

Vedranka Bobić

ISSN 0350-350X

GOMABN 44, 1, 9-34

Stručni rad / Professional Paper

UDK 502.37 : 504.53.054 : 665.7 : 504.53.062.4

## ONEČIŠĆENJE TLA NAFTNIM UGLJIKOVODICIMA – BIOOBNOVA: MOGUĆNOSTI, UČINKOVITOST, ISKUSTVA

### Sažetak

Sve više saznanja o ireverzibilnim i dugotrajnim utjecajima onečišćenja na pogoršanje kvalitete tla, sedimenata i zaliha pitke vode ima sve veći utjecaj na istraživanja i politiku upravljanja okolišem zadnjih dvadeset godina. Unos antropogenih, otrovnih i štetnih kemijskih spojeva u tlo ima ozbiljne posljedice na različita područja ljudskih aktivnosti, od poljoprivrede, opskrbe pitkom vodom, planiranja građenja do gospodarenja prirodnim resursima.

Tlo je jednako ugrožen ekosustav kao zrak i voda pa su neke razvijene zemlje već pred dvadeset godina donijele zakone o očuvanju kvalitete tla a time i podzemnih voda. Uzroci onečišćenja tla i podzemnih voda jesu: nepropisno zakopan otpad, loše riješeni tokovi otpadnih voda, nepropisno korištenje kemikalija u poljoprivredi, slučajni izljevi izazvani nepažnjom, pretjerano crpljenje podzemnih voda, odlaganje sanitarnog otpada na zemlju, odlaganje otpadnih muljeva industrije, propuštanje iz industrijskih bazena za otpadne vode, propuštanje iz spremnika goriva na skladišnim prostorima, itd.

Ugljikovodici su čest uzrok onečišćenja okoliša pa na naftnoj i petrokemijskoj industriji leži velika odgovornost za rješavanje problema onečišćenja okoliša. Industrije razvijenih zemalja su već šezdesetih godina prošlog stoljeća pokrenule istraživanja u suradnji sa znanstvenim institucijama u cilju rješavanja problema onečišćenja okoliša naftnim ugljikovodicima.

Cilj je rada prikazati kako se biološke procese, kao temelj brojnih korisnih tehnologija, može upotrijebiti kao gospodarski opravdane i učinkovite postupke čišćenja tla i podzemnih voda u

*slučajevima njihova onečišćenja opasnim tvarima, napose naftnim ugljikovodicima*

## Uvod

Složenost sustava tla i sedimenata te procesa koji se odvijaju u njima ne može se obuhvatiti na odgovarajući način bez suradnje znanstvenika iz različitih područja. U tom je smislu u različitim zemljama pokrenut čitav niz multidisciplinarnih programa istraživanja tla. Osim toga, u europskim se zemljama u proteklome desetljeću zamjećuje pojačana svijest o potrebi integriranja znanja različitih područja znanosti, izrade programa mjera i učešća industrije, kako bi se tlo kao ekosustavom upravljalo na ispravan način. Prodiranje zagađivača u tlo ima ozbiljne posljedice za različita područja ljudskih potreba i djelatnosti, kao što su korištenje tla u poljoprivredi, izgradnja, opskrba pitkom vodom, urbano i ruralno planiranje te upravljanje prirodnim izvorima. Postoji nužnost za zakonskom zaštitom tla, kao što je već učinjeno za vode, zrak i gospodarenje otpadom, čime se ujedno neizravno štiti tlo i podzemne vode.

U Hrvatskoj je stanje daleko ozbiljnije i teže nakon teških napada i stradavanja gradova i industrijskih područja tijekom rata. U različitim dijelovima zemlje gađane su rafinerije, tvornice kemikalija, transformatori, skladišta oružja, te je nakon 1991. došlo do istjecanja brojnih opasnih kemikalija (policikličkih aromatskih ugljikovodika, policikličkih bifenila, pesticida, naftnih ugljikovodika, teških metala) kroz tlo u podzemne tokove rijeka, onečišćujući tako glavne zalihe vode i potencijalna obradiva zemljišta.

## Bioobnova

Bioobnova je postupak kojim se ksenobiotici (okolišu strane kemijske tvari) koji su ušli u okoliš, prevode u manje toksične ili škodljive oblike, odnosno mineraliziraju do neorganskih (ugljični dioksid i voda) djelovanjem mikroorganizama. Taj se postupak temelji na sposobnosti mikroorganizama da koriste različite kemijske spojeve kao izvore energije, što čovječanstvo nerijetko iskorištava. Štoviše, ti procesi su na primjer, temelj uobičajenih tehnoloških postupaka obrade otpadnih voda. Postupci biorazgradnje često u potpunosti razgrađuju ili mineraliziraju organske spojeve (pri čemu mineralizacija podrazumijeva razlaganje organske molekule na njezine anorganske sastavne dijelove).

Biološki se procesi već stoljećima koriste za proizvodnju kruha, vina i piva, pa sve do uvriježenih prehrambenih proizvoda poput sira, jogurta, sojina umaka ili alkohola. Mikrobnim procesima nastaju brojne industrijske kemikalije, uključujući organske kiseline, otapala, polimere, specijalizirane enzime te insekticide. Brojni se lijekovi također dobivaju biološkim procesima, uključujući antibiotike, steroide te genetski dobivene antikancerogene spojeve. U pozadini primjene bioloških procesa u proizvodnji hrane, lijekova i kemikalija kriju se gospodarski razlozi. Oni su također i

motivacija za korištenje bioloških procesa u zbrinjavanju opasnog otpada, čime se započelo krajem 1960-ih i početkom 1970-ih.

Nema velike razlike između načela koja upravljaju biološkim procesima u obradi otpadnih voda i onih u bioobnovi opasnih kemikalija. Biološki su procesi katalizirani kemijski procesi. Bioobnova koristi katalizator (enzim) što ga proizvode mikroorganizmi kako bi katalizirala razgradnju nekog određenog opasnog kemijskog spoja. Zbog složenosti okoliša bioobnovu valja provoditi uz potpuno poznavanje kemijskih reakcija i bioloških načela uključenih u pojedini postupak. Neke se kemikalije u okolišu mogu nakupljati u količinama koje ugrožavaju zdravlje ljudi ili kakvoću okoliša. Do sredine 1960-ih smatralo se kako mikroorganizmi mogu razgraditi sve kemijske spojeve koji ulaze u okoliš. Lekcija nas je naučio diklor-difenil-trikloetan (DDT). Široko korištenje tog pesticida otpornog na mikrobiološku razgradnju i topljivog u lipidima, dovelo je do njegova nakupljanja u organizmima na višim razinama prehrambenog lanca (1,2). S druge strane, golema prirodna sposobnost mikroorganizama da razgrađuju organske spojeve temelj je bioobnove koja, međutim, isto ima ograničenja što ih valja uzeti u obzir kod razmatranja mogućnosti njezina korištenja. Proces biorazgradnje *in situ* osobito privlače pozornost radi uloge što je mikroorganizmi mogu odigrati u smanjenju onečišćenja okoliša. (3,4)

Biorazgradnja, biotransformacija koja uzrokuje pojednostavljenje strukture organskih spojeva cijepanjem međumolekularnih veza, često se koristi kao uvriježeni tehnološki postupak obrade otpadnih voda (5). Pojednostavljenje kroz biorazgradnju može biti djelomično, pri čemu uključuje jedino zamjenu funkcionalnih grupa, ili potpuno, u kojem slučaju u potpunosti razgrađuje ili mineralizira organski spoj do neorganskih dijelova ugljičnog dioksida, sulfata, fosfata, vode. (6) Uzrokom uznemirenosti javnosti bile su upravo visoke koncentracije organskih spojeva otpornih na razgradnju pronađenih u organizmima, napose onima prisutnima na višim razinama hranidbenih lanaca, kao i otrovnost vezana uz navedene kemikalije. (7)

Procesi bioobnove su aerobni ili anaerobni a odvijaju se u stanicama autohtonih mikroorganizama ili pak proizvedenih za specifične potrebe. Za neke ksenobiotike proces se može provesti kao kometabolički gdje se kao izvor ugljika koristi neki drugi kemijski spoj. (8)

## Sastav tla

Tlo je više ili manje složena mješavina djelića stijena, organske tvari, vlage, bakterija, insekata i drugih malih životinjskih vrsta (9). Neživi ili abiotički dio tla sastoji se od tri komponente: plinovite, tekuće i krute. Između krutih se čestica nalaze pukotine različitih oblika i veličina, tvoreći zajedno prostor pora. Ukupan dio tla što ga obuhvaćaju pore može uvelike varirati te je ovisan o vrsti tla (pjeskovita, glinasta ili tresetasta tla). U porama tla mobilnu fazu predstavljaju plin i vlaga čiji se

razmjeran doprinos u ukupnoj količini u tlu stalno mijenja pod utjecajem padalina, isparivanja i transpiracije. (10)

Plinovita faza tla u načelu je istoga sastava kao i atmosfera. Potrošnja kisika i stvaranje ugljičnog dioksida posljedica su mikrobnih aktivnosti i respiracije korijenja. U gornjem se dijelu tla obično istovremeno nalaze i zrak i voda.

Kruta faza tla može prema sastavu biti podijeljena na organsku i mineralnu frakciju. Organska frakcija pretežno potječe od biljnoga materijala te se sastoji uglavnom od živoga biljnoga materijala (korijenje), te mrtvoga biljnoga materijala u različitim fazama raspadanja - humusne tvari. Navedene humusne tvari sadrže velik broj negativno nabijenih reaktivnih skupina, što igra važnu ulogu u elektrostatskoj adsorpciji kationa, vezanju vode i koherenciji čestica tla, što sve zajedno tvori određenu strukturalnu stabilnost tla. Za mnoge je organske spojeve (npr. pesticide, naftu) to glavna reaktivna faza u tlu. (10)

Mineralna frakcija tla sastoji se uglavnom od kvarca, drugih oksida, i glinenih minerala. Kvarc, koji je glavni sastojak pjeskovitih tala, razmjerno je neaktivan, dok oksidi primjerice željeza, alumnija, mangana te glineni minerali tvore reaktivni dio. Navedene se razlike u reaktivnosti mogu pripisati razlikama u specifičnim površinama (s obzirom na veličinu čestica), kao i površinskoj napetosti spojeva o kojima je riječ. Narav i veličina električnoga naboja ostalih čestica oksida pod velikim je utjecajem pH vrijednosti samoga sustava. (11)

### Mikrobne zajednice u tlu

Mikrobna biomasa tla sastoji se od brojnih vrsta bakterija, virusa, mikomiceta i većih organizama tla, poput kvasaca, algi i protozoa. Mikroorganizmi osiguravaju energiju oksidirajući biljne i životinjske ostatke. Konačan rezultat mikrobne aktivnosti je oslobađanje ugljika, dušika, fosfora, kalija i sumpora u oblicima dostupnim biljkama koje su ovisne o hranjivim tvarima što ih stvaraju mikroorganizmi – suštinska karika u ciklusu hrane i energije. Zbog više razloga, ta biomasa može se smatrati posebnim dijelom tla. Vrlo je osjetljiv pokazatelj promjena u tlu koje se javljaju zbog različitih načina postupanja. Primjerice, pokazalo se kako dugotrajna primjena gnojiva onečišćenog metalima na poljoprivrednom zemljištu uvelike smanjuje količinu biomase (13). U tlu postoje trajne interakcije putem fizičkih i kemijskih procesa unutar abiotičnoga dijela. Štoviše, postoji trajno međusobno djelovanje između biljnog i životinjskog svijeta tla, kao i između njegovih živih i neživih dijelova. Radi toga tlo predstavlja iznimno dinamičan i složen sustav.

Tablica 1: Fizičko-kemijske značajke tla kao staništa mikroorganizama

temperatura	od -40 °C (Antarktik) do +65 °C (vruća pustinja)
pH	2,5 -11,00 (većina je tala blage kiselosti)
vodni potencijal	od 0,0 - 0,99
slanost	od 0,0 do zasićenja

dostupnost kisika	odgovarajuća, uz iznimku vodom natopljena tla
neorganske hranjive tvari	dušik i fosfor često ograničavajući
organska tvar	sastoji se uglavnom od refraktornih humusnih tvari
pripadajuća površina	velika količina anorganskih i organskih površina

## Čimbenici koji utječu na biorazgradnju kemijskih tvari u tlu

### Hranjive tvari

Nedostatak hranjivih tvari, a ne samo onečišćivača – primjerice, C, N, P, K, S, i elemenata u tragovima, mogu biti uzrokom slabe razgradljivosti nekog kemijskog spoja.

### Aerobno-anaerobni uvjeti

Većina je onečišćivača razgradljiva u aerobnim uvjetima, no može doći do nedostatka odgovarajućeg primatelja elektrona, ako ne i samog kisika. Postoje neki klorirani organski spojevi koji su u anaerobnim uvjetima podložniji biorazgradnji.

### Sadržaj vode u tlu

Voda je neophodna za rast mikroorganizama, pa ispod određenog sadržaja vlage u tlu ne može doći do biorazgradnje, a u tlu zasićenom vodom prevladavaju anaerobni uvjeti.

### Tekstura i struktura tla

Razmjerni omjeri pijeska, gline i mulja, kao i raspored i organizacija čestica tla izravno utječu na prolaz kisika i ugljičnog dioksida do mjesta mikrobne aktivnosti i natrag.

### pH

Reakcije različitih vrsta tala mogu biti vrlo raznolike, ali je većina njih donekle kisela. Većina bakterija posjeduje ograničenu toleranciju na kisele uvjete; gljivice su, primjerice, u tom smislu otpornije, pa tako pH vrijednost tla nerijetko određuje koja vrsta mikroorganizama može sudjelovati u biorazgradnji. (14)

### Temperatura

Biorazgradnja se javlja u širokom rasponu temperatura tla. U većini tala tijekom barem jednog dijela godine prevladavaju uvjeti pogodni za mezofilne mikroorganizme. Neka su istraživanja pokazala kako su mikroorganizmi koji razgrađuju ugljikovodike izolirani iz naftom onečišćenih tala na Aljasci mogli rasti na temperaturi od 5°C (15). Mezofilni mikroorganizmi najčešći su u svim tipovima tala dok biorazgradnja nastupa pri vrijednostima iznad 20°C (npr. ugljikovodici) (16). Razmjerno je malo podataka o termofilnim razgrađivačima u tlu. Neke su termofilne bakterije izolirane uzgojem na n-tetradekanu kao supstratu. (17)

### Toksični spojevi

Ostali toksični spojevi koji se nalaze na lokalitetu a nisu podložni biorazgradnji mogu spriječiti djelovanje organizama koji razgrađuju onečišćivač.

### Topljivost

Onečišćivač mora biti topljiv da bi bio dostupan mikroflori ali ako je u spoju sa netopljivim tvarima biorazgradnja je otežana. Ako su svi navedeni čimbenici optimizirani, možemo očekivati da će onečišćivač biti uklonjen iz okoliša. Međutim, čak i u velikoj mjeri onečišćeno tlo ipak omogućuje rast velikom broju različitih mikroorganizama, od kojih će neki ograničavati rast razgrađivača trošeći hranjive tvari. Ravnoteža mikroflora na onečišćenu tlu promijenit će se u korist razgrađivača onečišćivača koji će tako tijekom razgradnje biti brojčano nadmoćni. Nestanak onečišćivača, koji je čimbenik rasta za određene vrste mikroorganizama, izmijenit će sastav mikrobne zajednice pa će se njihov broj smanjivati kako se smanjuje količina onečišćivača. (18)

### Vrste onečišćenja tvarima koje su strane okolišu (ksenobiotici)

Ksenobiotici predstavljaju širok spektar kemijskih spojeva ljudske proizvodnje nastalih kao rezultat ljudske aktivnosti koji se unošenjem u okoliš akumuliraju u koncentracijama koje izazivaju nepoželjne učinke. (19) Njihova ksenobiotska narav podrazumijeva strukture koje postojeći mikrobnim enzimima za razgradnju ne prepoznaju, zbog čega dolazi do njihove akumulacije u okolišu. Mogu biti transformirani biotičkim i abiotičkim procesima, što dovodi do promjena njihova kemijskog stanja te naposljetku i do promjena njihove toksičnosti i reaktivnosti. Stoga se toj sposobnosti mikroorganizama, da metaboliziraju ksenobiotike te ih prevode u ugljični dioksid, vodu i mineralne elemente, posvetila velika pozornost kao ekonomičnoj metodi uklanjanja navedenih onečišćivača iz okoliša. S druge strane, određeni organizmi imaju veliku sposobnost bioakumulacije kemijskih spojeva iz okoliša na svim razinama prehrambenog lanca, što za posljedicu može imati biomagnifikaciju na višim trofičkim razinama prehrambenog lanca (20).

Postoji mnogo različitih načina kako onečišćivači ulaze u okoliš. Industrijske otpadne vode, koje sadrže fenolne spojeve i otapala, ugljen i naftni derivati iz starih postrojenja proizvodnje plina, namjerno oslobađanje pesticida u poljoprivredne svrhe, propuštanje kemikalija iz podzemnih spremnika i propuštanje u tlo iz odlagališta otpada, namjerni ili slučajni izljevi nafte - mogu izazvati snažno onečišćenje tla i podzemnih voda.

### Mikrobni metabolizam ksenobiotika

Problemi u zaštiti okoliša vezani za organske kemikalije potakli su velik interes za sposobnost mikroorganizama da metabolički razgrađuju takve spojeve. Već je desetljećima poznato kako su različite vrste mikroorganizama kadre metabolizirati brojne organske spojeve koje je sintetizirao čovjek (21). Tablica 2.

Tablica 2: Primjer nekih uobičajenih toksičnih spojeva i mikroorganizama koji ih metaboliziraju

#### KEMIKALIJE

- fenolni spojevi

#### MIKROORGANIZMI

*Rhizoctonia praticola* (22)

- p-krezol *Trametes versicolor* (23)
- aromatski ugljikovodci *Pseudomonas aeruginosa* UG2 (24,25)
- mješavina policikličkih aromatskih ugljikovodika *Mycobacterium* sp. (26,27)
- fluoranten (FA) *Cunninghamella elegans* (27)
- aromati
  - 3-klorobenzoat *Pseudomonas* sp.B13 (28)
  - fenantren *Pseudomonas* sp.R (29)
  - etilbenzen *Pseudomonas putida* F1 (30)
  - bifenili (arom.ugljikov.) *Beijerinckia* sp. (31)
  - naftalen *Oscillatoria* sp. JCM (32)
  - pentaklorofenol(PCP) *Arthrobacter* ATCC33790 (33)
  - Pseudomonas* (34)
- toluen, benzen miješana metanogena kultura (35)
- izopropil N-fenil
- karbamat *Arthrobacter* sp. (36)
- paration *Pseudomonas stutzeri* (37)
- pentaklorofenol (PCP) (38)
- kloroanilin (39)
- diklor-difenil-trikloretan (DDT) *Phanerochaete chrysosporium*(40)
- poliklorirani bifenili (41)
- dibenzo(p)dioksini (42)
- policiklički aromatski ugljikovodici (PAH)
  - Aspergillus ochraceus*
  - Cunninghamella elegans*
  - Trametes versicolor*
  - Phanerochaete chrysosporium*
  - Saccharomyces cerevisiae* (43)
- klorirani alkeni *Xanthobacter* sp. (44)

## Bioobnova tla

### Mikrobiološka strategija dekontaminacije onečišćenog zemljišta

Uklanjanje onečišćivača koji se pojavljuju u tlima zagađenim industrijskim otpadom može se postići izolacijom autohtonih mikroorganizama, njihovim uzgojem u velikim količinama, eksperimentalnom optimizacijom fizičko-kemijskih čimbenika okoliša te njihovim vraćanjem u tlo. Još jednu mogućnost predstavlja manipuliranje fizičko-kemijskim odlikama tla u korist povećanja broja organizama koji razgrađuju ksenobiotike.

Nafta i petrokemijski proizvodi predstavljaju najčešće ksenobiotike, nerijetko vrlo toksične, koji mogu (što često i jest slučaj) onečistiti tlo i vodu za vrijeme skladištenja i obrade, prijevoza i ukrcavanja, prijenosa cjevovodima, autocisternama, vagonima-cisternama, tankerima i zrakoplovima. Unatoč svim poduzetim mjerama predostrožnosti, gotovo je neizbježno da povremeno dolazi do onečišćenja tla i vode. U svrhu učinkovite sanacije prolivene nafte, vrlo je važno dobro poznavati način širenja nafte i otopljenih sastojaka, hlapljenje, biorazgradnju, razrjeđivanje, ponašanje nafte u heterogenu tlu, učinke nafte u tlu i podzemnim vodama.

Provedljivost bioobnove u cilju čišćenja onečišćenih lokaliteta započinje se procjenom mogućeg stupnja razgradnje zagađivača. Navedena procjena uključuje stupanj razgradnje, sposobnost postizanja potpune mineralizacije, kao i uvjete okoliša za mineralizaciju. Mineralizacija organskih tvari predstavlja potpunu razgradnju kemijskih spojeva na njihove anorganske sastavne dijelove. Prikaz potpune mineralizacije nekog spoja je težak te zahtijeva korištenje radioaktivno označenih supstrata i analize masa (45). Postoje izvješća o potpunoj mineralizaciji toksičnih organskih spojeva od strane čistih kultura: primjerice pentaklorofenola vrstom *Pseudomonas*. (34)

Oksidacija ne dovodi uvijek do mineralizacije, već može biti mnogo nusproizvoda koji ujedno mogu biti i toksičniji od matičnog spoja.(46,47,48) Primjer za to je posljedica mikrobne transformacije poliaromatskih ugljikovodika (PAH) prilikom koje se stvaraju različiti spojevi uključujući trans-dihidrodirole, fenole i kinone, na čiju toksičnost je neophodno ukazati. (49)

Prvi korak u analizi mjesta onečišćenja jest provjera je li pogodno za postupak bioobnove. To uključuje anлізу tla, kemijsku i mikrobiološku, kako bi se odredio stupanj onečišćenja, vrstu tla, razinu hranjivih tvari te prisutnost mikroorganizama koji su sposobni razgraditi toksične spojeve. Ako je malo autohtonih mikroorganizama koji mogu razgraditi onečišćivač ili ih uopće nema, može biti neophodno nacijepiti (inokulirati) mjesto onečišćenja mikroorganizmima koji razgrađuju dotičnu kemijsku supstanciju. Jedino laboratorijska ispitivanja pružaju siguran uvid u metabolizam mikroorganizama jer se kao abiotička kontrola uzimaju sterilizirani pripravci. Navedena vrsta kontroliranih laboratorijskih ispitivanja (korištenjem uzoraka iz okoliša i pojedinačnih mikrobih kultura) pružila je najveći dio informacija kojima trenutačno raspolažemo o genetskim (50), fiziološkim (51,52), biokemijskim (53), kinetičkim (54) aspektima i o aspektima okoliša (55,56) u biorazgradnji organskih spojeva. Jednako se tako, označavanjem uzoraka atomom ugljika, dokazuje kako je biorazgradnja biološke naravi (57). Tlo se uzorkuje i ispituje u cilju utvrđivanja parametara okoliša za optimiziranje procesa biorazgradnje. Uzorci se uzimaju periodično kako bi se utvrdili razmjeri razgradnje. Potom se rezultati mogu primijeniti na licu mjesta.

Dvije su osnovne mogućnosti bioobnove tla: *in situ* i *ex situ*. Obje uključuju biološke, kemijske i fizikalne mehanizme koji razaraju, imobiliziraju ili uklanjaju onečišćivač. Međutim, uvjeti ispod površine nikada neće biti u istom razmjeru kontrolirani kao u postupku *ex situ*. No, s obzirom na troškove, logistička pitanja i



zakonske zahtjeve koji su vezani za postupak *ex situ*, *in situ* postupke možemo smatrati privlačnom alternativom. Bioobnova *in situ* predstavlja bolje rješenje kroz djelomičnu ili potpunu razgradnju onečišćivača nasuprot brojnim tehnikama sanacije koje jednostavno prebacuju otpad iz jednog dijela okoliša u drugi ili ga pak ostavljaju na teret budućim naraštajima.

Sedamdesetih je godina prošlog stoljeća ova tehnika korištena i patentirana za ugljikovodike slučajno ili namjerno ispuštene u okoliš. (58,59)

Korištenje mikroorganizama podzemlja za razgradnju različitih onečišćenja podzemnih voda razvijeno je tijekom 1980-ih godina. (60)

**Tipične *in situ* tehnologije jesu:**

- solidifikacija/stabilizacija(s/s),
- ekstrakcija prozračivanjem (SVE),
- bioobnova/bioprozračivanje (b/b),
- vitrifikacija,
- radiofrekventno zagrijavanje,
- ispiranje tla i ekstrakcija injektiranjem pare ili vrućeg zraka.

Tri čimbenika kojima se provjerava izvodljivost postupka *in situ* su: učinkovitost, primjenjivost i troškovi. Okvir za procjenu mogućnosti korištenja postupka *in situ* uključuje pet kategorija:

- hidrogeološki režim protoka (karakterizacija tokova tekuće i plinovite faze ispod površine tla),
- zakonski propisi (državni ili lokalni),
- raspoloživo vrijeme obnove,
- logistika uklanjanja (onečišćenje smješteno dublje od 1,5 m ili na prostoru većem od 1000 m<sup>3</sup> povećava jednako troškove kao i složenost iskopavanja),
- uvjeti otpada (velika količina otpada ili niska koncentracija onečišćivača).

Ako je onečišćenje ograničeno na 50 cm dubine, može se primijeniti postupak obrade kao pri odlaganju na tlo. Tlo se iskapa i skuplja u gomile u postupku kompostiranja. Dodaju se hranjive tvari, podešavaju pH i prozračivanje kako bi se optimizirala bioobnova. Navedene su metode učinkovite za naftne ugljikovodike, poliklorirane bifenile, stiren, katrane i ugljikovodična klorirana otapala (61). Tlo se može tretirati u posebno izvedenim površinskim bioreaktorima u kojima se inkubira mješavina tla i aktivnog mulja. (62)

Sustavom cijevi dovodi se kisik i hranjive tvari do svake gomile zaštićene plastičnim folijama kako bi se izbjeglo osipanje te zadržala toplina za hladna vremena. Kontrola i vođenje procesa bioobnove obavlja se optimizacijom protoka kisika, propusnosti, homogenosti, sadržaja vlage, temperature, pH i dodavanje anorganskih hranjiva. Tehnikom bioobnove na licu mjesta i na površini (površinske ćelije) izbjegava se prijevoz, a time i uza nj vezane opasnosti i troškovi, te se procjenjuje kako je upola jeftinija od tretmana izvan samog lokaliteta. (63)

Površinski tretman može biti vrlo brz – primjerice 100 dana za tlo onečišćeno naftom.

### **Ako je onečišćenje duboko**

Prvi korak je procjena stanja lokaliteta i informacije o njemu. Proteklih je desetljeća došlo do ogromnoga razvoja tehnika uzimanja uzoraka tla i programske podrške za podzemno kartiranje i modeliranje. Tako se primjenjuje označavanje tla, raspoređivanje točaka ispuha, škropljenja i utiskivanja, odabir vodoravnih ili okomitih bušotina, određivanje dubina do koje bušotine valja ispitivati u svrhu uspješne sanacije.

Kisik se može pokazati kao ograničavajući čimbenik radi njegove slabe topljivosti u vodi te kod sanacije *in situ* dotok kisika predstavlja ključnu točku. Ponekad se preporuča vodikov peroksid, ali postoje problemi vezani uz njegovu visoku toksičnost te reakciju sa sastavnicama tla pri čemu se stvaraju precipitati i mjehurići koji onda blokiraju pore tla. Vodikov peroksid je također i skup u usporedbi s čistim kisikom (64). Ekstrakcijom prozračivanjem i uspostavljanjem vakuuma kroz nezasićena tla potiče se protok svježega zraka ispod površine i tako osigurava kisik potreban za bioobnovu.

Sve djelatnosti moraju biti praćene laboratorijskim ispitivanjima. Mjerenje, nadziranje i podešavanje kontrolnih parametara obavlja se u cilju optimizacije biološkog procesa biorazgradnje, jer je za rast mikroorganizama nužno održavanje odgovarajućih uvjeta okoliša. Razvijanje laboratorijskih metoda za praćenje putova razgradnje ugljikovodika od velike je važnosti, a promjena kemijske strukture predstavlja neophodnu informaciju za procjenu stupnja biorazgradnje. (65,66,57,68)

## **Zaštita podzemnih voda**

Čovjek raspolaže svega dvama tipovima izvora vode - površinskim izvorima (jezerima, potocima, drenažnim područjima koja vodu usmjeravaju ka prirodnim spremnicima) i podzemnim izvorima (bunarima, vrelima, horizontalnim galerijama). Navedeni izvori vode nisu uvijek odijeljeni, zbog hidrauličke međupovezanosti. Suprotno uvriježenom mišljenju, tek manje od 3% raspoložive tekuće slatke vode potječe iz potoka i jezera. Više od 97% je podzemnoga podrijetla te predstavlja vodu u pričuvi. Sva voda koja se nalazi ispod površine zemlje ne može se pridobiti uz pomoć vodonosnih formacija u kojima se nalazi, no u svakom su slučaju raspoložive količine podzemnih voda daleko veće od onih površinskih (69). Stoga je često otkrivanje onečišćenja podzemnih voda izazvalo zabrinutost oko zaštite tih vrijednih vodnih izvora.

Do onečišćenja podzemnih voda dolazi radi pogrešnog spaljivanja otpada, krivog odlaganja otpadnih voda, nepravilnog korištenja kemijskih poljoprivrednih sredstava, slučajnih izljeva, namjernog ili slučajnog odlaganja otpada na zemljištu, curenja podzemnih spremnika, itd. Brojni organski spojevi potječu od naftnih proizvoda koji su procurili ili se izlili u tlo. Proizvodnja, prijevoz i skladištenje nafte i derivata neizbježno uključuje rizik nehotičnih izljeva. Najlakše topljivi, a time ujedno i ekološki

najvažniji sastavni dijelovi nafte su niži alkani i aromati. Ravnotežne koncentracije otopljenih aromata, benzena i toluena za sirovu naftu iznose oko 8 mg/l. (70).

Otopljeni onečišćivači koji potječu od naftnih proizvoda putuju podzemnim vodama brzinom sporijom od samih podzemnih voda. Ta se pojava obično naziva geokemijskom retardacijom te se u slučaju neionskih, nepolarnih organskih sastavnih dijelova u tragovima poput BTEX-a (benzen, toluen, etilbenzen i ksilen) obično pripisuje sorpciji, dijeljenju organskih spojeva između topljive i krute faze. Organske tvari krute faze nastaju uglavnom dijeljenjem (topljivošću). Slaba se adsorpcija organskih spojeva na minerale tla u vodi pripisuje se snažnoj kompetitivnoj adsorpciji vode na polarnim površinama anorganskih tvari. (71,72) Iznad površine vodonosnog sloja nafta prolivena na površini tla ima tendenciju teći okomito prema dolje, pod utjecajem sile teže. (73) Po dolasku na površinu vodonosnog sloja onečišćivač se širi lateralno, dok istodobno nerijetko migrira dublje u vodonosni sloj. Nafta se širi također i radialno kapilarnim silama u mreži pornih prostora između čestica tla. Stupanj lateralnog tijeka (kretanja) podzemnih voda u pješćanim i šljunkovitim vodonosnim slojevima obično se kreće u rasponu između 0,1 i 3 m dnevno. (74) Brojni onečišćivači naftnoga podrijetla putuju jednako ili gotovo jednako brzo kao podzemne vode, dok se neki drugi opet kreću sporije poradi kemijskih interakcija s česticama tla u vodonosnom sloju. Osim fizičkih procesa, postoje također i oni kemijski i biološki koji utječu na ponašanje onečišćivača u podzemnim vodotokovima.

Organski onečišćivači mogu se transformirati u druge spojeve nizom iznimno složenih kemijskih reakcija kao što su hidroliza, oksidacija, itd. (75) i biološkim transformacijama. Mikroorganizmi vezani uz krute površine unutar vodonosnih slojeva mogu transformirati određene organske onečišćivače. Bakterije na površini čestica osiguravaju energiju i hranjive tvari iz podzemnih voda koje teku pokraj njih te, kada se njihov broj poveća, mogu stvoriti biofilme. Energija za rast crpi se iz oksidacije organskih supstrata ili anorganskih spojeva, poput vodika ili reduciranih oblika željeza, dušika ili sumpora.

Kada dođe do izljeva nafte u otvorenom vodonosnom sloju, stupanj i razmjeri biorazgradnje ugljikovodika ovisit će o koncentraciji, kemijskom sastavu i fizikalnim svojstvima ugljikovodika, autohtonoj mikrobnjoj populaciji, fizikalnim uvjetima u vodonosnom sloju, te dostupnosti hranjiva potrebnih za rast. Za sveobuhvatno i brzo uklanjanje visokih koncentracija ugljikovodika potreban je molekularni kisik radi općenito oksidativne naravi mikrobne razgradnje ugljikovodika. Potreba za kisikom u blizini izljeva ugljikovodika premašuje količinu otopljenog kisika koji se prirodno nalazi u podzemnim vodama. Dovoljnu količinu kisika bakterijama moguće je osigurati bilo putem bušotina bilo prirodnim procesima (76).

## Zaključak

Bioobnova predstavlja primjenu biološkog postupka u cilju čišćenja opasnih kemikalija. Ona zahtijeva kontrolu i manipulaciju mikrobnih procesa u površinskim

reaktorima ili u podzemlju. Posljednjih je dvadeset godina bioobnova prešla put od nepoznate tehnologije do jedne od glavnih tehnologija sanacije. To se objašnjava nižim troškovima bioobnove u usporedbi s tehnologijama poput, primjerice, spaljivanja, a ujedno i činjenicom da ona uništava većinu organskog otpada, uklanjajući time nepovoljne učinke za okoliš i zdravlje ljudi.

Opasni su spojevi otporni na razgradnju jer uvjeti okoliša ne pogoduju djelovanju mikroorganizama što inače rezultira biokemijskom razgradnjom. Optimizacija uvjeta okoliša postiže se putem razumijevanja bioloških načela po kojima se navedeni spojevi razgrađuju, te utjecajem uvjeta okoliša na mikroorganizme i njihove katalizirane reakcije.

Značajan postotak izljeva opasnih tvari uključuje proizvode na osnovi nafte, hlapljivih otapala, ili poliaromatskih ugljikovodika. Rasprostranjeno korištenje i skladištenje naftnih goriva učinili su naftne ugljikovodike najčešćim onečišćivačima tla i podzemnih voda. Onečišćenje naftom, neovisno o izvoru, nerijetko sadrži znatne mješavine ugljikovodika. Primjena bioobnove na naftne ugljikovodike nedvojbeno predstavlja područje na kojem je dotična tehnologija najkompletnije razvijena. Danas je nepobitna činjenica da bioobnova može na prihvatljiv način rješavati problem kemikalija u jednakoj mjeri kao i raspoložive alternativne tehnologije. Njezine su dvije glavne prednosti pritom niži troškovi te mogućnost primjene na licu mjesta. Nedostatak bi se, međutim, mogao nalaziti u važnosti znanstvenog intenziteta osmišljavanja i provođenja bioobnove.

Bioobnova u cijelosti ostaje područje obilježeno brzim napretkom: brojne tehnologije koje se mogu primijeniti na lokalitete onečišćene naftnim ugljikovodicima danas su komercijalno dostupne i primjenjuju se na tisućama lokaliteta.

## SOIL POLLUTION WITH PETROLEUM HYDROCARBONS - BIOREMEDIATION: POTENTIALITY AND PRACTICE

### *Abstract*

*Increasing realizations on irreversible and long-term impacts of pollution on impairing soil and sediments quality and potable water reserves has had an increasing impact on research and policy of environmental management over the past twenty years. The introduction of anthropogenic, harmful and noxious chemical compounds into soil has had a serious impact on various areas of human activities, from agriculture, potable water supply, urban planning, to resource management.*

*Soil is an equally endangered ecosystem as air and water, which is why some developed countries have already twenty years ago passed laws on the preservation of the quality of soil, and hence also of underground waters. Pollution causes of soil and underground waters are: improperly buried waste, bad solutions for wastewater flows, improper use of chemicals in agriculture, accidental spills caused by neglect, overuse of underground waters, disposal of sanitary waste into the ground, disposal of industrial waste sludge, leakage from industrial wastewater basins, leakage from fuel reservoirs in storage areas, etc.*

*Hydrocarbons are a frequent cause of environmental pollution, which is why the oil and petrochemical industries have a great responsibility for resolving environmental protection problems. The industry of developed countries has already in the 60s started research in co-operation with scientific institutions for the purpose of resolving the issue of environmental pollution by oil hydrocarbons.*

*The aim of the paper is to present how biological processes as base for many useful technologies could be used as economically justified and efficacious procedure for soil and groundwater decontamination in case of hazardous pollution, particularly with petroleum hydrocarbons.*

## **Introduction**

The complexity of the soil and sediment system and its processes cannot be tackled properly unless scientists from different disciplines work together. So, accordingly a number of multidisciplinary soil research programmes have been started in various countries. Besides, in European countries, in last decade is noticed ever growing awareness of necessity to integrate knowledge from different branches of science, policymakers and industry so the soil as an ecosystem can be managed properly. Input of pollutants in the soil has serious consequence in different area of human needs and activities such as agriculture, land use, groundwater and drinking water supply, town and country planning or nature management. There is the necessity for law policy especially to protect the soil and that kind of regulations for water and air quality and for waste treatment that provide indirect protection of soil and ground water.

In Croatia, the situation is far more serious and difficult after heavy shelling and destruction of cities and industrial area during the war. On different parts of the state refineries, chemical factories, transformers/condensers, ammunition stores were shelled and since 1991 many dangerous chemicals (PAHs, PCBs, pesticides,

petroleum oils, heavy metals) are leaking thorough soil to underground rivers contaminating essential water resources and potential agriculture land.

## Bioremediation

Bioremediation is the process in which the xenobiotics introduced into environment are being transformed to a less toxic or innocuous form, or mineralised to inorganic (e.g. carbon dioxide and water). This process is based on the capability of microorganisms to use different chemicals as the source of energy and humankind is frequently exploiting it. In fact, they are the basis of conventional engineering techniques for wastewater treatment. Biodegradation processes often will completely destroy or mineralise (conversion of an organic molecule into its inorganic constituents) organic compounds.

Biological processes have been used for many centuries for bread, wine and beer production to typical food production such as cheese, yoghurt, soy sauce or alcohol. Microbial processes produce many industrial chemicals including organic acids, solvents, polymers, specialized enzymes, and insecticides. Many medical products are produced by biological processes including antibiotics, steroids, and genetically engineered anticancer compounds. Economics is motivation for application biological processes in food, drugs and chemical production. Economics is also motivation for the use biological processes to treat hazardous waste what began in late 1960s and early 1970s.

There is little difference between the design principles of wastewater biological processes and those for bioremediation of hazardous chemicals. Biological processes are catalysed chemical processes. Bioremediation uses a catalyst (enzyme) that is supplied by microorganisms to catalyse the destruction of a specific hazardous compound. Because of environment complexities process design and operation for bioremediation must be undertaken with complete knowledge of the chemical reactions and biological principles involved. Certain chemicals can accumulate in the environment to the levels that threaten human health or environmental quality. Before mid -1960s it has been thought that microorganisms could degrade all compounds that entered the environment. The lesson of DDT widely used pesticide resistant to microbial attack and its solubility in lipids led to its bioaccumulation in organisms at higher levels of ecological food webs (1, 2). On the other hand enormous natural capacity of microorganisms to degrade organic compounds is the basis for bioremediation that also has limitations that must being recognised when considering its use. Specially in situ biodegradation processes are gaining attention because of the role that microorganisms may play in alleviating environmental pollution. (3, 4).

Biodegradation - biotransformation which causes simplification of an organic compounds structure by breaking intramolecular bonds - is frequently exploited in conventional engineering technique for wastewater treatment (5). Simplification via biodegradation may be subtle, involving merely a substituent functional group, or

severe, which will completely destroy or mineralise organic compound (conversion of an organic molecule into its inorganic constituents e.g.  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_4^{--}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) (6). High concentrations of persistent organic compounds found in organisms, especially those present in the higher levels of food chains and toxicity associated with these chemicals usually led to public disquiet (7).

The bioremediation processes are being carried out through either aerobic or anaerobic pathways by indigenous heterotrophs or by especially engineered organisms. For some xenobiotics the process, can also be carried out by cometabolic process, which use another compound as the carbon source. (8)

## Composition of soil

Soil is the complex mixture of more or less finely divided rock particles, moisture air organic matter, bacteria, insects and other small animal species (9). The non-living or abiotic part of soil consists of three components: a gaseous, a liquid and a solid phase. Cavities of different shapes and sizes occur in between the solid particles, together consisting the pore space. The part of total soil volume that is occupied by pores may vary widely and is related to the type of soil (sandy, clay or peat soils). The pores contain soil gas and soil moisture that are mobile and the relative contribution of gas and liquids are continuously changing as influenced by precipitation and evapotranspiration (10).

The soil gaseous phase in principle has the same composition as the atmosphere. Consumption of oxygen and production of carbon dioxide occur as the result of microbial activities and root respiration. In the upper part of soil, air and water are usually found simultaneously.

The soil solid phase may according to its composition, be divided in an organic and mineral fraction. The organic fraction predominantly results from plant material and mainly consists of living plant (roots), dead plant material in different stages of decomposition - humic substances. These humic compounds contain large numbers of electric negatively charged reactive groups, which plays an important role in the electrostatic adsorption of cations, the bonding of water and the coherence of soil particles resulting in a certain structural stability of soil. For many organic compounds (e.g. pesticides, oil) it is the main reactive phase in soil (10).

The mineral fraction of soil is mainly composed of quartz, other oxides, and clay minerals. The quartz, which is the dominant constituent in sandy soils, is relatively inactive whereas oxides of e.g. iron, aluminium and manganese and clay minerals are the reactive part. These differences in reactivity can be attributed to differences in specific surface area (as related to particle size) and surface charge density of the compounds involved. The nature and magnitude of the electric charge of other oxide particles are greatly influenced by the pH value of the system (11).

## Microbial communities of soil

The soil microbial biomass consist of many species of bacteria, viruses, myxomycetes (slime fungi) and larger soil organisms such as yeast, algae and protozoa. The microorganisms derive their energy by oxidising plant and animal residues. The final result of microbial activity is the liberation of carbon, nitrogen, phosphorus, potassium and sulphur in forms available to plants which are dependent upon nutrients made by microorganisms - essential link in the cycle of food and energy in nature (12). Although each species has a particular role in soil, for many purposes the biomass can be considered as a single compartment. The biomass is a sensitive indicator of changes in soil due to changing management practices. For example, long term application of metal contaminated sewage- sludge to agricultural land had being shown to reduce the size of the biomass considerably (13). In soil continuous interactions exist via physical and chemical processes within the abiotic part. Moreover, there is a lasting interplay between the soil biota, and between the living and non-living components of soil. This makes the soil an extremely dynamic and complex system.

Table 1: Physicochemical characteristics of soil as microbial habitat

temperature	from -40 °C (Antarctic) to +65 °C (hot desert)
pH	2, 5 -11.00 (most soils are slightly acidic)
water potential	from 0.0 - 0,99
salinity	from 0.0 to salt saturation
oxygen availability	adequately oxygenated except waterlogged soil
inorganic nutrients	N and P frequently limiting
organic matter	consisting mostly of refractory humic substances
attachment surfaces	great abundance of inorganic and organic surfaces

## Factors that influence biodegradation in soil

### Nutrients

Lack of nutrients, other than pollutant, e. g. C, N, P, K, S and trace elements may be the cause of low degradability of pollutant.

### Aerobic-anaerobic conditions

Majority of pollutants are degradable in aerobic conditions, but there may be an absence of a suitable electron acceptor, if not oxygen. There are certain chlorinated organic compounds where anaerobic conditions are more conducive to biodegradation.

### Soil water content

Water is essential for microbial growth however, so below certain moisture levels no biodegradation may occur but in waterlogged soil, anaerobic conditions will prevail.



**Soil texture and structure**

The relative proportions of sand, clay and silt and the arrangement and organisation of the soil particles will directly influence the passage of oxygen and carbon dioxide to and from the sites of microbial activity.

**pH**

Soil reaction of various soils encompasses a wide range, but most of them are somewhat acidic. Most bacteria have limited tolerance for acidic conditions; fungi are more resistant consequently, the soil pH will often determine what type of microorganisms can participate in biodegradation (14).

**Temperature**

Biodegradation occurs at a wide range of soil temperatures. In most soils conditions favourable for mesophilic microorganisms prevail during at least a part of the year. Some investigations showed that hydrocarbon-degrading microorganisms isolated from oil-contaminated soils in Alaska were able to grow at 5 °C (15). Mesophilic microorganisms are the most common in all types of soils and biodegradation occurs at rates above 20 °C (i.e. hydrocarbons) (16). Relatively little information exists on thermophilic degraders in soil. Some thermophilic bacteria have been isolated growing on n-tetradecane as growth substrate. (17).

**Toxic compounds**

Other toxic compounds at the site not amenable to biodegradation may inhibit the activity of the pollutant-degrading organisms.

**Solubility**

Pollutant has to be soluble to be valuable to the microflora. Problems also occur if it is complexed with insoluble materials. If all above factors are being optimised we may expect removing of the pollutant from the environment. Even highly contaminated soil however supports a wide range of microorganisms, some of which will compete with pollutant degraders for nutrients and limit their growth. Balance of microflora on polluted site will change in the favour of pollutant degraders which in number will prevail. Disappearance of pollutant (growth factor) will change the composition of microbial community and number of specific degraders will decrease. (18)

**Types of xenobiotic pollution**

Xenobiotics are wide variety of compounds made by man, introduced into environment in concentrations that cause undesirable effect. (19) Their xenobiotic character meant that their structures are not easily being recognised by existing degradative enzymes and as a result they accumulate in the environment. They can be transformed as a result of the biotic and abiotic processes, leading to changes in their chemical state and ultimately in their toxicity and reactivity. Therefore, microbial ability to metabolise xenobiotic compounds and to transform them to carbon dioxide,

water and mineral elements have received much attention as a cost effective method of removing these pollutants from the environment. On the other hand certain organisms have great ability for bioaccumulation of chemical compounds from their environment on every level of food chain what could have as a consequence biomagnification on higher trophic levels of food chain. (20)

There are many different ways how pollutants may enter environment. Industrial effluents, which contain phenolic compounds and solvents, coal and oil derivatives from old gas manufacturing plants, deliberate release of pesticides for agricultural purposes, leakage of compounds from underground storage tanks and leachates from landfill sites, deliberate or accidental oil spills can all cause severe soil and groundwater pollution.

### Microbial metabolism of xenobiotics

Environmental problems associated with organic chemicals stimulated great interest in the ability of microorganisms to metabolise them. It is known for decades that a wide variety of microorganisms are capable of metabolising many of the organic chemicals synthesised by man (21). Table 2.

Table 2: Example of some common toxic chemicals and the microorganisms that metabolise them

CHEMICALS	MICROORGANISM
• phenolic compounds	<i>Rhizoctonia praticola</i> (22)
• p-cresol	<i>Trametes versicolor</i> (23)
• aromatic hydrocarbon	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG2 (24,25)
• mixture PAHs	<i>Mycobacterium</i> sp. (26,27)
• fluoranthene(FA)	<i>Cunninghamella elegans</i> (27)
• aromatics	
3-chlorobenzoate	<i>Pseudomonas</i> sp.B13 (28)
phenantrene	<i>Pseudomonas</i> sp.R (29)
ethylbenzene	<i>Pseudomonas putida</i> F1 (30)
biphenyl (arom.hydroc.)	<i>Beijerinckia</i> sp. (31)
naphthalene	<i>Oscillatoria</i> sp.JCM (32)
pentachlorophenol (PCP)	<i>Arthrobacter</i> ATCC33790 (33)
	<i>Pseudomonas</i> (34)
• toluene, benzene	mixed methanogenic culture (35)
• isopropyl N-phenyl	
• carbamate	<i>Arthrobacter</i> sp. (36)
• parathion	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (37)
• pentachlorophenol (PCP)	(38)

- chloroaniline (39)
- DDT *Phanerochaete chrysosporium* (40)
- Polychlorinated biphenyls (41)
- dibenzo(p)dioxins (42)
- polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) *Aspergillus ochraceus*  
*Cunninghamella elegans*  
*Cunninghamella echinulata*  
*Trametes versicolor*  
*Phanerochaete chrysosporium*  
*Saccharomyces cerevisiae* (43)
- chlorinated alkenes *Xanthobacter* (44)

## Soil bioremediation

### Microbiological strategy for the decontamination of polluted land

Removal of contaminants occurring in land polluted by industrial waste may be effected by isolation of indigenous microorganisms capable of their decomposition, growing them in large numbers, experimental optimisation of physicochemical environmental factors and reinoculating them into the soil. Another possibility is manipulating the physicochemical characteristics of the soil to favour the proliferation of pollutant-degrading organisms.

Petroleum and petrochemicals are most common xenobiotics often highly toxic, which could (and do) contaminate soil and water during storage and processing, transfer and loading, transportation in pipelines, road tank trucks, rail tank wagons, tankers and aircrafts. Despite all precautions that are taken, it is almost inevitable that contamination of soil and water will occasionally occur. For the effective clean-up operations after an oil spill it is very important to have a thorough knowledge of the spreading of oil, spreading of dissolved components, fate of dissolved components, evaporation, biodegradation, dilution, behaviour of oil in heterogeneous soil, effects of oil in soil or groundwater.

The feasibility of bioremediation for cleanup of contaminated sites starts with assessment of the degradation potential of the contaminants. This assessment includes the ratio of degradation, the ability to achieve total mineralization, as well as the environmental conditions for mineralization. Mineralization of organics is the complete breakdown of the chemicals to its mineral constituents. The demonstration of complete mineralisation of a compound is difficult and requires the use of radiolabelled substrates and mass balance analyses. (45) There are reports of the complete mineralization of toxic organic chemicals by pure cultures, e.g. pentachlorophenol by a *Pseudomonas* species (34)

Oxidation is not always leading to mineralization, there could be many intermediates or sideproducts that also could be more toxic than the parent compound. (46,47,48)

The example for this is the result of microbial transformation of PAHs where various products including trans-dihydrodiols, phenols and quinones are formed and it is essential that toxicity of these compounds be elucidated. (49)

First step is analysing the site thoroughly to see if the site is suitable for bioremediation operation. These include chemical, soil and microbial analysis to determine levels of pollutant present, soil types, nutrient levels and presence of microorganisms that are capable of degrading the toxic compounds. If there are few or no indigenous microorganisms capable of degradation the pollutants it may be necessary to inoculate the site with known degraders.

Only laboratory assays provide definitive evidence for microbial metabolism because sterilised treatments can be examined as abiotic controls. This type of controlled laboratory experiments (using environmental samples and individual microbial cultures) provide the majority of information presently available on genetic (50) physiological (51,52) biochemical (53), kinetic (54) / and ecological aspects (55,56) of the biodegradation of organic compounds. Also, by labelling the samples with a single C atom has been shown that degradation appears to be of biological nature (57). Soil samples had to be taken and examined to determine environmental conditions for optimal biodegradation. Samples are being taken periodically to determine the extent of degradation. Then the results can be initiated at the field.

There are two basic possibilities for soil bioremediation: *in situ* and *ex situ*. Both include biological, chemical and physical mechanisms that destroy, immobilise or remove contaminants. However, conditions in the subsurface will never be as controlled as in an *ex situ* process. But the costs, logistical concerns and regulatory requirement associated with excavation, *ex situ* treatment and disposal can make *in situ* treatment an attractive alternative. *In situ* bioremediation offer a better solution through partial or complete destruction of the contaminants in contrast to many remedial techniques that simply transfer the waste from one part of the environment to another or as the burden to future generations. In the 1970's technique was used and patented for hydrocarbon accidentally or purposefully spilled into the environment. (58,59) Use of subsurface microorganisms to degrade a variety of groundwater contaminants evolved in the 1980s (60).

**Typical *in situ* technologies are:**

- solidification/stabilisation (s/s),
- soil vapour extraction (SVE),
- bioremediation/bioventing (b/b),
- vitrification,
- radiofrequency heating,
- soil flushing and steam or hot air injection/extraction.

Three feasibility screening criteria for *in situ* treatment are: effectiveness, implementability and costs. Overall frameworks for evaluating the potential for using *in situ* treatment include five categories:

- Hydrogeologic flow regime (characterises the gas and liquid flow in the subsurface).
- Regulatory standards (state or local).
- Time available for remediation.
- Removal logistics (contamination located deeper than 1.5 m or occupying volume of more than 1000 m<sup>3</sup> increases both the cost and the complexity of excavation).
- Waste conditions (large volume of waste or low contaminant concentrations).

If the contamination is limited on 50 cm of top soil land farming treatment could being apply. Soil could be excavated and piled into heaps in a composting process. Nutrients are being added and soil pH and aeration altered (controlled) to optimise bioremediation. These methods are successful for petroleum hydrocarbons, PCP, styrene, tars and chlorinated hydrocarbons solvents (61) Soil could being treated in especially structured surface bioreactors where after soil excavation, soil/slurry mixture is being incubated in the reactor.(62)

Manifold piping brings oxygen and nutrients to each pile protected with plastic sheet for preventing runoff and trapping heat during cold weather. Optimising oxygen flow, permeability, homogeneity, moisture content, temperature, pH and inorganic nutrient addition should be controlled to maintenance bioremediation process. Onsite aboveground bioremediation technique (aboveground cells) avoids transportation and liability and is expected to cost half as much as offsite treatment (63)

Aboveground treatment can be very rapid -100 days for e.g. petroleum - contaminated soil.

#### **If contamination is deep**

First step to success is site assessment and site information's. In the last decade there is enormous development of field sampling techniques and software tools for subsurface mapping and modelling. Site information's: spacing of vent, sparge and injection points, choice of either horizontal or vertical wells, depth to which wells should be screened for successful remediation.

Oxygen may be limiting factor due his low solubility on water and for in situ remediation oxygen delivery is the critical factor. Hydrogen peroxide is sometime recommended but there are problems with high toxicity, reaction with soil constituents to produce precipitates and bubble formation which blocks soil pores. Hydrogen peroxide is also expensive in comparison with pure oxygen (64). Soil vapour extraction, drawing a vacuum through unsaturated soils promotes the flow of fresh air into the subsurface and supplies oxygen to support bioremediation.

All activities must be followed by laboratory assays. Bioprocess control parameters can be measured and manipulated for optimisation because of proper environmental conditions must be maintained for growth of the organisms. Developing laboratory methods for screening of hydrocarbons degradation pathways is of considerable

importance and change of chemical structure is necessary information in estimation of the biodegradation degree (65,66,57,68)

## Groundwater protection

There are but two sources of water supply available to man - surface sources (lakes, streams, drainage areas which funnel Water toward holding reservoirs) and ground sources (wells, springs, and horizontal galleries). These water sources are not always separate, because of hydraulic interconnections. Contrary to current opinion less than 3% of the fluid fresh water available occurs in streams and lakes. More than 97% is underground and represent water in storage. Not all the water beneath the earth's surface can be recovered from the water-bearing formations in which is found, but anyway the available supply of ground water is many times greater than available supply of surface water (69). Frequent discoveries of groundwater contamination had as a consequence the growing concern over protection of these valuable water sources.

Groundwater contamination stems from improperly buried wastes, poor effluent disposal practices, improper use of agricultural chemicals, accidental spillages, intentional or purpose disposal of wastes on land, leaking of underground tanks etc. Many organic compounds are derived from petroleum products that have leaked or spilled into the ground. The production, transportation, and storage of petroleum inevitably involve the risks of accidental spills. The most soluble, and thus the most environmentally important constituents of oils, are the lower alkanes and aromatics. The equilibrium concentrations of dissolved aromatics, benzene and toluene for crude oils are reported to be about 8 mg/l. (70).

Dissolved contaminants derived from petroleum products travel in groundwater at a velocity less than that of the groundwater. This phenomenon is usually referred to as geochemical retardation and in the case of nonionic, nonpolar trace organic constituents such as BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) is generally attributed to sorption, a partitioning of the organic compounds between the solution and solid phase. Solid phase organic matter occurs essentially by partition (solubility). The weak adsorption of organic compounds by soil minerals in water is attributed to the strong competitive adsorption of water on polar mineral surfaces. (71,72) Above the water table oil spilled at the ground surface is encouraged to flow vertically downwards under gravity. (73) After arrival at the water table, contaminant spread laterally and at the same time often migrate deeper in the aquifer. The oil is also spreading out radially under capillary forces in the network of pore spaces between the grains of soil. Lateral rates of groundwater flow in sand and gravel aquifers are generally in the range of 0, 1 to 3 m per day. (74) Many petroleum derived contaminants travel as fast or nearly as fast as the groundwater, whereas other petroleum derived contaminants move at slower rate because of chemical interactions with soil particles in the aquifer. There are except physical processes,

chemical and biological processes too which influence contaminants behaviour in the underground.

Organic contaminant can be transformed into other compound by extraordinarily complex set of chemical reactions - hydrolysis, oxidation (75) and by biological transformations. Microorganisms attached to solid surfaces within the aquifer can transform certain organic contaminants. The attached bacteria obtain energy and nutrients from groundwater flowing by and may form biofilms as their number increase. Energy for growth is obtained from oxidation of organic substrates or inorganic compounds, such as hydrogen or reduced forms of iron, nitrogen or sulphur.

When considering a petroleum spill in an unconfined aquifer, the rate and extent of hydrocarbon biodegradation will depend on the concentration, chemical structure and physical properties of the hydrocarbons, the indigenous microbial population, the physical conditions in the aquifer, and the availability of the constituents required for growth. For extensive and rapid removal of high concentrations of hydrocarbons molecular oxygen is required because of generally oxidative nature of microbial hydrocarbon degradation. The oxygen demand in the vicinity of hydrocarbon spills is greater than can be supplied by the dissolved oxygen naturally present in groundwater. Sufficient oxygen may be provided to the bacteria either thorough wells or through natural processes. (76)

## Conclusion

Bioremediation is the application of biological treatment to the cleanup of hazardous chemicals. It requires the control and manipulation of microbial processes in surface reactors or in the subsurface. Within the last twenty years bioremediation has grown from an unknown technology to one of the major treatment technologies. The basis for this growth is bioremediation's lower cost than technologies such as incineration and because it destroys most organic wastes, eliminating health and ecological effects.

Hazardous compounds persist because environmental conditions are not appropriate for the microbial activity that results in biochemical degradation. The optimisation of environmental conditions is achieved by understanding the biological principles under which these compounds are degraded, and the effect of environmental conditions on microorganisms and their catalysed reactions.

A significant percentage of hazardous spills are petroleum-based, volatile solvent-based, or consist of PAHs. The widespread usage and storage of petroleum fuels has made petroleum hydrocarbons the most prevalent soil and groundwater contaminant. Petroleum contamination, regardless of its source, frequently contains large mixture of hydrocarbons. The application of bioremediation to petroleum hydrocarbons is undoubtedly the field in which the technology is most completely developed. Today, unquestionable fact is that bioremediation can treat chemicals to acceptable levels as frequently as alternate technologies. Two major advantages

are lower capital costs and the ability to perform task on site. Disadvantage may be importance of scientific intensity of bioremediation design and operation.

Bioremediation as a whole remains a rapidly advancing field, and many technologies that can be applied to sites contaminated with petroleum hydrocarbons are now commercially available and have been applied to thousands of sites.

#### Literatura / References:

1. Woodwell, G. M., *Scientific American*, 1967 **216**, 24-31
2. Chapedelaine, G., Laporte, P., Nettleship, D.N., *Can. J. Zool.* 1987 **65** 2922-6
3. Morgan, P., Watkinson, R.J., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1989 **63** 277-300
4. Thomas, J.M., Ward, C.H., *Environ. Sci. Technol.* 1989 **23** 760-66.
5. McCarty, P.L. In *Environmental Biotechnology*; Omen, G. S., Ed.; Plenum Press, New York, 1988, 143-62.)
6. Alexander, M. *Science*, 1981, **211**, 132-38)
7. Livingstone, D.R., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1993 **57**, 195-211
8. Omen, G.S., (Ed.) *Environmental Biotechnology*, Plenum Press, New York, 1982,
9. Holm, J.R., *Topic and Terms in Environmental Problems*, John Willey and Sons, New York, 1985.
10. Assink, J.W., van den Brink W.J. Eds., *Contaminated Soil*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1985.
11. Bohn, L.H., Mc Neal B.L., O'Connor, G.A., *Soil chemistry*, John Willey and Sons, New York, 1985.
12. Fitter A.H. (Ed.), *Ecological Interactions in Soil*, The British Ecological Society and Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1985.
13. Brookes, P.C., McGarh, S.P., 1984 **35**, 341-346.
14. Vanlocke et al. 1975. *Int. J. Environ. Studies* **8** 99-111
15. Baker, J.H., Smith, D.C., 1972. *J. Appl. Bacteriol.* **35** 589-596.
16. Dibble, J.T., Bartha, R., 1979. *Appl. Environ. Microbiol.* **37** 729-739.
17. Klug, M.J.; Markowitz, A.J. 1967. *Nature* **215** 1082-1083.
18. Atlas, M., *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Company, New York, 1984.
19. De Wolf, W. De Bruljn, J.H.H., Seinen, W. & Hermens, J.L., *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 1992 1197-201.
20. Conolly, J.P., *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 1991, 760-70.
21. Kobayashi, H. Rittmann, B.E., *Environ. Sci. Technol.* **16**, 1982, 170-83
22. Bollag J.M., *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3086, 1988
23. Fahraeus, G., Ljunggren, H. *Biochim. Biophys. Acta.* **461**, 1961, 22-32.
24. VanDyke, M.J., Gulley, S.L., Lee, H., Trevors, J.T.; *J. Ind. Microbiol.* 1993, **11**, 163-70.
25. Scheibenbogen, K., Zynter, R.G., Hung, L., Trevors, J.T.; *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994, **59**, 53-59.
26. Heitkamp, M.A., Cerniglia, C.E., *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1989, 1968-73.



27. Pothuluri, J.V., J.P. Freeman, F.E. Evans, C.E. Cerniglia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 2974-83.
28. Pothuluri, J.V., Heflich, R.H., Fu, P.P., Cerniglia, C.E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 937-41.
29. Hatzinger, P.B., Alexander, M., *Environ. Sci. Technol.*, 1995, **29**, 537-545.
30. Higgins, I.J., D.J. Best, R.C. Hammond, *Nature*, 1980, **286**, 561-64.
31. Gibson, D.T., Roberts, R.L., M.C. Wells, V.M. Kopal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **50**, 211-219.
32. Cerniglia, C.E., C. van Baalen, D.T., Gibson, *J. Gen. Microbiol.*, 1980, **116**, 485-94.
33. Edgehill, R.U., Finn, R.K., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, **45**, 1122-25.
34. Radehaus, P.M., Schmidt, S.K., *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2879-85.
35. D. Grbić-Galić, Vogel, T.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **53**, 254-260.
36. Clark, C.G., Wright, S.J.L., *Soil Biol. Biochem.*, 1970, **2**, 19-27.
37. Barles, R.W., C.G. Daughton, D.P.H. Hsieh, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1979, **8**, 647-660.
38. Mileski, G.J., Bumpus, J.A., Jurek, M.A., Aust, S.D. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, **54**, 2885-89.
39. Arjmand, M., Sandermann, H., *J. Agric. Food Chem.* 1985, **33**, 1055-60.
40. Bumpus, J.A., Aust, S.D., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **53**, 2001-18.
41. Eaton, D.C., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1985, **7**, 194-196.
42. Hammel, K.E., B. Kalyanaraman, T.K. Kirk, *J. Biol. Chem.* 1986, **261**, 16984-52.
43. Muencnerova, D., Augustin, J., *Bioresour. Technol.*, 1994, **48**(2), 97-106.
44. Ensign, S.A., Hayman, M.R., Arp, D.J., *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, **58**, 3038-46.
45. Mileski, G.J., Bumpus, J.A., Jurek, M.A., Aust, S.D. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**, 2885-9.)
46. Cerniglia, C.E., *Adv. Appl. Microbiol.*, 1984 **30** 31-71.
47. Rasul Chandry, G., Chapalamadugu, S., *Microbiological Rev.*, 1991 **55** 59-79.
48. Neilson, A.H., *J. Appl. Bacteriol.*, 1990 **69** 445-70.
49. Sutherland, J.B., *J. Ind. Microbiol.*, 1992 **9** 53-62
50. Rojo, F. et al. *Science*, 1987 **217** 139-98.
51. Vogel, T.M.; Criddle, C.S.; *Appl. Environ. Microbiol.* 1986 **52** 200
52. McCarty, P.L.; *Environ. Sci. Technol.* 1987 **21** 722-36
53. Gibson, D.T.; Subramanian, V. In *Microbial Degradation of Organic Compounds*; Gibson, D.T.; Ed.; Marcel Dekker, New York, 1984, chp. 7
54. Simkins, S.; Alexander, M. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984 **47** 1299-1306.
55. Alexander, M. *Science* 1981 **211** 132-38
56. Pritchard, P.H.; Bourquin, A.W., *Adv. Microbiol. Ecol.* 1984 **7** 133-215.
57. Kleopfer, R.D., Easley, D.M., Haas, B.B., Deihl, T.G.; *Environ. Sci. Technol.* 1985 **19** 277-280.
58. Raymond, R.L., Hudson, J.O., Jamison, V.W.; *Appl. Environ. Microbiol.* 1976 **31** 522-535.
59. Raymond, R.L. et al. U.S. Patent 4,588,506, 1986.
60. Lee, M.D. et al. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 1987 **18** 29-89.
61. Morgan, P., Watkinson, R.J., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1989 **63** 277-300.
62. Shepart, B.S. (Ed.) *Bioremediation of Pollutant in Soil and Water*, ASTM STP 1235, American Society for testing Materials, Philadelphia, PA.
63. Scheibenbogen, K., *J. Chem. Tech. Biotechnology*, 1994 **59** 53-59

64. Singleton, I. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1994 **599**-23.
65. Vrdoljak M., Pavušek I., Bobić V. i Protić-Lovašić G. Zbornik sažetaka priopćenja Trećeg Kongresa biologa Hrvatske, Mali Lošinj, 5 – 10.10.1987. Ur. H. Gomerčić, Hrvatsko biološko društvo, Zagreb, 506-507, 1987
66. Pavušek I., Vrdoljak M., Bobić V., Anušić F. i Pritić-Lovašić G. Plenarni referati i izvodi saopštenja četvrte konferencije o zaštiti Jadrana, Neum 1989., 164.
67. Bobić V., Zorić I. i Pavušek I. Abstracts Envirotech Vienna 1989., First International ISEP Congress: Chemical-Technologies-Hazardous Waste, Vienna/Hofburg, Austria, 1989. A.1.
68. Bobić V., Anušić F. i Pavušek I. Abstract Book of 5<sup>th</sup> European Congress in Biotechnology, Copenhagen, C. Christiansen, L. Munck, J. Villandsen, Munksgaard, Copenhagen, 197, 1990.
69. Ground water and wells, Johnson Division, Universal Oil Products Co., Saint Paul, Minnesota 55156.
70. Nathwani, J.S., Phillips, C.R., *Chemosphere*, No4, 1977 157-162.
71. Cary T. Chion, Daniel E. Kile, *Environ. Sci. Technol.*, 1994 **28** 1139-44.
72. Chion, C.T., Lee, J.-F., Boyd, S.A., *Environ. Sci. Technol.* 1990 **24**, 1164-68.
73. T.R. Harper, *Petroleum Review*, **30** (1976).
74. Mackay, D.M., Robert, P.V., Cherry, J.A., *Environ. Sci. Technol.* 1985. **10** 384-92.
75. Mill, T., *Environ. Toxicol. Chem.*, 1982 **1** 135-41.
76. 12th World Petrol. Congress 1987, Cherry, M., *Chemical Engineering*, May, 1994, 108-116.

UDK/UDC	Ključne riječi	Key words
502.37	mjere sanacije, obnove i spasavanja prirode	nature restoration, salvage and rescue measures
504.53.054 : 665.7	naftom zagađeno tlo	petroleum contaminated soil (PCS)
504.53.062.4	bioremedijacija, obnova plodnosti zagađenog tla mikrobiološkom degradacijom zagađivača	bioremediation, fertility restoration of polluted soil by microbiological degradation of pollutant matter

**Autor / Author:**

Vedranka Bobić, dipl.ing., INA d.d. Zagreb, Sektor istraživanja i razvoja, Centralni ispitni laboratorij

**Primljeno / Received:**

09.9.2004.