog u vodi i supernatanta organozeolita

4.2.1.2. DSC i TG analiza

DSC i TG krive prirodnog zeolita i organozeolita prikazane su na slikama 4.24. i 4.25., dok je gubitak mase za sve uzorke u različitim temperaturnim opsezima prikazan u tabeli 4.11. Za prirodni zeolit bio je uočljiv kontinuirani gubitak mase u temperaturnom opsegu od 30 – 1000 °C (slika 4.24.). U prvom temperaturnom opsegu od 30 – 220 °C, gubitak mase je u korelaciji sa fizički adsorbovanom vodom, dok se pri višim temperaturama (220 – 1000 °C) postepeno gubi voda koja je koordinisana sa hidratizovanim neorganskim katjonima. Kod organozeolita, kod kojih je količina adsorbovanih jona surfaktanta ispod ECEC vrednosti prirodnog zeolita, očekuje se da će gubitak mase u prvom temperaturnom opsegu biti manji nego kod prirodnog zeolita, što je posledica veće hidrofobnosti površine organozeolita. Uzimajući u obzir da su u ovom istraživanju adsorbovani surfaktanti na površini prirodnog zeolita formirali micelle, verovatno je u prvom temperaturnom opsegu došlo do desorpcije slabije vezanih molekula surfaktanta iz micela. U prvom temperaturnom opsegu primetan je blago veći gubitak mase za organozeolit (6,88%) u poređenju sa gubitkom mase kod prirodnog zeolita (6,70%; tabela 4.11.), što je ukazalo na eliminaciju slabo vezanog HDTMA iz micela. Gubitak mase u drugom temperaturnom opsegu kod organozeolita odgovarao je oksidaciji jona surfaktanta prisutnih na površini prirodnog zeolita, kao i gubitku vode koordinisane sa katjonima koji su ostali unutar kanala zeolita (Sullivan et al., 1997).

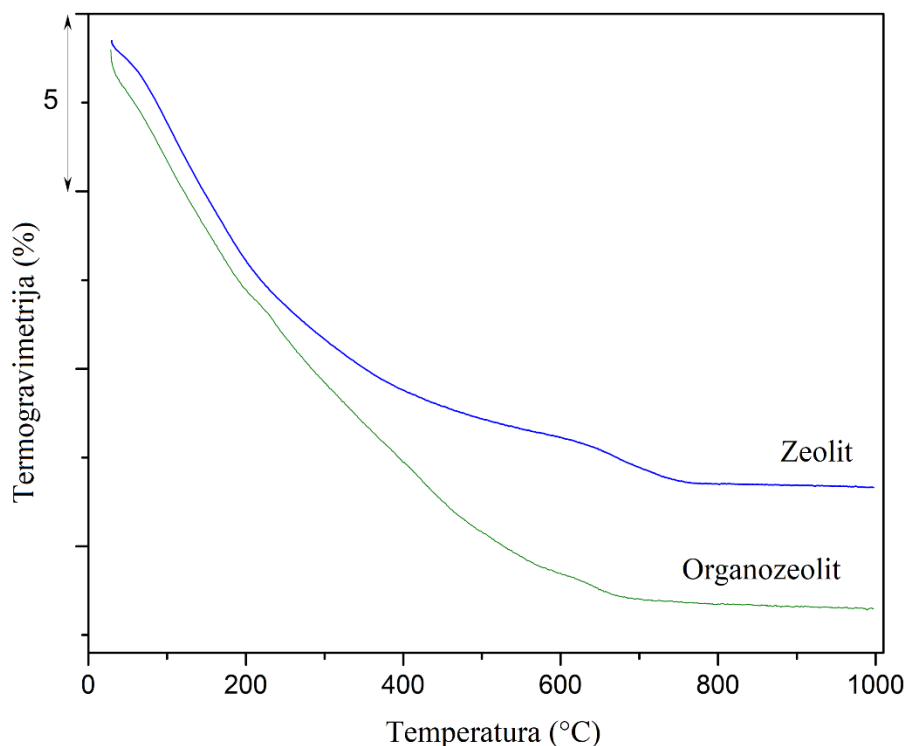


Slika 4.24. DSC krive zeolita i organozeolita

Tabela 4.11. Gubitak mase (%) dobijen iz termografimetrijskih (TG) krivi za zeolit i organozeolit

	Temperatura, °C			
	30 – 215	220 – 700	700 – 1000	Σ (30 – 1000)
Zeolit	6,70	5,07	0,57	12,52
Organozeolit	6,88	8,18	0,29	15,40

DSC kriva prirodnog zeolita (slika 4.24.) prikazuje endotermni vrh na 113 °C koji odgovara dehidraciji. Na DSC krivoj organozeolita je endotermni vrh u prvom opsegu bio na istoj temperaturi kao i za prirodni zeolit (113 °C) (Marković et al., 2017). U drugom temperaturnom opsegu na DSC krivoj organozeolita uočena su četiri egzotermna vrha (na 232, 320, 418 i 535 °C; slika 4.24.) koji predstavljaju oksidaciju organskog surfaktanta čvrsto vezanog na površini organozeolita. Gubitak mase u opsegu od 220 – 700 °C za prirodni zeolit povećao se nakon modifikacije HDTMA sa 5,07% na 8,18% (tabela 4.11.), što potvrđuje prisustvo surfaktanta u organozeolitu.



Slika 4.25. TG krive zeolita i organozeolita

4.2.2. Adsorpcija WSF dizela iz kontaminirane vode na organozeolit

4.2.2.1. Kinetika adsorpcije

Uticaj vremena kontakta na adsorpciju WSF dizela iz kontaminirane vode na organozeolit prikazan je na slici 4.26. Kao što se može videti, adsorpcija polutanta na organozeolit je inicijalno bila veoma brza, a većina kontaminanta (83,6%) adsorbovana je u prvih 7,5 minuta, što se može povezati sa velikom dostupnošću adsorpcionih mesta na površini organozeolita. Nakon toga adsorpcija je postepeno rasla dok nije dostignuta ravnoteža, za šta je bilo potrebno oko 60 minuta (približno 90% adsorbovanog polutanta). Maksimalna količina adsorbovanog WSF dizela pod ovim eksperimentalnim uslovima iznosila je 22,2 mg/g.

Podaci dobijeni tokom adsorpcionih eksperimenata (slika 4.26.) bili su fitovani u skladu sa često korišćenim kinetičkim modelima za analizu podataka o adsorpciji organskih polutanata od strane organominerala, tj. modelima pseudo-prvog reda i pseudo-drugog reda.

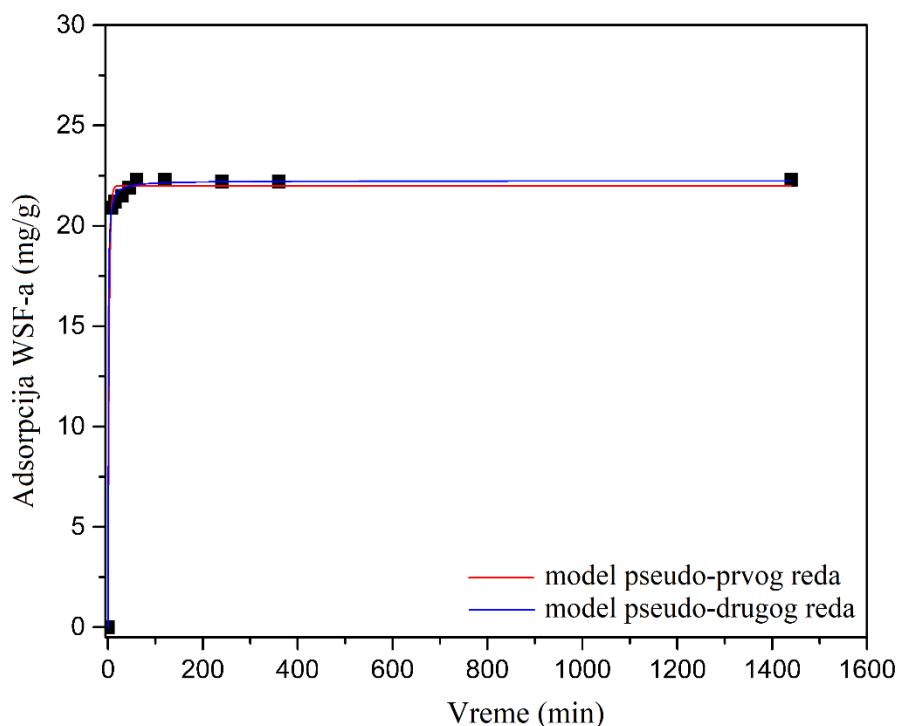
Kinetički model pseudo-prvog reda, poznatiji i kao Lagergren-ov (Lagergren) model, predstavljen je sledećom jednačinom (10) (Obradović et al., 2022):

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (10)$$

dok je jednačina pseudo-drugog reda predstavljena sledećim izrazom (11) (Ho i McKay, 1998):

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{q_e k_2 t + 1} \quad (11)$$

gde je q_e (mg/g) ravnotežna količina, a q_t (mg/g) je adsorbovana količina polutanta za adsorpciono vreme t . k_1 (1/min) i k_2 (g/mg × min) su kinetičke konstante pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, redom.



Slika 4.26. Efekat kontaktnog vremena na adsorpciju WSF-a dizela na organozeolit

Na osnovu vrednosti korelacionog koeficijenta (R^2) i odstupanja između teorijski izračunate q_{e1} i q_{e2} i eksperimentalno određene (q_{exp}) količine adsorbovanog polutanta, oba kinetička modela (pseudo-prvog i pseudo-drugog reda) pokazala su dobro poklapanje sa eksperimentalno dobijenim podacima za organozeolit (tabela 4.12.). Kinetički podaci dobijeni iz modela pseudo-drugog reda (više nego pseudo-prvog) pokazala su neznatno bolje podudaranje teorijski izračunate količine adsorbovanog polutanta q_{e2} (22,25 mg/g) sa eksperimentalno utvrđenom adsorbovanom količinom (22,20 mg/g), sugerišući da bi korak koji uključuje hemijsku adsorpciju mogao biti korak koji određuje brzinu procesa adsorpcije WSF dizela.

Tabela 4.12. Kinetički parametri za adsorpciju WSF dizela na organozeolit

Model	Parametar	Vrednost
Eksperimentalni podaci	q_e^{exp} (mg/g)	22,20
	k_1 (1/min)	0,390
pseudo-prvog reda	q_{e1} (mg/g)	22,01
	R^2	0,997
pseudo-drugog reda	k_2 (g/(mg · min))	0,081
	q_{e2} (mg/g)	22,25
	R^2	0,999

Dostupni literaturni podaci o kinetici adsorpcije od strane minerala ili biouglja sugerišu da model pseudo-drugog reda dobro opisuje većinu procesa adsorpcije u kojima se koriste nemodifikovani i organomodifikovani minerali, kao i zagađujuća jedinjenja koji se obično nalaze u WSF dizel goriva.

Na primer, u jednom istraživanju Ewis i saradnici su koristili mešavinu magnetnog bentonita/redukovanog grafen oksida ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Bent}/\text{rGO}$) i magnetnog bentonita/višezičnih ugljeničnih nanocevčica (*engl. Multiwall Carbon Nanotubes, MWCNT) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Bent}/\text{MWCNT}$) za uklanjanje ulja iz emulzije „voda u ulju“ (Ewis et al., 2022). Adsorpcioni eksperiment je pratilo različita vremena kontakta. Utvrđeno je da je do brze adsorpcije došlo u prvih 30 minuta na oba adsorbenta, nakon čega je usledilo postepeno smanjenje dok nije postignuta ravnoteža. Autori su objasnili da se ovo ponašanje može pripisati dostupnosti vezujućih mesta za adsorpciju u prvih 30 minuta, dok su nakon ovog perioda ta mesta postala potpuno zauzeta, te je adsorpcija počela da opada. Više R^2 vrednosti koje su nađene za model pseudo-drugog reda ukazale su da ovaj model bolje opisuje kinetiku adsorpcije ulja u poređenju sa modelom pseudo-prvog reda za oba adsorbenta, što sugerise da adsorpcija ulja uključuje proces hemisorpcije, a koji se sastoji od elektrostatičkih interakcija i uspostavljanja hemijskih veza između adsorbenta i adsorbata (Ewis et al., 2022).*

Onwuka i saradnici su koristili tri kinetička modela, tj. model pseudo-prvog, pseudo-drugog reda i intrapartikularnu difuziju, kako bi opisali adsorpciju BTEX jedinjenja na montmorilonitu modifikovanom pomoću HDTMA i trimetilfenil amonijumom (TMPA) (Onwuka et al., 2022). Na osnovu koeficijenta korelacije (R^2) zaključili su da je kinetički model pseudo-drugog reda bolje odgovarao eksperimentalnim podacima nego ostali kinetički modeli, kao i da je izračunata vrednost q_e (mg/g) dobijena iz modela pseudo-drugog reda bila bliža eksperimentalno određenoj q_e (mg/g). Nourmoradi i saradnici su proučavali adsorpciju BTEX na montmorilonitu modifikovanom pomoću tetradeciltrimetilamonijum bromida (TTAB-Mt) za različita vremena kontakta (Nourmoradi et al., 2013). Primitili su da je adsorpcija polutanta brzo rasla u početnom vremenu kontakta zbog veće dostupnosti adsorpcionih mesta, a zatim je kapacitet adsorpcije polako rastao do otprilike 24 časa. Na osnovu koeficijenta korelacije (R^2) za tri kinetička modela (model pseudo-prvog, pseudo-drugog reda i intrapartikularnu difuziju), model pseudo-drugog reda je bolje odgovarao eksperimentalnim podacima nego ostali kinetički modeli (Nourmoradi et al., 2013).

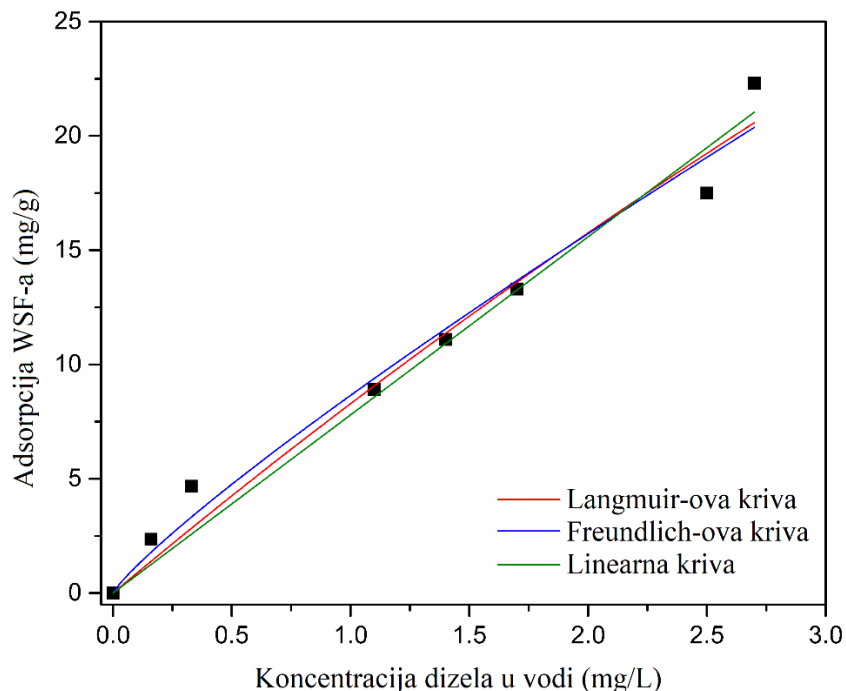
Kinetički model pseudo-drugog reda se takođe pokazao kao najbolji za prilagođavanje eksperimentalnih podataka u studiji Lopičić i saradnika u kojoj su proučavali kinetiku adsorpcije WSF dizela na biouglju dobijenom pirolizom koštica šljiva (PmS-B) (Lopičić et al., 2024). Rezultati su ukazali da je hemijska adsorpcija dominantan oblik adsorpcije i da bi deljenje elektrona između WSF dizela i PmS-B moglo biti uključeno u uklanjanje molekula adsorbata.

4.2.2.2. Adsorpcione izoterme

Kako bi se istražio mehanizam interakcije između adsorbata i adsorbenta, neophodno je odrediti adsorpcione izoterme. Da bi se predložio mehanizam adsorpcije WSF dizela na organozeolitu izvedena je adsorpcija pri različitim koncentracijama polutanta, a rezultati su prikazani na slici 4.27. Adsorpciona izoterma je dobijena unošenjem koncentracije kontaminanta u rastvoru nakon postizanja ravnoteže i njene zavisnosti od količine WSF dizela adsorbovane po jedinici težine organozeolita. Organozeolit je pokazao povećanu adsorpciju polutanta sa povećanjem početnih koncentracija, a dobijena je linearna izoterma zahvaljujući povoljnom hidrofobnom okruženju koje su omogućili joni HDTMA surfaktanta na površini organozeolita, što je omogućilo i raspodelu organskih molekula. S toga su eksperimentalni podaci fitovani za linearni oblik izoterme (12) (Daković et al., 2007):

$$C_{ads} = K_d C_{eq} \quad (12)$$

gde je C_{ads} koncentracija polutanta u čvrstoj fazi po jedinici mase organozeolita (mg/g), C_{eq} je ravnotežna koncentracija WSF dizela (mg/L), a K_d je linearni koeficijent adsorpcije (L/g). Za adsorpciju polutanta od strane organozeolita posmatrana je linearna izoterma sa koeficijentom $R^2 = 0,989$, dok je sa nagiba linearne krive izračunati koeficijent raspodele bio 8,8 L/g. Dobijeni maksimalni kapacitet adsorpcije WSF-a od strane organozeolita – 22,2 mg/g, pod primenjenim eksperimentalnim uslovima – ukazuje da je organozeolit izuzetno efikasan adsorbent.



Slika 4.27. Adsorpcione izoterme za adsorpciju WSF-a dizela iz vode na organozeolit

Dobro je poznato da se za adsorpciju manje polarnih molekula na glinama sintetizovanim sa katjonskim surfaktantima koji sadrže kratke alkilne lance (tetrametilamonijum–TMA) obično dobijaju nelinearne izotermalne krive (tipa Langmuir), dok se za gline modifikovane surfaktantima sa dugim alkilnim lancima obično dobijaju linearne izoterme u širokom opsegu koncentracija rastvora. Gline modifikovane surfaktantima sa dugim alkilnim lancima sadrže konglomerate fleksibilnih alkilnih lanaca i stvaraju organsko okruženje pogodno za raspodelu manje polarnih molekula (Park et al., 2011).

Haggerty i Bowman su objavili studiju u kojoj su gline modifikovane kvarternarnim amonijum-jonima, poput HDTMA, značajno poboljšale uklanjanje anjonskih organskih jedinjenja iz vodenih rastvora (Haggerty i Bowman, 1994). Slično tome, zeoliti modifikovani jonima HDTMA bili su efikasni u uklanjanju derivata benzena i hlorovanih alifatičnih molekula iz vodenih rastvora putem raspodele organskih molekula u hidrofobno jezgro nastalo adsorpcijom HDTMA na površini zeolita, a adsorpcija organskih molekula je bila u skladu sa linearnom adsorpcionom izotermom.

Chang i saradnici su proučavali adsorpciju naftalena (predstavnik PAH-ova) na hidrofobni DAY sintetički zeolit pri različitim koncentracijama kontaminanta i zaključili da je linearna adsorpciona izoterma najbolje opisivala proces adsorpcije (Chang et al., 2004).

Ma i Zhu su istraživali adsorpciju fosfata i fenantrena (jedinjenje iz grupe PAH-ova) na mineralu bentonitu modifikovanom sa polikatjonima gvožđa i različitim količinama HDTMA (Ma i Zhu, 2006). Uočili su da adsorpcija fosfata prati nelinearne adsorpcione krive, dok je adsorpcija fenantrena od strane svih adsorbata bila u skladu sa linearnom adsorpcionom izotermom. Koeficijent particije K_d (koji predstavlja opseg procesa raspodele) i količina adsorbovanog fenantrena bili su pod velikim uticajem količine surfaktanta u adsorbentima (Ma i Zhu, 2006).

Kong i saradnici ispitivali su uklanjanje PAH-ova (fenantrena, naftalena i acenaftena) iz vodenog rastvora korišćenjem uglja pripremljenog od stabljike soje (Kong et al., 2011). Eksperimentalni podaci su dobro opisani linearnim modelom adsorpcije, (R^2) > 0,994. Uočili su da, kada se ugalj koristi kao adsorbent, proces adsorpcije uključuje različite interakcije između površine uglja i adsorbata, kao što su Van der Waals-ove sile, elektrostatičke sile i slabe međumolekulske interakcije. Pored toga, hemijska svojstva adsorbata igraju ulogu u procesu adsorpcije; budući da su PAH-ovi nepolarna jedinjenja, za adsorpciju na ispitivani materijal uglavnom su odgovorne hidrofobne interakcije. Zaključili su da na vezivanje PAH-ova utiče nekoliko različitih faktora, kako karakteristike uglja, tako i veličina molekula, molekulska težina i hidrofobna priroda adsorbata.

Egbuchunam i saradnici proučavali su adsorpciju BTEX jedinjenja pomoću organokaolinitnog materijala dobijenog modifikacijom kaolina sa katjonima HDTMA pri različitim početnim koncentracijama polutanta (Egbuchunam et al., 2016). Uočili su da je adsorpcija kontaminanta rasla sa povećanjem početnih koncentracija, a proces adsorpcije je takođe bio opisan linearnom adsorpcionom izotermom. Ukazali su da organofilni glineni materijal ima visok afinitet za uklanjanje jedinjenja BTEX-a iz vodenih rastvora (Egbuchunam et al., 2016).

U studiji iz 2017. Wołowiec i saradnici ispitivali su adsorpciju mešavine BTEX-a (benzen, toluen, etilbenzen i *p*-ksilen) na klinoptilolit (Cp), sintetički zeolit (Na-X), kao i organo-Cp i organo-Na-X (koji sadrže HDTMA u količinama od 100 i 200% od ECEC vrednosti za Cp) (Wołowiec et al., 2017). Adsorpcija je praćena u vodenim rastvorima različitih početnih koncentracija BTEX-a (2,5; 12,5 i 25 ppm). Za Cp i organo-Cp, najviša adsorpcija BTEX-a postignuta je sa organo-Cp koji sadrži HDTMA u količini od 200% od ECEC vrednosti za Cp, a koji je uklonio slične količine etilbenzena (0,61 mg/g) i *p*-ksilena (0,60 mg/g), kao i nešto niže količine toluena (0,59 mg/g) i benzena (0,50 mg/g). Rezultati uklanjanja BTEX-a pomoću Na-X i organo-Na-X-a pokazali su da je organo-Na-X, modifikovan u količini od 100% od ECEC vrednosti za Na-X, efikasniji adsorbent od Na-X koji sadrži HDTMA u količini od 200% od ECEC vrednosti za Na-X. Za organo-Na-X sa 100% ECEC vrednosti, efikasnost uklanjanja BTEX-a povećavala se u sledećem redosledu: benzen (0,54 mg/g) < etilbenzen (0,67 mg/g) < *p*-ksilen (0,69 mg/g) < toluen (0,70 mg/g). Adsorpcija BTEX-a zavisila je od hemijskih osobina organskih jedinjenja, ali i od osobina zeolita (npr. odnos Si/Al, parametri teksture, veličina čestica i ECEC). Autori su naveli da mehanizam adsorpcije BTEX-a uključuje interakciju organskih jedinjenja sa organskim slojem surfaktanta, kao i prodiranje organskog rastvora u mezopore. Na osnovu literature i rezultata iz ovog istraživanja, linearna adsorpciona izoterma sugerise da, s obzirom na to da su većina PAH-ova i BTEX-a (koji su često prisutni u WSF-u) nepolarni, hidrofobni, nejonizovani molekuli, oni lako mogu interagovati sa hidrofobnim površinama minerala.

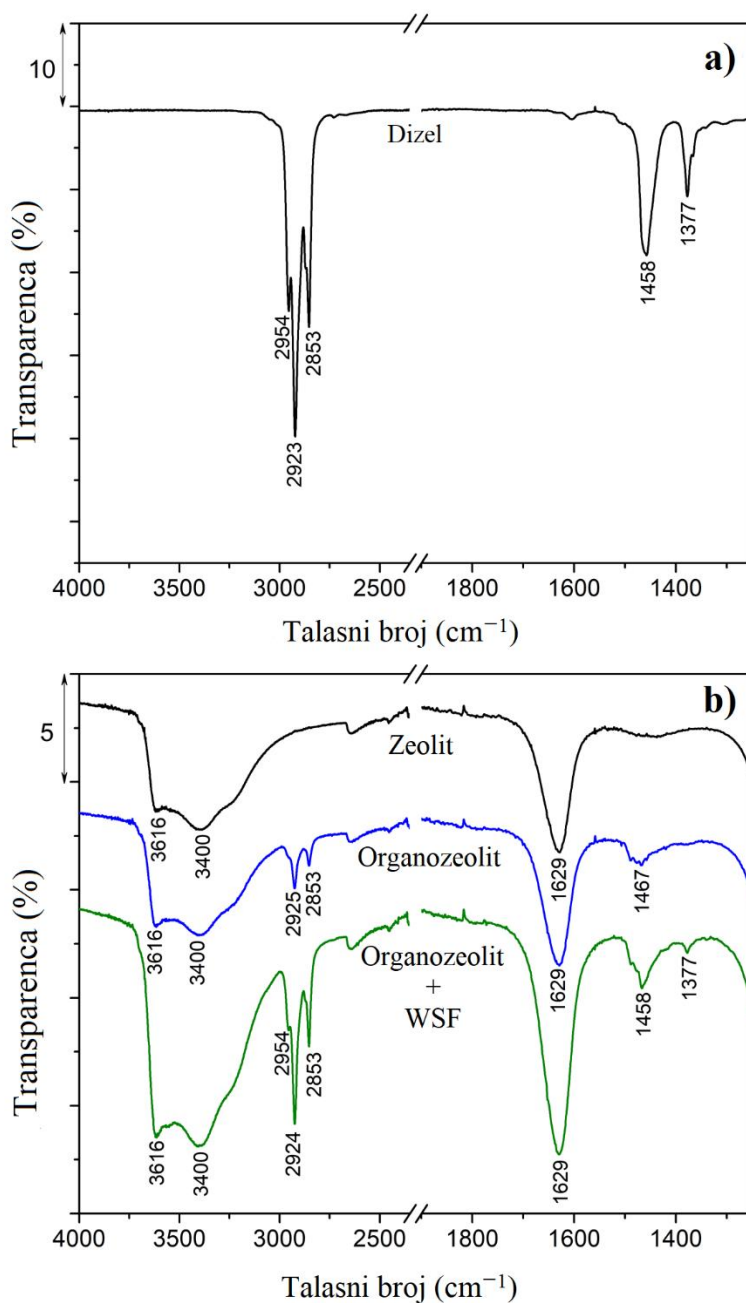
4.2.3. Karakterizacija organozeolita nakon adsorpcije WSF dizela iz kontaminirane vode

4.2.3.1. FTIR analiza

Na slici 4.28. prikazani su FTIR spektri dizela (a), prirodnog zeolita i organozeolita pre i posle adsorpcije WSF dizela iz vode (b). Kako bi se vizualizovale navedene absorpcione trake koje se pojavljuju u FTIR spektrima organozeolita pre i posle adsorpcije WSF dizela, razmatrani su spektralni opsezi od 4000 do 1350 cm^{-1} .

FTIR spektar dizel goriva (slika 4.28a.) pokazao je karakteristične absorpcione trake na 2954 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} i 2853 cm^{-1} , a koje se pripisuju istezanju C–H veza, i absorpcione trake na 1458 cm^{-1} i 1377 cm^{-1} , koje su povezane sa savijanjem C–H veza (Coronado et al., 2017; Maithomklang et al., 2023). Sa slike 4.28b. se vidi da je prirodni zeolit pokazao absorpcione trake na 3616 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} i 1629 cm^{-1} . Trake na 3616 cm^{-1} i 3400 cm^{-1} pripisane su istezanju –OH veza vode apsorbirane u zeolitu (molekuli vode koordinisani sa Na^+ i Ca^{2+} katjonima kako u kanalima, tako i na površini zeolita), međumolekulskim vodoničnim vezama i Si–OH–Al mostovima, dok traka pozicionirana na 1629 cm^{-1} odgovara savijanju molekula H_2O koji okružuju jonoizmenjive katjone u zeolitskoj strukturi (Miądlicki et al., 2021).

U poređenju sa FTIR spektrom prirodnog zeolita, u FTIR spektru organozeolita bile su vidljive absorpcione trake na 2925 cm^{-1} , 2853 cm^{-1} i 1467 cm^{-1} . Pikovi na 2925 cm^{-1} i 2853 cm^{-1} pripisani su asimetričnom i simetričnom istezanju metilenske grupe HDTMA surfaktanta, dok pik na 1467 cm^{-1} potiče od istezanja N-CH₃ veze kvaternarnog amonijačnog dela HDTMA, čime je potvrđena uspešna modifikacija površine prirodnog zeolita jonima surfaktanta (Hamoud et al., 2023). Nakon adsorpcije WSF dizela na površinu organozeolita bili su vidljivi dodatni pikovi, jedan na 2954 cm^{-1} , koji je pripisan istezanju C–H veza, i drugi na 1377 cm^{-1} , koji je povezan sa savijanjem C–H veza. Takođe, intenziteti absorpcionih pikova na 3616 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} i 1629 cm^{-1} su se povećali nakon adsorpcije zagađenja. Najizraženiji pik na 1016 cm^{-1} pripisana je asimetričnom istezanju unutrašnjih TO₄ tetraedra (T = Si⁴⁺ ili Al³⁺) zeolita i bila je prisutna u svim spektrima. To znači da struktura prirodnog zeolita nije promenjena nakon modifikacije surfaktantom i naknadne adsorpcije WSF dizela iz vode. FTIR analiza potvrdila je uspešnu modifikaciju prirodnog zeolita pomoću jona HDTMA i prisustvo zagađujućih jedinjenja iz WSF dizela na površini organozeolita.



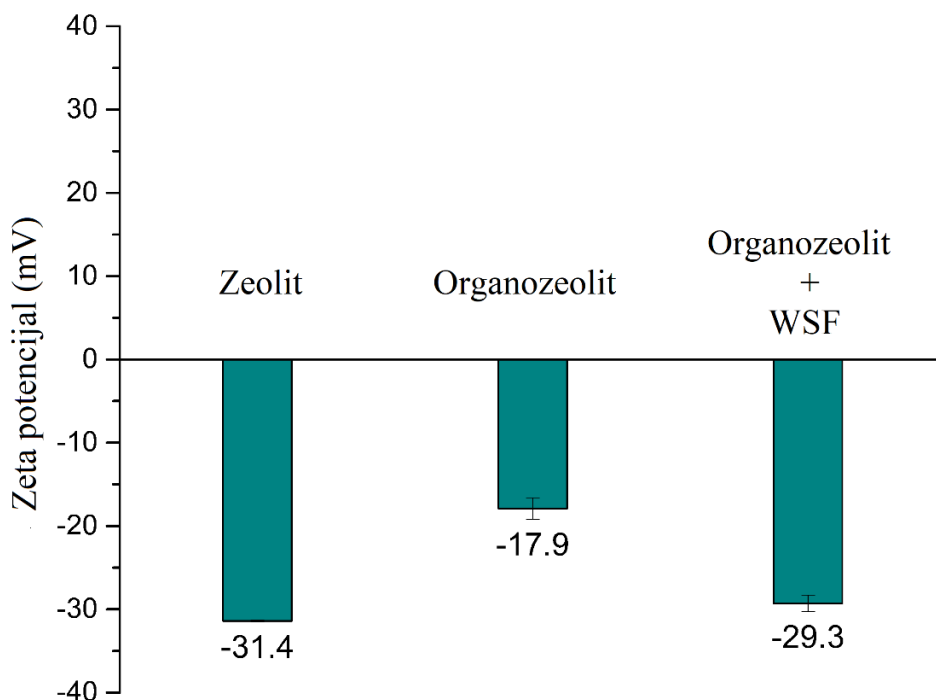
Slika 4.28. FTIR spektri dizela (a), zeolita i organozeolita pre i nakon adsorpcije WSF dizela iz vode (b)

4.2.3.2. Analiza zeta potencijala

Zeta potencijal je odraz površinskog potencijala i menja se u zavisnosti od količine surfaktanta primenjenog za modifikaciju, ukazujući na prelaz između monomolekuskog i bimolekuskog prekrivanja površine organozeolita. Generalno, adsorpcija surfaktanata na površinu zeolita zavisi od količine surfaktanta koji se koristi za modifikaciju. Kada je količina surfaktanta manja od spoljašnjeg kapaciteta za razmenu katjona (ECEC) ili mu je jednaka, formira se monomolekuskuski sloj surfaktanta na površini zeolita. U tom slučaju, površinski naboj se menja sa više negativnog na manje negativan (kada je količina surfaktanta ispod ECEC) ili se približava nuli (kada je količina surfaktanta jednaka ECEC).

Kada količina surfaktanta premaši ECEC vrednost, na površini zeolita formira se bimolekulski sloj surfaktanta, čime se površinski naboj menja sa negativnog na pozitivan. Takođe, ako tokom procesa modifikacije početna koncentracija surfaktanta premaši CMC (kao u ovoj disertaciji), u rastvoru su prisutne micelarne strukture, a može da dođe i do agregacije jona surfaktanta koji formiraju strukturalno neujednačeni dvosloj ili admicelije na površini zeolita, čak i ako je količina surfaktanta ispod ECEC (Krajišnik et al., 2011; Li i Bowman, 1998).

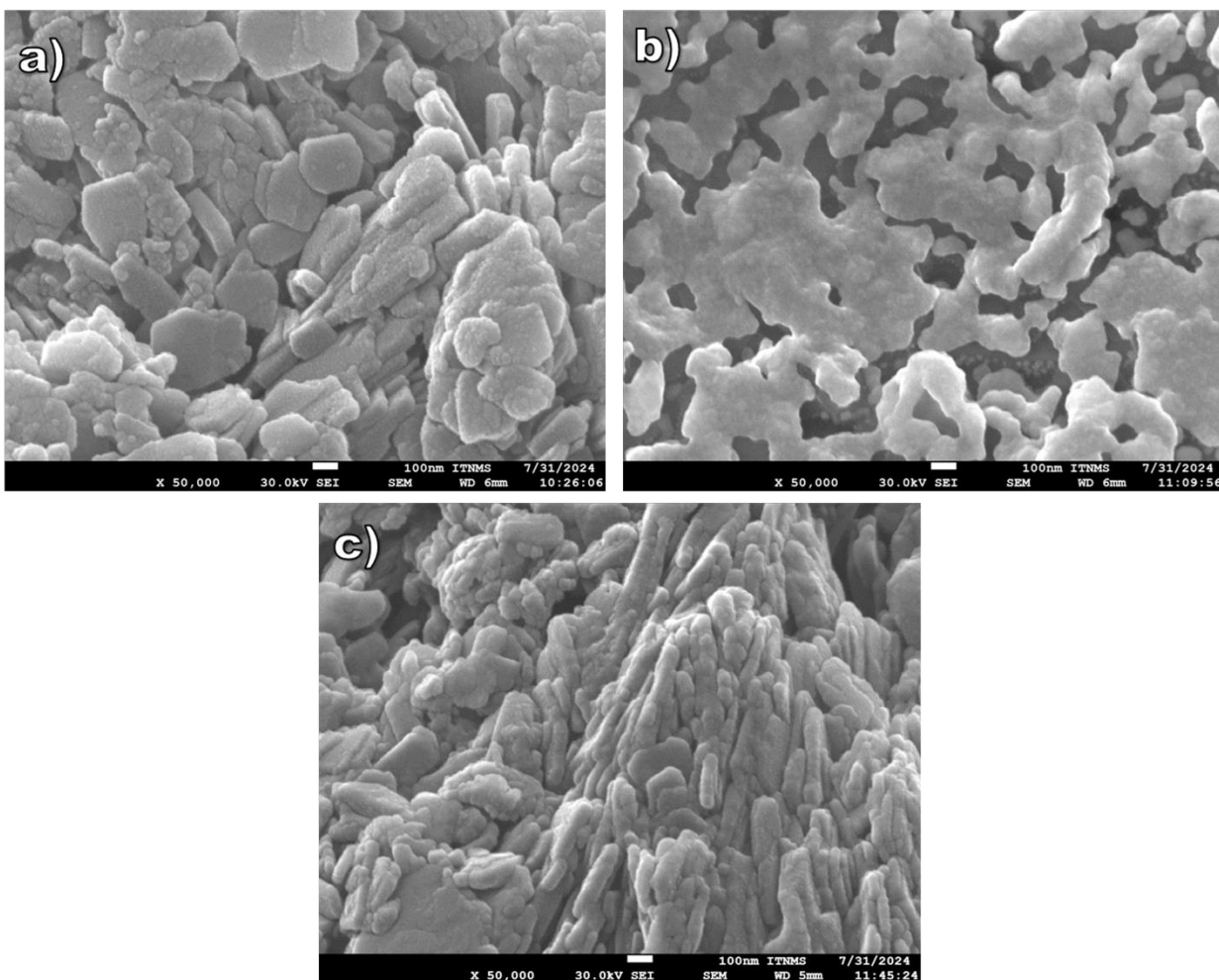
Određeni su zeta potencijali prirodnog zeolita i organozeolita pre i posle adsorpcije zagađujućih supstanci iz WSF dizela, a rezultati su prikazani na slici 4.29. Početni zeta potencijal prirodnog zeolita ($-31,4$ mV) promenio se nakon modifikacije sa jonima HDTMA na manje negativnu vrednost ($-17,9$ mV), što sugeriše postojanje micela HDTMA na površini organozeolita. Nakon adsorpcije WSF dizela, zeta potencijal je ponovo postao negativniji ($-29,3$ mV), što ukazuje na to da su adsorbovani molekuli WSF dizela izazvali promene u površinskom naboju organozeolita, čime je potvrđeno da su ovi molekuli prisutni na površini organozeolita. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature. Satouh i saradnici su merili zeta potencijal montmorilonita (Mt), sintetičkog liskuna (Na-Mica-4) i njihovih modifikovanih oblika sa oktadecilaminom (ODA) i oktadeciltrimetilaminom (ODTMA) (ODA-Mt, ODA-Mica-4, ODTMA-Mt i ODTMA-Mica-4) pre i posle adsorpcije PAH-ova, a pri pH 6,5 (Satouh et al., 2021). Njihovi rezultati su pokazali da su za uzorke montmorilonita (prirodni i modifikovani) nakon adsorpcije PAH-ova zabeležene promene u zeta potencijalu sa $-37,0$ mV (Mt) na $-36,4$ mV, sa $49,3$ mV (ODA-Mt) na $22,9$ mV i sa $27,2$ mV (ODTMA-Mt) na $31,8$ mV. Za uzorke liskuna zeta potencijal pre adsorpcije iznosio je $-28,4$ mV, $39,5$ mV i $54,9$ mV za Na-Mica-4, ODA-Mica-4 i ODTMA-Mica-4, redom, dok su nakon adsorpcije PAH-ova vrednosti porasle na $28,3$ mV, $49,1$ mV i $45,8$ mV za Na-Mica-4, ODA-Mica-4 i ODTMA-Mica-4, redom.



Slika 4.29. Grafički prikaz zeta potencijala za zeolit i organozeolit pre i nakon adsorpcije WSF dizela iz vode

4.2.3.3. SEM analiza

SEM mikrografije prirodnog zeolita i organozeolita pre i posle adsorpcije WSF dizela prikazane su na slici 4.30. Mikroskopska istraživanja prirodnog zeolita pokazala su da se uglavnom javlja u obliku finih kristala. Upoređivanje slika prirodnog zeolita i organozeolita potvrdilo je prisustvo surfaktanta na površinama zeolita. Pošto su joni HDTMA preveliki i ne ulaze u zeolitske kanale, oni su uglavnom bili smešteni na površini zeolita. Ovi joni su ravnomerno prekrili površinu zeolita, postignuvši visoko, ali ne potpuno prekrivanje, formirajući razgranate naslage HDTMA (Obradović et al., 2024).



Slika 4.30. SEM mikrografije zeolita (a), organozeolita (b) i organozeolita+WSF (c) pri uvećanju od 50 000x, sa skalom od 100 nm

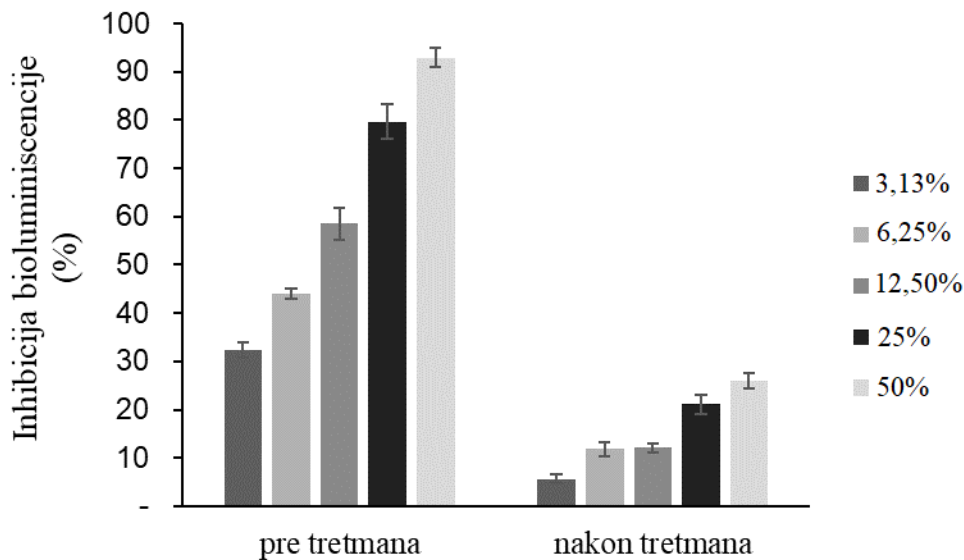
Rasuli i saradnici modifikovali su prirodni klinoptilolit pomoću HDTMA kako bi ispitali adsorpciju nitrata iz vodenih rastvora (Rasuli et al., 2020). Za prirodni zeolit i zeolit modifikovan surfaktantom ispitali su unutrašnju i spoljašnju morfologiju površine putem SEM analize i naglasili da su rezultati pokazali karakterističnu površinu prirodnog klinoptilolita i njegove modifikovane forme sa jonima HDTMA. Potvrdili su da je na površini zeolita formiran organski sloj koji je bio vidljiv u obliku velikih aglomerata na površini organozeolita. Anari-Anaraki i Nezamzadeh-Ejhieh modifikovali su klinoptilolit sa HDTMA, a potom i sa organskim ligandom ditizonom kako bi ispitali uklanjanje olova iz vodenih rastvora (Anari-Anaraki i Nezamzadeh-Ejhieh, 2015). Na SEM mikrografijama klinoptilolita

i klinoptilolita modifikovanog sa HDTMA uočili su da je površina HDTMA-modifikovanog klinoptilolita u spužvastom ili poroznom stanju u poređenju sa originalnim klinoptilolitom. Rezultati su potvrdili da je HDTMA uspešno vezana za površinu klinoptilolita.

U rezultatima koji su predstavljeni u ovoj disertaciji uočljivo je da je, nakon adsorpcije WSF dizela na organozeolit, površina organozeolita postala gotovo potpuno prekrivena. Ovo ukazuje na to da je efikasno modifikovani organozeolit sposoban da u potpunosti interaguje sa komponentama WSF dizela. To znači da su joni HDTMA na površini organozeolita aktivna mesta koja poboljšavaju adsorpciju hidrofobnih supstanci iz WSF dizela.

4.2.3.4. Test ekotoksičnosti

Voda kontaminirana dizelom i dalje predstavlja jedan od najvećih izazova širom sveta, a prema trenutnim podacima dizel gorivo ima toksičan uticaj na žive organizme (Müller et al., 2019), zbog čega je biološko praćenje veoma važno za procenu efikasnosti metoda sanacije. Biološka analiza inhibicije bioluminiscencije bakterije *Aliivibrio fischeri* široko se primenjuje za praćenje toksičnosti. Ovaj test je osetljiv, brz i lak za sprovođenje (Abbas et al., 2018). Nakon procesa adsorpcije na organozeolitu sprovedeni su ekotoksikološki testovi koristeći vodu kontaminiranu dizelom (početnu) i prečišćenu vodu. Rezultati testa akutne ekotoksičnosti na bakteriju *Aliivibrio fischeri* prikazani su na slici 4.31.



Slika 4.31. Ekotoksičnost vode kontaminirane dizelom pre i nakon tretmana organozeolitom

Netretirana voda kontaminirana sa WSF dizela (početna voda) uzrokovala je inhibiciju bioluminiscencije od 57% do 93% pri ispitivanim koncentracijama sa EC_{50} vrednošću od $2,12 \pm 0,03$ mg/L. U prethodnom istraživanju (Lopičić et al., 2021), tretman vode zagađene sa WSF dizela sorpcijom na biougllu od koštice breskve smanjio je inhibiciju bioluminiscencije sa početnih 80% pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji polutanta na oko 30% – 40%, bez obzira na koncentraciju zagađujuće supstance. U analizama predstavljenim u ovoj disertaciji, nakon tretmana organozeolitom, inhibicija bioluminiscencije opala je na oko 6% – 26% pri ispitivanim koncentracijama polutanta. EC_{50} vrednost nakon tretmana adsorpcijom na organozeolitu bila je 70 mg/L prema matematičkom proračunu definisanom u ISO 11348-3 standardu (2007). Ova vrednost premašuje rastvorljivost dizela u vodi, pa možemo sa visokim stepenom sigurnosti tvrditi da je toksičnost za *Aliivibrio fischeri* nakon tretmana

adsorpcijom bila vrlo niska. Rezidualni rastvor nakon adsorpcije WSF dizela na organozeolit nije bio predmet ovog istraživanja, jer su se njime bavili Lopičić i saradnici u njihovom radu (Lopičić et al., 2024). Pokazalo se da je nakon adsorpcije WSF dizela na biougalj od koštica šljive, sadržaj ugljovodonika u vodi smanjen sa 18 na 1,8 mg/L (Lopičić et al., 2024). U drugoj fazi tog istraživanja rezidualni rastvor nakon tretmana adsorpcijom podvrgnut je mikrobiološkom tretmanu. U eksperimentu koji je trajao 19 dana, sadržaj ugljovodonika je smanjen sa 1,8 na 0,46 mg/L (Lopičić et al., 2024). Na taj način problem uklanjanja rastvorne frakcije dizela u vodi mogao bi biti rešen. Iz tog razloga je fokus eksperimenata predstavljenih u ovoj disertaciji na uklanjanju WSF dizela pomoću organozeolita i biodegradaciji adsorbovanog kontaminanta.

4.2.4. Biodegradacija i respiracija

4.2.4.1. Biodegradacija

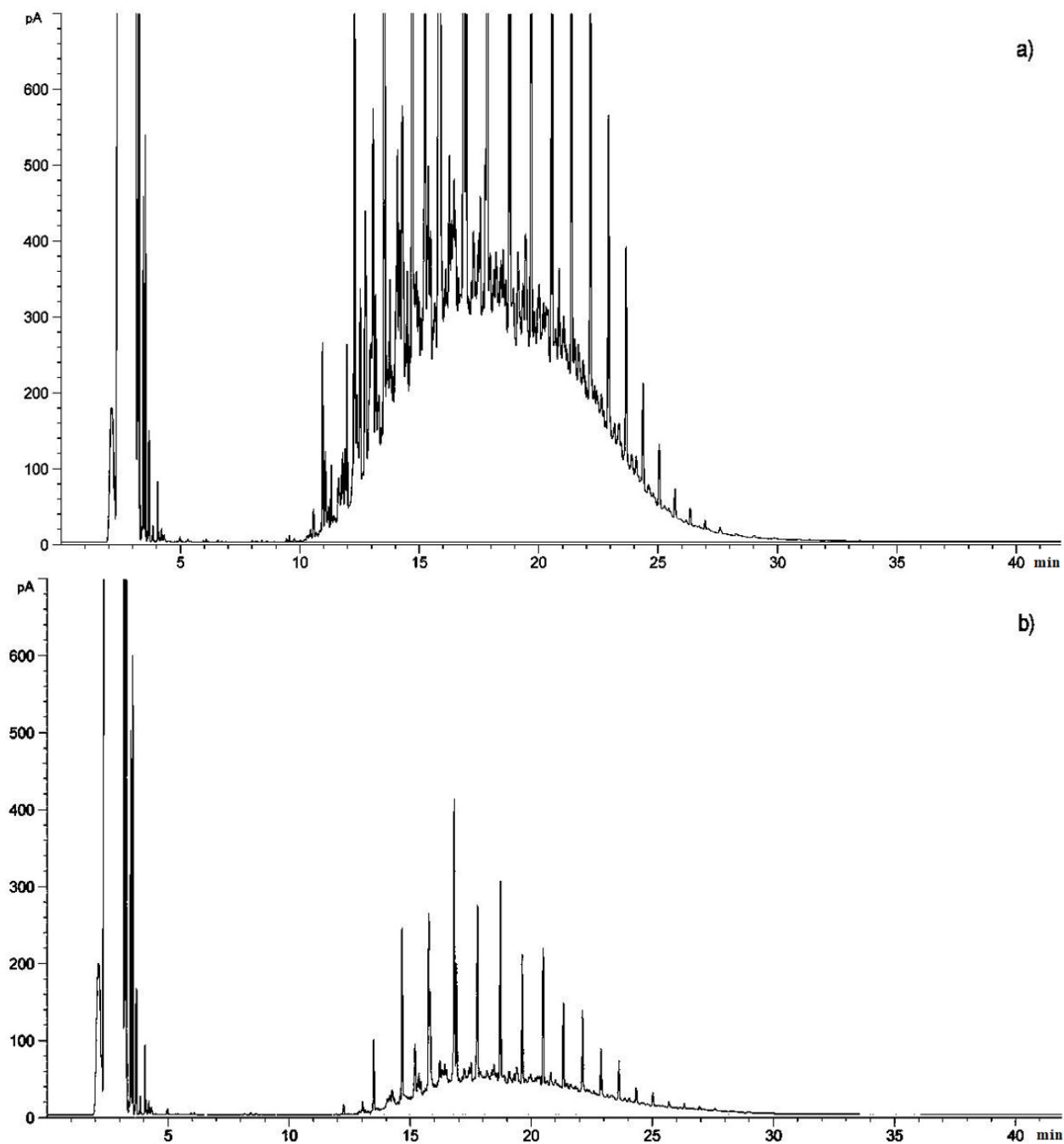
Mikrobna biodegradacija naftnih zagađenja je proces u kom mikroorganizmi koriste organske polutante kao izvor energije, razgrađujući složene ugljovodonike u jednostavnija, manje toksična jedinjenja. Upotreba mikroorganizama u procesu biodegradacije je u konstantnom porastu zbog njihovog ogromnog biodiverziteta i neprevaziđenog kataboličkog potencijala, a njihove sposobnosti za degradaciju su uslovljene kataboličkim genima i enzimima (Khomenkov et al., 2008). Čisti mikrobni sojevi imaju sposobnost da razgrade samo ograničen broj komponenti složenih zagađujućih supstanci, dok mešovite kulture, kao što su mikrobiološke zajednice, omogućavaju viši nivo degradacije (Lopičić et al., 2021). Bioremedijacija je efikasna i ekološki prihvatljiva metoda sanacije.

Kako bi se testirala hipoteza o biodegradaciji zagađenja uzrokovanog dizelom, kao i lanaca ugljovodonika („rep“ surfaktanta) na organozeolitu, sprovedeni su eksperimenti biodegradacije i respiracije. Eksperiment biodegradacije je izveden u laboratorijskim uslovima sa 8 g organozeolita i 180 mg adsorbovanog WSF dizela u 50 mL Ray-ovog medijuma, uz konzorcijum mikroorganizama (*Pseudomonas* sp. CHBE-44 (MT117228.1), *Pseudomonas* sp. CHBE-122 (MT081361.1) i *Achromobacter* sp. CHBE-82 (MT256175.1)). Ovi sojevi su odabrani jer je u početnim istraživanjima ovaj konzorcijum pokazao najveću efikasnost u degradaciji naftnih ugljovodonika. Sadržaj ugljovodonika na početku (a) i na kraju procesa (b) biodegradacije prikazan je na slici 4.32. Rezultati su pokazali da je ispitivani konzorcijum mikroorganizama degradirao 80% WSF dizela.

U prethodnom istraživanju Milić i saradnika proučavana je biodegradacija dizela D2 od strane *Planomicrobium* sp. RNP01 i *Rhodococcus* sp. RNP05. Tokom 20 dana *Rhodococcus* sp. RNP05 je biodegradirao oko 73,5% dizela D2, dok je *Planomicrobium* sp. RNP01 postigao biodegradaciju od 63% (Milić et al., 2024). Varjani i Upasani otkrili su da je *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 tokom 60 dana degradirao 60,63% ugljovodonika dužine lanca C8–C36+ iz sirove nafte (Varjani i Upasani, 2016). S obzirom da je konzorcijum mikroorganizama jedan od ključnih faktora za optimizaciju procesa biodegradacije naftnih zagađenja, može se zaključiti da je visok stepen degradacije u istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji postignut zahvaljujući veoma dobroj selekciji mikroorganizama.

Adsorpcija WSF dizela i biodegradacija pomoću konzorcijuma mikroorganizama je opisana u studiji Lopičić i saradnika (Lopičić et al., 2024). U njihovoj studiji je biodegradacija primenjena samo u drugoj fazi za tretman supernatanta nakon uklanjanja WSF dizela. Naime, u prvoj fazi su izučavali adsorpciju WSF dizela na biouglju koštica šljive. U ovoj fazi je WSF dizela bio veoma efikasno adsorbovan na biougalj (preko 90%), pri čemu je većina aromatičnih komponenti uklonjena, ali je deo alifatičnih jedinjenja i dalje ostao u rastvoru. U drugoj fazi, nakon adsorpcije, konzorcijum mikroorganizama (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. i *Rhodococcus* sp.) je korišćen za uklanjanje alifatičnih

jedinjenja iz supernatanta. Nakon završene biodegradacije ukupna količina WSF dizela je smanjena za 97,5%.



Slika 4.32. Gasni hromatogrami na početku (a) i na kraju (b) procesa biodegradacije WSF dizela

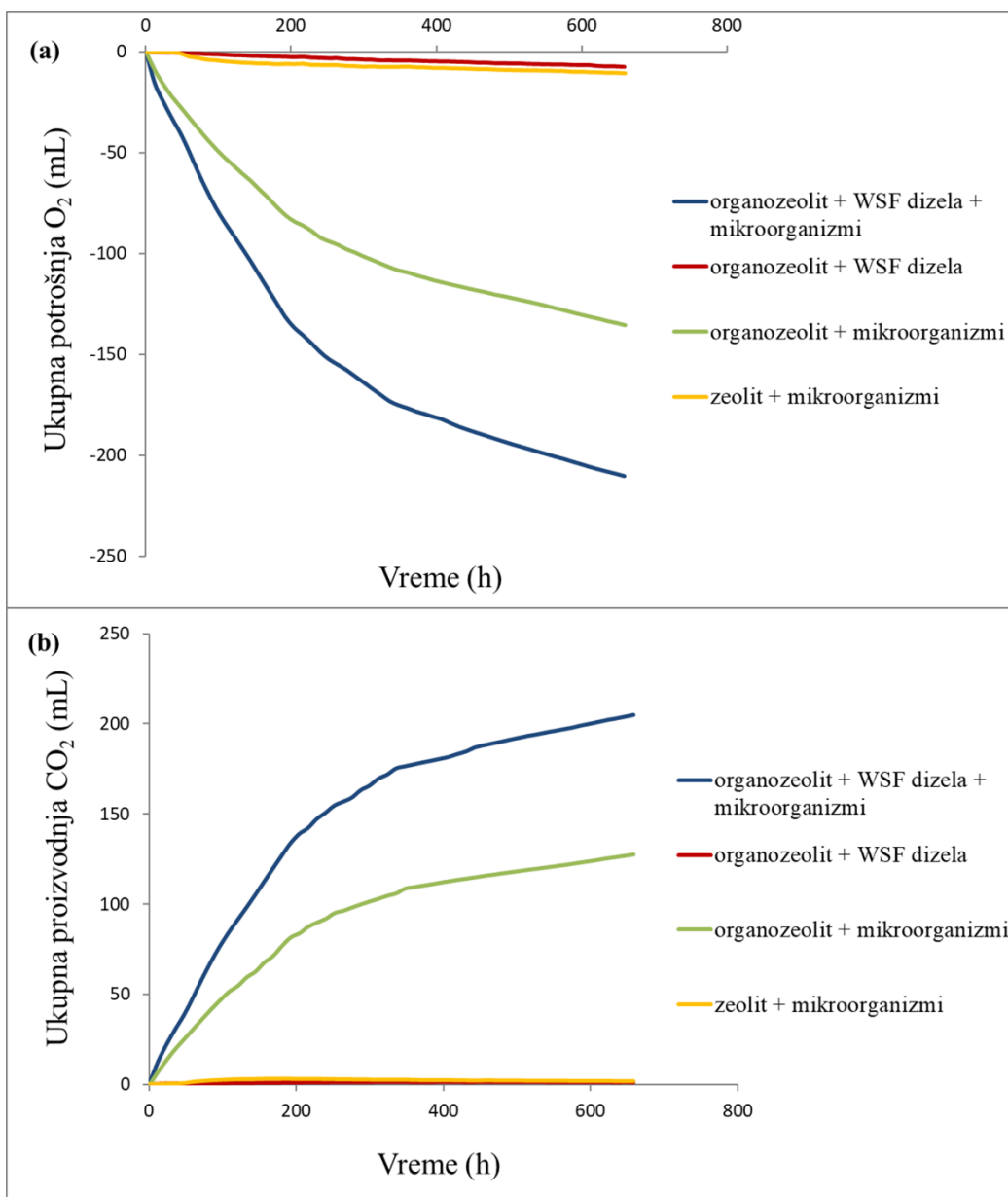
Na kraju procesa biodegradacije broj mikroorganizama bio je 2×10^6 CFU/mL, a što ukazuje na to da organozeolit sa adsorbovanim polutantom nije toksičan supstrat za testirane mikroorganizme. Štaviše, postavljena je hipoteza da bi biodegradacija mogla da se nastavi. Međutim, ovaj rezultat ne

pokazuje da li je došlo do degradacije dugolančanih organskih katjona korišćenih za površinsku modifikaciju zeolita. Iz tog razloga sproveden je i eksperiment respiracije.

4.2.4.2. Respiracija

Kako bi se potvrdilo da odabrani sojevi mogu da razgrade i dugolančane organske katjone sa površine organozeolita, pomoću Micro-Oxymax respirometra praćena je potrošnja kiseonika i proizvodnja ugljen-dioksida od strane konzorcijuma mikroorganizama tokom biodegradacije organozeolita i organozeolita sa adsorbovanim WSF dizela u trajanju od 28 dana. Respirometar je uređaj koji meri respiraciju živih organizama. Heterotrofni mikroorganizmi koriste organske molekule (molekule bogate ugljenikom) kao izvor energije i hranljivih materija. Razgradnjom ovih molekula oslobađa se ugljen-dioksid (CO_2) kao krajnji proizvod njihovih metaboličkih puteva. Količina oslobođenog CO_2 može se koristiti kao indikator mikrobiološke aktivnosti. Rezultati eksperimenta respiracije prikazani su na slici 4.33.

Primećene su razlike u potrošnji kiseonika (O_2) (slika 4.33a.) i proizvodnji ugljen-dioksida (slika 4.33b.) u poređenju sa kontrolama, pri čemu je najveća razlika zabeležena na kraju eksperimenta. Značajne razlike u potrošnji i proizvodnji gasa između kontrole i matriksa inokulisanih bakterijama dovele su do zaključka da su metabolički procesi bili intenzivni u oba inokulisana matriksa i da mikrobn konzorcijum može da koristi i dizel i organozeolit (tj. dugolančane organske katjone sa površine organozeolita) kao izvor ugljenika. Takođe, uočljive su bile razlike u proizvodnji ugljen-dioksida između inokulisanih uzoraka. Objašnjenje za ovo je da u uzorku sa organozeolitom+WSF dizela+mikroorganizmima, mikroorganizmi koriste i WSF dizela i dugolančane organske katjone sa površine organozeolita kao izvore ugljenika, dok u uzorku sa organozeolitom+mikroorganizmima, mogu da koriste samo dugolančane organske katjone (HDTMA).



Slika 4.33. Kumulativna potrošnja kiseonika (a) i proizvodnja ugljen dioksida (b) tokom 28 dana respiracionog eksperimenta

5. Zaključci

U prvom delu disertacije opisan je tehnološki postupak *in situ* bioremedijacije akvifera kontaminiranog naftnim polutantima u kombinovanom procesu biostimulacije i bioaugmentacije korišćenjem zimogenog konzorcijuma mikroorganizama. Sistem za tretman podzemnih voda se sastojao od injekciono-ekstrakcionih bunara povezanih preko FABK ispunjenih adsorbentom, čime je obezbeđena recirkulacija, delimična aeracija i filtracija podzemnih voda. Na osnovu praćenja procesa i dobijenih rezultata, može se zaključiti sledeće:

- ⊗ Iz sedimenta i podzemne vode kontaminirane lokacije izolovani su mikroorganizmi sposobni da degraduju naftne ugljovodonike ($5,6 \times 10^3 - 5,6 \times 10^4$ CFU/g i $4,0 \times 10^3 - 5,2 \times 10^4$ CFU/mL), ali je njihov bioremedijacioni potencijal bio nizak, što je zahtevalo bioaugmentaciju.
- ⊗ Izolovani mikroorganizmi su genotipski okarakterisani izolovanjem genomske DNK, prečišćavanjem fragmenata i njihovim sekvencioniranjem. Na osnovu dobijenih sekvenci (deponovanih u NCBI GenBank) konstruisano je filogenetsko stablo koje odlikava evolutivnu udaljenost sojeva.
- ⊗ Za pripremanje biomase za bioaugmentaciju podzemnih voda korišćeni su mikroorganizmi naftni degraderi izolovani sa kontaminirane lokacije i inokulum za bioaugmentaciju sastojao se od zimogenog konzorcijuma. Brojnost mikroorganizama je praćena i sprovedena je reinokulacija kada bi brojnost pala na oko 10^5 CFU/mL.
- ⊗ Određivanja fizičko-hemijskih parametara podzemnih voda su pokazala da je pH vrednost bila neutralna do blago bazna, što je bilo povoljno za rast mikroorganizama, ali je koncentracija rastvorenog kiseonika bila niska, te je bilo neophodno izvršiti aktivaciju akvifera. U te svrhe je korišćen 30% w/v H_2O_2 . Tokom celog procesa je praćena koncentracija rastvorenog kiseonika i reaktivacija je vršena kada bi njegova koncentracija pala ispod 3 mg/L.
- ⊗ Efikasnost bioremedijacione tehnologije je procenjena praćenjem redukcije sadržaja TPH u sedimentu (tehnikama CG i CGxGC-MS) i podzemnoj vodi (GC analizom). Tokom procesa bioremedijacije, sadržaj ugljovodonika u podzemnoj vodi je značajno smanjen (za oko 98%). Istovremeno je sadržaj naftnih ugljovodonika u sedimentu u okviru zone kontaminacije smanjen za 82,0% ($\pm 1,6\%$). Redosled degradacije pojedinačnih komponenti bio je sledeći: sterani (99,6% $\pm 0,2\%$), izoprenoidi (98,4% $\pm 1,2\%$), derivati benzena (98,4% $\pm 1,2\%$), alkani (97,2% $\pm 2,3\%$) i terpani (49,3 $\pm 2,8\%$).
- ⊗ Tokom celokupnog procesa nivo podzemne vode je varirao između 6 i 9 metara, što je obezbeđivalo kontakt sedimenta sa podzemnom vodom, odnosno kontakt sa mikroorganizmima.
- ⊗ Eksponencijalni model degradacije sa konstantom stepena degradacije β korišćen je da se opiše degradacija naftnih ugljovodonika. Prosečna vrednost β bila je 0,227 (nezavisna od početne koncentracije TPH), dok je najviša vrednost bila na dubinama 8 – 10 m ispod površine. Rezultati dobijeni modelovanjem su pokazali visok stepen podudaranja sa izmerenim vrednostima TPH, iz čega je izvedena hipoteza da ovakav model može biti koristan za određivanje vremena potrebnog za smanjenje sadržaja naftnih ugljovodonika do dozvoljenih vrednosti.
- ⊗ Dosadašnji bioremedijacioni pristupi u prečišćavanju sedimenata kontaminiranih naftnim ugljovodonicima u Srbiji su se zasnivali ili na *ex situ* bioremedijaciji ili na prirodnom smanjenju. Primenjena metodologija industrijske *in situ* bioremedijacije na lokaciji Toplane Novi Beograd, koja se sastojala od istovremenog tretmana podzemnih voda i sedimenta, je bila tehnički i ekonomski prihvatljivija. Pokazalo se da je opisana tehnologija bioremedijacije veoma efikasna u uklanjanju naftnih zagađujućih supstanci iz podzemne vode i sedimenta, koji je u kontaktu sa njom.

U drugom delu doktorske disertacije ispitan je adsorpcioni kapacitet organozeolita (zeolita modifikovanog dugolančanim kvaternarnim amonijumovim solima) za rastvornu frakciju dizela, kao i procena biodegradacionog potencijala konzorcijuma mikroorganizama (izolovanih u prvoj fazi istraživanja) za degradaciju adsorbovane zagađujuće supstance. Postavljena je hipoteza da će konzorcijum, pored adsorbovanih jedinjenja, razgraditi i dugolančane molekule kvaternarnih amonijumovih soli, pa će rezultat biti uklonjeni polutant i regenerisani zeolit koji se dalje može ponovo modifikovati. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti sledeće:

- ⊗ XRDP analiza zeolita korišćenog za sintezu organozeolita je pokazala da je ovaj polazni materijal po sastavu 80% klinoptilolit sa malim količinama feldspata, kvarca i piritu.
- ⊗ Amonijum hloridnom metodom je određen CMC polaznog zeolita koji je iznosi 139 meq/100 g, dok je metodom Ming-a i Dixon-a određen ECEC kapacitet od 10 meq/100 g.
- ⊗ Za modifikaciju površine zeolita (odnosno sintezu organozeolita) korišćena je katjonska amonijumova so HDTMA-Br u količini ekvivalentnoj 100% ECEC vrednosti prirodnog zeolita, odnosno u koncentraciji od 18,2 mmol/L. Ova koncentracija je deset puta veća od CMC za HDTMA (1,8 mmol/L). Analizom ukupne količine oslobođenih katjona sa spoljašnje površine zeolita i poređenjem sa ECEC vrednošću prirodnog zolita ustanovljeno je da je došlo do skoro potpune razmene jona.
- ⊗ Uspešnost modifikacije prirodnog zeolita jonima HDTMA procenjena je poređenjem FTIR spektara rastvora HDTMA u vodi sa FTIR sprektrom supernatanta nakon modifikacije zeolita. Vibracione trake čistog HDTMA na 2850 cm^{-1} i 2920 cm^{-1} bile su blago vidljive u supernatantu, što potvrđuje uspešnost modifikacije.
- ⊗ DSC i TG krive su pokazale da je gubitak mase u prirodnom zeolitu na nižim temperaturnim opsezima ($30 - 220\text{ }^{\circ}\text{C}$) posledica gubitka fizički adsorbovane vode, dok se na višim temperaturama ($220 - 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$) postepeno gubi voda koordinisana sa hidratizovanim neorganskim katjonima. Gubitak mase organozeolita na nižim temperaturnim opsezima verovatno potiče od desorpcije slabije vezanih molekula HDTMA iz micela, dok na višim temperaturama gubitak mase odgovara oksidaciji jona surfaktanta i gubitku koordinisane vode iz kanala zeolita. Gubitak mase modifikovanog zeolita bio je za $\approx 3\%$ veći u odnosu na prirodni zeolit, što potvrđuje prisustvo surfaktanta u organozeolitu.
- ⊗ Studije adsorpcije sprovedene serijskim ponavljanjima sa 25 mg/L WSF-a dizela u vodi pokazale su da je adsorpcija zagađujuće supstance na organozeolit bila u početku veoma brza i da je većina (83,6%) adsorbovana u prvih 7,5 minuta. Adsorpcija je potom usporena sve dok nije dostignuta ravnoteža ($\approx 90\%$ zagađujuće supstance je adsorbovano) u roku od 60 minuta. Maksimalna količina adsorbovane frakcije dizela bila je 22,2 mg/g.
- ⊗ Analizom podataka dobijenih u eksperimentu adsorpcije WSF dizela iz kontaminirane vode na organozeolit utvrđeno je da kinetika adsorpcije odgovarala kinetičkom modelu pseudo-drugog reda, sugerišući da bi hemisorpcija mogla biti korak koji određuje brzinu procesa adsorpcije dizela. Ravnotežni podaci adsorpcije odgovarali su linearnoj izotermi.
- ⊗ FTIR analizom dizela, prirodnog zeolita i organozeolita pre i posle adsorpcije WSF dizela pokazalo se da su u FTIR spektru organozeolita bile prisutne nove absorpcione trake na 2925 cm^{-1} , 2853 cm^{-1} i 1467 cm^{-1} koje nisu bile vidljive kod prirodnog zeolita, što dodatno govori u prilog uspešnoj modifikaciji. Nakon adsorpcije dizela na organozeolit u FTIR spektru su bile uočljive absorpcione trake na 2954 cm^{-1} i 1377 cm^{-1} (vidljive u FTIR spektru dizela) koje nisu

- bile prisutne u organozeolitu pre adsorpcije, što je podatak koji potvrđuje prisustvo dizela na organozeolitu, odnosno uspešnu adsorpciju.
- ⊗ Određivanjem zeta potencijala uočeno je njegova promena od $-31,4$ mV kod prirodnog zeolita, $-17,9$ mV kod zeolita modifikovanog sa HDTMA, te ponovo na negativniju vrednost od $-29,3$ mV nakon adsorpcije dizela.
 - ⊗ SEM analizom je utvrđena promena na površini zeolita, kako nakon modifikacije pomoću HDTMA, tako i nakon adsorpcije dizela na organozeolit, što je dodatno potvrdilo uspešnu modifikaciju prirodnog zeolita i adsorpciju dizela.
 - ⊗ Test ekotoksičnosti metodom biološke analize inhibicije bioluminiscencije bakterije *Aliivibrio fischeri* sproveden je korišćenjem vode kontaminirane dizelom i prečišćene vode (nakon adsorpcije zagađujuće supstance na organozeolit). Rezultati su pokazali da je kontaminirana voda uzrokovala inhibiciju bioluminiscencije od 57% do 93% pri ispitivanim koncentracijama sa EC50 vrednošću od $2,12 \pm 0,03$ mg/L, dok je inhibicija bioluminiscencije prečišćene vode opala na oko 6%–26% pri ispitivanim koncentracijama zagađujuće supstance.
 - ⊗ Nakon adsorpcije, sproveden je eksperiment biodegradacije u šaržnom sistemu korišćenjem konzorcijuma mikroorganizama sastavljenog od sojeva *Pseudomonas* sp. CHBE-44, *Pseudomonas* sp. CHBE-122 i *Achromobacter* sp. CHBE-82 izolovanih u prvom delu doktorske disertacije. Eksperiment je trajao 15 dana i pokazao da je ispitivani konzorcijum mikroorganizama degradovao 80% adsorbovane WSF dizela. Dodatne respirometrijske analize su pokazale da paralelno sa degradacijom polutanta, dolazi i do degradacije dugolančanih HDTMA jona na površini organozeolita. Ovo ukazuje na visoku efikasnost konzorcijuma mikroorganizama u degradaciji testirane zagađujuće supstance.
 - ⊗ Ova preliminarna studija potvrdila je zadatu hipotezu: biodegradacija dizela ne može se vršiti nezavisno od biodegradacije organozeolitnog adsorbenta, jer se dugolančani organski katjoni koji se koriste za površinsku modifikaciju prirodnog zeolita takođe mikrobiološki razlažu. Ovaj tretman kombinuje hemijske i biološke procese, a krajnji rezultat je uklanjanje zagađenja i regenerisani materijal spreman za ponovnu upotrebu (zeolit). Adsorbenti koji su predmet ove studije su netoksični, mogu se regenerisati i imaju visoku efikasnost u adsorpciji WSF dizela.

6. Literatura

- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-Ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar G.A., Asif Tahir, M., Iqbal, M., **2018**. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment* 626, 1295-1309. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066>.
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., **2016**. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25, 107-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Adedeji, J.A., Tetteh, E.K., Opoku Amankwa, M., Asante-Sackey, D., Ofori-Frimpong, S., Armah, E.K., Rathilal, S., Mohammadi, A.H., Chetty, M., **2022**. Microbial bioremediation and biodegradation of petroleum products – A mini review. *Applied Sciences* 12, 12212. <https://doi.org/10.3390/app122312212>.
- Adeola, A.O., Forbes, P.B.C., **2020**. Assessment of reusable graphene wool adsorbent for the simultaneous removal of selected 2–6 ringed polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution. *Environmental Technology* 48, 1255–1268. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1824024>.
- Afzal, M., Rehman, K., Shabir, G., Tahseen, R., Ijaz, A., Hashmat, A., Brix, H., **2019**. Large-scale remediation of oil-contaminated water using floating treatment wetlands. *npj Clean Water* 2, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0025-7>.
- Al-Majed, A.A., Adebayo, A.R., Hossain, M.E., **2012**. A sustainable approach to controlling oil spills. *Journal of Environmental Management* 113, 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.034>.
- Aloulou, H., Ghorbel, A., Aloulou, W., Ben Amar, R., Khemakhem, S., **2019**. Removal of fluoride ions (F⁻) from aqueous solutions using modified Turkish zeolite with quaternary ammonium. *Environmental Technology* 42, 1353-1365. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1668863>.
- Álvarez-Coronel, G., Domínguez-Rodríguez, V.I., Ovando-García, N., Adams, R.H., **2021**. Stabilization and solidification technology for treating heavy oil-contaminated sediments. *International Journal of Environmental Science and Technology* 19, 1437–1446. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03200-w>.
- Amiri, F., Yaghmaei, S., Samiei, S., **2007**. Application of bioaugmentation technology to improve the activated sludge treatment process in removal of aromatic compounds. *Iranian Journal of Chemical Engineering* 4, 43–53.
- Anari-Anaraki, M., Nezamzadeh-Ejhieh, A., **2015**. Modification of an Iranian clinoptilolite nanoparticles by hexadecyltrimethyl ammonium cationic surfactant and dithizone for removal of Pb(II) from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* 440, 272-281. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.017>.
- APHA, **2018**. 9020 Quality assurance/Quality control. In: Lipps, W.C., Baxter, T.E., Braun-Howland, E. (Eds.), Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd Ed. Washington DC: APHA Press. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.180>.
- Arinze, E.E., Ekwueme, B.N., Ekeleme, A.C., **2022**. The effect of soil particle sizes on bioremediation efficiency of petroleum contaminated soils. *Soil and Sediment Contamination* 32, 274-286. <https://doi.org/10.1080/15320383.2022.2079609>.
- Asante-Sackey, D., Rathilal, S., Tetteh, E.K., Armah, E.K., **2022**. Membrane bioreactors for produced water treatment: A mini-review. *Membranes* 12, 275. <https://doi.org/10.3390/membranes12030275>
- Atlas, R.M., **2010**. Handbook of microbiological media, 4th Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Washington, D.C., Boca Raton, Florida.
- Avdalović, J., Đurić, A., Miletić, S., Ilić, M., Milić, J., Vrvic, M.M., **2016**. Treatment of a mud pit by bioremediation. *Waste Management and Research* 34, 734–739.

<https://doi.org/10.1177/0734242X16652961>.

- Ayawei, N., Ebelegi, A.N., Wankasi, D., **2017**. Modelling and interpretation of adsorption isotherms. *Journal of Chemistry* 2017, 11. <https://doi.org/10.1155/2017/3039817>.
- Bacosa, H.P., Ancla, S.M.B., Arcadio, C.G.L.A., Dalogdog, J.R.A., Ellos, D.M.C., Hayag, H.D.A., Jarabe, J.G.P., Karim, A.J.T., Navarro, C.K.P., Palma, M.P.I., Romarate, R.A., II, Similatan, K.M., Tangkion, J.A.B., Yurong, S.N.A., Mabuhay-Omar, J.A., Inoue, C., Adhikari, P.L., **2022**. From surface water to the deep sea: A review on factors affecting the biodegradation of spilled oil in marine environment. *Journal of Marine Science and Engineering* 10, 426. <https://doi.org/10.3390/jmse10030426>.
- Bandura, L., Wozuk, A., Kołodyńska, D., Franus, W., **2017**. Application of mineral sorbents for removal of petroleum substances: A review. *Minerals* 7, 37. <https://doi.org/10.3390/min7030037>.
- Befkadu, A.A., Chen, Q., **2018**. Surfactant-enhanced soil washing for removal of petroleum hydrocarbons from contaminated soils: A review. *Pedosphere* 28, 383–410. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60027-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60027-X).
- Benkli, Y.E., Can, M.F., Turan, M., Celik, M.S., **2005**. Modification of organo-zeolite surface for the removal of reactive azo dyes in fixed-bed reactors. *Water Research* 39, 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.10.008>.
- Beškoski, V.P., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., Šolević, T., Vrvic, M.M., **2011**. *Ex situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment. *Chemosphere* 83, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>.
- Bianco, F., Monteverde, G., Race, M., Papirio, S., Esposito, G., **2020**. Comparing performances, costs and energy balance of *ex situ* remediation processes for PAH-contaminated marine sediments. *Environmental Science and Pollution Research International* 27, 19363–19374. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08379-y>.
- Blackburn, J.W., Hafker, W.R., **1993**. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Trends in Biotechnology* 11, 328–333. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90155-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90155-3).
- Boll, M., Estelmann, S., Heider, J., **2018**. Anaerobic degradation of hydrocarbons: Mechanisms of hydrocarbon activation in the absence of oxygen. In: Boll, M. (Ed.), *Anaerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33598-8_2-1.
- Boopathy, R., **2000**. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74, 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3).
- Bouwer, H., **2002**. Artificial recharge of groundwater: hydrogeology and engineering. *Hydrogeology Journal* 10, 121–142. <https://doi.org/10.1007/s10040-001-0182-4>.
- Bulatović, S., Marić, N., Šolević-Knudsen, T., Avdalović, J., Ilić, M., Jovančičević, B., Vrvic, M.M., **2020**. Bioremediation of groundwater contaminated with petroleum hydrocarbons applied at a site in Belgrade (Serbia). *Journal of the Serbian Chemical Society* 85, 1067–1081. <https://doi.org/10.2298/JSC191023003B>.
- Campo, P., Venosa, A.D., Suidan, M.T., **2013**. Biodegradability of Corexit 9500 and dispersed South Louisiana crude oil at 5 and 25 °C. *Environmental Science and Technology* 47, 1960–1967. <https://doi.org/10.1021/es303881h>
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., **2013**. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology* 63, 417–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>.
- Chang, C.-F., Chang, C.-Y., Chen, K.-H., Tsai, W.-T., Shie, J.-L., Chen, Y.-H., **2004**. Adsorption of naphthalene on zeolite from aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* 277, 29–

34. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.04.022>.
- Chen, W., Kong, Y., Li, J., Sun, Y., Min, J., Hu, X., **2020**. Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. *International Biodeterioration and Biodegradation* 154, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105047>.
- Cho, K., Myung, E., Kim, H., Purev, O., Park, C., Choi, N., **2020**. Removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil through microwave irradiation. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 5952. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165952>.
- Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M., Falkinham, J.O., **2004**. Collins and Lyne's microbiological methods, 8th Ed. Arnold, London.
- Coronado, M.A., Montero, G., García, C., Valdez, B., Ayala, R., Pérez, A., **2017**. Quality assessment of biodiesel blends proposed by the new Mexican policy framework. *Energies* 10, 631. <https://doi.org/10.3390/en10050631>.
- Cui, F., Daskiran, C., King, T., Robinson, B., Lee, K., Katz, J., Boufadel, M.C., **2020**. Modeling oil dispersion under breaking waves. Part I: Wave hydrodynamics. *Environmental Fluid Mechanics* 20, 1527–1551. <https://doi.org/10.1007/s10652-020-09753-7>.
- Daccò, C., Girometta, C., Asemoloye, M.D., Carpani, G., Picco, A.M., Tosi, S., **2020**. Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 147, 104866. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104866>.
- Daković, A., Matijašević, S., Rottinghaus, G.E., Dondur, V., Pietrass, T., Clewett, C.F.M., **2007**. Adsorption of zearalenone by organomodified natural zeolitic tuff. *Journal of Colloid and Interface Science* 311, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.02.033>.
- Danehpash, S., Farshchi, P., Roayaei, E., Ghoddousi, J., Hassani A.H., **2018**. An eco-friendly process for removal of environmental pollutants in water and wastewater: A review. *Journal Of Biochemical Technology* 2, 50-58.
- Das, N., Chandran, P., **2011**. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International* 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
- Desai, A.M., Autenrieth, R.L., Dimitriou-Christidis, P., McDonald, T.J., **2008**. Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505. *Biodegradation* 19, 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9129-3>.
- Díaz, M.P., Boyd, K.G., Grigson, S.J., Burgess, J.G., **2002**. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 145–153. <https://doi.org/10.1002/bit.10318>.
- Dokmanović, P., **2021**. Osnovi hidrogeologije. Rudarsko-geološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, pp. 66-105.
- Dolanc, I., Ferhatović Hamzić, L., Orct, T., Micek, V., Šunić, I., Jonjić, A., Jurasović, J., Missoni, S., Čoklo, M., Pavelić, S.K., **2023**. The impact of long-term clinoptilolite administration on the concentration profile of metals in rodent organisms. *Biology* 12, 193. <https://doi.org/10.3390/biology12020193>.
- Egbuchunam, T.O., Obi, G., Okieimen, F.E., Tihminlioglu, F., **2016**. Removal of BTEX from aqueous solution using organokaolinite. *International Journal of Applied Environmental Sciences* 11, 505–513.
- European Commission: Directorate-General for Environment, **2008**. Groundwater protection in Europe – The new groundwater Directive – consolidating the EU regulatory framework, Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2779/84304>.

- European Commission: Directorate-General for Environment, **2017**. EU Soil Strategy for 2030 – Reaping the benefits of healthy soils for people, food, nature and climate, Publications Office. https://environment.ec.europa.eu/publications/eu-soil-strategy-2030_en.
- European Union, **2000**. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Official Journal of the European Union L327, 1-73.
- European Union, **2008**. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union L348, 84–97.
- European Union, **2013**. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union L226, 1-17.
- Ewis, D., Mahmud, N., Benamor, A., Ba-Abbad, M.M., Nasser, M., El-Naas, M., **2022**. Enhanced removal of diesel oil using new magnetic bentonite-based adsorbents combined with different carbon sources. *Water, Air, and Soil Pollution* 233, 195. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05641-6>.
- Felsenstein, J., **1985**. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Garbisu, C., Garaiurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., Alkorta, I., **2017**. Plasmid-mediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Frontiers in Microbiology* 8, 1966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01966>.
- Gojgić-Cvijović, G.D., Milić, J.S., Šolević, T.M., Beškoski, V.P., Ilić, M.V., Đokic, L.S., Narančić, T.M., Vrvic, M.M., **2012**. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation* 23, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9481-1>.
- Gu, J.-D., **2003**. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52, 69–91. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00177-4).
- Gu, J.-D., **2016**. Biodegradation testing: so many tests but very little new innovation. *Applied Environmental Biotechnology* 1, 92. <https://doi.org/10.18063/AEB.2016.01.007>.
- Gupta, P.K., Gandhi, M., **2023**. Bioremediation of organic pollutants in soil–water system: A Review. *BioTech* 12, 36. <https://doi.org/10.3390/biotech12020036>.
- Hackbusch, S., Noirungsee, N., Viamonte, J., Sun, X., Bubenheim, P., Kostka, J.E., Müller, R., Liese, A., **2020**. Influence of pressure and dispersant on oil biodegradation by a newly isolated *Rhodococcus* strain from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 150, 110683. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110683>.
- Haggerty, G.M., Bowman, R.S., **1994**. Sorption of chromate and other inorganic anions by organo-zeolite. *Environmental Science and Technology* 28, 452-458. <https://doi.org/10.1021/es00052a017>.
- Hammershøj, R., Birch, H., Redman, A.D., Mayer, P., **2019**. Mixture effects on biodegradation kinetics of hydrocarbons in surface water: Increasing concentrations inhibited degradation whereas multiple substrates did not. *Environmental Science and Technology* 53, 3087–3094. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00638>.
- Hamoud, M.A., Abo-Zahra, S.F., Attia, M.A., Someda, H.H., Mahmoud, M.R., **2023**. Efficient adsorption of cesium cations and chromate anions by one-step process using surfactant-modified zeolite. *Environmental Science and Pollution Research International* 30, 53140–53156.

- <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25644-y>.
- Harms, H., **2011**. Bioavailability and bioaccessibility as key factors in bioremediation. In: Murray, Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Ed. Academic Press, pp. 83-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00367-6>.
- Hasanzadeh, R., Souraki, B.A., Pendashteh, A., Khayati, G., Ahmadun, F.-R., **2020**. Application of isolated halophilic microorganisms suspended and immobilized on walnut shell as biocarrier for treatment of oilfield produced water. *Journal of Hazardous Materials* 400, 123197. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123197>
- Hazen, T.C., **2010**. In Situ: Groundwater Bioremediation. In: Timmis, K.N., (Ed.), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2583–2596. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_191
- Hedayati, M.S., Li, L.Y., **2020**. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous media using modified clinoptilolite. *Journal of Environmental Management* 273, 111113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111113>.
- Ho, Y.S., McKay, G., **1998**. A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. *Process Safety and Environmental Protection* 76, 332-340. <https://doi.org/10.1205/095758298529696>
- Hoang, A., Pham, V.V., Duong, N., Huu Du, N., Viet, P., Nguyen, D., **2018**. A report of oil spill recovery technologies. *International Journal of Applied Engineering Research* 13, 4915–4928.
- Holmquist, J.K., Decterov, T., **2019**. Practical reasons for encouraging more widespread use of bioaugmentation. *Industrial Biotechnology* 15, 45–47. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.29163.jkh>.
- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H., **2009**. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1519–1528. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0044-0>.
- Husseiny, S., Elgiddawy, N., El-Sayyad, G.S., El Rouby, W.M.A., **2023**. Recent advances in microbial biodegradation. In: Ali, G.A.M., Makhlof, A.S.H. (Eds.), *Handbook of Biodegradable Materials*. Springer, Cham., pp. 111-136. https://doi.org/10.1007/978-3-031-09710-2_3.
- Imron, M.F., Kurniawan, S.B., Ismail, N.I., Abdullah, S.R.S., **2020**. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. *Journal of Cleaner Production* 251, 119716. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119716>.
- ISO 11348-3, **2007**. International standard: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Geneva.
- ISO 16703, **2004**. Soil quality - Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography. Geneva.
- ISO 18400-102, **2017**. Soil quality - Sampling - Part 102: Selection and application of sampling techniques.
- ISO 5667-1, **2006**. Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques.
- ISO 5667-12, **2006**. Water quality - Sampling - Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments from rivers, lakes and estuarine areas.
- ISO 9377-2, **2000**. Water quality - Determination of hydrocarbon oil index - Part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography. Geneva.
- Jaiswal, S., Shukla, P., **2020**. Alternative strategies for microbial remediation of pollutants via synthetic biology. *Frontiers in Microbiology* 11, 808. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00808>.
- Ji, J.-H., Liu, Y.-F., Zhou, L., Mbadinga, S.M., Pan, P., Chen, J., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Sand, W., Gu, J.-D., Mu, B.-Z., **2019**. Methanogenic degradation of long *n*-alkanes requires fumarate-dependent

- activation. *Applied and Environmental Microbiology* 85, e00985-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00985-19>.
- Joye, S.B., Teske, A.P., Kostka, J.E., **2014**. Microbial dynamics following the Macondo oil well blowout across Gulf of Mexico environments. *Bioscience* 64, 766–777. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu121>.
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E.M., Kamaraj, M., Assefa, F., **2021**. Factors influencing the bacterial bioremediation of hydrocarbon contaminants in the soil: mechanisms and impacts. *Journal of Chemistry* 9823362, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>.
- Kästner, M., **2002**. Parameter und Methoden zur Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden. In: Michels, J., Track, T., Gehrke, U., Sell, D. (Eds.), Leitfaden - Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Umweltbundesamt (UBA), Berlin, pp. 191 – 234.
- Kehew, A.E., Lynch, P.M., **2011**. Concentration trends and water-level fluctuations at underground storage tank sites. *Environmental Earth Sciences* 62, 985–998. <https://doi.org/10.1007/s12665-010-0583-6>.
- Khalid, F.E., Lim, Z.S., Sabri, S., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., Ahmad, S.A., **2021**. Bioremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: A Review and bibliometric analysis. *Journal of Marine Science and Engineering* 9, 155. <https://doi.org/10.3390/jmse9020155>.
- Khan, M.A.I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., Megharaj, M., **2018**. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil: A review. *Chemosphere* 212, 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094>.
- Khomenkov, V.G., Shevelev, A.B., Zhukov, V.G., Zagustina, N.A., Bezborodov, A.M., Popov, V.O., **2008**. Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биодegradации ксенобиотиков у микроорганизмов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология* 44, 117–135. <https://doi.org/10.1134/S0003683808020014>.
- Knightes, C.D., Peters, C.A., **2006**. Multisubstrate biodegradation kinetics for binary and complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1746. <https://doi.org/10.1897/05-483R.1>.
- Kong, H., He, J., Gao, Y., Han, J., Zhu, X., **2011**. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution on soybean stalk-based carbon. *Journal of Environmental Quality* 40, 1737–1744. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0343>.
- Kordala, N., Wyszowski, M., **2024**. Zeolite properties, methods of synthesis, and selected applications. *Molecules* 29, 1069. <https://doi.org/10.3390/molecules29051069>.
- Krajišnik, D., Daković, A., Milojević, M., Malenović, A., Kragović, M., Bogdanović, D.B., Dondur, V., Milić, J., **2011**. Properties of diclofenac sodium sorption onto natural zeolite modified with cetylpyridinium chloride. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.024>.
- Krmpotić, M., Nešković, D., Tadić, D., **2015**. Elaborat o izvedenim modelskim ispitivanjima stanja zagađenja akvifera naftnim derivatima na lokaciji TO Novi Beograd. In: Vrvić, M.M., Miletić, S., Jovančičević, B. (Eds.), Izveštaj br. 618/1: Detaljna ispitivanja zemljišta kontaminiranog ugljovodonicima naftnog porekla na Toplani Novi Beograd (Istraživanja hidrohemijskih, pedohemijskih i geohemijskih procesa, kao i biohemijskih i geomikrobioloških interakcija u podzemnim i površinskim vodama i zemljištu), Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., **2018**. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Laczi, K., Erdeiné Kis, Á., Szilágyi, Á., Bounedjoun, N., Bodor, A., Vincze, G.E., Kovács, T., Rákhely, G., Perei, K., **2020**. New frontiers of anaerobic hydrocarbon biodegradation in the multi-omics era.

- Frontiers in Microbiology* 11, 590049. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590049>.
- Lama, S.M.G., Pampel, J., Fellinger, T.-P., Beškoski, V.P., Slavković-Beškoski, L., Antonietti, M., Molinari, V., **2017**. Efficiency of Ni nanoparticles supported on hierarchical porous nitrogen-doped carbon for hydrogenolysis of Kraft lignin in flow and batch systems. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 5, 2415–2420. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02761>.
- Lamichhane, S., Bal Krishna, K.C., Sarukkalige, R., **2016**. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review. *Chemosphere* 148, 336-353. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.036>.
- Łebkowska, M., Zborowska, E., Karwowska, E., Miałkiewicz-Pęska, E., Muszyński, A., Tabernacka, A., Naumczyk, J., Jęczalik, M., **2011**. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering* 37, 1895–1900. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.06.047>.
- Lee, S.H., Kim, S.O., Lee, S.W., Kim, M.S., Park, H., **2021**. Application of soil washing and thermal desorption for sustainable remediation and reuse of remediated soil. *Sustainability* 13, 12523. <https://doi.org/10.3390/su132212523>.
- Lemić, J., Milošević, S., Vukašinović, M., Radosavljević-Mihajlović, A., Kovačević, D., **2006**. Surface modification of a zeolite and the influence of pH and ionic strength on the desorption of an amine. *Journal of the Serbian Chemical Society* 71, 1161–1172. <https://doi.org/10.2298/JSC0611161L>.
- Leone, V., Canzano, S., Iovino, P., Salvestrini, S., Capasso, S., **2013**. A novel organo-zeolite adduct for environmental applications: Sorption of phenol. *Chemosphere* 91, 415-420. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.079>.
- Li, Z., Bowman, R.S., **1998**. Sorption of perchloroethylene by surfactant-modified zeolite as controlled by surfactant loading. *Environmental Science and Technology* 32, 2278–2282. <https://doi.org/10.1021/es971118r>.
- Lin, C., Cheruiyot, N.K., Bui, X.T., Ngo, H.H., **2022**. Composting and its application in bioremediation of organic contaminants. *Bioengineered* 13, 1073–1089. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2017624>.
- Liu, J., Bacosa, H.P., Liu, Z., **2017**. Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology* 7, 2131. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02131>.
- Liu, J., Wang, L., Chen, F., Hu, W., Dong, C., Wang, Y., Han, Y., **2023**. Molecular characterization of hydrocarbons in petroleum by Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry. *Energies* 16, 4296. <https://doi.org/10.3390/en16114296>.
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R., **2018**. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology and Innovation* 10, 175–193. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>.
- Lopičić, Z., Avdalović, J., Milojković, J., Antanasković, A., Lješević, M., Lugonja, N., Šoštarić, T., **2021**. Removal of diesel pollution by biochar-support in water remediation. *Chemical Engineering* 75, 329-339. <https://doi.org/10.2298/hemind2105140291>.
- Lopičić, Z.R., Šoštarić, T.D., Milojković, J.V., Antanasković, A.V., Milić, J.S., Spasić, S.D., Avdalović, J.S., **2024**. Efficient removal of water soluble fraction of diesel oil by biochar sorption supported by microbiological degradation. *Processes* 12, 964. <https://doi.org/10.3390/pr12050964>.
- Löser, C., Seidel, H., Zehnsdorf, A., Stottmeister, U., **1998**. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 631–636. <https://doi.org/10.1007/s002530051225>.
- Lyon, D.Y., Vogel, T.M., **2013**. Bioaugmentation for groundwater remediation: An overview. In:

- Bioaugmentation for groundwater remediation. Springer New York, New York, NY, pp. 1–37. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4115-1_1.
- Ma, J., Zhu, L., **2006**. Simultaneous sorption of phosphate and phenanthrene to inorgano-organo-bentonite from water. *Journal of Hazardous Materials* 136, 982–988. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.01.046>.
- Macci, C., Doni, S., Peruzzi, E., Mennone, C., Masciandaro, G., **2016**. Biostimulation of soil microbial activity through organic fertilizer and almond tree association. *Land Degradation and Development* 27, 335–345. <https://doi.org/10.1002/ldr.2234>.
- Madhubashani, A.M.P., Giannakoudakis, D.A., Amarasinghe, B.M.W.P.K., Rajapaksha, A.U., Pradeep Kumara, P.B.T., Triantafyllidis, K.S., Vithanage, M., **2021**. Propensity and appraisal of biochar performance in removal of oil spills: A comprehensive review. *Environmental Pollution* 288, 117676. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117676>.
- Maier, R.M., **2000**. Bioavailability and its importance to bioremediation. In: Valdes, J.J. (Ed) Bioremediation. Springer, Dordrecht, pp. 59–78. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9425-7_4.
- Maithomklang, S., Sukjit, E., Srisertpol, J., Klinkaew, N., Wathakit, K., **2023**. Pyrolysis oil derived from plastic bottle caps: Characterization of combustion and emissions in a diesel engine. *Energies* 16, 2492. <https://doi.org/10.3390/en16052492>.
- Maletić, S.P., Dalmacija, B.D., Rončević, S.D., Agbaba, J.R., Perović, S.D.U., **2011**. Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil. *Journal of Environmental Science and Health. Part A* 46, 1042–1049. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.590380>.
- Maletić, S., Dalmacija, B., Rončević, S., **2013**. Petroleum hydrocarbon biodegradability in soil—implications for bioremediation. *Hydrocarbon* 16, 43–64. <https://doi.org/10.5772/50108>.
- Marandi, A., Polikarpus, M., Jöeleht, A., **2013**. A new approach for describing the relationship between electrical conductivity and major anion concentration in natural waters. *Applied Geochemistry* 38, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2013.09.003>
- Marić, N., Ilić, M., Miletić, S., Gojgić-Cvijović, G., Beškoski, V., Vrvic, M.M., Papić, P., **2015**. Enhanced *in situ* bioremediation of groundwater contaminated by petroleum hydrocarbons at the location of the Nitex textiles, Serbia. *Environmental Earth Sciences* 74, 5211–5219. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4531-3>.
- Markiewicz, A., Strömvall, A.M., Björklund, K., **2020**. Alternative sorption filter materials effectively remove non-particulate organic pollutants from stormwater. *Science of The Total Environment* 730, 139059. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139059>.
- Marković, M., Daković, A., Rottinghaus, G.E., Petković, A., Kragović, M., Krajišnik, D., Milić, J., **2017**. Ochratoxin A and zearalenone adsorption by the natural zeolite treated with benzalkonium chloride. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 529, 7–77. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.054>.
- Mbachu, A.E., Chukwura, E.I., Mbachu, N., **2020**. Role of microorganisms in the degradation of organic pollutants: A review. *Energy and Environmental Engineering* 7, 1–11. <https://doi.org/10.13189/eee.2020.070101>.
- Mgbemere E.H, Ikenna C.I., Ganiyu I.G., **2017**. Zeolite synthesis, characterization and application areas: A review. *International Research Journal of Environmental Sciences* 6, 45–59.
- Miądlicki, P., Wróblewska, A., Kielbasa, K., Koren, Z.C., Michalkiewicz, B., **2021**. Sulfuric acid modified clinoptilolite as a solid green catalyst for solvent-free α -pinene isomerization process. *Microporous and Mesoporous Materials* 324, 111266. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.111266>.
- Milić, J., Šolević-Knudsen, T., Kojić, I., Avdalović, J., Ilić, M., Vrvic, M.M., **2024**. Short-term study of

- biological degradation of diesel oil by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. *Chemistry and Ecology* 40, 835–858. <https://doi.org/10.1080/02757540.2024.2356565>.
- Mishra, M., Singh, S.K., Kumar, A., **2021**. Environmental factors affecting the bioremediation potential of microbes. In: Kumar, A., Singh, V.K., Singh, P., Mishra, V.K. (Eds.), *Microbe mediated remediation of environmental contaminants*. Elsevier, pp. 47–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00005-5>.
- Moshoeshoe, M.N., Nadiye-Tabbiruka, M.S., Obuseng, V.C., **2017**. A review of the chemistry, structure, properties and applications of zeolites. *American Journal of Materials Science* 7, 196-221. <https://doi.org/10.5923/j.materials.20170705.12>.
- Muir, B., Bajda, T., **2016**. Organically modified zeolites in petroleum compounds spill cleanup — Production, efficiency, utilization. *Fuel Processing Technology* 149, 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.04.010>.
- Muir, B., Likus, M., Bajda, T., Nowak, P., Czuprynski, P., **2017**. The removal of organic compounds by natural and synthetic surface-functionalized zeolites: A mini-review. *Mineralogia* 48, 1-4. <https://doi.org/10.1515/mipo-2017-0017>.
- Müller, J.B., Melegari, S.P., Perreault, F., Matias, W.G., **2019**. Comparative assessment of acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Chemosphere* 221, 640-646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.069>.
- Nikunen, S., Pyysing, S., Talvenmäki, H., Allen, J., Romantschuk, M., Silvennoinen, H., **2017**. Utilization of *in situ* techniques in remediation of oil-polluted sites in Finland. In: Paya, A., Pelaez, S. (Eds.), *European achievements in soil remediation and brownfield redevelopment: A report of the European Information and Observation Network's National Reference Centres for Soil (Eionet NRC Soil)*. Geneva: European Commission.
- Nourmoradi, H., Khiadani, M., Nikaeen, M., **2013**. Multi-component adsorption of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene from aqueous solutions by montmorillonite modified with tetradecyl trimethyl ammonium bromide. *Journal of Chemistry* 2013, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/589354>.
- Nur Zaida, Z., Piakong, M.T., **2018**. Bioaugmentation of petroleum hydrocarbon in contaminated soil: A review. In: Kumar, V., Kumar, M., Prasad, R. (Eds.), *Microbial action on hydrocarbons*. Springer Singapore, Singapore, pp. 415–439. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_17.
- Nutcharin, S., **2015**. The difference of Si/Al ratio on organo-zeolite in the adsorption of atrazine and linuron. *Applied Mechanics and Materials* 804, 295–8. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.804.295>.
- Obradović, M., Daković, A., Smiljanić, D., Ožegović, M., Marković, M., Rottinghaus, G.E., Krstić, J., **2022**. Ibuprofen and diclofenac sodium adsorption onto functionalized minerals: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Microporous and Mesoporous Materials* 335, 111795. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2022.111795>.
- Obradović, M., Daković, A., Smiljanić, D., Marković, M., Ožegović, M., Krstić, J., Vuković, N., Milojević-Rakić, M., **2024**. Bentonite modified with surfactants – efficient adsorbents for the removal of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Processes* 12, 96. <https://doi.org/10.3390/pr12010096>.
- Oliveira, L.M.T.M., Saleem, J., Bazargan, A., Duarte, J.L.D.S., McKay, G., Meili, L., **2021**. Sorption as a rapidly response for oil spill accidents: A material and mechanistic approach. *Journal of Hazardous Materials* 407, 124842. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124842>.
- Onwuka, K.E., Emole, P.O., Igwe, J.C., Atasié, O.C., **2022**. Monitoring BTEX adsorption on to organoclays in aqueous solution: multi-isotherm and kinetics studies. *Biomedical Journal of*

- Ossai, I.C., Ahmed, A., Hassan, A., Hamid, F.S., **2020**. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation* 17, 100526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>.
- Paliulis, D., **2021**. Experimental investigations of dynamic sorption of diesel from contaminated water. *Archives of Environmental Protection* 47, 30-39. <https://doi.org/10.24425/aep.2021.139500>.
- Pande, V., Pandey, S.C., Sati, D., Bhatt, P., Samant, M., **2022**. Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem. *Frontiers in Microbiology* 13, 824084. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>.
- Park, H., Kim, H., Kim, G.-Y., Lee, M.-Y., Kim, Y., Kang, S., **2021**. Enhanced biodegradation of hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa*-encapsulated alginate/gellan gum microbeads. *Journal of Hazardous Materials* 406, 124752. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124752>.
- Park, Y., Ayoko, G.A., Frost, R.L., **2011**. Application of organoclays for the adsorption of recalcitrant organic molecules from aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science* 354, 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.09.068>.
- Patil, P., Jeppu, G., Girish, C.R., Mohan, B., **2024**. Development of a comprehensive analytical solution for modeling adsorption kinetics and equilibrium. *Separation Science and Technology* 59, 373-394 <https://doi.org/10.1080/01496395.2024.2319146>.
- Perdigão, R., Almeida, C.M.R., Magalhães, C., Ramos, S., Carolas, A.L., Ferreira, B.S., Carvalho, M.F., Mucha, A.P., **2021**. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in seawater: prospects of using lyophilized native hydrocarbon-degrading bacteria. *Microorganisms* 9, 2285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112285>.
- Pietrangeli, B., Lauri, R., Incocciati, E., **2024**. Sustainability in site remediation: occupational health and safety assessment of techniques for groundwater remediation. *Safety* 10, 83. <https://doi.org/10.3390/safety10040083>.
- Poi, G., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Mok, P.C., Ball, A.S., **2018**. Large scale treatment of total petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater using bioaugmentation. *Journal of Environmental Management* 214, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.079>.
- Polomčić, D., Stevanović, Z., Dokmanović, P., Papić, P., Ristić-Vakanjac, V., Hajdin, B., Milanović, S., Bajić, D., **2011**. Vodosnabdevanje podzemnim vodama u Srbiji – stanje i perspektive. In: Polomčić, D., Ristić-Vakanjac, V. (Eds.), Četrdeset godina Departmana za Hidrogeologiju. Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet, Beograd, p. 45.
- Radice, R.P., De Fabrizio, V., Donadoni, A., Scopa, A., Martelli, G., **2023**. Crude oil bioremediation: from bacteria to microalgae. *Processes* 11, 442. <https://doi.org/10.3390/pr11020442>.
- Rahman, R.O.A., El-Kamash, A.M., Hung, Y.-T., **2022**. Applications of nano-zeolite in wastewater treatment: An overview. *Water* 14, 137. <https://doi.org/10.3390/w14020137>.
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., **2017**. Toxicity of diesel water accommodated fraction toward microalgae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella* sp. MM3. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.052>.
- Rasuli, L., Nasser, S., Hadi, M., **2020**. Performance of surfactant-modified forms of clinoptilolite and pumice in nitrate removal from aqueous solution. *Desalination and Water Treatment* 180, 227-236. <https://doi.org/10.5004/dwt.2020.24861>.
- Ray P., Oubelli M.A., Löser C., **1999**. Aerobic 4-nitrophenol degradation by microorganisms fixed in a continuously working aerated solid-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 284-290. <https://doi.org/10.1007/s002530051394>.

- Rizzo, P., Malerba, M., Bucci, A., Sanangelantoni, A.M., Remelli, S., Celico, F., **2020**. Potential enhancement of the *in-situ* bioremediation of contaminated sites through the isolation and screening of bacterial strains in natural hydrocarbon springs. *Water* 12, 2090. <https://doi.org/10.3390/w12082090>.
- Robles-Mora, G., Barrera-Cortés, J., Valdez-Castro, L., Solorza-Feria, O., García-Díaz, C., **2021**. Polycyclic aromatic hydrocarbon sorption by functionalized humic acids immobilized in micro- and nano-zeolites. *Sustainability* 13, 10391. <https://doi.org/10.3390/su131810391>.
- Romantschuk, M., Lahti-Leikas, K., Kontro, M., Galitskaya, P., Talvenmäki, H., Simpanen, S., Allen, J. A., Sinkkonen, A., **2023**. Bioremediation of contaminated soil and groundwater by *in situ* biostimulation. *Frontiers in Microbiology* 14, 1258148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1258148>.
- Saitou, N., Nei, M., **1987**. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Sánchez Mata, O., Aguilera Flores, M.M., Ureño García, B.G., Ávila Vázquez, V., Cabañas García, E., Franco Villegas, E.A., **2023**. Bioremediation of automotive residual oil-contaminated soils by biostimulation with enzymes, surfactant, and vermicompost. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20, 6600. <https://doi.org/10.3390/ijerph20166600>.
- Santos, C.A., Lenz, D., Brandão, G.P., Chippari-Gomes, A.R., Gomes, L.C., **2013**. Acute toxicity of the water-soluble fraction of diesel in *Prochilodus vimboides* Kner (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology* 11, 193–198. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252013000100022>.
- Sarkar, J., Kazy, S.K., Gupta, A., Dutta, A., Mohapatra, B., Roy, A., Bera, P., Mitra, A., Sar, P., **2016**. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in Microbiology* 7, 1407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01407>.
- Satouh, S., Martín, J., Orta, M.d.M., Medina-Carrasco, S., Messikh, N., Bougdah, N., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., **2021**. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by natural, synthetic and modified clays. *Environments* 8, 124. <https://doi.org/10.3390/environments8110124>.
- Sayara, T., Sánchez, A., **2020**. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Process enhancement through composting/compost. *Applied Sciences* 10, 3684. <https://doi.org/10.3390/app10113684>.
- Schuhmann, R., Koniger, F., Emmerich, K., Stefanescu, E., Stacheder, M., **2011**. Determination of hydraulic conductivity based on (soil) - moisture content of fine grained soils. In: Lakshmanan, E. (Ed.), Hydraulic conductivity - issues, determination and applications. InTech, Croatia. <https://doi.org/10.5772/20369>.
- Shahsavari, E., Poi, G., Aburto-Medina, A., Haleyur, N., Bal, A.S., **2017**. Bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon-contaminated environments. In: Anjum, N.A., Gill, S.S., Tuteja, N. (Eds.), Enhancing cleanup of environmental pollutants, 1st Ed. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–41.
- Shieh, H.-J., Peralta, R.C., **2008**. Optimal *in-situ* bioremediation system design using simulated annealing. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 51, 1273–1285.
- Slaný, M., Jankovič, L., Madejová, J., **2019**. Structural characterization of organo-montmorillonites prepared from a series of primary alkylamines salts: Mid-IR and near-IR study. *Applied Clay Science* 176, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.04.016>.
- Službeni glasnik Republike Srbije (Broj 88/2010), **2010**. Uredba o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa.
- Srivastava, J., Narayan, R., Kalra, S.J.S., Chandra, H., **2014**. Advances in microbial bioremediation and

- the factors influencing the process. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11, 1787–1800. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0412-z>.
- SRPS EN 27888, **2009**. Kvalitet vode – Određivanje električne provodnosti.
- SRPS EN ISO 10523, **2016**. Kvalitet vode – Određivanje pH-vrednosti.
- SRPS ISO 10390, **2007**. Kvalitet zemljišta – Određivanje pH-vrednosti.
- SRPS ISO 11465, **2002**. Kvalitet zemljišta – Određivanje sadržaja suve materije i vode u obliku masene frakcije – Gravimetrijska metoda.
- Stefani, F.O.P., Bell, T.H., Marchand, C., de la Providencia, I.E., El Yassimi, A., St-Arnaud, M., Hijri, M., **2015**. Culture-dependent and -independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *PLoS One* 10, e0128272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128272>.
- Stringfellow, W.T., Aitken, M.D., **1995**. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 357–62. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.357-362.1995>.
- Sufyan, M., Martelli, G., Teatini, P., Cherubini, C., Goi, D., **2024**. Managed aquifer recharge for sustainable groundwater management: new developments, challenges, and future prospects. *Water* 16, 3216. <https://doi.org/10.3390/w16223216>.
- Sullivan, E.J., Hunter, D.B., Bowman, R.S., **1997**. Topological and thermal properties of surfactant-modified clinoptilolite studied by tapping-modeTM atomic force microscopy and high-resolution thermogravimetric analysis. *Clays and Clay Minerals* 45, 42–53. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1997.0450105>.
- Szala, B., Bajda, T., Matusik, J., Zięba, K., Kijak, B., **2015**. BTX sorption on Na-P1 organo-zeolite as a process controlled by the amount of adsorbed HDTMA. *Microporous and Mesoporous Materials* 202, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.09.033>.
- Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., Chrzanowski, Ł., **2014**. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management* 132, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.006>.
- Šoštarić, T., **2016**. Uklanjanje teških metala iz vodenih rastvora biosorbentom na bazi koštica kajsija kao otpadne biomase. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet: doktorska disertacija
- Talley, J.W., Sleeper, P.M., **1997**. Roadblocks to the implementation of biotreatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 829, 16–29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48562.x>.
- Tamura, K., Nei, M., **1993**. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Tewari, D., Sirvaiya, A., **2015**. Oil spill remediation and its regulation. *International Journal of Research in Science and Engineering* 1, 2394-8299.
- Torabian, A., Kazemian, H., Seifi, L., Bidhendi, G.N., Azimi, A.K., Ghadiri, S.K., **2010**. Removal of petroleum aromatic hydrocarbons by surfactant-modified natural zeolite: The effect of surfactant. *Clean Soil Air Water* 38, 77-83. <https://doi.org/10.1002/clen.200900157>.
- Udume, O.A., Abu, G.O., Stanley, H.O., Vincent-Akpu, I.F., Momoh, Y., Eze, M.O., **2023**. Biostimulation of petroleum-contaminated soil using organic and inorganic amendments. *Plants* 12, 431. <https://doi.org/10.3390/plants12030431>.
- Ugal, R.J., Hassan, H.K., Ali, H.I., **2010**. Preparation of type 4A zeolite from Iraqi kaolin: Characterization and properties measurements. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* 9, 2-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2010.12.002>.

- Ugya, Y.A., Hasan, D.B., Tahir, S.M., Imam, T.S., Ari, H.A., Hua, X., **2021**. Microalgae biofilm cultured in nutrient-rich water as a tool for the phytoremediation of petroleum-contaminated water. *International Journal of Phytoremediation* 23, 1175–1183. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1882934>.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA), 170.1., **1974**. Temperature by Thermometer. National Exposure Research Laboratory (NERL).
- United States Environmental Protection Agency (US EPA), **1995**. *In-situ* groundwater bioremediation. In: How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: A guide for corrective action plan reviewers. Publication No. EPA 510-B-17-003. p X-16. <https://www.epa.gov/ust/how-evaluate-alternative-cleanup-technologies-underground-storage-tank-sites-guide-corrective>.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA) Hach Method 10360, **2006**. Luminescence measurement of dissolved oxygen in water and wastewater revision 1.1.
- Urgel, J.J.D.T., Briones, J.M.A., Diaz, E.B., Dimaculangan, K.M.N., Rangel, K.L., Lopez, E.C., **2024**. Removal of diesel oil from water using biochar derived from waste banana peels as adsorbent. *Carbon Research* 3, 13. <https://doi.org/10.1007/s44246-024-00100-9>.
- Vahabisani, A., An, C., **2021**. Use of biomass-derived adsorbents for the removal of petroleum pollutants from water: a mini-review. *Environmental Systems Research* 10, 25. <https://doi.org/10.1186/s40068-021-00229-1>.
- Van Hamme, J.D., **2004**. Bioavailability and biodegradation of organic pollutants – A microbial perspective. In: Singh, A., Ward, O.P. (Eds.), *Biodegradation and bioremediation*, 2nd Ed. Springer Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 37-56.
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., **2016**. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology* 222, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>.
- Victor, I.A., Iwok, E.O., Archibong, I.A., Effiom, O.E., Okon, E., Andem, A.B., **2020**. The biochemical mechanisms of petroleum degradation by bacteria. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 11, 1258–1275.
- Vidonish, J., Zygourakis, K., Masiello, C., Sabadell, G., Alvarez, P., **2016**. Thermal treatment of hydrocarbon-impacted soils: A review of technology innovation for sustainable remediation. *Engineering* 2, 426-437. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2016.04.005>.
- Vrvić, M.M., Miletić, S., Jovančičević, B., **2015**. Izveštaj br. 618/1: Detaljna ispitivanja zemljišta kontaminiranog ugljovodonicima naftnog porekla na Toplani Novi Beograd (Istraživanja hidrohemijskih, pedohemijskih i geohemijskih procesa, kao i biohemijskih i geomikrobioloških interakcija u podzemnim i površinskim vodama i zemljištu). Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
- Vrvić, M.M., **2015**. Projekat sanacije i/ili remedijacije kontaminirane lokacije na TO Novi Beograd. BREM GROUP, Beograd.
- Vyas, T.K., Dave, B., **2010**. Effect of addition of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on biodegradation of crude oil by marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences* 39, 143-150.
- Waikhom, D., Ngasotter, S., Soniya Devi, L., Devi, S., Singh, A.S., **2020**. Role of microbes in petroleum hydrocarbon degradation in the aquatic environment: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 9, 2890–2903. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.905.342>.
- Walworth, J., Pond, A., Snape, I., Rayner, J., Ferguson, S., Harvey, P., **2007**. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology* 48, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2006.07.001>.
- Wang, J., Guo, X., **2020a**. Adsorption isotherm models: Classification, physical meaning, application

- and solving method. *Chemosphere* 258, 127279. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127279>.
- Wang, J., Guo, X., **2020b**. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. *Journal of Hazardous Materials* 390, 122156. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122156>.
- Wang, M., He, J., Dong, X., Zhang, J., **2023**. Effect of salinity on performance and microbial community during granulation process in a sequencing batch reactor. *Water* 15, 3961. <https://doi.org/10.3390/w15223961>.
- Wołowiec, M., Muir, B., Bajda, T., Zięba, K., Kijak, B., Franus, W., **2017**. Removal of BTEX and hexane by organo-zeolites: The influence of surfactant carbon chain length on the sorption process. *Desalination and Water Treatment* 94, 120–128. <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.21537>.
- Wu, M., Wu, J., Zhang, X., Ye, X., **2019**. Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere* 237, 124456. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124456>.
- Xie, J., Meng, W., Wu, D., Zhang, Z., Kong, H., **2012**. Removal of organic pollutants by surfactant modified zeolite: comparison between ionizable phenolic compounds and non-ionizable organic compounds. *Journal of Hazardous Materials* 231-232, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.035>.
- Xie, Q., Xie, J., Wang, Z., Wu, D., Zhang, Z., Kong, H., **2013**. Adsorption of organic pollutants by surfactant modified zeolite as controlled by surfactant chain length. *Microporous and Mesoporous Materials* 179, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.05.027>.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., Yu, H., **2018**. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis. *Frontiers in Microbiology* 9, 2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., **2007**. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.006>.
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., **2017**. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- Zhao, C., Dong, Y., Feng, Y., Li, Y., Dong, Y., **2019**. Thermal desorption for remediation of contaminated soil: A review. *Chemosphere* 221, 841–855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.079>.

Biografski podaci o kandidatkinji

Marija (Miroslav) Lukić je rođena 23.09.1989. godine u Loznici, Srbija. Nakon završene Osnovne škole “Branko Radičević” u Malom Zvorniku, upisuje Srednju medicinsku školu “Dr Miša Pantić” u Valjevu (Istureno odeljenje u Loznici), smer fizioterapeutske tehničar, koju završava 2008. godine. Iste godine započinje osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Biolog istraživač, koje završava 2013. godine sa prosečnom ocenom 7,94. Master studije nastavlja na istom fakultetu na katedri za Fiziologiju životinja, modul Eksperimentalna fiziologija životinja, koje završava 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,83 i ocenom 10 na odbrani master rada pod nazivom “*Uticaj akutnih i hroničnih stresora na koncentraciju galanina i FTO u srcu pacova*”. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisuje 2016. godine na studijskom programu Biohemija na kom je do sada položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00.

Od 2015. do 2022. godine je bila zaposlena u preduzeću NRK Inženjering d.o.o. gde je radila na poslovima proizvodnje i kontrole kvaliteta hemijskih proizvoda koji se koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj i vojnoj industriji, a u skladu sa relevantnim standardima. Istovremeno je radila i kao hemijski analitičar u laboratoriji akreditovanoj prema ISO 17025 standardu, čiji je glavni fokus bio na analizi zemljišta i vode na naftne zagađivače. Kao eksterni saradnik je u istom periodu učestvovala i na projektima firme BREM Group d.o.o. koja posluje u oblasti zaštite životne sredine. Angažovanje u okviru BREM Group d.o.o. je bilo na poslovima obilaženja i procena lokacija, terenskog rada, kao i uzorkovanja.

Od 2022. godine je angažovana kao biolog na Institutu za hematopatologiju u Hamburgu, Nemačka, gde se bavi dijagnostikom hematoloških oboljenja sa akcentom na imunofenotipizaciji pomoću FACS (*engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting*) metode. Pored toga radi i na poslovima kontrole kvaliteta FACS laboratorije, a vrši i kontrolu kvaliteta preparata obrađenih u laboratoriji za konvencionalnu histologiju i citologiju.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Лукић

Број индекса ДБ03/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Уклањање нафтних угљоводоника из воде и седимента интегралним поступком адсорпције и микробне деградације”

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

Потпис аутора

У Београду, 30. 8. 2025.

Марија Лукић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Лукић

Број индекса ДБ03/2016

Студијски програм Биохемија

Наслов рада „Уклањање нафтних угљоводоника из воде и седимента интегралним поступком адсорпције и микробне деградације”

Ментори др Владимир Бешкоски, редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета,

др Јелена Авдаловић, научни саветник Универзитета у Београду, Института за хемију, технологију и металургију, Института од националног значаја за Републику Србију

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 30.6.2025.

Марија Лукић

Изјава о коришћењу

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

„Уклањање нафтних угљоводоника из воде и седимента интегралним поступком адсорпције и микробне деградације”

која је моје ауторско дело.

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 30. 6. 2025.

Лукис Марковић

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