

**Vedranka Bobić, Iva Beer-Romac, Luka Štajduhar**ISSN 0350-350X  
GOMABN 54, 2, 108-122  
Izvorni znanstveni rad

# ISPITIVANJE BIORAZGRADNJE DIZELSKOG I BIODIZELSKOG GORIVA

## Sažetak

Najveći problem vezan uz područje mikrobiologije goriva jest što mikrobiološke infekcije uzrokuju gubitak kvalitete proizvoda, formiranje muljeva, naslage na filtrima, cijevima i ventilima, oštećenja cjevovoda i spremnika goriva u rafinerijama zbog procesa biokorozije i time visoke troškove popravaka ili zamjene dijelova opreme, promjene u radu motora i, na kraju, gubitak ugleda (korisnici govore o problemima). U radu su prikazani rezultati ispitivanja potencijala autohtone mikrobne populacije izolirane iz tla za biorazgradnju dizelskog goriva (eurodizel) i biodizela (metilnih estera masnih kiselina FAME). Testirane su mješavine dizelskog goriva s 10 % (v/v) FAME (B10), dizelsko gorivo i biodizel (B100). Također su iz dizelskog goriva i biodizela izolirane mješovite kulture mikroorganizama. Rezultati istraživanja pokazali su da mješovita mikrobna populacija koja nije prethodno bila izložena naftnim ugljikovodicima u laboratorijskim uvjetima razgrađuje FAME u potpunosti nakon šest dana, a čisto dizelsko gorivo također, ali u manjoj mjeri. Razlika je uočena i u brzini rasta ovisno o izvoru ugljika (FAME ili čisti eurodizel) kao i u uvjetima rasta ovisno o sastavu hranjive podloge za uzgoj. Iz rezultata se može zaključiti da će u cijelom lancu proizvodnje, skladištenja i opskrbe uz dodatak FAME biti pojačana mikrobna proliferacija što može, ukoliko se ne primjenjuju mjere održavanja čistoće u svim segmentima proizvodnje i distribucije, imati posljedicu smanjenja kvalitete goriva, pojavu biokorozije i, na kraju, pad ugleda distributera na tržištu. Cilj je bio upoznati upravu kompanije s kojom vrstom problema vezanih na kvalitetu goriva će se suočiti uvođenjem biodizela u proces proizvodnje kao i na vrijeme uvesti brze i točne metode za utvrđivanje mogućih mikrobnih infekcija. Također, na temelju rezultata istraživanja, stanja lanca opskrbe i distribucije te iskustava naftne industrije u svijetu, predložene su preventivne i zaštitne mjere.

**Ključne riječi:** gorivo, biogorivo, kvaliteta, biorazgradnja, biokorozija

## 1.Uvod

Biorazgradnja ili biološko kvarenje goriva primarno se istraživalo zbog dva razloga: prvo, mikrobno kvarenje naftnih proizvoda ima gospodarske posljedice, a drugo, akcidenti izljeva nafte predstavljaju glavni izvor onečišćenja ekosustava.

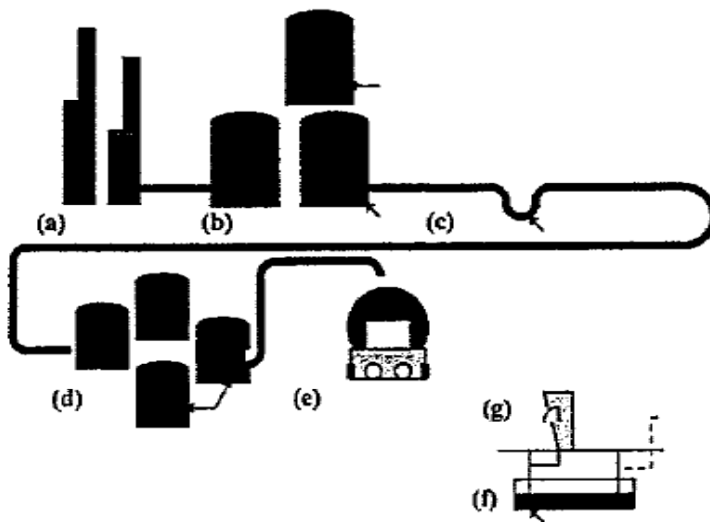
Ranih četrdesetih godina prošlog stoljeća eksplozije spremnika uskladištenog goriva prvi puta su bile povezane s mikrobnom anaerobnom proizvodnjom eksplozivnih plinova – metana, vodika i vodikovog sulfida. Do danas su u različitim industrijskim pogonima zabilježeni slučajevi eksplozija spremnika uzrokovanih mikrobnim infekcijama (1,2). Opasnosti vezane uz mikrobnu kontaminaciju goriva naglašene su od 1958. godine kada je pad vojnog zrakoplova B-52 direktno pripisan čepljenju filtra za dovod goriva mikrobnom biomasom (3).

Osim ovakvih fenomena mikrobnost postala je jedan od glavnih problema svjetske proizvodnje i transporta nafte i plina zbog procesa biokorozije. Pucanje naftovoda na Aljaski 2006. godine, koje je bilo razlogom za 4 %-tno smanjenje opskrbe naftom i rast cijena derivata u SAD-u usmjerilo je pozornost na biokoroziju. Kako infrastruktura stari, biokorozija postaje sve veći čimbenik rizika u mnogim industrijskim operacijama (4). Prema novijim anketama posljedice oštećenja od korozije u SAD-u su procijenjene na 278 milijarda dolara godišnje. Slične su procjene u Velikoj Britaniji, Japanu, Australiji i Njemačkoj pokazale da troškovi štete od korozije iznose 5 % nacionalnog bruto proizvoda. Izvještaji pokazuju da korozija uzrokovana aktivnošću mikroorganizama sudjeluje u ukupnim troškovima korozije s 30 – 50 % (5,6).

Različiti materijali podložni su biorazgradnji: drvo, metali, plastika, keramika, staklo pa i ugljikovodična goriva (7). Zapravo razlika između bioremedijacije (bioobnove) ekosustava i biološkog kvarenja proizvoda u potpunosti je komercijalna. S vanjske strane „ograda“ mikrobnost aktivnost naziva se bioremedijacija dok se s ove strane „ograda“ posljedica mikrobnosti naziva kvarenjem kada proizvod gubi komercijalnu vrijednost zbog mikrobnosti infekcije. Uvođenje etilenglikol monometil etera (EGME) kao inhibitora zamrzavanja goriva utjecalo je na smanjenje broja mikroorganizama u sustavima goriva, no od tada je razvijeno niz različitih aditiva što je uvelike utjecalo na sastav mikrobnih zajednica u gorivima.

S druge strane, niski sadržaj sumpora i uvođenje mješavina s biogorivima, povećalo je vjerojatnost mikrobnosti infekcija goriva i biorazgradnju. Zbog sve strožih propisa u zaštiti okoliša (Kyoto protokol 1997, EU direktiva 2003/30/EG, 2003) uvođenjem prve generacije biogoriva problemi s mikrobnosti infekcijama su se povećali. Biodizel (metilni esteri masnih kiselina, FAME) doprinosi smanjenju količine sumpora, emisije ugljikovog dioksida i čestica. Unatoč tim prednostima, biodizel je mnogo podložniji bio-razgradnji što će biti predstavljeno u ovome radu. Odsutnost aromata, higroskopna svojstva i dostupnost visoko energetskih esterskih veza pridonosi biorazgradljivosti što vodi formiranju čestica (8). Prisutnost vode u etanolu, drugom najkorištenijem biogorivu, vodi do porasta broja pukotina zbog zamora materijala čeličnih legura. Bakterije koje ubrzavaju koroziju identificirane su i u spremnicima s etanolom (9).

Tijekom svakog stadija proizvodnje, skladištenja i distribucije može doći do kontaminacije (slika 1) (10).



Slika 1: Sustav distribucije goriva (10). Strelice pokazuju gdje se nakupljaju voda i mikroorganizmi; a) proizvodni dio, b) rafinerijski spremnici, c) cjevovodi, d) skladišni spremnici, e) transport, f) podzemni spremnici, g) distribucija

Čisto (ispravno) gorivo ne sadrži krute čestice ili tekuća onečišćenja, mikrobnu biomasu, mikrobne metaboličke produkte kao što su površinski aktivne tvari, plinove (sumporovodik, metan) ili kiseline. Izvori mikrobnog onečišćenja su voda (čak i ako je prisutna u gorivu u mikro količinama) i zrak koji ulazi u spremnike kroz odušne ventile. Najznačajnije posljedice prisutnosti vode i zraka su veća količina krutih čestica kao posljedica korozije (biološke i kemijske) mikrobne čestice, mulj na dnu spremnika i biofilm na stijenkama spremnika. Sapnice za ubrizgavanje goriva u suvremenim dizelovim motorima rade i ispuštaju gorivo kroz veći broj otvora u komoru za izgaranje pod izuzetno visokim pritiscima. Pri tome je tolerancija komponenti injektora mnogo manja uz više zahtjeva za čistoćom goriva (npr. krute čestice veličine 2  $\mu\text{m}$  mogu izazvati oštećenja) i ako ti zahtjevi nisu zadovoljeni motor se neće ponašati kako je osmišljeno, što će rezultirati prijevremenim kvarovima (11). Proizvođači motora definiraju čistoću ulaznog goriva ([www.acea.be](http://www.acea.be)) koja za nove HPCR motore (visokotlačni sustavi motora) mora zadovoljiti razinu čistoće čak od 12/9/6 prema ISO normi 4406:1999. Zbog tih razloga kontrola čistoće goriva mora biti provedena naprednim tehnologijama filtracije čestica i vode kao i pročišćavanjem goriva (*fuel polishing*) od dopreme preko skladištenja sve do sapnice za ubrizgavanje goriva.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi stupanj biorazgradljivosti tri različita goriva (dizel, B10 i B100) i usporediti stupanj biorazgradnje u različitim uvjetima. Također, cilj je bio izolirati mikroorganizme iz goriva koje je uskladišteno duže vrijeme kako bi se dokazala njihova prisutnost u proizvodu.

## 2. Eksperimentalni dio

### 2.1. Materijali i metode

Mikrobna mješovita kultura izolirana je iz tla koje nije bilo onečišćeno ugljikovodicima ili metilnim esterima masnih kiselina kako bi se dokazalo da neadaptirane mješovite kulture iz okoliša mogu razgrađivati ispitivana goriva. Jedan gram tla inokulirano je u 100 ml tekućeg medija za uzgoj inokuluma. Izvor ugljika bilo je dizelsko gorivo (5 % v/v). U ekspanzionalnoj fazi rasta 10 ml inokuluma dodano je u 90 ml dva različita mineralna medija (D1 i N4) za uzgoj mikroorganizama s različitim izvorima ugljika (dizel, B10, B100, 2 % v/v) zasebno. Rast mikrobnih kultura na tekućoj hranjivoj podlozi D1 s tri različita izvora ugljika (dizel, B10, B100) praćen je mjerenjem optičke gustoće (OG 460  $\mu\text{m}$ ) 12 dana uz podešavanje pH vrijednosti. Stupanj biorazgradnje ugljikovodika praćen je plinskom kromatografskom analizom. Sva ispitivanja provedena su u Erlenmayer tikvicama volumena 500 ml sa 100 ml podloge u submerznom uzgoju u termostetiranoj tresilici (pH 7,0 $\pm$ 0,2 25 °C i 130 min<sup>-1</sup>). Ispitivanja su provedena u dvije paralele uz kontrolu u koju nisu inokulirani mikroorganizmi. Nakon 6 do 12 dana uzgoja provedena je ekstrakcija ugljikovodika s tetraklormetanom (CCl<sub>4</sub>), a analiza ekstrakta uzoraka provedena je plinskom kromatografskom analizom na instrumentima: Varian 3100 CX, Varian CP 3800.

Izolacija mikroorganizama iz uskladištenog goriva s dna laboratorijskih spremnika provedena je metodom filtracije i uzgoja na čvrstim hranjivim podlogama (ASTM D6974-09). Uzorci su uzimani s dna gdje se voda i mikroorganizmi mirovanjem goriva talože, sterilnom pipetom od 50 ml.

#### Tekući medij za uzgoj inokuluma:

100 ml hranjive podloge po Davisu D1 bez dekstroze i citrata u Erlenmayerovim tikvicama volumena 500 ml s 5 % (v/v) dizelskog goriva kao jedinog izvora ugljika.

#### Tekuće mineralne podloge za rast mješovite kulture:

- Tekuća mineralna podloga za rast D1: minimalna podloga po Davisu bez dekstroze i bez citrata, Sigma-Aldrich, pH 7, 0 $\pm$ 0, 2

- Tekuća mineralna podloga za rast N4: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,81 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 3,82 g/L; MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 1,0 g/L; CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O 0,38 g/L; NaCl 0,1 g/L; pH 7, 0 $\pm$ 0, 2

Izvori ugljika u mineralnim podlogama: INA euro dizel (dizel); FAME – metilni esteri masnih kiselina (B100); 10 % FAME u eurodizelu (v/v) (B10)

#### Postupak ekstrakcije za plinskokromatografsku analizu:

100 ml sadržaja iz Erlenmayerove tikvice prebačeno je u lijevak za odjeljivanje volumena 250 ml i dodano 50 ml tetraklormetana (CCl<sub>4</sub> za spektroskopiju). Uzorci su u lijevcima za odjeljivanje treseni 40 minuta na laboratorijskoj tresilici. Iz sloja s tetraklormetanom odvojeni su alikvoti za plinskokromatografsku analizu.

U slučaju pojave emulzije uzorci su centrifugirani (10.000 min<sup>-1</sup> 10 minuta)

Plinskokromatografske analize: Varian 3100 CX, Varian CP 3800

Za izolaciju mikroorganizama iz goriva na Petrijevim pločama korištene su krute podloge:

- za rast kvasaca i plijesni: MEA Malt extract agar pH 5,2±0,2, Merck, Germany. Za zaustavljanje rasta bakterija korištena je otopina 1,0 % tetraciklin hidroklorida (Calbiochem, USA).
- za rast bakterija: TSA Tryptone soya agar pH 7,3±0,3 (Oxoid, England).

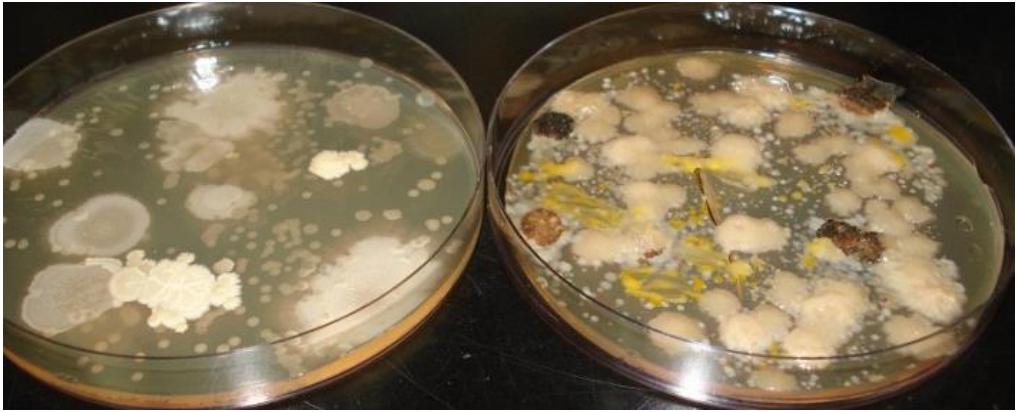
### 3. Rezultati i diskusija

Neposredne posljedice mikrobnog kontaminacije goriva su: metaboliziranje molekula ugljikovodika i aditiva goriva, proizvodnja ekstracelularnih metabolita kao što su površinski aktivne tvari, organske kiseline i sulfidi, povećanje udjela biomase i formiranje biofilma. Daljnje posljedice mikrobioloških infekcija goriva u procesima proizvodnje, skladištenja i distribucije su mikrobnog korozija, čepljenje filtra, trošenje motora, depoziti korozije na dijelovima motora, smanjenje temperature izgaranja, promjene u značajkama goriva i gubitak aditiva. U sprečavanju ovih pojava važno je dobro poznavanje vrlo specifičnih mikrobnih fizioloških procesa kao što je biorazgradnja netopljivih uljnih supstrata.



Slika 2: Mješovita mikrobna kultura izolirana na podlozi MEA s dna laboratorijskog spremnika s B100 nakon 2 mjeseca skladištenja

Uvođenje točne i brze metode za utvrđivanje stupnja mikrobiološke čistoće lanca proizvodnje i distribucije goriva treba se zasnivati na dobrom poznavanju fiziologije mikrobnih konzorcija u medijima kao što su ugljikovodici i FAME primarno zbog njihove karakteristike netopljivosti u vodenom mediju. Sastav mikrobnih populacija u sustavima vrlo je različit i mijenja se ovisno o uvjetima u kojima mikroorganizmi rastu i mediju koji koriste kao izvor hrane (slike 2 - 4).



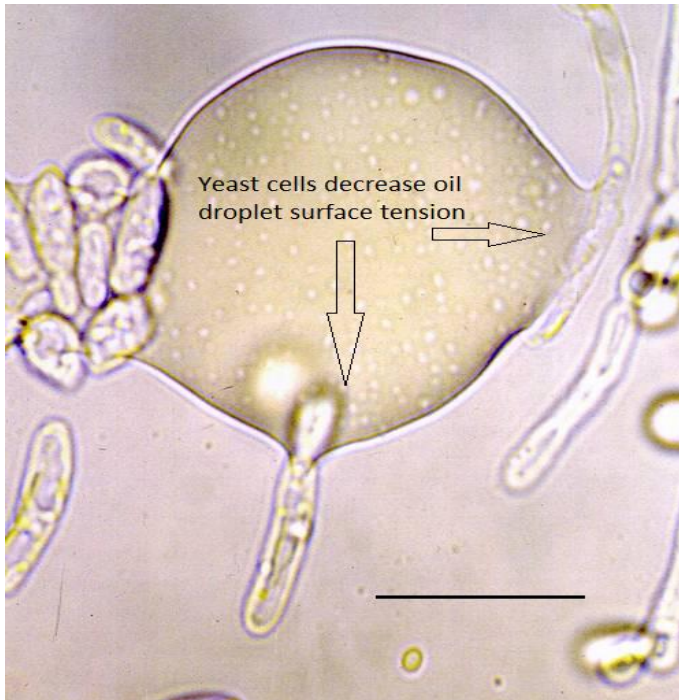
Slika 3: Mješovita mikrobnna kultura izolirana na dvije različite hranjive podloge (TSA, MEA) u laboratorijskim uvjetima iz vodenog sloja s dna laboratorijskog spremnika s B10 nakon dva mjeseca skladištenja



Slika 4: Mješovita mikrobnna kultura izolirana na dvije različite hranjive podloge (TSA, MEA) iz vodenog sloja s dna laboratorijskog spremnika sa dizelskim gorivom nakon tri mjeseca skladištenja

Gorivo treba proći kroz staničnu membranu kako bi ga mikroorganizmi koji se okupljaju u nakupine oko sitnih kapljica asimilirali (slika 5) (12). Sposobnost mikroorganizama da intracelularno akumuliraju ugljikovodični supstrat što ukazuje na transport kroz staničnu membranu, određena je postupcima elektronske mikrofografije, plinske kromatografije i x-ray fluorescencijom (13).

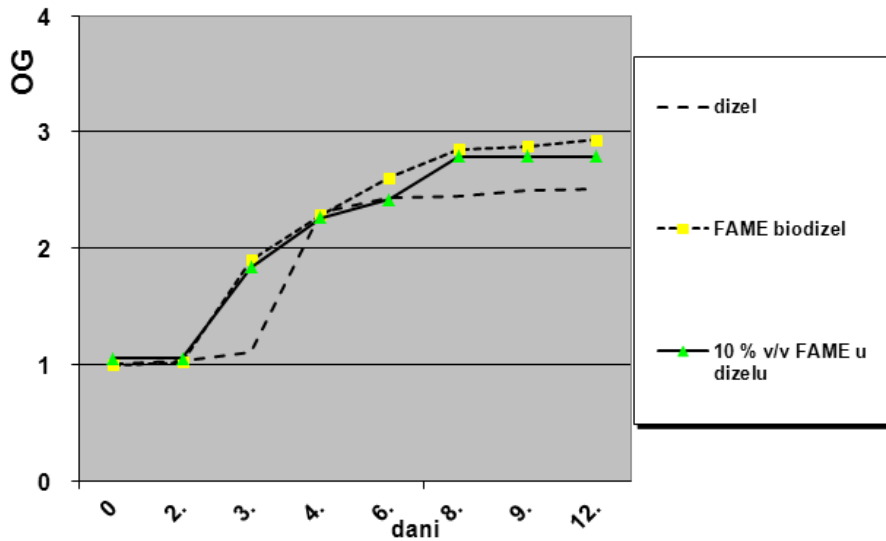
Da bi prošla kroz staničnu membranu, volumen kapljice mora se smanjiti proizvodnjom ekstracelularnih površinski aktivnih tvari (13). To je zajednička značajka većine mikroorganizama koji asimiliraju naftne ugljikovodike (14,15). Prva posljedica proizvodnje površinski aktivnih tvari je pojava emulzija koja nije rijetkost kroz cijeli lanac proizvodnje i transporta, pa i kod pridobivanja nafte. Druga posljedica jest mijenjanje fizikalnih karakteristika goriva zbog prisutnosti površinski aktivnih tvari.



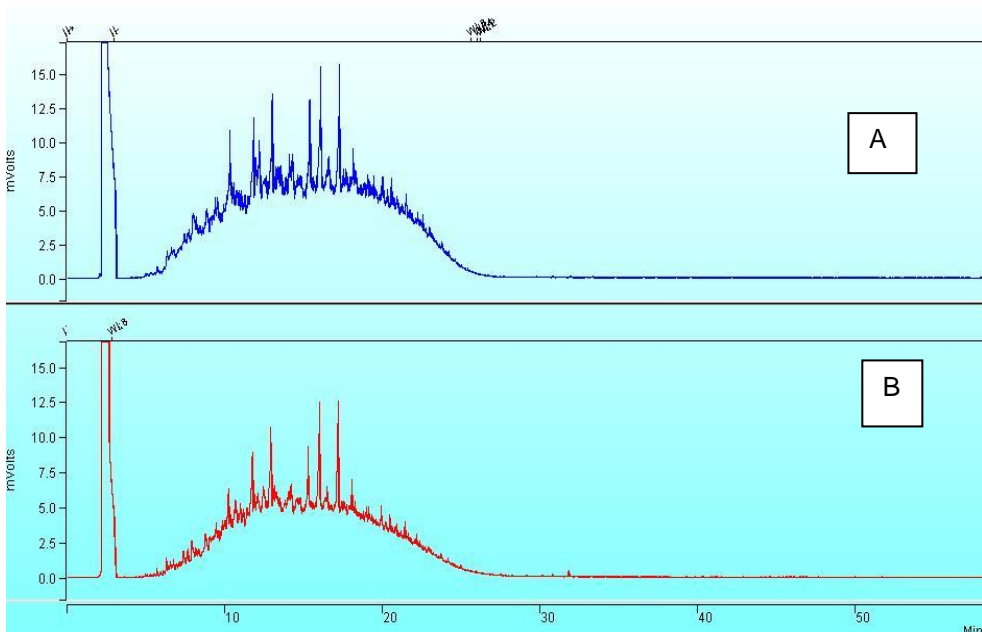
Slika 5: Stanice kvasca izolirane iz sjevernog Jadrana, na kapljici nafte Angola u mediju umjetnog mora; bar 10  $\mu\text{m}$  (foto: V. B.)

U radu je ispitivana sposobnost rasta mikroorganizama na različitim izvorima ugljika: dizelskom gorivu, B10 i na čistom FAME kao jedinim izvorima ugljika. Porijeklo mikroorganizama u gorivu je okoliš-zrak, prašina, vlaga i voda.

Iz rezultata je vidljivo da je mikrobni konzorcij koristeći B10 i čisti FAME imao kraću *lag* fazu rasta i dužu *log* fazu rasta od konzorcija na čistom dizelu kao izvoru ugljika (slika 6). To odgovara i rezultatima stupnja biorazgradnje između čistog dizelskog goriva i B10 (slika 7). Usporedbom kromatograma dizelskog goriva i B10 koji se odnose na biorazgradnju na istoj hranjivoj podlozi (N4), uočava se razgradnja oba uzorka, uz znatniju razgradnju uzorka B10 pri korištenju navedene podloge.



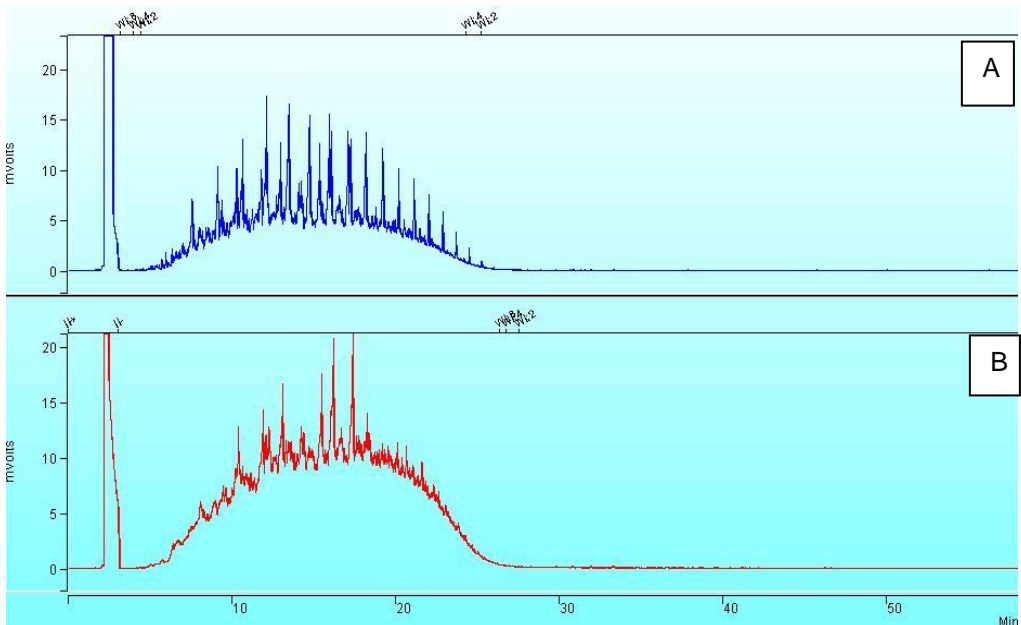
Slika 6: Rast mješovite mikrobne kulture u tekućem mediju (D1, 25 °C, 130 min<sup>-1</sup>) na različitim izvorima ugljika praćen mjerenjem porasta optičke gustoće (OG460 μm)



Slika 7: Biorazgradnja dva različita izvora ugljika na istoj hranjivoj podlozi (N4); (A) dizel, (B) dizelsko gorivo B10

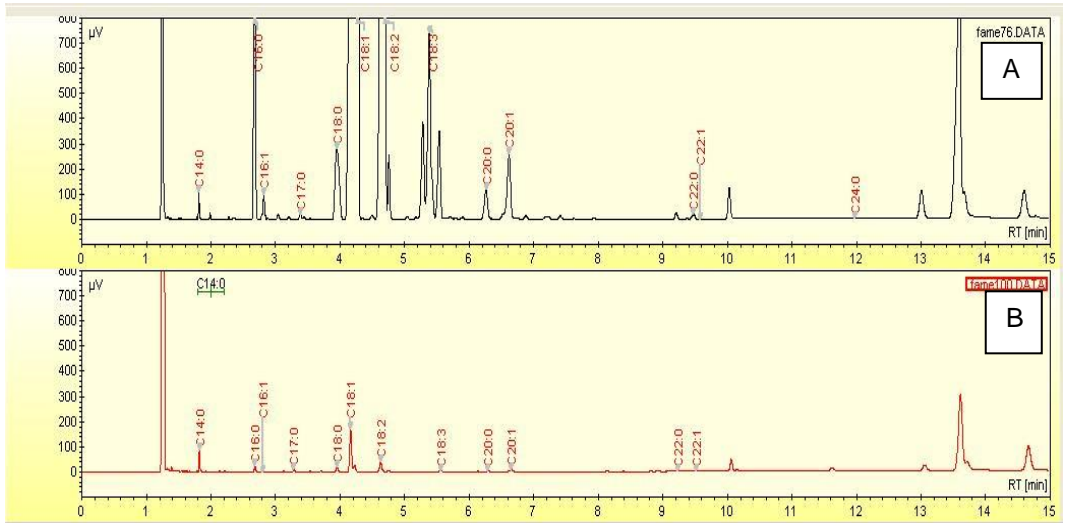


Stupanj biorazgradnje supstrata na različitim hranjivim podlogama (slike 8 i 9) ukazuje na utjecaj uvjeta okoliša na rast i stupanj biorazgradnje. Rezultati plinsko-kromatografske analize biorazgradnje dizela na hranjivoj podlozi N4 ukazuju na pojačanu razgradnju svih ugljikovodičnih spojeva, uz nešto izraženiji stupanj razgradnje ugljikovodika više temperature vrelišta. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da će se duž lanca opskrbe, kako se mijenjanju uvjeti okoliša, mijenjati i stupanj infekcije goriva kao i sastav mikrobnih konzorcija.

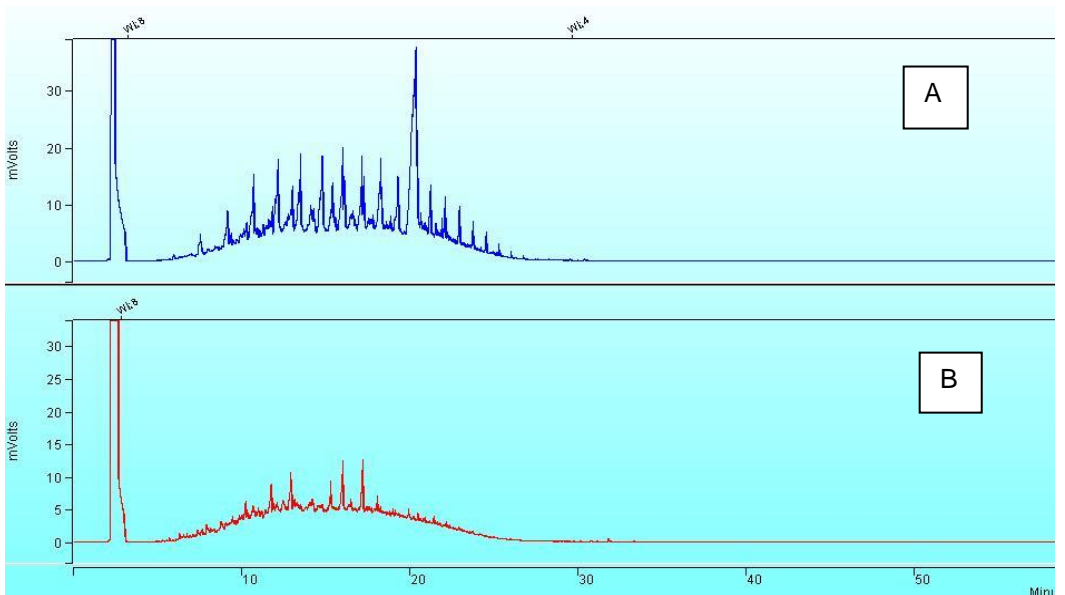


Slika 8: Razlika u stupnju biorazgradnje ovisno o mediju za rast; biorazgradnja dizela na hranjivoj podlozi D1 (A), biorazgradnja dizela na hranjivoj podlozi N4 (B)

U laboratorijskim uvjetima biorazgradnja B10 bila je potpuna nakon 6 dana (sl. 10). Kromatogram B10 abiotičke kontrole nakon 12 dana karakteriziraju pikovi ugljikovodika s izraženijim pikom namješanih metilnih estera masnih kiselina. Kao rezultat biorazgradnje uzorka nakon 6 dana u kromatogramu se uočava izostanak znatnog dijela pikova ugljikovodika, ali i potpuni izostanak pika metilnih estera masnih kiselina. Kraća *lag* faza i duža *log* faza rasta na B10 kao izvoru ugljika (sl. 6) i potpuna biorazgradnja B10 nakon šest dana u laboratorijskim uvjetima ukazuje da će mikrobnе infekcije s dodanim FAME u lancu opskrbe biti u većoj mjeri prisutne nego u dizelu bez FAME. To objašnjava uzroke velikog porasta čepljenja brojnih benzinskih postaja u svijetu nakon uvođenja FAME u proizvod i to najčešće kada je na dnu podzemnog spremnika bila prisutna voda i mikroorganizmi.

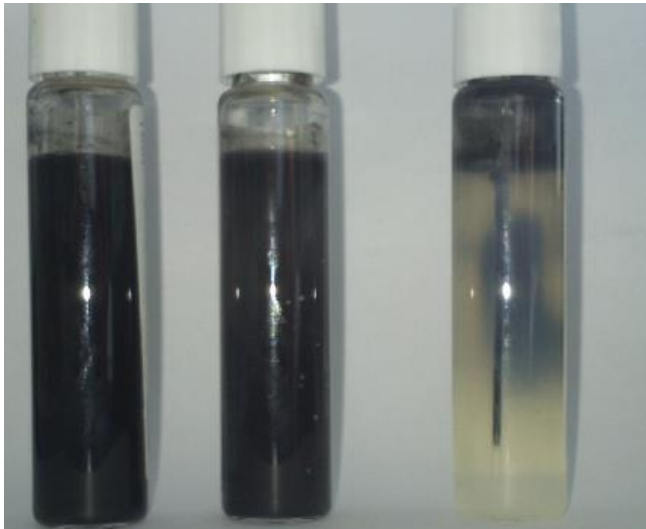


Slika 9: Biorazgradnja B100 kao jedinog izvora ugljika na dvije različite hranjive podloge: D1 (A), N4 (B)

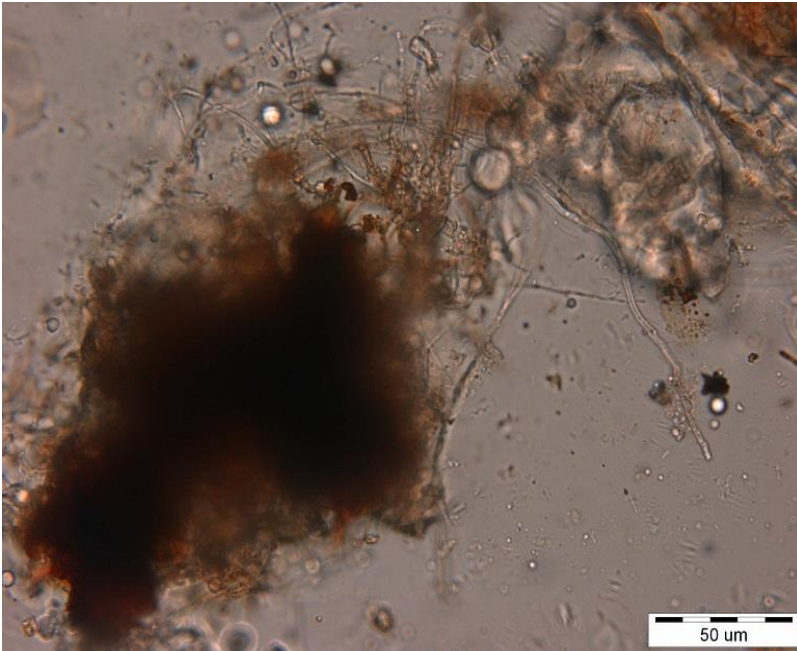


Slika 10: Biorazgradnja B10 mješovitom mikrobnom kulturom nakon 6 dana – submerzni rast (N4); (A) B10 abiotička kontrola, 12 dana, (B) B10, 6 dana

Voda je osnovni uzrok rasta mikroorganizama. U rafineriji se gorivo nakon proizvodnje hladi, otopljena voda se kondenzira i akumulira na dnu spremnika te na najnižim točkama cjevovoda. Taj proces se nastavlja tijekom transporta i ovisi o količini vode na početku lanca, vremenu mirovanja i poziciji usisnih otvora. Prašina i vlaga ulaze kroz nezaštićene odušne ventile. Redovna kontrola i uklanjanje vode osnovna je aktivnost koja smanjuje rast mikroorganizama. To predstavlja problem ovisno o konstrukciji spremnika, a još više kod podzemnih spremnika na benzinskim postajama gdje se voda sakuplja na najnižoj točki. Dovoljna je razina od 1 mm vode da počne proliferacija mikroorganizama, a čak veći problem u sustavima goriva je obrastanje stijenki spremnika i cijevi (fouling) gdje biomasa smanjuje protok goriva. Najčešći uobičajeni simptomi su čepljenje filtra, kvarovi ventila, crpki i ostalih pokretnih dijelova postrojenja (16,17). Obrastanje je proces prihvaćanja mikroorganizama na površine spremnika i cjevovoda gdje su mikroorganizmi biofilma uklopljeni u složeni heterogeni izvanstanični polisaharidni matriks (18) ispod kojeg je prisutan proces mikrobne korozije (19). Stvaranje gradijenta kemijskog i elektropotencijala (galvanski članak) između površina pokrivenih biofilmom i površina izloženih gorivima počinje aerobnim bakterijama koje troše kisik i stvaraju okoliš bez kisika pogodan za aktivnost sulfato reducirajućih anaerobnih bakterija. Mikrobna aktivnost i proizvodnja metabolita u biofilmu olakšava točkastu koroziju, trošenje inhibitora korozije i razgradnju zaštitnih premaza (20). Formiranje crnog željezovog sulfida aktivnošću sulfato reducirajućih bakterija s dna spremnika s gorivom (21) prikazan je na slici 11. Taj proces ima za posljedicu stvaranje čestica korozije u spremniku (slika 12) (36).



Slika 11: Formiranje željezovog sulfida u uzorku dizelskog goriva s dna spremnika (Easicult test za utvrđivanje anaerobnih sulfatoreducirajućih bakterija (21))



Slika 12: Mikroskopska snimka čestice korozije (tamna) s dna metalnog spremnika s dizelskim gorivom upletene u stanice biomase (nitaste tvorevine) (36) (foto: autori)

Kako je prikazano u radu, mikrobnost je veća uz B100 i B10 kao izvore ugljika nego u čistom dizelskom gorivu, a uz B10 može biti i veća nego uz čisti FAME (22). Kvarjenje je vrlo složen biološki proces koji ovisi o mnogo fizioloških i okolišnih čimbenika od kojih je razlika u biorazgradnji na dva različita medija za rast prikazan u ovome radu (slike 8 i 9). Osim drenaže vode, primjena biocida može biti jedna od preventivnih mjera, ali neće spriječiti ulaz vode i ne može zamijeniti praksu dobrog održavanja čistoće sustava. Štoviše, neispravna primjena biocida može čak povećati otpornost mikroorganizama na tretiranje biocidom. Zbog tih razloga primjenu biocida treba provoditi pod nadzorom stručnjaka koji također treba preporučiti i odgovarajući biocid za vrstu mikrobnost infekcije (23).

#### 4. Zaključci

U prethodnim radovima istraživana je sposobnost biorazgradnje različitih naftnih ugljikovodika autohtonom mikrobnom populacijom sjevernog Jadrana kao dio projekta „Mikrobiološka ispitivanja ekoloških rizika“ (12,14,24-29). Projekt „Bioremedijacija tla i podzemnih voda radi zaštite od akcidentnih izljeva“ predložen je kao postupak uvođenja jeftinih metoda čišćenja tla od izljeva naftnih ugljikovodika te kao i metoda za čišćenje i biorazgradnju vlastitog opasnog otpada (smanjenje troškova zbrinjavanja otpada) (30-34).

Unatoč odustajanju nadležne uprave kompanije od završetka i provedbe navedenih projekata, rad na njima bio je odlična osnova za stjecanje velike količine znanja o mikrobiologiji ugljikovodika, laboratorijskoj praksi i iskustvu u postupcima za određivanje stupnja biorazgradnje netopljivih supstrata u različitim uvjetima.

Na temelju stečenog znanja i opsežne terenske prakse utvrđeno je stanje čistoće cijelog lanca opskrbe i distribucije goriva. Uvedene su nove mikrobiološke tehnike i analize što je opet bila osnova za uvođenje metoda za mikrobnu kontrolu i procjenu stanja u lancu proizvodnje i opskrbe, pripremu različitih mjera održavanja lanca i konačno, formuliranje priručnika za održavanje lanca proizvodnje i opskrbe (35-38). Dobra praksa očuvanja čistoće sustava osnovni je pristup kako bi se sačuvala kvaliteta uskladištenih proizvoda od rafinerija do distribucije goriva. Kontrola svih procedura održavanja, periodična mikrobiološka kontrola, procedure čišćenja i primjena biocida trebaju biti dobro dokumentirani u cilju smanjenja troškova održavanja i zadovoljstva kupca.

## 5. Literatura

1. CSB US Chemical Safety Board  
<http://www.csb.gov/csb-chairperson-moure-eraso-warns-about-danger-of-hot-work-on-tanks-containing-biological-or-organic-material/>
2. Explosion Caused by Microbial Hydrogen Formation  
<http://h2tools.org/lessons/incident.asp?inc=106&cat=8&val=4>
3. Finfrock V. H., Killian, L. N., London, S. A. Microbial Activity in Air Force Jet Fuel Systems. Ft. Belvoir: Systems Research Labs Inc. Dayton, USA, 1965.  
(In: A Metagenomic Analysis of Microbial Contamination in Aviation Fuels, Airforce Institute of Technology)
4. Joosten M. W., Kolts J., Hembree J. W. Organic acid corrosion in oil and gas production, Corrosion, Paper No. 02294, NACE International, Houston, TX2002.
5. Brenda J. Little, Jason S. Lee, Microbiologically Influenced corrosion, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-38., 2008.
6. Fleming H. C., Economical and technical overview. In: Heitz, E. Fleming, H. C., Sand W. (Eds.), Microbially influenced corrosion of materials, Springer Verlag, New York, 6-14, 1996.
7. Alsop D., Seal K., Gaylarde C. Introduction to Biodeterioration, Cambridge University Press, 28-31, 2004.
8. Zhang X., Peterson L., Reece D., Möller G., Haws R. Biodegradability of Biodiesel in the Aquatic Environment;  
[https://www.nbb.org/resources/reportsdatabase/reports/mar/19950601\\_mar-009.pdf](https://www.nbb.org/resources/reportsdatabase/reports/mar/19950601_mar-009.pdf)
9. Sowards J., Weeks T., Mc Colskey, Fekete J. Effect of Ethanol Fuel and Microbiologically Influenced Corrosion on the Fatigue Crack Growth Behavior of Pipeline Steels, DOD Corrosion Conference Presentation, La Quinta, California, 2011.
10. ASTM G6469 -14 Standard Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems, 2014.
11. A.J. von Wielligh, N.D.L. Burger, P.L. de Vaal, Influence of Fuel Quality on Diesel Injector Failures. Fifth International Colloquium Fuels, Stuttgart, January 2005.

12. Bobić V., Zorić I., Pavušek I., The effects of crude oil on marine hydrocarbonoclastic yeasts, Abstracts Envirotech Vienna 1989. First international ISEP Congress: Chemical-technologies-hazardous waste, Vienna/Hofburg, Austria, 1989.
13. Kennedy R.S., Finnerty W.R., Sudarsanan K., Young R.A. Microbial Assimilation of Hydrocarbons, Arch. Microbiol. 102, 75-83, 1975.
14. Bobić V., Runjić-Perić V., Pavušek I. Procjena mogućnosti emulgiranja naftnih derivata kvascem *Candida* sp. 2. Hrvatski kongres prehrambenih tehnologa biotehnologa i nutricionista, Zbornik sažetaka, 97-98, Zagreb, 1994.
15. Rutledge C., Products of hydrocarbon microorganisms interaction. In: Houghton D.R., Smith R.N., Eggins H.O.W. (Eds.), Biodeterioration 7. Elsevier Applied Science, London, 219-236, 1988.
16. Siegert W., Microbial contamination in diesel fuel – are new problems arising from biodiesel blends, In: Morris R.E. (Ed.) Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels; 18-22 October 2009, Czech Republic, Prague 2009.
17. IATA, Guidance Material on Microbiological Contamination in Aircraft Fuel Tanks, International Air Transport Association, Montreal, Geneva, 47. 2009.
18. Xavier J., Picioreanu B. C., van Losdrecht M.C.M., TU Delft, Department of Biotechnology, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands <http://biofilms.bt.tudelft.nl/bloomingtonPoster/>
19. Passman F.J., Knowing when you have contamination, National Petroleum News, 86(10) 1994.
20. Videla H.A., Manual of Biocorrosion, CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton 2000.
21. Kurte L., Bobić V., Klarić I., Microbiological testing of diesel and biodiesel fuel in order product and materials protection, MATRIB International conference on materials, tribology and recycling, Book of Abstract, 32, 2014.
22. Díaz C., Yuste R. Microbiological activity in FAME and FAME/diesel blends during long term storage. Assessment on fuel biodegradability. Brussels: EU Commission, 2006.
23. CONCAWE Guidelines for handling and blending FAME, Report No. 9/09, Brussels, November 2009.
24. Bobić V., Zorić I. Pavušek I., Utjecaj različitih naftnih ugljikovodika na rast kvasaca izoliranih iz priobalnog mora 4. Kongres ekologija Jugoslavije, Ohrid, Knjiga sažetaka, 211, 1988.
25. Anušić F., Vrdoljak M., Muehl J., Pavušek I., Protić-Lovašić G., Bobić V. Mikrobiološka razgradnja naftnih ugljikovodika, Zbornik sažetaka JUGOMA 89, Zaštita okoliša i ugljikovodična goriva, 48. Pula 1989.
26. Zorić I., Bobić, V., Pavušek I. Marine hydrocarbonoclastic yeasts: Their vitamin B requirements and salinity tolerance in correlation with pH. Abstracts Bioreactor Engineering Course III, 8, Supetar, Brač 1989.
27. Bobić V., Pavušek I., Characterization of yeasts isolated from sea water polluted by hydrocarbons. Period. Biol. 91(1), 20-22, 1989.
28. Bobić V., Anušić F., Pavušek I., The growth response of marine hydrocarbon – degradative yeast *Candida* sp. to drilling fluid, Abstract Book of 5th European Congress in Biotechnology, Copenhagen, 1990. Ed. C. Christiansen, L. Munck, J. Villandsen, Munksgaard, Copenhagen, 197.

29. Bobić V., Pavušek I., Effect of drilling fluid components on marine hydrocarbon - degradative *Candida* sp., International Symposium Environmental Biotechnology, Book II, 407-410, Royal Flemish Society of Engineers 1991.
30. Bobić V., Onečišćenje tla naftnim ugljikovodicima-bioobnova: mogućnosti, učinkovitost, iskustva, *Goriva i maziva* 44, 1, 2005.
31. Bobić V., Isolation and determining the number of microorganisms in the soil exposed to long term influence of hydrocarbons, Međunarodni simpozij Power of Microbes in Industry and environment, Zadar 2007.
32. Bobić V., Utjecaj ugljikovodika na ekosustav mora i tla i mogućnost čišćenja uljnih zagađenja biološkim metodama, 4. Međunarodni znanstveno-stručni skup o naftnom gospodarstvu, Knjiga sažetaka, Zadar, 2007.
33. Pernar N., Bakšić D., Bobić V., Perković I. Stanje tla u mikrodepresijama šume žutica, Šumarstvo, lipanj, 2008.
34. Bobić V., Bioremediation method for the soil polluted by oil hydrocarbons, Silver medal 34. Croatian Innovation Salon INOVA, Zagreb 2009.
35. Bobić V., Mikrobiološke infekcije goriva i metode analize, 35. Znanstveni simpozij GORIVA, Poreč 2002.
36. Bobić V., Ispitivanje biorazgradivosti dizelskog i biodizelskog goriva u cilju očuvanja kvalitete proizvoda, 41. Stručno-znanstveni simpozij simpozij GORIVA, Zadar 2008.
37. Bobić V., Čistoća goriva s biološke točke gledišta-kontrola lanca opskrbe, 43. stručno-znanstveni simpozij GORIVA, Šibenik 2010, Zbornik sažetaka, str. 23.
38. Bobić V., Tonković T., INA Diesel Fuel, Diesel Fuel FAME Blends and FAME Supply and Distribution Chain Good Housekeeping Practice Guideline, INA 2013.

#### **Autori**

Vedranka Bobić, Iva Beer-Romac<sup>1</sup>, Luka Štajduhar<sup>1</sup>

INA Industrija nafte d.d., Centralni ispitni laboratorij, Lovinčićeva 4, 10000 Zagreb

e-adresa: ved.bobic@gmail.com

#### **Primljeno**

4.2.2015.

#### **Prihvaćeno**

3.3.2015.