

Mikrobiološka aktivnost deposal u procesu rekultivacije na lokaciji rudnika uglja Stanari

Zorica Golić¹, Nenad Malić², Mihajlo Marković³

¹Poljoprivredni institut Republike Srpske, Banja Luka, Republika Srpska

²EFT - Rudnik i Termoelektrana Stanari, Stanari - Doboj, Republika Srpska

³Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, Republika Srpska

Sažetak

Površinska eksploatacija, kao način intenzivne eksploatacije ležišta mineralnih sirovina, a pogotovo uglja, je visoko razvijena oblast privrede, pa su intenzivna i oštećenja koja dovode do gubitka funkcije produktivnog sloja zemljišta. Biološka rekultivacija deposal treba da smanji štetne posljedice nastale eksploatacijom. Brojnost pojedinih sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama i njihova aktivnost daju korelativnu informaciju o biološkoj aktivnosti zemljišta. Na lokalitetu odlagališta otkrivke u rudniku Stanari, u 2011. god. izvršena je sjetva travnodjetelinske smješe u prethodno obrađeni deposal. Cilj istraživanja je da se na osnovu zastupljenosti pojedinih grupa mikroorganizama i aktivnosti enzima dehidrogenaze sagleda biološka aktivnost deposal u procesu biološke rekultivacije. Opšta biološka aktivnost deposal u procesu rekultivacije određena je na osnovu ukupnog broja bakterija, zastupljenosti azotobaktera, amonifikatora, oligonitrofila, aktinomiceta i gljiva i aktivnosti enzima dehidrogenaze. Rezultati istraživanja ukazuju na veću brojnost i dehidrogenaznu aktivnost deposal u procesu biološke rekultivacije u odnosu na deposal (kontrola).

Ključne riječi: zemljište, rekultivacija, raznovrsnost mikroorganizama, dehidrogenazna aktivnost

Uvod

Intenziviranjem rudarskih radova na površinskom kopu Raškovac i budućem površinskom kopu Ostružnja, zbog obezbjeđivanja dovoljne količine uglja za snabdijevanje termoelektrane Stanari, znatno je ubrzana degradacija životne sredine i cijelih ekosistema (Malić i sar., 2012). U skladu sa principima ekološki održivog razvoja, rekultivacija je bitna u procesu eksploatacije mineralnih sirovina. Cilj rekultivacije površinskog kopa je da se obnovi ekološki integritet narušenog područja (Sheoran i sar., 2010). Obnavljanjem vegetacionog pokrivača postiže se stabilizacija zemljišta i minimiziraju problemi zagađenja (Wong, 2003).

Mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u funkcionisanju ekosistema zemljišta. Mikrobiološki procesi su rezultat vrlo uske povezanosti između mikroorganizama, biljaka i tla. Mjerenje procesa koji se odvijaju u zemljištu od strane mikroflore i opšta metabolička aktivnost mikroorganizama se koristi za procjenu popravke oštećenog zemljišta (Mummey i sar., 2002; Izquierdo i sar., 2005). Cilj ovog istraživanja je da se na osnovu zastupljenosti pojedinih grupa mikroorganizama i aktivnosti enzima dehidrogenaze sagleda biološka aktivnost deposola u procesu biološke rekultivacije unutrašnjeg odlagališta otkrivke površinskog kopa Raškovac u rudniku uglja Stanari.

Materijal i metode rada

Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti deposola u rudniku uglja Stanari (EFT – Rudnik i termoelektrana Stanari) obavljeno je na lokaciji ogledne parcele na unutrašnjem odlagalištu otkrivke sa površinskog kopa Raškovac. Uzorci zemljišta su uzeti na dubini od 0-30 cm sa površine deposola koja nije rekultivisana (kontrolni deposol) i površine deposola u procesu rekultivacije pod travnodjetelinskom smješom.

Biološka rekultivacija je obavljena sjetvom travnodjetelinske smješe u obrađeni deposol, direktni tip rekultivacije, u proljeće 2011. god. Pri sjetvi je izvršena startna primjena mineralnog NPK đubriva i mikrobiološkog đubriva bio-algeen granulata, proizvedenog od smeđih morskih algi (*Ascophyllum nodosum*), u dozi od 65 g/m². Tokom vegetacije vršena je prihrana azotnim đubrivom i malčiranje površine. Prosječni uzorci zemljišta za analizu su uzeti u avgustu 2013. godine sa kontrolne parcele i parcele pod travnodjetelinskom smješom.

Ukupan broj bakterija je određen metodom razređenja, na podlozi 0,1 x TSA, a brojnost amonifikatora na mesopeptonskom agaru (Pochon i Tardieux, 1962). Brojnost sporogenih bakterija određena je zagrijavanjem inokuluma na 80° C u vremenu od 10 min i zasijavanjem na mesopeptonskom agaru (Sarić, 1989). Na bezazotnoj podlozi Fjodora je određena zastupljenost oligonitrofila, a metodom "fertilnih kapi" brojnost *Azotobacter*-a (Anderson, 1965). Brojnost aktinomiceta je određena na sintetičkoj podlozi po Krasiljnikov (1965), a zastupljenost gljiva na Czapek-Dox podlozi (Sharlau, 1999). Vrijeme i temperatura inkubacije zavisila je od grupe mikroorganizama. Dehidrogenazna aktivnost je određena spektrofotometrijski po modifikovanoj metodi (Thalman, 1968), koja se bazira na mjerenju ekstinkcije, ružičasto bojenog, trifenilformazana (TPF), a izračava se u µg TPF po 1g apsolutno suvog zemljišta.

Statistička obrada podataka (deskriptivna statistika i Studentov t-test) provedena je u statističkom programu Statistica 7.1. (StatSoft, Inc. 2003) i SAS 8.2.

Rezultati i diskusija

Hemijske karakteristike deposola

S obzirom da postoji vrlo uska povezanost između mikroorganizama u zemljištu i njihove sredine, određena su glavna hemijska svojstva deposola (na kome nisu vršene mjere biološke rekultivacije) i deposola u procesu rekultivacije (Tabela 1).

Tab.1. Rezultati hemijske analize deposola (kontrola) i deposola u procesu rekultivacije

Results of chemical analysis of the deposol (control) and deposol in the reclamation process

Redni broj N ^o	Varijanta (faza deposola) <i>Variant (phase of deposol)</i>	pH		Humus (%)	N (%)	Lakopristupačni <i>Plant available</i>	
		H ₂ O	KCl			P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g
1.	Deposol (kontrola, bez mjera rekultivacije) Deposol (control without recultivatio treatment)	5,2	4,1	0,0	0,0	0,0	1,0
2.	Deposol u procesu rekultivacije <i>Deposol in the reclamation process</i>	6,3	5,0	0,2	0,01	2,3	5,9

Prema hemijskoj reakciji deposol pripada jako kiselim zemljištima (pH u KCl 4,1). Sadržaj humusa je ispod nivoa detekcije, kao i sadržaj lakopristupačnog fosfora. Obezbjedenost deposola lakopristupačnim kalijumom je slaba (1,0 mg/100 g zemljišta). Primjenom mjera rekultivacije vrijednosti svih ispitivanih parametara su povećane. Povećane vrijednosti su u saglasnosti sa istraživanjima Malića i sar. (2013.), koji konstatuju djelimično podizanje nivoa plodnosti u procesu biološke rekultivacije sjetvom travnodjetelinskih smješa i zasnivanjem vještačkih travnjaka. Međutim, prema hemijskoj reakciji zemljište je i dalje kiselo (pH u KCl 5), a sadržaj humusa i azota izuzetno nizak. Količine biljkama pristupačnih oblika fosfora i kalijuma su nezadovoljavajuće.

Mikrobiološka aktivnost deposola

Mikroorganizmi kao dio biološke komponente dobri su indikatori kvaliteta zemljišta, jer oni brzo reaguju na promjene u zemljišnom ekosistemu, imaju intiman odnos sa okruženjem zbog njihove velike površine u odnosu na zapreminu zemljišta koja ih okružuje. Brojnost i biodiverzitet mikrobiološke populacije ili aktivnost može otkriti promjene u fizičkim i hemijskim svojstvima zemljišta. U tabeli 2 prikazana je brojnost i dehidrogenazna aktivnost ispitivanih grupa mikroorganizama u deposolu u procesu rekultivacije i deposolu (kontrola).

Ukupan broj bakterija je pokazatelj potencijalne plodnosti zemljišta (Milošević i sar., 1997). Primjenjene mjere u procesu rekultivacije deposola uticale su na povećavanje ukupnog broja bakterija. U kontrolnom deposolu ukupan broj bakterija iznosi $4,7 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ i statistički visoko značajno je manji u odnosu na ukupan broj bakterija u deposolu u procesu rekultivacije u kome je zabilježen ukupan broj bakterija u iznosu od $11,2 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ (tabela 2).

Amonifikaciju kao značajan proces razgradnje sirovih proteina i njihovu transformaciju u mineralne ili nove organske forme omogućavaju amonifikatori (Jarak i Govedarica, 2003). Na osnovu rezultata istraživanja uočava se značajno prisustvo amonifikatora u deposolu ($96 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$) i njihova brojnost nije statistički značajno veća u deposolu u procesu rekultivacije ($98,7 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$). Prema istraživanjima Tintor i sar. (2009) brojnost ove grupe mikroorganizama najmanje je osjetljiva na promjenu fizičko hemijskih parametara u zemljištu i negativne uticaje. Brojnost sporogenih amonifikatora je izrazito niska u kontrolnom deposolu i iznosi $7 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$, dok je u deposolu u procesu rekultivacije broj sporogenih

bakterija statistički visoko značajno veći u odnosu na broj sporogenih bakterija u kontrolnom deposalu i iznosi $38 \times 10^3 \text{g}^{-1}$.

Tab. 2. Brojnost i dehidrogenazna aktivnost mikroorganizama u deposalu u procesu rekultivacije i deposalu (kontrola)

The number and dehydrogenase activity of the microbial groups in deposal and the reclamation process and deposal (control)

Vrsta mikroorganizama <i>Species of Microorganisms</i>		Faza ispitivanog deposola – supstrata <i>Phase of the deposal</i>		temp
		Deposal u procesu rekultivacije <i>Deposal in the reclamation process</i>	Deposal (kontrola) <i>Deposal (control)</i>	
Ukupan broj bakterija $\times 10^6 \text{g}^{-1}$ <i>Total bacteria count $\times 10^6 \text{g}^{-1}$</i>		11,2 \pm 2,50	4,7 \pm 0,50	5,159**
Amonifikatori <i>Ammonifying bacteria</i>	ukupni $\times 10^4 \text{g}^{-1}$ <i>total $\times 10^4 \text{g}^{-1}$</i>	98,7 \pm 37,99	96 \pm 13,09	0,134 ^{ns}
	sporogeni $\times 10^3 \text{g}^{-1}$ <i>sporogenic $\times 10^3 \text{g}^{-1}$</i>	38 \pm 3,56	7 \pm 2,16	14,892**
Oligonitrofilni $\times 10^4 \text{g}^{-1}$ <i>Oligonitrophilic bacteria $\times 10^4 \text{g}^{-1}$</i>		118 \pm 31,27	96,1 \pm 15,76	1,251 ^{ns}
Azotobakter $\times 10^2 \text{g}^{-1}$ <i>Azotobacter sp. $\times 10^2 \text{g}^{-1}$</i>		90 \pm 10,20	5 \pm 2,94	16,016**
Aktinomicete $\times 10^3 \text{g}^{-1}$ <i>Actinomycetes $\times 10^3 \text{g}^{-1}$</i>		28 \pm 6,34	0,5 \pm 1,00	8,563**
Gljive $\times 10^4 \text{g}^{-1}$ <i>Fungi $\times 10^4 \text{g}^{-1}$</i>		27,7 \pm 10,97	36,5 \pm 34,24	4,883*
Dehidrogenazna aktivnost $\mu\text{g TPFg}^{-1}$ apsolutno suvog zemljišta <i>Dehydrogenase activity $\mu\text{g TPFg}^{-1}$ absolutely dry soil</i>		184 \pm 10,61	110 \pm 3,56	13,220**

srednja vrijednost \pm standardna devijacija; *mean \pm sd*; n = 4

ns= nesignifikantno; *ns = not significant*; *p<0,05; **p< 0,01;

Oligonitrofilne bakterije predstavljaju specifičnu grupu mikroorganizama koji su sposobni da redukuje molekularni oblik azota iz atmosfere i prevodi ga u amonijačni, organski oblik, ali isto tako u veoma malim količinama koristi mineralni oblik azota iz zemljišta. Oligonitrofilni su, kao

i amonifikatori, prisutni u značajnom broju u kontrolnom deposolu ($96,1 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$) i njihov broj nije statistički značajno veći u deposolu u procesu rekultivacije ($118 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$). U deposolu gdje nije primjenjena rekultivacija (kontrola) je neznatna razlika u brojnosti oligonitrofila i amonifikatora što znači da se proces razgradnje i azotofiksacije odvija istim intenzitetom, dok je u deposolu u procesu rekultivacije intenzivniji proces azotofiksacije u odnosu na proces razgradnje organske materije.

Azotobacter sp. je važan predstavnik slobodnih azotofiksatora. Brojnost ove grupe azotofiksatora je jedan od važnijih pokazatelja plodnosti zemljišta. Rezultati istraživanja pokazuju da je brojnost azotobaktera u deposolu izuzetno mala i iznosi $5 \times 10^2 \text{ g}^{-1}$, a u deposolu u procesu rekultivacije brojnost azotobaktera je statistički visoko značajno veća u odnosu na kontrolni deposol i iznosi $90 \times 10^2 \text{ g}^{-1}$.

Gljive učestvuju u dekompostiranju organskih ostataka. One su efikasnije od bakterija, jer transformišu veću količinu raspadnutih biljnih ostataka u raspoložive nutritijente. Kisela sredina je pogodna za razvoj gljiva. S obzirom da kontrolni deposol ima nešto nižu pH vrijednost u odnosu na deposol u procesu rekultivacije, za očekivati je i da brojnost gljiva bude veća u kontrolnom deposolu u odnosu na deposol u procesu rekultivacije. Broj gljiva u kontrolnom deposolu je statistički značajno veći u odnosu na broj gljiva u deposolu u procesu rekultivacije.

Sa povećavanjem pH vrijednosti u deposolu u procesu rekultivacije, zabilježen je i statistički visoko značajan broj aktinomiceta ($28 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$) u odnosu na kontrolni deposol ($0,5 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$).

Veća aktivnost dehidrogenaze ukazuje na veći intenzitet disanja, odnosno na intenzivniju mineralizaciju svježih organske materije i humusa. Rezultati istraživanja ukazuju na manju vrijednost dehidrogenaze u deposolu bez primjenjene biološke rekultivacije ($110 \mu\text{g TPFg}^{-1}$) u odnosu na deposol u rekultivaciji ($184 \mu\text{g TPFg}^{-1}$). Zabilježena je statistički značajno veća aktivnost dehidrogenaze u deposolu u procesu rekultivacije u odnosu na kontrolni deposol.

Zaključak

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da se primjenom mjera rekultivacije biološka aktivnost u deposolu u procesu rekultivacije povećala u odnosu na deposol kontrolu. Zastupljenost ukupnog broja bakterija, sporegenih amonifikatora, azotobaktera, aktinomiceta i aktivnost enzima dehidrogenaze u deposolu u procesu rekultivacije je statistički

visoko značajno veća u odnosu na deposol gdje nisu primjenjivane mjere biološke rekultivacije (kontrola). Brojnost oligonitrofila i amonifikatora se nije statistički značajno povećao u deposolu u procesu rekultivacije u odnosu na deposol kontrolu. Brojnost gljiva je statistički značajno manja u deposolu u procesu rekultivacije u odnosu na kontrolni deposol. U deposolu u procesu rekultivacije broj oligonitrofila je veći u odnosu na broj amonifikatora, što znači da je proces azotofiksacije intenzivniji u odnosu na proces razgradnje organske materije, a u kontrolnom deposolu je neznatna razlika u brojnosti oligonitrofila i amonifikatora, što znači da se proces razgradnje i azotofiksacije odvija istim intenzitetom.

Literatura

- Anderson, G. R. (1965). Ecology of Azotobacter in soil of the Palouse region I. Occurrence. *Soil Science*, 86, 57-65.
- Izquierdo, I., Caravaca, F., Alguacil, M.M., Hernandez, G. & Roldan, A. (2005). Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Applied Soil Ecology*, 30, 3-10.
- Jarak, M. i Govedarica, M. (2003). *Mikrobiologija*. Univerzitet Novi Sad.
- Krasiljnikov, N.A. (1965). *Biologija otedeljnih grup aktinomicetov*. Moskva: Nauka.
- Milošević, N., Govedarica, M. i Jarak, M. (1997). *Mikrobi zemljišta: značaj i mogućnosti*. Uređenje, korišćenje i očuvanje zemljišta, (ur. Dragović S.), JDPZ, str. 398 -398.
- Malić, N., Matko-StamenkovićUna, Nožinić, M. (2012). *Tehnogena zemljišta stanarskog ugljenog basena u funkciji ekološkog i poljoprivrednog resursa*. Zbornik radova 1. Međunarodnog kongresa ekologa "Ekološki spektar 2012". Banja Luka, str. 651-669.
- Malić, N., Marković, M., Lakić, Ž. (2013). *Promjene hemijskih svojstava u deposolima u postupku rekultivacije zasnivanjem travnjaka*. II International Symposium and XVIII Scientific Conference of Agronomists of Republic of Srpska, Trebinje. Book of Abstracts, 200-201.
- Mummey, D.L., Stahl, P.D., and Buyer, J.S. (2002). Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology* 21, 251- 259.
- Pochon, J., Tardieux P. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. *Editions de la Tourelle, St-Mandé, France, 111 pp.*

- Sarić, Z. (1989). *Praktikum iz mikrobiologije*. Naučna knjiga, Beograd.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P (2010). Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water*, 3(2), Art. 13.
- Sharlau, Microbiology (1999). *Hand book of Microbiological Culture Media*, pp. 87, Ref. 1-051 (Czapek-Dox). Fifth International Edition, Barcelona.
- Tintor, B., Milošević, N., Vasin, J. (2009). Mikrobiološka svojstva černo-zema Južne Bačke u zavisnosti od načina korišćenja zemljišta. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtlarstvo*, 46.
- Thalman, A. (1968). Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenase aktivitat im Boden mittels *Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)*. *Landwirtsch Forsch.*, 21, 249-258.
- Wong, M.H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50, 775–780.

Primljeno: 07. maja 2014.
Odobreno: 23. januara 2015.

Microbiological Activity of Deposol in the Reclamation Process at the Location of Coal Mine Stanari

Zorica Golić¹, Nenad Malić², Mihajlo Marković³

¹ *Agricultural Institute of Republic of Srpska, Banja Luka,
The Republic of Srpska - B&H*

² *EFT - Mine and Thermal Power Stanari, Stanari - Doboj,
The Republic of Srpska - B&H*

³ *University in Banja Luka, Faculty of Agriculture,
The Republic of Srpska - B&H*

Abstract

Surface mining, as a means of intensive exploitation of mineral raw materials and especially coal, is highly developed area of economy, therefore land degradation is intensive and leading to loss of the productive layer of soil. Biological reclamation of deposol should reduce the harmful consequences of exploitation. The number of systematic and physiological groups of microorganisms and their activities provide correlative information on the biological activity of the soil. In 2011, at the overburden disposal site in Stanari coal mine, the sowing of grass-clover mixture in previously treated deposol was carried out. The aim of the research is to the deposol biological activity in the process of biological reclamation based on the distribution of certain groups of microorganisms and dehydrogenase activity. General microbial activity in deposol in the process of reclamation is determined by the total number of bacteria, azotobacters, ammonifiers, oligonitrophyls, actinomycetes and fungi and the activity of the enzyme dehydrogenase. The research results indicated a greater abundance and deposol dehydrogenase activity in the process of biological reclamation compared to deposol (control).

Key words: soil, reclamation, microbial diversity, dehydrogenase activity

Zorica Golić
E-mail: zoricagolic@gmail.com

Received: May 7. 2014.
Accepte: January 23. 2015.

