

DOROTA WOLICKA*, AGNIESZKA SUSZEK**

Bioremediacja terenów skażonych monopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi

Wprowadzenie

W ostatnich latach praktycznie we wszystkich uprzemysłowionych krajach świata pojawił się problem skażenia gruntów i wód podziemnych ropą naftową i jej produktami. Głównymi źródłami tych zanieczyszczeń są: instalacje wydobywcze i rafinerie przerabiające ropę naftową, urządzenia do dystrybucji i magazynowania paliw, środki transportu surowców ropopochodnych, lotniska, awarie i nielegalne odwierty (Klimiuk, Łebkowska 2003). W skład ropy naftowej i produktów jej przeróbki wchodzi głównie węglowodory alifatyczne i aromatyczne (Tyson 1995; Fukui i in. 1999). Ropa naftowa zawiera również pierwiastki biogenne: węgiel (83–87%), wodór (11–14%), siarkę (0,5–6%), tlen (0,1–4%), azot oraz jony metali ciężkich takie jak: ołów, cyna, arsen, rtęć, german, antymon, tal, wanad, żelazo (Kwapisz 1999). Pierwiastki takie jak siarka, azot i tlen, występują w postaci związków heterocyklicznych (tiofeny, pirydyna, pirole, benzofurany, fenole).

Wiele mikroorganizmów glebowych – głównie bakterie i grzyby – przekształca węglowodory naftowe do związków nietoksycznych lub też przeprowadza całkowitą mineralizację do prostych substancji nieorganicznych, takich jak dwutlenek węgla i woda (Szlaski, Wojewódka 2003). Ta naturalna mikrobiologiczna aktywność jest wykorzystywana w procesie bioremediacji do redukcji stężenia i/lub toksyczności różnych zanieczyszczeń, w tym ropopochodnych (Boopathy 2002; Dua i in. 2002).

* Dr, Uniwersytet Warszawski, Wydział Geologii, Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii, Warszawa; e-mail: d.wolicka@uw.edu.pl

** Mgr, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii, Warszawa

Do podstawowych czynników wpływających na proces biodegradacji produktów ropopochodnych w glebie należą: budowa chemiczna węglowodorów, ich stężenie i toksyczność w stosunku do mikroflory autochtonicznej (Romantschuk i in. 2000). Do najbardziej toksycznych składników ropy naftowej, wykazujących działanie mutagenne i kancerogenne, należą benzen, toluen, etylobenzen, ksylen i inne związki aromatyczne, które łatwo przedostają się do wody gruntowej (Kasai i in. 2005). Dodatkowymi czynnikami, które odgrywają również ważną rolę są mikrobiologiczny potencjał gleby (różnorodność populacji, aktywność enzymów) oraz fizykochemiczne parametry środowiska (m.in. odczyn, temperatura, zawartość materii organicznej, wilgotność) a także dostępność węglowodorów dla mikroorganizmów (Bogan, Sullivan 2003).

Zdolność do biodegradacji węglowodorów w glebie posiadają głównie bakterie (0,13 do 50% ogólnej liczby heterotroficznych mikroorganizmów glebowych) oraz grzyby (6–82%) (Leahy, Colwell 1990). Żaden jednak pojedynczy gatunek nie potrafi rozkładać wszystkich składników obecnych w ropie lub jej produktach, nawet ten zmodyfikowany genetycznie. Niewiele organizmów potrafi rozkładać jeden lub w najlepszym razie kilka węglowodorów w tym samym czasie (Korda i in. 1997). Biodegradacja substancji ropopochodnych jest więc przeważnie procesem wieloetapowym, zachodzącym z udziałem wielu mikroorganizmów, które często wykazują działanie synergistyczne względem siebie. Stąd też wydajna bioremediacja gruntów z produktów ropopochodnych wymaga mieszaniny populacji mikroorganizmów zdolnych do metabolizowania poszczególnych związków.

Celem pracy była izolacja, namnożenie i identyfikacja autochtonicznej mikroflory, a następnie monitoring, zarówno mikrobiologiczny, jak i postępu procesu bioremediacji.

1. Materiały i metody

1. Środowiska izolacji mikroorganizmów

Mikroorganizmy izolowano z okolic najstarszego złoża ropy naftowej w południowo-wschodniej Polsce, będącego częścią jednostki śląskiej. Próbki skażonego gruntu pobierano z głębokości 0,3 m.

2. Namnażanie mikroorganizmów

Skażony grunt w ilości 5 gramów wprowadzano do kolb o pojemności 300 ml i zalewano go podłożem, w których monopierścieniowe węglowodory aromatyczne stanowiły jedyne źródło węgla. Do hodowli dodawano benzen, toluen, etylobenzen lub ksylen. Kolby zatkano korkami z waty, a następnie wytrząsano je na wytrząsarce w celu zapewnienia warunków tlenowych hodowli przez 72 godziny. Następnie z hodowli pobierano supernatant, który stanowił inokulum mikroorganizmów autochtonicznych i wysiewano go (0,1 ml) na podłożu zestalonym na szalkach Petriego z odpowiednim źródłem węgla. Uzyskane kolonie przenoszono na podłoże płynne, wytrząsano przez 24 godziny i ponownie wysiewano na szalki Petriego. Zabieg ten wykonywano kilka-

naście razy w celu uzyskania dostatecznej ilości inokulum niezbędnej do założenia hodowli płynnej i zastosowania jej w warunkach polowych.

3. Warunki hodowli

Hodowle inkubowano w temperaturze pokojowej około 18°C. Stosunek inokulum do podłoża wynosił 1:10.

4. Zastosowane podłoże:

M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,134 g/L, KH_2PO_4 – 0,03 g/L, NaCl – 0,5 g/L, NH_4Cl – 3,982g/L, sole $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,47 g/100 ml – 1 ml soli/100ml podłoża, CaCl_2 – 111 mg/100ml – 1 ml soli/100 ml podłoża).

5. Oznaczenia

- *Oznaczenia biologiczne*: ogólna liczba bakterii, barwienie metodą Grama, obserwacje mikroskopowe prowadzone przy wykorzystaniu mikroskopu optycznego i skaningowego SEM.
- *Oznaczenia chemiczne*: pH mierzono przy użyciu pH-metru a odczyn hodowli korygowano przy użyciu 0,1 N HCl lub 0,1 N NaOH. Pomiary węglowodorów przeprowadzono metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo jonizacyjnym GC-FID. Próby ekstrahowano petroleterem (zgodnie z normą DIN EN ISO 9377-2 H53). Badania BTEX przeprowadzone zostały akredytowaną metodą chromatografii gazowej ze spektrometrem masowym GC-MS (zgodnie z normą DIN 38407 F9, F5).

2. Wyniki i dyskusja

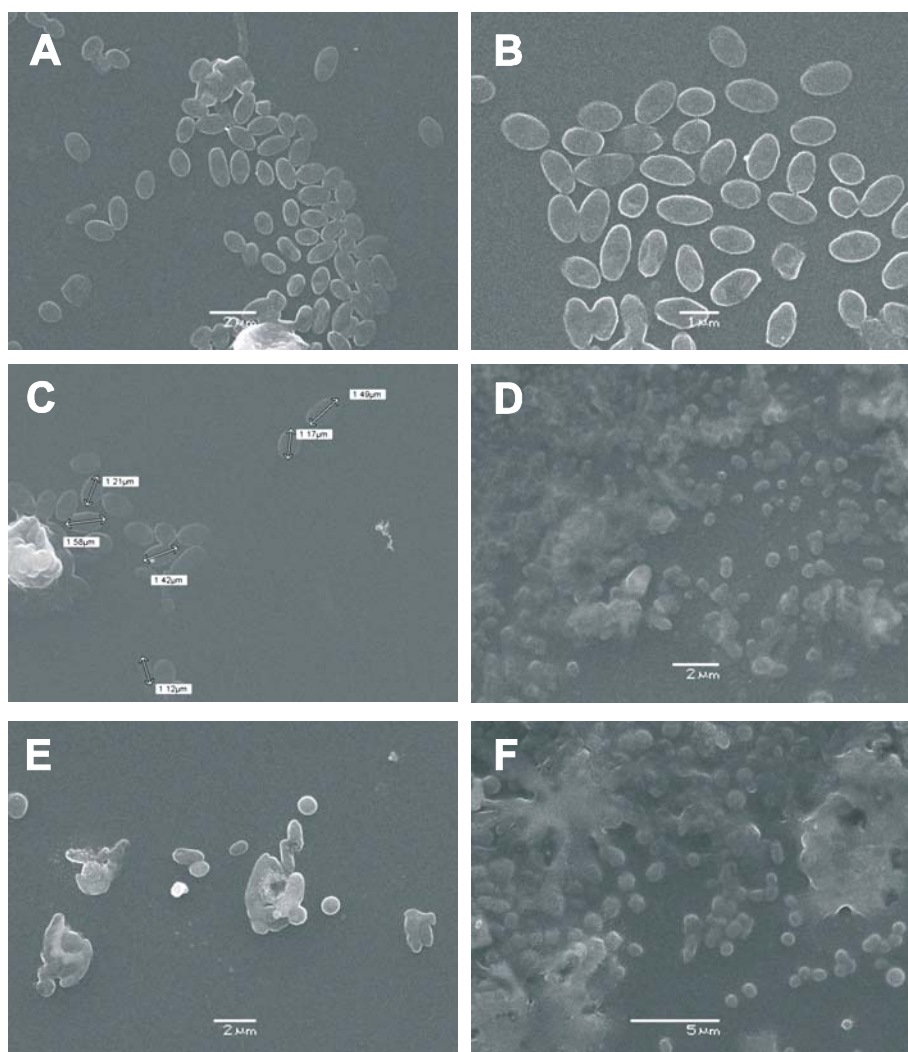
2.1. Izolacja i namnażanie tlenowych zespołów mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji BTEX

W myśl zasady, że najlepszym miejscem do izolacji mikroorganizmów zastosowanych następnie w procesie biodegradacji zanieczyszczeń są środowiska skażone tym zanieczyszczeniem, próbki gleby pobierano z terenu skażonego ropą naftową. Mikroorganizmy namnażano w warunkach tlenowych, gdyż efektywna biodegradacja produktów ropopochodnych, według obecnej wiedzy, zwykle wymaga obecności tlenu (Romantschuk 2000).

Do podłoża M9 dodano benzen, toluen, etylobenzen lub ksylen jako jedyne źródła węgla. Do każdej hodowli wprowadzano ww. związki w stężeniu 0,5, 0,75 i 1,0 g/L, w celu zaadaptowania wyizolowanych zespołów do wysokich stężeń BTEX. W sumie w pierwszym etapie doświadczenia założono 12 tlenowych hodowli, w celu selekcji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji zastosowanego źródła węgla. Hodowle inkubowano w temperaturze pokojowej.

W następnym etapie badań wyizolowane zespoły wysiano na podłoża zestalone. Już po 5 dniach zaobserwowano wzrost kolonii bakteryjnych na szalkach z benzenem, toluenem i ksylenem, jako jedynymi źródłami węgla. Powyższe czynności, a więc przenoszenie zespołów na podłoże płynne, następnie wysiewanie na płytce Petriego (na podłoże zestalone),

wykonywano kilkanaście razy w celu uzyskania aktywnych zespołów mikroorganizmów zdolnych do efektywnej biodegradacji związków organicznych BTEX. Celem tych zabiegów była adaptacja autochtonicznej mikroflory do wykorzystywania BTEX. W hodowlach stacjonarnych, w warunkach laboratoryjnych, stwierdzono 100-procentową redukcję benzenu, toluenu i ksylenu i 85-procentową redukcję etylobenzenu. W efekcie uzyskano biocenozy charakteryzujące się wysokim tempem biodegradacji BTEX. Wszystkie hodowle charakteryzowały się pH w zakresie 6,6–7,4.



Rys. 1. Wyselekcjonowane zespoły mikroorganizmów zdolne do biodegradacji benzenu (A, B, C), etylobenzenu (D) i ksylenu (E, F) jako jedyne źródła węgla

Fig. 1. Bacterial communities biodegrading benzene (A, B, C), ethylbenzene (D) and xylene (E, F) as sole carbon source

2.2. Identyfikacja wyizolowanych zespołów mikroorganizmów

Następnym etapem pracy była identyfikacja tlenowych mikroorganizmów wyhodowanych i zaadaptowanych do wysokich stężeń produktów naftowych. Wyizolowane tlenowe zespoły mikroorganizmów były heterogenne, co potwierdziły obserwacje mikroskopowe (rys. 1). Fakt ten uniemożliwił dokładną identyfikację mikroorganizmów. Po oczyszczeniu zespołów mikroorganizmów przeprowadzenie testów identyfikacyjnych będzie kolejnym etapem pracy.

2.3. Bioremediacja gruntu skażonego produktami ropopochodnymi w warunkach polowych

Nieliczne mikroorganizmy glebowe potrafią biodegradować jeden lub w najlepszym razie kilka węglowodorów w tym samym czasie (Nielsen i in. 2006). Stąd też wydajna bioremediacja gruntów z produktów ropopochodnych wymaga mieszanych zespołów mikroorganizmów, takich jakie otrzymano w laboratorium (Sikkema i in. 1995).

Wyselekcjonowane zespoły zastosowano w warunkach polowych i zadano na przymie eksperymentalnej o wymiarach $9,4 \times 5,8$ m i wysokości około 1 metra. Grunt, który był bioremediowany, należy zaliczyć do gruntów mieszanych piaszczysto-gliniastych. Dla efektywnego przebiegu biodegradacji konieczny jest kontakt mikroorganizmów i zanieczyszczeń, co niełatwo jest osiągnąć w warunkach polowych, gdy nie są one równomiernie rozproszone w glebie. Struktura i przepuszczalność gleby znacznie wpływa na szybkość przemieszczania się zanieczyszczeń w głąb gruntu. Dlatego też przed zadaniem mikroorganizmów przyma została przekopana i ponakłuwana w celu lepszej penetracji zastosowanego biopreparatu i większej dostępności tlenu.

Należy pamiętać, że o efektywności bioremediacji *in situ* gleb skażonych produktami ropopochodnymi decydują przede wszystkim parametry fizykochemiczne środowiska; głównie temperatura i struktura gruntu (Klimiuk, Łebkowska 2003). Wpływ tych czynników na liczebności, różnorodności i aktywności drobnoustrojów oraz biodostępność węglowodorów naftowych stanowi wypadkową i wymaga dalszych badań.

Efektywność biodegradacji i ocena szans powodzenia prac biodegradacji w terenie jest znacznie trudniejsza niż w badaniach laboratoryjnych. Jednym z utrudnień jest nierównomierne rozmieszczenie zanieczyszczeń, które zmusza do pobrania dużej liczby próbek, w celu otrzymania statystycznie istotnych i powtarzalnych wyników. Drugim bardzo ważnym czynnikiem jest proces migracji zanieczyszczeń w gruncie a ustalenie jego kierunku niezbędne.

Kontrola przebiegu procesu bioremediacji gruntów z produktów ropopochodnych polega na przeprowadzaniu analiz fizyczno-chemicznych i mikrobiologicznych. Określa się zmiany całkowitej ilości węglowodorów naftowych, skład zespołu mikroorganizmów oraz ich aktywność. Proces bioremediacji prowadzi się do uzyskania dopuszczalnego stężenia węglowodorów w remediowanym gruncie.

Przed zadaniem mikroorganizmów na pryzmę doświadczalną oraz po upływie 14 dni pobrano próbki gruntu w celu wykonania niezbędnych analiz chemicznych, określenia stopnia biodegradacji substancji ropopochodnych oraz określenia skuteczności zastosowanych zespołów mikroorganizmów. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1

Charakterystyka zanieczyszczeń gruntu przed i po procesie bioremediacji

TABLE 1

The characteristic of contamination before and after bioremediation process

Rodzaj analizy	Przed bioremediacją	Po zadaniu biocenozy	Procent redukcji zanieczyszczeń
Węglowodory [mg/L]			
C ₆ -C ₁₂	54	23	57,4
C ₁₂ -C ₃₅	672	31	95,4
Azot ogólny	550	170	69,0
Fosfor ogólny	327	310	5,2
BTEX [mg/L]			
benzen	0,03	<0,01	66,7
toluen	0,075	<0,01	86,7
etylobenzen	0,3	0,05	83,3
m-,p-ksylen	2,2	0,2	91,0
o-ksylen	1,4	0,1	92,8
Suma BTEX	4,0	0,4	90,0

Jak wynika z powyższej tabeli po zastosowaniu wyselekcjonowanych tlenowych biocenozy mikroorganizmów nastąpiła znaczna redukcja zanieczyszczeń zarówno węglowodorami alifatycznymi (57,4–95,4%) jak i aromatycznymi (66,7–92,8%). Uzyskane wyniki wskazują na bardzo wysoką efektywność zastosowanej metody co objawia się uzyskaniem znacznej redukcji zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi w krótkim czasie – około 14 dni. Uzyskane wyniki bioremediacji okazały się bardzo zadowalające.

Ocena szans powodzenia prac biodegradacji w terenie jest znacznie trudniejsza niż w badaniach laboratoryjnych. Dostępność węglowodorów naftowych dla komórek mikroorganizmów (biodostępność) zależy od różnych czynników fizycznych (struktura gleby i rozmiar porów), chemicznych (adsorpcja, niska rozpuszczalność) i mikrobiologicznych (budowa osłon komórkowych). Wpływają one zarówno na transport tych związków, jak i migrację mikroorganizmów w glebie. Problem ten nadal nie jest do końca rozwiązany i wyjaśniony dlatego też wymaga dalszych badań.

Podsumowanie

Zastosowanie metod biologicznych w procesie redukcji skażeń substancjami ropopochodnymi wydaje się jak najbardziej słuszne i uzasadnione z kilku powodów. Są to metody, które wykorzystują naturalną aktywność mikroorganizmów, a produktem końcowym wszystkich przemian metabolicznych są związki nietoksyczne dla środowiska takie jak CO₂ i H₂O. Ponadto metody te nie wymagają wprowadzania do środowiska przyrodniczego żadnych związków chemicznych, które ewentualnie mogłyby wchodzić w reakcję, czy też ulegać akumulacji w glebie. Procesy biologiczne są jak najbardziej procesami ekologicznymi.

LITERATURA

- Bogan B.W., Sullivan W.R., 2003 – Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, vol. 52, 1717–1726.
- Boopathy R., 2000 – Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, vol. 74, 63–67.
- Dua M., Singh A., Suthunathan N., Johri A.K., 2002 – Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, 143–152.
- Fukui M., Harms G., Rabus R., Schramm A., Widdel F., Zengler K., Boreham C., Wilkes H., 1999 – Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria In: *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Kasai Y., Takahata Y., Hoaki T., Watanabe K., 2005 – Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. *Environ. Microbiol.* Vol. 7, 806–818
- Klimiuk E., Łebkowska M., 2003 – Mikrobiologiczne oczyszczanie gruntów z produktów naftowych [W:] *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 199–226.
- Korda A., Santas P., Tenente A., Santas R., 1997 – Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. 48, 677–686.
- Kwapisz E., 1999 – Problemy biodegradacji ropy naftowej [W:] *Materiały Konferencyjne I Krajowy Kongres Biotechnologii*, 14 sekcja *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wrocław, 23–24 września 1999 r. 227–229.
- Leahy J., Colwell R.R., 1990 – Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, vol. 54, 305–315.
- Nielsen D.R., McLellan P.J., Daugulis A.J., 2006 – Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylooxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in a bio-scrubber. *Biotechnol. Lett.* vol. 28, 1293–1298.
- Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Hahtela K., 2000 – Means to improve effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environ. Poll.* vol. 107, 179–185.
- Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B., 1995 – Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* vol. 59, 201–222.
- Szlaski A., Wojewódka D., 2003 – Bioremediacja gruntów z produktów ropopochodnych. *Instalator*, 61, 52–53.
- Tyson R.V., 1995 – *Sedimentary organic matter*. London. Chapman&Hall.

BIOREMEDIACJA TERENÓW SKAŻONYCH MONOPIERŚCIENIOWYMI WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI

Słowa kluczowe

Bioremediacja, skażenie środowiska, BTEX, procesy tlenowe

Streszczenie

Nieustanny rozwój przemysłu i idący wraz z nim postęp techniczny związany jest z pojawianiem się w środowisku przyrodniczym różnych związków chemicznych, zarówno organicznych, jak i nieorganicznych, które w naturalnych warunkach w nim nie występują. Poważnym problemem dzisiejszych czasów jest zanieczyszczenie środowiska substancjami ropopochodnymi stanowiącymi poważny i nierozwiązany problem w wielu krajach świata, jak również i w Polsce. Według danych literaturowych, około 0,25% zużywanych produktów naftowych przedostaje się do środowiska. Są to głównie paliwa silnikowe, smary, oleje i surowa ropa naftowa. W Polsce, przy zużyciu produktów naftowych około 17 mln. ton/rok, teoretycznie około 40 tys. ton tych substancji może przedostawać się do środowiska, co stanowi dla niego realne zagrożenie. Mimo niskiego wydobycia ropy naftowej w Polsce, w wielu rejonach obserwuje się silne zanieczyszczenie gruntów i wód gruntowych m.in. w otoczeniu rafinerii, stacji benzynowych, baz składowania paliw płynnych, rurociągów przesyłowych paliwa, lotnisk oraz poligonów wojskowych. W niektórych rejonach skażenie substancjami ropopochodnymi, sięgające 250 g/kg gruntu, stwierdzono na znacznej głębokości (Klimiuk, Łebkowska 2003).

Celem prezentowanej pracy było wyizolowanie z terenów eksploatacji ropy naftowej tlenowych zespołów mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji benzenu, toluenu, etylobenzenu oraz ksylenu (BTEX). Związki BTEX dodawano do hodowli jako jedyne źródło węgla. W hodowlach stacjonarnych w warunkach laboratoryjnych uzyskano 100% redukcję benzenu, toluenu i ksylenu. W hodowlach z etylobenzenem jako jedynym źródłem węgla wartość redukcji wynosiła 85%. Wyizolowane biocenozy mikroorganizmów zastosowano z powodzeniem w warunkach polowych, w celu redukcji stopnia zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi. W warunkach tych uzyskano 66,7% redukcji benzenu, 86,7% toluenu, 83,3% etylobenzenu oraz 91% m-, p-ksylenu i 92,8% o-ksylenu.

BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED AREA BY MONOCYCLIC HYDROCARBONS

Key words

Bioremediation, environmental contamination, BTEX, aerobic processes

Abstract

Continuous industrial development and the accompanying technical evolution is linked with introducing to the natural environment different organic and inorganic chemical compounds that do not occur in natural conditions. An important phenomenon of our times is environmental pollution caused by oil products, which is a crucial and unsolved problem in many countries, including Poland. According to literature data, ca. 0.25% of the utilized oil products is introduced into the natural environment. They include: petrol fuel, lubricants, motor oil, and crude oil. In Poland about 17 mln t of oil products are utilized each year, and theoretically ca. 40 t of these substances may be introduced into the natural environment, posing hazard. Despite the very low exploitation of crude oil in Poland, in many regions strong pollution of soils and groundwater by oil products can be observed, e.g. near oil refinement plants, petrol stations, liquid fuel magazines, pipelines, airfields and proving grounds. In some areas the pollution by oil products reaching 250 g/kg of soil has been determined at considerable depths (Klimiuk, Łebkowska 2003).

The aim of this study was the isolation of aerobic bacterial communities from oil fields and their adaptation to utilize benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) as the sole carbon source. In stationary cultures in laboratory conditions, a 100% reduction of benzene, toluene and xylene, and a 85% reduction of ethylbenzene was observed. The isolated communities of microorganisms were successfully applied in field conditions in order to reduce the degree of pollution by oil products. During biodegradation in situ the 66.7%, 86.7%, 83.3% and 92% reduction of BTEX, respectively, was obtained.