

Primjena bioremedijacije u sanaciji onečišćenih tala

Krčelić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:850672>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Primjena bioremedijacije u sanaciji onečišćenih tala

DIPLOMSKI RAD

Iva Krčelić

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

Primjena bioremedijacije u sanaciji onečišćenih tala

DIPLOMSKI RAD

Iva Krčelić

Mentor:

Doc. dr. sc. Danijela Jungić

Zagreb, rujan, 2021.

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Iva Krčelić, JMBAG 0178107630, rođena 30.06.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PRIMJENA BIOREMEDIJACIJE U SANACIJI ONEČIŠĆENIH TALA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Iva Krčelić**, JMBAG 0178107630, naslova

Primjena bioremedijacije u sanaciji onečišćenih tala

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Doc. Dr. sc. Danijela Jungić

2. Doc. dr. sc. Aleksandra Perčin

3. Doc. dr. sc. Nataša Hulak

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada	2
2. Oštećenje i onečišćenje tla.....	3
3. Glavni onečišćivači tla	5
4. Biološke metode sanacije onečišćenog tla	6
4.1. Bioremedijacija.....	6
5. Glavni čimbenici koji utječu na bioremedijaciju	8
5.1. Mikroorganizmi	9
5.2. Temperatura	9
5.3. pH.....	10
5.4. Vlažnost tla	10
5.5. Kisik u tlu	10
5.6. Hranjive tvari	11
5.7. Organska tvar i tekstura tla	11
6. Vrste bioremedijacije	12
6.1. In situ bioremedijacija.....	12
6.2. <i>Ex situ</i> bioremedijacija	15
7. Prednosti i nedostaci bioremedijacije.....	20
8. Primjena bioremedijacije u sanaciji onečišćenih tala	21
8.1. Bioremedijacija naftom onečišćenih tala	21
8.2. Bioremedijacija tala ugroženih ostacima pesticidima	24
8.3. Bioremedijacija tala onečišćenih teškim metalima	28
9. Upotreba novih tehnologija u bioremedijaciji	31
10. Zaključak	34
11. Popis literature	35

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ive Krčelić**, naslova

PRIMJENA BIOREMEDIJACIJE U SANACIJI ONEČIŠĆENIH TALA

Industrijalizacija, urbanizacija te porast globalnog stanovništva uzrokuju golem pritisak na okoliš. Posljednjih godina javlja se sve veća svijest o posljedicama iskorištavanja okoliša i prirodnih resursa. Bioremedijacija je biotehnološka metoda sanacije tla upotrebom mikroorganizama i mikrobioloških procesa kako bi se štetnoj tvari smanjila koncentracija ili je se prevelo u neškodljive produkte CO₂, H₂O i biomasu. Uspješnost bioremedijacije ovisi o brojnim čimbenicima poput mikroorganizama, temperature, pH, organske tvari tla, hranjivih tvari itd. Korištenjem *in situ* i *ex situ* tehnika bioremedijacije mogu se učinkovito ukloniti organski i anorganski kontaminanti kao što su nafta, teški metali, pesticidi i dr. Kako bi se povećao potencijal mikroorganizama u sanaciji onečišćenog tla, intenzivno se istražuju moderne tehnologije kao što je gensko inženjerstvo te nanotehnologija.

Ključne riječi: bioremedijacija, sanacija, mikroorganizmi, onečišćenje, tlo

Summary

Of the master's thesis – student **Iva Krčelić**, entitled

Application of bioremediation technology in contaminated soil remediation

Industrialization, urbanization and global population growth are putting enormous pressure on the environment. In recent years, there has been a growing awareness of the consequences of exploiting the environment and natural resources. Bioremediation is a biotechnological method of soil remediation using microorganisms and microbiological processes to reduce the concentration of harmful substances or to translate them into harmless products CO₂, H₂O and biomass. The success of bioremediation depends on a number of factors such as microorganisms, temperature, pH, soil organic matter, nutrients, etc. Using *in situ* and *ex situ* bioremediation techniques can effectively remove organic and inorganic contaminants such as crude oil, heavy metals, pesticides, etc. In order to increase the potential of microorganisms in the remediation of contaminated soil, modern technologies such as genetic engineering and nanotechnology are being intensively researched.

Key words: bioremediation, recovery, microorganisms, contaminants, soil

1. Uvod

Tlo je višenamjenski resurs i prirodno dobro značajno za djelatnosti čovjeka. Nastaje složenim i iznimno dugotrajnim djelovanjem vegetacije, klime i organizama na matičnu stijenu. Svako tlo može biti uništeno, onečišćeno i premješteno u kratkom vremenu a za nastajanje 30cm tla, potrebno je od nekoliko tisuća do milijun godina. Iz tog razloga, tlo se smatra uvjetno obnovljivim resursom kojeg ništa u prirodi ne može zamijeniti (Kisić, 2012). Industrijalizacija, urbanizacija te porast globalnog stanovništva uzrokuju golem pritisak na okoliš (Vidali, 2001). Procjenjuje se da u Europi postoji 2,5 milijuna potencijalno onečišćenih mjesta, a od toga je barem 340 000 mjesta sigurno onečišćeno. Na mnogim od ovih mjesta tla su istovremeno onečišćena raznim štetnim spojevima (teški metali, mineralna ulja, aromatični ugljikovodici itd.), što otežava njihovu sanaciju (Alkorta i sur., 2017). Posljednjih godina javlja se sve veća svijest o posljedicama iskorištavanja okoliša i prirodnih resursa. Smatra se da je većina onečišćenja nastala u prošlosti, kada se nije marilo za održivo korištenje resursa i ekološku proizvodnju, a onečišćena zemljišta se ni na koji način nisu sanirala. Danas je poznato da takva onečišćenja tla narušavaju ravnotežu ekosustava te da su štetna za ljudsko zdravlje, stoga se na rješenjima ovog problema radi na globalnoj razini (Vidali, 2001).

Tlo možemo nazvati onečišćenim kada u sebi sadrži štetne kemijske spojeve, radioaktivni otpad, soli ili patogene koji imaju negativan utjecaj na biološke sustave u tlu. Danas su u tlu zabrinjavajuće količine zagađivača kao što su teški metali, pesticidi i razni derivati nafte. Kada dospiju u tlo, oni se mogu adsorbirati, prenositi utjecajem vjetra ili vode i infiltrirati u dublje slojeve tla, odnosno u podzemne vode. Glavni izvori ovih onečišćenja u tlu su poljoprivredne djelatnosti, navodnjavanje, poplave, izlivanje nafte, neadekvatno gospodarenje komunalnim otpadom i otpadnim vodama (da Silva i sur., 2020).

Tradicionalne metode sanacije tala uključuju iskop onečišćenog tla te njegovo prevoženje na deponije. Drugi način uključuje ograđivanje, zaštitu i nadzor onečišćenog područja. Prva metoda donosi određene rizike prilikom iskopa i prijevoza gdje može doći do širenja onečišćenja. Također, veoma je skupo neprekidno pronalaziti nove deponije na kojima bi se takvo tlo odlagalo. Druga metoda zahtjeva stalan monitoring i održavanje zaštićenog područja. Osim toga, ovo je samo privremeno rješenje kojim se neće postići uklanjanje onečišćenja iz tla. Metode sanacije kojima se u potpunosti uklanjaju onečišćenja iz tla ili ih se prevodi u manje štetan oblik smatraju se boljim rješenjem. Takve metode uključuju spaljivanje tla na visokim temperaturama ili tretiranje tla kemikalijama kako bi se postigla kemijska razgradnja kontaminanata. Ovo su veoma kompleksne metode i zahtijevaju moderna postrojenja koja su veoma skupa te se ne isplate za manja onečišćena područja. Uz to, pri upotrebi ovih metoda javlja se zabrinutost građana kao i djelatnika takvih postrojenja zbog straha za svoje zdravlje. Zbog svega navedenog javlja se potreba za upotrebom bioloških metoda remedijacije onečišćenog tla koje su ekološki prihvatljivije. (Vidali, 2001).

Jedna od takvih metoda sanacije onečišćenih tala upravo je bioremedijacija. Bioremedijacija je biotehnološka metoda sanacije tla upotrebom mikroorganizama i mikrobioloških procesa kako bi se štetnoj tvari smanjila koncentracija ili je se prevelo u neškodljive produkte CO₂, H₂O i biomasu (Kensa, 2011., Azubuike i sur., 2016., Alkorta i sur., 2017., Arora, 2018., Zhang i sur., 2020). U skladu je s konceptom održivog razvoja pa upravo zbog toga pripada tzv. zelenim tehnologijama (Bertović, 2016). Bioremedijacija se može provesti *in situ*, na mjestu onečišćenja ili *ex situ*, odvoženjem onečišćenog materijala na drugu lokaciju gdje će se odvijati proces sanacije. Izbor načina provođenja bioremedijacije ovisi o karakteristikama onečišćenog područja, tipu i koncentraciji polutanata pa i financijskim mogućnostima s obzirom da je *ex situ* metoda skuplja zbog dodatnih troškova iskopa i prijevoza. Kako bi postupak bioremedijacije na koncu bio uspješan, važno je dobro proučiti problem odnosno vrstu onečišćenja tla i sukladno tomu izabrati postupak koji bi bilo najučinkovitiji u rješavanju istog. Važno je znati da ne postoji jedan određen postupak bioremedijacije koji će uspješno sanirati svako onečišćeno područje, nego se svakom području pristupa individualno, te se izabire slijed postupaka koji će na kraju dati najbolji rezultat. Za uspješnost provođenja remedijacije potrebno je uz navedeno poznavati i karakteristike mikroorganizama, s obzirom na to da svi nemaju iste mehanizme djelovanja, ovisno o vrsti onečišćujuće tvari u tlu (Azubuike i sur., 2016).

1.1. Cilj rada

Cilj ovoga preglednog diplomskog rada je opisati postupak bioremedijacije i prikazati različite načine primjene bioremedijacije, njene prednosti i nedostatke te utjecaj glavnih čimbenika na uspješnost ove metode. Za provedbu ovog cilja, koristit će se literatura domaćih i stranih autora, a dobivene informacije i podatci vezani uz bioremedijaciju bit će prikazani u sažetom i sistematiziranom obliku.

2. Oštećenje i onečišćenje tla

Tehničko-tehnološki napredak ljudskog društva sve češće rezultira opadanjem kvalitete tla kao osnovnog prirodnog resursa. To se manifestira kroz jače ili slabije izražene procese oštećenja tla, a njihovom intenzifikacijom nastaju različite vrste onečišćenja tla. Oštećenje tla uključuje sve procese i utjecaje na tlo, koji smanjuju njegovu upotrebnu vrijednost ili ga isključuje iz prirodne uloge koje tlo obavlja (Sofilić, 2014). Klasifikacija oštećenja tla važno je pitanje pri odabiru i usmjeranju istraživanja tla te valorizaciji i rangiranju opasnosti degradacijskih procesa. Cilj klasifikacije je formirati znanstveno utemeljenu klasifikaciju oštećenja povoljnu za primjenu u praksi, poticajnu za provođenje mnogih istraživanja te kreiranu za nove spoznaje koje se svakodnevno prikupljaju (Blatarić, 2017). Klasifikacija oštećenja tla u Hrvatskoj prema Bašiću (1994.) temelji se na nekoliko klasifikacijskih jedinica: stupanj oštećenja, vrsta oštećenja, procesi oštećenja i posljedice oštećenja. Stupanj oštećenja, najviša je klasifikacijska jedinica u kojoj se tlo svrstava prema obnovljivosti oštećenja. Prema tome, razlikujemo slabo lako obnovljivo, osrednje teško obnovljivo, teško neobnovljivo te nepovratno oštećenje tla. Vrsta oštećenja označava porijeklo oštećenja, što može biti degradacija tla u intenzivnoj biljnoj proizvodnji, zagađenje ili onečišćenje tla, premještanje te prenamjena tla kao vrsta oštećenja s najtežim posljedicama. Proces oštećenja najznačajnija je kategorija klasifikacije koja upućuje na uzročnika, a to može biti jedan proces ili skupni procesi koji su posljedica neke vrste oštećenja. Posljedice oštećenja su raznovrsne te ih nije jednostavno identificirati (Kisić, 2012). U tablici 2.1. prikazana je klasifikacija oštećenja tla prema Bašiću.

Tablica 2.1. Klasifikacija oštećenja tla

Stupanj oštećenja	Vrsta oštećenja	Procesi oštećenja	Posljedice
Slabo lako obnovljivo	Degradacija tla u intenzivnoj proizvodnji	Degradacija fizikalnih, kemijskih i bioloških značajki tla te degradacija hidromelioracijama.	Antropogena zbijanja tla, poremećaj vodozračnih prilika, veći utrošak energije u obradi, zakiseljavanje i zaslanjivanje tla, fitotoksični efekt, smanjena biogenost, poremećen odnos mikroflore, infekcija tla.
Osrednje teško obnovljivo	Onečišćenje	Teški metali, pesticidi, PAH-ovi, petrokemikalije, radionuklidi, imisijska acidifikacija tla.	Neupotrebljiva hrana zbog mutagenog, teratogenog i kancerogenog djelovanja. Depresija rasta biljke. Fitotoksični efekt.

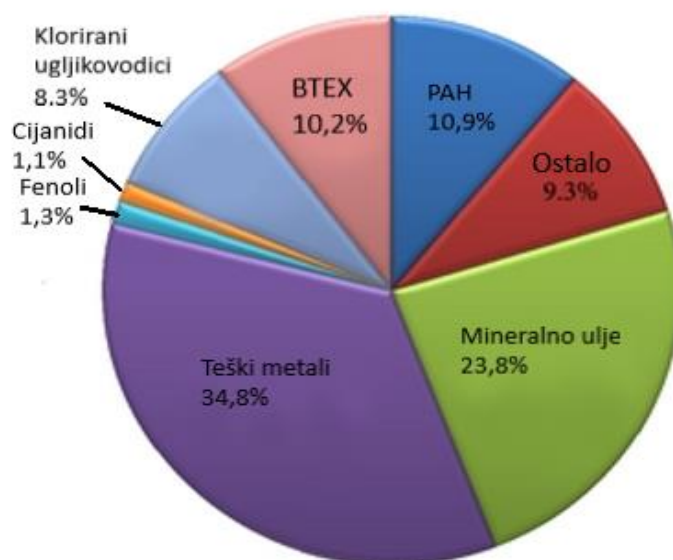
			Ugroženi drugi ekosustavi.
Teško obnovljivo	Premještanje	Erozija vodom ili vjetrom, eksploatacija kamena, šljunka i dr., odnošenje tla plodinama, posudišta tla. Prekrivanje smećem, industrijskim otpadom, drugim tlom. Oštećenja tla šumskim požarom.	Gubitak djela ili cijelog profila tla, promjena stratigrafije profila. Smanjenje proizvodnih površina, smetnje u obradi tla. Povećana heterogenost pokrova tala, povećani troškovi proizvodnje. Smanjen prinos, ugroženi drugi ekosustava i gubitak proizvodnih površina.
Nepovratno obnovljivo	Prenamjena	Izgradnja urbanih područja, industrijskih i energetske objekta, prometnica, zračnih luka. Hidroakumulacije.	

Izvor: Bašić, 1994.

Onečišćenje tla može se definirati kao unos tvari, bioloških organizama ili energije u tlo, što rezultira u promjeni kakvoće tla te utječe na normalnu uporabu tla ili zdravlje ljudi i ostalih organizama (Mesić i sur. 2008). Čimbenici koji utječu na onečišćenje tla mogu se podijeliti na prirodne i antropogene. Prirodna onečišćenja uzrokuju vulkanske erupcije, potresi, požari te razne vremenske neprilike. Antropogena onečišćenja su ujedno i najopasnija te najznačajnija onečišćenja tla uzrokovana ljudskom djelatnošću. To su onečišćenja koja nastaju industrijskom proizvodnjom, odlaganjem raznog otpada, poljoprivredom, vojnim djelatnostima i sl. (Blatarić, 2017.) Onečišćenje tla pripada drugom stupnju oštećenja tla, osrednje teško obnovljivo oštećenje (Kisić, 2012).

3. Glavni onečišćivači tla

U Europi se primjenjuju mnoge legislative i direktive Europske Unije kojima se nastoji kontrolirati odnosno minimalizirati onečišćenje tla kao i sanirati ona tla koja su onečišćena. Međutim, onečišćenje tla je i dalje veliki problem na području Europe. Industrijska proizvodnja glavni je izvor onečišćenja tla derivatima nafte, teškim metalima te raznim organskim onečišćivačima kao što su poliklorirani bifenili (PCB), policiklički aromatski ugljikovodici (PAH), benzen, toluen, etilbenzen i ksilen (BTEX). Osim industrije, važno je spomenuti poljoprivredu s obzirom da je u Europi oko 200 000 ha poljoprivrednih zemljišta koja čine oko 25% ukupne površine Europe. U 80% poljoprivrednih zemljišta Europe, pronađeni su ostaci pesticida. U slabije razvijenim zemljama Europe, česta su divlja, nekontrolirana odlagališta otpada koja predstavljaju značajan izvor onečišćenja tla (<http://www.fao.org/3/cb4894en/online/src/html/chapter-08-2.html>). Na slici 3.1. grafički je prikazan udio pojedinih onečišćivača tla na području Europe.



Slika 3.1. Glavni onečišćivači tla u Europi

Izvor: <https://www.hindawi.com/journals/jeph/2013/158764/>

4. Biološke metode sanacije onečišćenog tla

Postoje različite metode sanacije tla a to su biološka, kemijska, fizikalna i termalna remedijacija. Biološke metode remedijacije tla obuhvaćaju postupke bioremedijacije, fitoremedijacije i bioprozračivanja koje je zapravo oblik *in situ* bioremedijacije. Ovi postupci koriste mikroorganizme (bakterije, gljive, kvasci) i biljke kako bi se uklonio ili blokirao onečišćivač iz tla (Kisić, 2012).

4.1. Bioremedijacija

Bioremedijacija je metoda koja upotrebljava prirodno prisutne mikroorganizme ili kisik za razgradnju tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš (Vidali, 2001). Uključuje procese degradacije, uklanjanja, mijenjanja, imobilizacije i detoksikacije raznih onečišćujućih tvari iz okoliša djelovanjem bakterija, gljivica, algi i biljaka (Sharma, 2020). Mikroorganizmi mogu biti autohtoni na onečišćenom području ili mogu biti izolirani i doneseni na onečišćeno područje (Vidali, 2001). Mikroorganizmi imaju sposobnost biorazgradnje gotovo svih organskih i mnogih anorganskih onečišćivača (<https://www.nap.edu/read/2131/chapter/4>). Mikroorganizmi razgrađuju štetne spojeve putem kemijskih reakcija koje se normalno odvijaju kao dio njihovih metaboličkih procesa. Razgradnja štetnih spojeva je često rezultat djelovanja više različitih organizama. Budući da bioremedijacija može biti uspješna samo tamo gdje uvjeti okoliša dopuštaju rast i aktivnost mikroba, njena primjena često uključuje manipulaciju parametrima okoliša kako bi se osigurali povoljni uvjeti za njihov rast i razvoj ali i ubrzala razgradnja štetnih tvari (Vidali, 2001). Idealan ishod bioremedijacije je da se onečišćena mjesta mogu vratiti u prvobitna stanja bez ikakvog drugog štetnog utjecaja na okoliš (Zhang i sur., 2020).

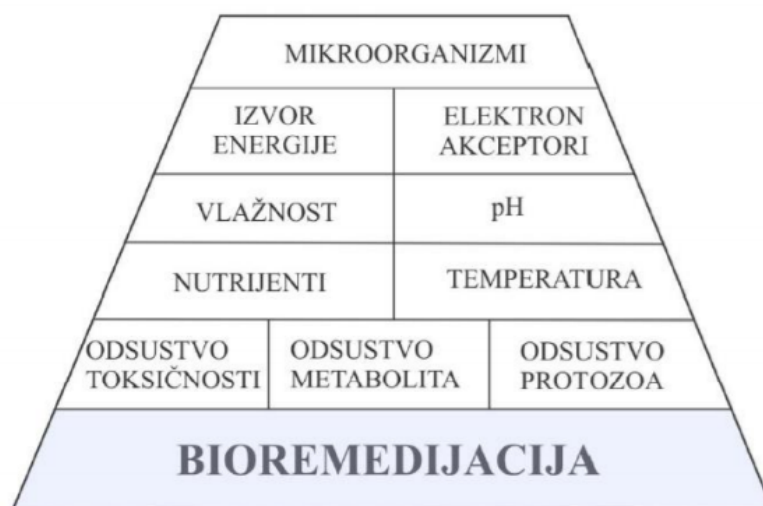
Bioremedijacijom se mogu ukloniti organski i anorganski onečišćivači. U skupinu organskih onečišćivača ubrajamo alkane, policikličke aromatske ugljikovodike (PAH), klorirane ugljikovodike, poliklorirane bifenile (PCB), heterocikličke aromatske spojeve, sintetičke materijale i drugo (Kensa, 2004). USA EPA izabrala je bioremedijaciju kao najprihvatljiviju metodu za sanaciju šumskih tala koja su onečišćena postojećim organskim onečišćivačima (Kisić, 2012). Za razliku od organskih tvari koje mikroorganizmi razgrađuju sve do CO₂ i vode, anorganske tvari kao što su teški metali nisu tako jednostavne za razgradnju. Ipak, pronađene su mnoge bakterije koje su tolerantne na štetan utjecaj visokih koncentracija teških metala zbog čega se primjena bakterija u bioremedijaciji teških metala sve više istražuje, a moguća je i primjena genetski modificiranih bakterija. Kako bi se poboljšala degradacija onečišćivača, u sklopu bioremedijacije moguća je primjena i kemijskih i fizikalnih metoda (Singh i Ward, 2004). Proces bioremedijacije može se odvijati u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima, mikroorganizmi se koriste kisikom te transformiraju onečišćivače do

manje toksičnih ili netoksičnih produkata. U anaerobnim uvjetima stvaraju se različiti produkti razgradnje no postoji mogućnost i nastajanja još toksičnijih spojeva.

Prije provedbe bioremedijacije potrebno je napraviti procjenu značajki onečišćujućih tvari, mjesta onečišćenja te broja i vrste mikroorganizama. Prilikom karakterizacije mjesta onečišćenja važno je utvrditi mehanički sastav i tip tla, zbijenost, pH i druge fizikalno-kemijske biološke uvjete u tlu. Osim toga, potrebno je definirati klimu te geološke i hidrogeološke uvjete koji prevladavaju na toj lokaciji. Na kraju, važno je provjeriti zakonske uvjete koji se odnose na sanaciju onečišćenog mjesta. Proces bioremedijacije započinje analizom onečišćenog tla a zatim odabirom mikroorganizama s obzirom na njihovu učinkovitost razgradnje. Bakterije prolaze niz analiza kojima se utvrđuje njihova otpornost na štetni utjecaj istraživanih onečišćivača. Dio odabranih mikroorganizama se ubacuje u tlo s visokom koncentracijom onečišćivača pri čemu dolazi do mikrobiološke razgradnje (Kisić, 2012).

5. Glavni čimbenici koji utječu na bioremedijaciju

Čimbenici koji utječu na proces razgradnje onečišćivača (Slika 5.1.) su mikroorganizmi (brojnost i raznolikost populacija, enzimska aktivnost), supstrat (fizikalno kemijske karakteristike, molekularna struktura i koncentracija) te niz okolišnih faktora (pH, temperatura, vlaga, izvor ugljika i energije) (Luka i sur. 2018).



Slika: 5.1. Čimbenici koji utječu na uspješnost bioremedijacije

Izvor: Marić, 2015.

Iako neki mikroorganizmi mogu obitavati u ekstremnim uvjetima, većina obitava u užem rasponu pH i temperature. Osim nutrijenata, rast i aktivnost mikroorganizama uvelike ovisi o pH, temperaturi, organskoj tvari, kisiku i vlazi tla. Temperatura i pH utječu na brzinu kemijskih reakcija dok je voda osnovna potreba svih živih organizama (Vidali, 2001). Na prisutnost vode, zraka i nutrijenata u tlu utječe struktura tla a kako bi se poboljšala dodaju se tvari kao što su gips i organska tvar. Zbijena tla sitnijih čestica kojima se teško može popraviti struktura nisu pogodna za *in situ* sanaciju (Vidali, 2001). Sadržaj organske tvari ima velik utjecaj na brojnost i raznovrsnost mikrobnih populacija. Parametri povoljni za mikrobiološku aktivnost prikazani su u tablici 5.1.

Tablica 5.1. Najpovoljniji okolišni parametri za mikrobiološku aktivnost

Parametri	Najpovoljniji uvjeti za mikrobiološku aktivnost	Optimalne vrijednosti za degradaciju naftnih derivata
Vlaga tla	25-28% retencijskog kapaciteta tla za vodu	30-90%
pH tla	5.5-8.8	6.5-8.0
Kisik	Aerobni uvjeti, pore ispunjene min. 10%	10-40%
Nutrijenti	N i P, za rast mikroorganizama	C:N:P=100:10:1
Temperatura / °C	15-45	20-30
Kontaminanti	Male količine	Ugljikovodici, 5-10% ukupne suhe tvari tla
Teški metali	2000ppm	700ppm
Tip tla	Nizak sadržaj gline ili mulja	

Izvor: Kensa, 2011

5.1. Mikroorganizmi

Ključni element prilikom bioremedijacije su mikroorganizmi. Mikroorganizmi putem oksido-redukcijskih reakcija aerobne i anaerobne respiracije osiguravaju energiju koja im je potrebna za rast i razmnožavanje (<https://www.nap.edu/read/2131/chapter/4>). Prema tome, u bioremedijaciji sudjeluju aerobne i anaerobne bakterije, lignolitičke gljive i metanotrofi (Arora, 2018). Bakterije koje imaju sposobnost aerobne degradacije onečišćivača kao što su naftni ugljikovodici i pesticidi su *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium* (Vidali, 2001). Anaerobne bakterije razgrađuju poliklorirane bifenile, trikloretilen i kloroform (Arora, 2018). Lignolitičke gljive kao što je *Phanaerochaete chrysosporium* mogu razgraditi širok raspon perzistentnih organskih toksičnih tvari (Vidali, 2001). Metanotrofi koji koriste metan kao izvor energije mogu razgraditi tvari kao što je trikloretilen i 1,2-dikloretnan (Arora, 2018).

5.2. Temperatura

Temperatura tla izravno utječe na brzinu metabolizma mikroorganizama i posljedično na aktivnost mikroorganizama u okolišu. Mikrobiološka razgradnja onečišćivača u određenoj mjeri raste s porastom temperature tla, a s padom temperature usporava (Addams i sur., 2015). Temperatura tla ima važnu ulogu u apsorpciji teških metala. Promjene temperature utječu na stabilnost metalnih iona, kapacitet biosorpcije, ravnotežni kapacitet i brzinu difuzije adsorbenata preko vanjskog staničnog zida bakterije (Ayangbenro i Babalola, 2017).

Temperatura utječe i na adsorpciju pesticida tako što mijenja topljivost i hidrolizu pesticida u tlu. To uvelike ovisi o molekularnoj strukturi pesticida. Kako su procesi adsorpcije egzotermni, a procesi desorpcije endotermni, očekuje se da će se adsorpcija smanjiti s porastom temperature s odgovarajućim povećanjem topljivosti u pesticidima. Aktivnost mikroba potiče se povišenjem temperature tla, a neke mikrobne skupine dominiraju u određenim temperaturnim rasponima. Maksimalan rast i aktivnost mikroorganizama u tlima javlja se pri 25–35 ° C, a razgradnja pesticida optimalna je u rasponu mezofilnih temperatura od oko 25–40 ° C (Chowdhury i sur., 2018).

5.3. pH

Važan parametar za razgradnju kontaminanata a posebno za mobilizaciju teških metala je pH tla. Učinak pH na razgradnju teških metala, očituje se promjenama bioraspoloživosti i pokretljivosti metalnih iona (Chowdhury i sur., 2018). U bioremedijaciji teških metala pri povećanoj koncentraciji vodikovih iona u tlu, veća je nabijenost bakterijskog staničnog zida. Time se smanjuje privlačnost između metalnih kationa i bakterija te se povećava biopristupačnost i toksičnost teških metala (Ayangbenro i Babalola, 2017). Za razliku od vodenih ekosustava, pH tla može biti veoma varijabilan i kretati se već od pH 2.5 do 11.0. Većina heterotrofnih mikroorganizama i gljiva preferira pH bliže neutralnom dok su gljive tolerantnije na kiseliije uvjete pa takav pH tla nerijetko određuje koje vrsta mikroorganizama može sudjelovati u biorazgradnji (Chandra i sur., 2012). Kako bi se optimizirali eventualno nepovoljni uvjeti vezani uz reakciju tla, može se dodati vapno ili amonijev sulfat (Sofilić, 2014).

5.4. Vlažnost tla

Voda je neophodna za rast mikroorganizama, pa ispod određenog sadržaja vlage u tlu ne može doći do biorazgradnje (Bobić, 2005). Ako je tlo jako suho, rast i metabolizam bakterija biti će uvelike smanjeni ili čak inhibirani (Chowdhury i sur., 2018). Prisutnost vode u tlu utječe na difuziju vode i u njoj otopljenih hranjivih tvari u stanicama mikroorganizama (<https://waterquality.montana.edu/energy/cbm/lit-reviews/bioremed-soil.html>).

Najpovoljnija vlažnost tla za proces bioremedijacije je između 30 i 90%. Ako se udio vlage smanji ispod 10% mikroorganizmi ugibaju. Prevelika vlažnost tla smanjuje udio kisika pri čemu mogu nastati anaerobni uvjeti u koji nisu povoljni za razgradnju većine ugljikovodika (Vidali, 2001). Prilikom razgradnje pesticida, voda djeluje kao otapalo za kretanje i difuziju pesticida i ključna je za funkcioniranje mikroba (Chowdhury i sur., 2018).

5.5. Kisik u tlu

Količina dostupnog kisika odredit će jesu li u tlu aerobni ili anaerobni uvjeti (Vidali, 2001). Mikroorganizmi u aerobnim uvjetima procesom aerobne respiracije razgrađuju organsku tvar pri čemu nastaju CO₂ i voda. U anaerobnim uvjetima odvija se proces anaerobne respiracije u kojemu razgradnjom onečišivača mogu nastati štetni produkti kao što su elementarni dušik ili metan (<https://www.nap.edu/read/2131/chapter/4>). Kisik je neophodan za početnu reakciju razgradnje ugljikovodika te u njegovoj prisutnosti dolazi do potpune razgradnje ulja. Ako su prisutne velike količine ulja, kisik u tlu će se vrlo brzo potrošiti što dovodi do anaerobnih uvjeta u kojima je potrebno dulje vremensko razdoblje za sanaciju. Većina je onečišivača razgradljivija u aerobnim uvjetima, no neki su spojevi podložniji razgradnji u anaerobnim uvjetima (Thapa i sur., 2012). Da bi se povećala količina kisika u tlu, primjenjuje se oranje ili bioventilacija. U nekim se slučajevima u tlo može unijeti vodikov ili magnezijev peroksid kao izvor kisika (Vidali, 2001).

5.6. Hranjive tvari

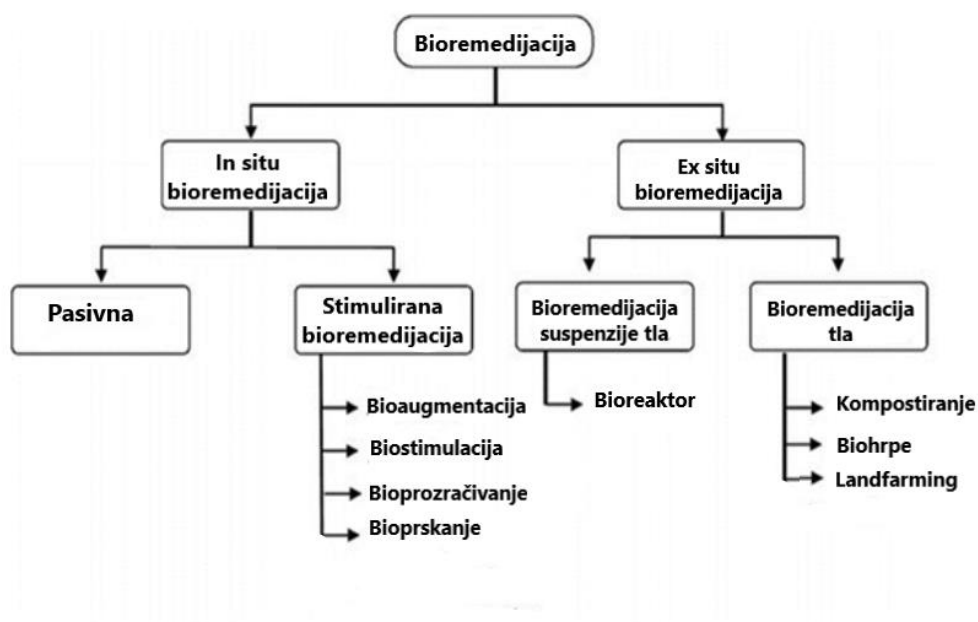
Iako se u onečišćenom tlu nalaze autohtoni mikroorganizmi, oni se možda ne nalaze u dovoljnoj količini kako bi uspješno provodili bioremedijaciju. Iz tog razloga, u tlo se dodaju nutrijenti koji potiču razmnožavanje i razvoj bakterija, te njihovu sposobnost da stvaraju enzime kojima razgrađuju onečišćujuće tvari u tlu (Kensa, 2011). Općenito, nedostatak hranjivih tvari (C, N, P, K, S) i elemenata u tragovima, mogu biti uzrokom slabe razgradivosti nekog onečišivača (Bobić i sur., 2005). Dušik je primjer hranjive tvari koja se u kopnenom okruženju nalazi u mnogim oblicima. To je esencijalni hranjivi sastojak koji ubrzava rast i aktivnost mikroorganizama a time i mikrobiološku razgradnju, posebno u tlima onečišćenim naftnim ugljikovodicima (Koshlaf i sur., 2017). Hranjive tvari se dodaju u tlo dodatkom organskih ili mineralnih gnojiva (Beškoski i sur., 2012).

5.7. Organska tvar i tekstura tla

Organska tvar služi kao skladište ugljika i energije, kao i izvor drugih makronutrijenata poput dušika, fosfora i sumpora (Boopathy, 2000). Ugljik je osnovni gradivni element živih bića i potreban je u većim količinama od ostalih elemenata. Uz vodik, kisik i dušik čini oko 95% mase stanica mikroorganizama (Kensa, 2011). Sadržaj organske tvari tla utječe na dostupnost onečišivača mikroorganizmima a time i na razgradnju onečišivača. Dodatak organske tvari prilikom bioremedijacije tla onečišćenog naftnim ugljikovodicima pospješuje njihovu razgradnju (Atagana, 2008., Abioye i sur., 2012). Osim nafte, dodatak organske tvari pozitivno djeluje i na razgradnju pesticida. Na primjer Chowdhury i sur., 2018. navode kako je dodatak organskih materijala poplavljenim tlima pospješio bakterijsku razgradnju nekih organoklornih insekticida poput BHC, DDT, metoksiklora i heptaklora. Tekstura i struktura tla utječe na permeabilnost te sadržaj vlage i kisika u tlu. Na primjer, tla koja se sastoje od manjih čestica (glinasta tla) imaju otežanu distribuciju vlage i kisika, što dovodi do slabe biološke aktivnosti. Tekstura takvog tla može se popraviti dodatkom slame i piljevine (Koshlaf i sur., 2017).

6. Vrste bioremedijacije

Dva su načina na koja se provodi tehnologija bioremedijacije: *in situ* ili *ex situ*. Slika 6.1. prikazuje podjelu *ex situ* i *in situ* metode bioremedijacije.



Slika 6.1. Metode bioremedijacije

Izvor: Sharma, 2020.

6.1. In situ bioremedijacija

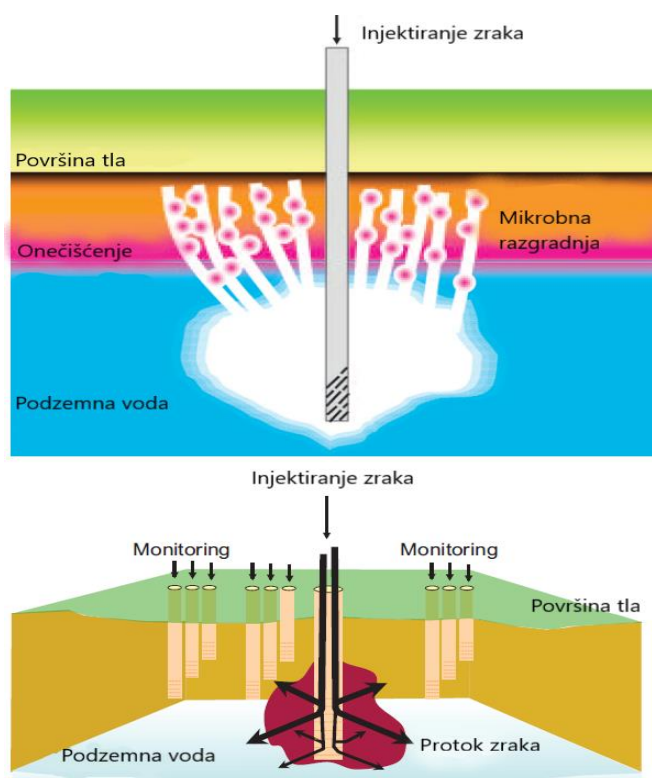
In situ bioremedijacija obuhvaća upotrebu autohtonih mikroorganizama koji se opskrbljuju hranjivim tvarima i kisikom na mjestu onečišćenja radi djelotvornije razgradnje (Kisić, 2014). In situ bioremedijacija može biti pasivna ili stimulirana.

Pasivna bioremedijacija (eng. *Intrinsinc bioremediation*) odnosno prirodno slabljenje ili smanjenje onečišćenja je zapravo proces prirodne degradacije koju provode autohtoni mikroorganizmi (da Silva i sur., 2020). Ona uključuje sve biološke, kemijske i fizikalne procese kojima se neka onečišćujuća tvar transformira u bezopasan oblik ili imobilizira ispod površine tla (Antizar – Ladislao, 2010). Ne primjenjuju se dodatne faze kao kako bi se ubrzao proces biološke razgradnje no često se primjenjuje dodavanje raznih aditiva kao što su kalcijevi i magnezijevi spojevi te zeoliti u svrhu stabilizacije onečišćenja (Kisić, 2012). Učinkovitost ove metode često je ograničena dostupnošću hranjivih sastojaka. Uz to, na mjestu onečišćenja možda neće biti prisutne mikrobne zajednice koje učinkovito razgrađuju onečišćenje (Koshlaf i sur., 2017). Kako bi ova metoda bioremedijacije bila uspješna, uvjeti u tlu trebaju biti pogodni

za mikrobiološku razgradnju onečišćivača (da Silva i sur., 2020). Osim navedenog, nedostatak ove metode je što se uvjeti u tlu mogu slabo kontrolirati. Vrlo je važno onemogućiti ispiranje štetnih tvari u podzemne vode, ali i druge sustave kako se onečišćenje ne bi dalje širilo (Beškoski i sur., 2012).

Stimulirana bioremedijacija (eng. Engineered bioremediation) obuhvaća tehnike kao što su **bioprozračivanje**, **bioprskanje**, **bioaugmentacija** i **biostimulacija** (da Silva i sur. 2020).

Bioprozračivanje (eng. *bioventing*) i **bioprskanje** (eng. *biosparging*) su slične metode (Slike 6.2. i 6.3.) kojima se u tlo upuhuje zrak, kisik ili metan. Strujanjem ovih plinova, pojačava se isparavanje organskih onečišćujućih tvari dok se istovremeno stvaraju povoljni uvjeti za aerobnu mikrobnu razgradnju manje hlapivih spojeva (Antizar – Ladislao, 2010). Osim plinova moguć je dodatak i nutrijenata u tlo (Johnson i sur., 2001). Upuhivanje kisika u nesaturiranu zonu tla naziva se bioprozračivanje a upuhivanje u saturiranu zonu bioprskanje (Antizar-Ladislao, 2010). Dakle, bioprskanje se koristi prilikom onečišćenja podzemne vode a bioprozračivanje prilikom onečišćenja tla (Johnson i sur., 2001).



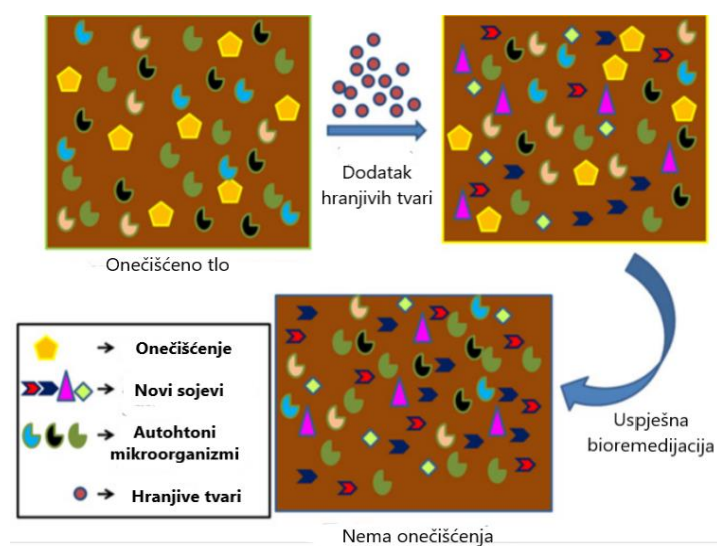
Slika 6. 2. Bioprskanje i Bioprozračivanje

Izvor: <https://frtr.gov/matrix/Bioventing/8>

Bioprskanje i bioprozračivanje pokazale su se veoma uspješnima kod sanacije tala i podzemnih voda onečišćenih naftom, aromatskim ugljikovodicima i hidrauličkim uljima (Kumar i sur., 2018). Primjerice, Österreicher-Cunha i sur. (2004) utvrdili su da bioprozračivanje pozitivno utječe na mikrobiološku razgradnju benzina i etanola u tlu. Osim navedenog, Frutos i sur. (2010) su primijenili ovu metodu za bioremedijaciju tla onečišćenog fenantrenom što je

rezultiralo gotovo potpunom razgradnjom ovog aromatskog spoja. Kao i sur. (2008) utvrdili su da biosparging metoda učinkovito uklanja BTEX iz podzemnih voda.

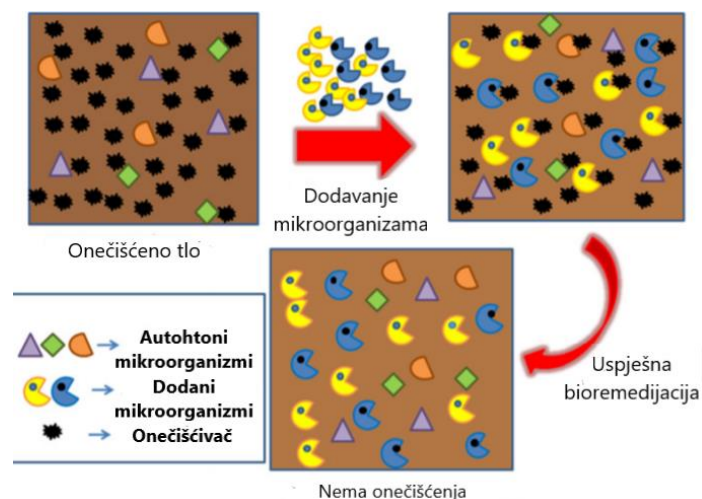
Biostimulacija (Slika 6.3.) je dodavanje hranjivih tvari autohtonim bakterijama koje imaju sposobnost razgradnje štetnih tvari u tlu (Joo i sur, 2004). Ovaj postupak ubrzava razgradnju štetnih tvari pod uvjetom da su u tlu optimalni uvjeti pH, temperature, kisika i vlage (Antizar - Ladislao i sur., 2018). Biostimulacija je jedna od najvažnijih metoda kojima se uklanjaju naftni ugljikovodici. S obzirom da nafta predstavlja izvor ugljika, dodatak kisika i drugih hranjiva rezultirati će uspješnom razgradnjom nafte (Goswami i sur. 2018).



Slika 6.3. Biostimulacija

Izvor: Goswami i sur., 2018

Bioaugmentacija (Slika 6.4.) je tehnika u kojoj se autohtonim mikroorganizmima dodaju posebno odabrani sojevi mikroorganizama koji će sudjelovati u razgradnji štetnih tvari u tlu. Mogu se dodati čiste ili miješane kulture mikroorganizama. Bioaugmentacija se može primjenjivati i *ex situ* (Antizar- Ladislao i sur., 2010). Uspješnost ove metode primarno ovisi o prilagodbi unesenih mikroorganizama na abiotičke uvijete u tlu kao i na autohtone mikroorganizme. Najčešće se upotrebljava prilikom bioremedijacije tla onečišćenog naftom i naftnim derivatima (Goswami i sur., 2018).



Slika 6.4. Bioaugmenacija

Izvor: Goswami i sur. 2018

Fan i sur. (2013) utvrdili su da se dizelsko gorivo u tlu može razgraditi prirodnim putem autohtonim mikroorganizmima no primjenom augmentacije ovaj proces je znatno brži i učinkovitiji. Istraživanje koje su proveli Varjani i Upasani (2019) pokazuje koliko je učinkovita primjena i bioaugmentacije i biostimulacije prilikom bioremedijacije tla onečišćenog naftom. Dodatak hranjiva i pogodnih bakterijskih kultura onečišćenom tlu, rezultirao je brzom i učinkovitom degradacijom naftnih ugljikovodika. Suprotno tome, upotreba svake metode zasebno nije dala zadovoljavajuće rezultate. Ramondo i sur. (2020) utvrdili su da primjenom biostimulacije i bioaugmentacije dolazi do učinkovite mikrobiološke razgradnje lindana u tlu što znači da su ove dvije metode uspješne i u bioremedijaciji tla koje je onečišćeno pesticidima.

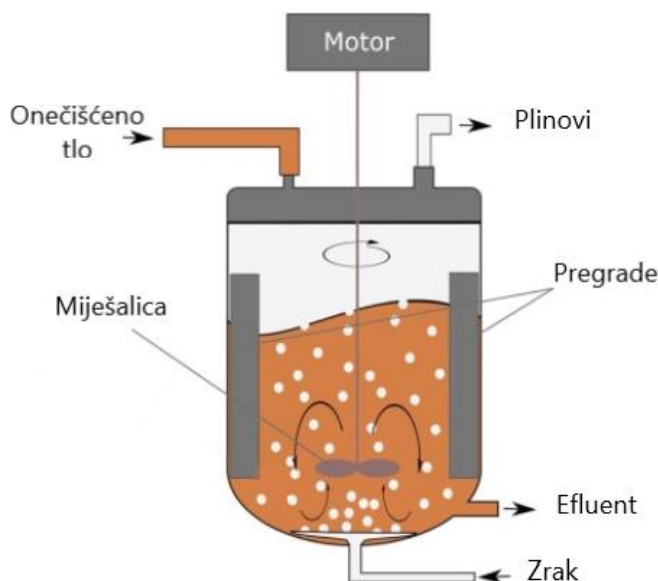
Metode *in situ* bioremedijacije imaju svoje prednosti ali i nedostatke. *In situ* metoda bioremedijacije općenito se smatra jeftinijom metodom jer nema troškova iskopa i prijevoza onečišćenog tla (Azubuike i sur., 2016). S obzirom da nema iskopa onečišćenog tla, ne dolazi do narušavanja fizikalnih, kemijskih i bioloških značajaka u tlu. Metode *in situ* mogu se primjenjivati u kombinaciji s drugim kemijskim ili fizikalnim metodama te se mogu primjenjivati i u sanaciji onečišćenih voda (Boopathy, 2000). Nedostatak primjene bioremedijacije *in situ* je instalacija opreme za monitoring onečišćenog područja koja može biti prilično skupa. Također, potrebno je opsežno i dugotrajno motrenje mjesta onečišćenja.

6.2. *Ex situ* bioremedijacija

Ex situ bioremedijacija uključuje **bioreaktore, biološke hrpe, kompostiranje i landfarming** (da Silva i sur., 2020).

Bioreaktori (Slika 6.5.) su zatvoreni sustavi u kojima se odvijaju biološke reakcije razgradnje onečišćujućih tvari. Bioremedijacija u bioreaktorima uključuje obradu kontaminiranog čvrstog materijala (tla, sedimenta, mulja) ili vode (Kensa, 2011). Dodaju se mikroorganizmi i nutrijenti te se održavaju optimalni uvjeti temperature, zraka i pH, kako bi

se osigurao i ubrzao rast i razvoj mikroorganizama koji su ključni za učinkovitu mikrobiološku razgradnju (Azubuike i sur., 2016).

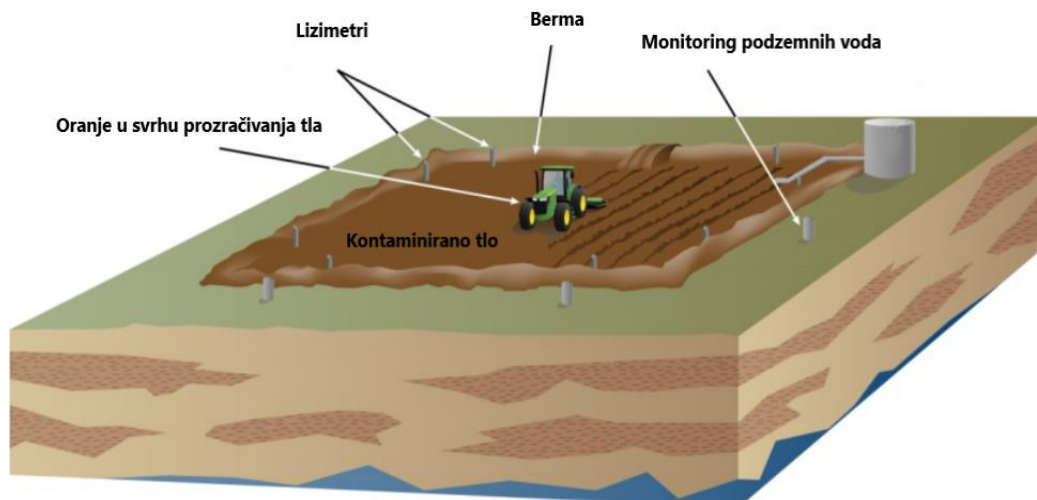


Slika 6.5. Bioreaktor

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030438941730434X>

Primjenjuju se prilikom bioremedijacije tla i vode onečišćenih pesticidima, teškim metalima te sirovom naftom i njenim produktima npr. BTEX (Azubuike i sur., 2016). Obradom onečišćenog tla u biorektoru značajno se smanjila koncentracija alkana i aromatskih ugljikovodika (Bhattacharya i sur. 2015). Istraživanjem koje su proveli Chikere i sur. (2011) utvrđena je učinkovitost bioreaktora u smanjenju koncentracije aromatskih ugljikovodika. Osim navedenih, u bioreaktorima se uspješno odvija i mikrobiološka razgradnja pesticida karbofurana što je navedeno u istraživanju Plangklang i Reungsang (2010).

Landfarming (Slika 6.6.) je jednostavna tehnika bioremedijacije gdje se onečišćeno tlo iskopa, rasprostire na pripremljenu nepropusnu površinu i formira u tzv. gredice. Tijekom procesa dodaju se nutrijenti i voda te se tlo ore u određenim vremenskim razmacima kako bi se prorahlilo odnosno prozračilo. Može se izvoditi i *in situ*. Iako je ovo veoma jednostavna metoda, ponekad je teže izvediva jer je potrebna velika površina na kojoj će se izvoditi (Kumar i sur., 2018). Kriteriji prema kojima se odabire teren na kojem će se izvoditi *Landfarming* su: minimalno 3 metra razmaka između površine tla i podzemnih voda i nagib terena ne smije biti više od 8% (Thapa i sur., 2012).

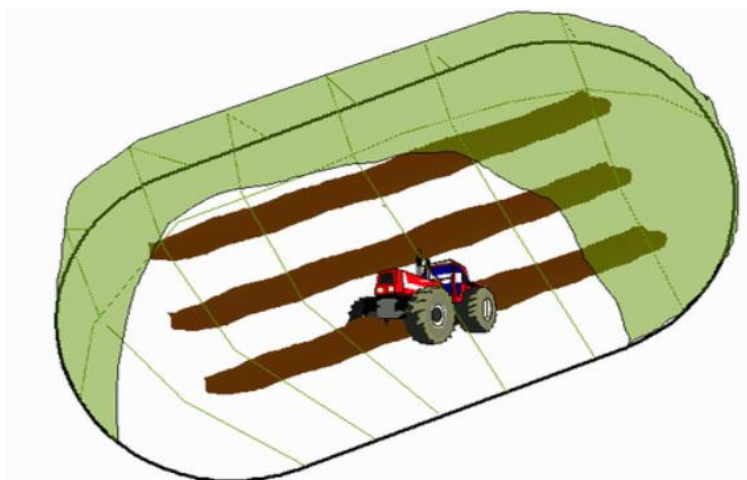


Slika 6.6. Landfarming

Izvor: https://www.enviro.wiki/index.php?title=File:Kamath1w2_Fig7.PNG

Ova metoda se uglavnom koristi prilikom sanacije tala onečišćenih naftnim uljem i mazivima, naftnim ugljikovodicima i pesticidima (Azubuike i sur., 2016). Paudyn i sur. (2008) uspješno su proveli sanaciju onečišćenog tla dizelskim gorivom ovom metodom a McCarthy i sur. (2004) ovom metodom sanirali su tlo onečišćeno naftnim ugljikovodicima. Kako navode Picado i sur. (2001), *landfarming* metoda se može primijeniti i u sanaciji tala onečišćenih PAH-ovima.

Kompostiranje (Slika 6.7.) je metoda bioremedijacije u kojoj se onečišćeno tlo miješa sa stajnjakom ili drugim poljoprivrednim otpadom. Autohtoni mikroorganizmi održavaju temperaturu kompostiranja koja je između 55°C i 65°C. Nakon što mikrobi iskoriste hranjiva dobivena organskim otpadom, slijedi degradacija štetnih tvari (Kumar i sur., 2018). Dva najčešća načina kompostiranja su kompostiranje hrpa gdje se kompost oblikuje u hrpe koje se prozračuju puhalicama ili vakuumskim pumpama i kompostiranje gredica (eng. *windrow composting*) gdje se kompost stavlja u dugačke hrpe koje se miješaju radnim strojevima (da Silva i sur., 2020).

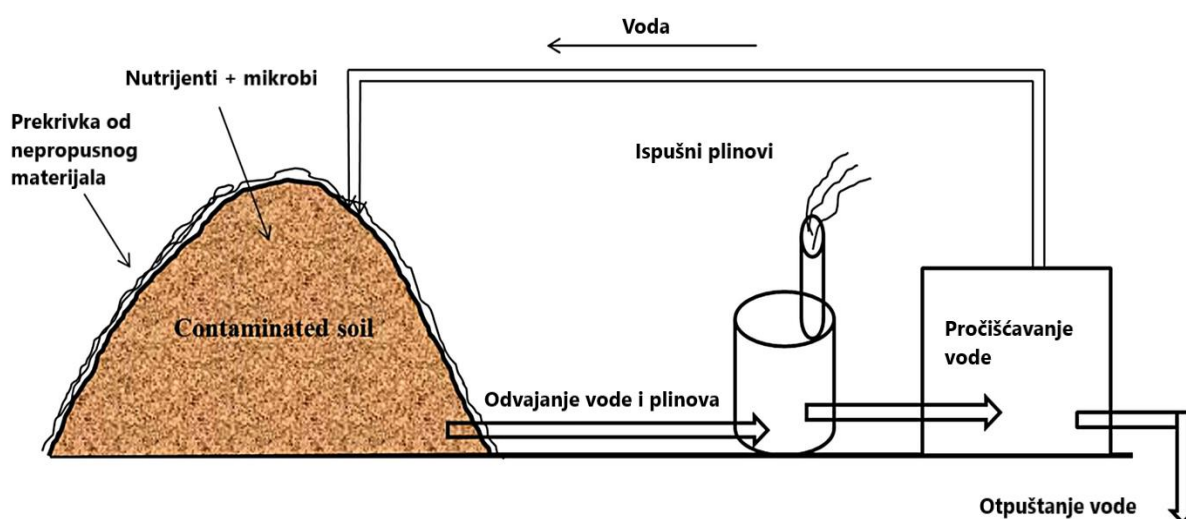


Slika 6.7. Kompostiranje

Izvor: <http://learnbioremediation.weebly.com/composting.html>

Ova metoda bioremedijacije može se provoditi prilikom sanacije tla onečišćenih pesticidima, TNT-om, kreozotom, kloriranim ugljikovodicima i naftnim ugljikovodicima. Ahtiainen i sur. (2002) u svojem istraživanju dokazuju učinkovitost kompostiranja u degradaciji kreozota. U istraživanju Leech i sur. (2020) uspješno je provedena sanacija tla onečišćenog policikličkim aromatskim ugljikovodicima. Atagana (2008) utvrđuje da se kompostiranjem uspješno može provesti bioremedijacija tla onečišćenog naftnim ugljikovodicima.

Biološke hrpe (eng. *biopiles*) (Slika 6.8.) je metoda bioremedijacije koja je zapravo kombinacija kompostiranja i *landfarming* metode. Onečišćeno tlo se iskopa, miješa s kompostom i stavlja na prethodno pripremljenu površinu. Kompleksan sustav sastoji se od cijevi koje dovode vodu, kisik i nutrijente te odvoje procjedne vode. Hrpe tla mogu biti visoke i do 6 metara a pokrivaju se nepropusnim materijalom kako bi se spriječilo otjecanje ili isparavanje hlapivih spojeva (Sardrood i sur. 2012). Također, pokrivanje hrpi može biti korisno u krajevima gdje su niske temperature jer pomažu u zadržavanju topline unutar hrpi a time i aktivnosti mikroorganizama (Azubuike i sur., 2016).



Slika 6.8. Biološke hrpe

Izvor: Sardrood i sur., 2012

Ova *ex situ* metoda najviše utječe na mikrobiološku razgradnju naftnih derivata (da Silva i sur. 2020). Istraživanja metode sanacije tla u biohrpama nerijetko se provode u hladnijim klimama. Alvarez i sur. (2017), uspješno su proveli sanaciju onečišćenog tla dizelom na Antarktici koristeći biohrpe prekrivene polietilenskim nepropusnim prekrivkama. Kim i sur. (2018) proveli su postupak bioremedijacije na području Kanade. Tlo je bilo onečišćeno naftnim ugljikovodicima, a provedbom bioremedijacije u biohrpama, njihova se koncentracija značajno smanjila.

Prednosti primjene *ex situ* metoda bioremedijacije jesu to što se mogu upotrijebiti u sanaciji većeg broja kontaminanata u kontroliranim uvjetima zbog čega dolazi do veće stope

biorazgradnje nego u in situ metodama. Nadalje, zahvaljujući mogućnosti homogenizacije onečišćenog tla, postupak postaje ujednačeniji i kraćeg trajanja (da Silva i sur., 2020). Također, ovaj tip bioremedijacije se lakše kontrolira te omogućuje razgradnju šireg spektra tvari (Kisić, 2014). Nedostaci primjene bioremedijacije *ex situ* očituju se u tome što je ponekad teško naći dovoljno prostora za provedbu *ex situ* metoda na mjestu onečišćenja. Osim toga, često su skuplje zbog troškova iskopa i prijevoza (Kensa, 2011).

7. Prednosti i nedostaci bioremedijacije

Budući da je bioremedijacija prirodna metoda sanacije onečišćenih tala, njeni pozitivni učinci za okoliš su sljedeći:

- Ekonomičan i ekološki prihvatljiv pristup sanaciji onečišćenih tala.
- Bioremedijacija je korisna za potpuno uništavanje širokog spektra onečišćenja.
- Nema potrebe za iskopom tla, zbog čega ne dolazi do značajnijeg narušavanja fizikalnih, kemijskih i bioloških značajki u tlu (Kensa, 2011).
- Postupak bioremedijacije je jeftiniji način smanjenja onečišćivača u tlu u odnosu na druge fizikalne i kemijske metode.
- Može se primjenjivati u kombinaciji s drugim kemijskim i fizikalnim metodama (Vidali, 2001).

Jedan od odličnih primjera primjene bioremedijacije nalazi se u Londonu. Lokacija današnjeg Olimpijskog parka bila je iznimno onečišćena industrijskom aktivnošću. Bioremedijacijom je sanirano 1,7 milijuna kubičnih metara onečišćenog tla nakon čega se izgradio sportski kompleks za održavanje Olimpijskih igara u Londonu 2012. godine (<https://microbiologysociety.org/blog/bioremediation-the-pollution-solution.html>)

Osim navedenih prednosti, ova metoda ima i neke nedostatke:

- Neke onečišćujuće tvari ne podliježu mikrobiološkoj razgradnji ili je ona izrazito spora.
- Teško se primjenjuje u glinastim tlima zbog nepovoljnih vodozračnih odnosa i slabe mikrobiološke aktivnosti.
- U usporedbi s nekim kemijskim i fizikalnim metodama, bioremedijacija je duljeg trajanja.
- Moguć nastanak toksičnijih spojeva kao produkta mikrobiološke razgradnje.
- Prije primjene bioremedijacije potrebna su iscrpna i dugotrajna istraživanja te ponekad rezultati dobiveni u laboratoriju nisu jednaki onima na terenu (Kensa, 2011).

8. Primjena bioremedijacije u sanaciji onečišćenih tala

8.1. Bioremedijacija naftom onečišćenih tala

Nafta je prirodna tvar akumulirana u Zemljinoj kori, tekućina svijetložute do tamnosmeđe boje i posebnog mirisa. U sirovoj nafti identificirano je više od 17 000 različitih spojeva što je čini možda i najkompleksnijom prirodnom smjesom organskih tvari. Udio ugljikovodika u nafti veći je od 75%. Ugljikovodici koji se nalaze u nafti pripadaju skupinama alkana (parafina), cikloalkana (naftena) i aromatskih ugljikovodika (Mendušić, 2012). Od aromatskih ugljikovodika najzastupljeniji su benzen, toluen, etilbenzen, ksilen. Skraćeno ih se naziva BTEX (Marić, 2015). Uz navedene spojeve, u nafti su prisutni fenoli, masne kiseline, ketoni, esteri, porfirini i smole (piridini, kinolini, karbazoli, sulfoksidi i amidi) (Koshlaf i sur., 2017). Najčešći izvori onečišćenja su ispuštanje iz postrojenja za preradu i rafiniranje nafte, izlijevanje nafte iz tankera te nesreće tijekom transporta. Sirova nafta transportira se na velike udaljenosti kopnenim cjevovodom, tankerima, cisternama, zrakoplovima stoga se često događaju nesreće pri kojima dolazi do izlijevanja nafte (Thapa i sur., 2012). Kontaminacija vode i tla izlijevanjem sirove nafte je rastući problem na globalnoj razini. Tlo kontaminirano naftom ozbiljno ugrožava ljudsko zdravlje, uzrokuje organsko onečišćenje podzemnih voda što ograničava njezinu uporabu, uzrokuje gospodarske gubitke, ekološke probleme i smanjuje poljoprivrednu produktivnost tla (Thapa i sur., 2012). Utjecaj nafte na životinjski svijet je velik. Kada ulje dospije u probavni trakt životinja može doći do promjena u radu jetre i oštećenja bubrega. Bez ljudske intervencije, većina ptica pogođenih izlijevanjem nafte ugiba (Adams i sur., 2015). Primjerice, izlijevanjem nafte u Meksičkom zaljevu uginulo je stotine tisuća ptica i riba a ljudi koji žive na obali Meksičkog zaljeva ostali su bez glavnog izvora prihoda koji im je donosio ribolov (<https://www.britannica.com/event/Deepwater-Horizon-oil-spill>).

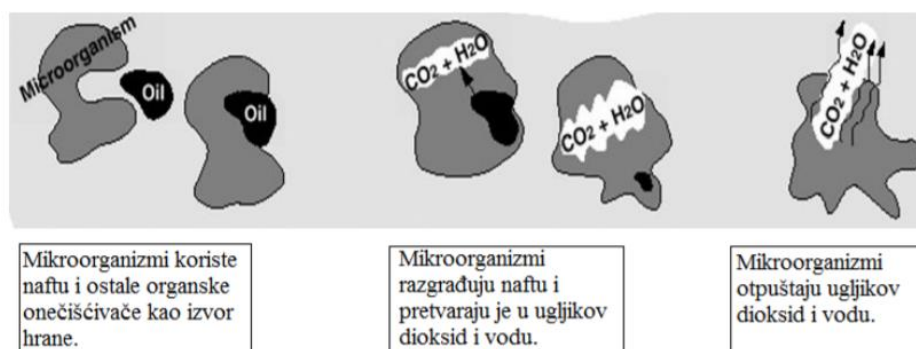
Rodovi mikroorganizama koje mogu razgraditi naftu su:

a) bakterije: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Beijerinckia*, *Flavobacteria*, *Nocardia*, *Ochrobacteria*, *Corynebacteria*, *Atinetobacter*, *Mycobactena*, *Modococci*, *Streptomyces*, *Bacilli*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Cyanobacteria*,

b) kvasci: *Rhodotorulla*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Aureobasidium* te

c) plijesni: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* i *Phanerochaete* (Thapa i sur., 2012, Kuhad i Gupta, 2009).

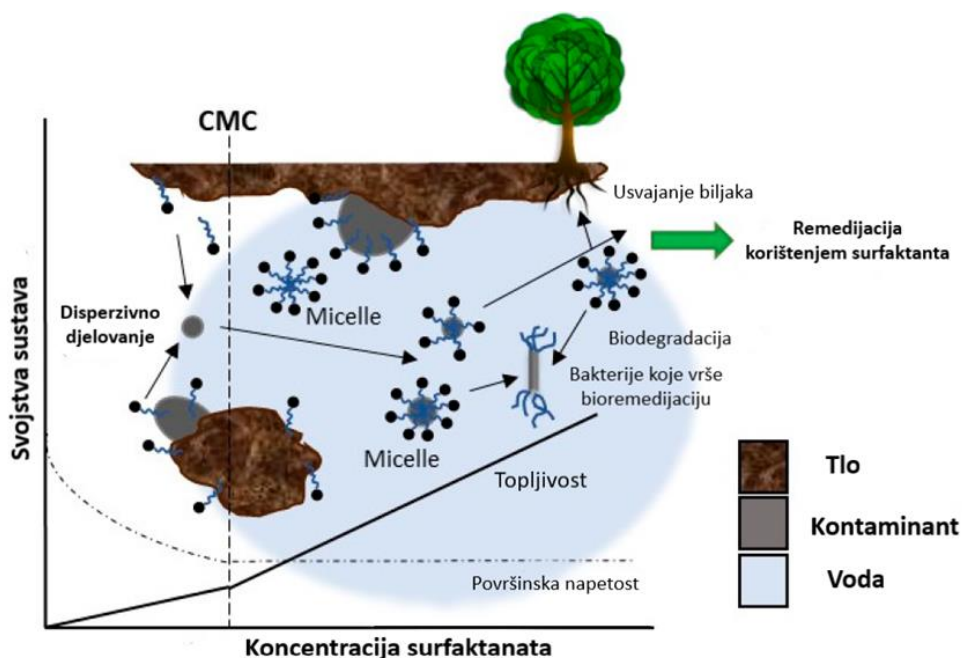
Ugljikovodici lakše strukture i manje molekulske mase, podložniji su enzimskoj degradaciji dok se teži i kompleksniji spojevi teže razgrađuju. Iz tog razloga, potrebno je zajedničko odnosno sinergijsko djelovanje različitih bakterijskih sojeva kako bi se naftni ugljikovodici preveli do neškodljivog CO₂ i vode (Bertović, 2016). (Slika 8.1.)



Slika 8.1. Proces bioremedijacije tla onečišćenog naftom

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-degradation-of-oil-by-microbes_fig4_281738389

Mikrobiološka razgradnja nafte može se pospješiti dodatkom surfaktanata. (Slika 8.2.) To su spojevi koji smanjuju površinsku napetost vode i povećavaju topljivost tvari. Kod onečišćenja tla naftom, ugljikovodici u tlu vežu se na čestice tla pa upotreba surfaktanata potpomaže desorpciju onečišćenja i povećava njihovu biopristupačnost mikroorganizmima. Isto tako, korisno je u tlo dodati sojeve bakterija koje uz sposobnost degradacije ugljikovodika, kao produkt stvaraju glikolipide koji djeluju kao surfaktanti (Bertović, 2016). Na primjer, bakterije roda *Pseudomonas aeruginosa* sintetiziraju ramnolipide a bakterije roda *Rhodococcus* sintetiziraju trehalolipide (Beškoski, 2012). Surfaktanti mogu biti i sintetski kao što su je Polisorbat80, Brij30 ili Triton X-100 (Odukkathil i Vasudevan, 2013).



Slika 8.2. Prikaz djelovanja surfaktanata

Izvor: da Silva i sur. (2020).

Prilikom sanacije tla onečišćenog naftom, mnoge *in situ* ili *ex situ* metode su se pokazale uspješnim. Kod površinskih onečišćenja tla kod kojih se može spriječiti volatilizacija i otjecanje onečišćujućih tvari u podzemne vode, primjenjuje se uglavnom *landfarming* metoda sanacije. Ako se radi o izlivanju nafte puknućem cjevovoda, naftnih spremnika ili prodiranjem nafte u duboke slojeve tla, primjenjuje se bioprozračivanje. Ako se područje ne može osigurati od širenja onečišćenja, potrebno je tlo iskopati i prevesti na drugo mjesto sanacije. Preporučuju se *ex situ* metode kao što su sanacije onečišćenog tla primjenom postupaka u bioreaktorima, biohrpama, kompostiranju i *landfarming* (Singh i Ward, 2004).

Znanstvenici su istraživali učinkovitost bioremedijacije na raznim lokacijama u svijetu. Molano i sur. (2018) su na eksploatacijskom polju Caracara u Kolumbiji proveli postupak bioremedijacije naftnog mulja. Onečišćenom tlu dodane su kulture mikroorganizama i organska tvar nakon čega se je formiralo u hrpe koje su se prekrile nepropusnim materijalom. Hrpe se mehanički miješaju. Rezultati analize početne smjese pokazali su koncentraciju masti i ulja u iznosu 20.6% a nakon procesa bioremedijacije koncentracija masti i ulja je iznosila 1.3%. Zbog jednostavnosti i niske cijene, ovaj postupak ponovljen je još nekoliko puta te se u periodu od 2012. do 2018. godine uspješno obradilo ukupno 12 000m³ tla onečišćenog naftnim muljem.

Mohn i sur. (2001) proveli su proces bioremedijacije biohrpama u Kanadi na lokacijama Cambridge bay i Yukon. Tlo onečišćeno dizelskim gorivom je iskopano, formirano u hrpe i prekriveno plastičnom folijom. Na svakoj lokaciji formirane su četiri hrpe. Jednoj je dodano gnojivo (N i P) i treset, drugoj gnojivo i mikroorganizmi a trećoj je dodano gnojivo, treset i mikroorganizmi. Četvrta hrpa nije bila tretirana ni sa čim i predstavljala je kontrolu. Nakon godinu dana, koncentracija dizelskog goriva u tlu na lokaciji Cambridge bay smanjila se sa 196mg/kg na manje od 10mg/kg a na lokaciji Yukon, koncentracija onečišćivača smanjila se sa 2109 mg/kg na 195mg/kg. Ovi rezultati su pokazali da bioremedijacija tla onečišćenog naftom može biti uspješna i u područjima polarne klime na kojima su nesreće izlivanja nafte iznimno česte.

Bertović (2016) u svom radu prikazuje proces sanacije onečišćenog područja benzinske postaje Petrinja naftnim ugljikovodicima. Bioremedijacija se obavila na lokaciji Moslavačka Gračenica a primjenjivala se *landfarming* metoda. Onečišćeno tlo je dovezeno i raspoređeno na vodonepropusnu površinu. Nakon toga su se formirale tzv. gredice. U onečišćeno tlo su unijeli preparat miješane kulture prirodnih mikroorganizama i enzima i surfaktant. Rahljenje i vlaženje zemlje provodilo se svakih sedam dana i ponavljalo sve dok koncentracije onečišćivača nisu dostignule ciljane vrijednosti, pri kojima se tlo više nije smatralo otpadom. Nakon mjesec dana, zabilježili su koncentracije PAH-ova i BTEX-a ispod granice detekcije. Koncentracija mineralnih ulja smanjila se za 40%. Ciljane koncentracije postignute su za 120 dana a očišćeno tlo iskoristilo se kao građevinski materijal.

8.2. Bioremedijacija tala ugroženih ostacima pesticida

Pesticid, odnosno zaštitno sredstvo je svaka tvar ili mješavina tvari namijenjena za sprečavanje, uništavanje ili suzbijanje štetočina, uključujući vektore bolesti ljudi ili životinja, neželjenih vrsta biljaka ili životinja koje uzrokuju štetu ili na neki drugi način ometaju proizvodnju, preradu, skladištenje ili transport hrane, poljoprivrednih proizvoda, drva i drvnih proizvoda ili hrane za životinje ili tvari koje se koriste kod životinja za kontrolu insekata, pauka ili drugih štetnika na ili u njihovom tijelu (FAO, 2005). Broj aktivnih tvari s pesticidnim djelovanjem je u stalnom rastu a danas se na tržištu nalazi više od 1500 vrsta. Prema kemijskoj strukturi, mogu se podijeliti na: organoklorne pesticide, organofosforne pesticide, karbamate, sintetičke pesticide i neonikotinoide. Najpoznatiji su organoklorni pesticidi DDT, aldrin, dieldrin, lindan, endosulfan i klordan. Oni su toksični, kancerogeni i vrlo otporni na kemijsku, fizičku ili biološku razgradnju. Iz tog razloga, njihova primjena zabranjena je Stockolmskom konvencijom u većini zemalja no i dalje se mogu otkriti u uzorcima hrane, vode i tla (Jurak, 2014). Primjena pesticida raširena je u svim zemljama a zbog visoke učinkovitosti i niske cijene, koriste se u velikim količinama u poljoprivredi (Đokić i sur., 2012). Pretjeranom upotrebom pesticida ugroženi su drugi, neciljani organizmi kao što su oprašivači (pčele, bumbari, bubamare, leptiri) (Jurak, 2014). Ovi kukci su od iznimne važnosti za poljoprivredu i bioraznolikost. Također, organoklorni pesticidi se nakupljaju u masnom tkivu i jetri životinja ili žumanjku jajeta te tako mogu dospjeti u ljudsko tijelo i uzrokovati glavobolju, gubitak svijesti, probleme s vidom, gubitak pamćenja i dr. Osim putem hrane, organoklorni pesticidi u ljudsko tijelo mogu dospjeti kroz kožu i inhalacijom (Đokić i sur., 2012).

Prilikom bioremedijacije tala onečišćenih pesticidima ističu se mnogi rodovi gljiva. Primjerice, *Phanerochaete chrysosporium* razgrađuje mnoge pesticide uključujući toksičan lindan, DDT, atrazin, aldrin, dieldrin i dr. Rodovi mikroorganizama koji mogu razgraditi pesticide su:

a) bakterije: *Bacillus* sp., *Flavobacterium*, *Bacterium raoultella* sp., *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* i

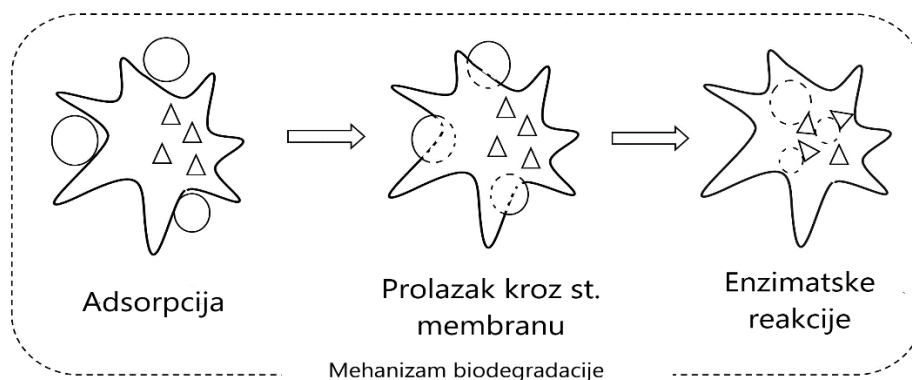
b) gljive: *Flammulina velutipes*, *Stereum hirsutum*, *Coriolus versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Hypholoma fasciculare*, *Auricularia auricula*, *Pleurotus ostreatus*, *Avatha discolor*, *Agrocybe semiorbicularis* i *Phanerochaete chrysosporium* (Odukkathil i Vasudevan, 2013).

Pesticidi se razgrađuju u manje toksične spojeve na nekoliko načina: enzimatskom razgradnjom (Slika 8.3.), kometabolizmom i mineralizacijom. Proces enzimatske razgradnje odvija se u tri faze:

Faza 1: Apsorpcija pesticida na površinu mikrobne stanice

Faza 2: Ulazak pesticida u stanicu

Faza 3: Enzimatska razgradnja pesticida



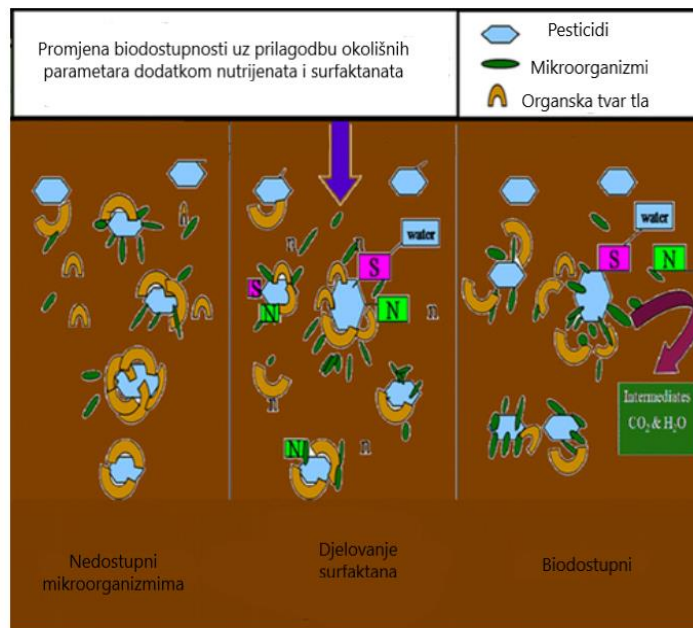
Slika 8.3. Mehanizam biodegradacije pesticida

Izvor: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2313>

Kometabolizam je sposobnost mikroorganizma da pretvara toksičan spoj u ne toksičan uz dodatak nekog izvora energije (organske tvari) a mineralizacija je proces degradacije pesticida u anorganske produkte CO_2 i vodu pri čemu organizam koristi spojeve pesticida kao izvor energije (Huang i sur., 2018). Zbog limitirajućih faktora u tlu, često dolazi do nepotpune razgradnje pesticida pri čemu nastaju još toksičniji spojevi koji mogu inhibirati rast i razvoj mikroorganizama u tlu. To će pak dovesti do slabije razgradnje pesticida u tlu (Weier i sur., 2006). Na primjer, razgradnjom DDT-a nastaju spojevi kao što su DDD i DDE koji su toksičniji i perzistentniji spojevi nego DDT (Foght i sur., 2001).

Za potpun učinak bioremedijacije tla onečišćenog ostacima pesticida uz povoljne okolišne uvijete za mikrobiološku aktivnost (pH, temperatura tla, vlažnost tla, tekstura tla, sadržaj organske tvari u tlu) potrebno je poznavati i biopristupačnost samog pesticida u tlu (prikazano na slici 8.4.). Biopristupačnost pesticida djeluje na bioremedijaciju na više načina:

- a) Pri niskoj koncentraciji pesticida u tlu može doći do stvaranja kataboličkih gena koji usporavaju bioremedijaciju.
- b) Pri niskoj koncentraciji pesticida i nedostatku nutrijenata, može doći do razgradnje pesticida no zbog nedostatka nutrijenata dolazi do slabe aktivnosti mikroorganizama i prema tome, slabije mikrobiološke razgradnje pesticida.
- c) S obzirom da se pesticidi često razgrađuju raznim enzimatskim reakcijama, pri nedostatku nutrijenata i mikroorganizama biti će i slabija enzimatska razgradnja pesticida.



Slika 8.4. Biološki pristupačni i nepristupačni ostaci pesticida u tlu

Izvor: Odukkathil i Vasudevan, 2013.

Kao što je navedeno u poglavlju 8.1., surfaktanati su tvari koje povećavaju biopristupačnost onečišćenja u tlu čime se pospješuje mikrobiološka razgradnja. Na primjer, Juan i sur., 2001. su potvrdili povećanje razgradnje pesticida metoksiklora te metabolita DDT-a, dodatkom surfaktanta Tween80.

Metode bioaugmentacija i biostimulacije učinkovite su u razgradnji ostataka pesticida *in situ*. Ex situ metode koje se mogu primijeniti su kompostiranje, *landfarming* te razgradnja u bioreaktorima (Morillo i Villaverde, 2017).

Mnoga su istraživanja provedena kako bi se utvrdila učinkovitost bakterija u degradaciji pesticida i to koristeći razne postupke bioremedijacije. Ali i sur. (2016) su istražili uspješnost razgradnje pesticida aldrina i endosulfana α i β pomoću autohtonih mikroorganizama u procesu kompostiranja. Proces se odvijao u tri faze pri čemu se u svakoj sljedećoj fazi dodavala veća koncentracija pesticida. U prvoj fazi unutar 12 dana došlo je do razgradnje više od 80% svih triju pesticida. U drugoj fazi unutar 12 dana došlo je do razgradnje 60% pesticida dok je u trećoj fazi otklonjeno najmanje pesticida, tek 50% i to u periodu od 15 dana. S obzirom na rezultate, zaključak je da su velike koncentracije pesticida toksične za autohtone mikroorganizme, zbog čega dolazi do slabije razgradnje.

Cycon i sur. (2009) istražili su potencijal bakterija iz rodova *Pseudomonas* sp. i *Serratia* sp. Sojevi bakterija izolirani su iz tla onečišćenim diazinom. U tlo u laboratorijskim uvjetima su inokulirana 3 soja bakterija *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* i rod *Pseudomonas* sp. uz dodatak diazina kao pesticida. Nakon 42 dana *S. marcescens* je uspješno otklonila 83% diazina, *Pseudomonas* 87% a *S. liquefaciens* 74%. Također, u tlu u kojem su inokulirana sva tri

soja bakterija dokazana je najveća degradacija pesticida iz čega se zaključuje da bakterije u konzorciju vrše učinkovitiju degradaciju.

Chennapa i sur. (2018) upotrijebili su PGPR bakterije roda *Azotobacter* za razgradnju herbicida pendimetalina. Soj *A. salinestris* pokazao se najuspješnijim degradacijom 100% pesticida. *A. chroococum* je razgradio 98.86% pesticida a *A. armeniacus* razgrađuje 62.16% pesticida unutar perioda od dva tjedna.

Ermakova i sur. (2010) proveli su istraživanje bakterijske razgradnje glifosata bakterijama *Achromobacter* sp. i *Ochrobactrum anthropi*. Nakon 21 dana, bakterije roda *Achromobacter* otklonile su 65.8% glifosata a bakterije roda *O. anthropi* uklonile su 49.5% glifosata. Analizom uzoraka tla, utvrđeno je da bakterijskom razgradnjom glifosata nisu nastali dodatni produkti.

8.3. Bioremedijacija tala onečišćenih teškim metalima

Teški metali se definiraju kao metali s gustoćom većom od 5 g/cm³. Dijele se na esencijalne (bakar, cink, mangan, željezo, molibden, selen) i neesencijalne (olovo, živa, kadmij, arsen, aluminij, kositar, kobalt, paladij, platina) koji u prekomjernim količinama mogu biti otrovni (Glavašević, 2020). Teški metali u okoliš mogu dospjeti prirodnim utjecajem ili ljudskom aktivnošću. Primjeri prirodnih procesa koji dovode do pojave teških metala u okolišu su komete, erozija, vulkanske erupcije te utjecaj vremenskih prilika na ispiranje stijena i tla. Neki antropogeni izvori teških metala su proizvodnja legura, baterija, biokrutina, eksplozivnih sredstava, nepravilno slaganje krutog industrijskog otpada, rudarstvo, proizvodnja tekstila, boja i lakova (Ayangbenro i Babalola, 2017). Teški metali su vrlo opasni onečišćivači tla zbog svoje perzistentnosti u okolišu i toksičnosti za organizme. Živa, cink, uran, srebro, zlato, arsen, nikal, i selen negativno utječu na razvoj biljaka ometajući procese fotosinteze i aktivnost esencijalnih enzima u biljkama. Teški metali su citotoksični u malim količinama i uzrokuju karcinom kod ljudi. Konzumacijom hrane dopijevaju u ljudski organizam gdje se akumuliraju i uzrokuju oslobađanje slobodnih radikala koji razorno djeluju na molekulu DNA (Ojuederie i Babalola, 2017). Osim navedenog, trovanje pojedinim teškim metalima može uzrokovati neplodnost, probleme s kostima i disanjem, slabokrvnost, oštećenje pluća i bubrega i dr. Slučaj trovanja kadmijem poznat je u Japanu kao „Itai-Itai“ bolest koja napada kosti i zglobove. Do otrovanja ljudi je došlo konzumacijom riže koja je sadržavala 10 puta veću koncentraciju zbog natapanja onečišćenom vodom (Glavašević, 2020).

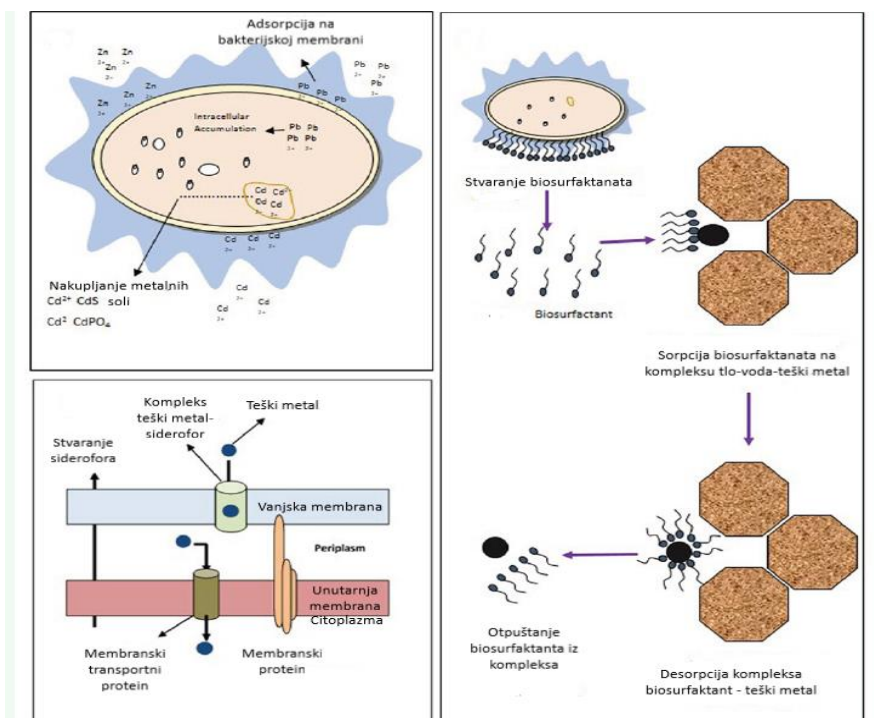
Mikroorganizmi s potencijalom bioremedijacije teških metala su:

a) bakterije: *Arthrobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* soj XMCr-6, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter sp.*, *Cupriavidus metallidurans*, *Phylum Cyanobacteria sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter cloacae* soj B2-DHA, *Kocuria flava*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas veronii*, *Sporosarcina ginsengisoli*, *Streptomyces sp.*,

b) gljivice: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae* i

c) kvasci: *Candida utilis*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula rubra* soj GV45, *Saccharomyces cerevisiae* (Pratish i sur., 2018).

Za razliku od organskih onečišćivača, teški metali se ne mogu razgraditi kemijskim ili biološkim procesima. Oni se mogu transformirati u manje toksične oblike. Bioremedijacija teških metala mikroorganizmima odvija se na više načina: adsorpcijom na bakterijsku membranu, nakupljanjem na membrani bakterijske stanice i akumulacijom unutar stanice te stvaranjem siderofora i biosurfaktanata. (Slika 8.5.)



Slika 8.5. Mehanizmi bioremedijacije teških metala

Izvor: Banik i sur., 2014.

Siderofore su spojevi koji služe za transport željeza kroz stanične membrane mikroorganizama. Osim dovođenja željeza u stanice, mogu vezati i druge metale i tako smanjiti toksičnost i biopristupačnost metala u tlu. Isto tako, sintezom biosurfaktanata i stvaranjem kompleksa s teškim metalima, dolazi do smanjenja biopristupačnosti i toksičnosti teških metala u tlu (Banik i sur., 2014).

Glavne metode sanacije tla onečišćenog teškim metalima uključuju fizikalne i kemijske metode kao što su koagulacija, elektrodijaliza, flotacija, flokulacija, kemijsko ispiranje, ekstrakcija, stabilizacija i druge. Ove metode su iznimno skupe i osim što se ne isplate, nisu učinkovite u tlima s nižim koncentracijama teških metala. Alternativa je upotreba bioloških metoda (Verma i Kulia 2019). Učinkovita metoda za sanaciju teških metala je razgradnja u bioreaktoru uz postupke augmentacije i biostimulacije. Na ovaj način moguće je smanjenje koncentracije više različitih teških metala (Volarić i sur., 2021).

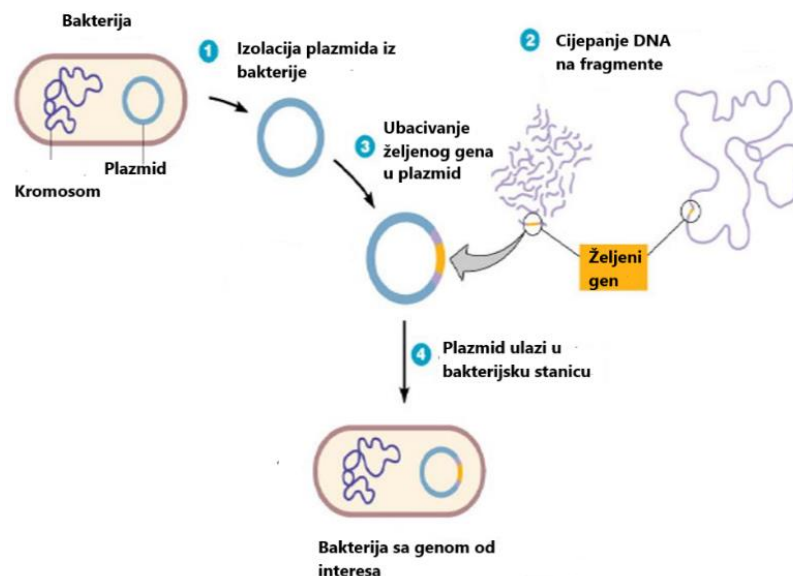
Učinkovitost bioremedijacije teških metala u bioreaktorima uz biostimulaciju ispitana je u laboratorijskim istraživanjima te se pokazala kao učinkovita metoda. Fulekar i sur. 2012. proveli su laboratorijsko istraživanje učinkovitosti bioremedijacije u biorektoru. Uzorcima tla dodano je 25, 50 i 100ppm kadmija, bakra i željeza. Također, dodani su autohtoni mikroorganizmi izolirani sa odlagališta industrijskog otpada onečišćenog teškim metalima te kisik i hranjive tvari. Nakon 21 dana, došlo je do potpune remedijacije svih metala i u uzorcima tla tretiranih s većom i onima s manjom koncentracijom teških metala. Osim u aerobnim uvjetima moguća je mobilizacija teških metala i u anaerobnim uvjetima. Bioremedijaciju

arsena u anaerobnom bioreaktoru proveli su Altun i sur. (2014). Dodatkom sulfat reducirajućih bakterija i održavanjem koncentracije Fe^{2+} nastaje manje toksičan spoj FeAsS te se koncentracija As (V) smanjila za 96%. Iako su dostupna mnoga laboratorijska istraživanja bioremedijacije teških metala koja su uglavnom uspješna, nedostaju istraživanja u većoj mjeri na terenu i u praksi (Volarić, 2021). Također, postoji ograničenje procesa bioremedijacije jer nije mnogo mikroorganizama sposobno pretvoriti otrovne teške metale u njihove netoksične oblike. Kako bi se povećao potencijal mikroorganizama u sanaciji teških metala, intenzivno se istražuju moderne tehnologije kao što je gensko inženjerstvo te nanotehnologija (Verma i Kulia, 2019).

9. Upotreba novih tehnologija u bioremedijaciji

Napredak znanosti, posebno genetike omogućava bolje razumijevanje metaboličkih procesa mikroorganizama koji su ključni za bioremedijaciju. Ponekad su potrebne uzastopne biološke transformacije kako bi se toksična tvar razgradila a to je nešto što se može ostvariti primjenom sintetskih mikrobnih zajednica s posebnim svojstvima. To omogućuje razvoj nove grane biologije pod nazivom sintetska biologija a ona može stvarati nove biološke organizme i stanice. Za proučavanje metabolizma mikroorganizama na molekularnoj razini, osmišljene su moderne tehnike kao što su: proteomika (proučavanje proteina), genomika (proučavanje DNK), transkriptomika (proučavanje prevođenja RNK) i interaktomika (izučavanje interakcija između proteina). Proteomika proučava promjene u broju i sastavu proteina koje se događaju pod utjecajem vanjskih podražaja na bakterije. Na taj način moguće je identificirati proteine koji su ključni u odgovoru na vanjske podražaje i promjene u okolišu što je ključno kako bi se bolje razumio proces bioremedijacije. Proteomika i genomika odličan su alat za istraživanje ekspresije gena i metaboličkih puteva organizma s obzirom da biološke funkcije organizma proizlaze iz informacija koje su zapisane u genomu. Još jedna moderna tehnika uključuje 16S rRNK sekvencioniranje. Sekvencioniranjem 16S rRNK moguće je identificirati i usporediti bakterije prisutne u uzorku. Također, ova tehnika omogućuje otkrivanje do sada nepoznatih mikroorganizama koji bi mogli biti korisni u bioremedijaciji (Česnik i sur., 2019).

Napretkom znanosti i industrije, u okolišu se pojavljuju novi, umjetno proizvedeni materijali. Takve tvari autohtone bakterije ne mogu učinkovito degradirati a svakodnevno završavaju u okolišu kao otpad. Moguće rješenje je genetska modifikacija mikroorganizama (Slika 9.1.). Modifikacijom genoma mikroorganizma dodavanjem ili izmjenom jednog ili više gena, može se proizvesti mikroorganizam koji će moći uspješnije razgraditi neku štetnu tvar. Na primjer, kloniranje gena koji omogućava otpornost na krom *chrA* iz *B. pseudomycoides* u *B. subtilis* rezultiralo je preživljavanjem drugog organizma pri visokoj koncentraciji kroma. Pokazalo se da su modifikacije metaloregulacijskog proteina *ArsR* u bakteriji *Escherichia coli* odgovorne za uspješnu bioremedijaciju arsena u kontaminiranoj pitkoj i podzemnoj vodi (Volarić i sur., 2021).



Slika 9.1. Postupak genetske modifikacije

<https://slideplayer.com/slide/10951402/>

Primjena i istraživanja GMO organizama strogo je regulirana brojnim dokumentima: Programom Ujedinjenih naroda za okoliš, Konvencijom o biološkoj raznolikosti, Organizacijom za ekonomsku suradnju i razvoj te Protokolom iz Cartagene o biosigurnosti. Najveća zabrinutost koja se javlja prilikom primjene GMO mikroorganizama u bioremedijaciji jest da dodavanjem GMO mikroorganizama u *in situ* bioremedijaciji, može doći do miješanja autohtonih i GMO populacija. Međutim, primjenom tzv. gena samoubojica može se spriječiti miješanje GMO i autohtonih populacija mikroorganizama, tako što će geni samoubojice uzrokovati smrt mikroorganizama kada bioremedijacija završi (Česnik i sur., 2019).

Osim upotrebom genetske modifikacije, sanacija onečišćenih tala teškim metalima može se unaprijediti primjenom nanotehnologije odnosno nanočestica. Nanočestica se definira kao čestica tvari koja ima promjer između 1 i 100 nanometara (Guedes i sur., 2020). Poznato je da širok raspon nanočestica (željezo, zlato, srebro itd.) pojačava mikrobnu aktivnost pa se s obzirom na to može primijeniti u bioremedijaciji. Nanočestice mogu biti proizvedene bakterijskim enzimskim procesima u kojima bakterija usvaja metalne ione iz okoline i pretvori ih u elementarne metale. Biosinteza nanočestica može biti unutarstanična, nakon usvajanja metalnih iona, ili izvanstanična, što uključuje zarobljavanje metalnih iona na površini stanice, nakon čega slijedi enzimatska transformacija. Bakterije roda *Rhodococcus sp.* mogu unutar stanice sintetizirati nanočestice zlata, bakterije roda *Bacillus cereus* mogu sintetizirati nanočestice srebra dok bakterije roda *Shewanella oneidensis* mogu sintetizirati magnetit. Takve se nanočestice mogu koristiti za uklanjanje teških metala. Na primjer, željezne nanočestice, mogu reducirati visoko otrovni šestovalentni krom u ekološki prihvatljiviji trovalentni oblik (Volarić i sur., 2021).

Nanočestice potencijalno štetno djeluju na okoliš i ljudsko zdravlje. One se mogu lako raspršiti u okolišu a tako i transportirati na velike udaljenosti. Nanočestice mogu biti

perzistentne u okolišu a toksične za ljude, životinje i okoliš. S obzirom da je nanotehnologija nova tehnologija čija je primjena veoma raznolika, potrebna su detaljnija istraživanja kako bi se utvrdilo njeno djelovanje na živi svijet (Guedes i sur., 2020).

10. Zaključak

Onečišćenje okoliša predstavlja veliki problem današnjice. Često je kvaliteta i očuvanje tla zanemareno kada se govori o očuvanju okoliša. Ipak, tlo je neobnovljivi medij velike bioraznolikosti s ulogom održavanja sveukupnog života na Zemlji. Bioremedijacija je izvrsna, moderna i učinkovita tehnologija sanacije onečišćenih tala koja je korisna za sanaciju širokog spektra onečišćenja. Temelji se na primjeni mikroorganizama koji razgrađuju štetne tvari kemijskim reakcijama koje se normalno odvijaju kao dio njihovih metaboličkih procesa. Ova biološka metoda sanacije, može se primijeniti *in situ* i *ex situ* upotrebom učinkovitih tehnoloških procesa. S obzirom da uspješnost bioremedijacije ovisi o aktivnosti i rastu mikroorganizama, potrebna je stalna kontrola procesa i podešavanje niza parametara kao što su pH, vlaga, temperatura i hranjiva. Može se učinkovito primijeniti u sanaciji tala onečišćenih naftom, pesticidima, raznim eksplozivima i teškim metalima. Posljednje desetljeće, razvija se gensko inženjerstvo i nanotehnologija koji su pokazali da mogu biti izvrstan alat u sanaciji onečišćenih tala, posebno teškim metalima. Bioremedijacija je često ekonomičnija nego druge fizikalne i kemijske metode sanacije no potrebna su još mnoga istraživanja kako bi ova tehnologija bila sigurnija za okoliš i u većoj se mjeri počela primjenjivati na terenu.

Bez obzira što se metode sanacije tala intenzivno istražuju i usavršavaju, najbolje i najsigurnije rješenje je svakako prevencija onečišćenja okoliša.

11. Popis literature

1. Abioye P.O., Abdul Aziz A., Agamuthu P. (2009). Enhanced Biodegradation of Used Engine Oil in Soil Amended with Organic Wastes. *Water, Air, & Soil Pollution*, 209(1-4), 173–179.
2. Adams G. O., Fufeyin P. T., Okoro S. E., Ehinomen I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39.
3. Ali M., Gani K.M., Kazmi A.A., Ahmed N. (2016). Degradation of aldrin and endosulfan in rotary drum and windrow composting. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(5), 278–286.
4. Alkorta I., Epelde L., Garbisu, C. (2017). Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(19).
5. Altun M., Sahinkaya E., Durukan I., Bektas S., Komnitsas, K. (2014). Arsenic removal in a sulfidogenic fixed-bed column bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 269, 31–37.
6. Antizar-Ladislao B. (2010). Bioremediation: Working with Bacteria. *Elements*, 6(6), 389–394.
7. Arora, N.K. (2018). Bioremediation: a green approach for restoration of polluted ecosystems. *Environmental Sustainability*, 1(4), 305–307.
8. Atagana H. I. (2008) Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1516-1525
9. Ayangbenro A., Babalola O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 94.
10. Azubuike C.C., Chikere C.B., Okpokwasili, G.C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11).
11. Banik S, Das K.C., Islam M.S., Salimullah M. (2013). Recent Advancements and Challenges in Microbial Bioremediation of Heavy Metals Contamination. *JSM Biotechnology and Bioengegy* 2(1), 1035.
12. Bašić F. (1994). Klasifikacija oštećenja tala Hrvatske. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 56(3-4), 291–310.
13. Bertović, B. (2016). Bioremedijacija zemlje onečišćene naftnim ugljikovodicima. Goriva i maziva: časopis za tribologiju, tehniku podmazivanja i primjenu tekućih i plinovitih goriva i inženjerstvo izgaranja, 55(4), 295–305.

14. Beškoski V., Gojgic-Cvijović G., Milic J., Ilić M., Miletić S., Jovančičević, B., Vrvčić-Miroslav M. (2012). Bioremediation of soil polluted with crude oil and its derivatives: Microorganisms, degradation pathways, technologies. *Hemijska industrija*, 66(2) 275–289.
15. Blatarić, M. (2017). Remedijacija tla. Dostupno na: <https://repozitorij.mev.hr/islandora/object/mev:537>
16. Bobić V. (2005). Onečišćenje tla naftnim ugljikovodicima – Bioobnova: Mogućnosti, učinkovitost, iskustva. *Goriva i maziva : časopis za tribologiju, tehniku podmazivanja i primjenu tekućih i plinovitih goriva i inženjerstvo izgaranja*, 44(1), 9–20.
17. Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63–67.
18. Chandra S., Sharma R., Singh K., Sharma A. (2012). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, 63(2), 417–431.
19. Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. (2018). *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. *Microorganisms for Sustainability*, 23–43.
20. Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja, H. (2018). *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. *Microorganisms for Sustainability*, 23–43.
21. Chikere C.B., Chikere B.O., Okpokwasili, G.C. (2011). Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. *3 Biotech*, 2(1), 53–66.
22. Chowdhury A., Pradhan S., Saha M., Sanyal N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 114–127.
23. Cycoń M., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z. (2009). Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76(4), 494–501.
24. Cycoń M., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z. (2009). Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76(4), 494–501.
25. Česnik M., Findrik Blažević Z., Vuković Domanovac M. (2019). Povećanje učinkovitosti bioremedijacije na razini gena. *Kemija u industriji*, 68(1-2), 23–30.
26. da Silva I.G., Gomes de Almeida F.C., Padilha da Rocha e Silva N.M., Casazza A.A., Converti A., Asfora Sarubbo L. (2020). Soil Bioremediation: Overview of Technologies and Trends. *Energies*, 13(18), 4664
27. Đokić M., Bilandžić N. Briški F. (2012). Postupci uklanjanja pesticida iz okoliša. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 61(7-8) 341–348.

28. Ermakova I.T., Kiseleva N.I., Shushkova T., Zharikov M., Zharikov G.A., Leontievsky, A.A. (2010). Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 585–594.
29. Fan M.Y., Xie R.J., Qin G. (2013). Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with yeast. *Environmental Technology*, 35(4), 391–399.
30. Foght J, April T, Biggar K, Aislabied J. (2001) Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. *Bioremediation Journal*. 5(3), 225–46.
31. Frutos F.J.G., Escolano O., García, S., Babín, M., Fernández, M.D. (2010). Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1), 806–813.
32. Fulekar M.H., Sharma J., Tendulkar A. (2012). Bioremediation of heavy metals using biostimulation in laboratory bioreactor. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(12), 7299–7307.
33. Glavašević D. (2020) Teški metali u organizmu. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek
34. Goswami M, Chakraborty P, Mukherjee K, Mitra, G., Bhattacharyya P., Dey S., Tribedi P. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 6(5), 223–231
35. Guedes M.I.F., Tramontina Florean E.O.P., De Lima F., Benjamin, S.R. (2020). Current trends in nanotechnology for bioremediation. *International Journal of Environment and Pollution*, 1(1).
36. Huang Y., Xiao L., Li F., Xiao M., Lin D., Long X., Wu, Z. (2018). Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*, 23(9), 2313.
37. Joo H.-S., Ndegwa P.M., Shoda M., Phae C.-G. (2008). Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. *Environmental Pollution* 156(3) 891–896. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18620787/> (26.7.2021).
38. Jurak G. (2014). Med i pčele kao bioindikatori zagađenja okoliša pesticida u Varaždinskoj županiji. Doktorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
39. Kao C.M., Chen C.Y., Chen S.C., Chien H.Y., Chen Y.L. (2008). Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. *Chemosphere*, 70(8), 1492–1499.
40. Kensa V.M. (2011). BIOREMEDIATION - AN OVERVIEW. *I Control Pollution*, 27(2), 161–168. Dostupno na: <https://www.icontrolpollution.com/articles/bioremediation--an-overview-.php?aid=37408> (30.7.2021.)

41. Kisić, I. (2012). Sanacija onečišćenog tla. Agronomski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
42. Koshlaf E.S., Ball A. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1), 25–49.
43. Kuhad R.C., Gupta, R. (2009). Biological Remediation of Petroleum Contaminants. *Soil Biology*, 173–187.
44. Kumar V., Shahi S.K., Singh S. (2018). Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*, 115–136.
45. Luka Y., Highina B. K., Zubairu A. (2018). Bioremediation: A Solution to Environmental Pollution-A Review” *American Journal of Engineering Research (AJER)*, 7 (2), 101-109. Dostupno na: <http://www.ajer.org/papers/Vol-7-issue-2/M0702101109.pdf>
46. Marić N. (2015) Prirodno prečišćavanje i stimulirana bioremedijacija podzemnih voda zagađenih naftnim ugljikovodonicima. Doktorska disertacija, Rudarsko-geološki fakultet, Beograd.
47. Martínez Álvarez L., Ruberto L., Lo Balbo A., Mac Cormack, W. (2017). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. *Science of The Total Environment*, 590-591, 94–203
48. McCarthy K., Walker L., Vigoren L., Bartel, J. (2004). Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site. *Cold Regions Science and Technology*, 40(1-2), 31–39.
49. Menđušić V. (2012). Derivati nafte. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek
50. Mesić H., Čidić A., Dominiković Alavanja S., Kisić I., Bašić F., Mesić M., Zgorelec Ž., Husnjak S., Romić D., Komesarović B., Klaić D., Pernar N., Bakšić D., Vrbek B., Pilaš I., Potoči, N., Seletković I., Durn G., Mileusnić M., Nakić Z. (2008). Program trajnog motrenja tala Hrvatske: projekt Izrada programa trajnog motrenja tala Hrvatske s pilot projektom: Agencija za zaštitu okoliša.
51. Mohn W.W., Radziminski C.Z., Fortin M.C., Reimer K.J. (2001). On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [online] 57(1-2), pp.242–247.
52. Molano J. (2018). Use of Exogenous Bacteria to Improve the Bioremediation Process in the Caracara Field Colombia.
53. Morillo E., Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of The Total Environment*, 5(86), 576–597.
54. Odukkathil G., Vasudevan, N. (2013). Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(4), 421–444.

55. Ojuederie O., Babalola O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), 1504.
56. Österreicher-Cunha P., Euripedes, A. V., Guimaraes J. V., Campos T., Cassiane M., Nunes M., F., Ariovaldo C., Santos A., da Silva M., I., Mano, D. M. (2004). Evaluation of bioventing on a gasoline?ethanol contaminated undisturbed residual soil. *Journal of Hazardous Materials*, 110(1-3), 63–76.
57. Paudyn K., Rutter A., Kerry R., Poland, J.S. (2008). Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Regions Science Technologym* 53(1), 102–114. Dostupno na:
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=AE4E8595949D24408754D53A5A458365?doi=10.1.1.531.7914&rep=rep1&type=pdf>
58. Picado A., Nogueira A., Baeta-Hal, L., Mendonça E., de Fátima Rodrigues M., do Céu Sàágua M., Martins A., Anselmo, A.M. (2001). Landfarming in PAH contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Health*, 36(9), 1579–1588.
59. Plangklang P., Reungsang, A. (2010). Bioaugmentation of carbofuran by *Burkholderia cepacia* PCL3 in a bioslurry phase sequencing batch reactor. *Process Biochemistry*, 45(2), 230–238.
60. Pratush A., Kumar A., Hu Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. *International Microbiology*, 21(3), 97–106.
61. Pratush A., Kumar A., Hu Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. *International Microbiology*, 21(3), 97–106.
62. Raimondo E.E., Saez J.M., Aparicio J.D., Fuentes M.S., Benimeli, C.S. (2020). Bioremediation of lindane-contaminated soils by combining of bioaugmentation and biostimulation: Effective scaling-up from microcosms to mesocosms. *Journal of Environmental Management*, 276, 111-309.
63. Sardrood B.P., Goltapeh E.M., Varma A. (2012). An Introduction to Bioremediation. *Soil Biology*, 3–27.
64. Sharma I. (2020). Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. *Trace Metals in the Environment - New Approaches and Recent Advances*. Dostupno na:
<https://www.intechopen.com/books/trace-metals-in-the-environment-new-approaches-and-recent-advances/bioremediation-techniques-for-polluted-environment-concept-advantages-limitations-and-prospects>
65. Singh A., Ward O.P., (2004). *Applied Bioremediation and Phytoremediation*. Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

66. Sofilić T. (2014). Onečišćenje i zaštita tla. Dostupno na:
[http://bib.irb.hr/datoteka/686398.T. Sofilic ONECISCENJE I ZASTITA TLA.pdf](http://bib.irb.hr/datoteka/686398.T_Sofilic_ONECISCENJE_I_ZASTITA_TLA.pdf)
 (18.8.2021)
67. Thapa B., Kumar A., Ghimire A. (2012). A Review On Bioremediation Of Petroleum Hydrocarbon Contaminants In Soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology, 8(1), 164–170.
68. Varjani S., Upasani V.N. (2019). Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. Journal of Environmental Management, 245, 358–366.
69. Verma S., Kuila A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. Environmental Technology & Innovation, 14, 100369.
70. Vidali M., (2001). Bioremediation: An overview. Journal of Applied Chemistry, 73 (7), 1163-1172.
71. Volarić A., Svirčev Z., Tamindžija D., Radnović, D. (2021). Microbial bioremediation of heavy metals. Hemijska industrija, 75(2), 103–115.
72. Weir K.M., Sutherland T.D., Horne I., Russell R.J., Oakeshott J.G. (2006). A Single Monooxygenase, Ese, Is Involved in the Metabolism of the Organochlorides Endosulfan and Endosulfate in an Arthrobacter sp. Applied and Environmental Microbiology, 72(5), 3524–3530.
73. Zhang H., Yuan X., Xiong T., Wang H., Jiang L. (2020). Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. Chemical Engineering Journal, 398, 125-657.

Internetski izvori:

- <http://www.fao.org/docrep/018/a0220e/a0220e00.pdf> (Pristupljeno: 26.7.2021.)
- <https://www.nap.edu/read/2131/chapter/4> (Pristupljeno: 16.8.2021.)
- <https://waterquality.montana.edu/energy/cbm/lit-reviews/bioremed-soil.html>.
 (Pristupljeno, 16.8.2021.)

Životopis

Iva Krčelić rođena je 30. lipnja 1996. godine u Zagrebu. Pohađala je Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga u Zagrebu koju završava 2015. godine. Nakon završene srednje škole, upisuje preddiplomski stručni studij sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu koji završava 2019. godine obranom završnog rada te stječe akademski naziv prvostupnica sanitarnog inženjerstva (bacc. san. ing.). Završni rad pod naslovom „Praćenje prisutnosti alergena u prehrambenim proizvodima“ izradila je na Zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“. Također, 2019. godine upisuje diplomski sveučilišni studij na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, smjer agroekologija, usmjerenje mikrobna biotehnologija u poljoprivredi.