

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tihana Arapovi

„Terra rossa” kao nosač bakterije *Acinetobacter junii*

Diplomski rad

Zagreb, 2011

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof.dr.sc. Jasne Hrenovi, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl.ing.biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Jasni Hrenovi , na pruženoj prilici za rad na ovom istraživanju.

Tako er se želim zahvaliti svojim kolegama i prijateljima na podršci, savjetima, kako za vrijeme školovanja tako i pri završavanju ovog rada.

Nadasve zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju, pruženoj podršci i strpljenju tijekom mog cjelokupnog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

„TERRA ROSSA” KAO NOSA BAKTERIJE *ACINETOBACTER JUNII*

Tihana Arapovi

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Fosfat-akumulirajuće bakterije imaju primjenu u procesu poboljšanog biološkog uklanjanja fosfata (EBPR). Primjenom spomenutih bakterija imobilizacijom na odgovarajuće mineralne nosače postiže se veća koncentracija bakterija čime se neposredno postiže i uspješnije uklanjanje fosfata iz otpadnih voda. Svrha ovog istraživanja je utvrđivanje kapaciteta imobilizacije *Acinetobacter junii* kao fosfat-akumulirajuće bakterije na mineralni nosač, bakterijsku sposobnost uklanjanja fosfata te pogodnost mineralnog nosača na metabolizam iste bakterije. Korišteni mineralni nosač je terra rossa. Istraživanje je pokazalo da je terra rossa pogodan nosač fosfat-akumulirajuće bakterije *Acinetobacter junii* te da i sama ima sposobnost uklanjanja fosfata.

(25 stranica, 7 slika, 4 tablice, 33 literarna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: fosfat-akumulirajuće bakterije, mineralni nosač, otpadna voda, terra rossa, *Acinetobacter junii*

Voditelj: Dr.sc. Jasna Hrenović, prof.

Ocjenitelji: Dr.sc. Jasna Hrenović, prof.

Dr.sc. Mladen Kerovec, prof.

Dr.sc. Vesna Benković, doc.

Rad prihvaćen: 9. rujna 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

"TERRA ROSSA" AS THE CARRIER OF ACINETOBACTER JUNII

Tihana Arapovi

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Phosphate-accumulating bacteria have their use in the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR). Using the mentioned bacteria, by immobilization on suitable mineral carriers, higher concentrations of bacteria are achieved which directly correlate to better phosphorus removal. In the research the capacity of immobilization of *Acinetobacter junii* as the phosphate-accumulating bacteria on the mineral carrier was being determined, as well as the bacterial capability to remove phosphate. Influence of the mineral carrier on the researched bacteria was being determined as well. Mineral carrier that was used was terra rossa. The research showed that terra rossa was a good carrier of the phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*. Terra rossa used even alone had considerable phosphorus uptake.

(25 pages, 7 figures, 4 tables, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: phosphate-accumulating bacteria, mineral carrier, EBPR, terra rossa,

Acinetobacter junii

Supervisor: Dr.sc. Jasna Hrenovi , Prof.

Reviewers: Dr.sc. Jasna Hrenovi , Prof.

Dr.sc. Mladen Kerovec, Prof.

Dr.sc. Vesna Benkovi , Asst. Prof

Thesis accepted: September 9, 2011.

1. UVOD

1.1. Fosfat-akumuliraju e bakterije

Kako na prirodan na in ukloniti fosfate iz okoliša postao je jedan od bitnih problema sadašnjice. Stare konvencionalne metode temeljene na kemijskom pro iš avanju remete kemijsku i biološku ravnotežu i izuzetno su skupe. Zato dolazi do potrebe za traženjem alternativnih, prirodnih na ina pro iš avanja okoliša, a time i otpadnih voda.

Kontroliranje fosfora ispuštenog iz industrijskih i komunalnih otpadnih voda je jedan od ključnih imbenika prevencije eutrofikacije površinskih voda. Fosfor je jedan od glavnih imbenika koji doprinosi povećanoj eutrofikaciji jezera i prirodnih izvora. Eutrofikacija uzrokuje mnoge probleme kvalitete vode uključujući i troškove pro iš avanja, smanjena rekreacijska i konzervacijska vrijednost, gubitak u poljoprivredi i mogu i smrtonosni u incidentima toksina u pitkoj vodi. Uklanjanje fosfora se najčešće provodi kemijskom precipitacijom koja je iznimno skupa i uzrokuje povećanje industrijskog mulja do čak 40 %. Alternativa je biološko uklanjanje mulja tj. fosfata.

U zadnjih etrdeset godina (od 1975.godine) se najviše koristi metoda obogaćivanja aktivnog mulja fosfat-akumulirajućim bakterijama koje se prirodno nalaze u opterećenim otpadnim vodama. Te bakterije imaju svojstvo da skladište fosfor intracelularno i to ih čini vrlo pogodnima, a samim time i primjenjivima u uređajima za pro iš avanje.

Općenito, različite skupine bakterija imaju sposobnost pojačanog uklanjanja fosfata(P) tj. polifosfata (poli-P). Fosfat-akumulirajuće bakterije smatraju se onima koje mogu skladištiti više od 10^{-12} mg P/u stanici. Pokazalo se da aktivni muljevi s poboljšanim biološkim uklanjanjem P (**EBPR** eng. Enhanced Biological Phosphorus Removal) sadrže uglavnom klase koljena Actinobacteria i subklase koljena Proteobacteria.

Akumulacija P optimalna je u aerobnim uvjetima, sa suviškom otopljenih P i manjom količinom organske tvari. Kako bi se postigla potrebna brojnost bakterijske kulture mora se izlagati aerobnim i anaerobnim uvjetima. U **anaerobnim** uvjetima dolazi do transporta hlapivih masnih kiselina (VFA eng. volatile fatty acids) u stanicu. Te masne kiseline uglavnom su produkt metabolizma heterotrofnih populacija iz otpadnih voda. Nakon transporta VFA u stanicu fosfat-akumulirajuće bakterije dolazi do pretvaranja i skladištenja u obliku poli-hidroksialkanoata (PHA). Anaerobno dobiveni PHA se

kataboliziraju korištenjem kisika u **aerobnim** uvjetima. Kisik ovdje igra ulogu akceptora elektrona za dobivanje energije za rast stanice, nastanak glikogena, a to rezultira unosom P. Bakterije roda *Acinetobacter* postale su modelni organizmi za uklanjanje P. Imaju najveći kapacitet uklanjanja P od svih fosfat-akumulirajućih bakterija i zbog toga smo uzeli bakteriju roda *Acinetobacter*, to nije *Acinetobacter junii*. Osim nje, fosfat-akumulirajuće vrste uključuju i *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. bouffetii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. iwoffi*, *A. jazonii*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae* te *A. townneri* (Carr i sur. 2003).

Općenito, rod *Acinetobacter* čine gram-negativne bakterije koje pripadaju u skupinu Gammaproteobacteria. Nepokretne su, oksidaza negativne i pod mikroskopom dolaze u parovima. Važni su organizmi u tlu gdje doprinose mineralizaciji. Sposobne su rasti u vrlo jednostavnim medijima poput hranjivog agara. Njihova važnost dolazi do izražaja tek u zadnjim desetljećima kada je sve veća potreba za biološkim uklanjanjem potencijalno štetnih spojeva, biodegradacijom kontaminanata i ostalih toksina. Primjena roda *Acinetobacter* je, kako smo vidjeli, raznolika tako da se ta primjena može razdijeliti na nekoliko skupina:

Uklanjanje fosfata i teških metala

Uklanjanje P jedan je od najbitnijih procesa za pročišćavanje otpadnih voda. Rod *Acinetobacter* je pokazao veliku sposobnost uklanjanja P i radi se na unaprjeđivanju tih metode kao i na izbacivanju starih i skupljih metoda. Također, bakterije roda *Acinetobacter* jedne su od primarnih u procesu biološkog uklanjanja P. Ovaj proces se odvija kroz reciklažu aktivnog mulja kroz anaerobne i aerobne zone. Ovisan je o dodavanju aktivnog mulja fosfat-akumulirajućim (striktno aerobnim) bakterijama roda *Acinetobacter* koji može apsorbirati do 100 mg fosfora/g suhe biomase tijekom aerobnih uvjeta i otpuštaju je u anaerobnim uvjetima (van Groenestijn i sur, 1989, Timmerman 1984). Iako su opreznije u kojoj mjeri su zastupljene bakterije roda *Acinetobacter* na uređajima za pročišćavanje (50-70 % ukupne populacije (Buchan 1983, Lotter i Murphy 1985), 90% (Wentzel i sur. 1988), manje od 9% (Mudaly i sur. 2000) njihov kapacitet intracelularnog akumuliranja P bio je najveći i od svih izoliranih bakterija iz uređaja s aktivnim muljem. Nešto više od polovice izolata iz uređaja s aktivnim muljem bila je sposobna akumulirati poli-P, a neki i koriste PHB

(polihidroksibutirat) kao jedini izvor ugljika i energije. Međutim, većina izolata nije bila sposobna reducirati nitrate. Ove osobine roda *Acinetobacter* su poželjne kod mikroorganizama odgovornih za EBPR. Ove bakterije koje su, kako je već napomenuto, striktno aerobne u izmjeni no anaerobno/aerobnim uvjetima reagiraju na stres zbog nedostatka kisika koji inače služi kao akceptor elektrona za kataboliziranje PHA. S obzirom da im u takvim stresnim uvjetima nedostaje kisik one počinju pokazivati pojačanu akumulaciju P. Dolazi do hidroliziranja uskladištenog poli-P za dobivanje energije za sintezu PHA. Drugi način je dobivanje energije iz nekih drugih polisaharida ili od međuprodukata metabolizma drugih heterotrofnih populacija. Zbog ovih osobina bakterije roda *Acinetobacter* nisu prisiljene na kompeticiju s drugim vrstama.

Acetatna, propionatna, butiratna, valerijanska kiselina samo su neke od VFA koje koriste bakterije roda *Acinetobacter* za akumuliranje P. VFA mogu se naći i kao supstrat koji je već prisutan u otpadnim vodama ili su produkti bakterija iz otpadnih voda u sustavu s aktivnim muljem. Varijabilne značajke među bakterijama roda *Acinetobacter* su stoga kolika je stopa otpuštanja i asimilacije P, potrošnja VFA i njihova dostupnost te faza rasta stanica. Vrste roda *Acinetobacter* također su značajne u uklanjanju teških metala (Boswell i sur. 2001).

Biodegradacija ksenobiotika i halogena

Toluen, fenol, stiren samo su neki od ksenobiotičkih polutanata koji se mogu naći u manjim koncentracijama prisutnima u otpadnim vodama, izljevima i tlu. Međutim, ove spojeve je jako teško sanirati i visoko su toksični. Vrste roda *Acinetobacter* mogu fenol koristiti kao izvor energije i ugljika (Briganti i sur. 1997, Chibata i Tosa 1981) te stoga imaju široku ekološku primjenu. Neki od spojeva kao npr. 4-hidroksimandelnika i 4-hidroksi-3-metoksimandelnika kiselina (Rusansky i sur. 1987), 4-klorobenzoat (Adriaens i Focht, 1991), 4-hidroksibenzoat (Allende i sur. 2000) se također mogu metabolizirati u odgovarajuće benzoate koje koriste vrste roda *Acinetobacter*. Primjećeno je i da iskorištavaju bifenile. Također neki od spojeva imaju sposobnost razgradnje aminokiselina (Kahng i sur. 2001).

Bioremedijacija kontaminanata

Mnoge toksi ne komponente mogu u i u okoliš, raširiti se i postati perzistentne (van der Meer i sur. 1992). Djelovanjem odgovaraju ih mikroorganizama može se posti i konverzija toksi nih i opasnih kontaminanata u manje toksi ne i netoksi ne oblike. Budu i da su klasi ne metode postale preskupe i dugotrajne, ovakav na in primjene mikroorganizama ima dugotrajniji, bolji i prirodni u inak. *Acinetobacter* je samo jedan od rodova bakterija koji može i u ovom polju prona i svoju primjenu.

Vrste roda *Acinetobacter* imaju svoju primjenu i u razgradnji ulja, sintezi bioemulzifikatora, proizvodnji polisaharida, esterifikaciji i transesterifikaciji triglicerida, hidrolizi i kiralnoj sintezi estera (Chen i sur. 1999, Li i sur. 2000, 2001). Tako er, imaju i uporabu u proizvodnji kemikalija (tinte za printanje, lubrikanti, svije e). Me u zanimljivijim primjenama roda *Acinetobacter* je korištenje u bioluminiscenciji za detektiranje kontaminanata. Princip po kojem se detektiraju odre ene kemikalije ili agensi je geneti ki dizajn bioreportera koji u našem slu aju ine vrste roda *Acinetobacter*. Soj e u slu aju da se neka odre ena kemikalija nalazi u okolišu davati mjerljivi signal kao odgovor na tu kemikaliju ili fizi ki reagens. Genetika soja se sastoji od inducibilnih promotora gena spojenih s reporterskim genom kao npr. luciferaza ili zeleni fluorescentni protein (Applegate i sur. 1998).

1.2. Biološko uklanjanje fosfata

Sa sve ve im problemom eutrofikacije danas intenzivno se traže nove metode uklanjanja štetnih spojeva iz prirodnog okruženja. Ti štetni spojevi uklju uju sredstva za pranje, deterdžente, razne kemikalije, metale i u našem slu aju P. U prijašnjim godinama ljudi su pribjegavali konvencionalnim kemijskim metodama za uklanjanje P dok se u zadnje vrijeme sve više traži na in kako na što prirodni na in ukloniti P i ostale štetne spojeve ak i prije nego do e do ispuštanja u okoliš.

Neke od tih bioloških metoda uklju uju aerirane lagune, razne biološke filtracije. U našem slu aju govorit emo o jednoj od naju inkovitijih metoda uklanjanja P ili EBPR. Ta metoda je široko u uporabi u postrojenjima s aktivnim muljem. U tim postrojenjima

postoje dvije osnovne metode biološkog uklanjanja P iz voda. To su asimilacija i EBPR. Asimilacija je princip temeljen na ugradnji P u biomasu organizma, a me u tim organizmima su biljke, mikroorganizmi i kasnije i životinje kroz hranidbeni lanac. Me utim, problem je u sanaciji te biomase jer se njenim raspadanjem osloba a P i stoga je ova metoda u manjoj uporabi na manjim vodenim površinama.

EBPR se temelji na mikrobiološkoj aktivnosti i uklanjanje P se postiže akumulacijom fosfora u bakterijskim stanicama u obliku poli-P granula. Te granule prelaze granice potrebne za rast tih mikroorganizama. Poli-P je polianionski polimer i sastoji se od mnogo ortofosfatnih monomera povezanih fosfoanhidridnim vezama koje imaju visoku energiju. Stupanj polimerizacije ovisi o sastavu mikrobne populacije. Sve stanice sadrže poli-P što bi zna ilo da je neophodan za funkciju same stanice, me utim teško ga je vizualizirati i detektirati (Kortsee, 1994). Organizacija i intracelularna lokacija poli-P u vezi s EBPR biomasom nije dovoljno istražena jer ga nalazimo u obliku intracelularnih granula. Nakon primjenjivanja metilenskog ili toluidinskog plavila granule postaju ruži aste (metilen) i nazivaju se metakromatske. Tako er granule se mogu bojati i DAPI (diamidin fenol indol) bojom. Iako se poli-P granule mogu bojati, lokacija i organizacija u stanici još nije potpuno istražena i jasna. P u EBPR biomasi je lociran kao intracelularni polimerni poli-P koji nije precipitiran na površinu stanice kao anorganski depozit ili vezan na ekstracelularnim polimernim supstancama koje se povezuju sa flokulama (Levin i Shapiro, 1965). O organizaciji unutar fosfat-akumuliraju ih bakterija još se manje zna, ali pretpostavka je da se poli-P nalazi u periplazmi, citoplazmi ili je povezan s intracelularnim membranama (Hill 1989, Streichan 1991, Mino 1985) ili ak u kompleksu s proteinima te RNA i DNA (Bond i sur. 1999, Kornberg i sur. 1999). Ovisno o populacijama fosfat-akumuliraju ih bakterija u mulju svaka e na druga iji na in skladištiti poli-P.

1.3. Imobilizacija fosfat-akumulirajućih bakterija na nosačima

1.3.1. Terra rossa

Terra rossa je tip glinenog tla nastao trošenjem vapnenca. Kada se vapnenac troši, glina u stijenama ostaje zarobljena kao i netopljivi kameni materijal. U aerobnim uvjetima, kada je tlo iznad vodonosnog sloja, željezni oksid se formira u glini dajući joj karakterističnu crvenu do crvenonaranastu boju (Slika 1). Ima dobre drenažne karakteristike kao i većina glinenih tla. To ju čini pogodnom za uzgoj vinove loze te voćnih biljaka.



Slika 1. Terra rossa (<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=crvenica>)

Spada u crvena rezidualna tla posebice razvijena u krškom području oko mediterana. Mišljenje je da je crvenica nastala u toplijim klimatskim uvjetima od miocena do kasnog pleistocena zbog velikih klimatskih fluktuacija u tim periodima (Atalay 1998.)

Terra rossa se javlja u područjima gdje kiša otapa ugljik iz kalcijevog karbonata te silikati su isprani iz zemlje ostavljajući naslage bogate amorfnim željeznim hidroksidima i oksidima koji su razlozi tipične crvene boje. Takva područja su uglavnom depresije unutar vapnenca ili područja gdje je tipična vegetacija garig (Allen 2001, Waugh 2000).

1.4. Cilj istraživanja

Zbog sve većih problema globalne zagađenosti otpadnih, a samim time i prirodnih voda, sve više pažnje se posvećuje kako na prirodan, biološki na in vitro istiti otpadne vode. EBPR tretman se sve više pokazuje kao najučinkovitija metoda uklanjanja P i preuzima ulogu kemijskih metoda pročišćavanja. Tu najveću ulogu imaju fosfat-akumulirajuće bakterije jer se upravo na njima temelji biološko pročišćavanje otpadnih voda. Njihovom imobilizacijom na nosač se pokušava dostići i što veći broj fosfat-akumulirajućih bakterija što bi podrazumijevalo i učinkovitije pročišćavanje otpadnih voda.

Cilj ovog istraživanja bilo je istražiti je li terra rossa pogodan nosač fosfat-akumulirajućih bakterija *A. junii*, utvrđivanje njenog kapaciteta imobilizacije na terra rossu te utjecaj imobiliziranih bakterija da uklanjaju P iz otpadne vode.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Bakterijska kultura

Liofilizirana kultura fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* soj DSM 1532 je dobivena je iz Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH banke mikroorganizama. Soj se odražavao na hranjivom agaru (Biolife, Italija) i precjepljivan je mjesečno i čuvan na 4°C (Slika 2.). Sastav hranjivog agara: 15,0 g agara, 5,0 g peptona, 3,0 g govećeg ekstrakta, 1L destilirane vode. pH vrijednost medija je namještena na neutralni pH 7,0±0,2 prije sterilizacije autoklaviranjem (121°C/15min).



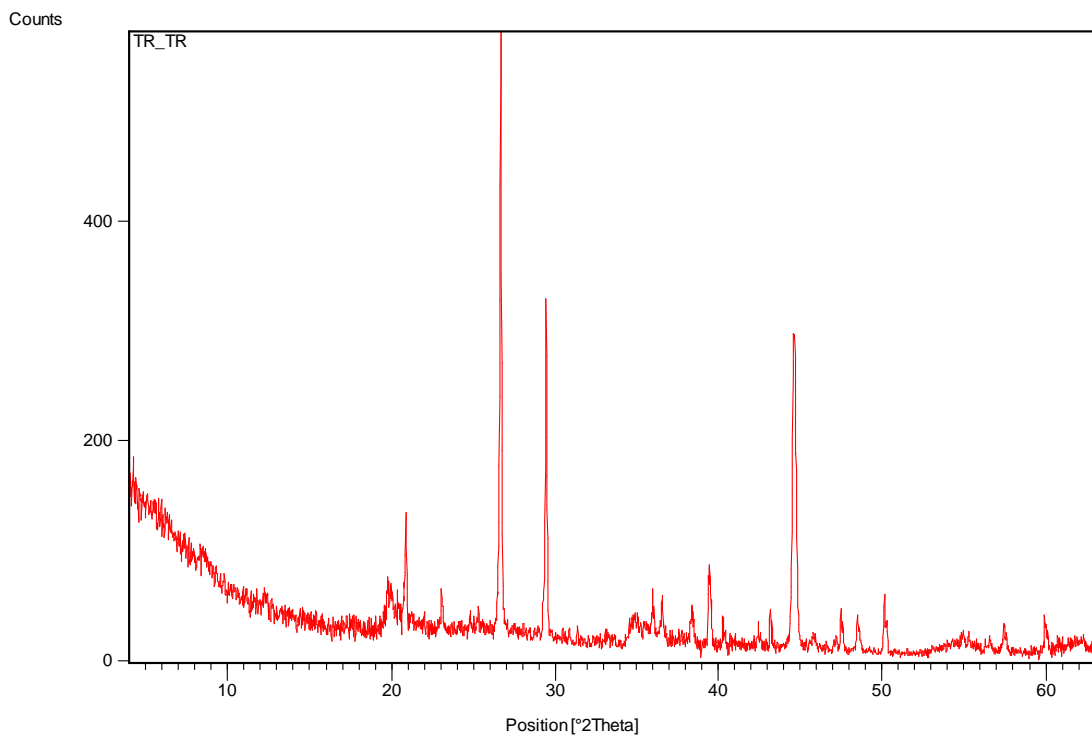
Slika 2. *Acinetobacter junii* na hranjivom agaru nakon 24 h inkubacije

2.2. Sintetska otpadna voda

Realna otpadna voda je zamjenjena kemijski definiranom vodenom otopinom. Sastav (u mg/L destilirane vode): natrijev propionat 300; pepton 100; MgSO₄ 10; CaCl₂ 6; KCl 30; ekstrakt kvasca 20; KH₂PO₄ 88. pH sintetske vode je podešen na 7,00 ±0,04 s 1 M NaOH ili 1 M HCl prije autoklaviranja (121°C/15 min). pH je izmjeren WTW 330 pH metrom.

2.3. Terra rossa

U ovom istraživanju koristili smo 4 uzorka terra rosse od kojih su 3 bila iz Istre, a jedan iz Izmir, Turska. Svi uzorci imali su veliku frakciju manju od $125\mu\text{m}$. Kvalitativna fazna analiza provedena je metodom difrakcije rentgenskih zraka na praškastim uzorcima na Philipsovom vertikalnom rentgenskom goniometru (tip X-Pert), uz upotrebu Cu-cijevi (40 kV i 40 mA) i je zračenje monokromatizirano grafitnim monokromatorom. Za registraciju zračenja korišten je proporcionalni brojač. Snimanje je bilo kontinuirano brzinom $0,02^\circ/\text{s}$. Glavni sastojci su kvarc i kalcit, a među bitnijima su i kaolinit i hematit. U uzorku iz Izmir (Turska) prisutni su i tragovi pirita i anatasa. Rentgenska analiza terra rosse iz Izmir (Turska) vidljiva je slici (Slika 3), a mineralni sastav u Tablici 1.



Slika 3. Rentgenska analiza terra rosse iz Izmir (Turska)

Tablica 1. Mineralni sastav terra rosse iz Izmir (Turska)

Pozicija [$^{\circ}2\theta$.]	d-razmak [Å]	Rel. Int. [%]	Pripadnost
12,2779	7,20907	6,84	Kaolinit
19,8767	4,46691	6,26	Kaolinit
20,3713	4,35956	8,11	Kaolinit
20,8862	4,25323	19,60	Kvarc
21,2520	4,18085	5,53	Kaolinit
23,0755	3,85442	6,03	kalcit; kaolinit
24,7731	3,59401	6,25	Kaolinit
25,2928	3,52132	7,84	Anatas
26,6617	3,34356	100,00	Kvarc
29,4316	3,03489	60,26	Kalcit
33,2240	2,69663	0,59	Hematit
34,8891	2,56950	3,47	Kaolinit
35,5019	2,52866	6,18	kaolinit; hematit
36,0177	2,49362	7,36	kalcit; kaolinit
36,5828	2,45639	7,85	Kvarc
38,4603	2,34069	4,86	kaolinit; nosač uzorka
39,4611	2,28360	12,06	kvarc; kalcit; kaolinit
40,3458	2,23555	3,43	kvarc; kaolinit
42,4929	2,12743	1,63	kvarc; kaolinit
43,1765	2,09531	6,83	kalcit; kaolinit
44,5869	2,03226	45,97	nosač uzorka
45,8161	1,98055	3,08	kvarc; kaolinit
47,0774	1,93039	2,17	kalcit; kaolinit
47,4889	1,91462	7,46	Kalcit
48,5251	1,87613	5,23	Kalcit
50,1572	1,81734	9,41	Kvarc
54,9450	1,66976	3,80	kvarc; kaolinit
55,3254	1,65918	1,99	kvarc; kaolinit
56,3064	1,63258	1,45	Pirit
56,5666	1,62568	2,36	kalcit; kaolinit
57,4917	1,60170	3,59	Kalcit
59,9627	1,54147	5,25	kvarc; kaolinit
62,1921	1,49146	1,99	Kaolinit

2.4. Eksperimentalne metode

2.4.1. Dizajn pokusa

Prije samog imobiliziranja bakterija, *A. junii* je uzgojen na hranjivom agaru (Biolife, Italija). Bakterije smo zatim suspendirali u 0,05M sterilne otopine natrijeva klorida i inokulirali po 1 mL u Erlenmeyerove tikvice u kojima je bilo pripremljeno 100 mL sintetske vode. Uz svaku suspenziju *A. junii* u svaku od tikvica smo dodali po 1g odabranog materijala. Tikvice smo zatim za epili plasti nom folijom i inkubirali u vodenoj kupelji Memmert WNB (Slika 4) na 30°C kroz 24 sata uz konstantno mješanje od 70 rpm. Za dovod sterilnog zraka koristili smo akvarijske pumpe na koje smo pri vrstili serološke pipete (1L zraka/min). Tako er, kako bismo ustanovili postotak uklanjanja P od strane same terra rosse, isti postupak je napravljen bez dodavanja bakterija.



Slika 4. Memmert WNB vodena kupelj s mješalicom

2.5. Analiti ke metode

2.5.1. Mjerenje koncentracije fosfata i pH vrijednosti

Koncentracija P u sintetskoj vodi je izmjerena spektrofotometrijski u DR/2500 Hach spektrofotometru koristeći molibdovanat metodu (Hach metoda 8114). Uzima se 10 mL otopine sintetske vode iz svake od Erlenmeyerovih tikvica, 1 mL reagensa uz nadopunu do 25 mL destiliranom vodom u svakoj kiveti spektrofotometra. Prva proba je slijepa od samo destilirane vode. Na spektrofotometru se direktno očitaju mg P-PO₄ pri čemu se, nakon dodatka molibdovanatnog reagensa, razvija žuta boja koja je proporcionalna koncentraciji P, koju smo direktno očitavali u mg/L.

Područna vrijednost pH je izmjerena sa WTW 330 pH metrom - Slika 5.

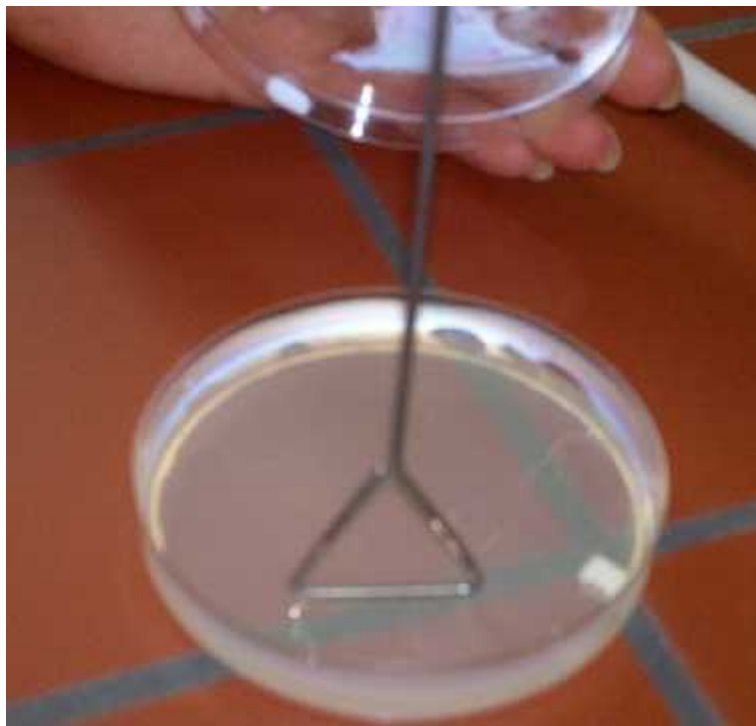


Slika 5. WTW 330 pH metar

2.5.2. Određivanje broja bakterija

2.5.2.1. Određivanje broja slobodnih bakterija

Uzorak od 1 mL supernatanta iz svake od Erlenmeyerovih tikvica sa sintetskom vodom i odabranim materijalom je uzet i serijski razrijeđen od 10^{-1} do 10^{-7} . Inokulirali smo 0,1 mL na hranjivi agar metodom širenja razmaza (spread plate method) (Slika 6). Nakon inkubacije od 24 sata (30°C) bakterijske kolonije su prebrojene i broj vijabilnih stanica je uzet kao CFU/L (CFU eng. Colony Forming Units). Ploče sa vidljivim brojem kolonija od 10-300 smo uzimali kao brojive.



Slika 6. Metoda širenja razmaza

2.5.2.2. Određivanje broja imobiliziranih bakterija

Nakon odvajanja supernatanta iz Erlenmeyerove tikvice, ostatak s materijalom (nosa em) smo prebacili u plasti nu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Epruvetu smo tresli 3 minute (40 Hz) na Kartell TK3S homogenizatoru (Slika 7). Na taj na in smo odvojili imobilizirane bakterije s površine nosa a (terra rossa) i mobilizirali u supernatantu (fiziološka otopina) koji smo tad serijski razrijedili od 10^{-1} do 10^{-8} . Zatim smo inokulirali 0,1 mL na hranjivi agar metodom širenja razmaza i stavili na inkubaciju od 30 °C. Nakon inkubacije od 24 sata (30°C) bakterijske kolonije su prebrojene i broj vijabilnih stanica je uzet kao CFU/L. Plo e sa vidljivim brojem kolonija od 10-300 smo uzimali kao brojive.

Materijal iz epruveti za određivanje broja imobiliziranih bakterija smo prebacili u petrijeve plo e (materijal prikupljen ispiranjem posude) i stavili u sušionik na 105°C/24 h. Nakon 24 sata smo izdvojili materijal, izvagali ga na analiti koj vagi i prera unali u broj bakterija po gramu materijala.



Slika 7. Kartell TK3S homogenizator (odvajanje imobiliziranih bakterijskih stanica)

2.5.3. Izračun parametara

Nakon inkubacije mjerili smo sljedeće podatke: pH vrijednost sintetske otpadne vode nakon aktivnosti fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii*, koncentraciju P-PO₄ nakon inkubacije. Imobilizirane bakterijske stanice smo računali kao broj imobiliziranih stanica po gramu materijala.

Nakon dobivenih vrijednosti uvrštenih u tablicu, izračunali smo vrijednosti bitne za tumačenje rezultata. To su:

- količina uklonjenog P iz sintetske otpadne vode (razlika količine P prije i poslije pokusa)
- količina uklonjenog P po gramu materijala (vrijednost dobivena dijeljenjem količine uklonjenog P iz sintetske otpadne vode s ukupnom količinom materijala u pokusu)
- broj imobiliziranih bakterija (CFU/g materijala) preračunato s tom količinom materijala nakon mjerenja broja imobiliziranih bakterija
- ukupni broj bakterija (CFU/mL) (dobiven zbrojem CFU/L slobodnih i CFU/L imobiliziranih bakterija)
- stopa uzimanja P po bakterijskoj stanici (dobivena dijeljenjem ukupne količine uklonjenog P u sintetskoj otpadnoj vodi i ukupnim brojem bakterija u sintetskoj otpadnoj vodi)
- postotak uklonjenog P iz sintetske otpadne vode (dobiven omjerom količine P prije i poslije inkubacije i izraženim u postocima)

3. REZULTATI

Nakon 24 h inkubacije samo terra rosse i sintetske otpadne vode dobili smo rezultate prikazane u Tablici 2. Rezultati vidljivo prikazuju da je terra rossa iz Izmira (Turska) uklonila 26,2% P, uzorak 2 (Istra-3686) i 3 (Istra-3687) su približno uklonili podjednaki postotak (2-31,1% P, 3-31,0% P). Uzorak 4 (Istra-3688) je uklonio 25,7% P.

Tablica 2. Koncentracija P prije i poslije inkubacije od 24 h u suspenziji sintetske otpadne vode s 1g terra rosse/100 mL bez fosfat-akumuliraju e bakterije *A. junii* (1- Izmir, 2- Istra 3686, 3- Istra 3687, 4- Istra 3688)

START	1 (Izmir)	2 (Istra-3686)	3 (Istra-3687)	4 (Istra-3688)
C ₀ (P-PO ₄ (mg/L))	21,4	22,5	22,6	21,0
NAKON 24 h	1(Izmir)	2 (Istra-3686)	3 (Istra-3687)	4 (Istra-3688)
C ₁ (P-PO ₄ (mg/L))	15,8	15,5	15,6	15,6
Uklonjeni P-PO ₄ (%)	26,2	31,1	31,0	25,7

Vrijednosti dobivene u reaktoru s nosa em i bakterijom *A. junii* te kontrolne vrijednosti razvidne su u Tablici 3. Nakon inkubacije od 24 h vidljivo je da je koncentracija imobiliziranih bakterija za uzorak iz Izmira bila $10,05 \times 10^9$ CFU/g, za uzorak 2 (Istra-3686) $2,89 \times 10^9$ CFU/g, uzorak 3 (Istra-3687) $5,61 \times 10^9$ CFU/g, te uzorak 4 (Istra-3688) $9,81 \times 10^9$ CFU/g. Broj ukupnih bakterija u reaktoru sa uzorkom iz Izmira bio je $2,48 \times 10^8$ CFU/mL, za uzorak 2 (Istra-3686) je $3,10 \times 10^8$ CFU/mL, za uzorak 3 (Istra-3687) je $2,72 \times 10^8$ CFU/mL te uzorak 4 (Istra-3688) $3,82 \times 10^8$ CFU/mL. Stopa uklonjenog P s bakterijama iznosi redom: Izmir $2,79 \times 10^{-11}$ mg P/CFU, 2 (Istra-3686) $1,55 \times 10^{-11}$ mg P/CFU, 3 (Istra-3687) $1,47 \times 10^{-11}$ mg P/CFU te 4 (Istra-3688) $1,54 \times 10^{-11}$ mg P/CFU. Postotak uklonjenog P koji otpada samo na bakterije (od ukupno uklonjenog P) bio je za Izmir 55,2%, za uzorak 2 (Istra-3686) je 40.6 %, za uzorak 3 (Istra-3687) 36,36%, a za uzorak 4 (Istra-3688) je 52,21 %. Iz ovog se može zaklju iti da je kod uzorka iz Izmira te uzorka 4 (Istra-3688) uklonjeno malo više od 50% ukupno uklonjenog P, dok je kod uzorka 2 (Istra-3686) i 3 (Istra-3687) uklonjeno nešto manje od 50% ukupno uklonjenog P.

Tako er vidimo i odnos planktonskih i imobiliziranih stanica na nosa e. Vidljivo je da je na terra rossu iz Izmira imobiliziran najve i postotak fosfat-akumuliraju e bakterije *A. junii*, dok je na uzorak 2 (Istra-3686) imobilizirano daleko manje.

Tablica 3. Parametri mjereni u reaktorima s *A. junii* (kontrola), te *A. junii* s dodatkom 1g terra rosse/100 mL nakon 24 sata inkubacije. C_0 CFU (10^6 /mL) = $7,99 \pm 2,10$; C_0 P- PO_4 (mg/L) = $21,9 \pm 0,6$. (1 - Izmir, 2 - Istra 3686, 3 - Istra 3687, 4 - Istra 3688)

NAKON 24h	Kontrola	1 + A.junii	2 + A.junii	3 + A.junii	4 + A.junii
pH	6,79	7,90	7,89	7,90	7,93
PO_4 -P (mg/L)	17,4	10,0	9,5	11,0	10,0
P ukupno uklonjeni (mg/L)	4,8	12,5	11,8	11,0	11,3
P uklonjeni samo bakterijama (mg/L)	4,8	6,9	4,8	4,0	5,9
Planktonske bakterije (CFU/mL)	$6,20 \times 10^7$	$1,47 \times 10^8$	$2,81 \times 10^8$	$2,16 \times 10^8$	$2,84 \times 10^8$
Imobilizirane bakterije (CFU/g)	-	$10,05 \times 10^9$	$2,89 \times 10^9$	$5,61 \times 10^9$	$9,81 \times 10^9$
Ukupne bakterije (CFU/mL)	$6,20 \times 10^7$	$2,48 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	$2,72 \times 10^8$	$3,82 \times 10^8$
Stopa uklanjanja P (mg P/CFU)	$7,74 \times 10^{-11}$	$2,79 \times 10^{-11}$	$1,55 \times 10^{-11}$	$1,47 \times 10^{-11}$	$1,54 \times 10^{-11}$
Umnažanje bakterija (CFU 24h/CFU start)	7,75	26,62	43,34	54,33	36,39
Uklonjeni P (%)	21,6	55,6	55,4	50,0	53,1
Planktonske stanice (%)	-	59,27	90,64	79,41	74,34
Imobilizirane stanice (%)	-	40,73	9,36	20,59	25,66

4. RASPRAVA

Nakon 24 sata s terra rossom, dio *A. junii* je imobiliziran na podlogu, dok je ostatak ostao u slobodnom obliku u sintetskoj otpadnoj vodi. Nakon tih 24 sata može se zaključiti da je broj imobiliziranih bakterija različit za pojedini uzorak terra rosse. Tako možemo reći sa sigurnošću da je najviše bakterija imobilizirano na uzorak iz Izmir (10,05x10⁹ CFU/g), a najmanje na uzorak 2 (Istra-3686) od samo 2,89x10⁹ CFU/g. Broj bakterija u reaktorima je veći nego po etni, a to možemo zaključiti po izmjerenoj stopi umnažanja za pojedine uzorke gdje je najveća stopa umnažanja bila kod uzorka 3 (Istra-3687) 54,33, a najmanja za uzorak iz Izmir (Turska) od 26,62.

U istraživanju gdje smo mjerili samo uklanjanje P bez djelovanja bakterije *A. junii* dodavanjem 1,0 g materijala u 100 mL sintetske otpadne vode nakon 24 sata vidljivo je da je mnogo manje P uklonjeno te uspoređujući ove rezultate s rezultatima uklanjanja P s dodatkom fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* možemo reći da bakterija ima veći kapacitet uklanjanja P od same terra rosse.

U svojem istraživanju Hrenović i sur. (2009) spominju glinu kao dobre nosač fosfat-akumulirajućih bakterija. Korišten je prirodni bentonit i bentonit modificiran kationskim surfaktantom cetiltrimetilamonij bromidom (CTA). Pri dodavanju *A. junii* više je imobiliziranih bakterija bilo na modificiranom bentonitu (7,78x10⁹ CFU/g), nego na prirodnom bentonitu (4,79x10⁹ CFU/g). Međutim, budući da je bentonit slojeviti mineral, vezanje CTA se događa i na unutarnjim površinama što ima i pozitivni i negativni učinak na istraživanu bakteriju *A. junii*. Uklanjanje P raste s količinom vezanih CTA molekula, no CTA uzrokuje razaranje stanične membrane i smrt stanice. Pozitivno nabijena polarna glava CTA igra ulogu u baktericidnom djelovanju te modificirani bentonit u kombinaciji sa CTA molekulama djeluje baktericidno. Primjenjujući i odgovarajuće količine CTA molekula u vezanju na modificirani bentonit, a da pri tom ne dolazi do desorpcije, bakterijske stanice će ipak ostati vijabilne i bit će znatno uklanjanje P iz otpadnih voda.

Pri usporedbi prirodnih materijala kao nosa a, a to su u ovom slu aju prirodni bentonit i terra rossa, broj imobiliziranih bakterija na prirodni bentonit je bio vidljivo manji. Jedino je uzorak 2 (Istra-3686) imao manje imobiliziranih bakterija na terra rossi u usporedbi sa brojem imobiliziranih bakterija na prirodni bentonit. Uzimaju i srednju vrijednost imobiliziranih bakterija na terra rossu, rezultat je ostaje isti i zaklju ujemo da je terra rossa bolji nosa fosfat-akumuliraju e bakterije *A. junii* što je vidljivo u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz usporedbe broja imobiliziranih bakterija *A. junii* na različite minerale kao nosa e

Materijal	Imobilizirane bakterije (CFU/g)	Referenca
Prirodni bentonit	$4,79 \times 10^9$	Hrenovi i sur. (2009)
Organski bentonit	$7,78 \times 10^9$	Hrenovi i sur. (2009)
Originalni sepiolit	$5,57 \times 10^9$	Hrenovi i sur. (2010)
Pro iš eni sepiolit	$8,12 \times 10^9$	Hrenovi i sur. (2010)
Terra rossa Izmir (Turska)	$10,05 \times 10^9$	
Terra rossa 2 (Istra-3686)	$2,89 \times 10^9$	
Terra rossa 3 (Istra-3687)	$5,61 \times 10^9$	
Terra rossa 4 (Istra-3688)	$9,81 \times 10^9$	

U istraživanju Hrenovi i sur. (2010.) spominju i sepiolit kao potencijalni nosa *A. junii*. Sepiolit također spada u skupinu glina. Korišten je originalni sepiolit (40-50% sepiolita) te pro iš eni sepiolit (50-55% sepiolita) u istraživanju. Sepiolit se smatrao obe avaju im zbog svojih fizi kih svojstava (igli aste estice) i visokog udjela magnezija (Mg^{2+}). Mg^{2+} je jako bitan za *A. junii* jer se pokazalo da njegova povećana koncentracija u otpadnoj vodi povećava umnažanje spomenute bakterije (Hrenovi i sur. 2010). Broj imobiliziranih bakterija na originalni sepiolit je bio $5,57 \times 10^9$ CFU/g, dok je za pro iš eni sepiolit bio $8,12 \times 10^9$ CFU/g. Sepiolit se u kona nici pokazao kao dobar nosa za ispitivanu bakteriju *A. junii* kako u originalnoj tako i u pro iš enoj formi. Pozitivan u inak bio je i taj što je sepiolit bogat Mg^{2+} što je povećalo biomase ispitivane bakterije, a samim time i povećanu ratu uklanjanja P.

Pri usporedbi broja imobiliziranih bakterija na terra rossu s brojem imobiliziranih bakterija na originalni i pro iš eni sepiolit, uzorak 2 (Istra-3686) opet daje najslabije rezultate. Uzorak 3 (Istra-3687) ima podjednaki rezultat kao originalni sepiolit, ali zato slabiji nego pro iš eni sepiolit. Me utim, uzorak 4 (Istra-3688) i uzorak iz Izmira (Turska) pokazuju ve i broj imobiliziranih bakterija nego pro iš eni sepiolit ime se pokazuje svojstvo terra rosse kao dobrog nosa a fosfat-akumuliraju e bakterije *A. junii*. Ta usporedba je tako er vidljiva u Tablici 4.

S obzirom da ispitivani soj bakterija *A. junii* nema skoro nikakav direktan niti štetan u inak po ljudsko zdravlje, možemo re i da kombinacija terra rosse i *A. junii* imaju potencijal u daljnjem korištenju kao u inkovit na in uklanjanja P iz otpadnih voda.

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja u kojem smo tražili odgovore na je li terra rossa pogodan nosač fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* te koji je njen kapacitet imobilizacije i uklanjanja P iz otpadne vode došli smo do sljedećih zaključaka:

Terra rossa koju smo koristili u istraživanju se pokazala kao dobar nosač fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii*. Broj imobiliziranih bakterija varira od $2,89 \times 10^9$ do $10,05 \times 10^9$ CFU/g. Iako i sama terra rossa uklanja P iz otpadne vode, postotak uklonjenog P bio je mnogo veći uz upotrebu *A. junii*.

Može se zaključiti da je terra rossa pogodna kao nosač u bioreaktorima za pročišćavanje otpadnih voda. Upotreba fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* imobilizirane na terra rossu u sustavima pročišćavanja otpadnih voda je obavezujuća.

6. LITERATURA

1. Adriaens P., Focht D. (1991). Cometabolism of 3,4-dichlorbenzoate by *Acinetobacter* sp. Strain 4-CB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 5:173-179
2. Allen Harriet D. (2001). *Mediterranean Ecogeography*. Pearson Education. pp. 79-81
3. Allende L., Gibello A., Fortun A., Mengs G., Ferrer E., Martin M. (2000). 4-Hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp. *Curr. Microbiol.* 40:34-39
4. Applegate B.M., Kehrmeyer S.R., Sayler G.S. (1998). A chromosomally based *luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2730-2735
5. Atalay I. (1998). "Paleoenvironmental Conditions of the Late Pleistocene and Early Holocene in Anatolia, Turkey" In Alsharhan A.S., Glennie K.W., Whittle G.L., and St. Kendall C.G. *Quaternary Deserts & Climatic Change: Proceedings of an International conference on Quaternary Deserts and Climatic Change at Al Ain UAE, December 9-11, 1995*. Taylor & Francis. pp. 229
6. Bond P.L., Rees G.N. (1999). Microbiological aspects of phosphorus removal in activated sludge systems. In: *Microbiology of activated Sludge* (Seviour R.J. and Blackall L.L., Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 227-256
7. Boswell C.D., Dick R.E., Eccles H., Macaskie L.E. (2001). Phosphate uptake and release by *Acinetobacter johnsonii* in continuous culture and coupling of phosphate release to heavy metal accumulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26:333-340
8. Briganti F., Pessione E., Giunta C., Scozzofava A. (1997). Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Lett.* 416:61-64

9. Buchan L. (1983). Possible biological mechanism of phosphorus removal. *Water Sci. Technol.* 15:87-103
10. Carr E.L., Kampf P., Patel B.K.C., Gurtler V., Seviour R.J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:953-963
11. Chen J.Y., Wen C.M., Chen T.L. (1999). Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol. Bioeng.* 62:311-316
12. Chibata I., Tosa T. (1981). Use of immobilized cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10:197-216
13. Durham D.R., Marshall L.C., Miller J.G., Chmurny A.B. (1994). Characterization of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment process. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3329-3335
14. Hill W.E., Beneceld L.D., Jing S.R. (1989). ³¹P-NMR spectroscopy characterization of polyphosphates in activated sludge exhibiting enhanced phosphorus removal. *Water Res.* 23:1177-1181
15. Hrenovi J., Ivankovi T., Rozi M. (2010). Requirement of *Acinetobacter junii* for magnesium, calcium and potassium ions. *J. Biosci. Bioeng.* 110:180-186
16. Hrenovi J., Rozi M., Ivankovi T., Farkaš A. (2009). Biosorption of phosphate from synthetic wastewater by biosolids. *Centr. Eur. J. Biol.* 4(3):397-403
17. Hrenovi J., Tibljaš D., Biiyukgungor H., Orhan Y. (2003). Influence of support materials on phosphate removal by the pure culture of *Acinetobacter calcoacetucus*. *Food Technol. Biotechnol.* 41:331-338
18. Hrenovi J., Tibljaš D., Ivankovi T., Kova evi D., Sekovanovi L. (2010). Sepiolite as carrier of the phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*. *Appl. Clay Sci.* 50:582-587

19. Kahng H.Y., Kim S.I., Yoo Y.C. (2001). Complete nucleotide sequence and overexpression of *catI* gene cluster, and roles of the putative transcriptional activator CatR1 in *Acinetobacter iwoffi* K24 capable of aniline degradation. *Biochem. Biophys. Res.* 288:645-649
20. Kornberg A., Rao N.N., Ault-Riche D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125
21. Kortsee G.J.J., Appeldorn K.J., Bonting C.F.C., van Niel E.W.J., van Veen H.W. (1994). Biology of phosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:137-153
22. Levin G.V., Shapiro J. (1965). Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. *J. Water. Pollut. Cont. Fed.* 37:800-821
23. Li S.C., Wu J.Y., Chen C.Y., Chen T.L. (2000). Semicontinuous production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* in presence of nonwoven fabric. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 87:73-80
24. Li Y.C., Wu J.Y., Chen T.L. (2001). Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with batch culture in presence of nonwoven fabric. *Appl. Biotechnol. Bioeng.* 76:214-218
25. Lotter L.H., Murphy M. (1985). The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water SA* 11:179-184
26. Mino T., Kawakami T., Matsuo T. (1985). Behaviour of intracellular polyphosphate in the biological phosphate removal process. *Water Sci. Technol.* 17:11-21
27. Mudaly D.D., Atkinson B.W., Bux F. (2000). 16S rRNA probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal. *Water Sci. Technol.* 43:91-98

28. Rusansky S., Avigad R., Michaeli S., Gutnick D.L. (1987). Involvement of a plasmid in growth on and dispersion of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* RA57. Appl. Environ. Microbiol. 53:1918-1923
29. Streichan M., Schon G. (1991). Periplasmic and intracytoplasmic polyphosphate and easily washable phosphate in pure cultures of sewage bacteria. Water Res. 25:9-13
30. Timmerman M.W. (1984). Biological phosphorus removal in wastewater treatment. Microbiol. 1:149-152
31. van der Meer J.R., de Vos W.M., Harayama S., Zehnder A.J. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev. 56:677-694
32. van Groenestijn J.W., Bentvelsen M.M., Deinema M.H., Zehnder A.J. (1989). Polyphosphate-degrading enzymes in *Acinetobacter* spp. and activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 55:219-223
33. Waugh D. (2000). Geography: An Integrated Approach. Nelson Thornes. pp. 274