

NGUYEN THI BICH LOC*

**EFEKTYWNOŚĆ METODY IN-SITU W USUWANIU
ZANIECZYSZCZEŃ ROPOPOCHODNYCH***Streszczenie*

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. Próbkę gleb pobrano: na stacji kolejowej (przy torach kolejowych) w Zielonej Górze, na Lotnisku w Przylepie pod Zieloną Górą (w miejscu tankowania benzyny), oraz na stacji benzynowej w Zielonej Górze (ulica Konstytucji 3-maja). Badania mikrobiologiczne prowadzono w laboratorium Instytutu Inżynierii Środowiska, Uniwersytetu Zielonogórskiego w okresie letnim 2010 i 2011 roku. Badania mikrobiologiczne polegały na określeniu: ogólnej liczby bakterii w pobranych próbkach gleb, oraz hodowanie wybranych szczepów bakterii na pożywkach sztucznych (pożywka stała i płynna) w celu zastosowania niektórych z tych szczepów do gleby zakażonych różnymi substancjami zawierającymi węglowodory (benzyna, ropa naftowa i olej). Badanie in-situ przeprowadzono w sposób wazonowy na glebie lekko-gliniastej. Zawartość zanieczyszczeń: benzyna (B) 3200 ppm, ropa naftowa (R) 20030 ppm, olej (O) 2140 ppm. Do każdego wazonu dodawano roztwór mieszaniny trzech szczepów (150 ml): *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.* W badaniu trzech rodzajach gleb zakażonych związkami węglowodorowymi występuje 9 rodzajów bakterii: *Comamonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* i *Acinetobacter sp.* Skutecznie usunięto zakażenia węglowodorów w badanych glebach. Ogólny procent usunięcia zanieczyszczeń wynosi 99,7%. Efektywność działania trzech szczepów bakterii w badanych glebach osiągnęła od 56,1 do 69,8%.

Słowa kluczowe: bakterie, ropa naftowa, benzyna, in-situ

WSTĘP

Chemiczne zanieczyszczenia gleb jest wynikiem niewłaściwej działalności człowieka. Źródłem zanieczyszczenia gleby ropą naftową i jej pochodnymi są

* Uniwersytet Zielonogórski; Instytut Inżynierii Środowiska; Zakład Ekologii Stosowanej

głównie procesy związane z wydobyciem ropy i jej przetwarzaniem w rafineriach. Źródłem zanieczyszczeń są również stacje benzynowe, stacje obsługi samochodów, tereny portowe, lotniska, warsztaty naprawcze taboru samochodowo-kolejowego, czy też awarie podczas transportu i magazynowania paliw itp. Produkty pochodzenia petrochemicznego mogą dostawać się do gleby ze ściekami, ale również ze spływami powierzchniowymi spłukującymi powierzchnie ulic, placów i dróg.

W Polsce silnie skażone są tereny byłych baz i poligonów poradzieckich, gdzie wylewano zużyte oleje i smary bezpośrednio do gruntu.

Efektywność bioremediacji gruntów z ropy i jej pochodnych zależy od szybkości rozkładu tych zanieczyszczeń przez mikroorganizmy glebowe. Efektywność biodegradacji zależy od budowy chemicznej i stężenia węglowodorów, ich toksyczności oraz od aktywności enzymatycznej mikroorganizmów.

Minimalna liczebność mikroorganizmów w glebie skażonej produktami ropopochodnymi konieczna dla efektywnej biorekultywacji wynosi ponad 10^5 komórek/g s.m. gruntu. W powierzchniowych warstwach gleby, zawierających odpowiedni stosunek C:N:P występuje od 10^7 do 10^9 komórek/g gruntu, z tego od 0,1 do 1,0% stanowią organizmy zdolne do rozkładu substancji ropopochodnych. W glebach skażonych produktami ropopochodnymi liczba bakterii może zwiększyć się od 100 do 1000 razy.

Większość metod biologicznego oczyszczania zaolejonych gruntów oparta jest na intensyfikacji procesu poprzez zastosowanie odpowiednio dobranych i przygotowanych zespołów mikroorganizmów – biocenozy lub konsorcjów mikroorganizmów, wyspecjalizowanych w rozkładzie węglowodorów.

Bioremediację gruntów można przeprowadzać sposobem *in situ* – w miejscu występowania skażenia lub *ex situ* – po wybraniu zanieczyszczonej gleby z danego terenu i umieszczeniu w specjalnie przygotowanym miejscu.

W bioremediacji naturalnej wykorzystuje się proces naturalnej biodegradacji przeprowadzanej przez mikroorganizmy i wymaga jedynie prowadzenia regularnego monitorowania stężenia zanieczyszczeń. Najpowszechniej stosowaną metodą bioremediacji gruntów jest biostymulacja polegająca na stymulowaniu wzrostu i aktywności rodzimych populacji drobnoustrojów (przyspieszaniu procesów biodegradacji zanieczyszczeń) poprzez dostarczenie im odpowiednich substancji pokarmowych lub/i tlenu.

Zdarza się, że rodzime populacje na danym terenie nie wykazują pożądanej aktywności w degradacji zanieczyszczeń. Jest to spowodowane toksycznym działaniem związków wchodzących w skład skażenia lub brakiem odpowiednich mikroorganizmów. W takiej sytuacji można zastosować bioaugmentację. Metoda ta polega na wprowadzeniu do środowiska odpowiednich mikroorganizmów. Mogą to być wyizolowane ze skażonego gruntu i namnożone rodzime szczepy, które wykazują największą aktywność w rozkładzie zanieczyszczeń.

Zdolność do degradacji i/lub wykorzystywania węglowodorów naftowych wykazują liczne rodzaje bakterii i grzybów, a także drożdże, niektóre *Cyanobacteria* i zielone glony. Jednak w bioremediacji gruntów, z wielu względów, wykorzystuje się przede wszystkim bakterie. Charakteryzują się one wysoką liczebnością, szybkim wzrostem i zdolnością degradacji różnorodnych zanieczyszczeń. Można je łatwo hodować oraz poddawać manipulacjom genetycznym. Biologiczne oczyszczanie gleb z produktów ropopochodnych zachodzi głównie w wyniku działalności bakterii tlenowych, które wykorzystują węglowodory naftowe jako źródło węgla i energii potrzebne do ich wzrostu i rozmnażania.

O efektywności bioremediacji *in situ* gleb skażonych produktami ropopochodnymi w dużej mierze decydują parametry fizykochemiczne środowiska. Celowe jest prowadzenie badań nad wykorzystaniem bakterii wyizolowanych z gruntów skażonych ropopochodnymi do biodegradacji ropopochodnych.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Badania laboratoryjne

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem próbek gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. Próbki gleb pobrano z następujących miejsc:

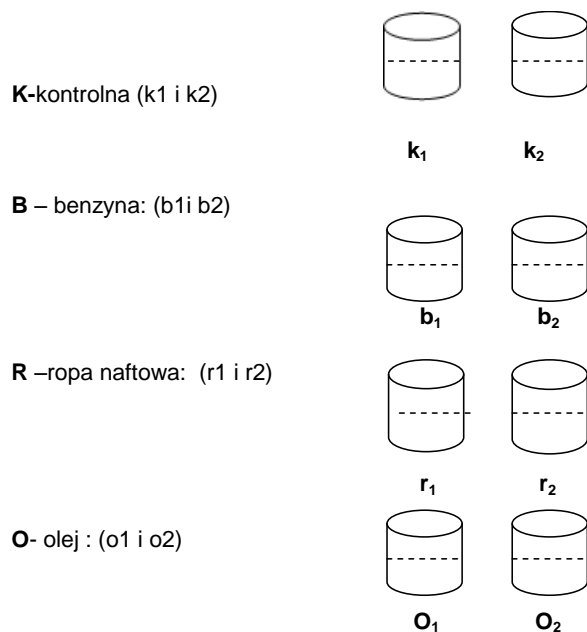
- na stacji kolejowej (przy torach kolejowych) w Zielonej Górze,
- na lotnisku w Przylepie pod Zieloną Górą (w miejscu gdzie samoloty tankują benzynę),
- na terenie stacji benzynowej w Zielonej Górze (ulica Konstytucji 3-maja).

Badania mikrobiologiczne prowadzono w laboratorium Instytutu Inżynierii Środowiska, Uniwersytetu Zielonogórskiego w okresie lata 2010 i 2011 r. Badania mikrobiologiczne polegały na określeniu: ogólnej liczby bakterii w pobranych próbkach gleb, przewagę liczebną szczepów, wyznaczenie stosunku bakterii zdolnych do rozkładu zanieczyszczeń wobec ogólnych liczb bakterii w próbie kontrolnej oraz hodowanie wybranych szczepów bakterii na pożywkach sztucznych (pożywka stała i płynna) w celu zastosowania niektórych z tych szczepów do oczyszczania gleb skażonych benzyną, ropą naftową i olejami. Pożywki przygotowane według metodyki podanej w skrzypcie laboratorium biotechnologii [B.L. Nguyen Thi, 2009]. Izolacje i identyfikacje szczepów bakterii prowadzono według wskaźników opisanych przez Atlas i Bartha [1993] oraz w *Bergey's manual of determinative bacteriology* [1993].

Metoda *in-situ* rozkładu zanieczyszczeń węglowodorowych w glebie

Badanie *in-situ* przeprowadzono metodą wazonową z wykorzystaniem gleby lekko-gliniastej. Zawartość zanieczyszczeń wynosiła: benzyna (B) 3200 ppm,

ropa naftowa (R) 20030 ppm, olej (O) 2140 ppm. Do każdego wazonu dodawano roztwór mieszaniny trzech szczepów bakterii (150 ml) : *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.* Prowadzono 2 razy powtórzenia dla każdego rodzaju zanieczyszczenia. Do wazonu kontrolnego nie dodawano roztworu bakterii, tylko wodę destylowaną w ilości 150 ml (jak roztworu bakterii) [Cieplik, 1997, Warren, 1986, Bryant i in., 1998]. Schemat doświadczenia z oznaczeniami poszczególnych próbek przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Schemat doświadczenia
Fig. 1. Experiment design

Zaplanowano 6-tygodniowe badania wazonowe z wybranymi mieszaninami szczepów bakterii wyizolowanych z zakażonych gleb. Raz w tygodniu regularnie mieszano zawartość wszystkich wazonów.

Badania fizykochemiczne polegały na określeniu: pH, temperatury, wilgotności gleby, zawartości zanieczyszczeń w tym N i P. Stężenie zanieczyszczeń ropopochodnych po działaniu bakterii określano metodą chromatografii gazowej (GC) i spektrofotometrii w strumieniu światła czerwono-fioletowego.

Przedział ufności obliczeń wyznaczono według zmodyfikowanego wzoru podanego przez Jegorow [1976]:

$$Xi = (XT + 2\delta\bar{x}) pk$$

X_i – zawartość zanieczyszczeń w 1 kg s.m. gleby,
 \bar{X}_T – średnia zawartość zanieczyszczeń w wazonie doświadczalnym,
 $\delta\bar{x}$ – średnia nachylenia
 P – prawdopodobieństwa (95%),
 k – współczynnik suchej masy gleby ($=1$)

$$\delta\bar{x} = \mp \frac{\sqrt{\sum xt}}{n}$$

n- powtórzenia

WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Dane w tabeli 1 wykazują różne bakterie występujące w trzech badanych glebach zakażonych substancjami węglowodorowymi. Najmniejsza liczba bakterii występuje w próbce gleby pobranej przy torach kolejowych (dworzec kolejowy w Zielonej Górze). W próbce zidentyfikowano 7 kolonii bakterii w tym tylko 3 szczepy bakterii. Stosunek liczby każdego szczepu bakterii w stosunku do gleby kontrolnej wynosił od 1,6-5,0%. Więcej bakterii występuje w próbce gleby pobranej na lotnisku w Przylepie. Wykazano 21 kolonii, w tym 7 szczepów bakterii. Stosunek liczby bakterii do gleby kontrolnej wynosił 1,6-11,7%. W próbce gleby pobranej na stacji benzynowej występuje 11 kolonii bakterii, w tym 5 szczepów bakterii. Stosunek liczby bakterii do gleby kontrolnej wynosił 2,3-9,0%.

Tab. 1. Obecność bakterii w próbkach glebowych

Table 1. The presence of bacteria in soil samples

Czynniki badane	Miejsce pobrania próbki		
	Lotnisko Przylep w Zielonej Górze	Dworzec kolejowy (przy torach) w Zielonej Górze	Stacja benzynowa w Zielonej Górze
Zanieczyszczenia	benzyna samolotu	smary i olej	mieszane surowce napędowe
Rodzaj gleby	lekka gliniasta	lekka gliniasta	piaszczysta
Ogólna liczba bakterii w próbkach gleb (ilość kolonii)	21	7	11
Ogólna liczba kolonii w glebach kontrolnych (ilość)	60	60	43
Ilość kolonii każde-	<i>Comamomonas sp. 7,</i>	<i>Pseudomonas sp. 3</i>	<i>Micrococcus sp. 7</i>

go rodzaju bakterii	<i>Pseudomonas sp. 5</i> , <i>Bacillus sp. 4</i> <i>Chromobacterium sp. 2</i> , <i>Pseudomonas fluo- rescens 1</i> <i>Agrobacterium sp. 1</i> <i>Flavobacterium sp. 1</i>	<i>Pseudomonas fluorescens 3</i> <i>Bacillus sp. 1</i>	<i>Staphylococcus sp. 2</i> <i>Acinetobacter sp. 1</i> <i>Pseudomonas sp. 1</i>
Stosunek rodzaju bakterii w stosunku do gleby kontrolnej(%)	1,6-11,7	1,6-5,0	2,3-9,0

Wyniki dotyczące rozkładu zanieczyszczeń (węglowodorów) w glebie lekkiej gliniastej przedstawiono w tabeli 2. Dane wykazują, że rozkład węglowodorów w glebie lekkiej gliniastej zachodził szybciej w próbkach z dodanym roztworem bakterii. Rozkład zanieczyszczeń w okresie 42 dób działania bakterii był na poziomie 99,7%.

Tab. 2. Rozkład węglowodorów w glebie lekkiej gliniastej w metodzie *in-situ*
Table 2. Decomposition of hydrocarbons in the clayey soil *in-situ* method

Rodzaj zanieczyszczeń	Zawartość węglowodorów, ppm.kg ⁻¹ gleby			rozkład zanieczyszczeń,%			Przedział ufności p=95%
	przed dodaniem bakterii	po 42 dobach działania bakterii	gleba kontrola po 42 dobach	w stosunku do bakterii i wody	w stosunku do gleby kontrolnej	rozkład	
Benzyna	3200	8,5	2100	99,7	34,4	65,3	7,3-3095,7
Olej i smary	2140	6,2	1500	99,7	29,9	69,8	5,8-2072,3
Ropa naftowa	20030	51,0	11300	99,7	43,6	56,1	46,6-19149,3
pH	6,5	7,2	7,5	-	-	-	-
Temperatura gleby, °C	20	22	20	-	-	-	-
Wilgotność gleby, %	39	80	39-80	-	-	-	-
Zawartość azotu ogólnego, g.kg ⁻¹ s.m	12,7	16,3	13,7	-	-	-	-
Zawartość fosforu ogólnego, g.kg ⁻¹ s.m	20,5	19,4	16,3	-	-	-	-

W porównaniu z glebą kontrolną rozkład zanieczyszczeń wynosił od 56,1 do 69,8%. Wyniki badań wykazują również, że w warunkach laboratoryjnych zachodził naturalny proces rozkładu badanych węglowodorów w glebie wynoszący od 29,9 do 43,6%. Badana gleba była sucha – wilgotność początkowa próby wynosiła 39%.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Bakterie powodują rozkład pochodnych ropy naftowej i pracują aż do momentu wyczerpania się źródła pokarmu [Malina i Szczepański, 1994]. Analiza danych literaturowych wskazuje, że większość badań prowadzonych na świecie dotyczy przede wszystkim procesów prowadzonych przez wybrane gatunki mikroorganizmów oraz koncentruje się na rozpoznaniu mechanizmów działania bakteryjnych enzymów hydrolitycznych. Badania koncentrują się również na zagadnieniach ekspresji genów odpowiedzialnych za wydzielanie specyficznych enzymów [Zhou, 2000; Kapusta, 2000; Karaszkiewicz, 1970].

Do badań wybrano 3 szczepy bakterii: *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, które zostały wyizolowane z gleb skażonych substancjami pochodzącymi z ropy naftowej. Wyizolowane szczepy bakterii są zdolne do rozkładu węglowodorów, ale również innych zanieczyszczeń [Karaszkiewicz, 1974]. Roztwór hodowanych szczepów bakterii dodany do gleb z zawartością ropopochodnych w czasie 42 dób powodował obniżenie stężeń węglowodorów do poziomu poniżej 100 ppm gleby.

Wyniki badań potwierdziły skutecznie działanie bakterii w degradacji ropy naftowej, benzyny i olejów. Stężenie pozostałe wynosiły od 6,2-51,0 ppm gleby.

Metoda *in-situ*, zastosowana w doświadczeniu okazała się skuteczną w usuwaniu zanieczyszczeń ropopochodnych. Porównując z metodą *Ex-situ* - wykorzystanie naturalnych procesów biologicznych zachodzących w danej glebie powodowała szybsze odkażanie gleb. W rzeczywistości procesy te są znacznie bardziej skomplikowane, zdolność usuwania zanieczyszczeń posiadają także grzyby pleśniowe, reprezentowane przez następujące rodzaje *Aspergillus chaetomium* i *Fusarium* [Chmiel, 1994; Klimiuk i in., 2003].

WNIOSKI

- W trzech rodzajach gleb skażonych ropopochodnymi wyizolowano dziewięć rodzajów bakterii: *Comamomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Stapylococcus sp.* i *Acinebacter sp.*

- Ilość bakterii zależy od rodzaju gleby. Największą liczbę bakterii stwierdzono w glebie lekkiej gliniastej, skażonej benzyną (21 kolonii w g badanej gleby), a najmniejszą w glebie pobranej z torów kolejowych (7 kolonii w 1 g badanej gleby). W glebie piaszczystej wyizolowano 11 kolonii bakterii.
- Ogólny procent usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych wynosił 99,7%.
- Efektywność biodegradacji ropopochodnych przez bakterie *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, wynosiła od 56,1 do 69,8%.

LITERATURA

1. ATLAS R.M., BARTHA R.: *Microbial ecology. Fundamentals and applications*. Third Edition USA, the Benjamin, Cummings Publishing Comp, Inc., 1993
2. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. USA, Ninth Ed. Williams & Wilkins, 1993
3. BICH LOC NGUYEN THI: *Laboratorium biotechnologii dla kierunku inżynieria środowiska*. UZ, Zielona Góra, 2009, 123 s.
4. BRYANT R. et al.: *Biotechnology for heavy oil recovery*. Beijing China, 7th UNITAR, Int. conf. on Heavy crude and tar sand, 1998, 7 s.
5. CHMIEL A.: *Biotechnologia – Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. Warszawa PWN, 1994, 365 s.
6. CIEPLIK Z.: *Procesy deterioracji środków chemicznych używanych do sporządzania i obróbki chemicznej płuczek wiertniczych*. Kraków, VII Międzynarodowa Konf. Nauk – Techn. AGH NT: „Nowa metody i technologie w geologii naftowej, wiertnictwie eksploatacji otworowej i gazownictwie”, 73-78. 1997
7. JEGOROW H.C.: *Praktikum Mikrobiologii*. Uniwersytet IZD., Moskwa, 1976, 307 s.
8. KAPUSTA P. NIEWIADOMSKA A., TURKIEWICZ A.: *Charakterystyka grup mikroorganizmów będących wskaźnikami występowania złóż ropy naftowej i gazu ziemnego*. Kraków, dokumentacja IGN i G, 2000
9. KARASZKIEWICZ J.: *Badania nad zastosowaniem metod mikrobiologicznych w poszukiwaniu złóż ropy naftowej i gazu ziemnego*. Katowice, prace Instytutu Naftowej, 1970
10. KARASZKIEWICZ J.: *Zastosowanie metod mikrobiologicznych w intensyfikacji eksploatacji Karpaccich złóż ropy naftowej*. Katowice, wyd. Śląsk, 1974
11. KLIMIUK E., ŁEBKOWSKA M.: *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wydawnictwa Naukowa PWN, Warszawa, s.199-226, 2003
12. MALINA G., SZCZEPAŃSKI A.: *Likwidacja zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi w środowisku wodno-gruntowym*. PIOŚ. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa, 1994

13. WARREN K. A.: *Microbial hydrolysis of polysaccharides*. Ann. Rev. Microbiol., 50, 1986
14. ZHOU S., INGRAM L.O.: *Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acids wollen cellulose by two endoglucanases (celz and cely) from Erwinia chrysanthemi*. Journ. Bacteriol., Oct, 182(20), 2000, 5676-5682

EFFICIENCY OF REMOVING CONTAMINATION FROM THE PRODUCTION OF PETROLEUM ORIGIN BY METHOD IN-SITU

S u m m a r y

The research was carried out in laboratory conditions with the soils which was contaminated with product of petroleum origin. The soil tests were taken from: a railway station (by railway track), air field Przylep (From place to fill up with petrol of plane), petrol station in the street Konstytucja 3-maja in Zielona Góra, Poland. The microbiological studies was analysed in laboratory Institute of Environment Engineering, University of Zielona Góra, Poland in the summer 2010 and 2011 of the years. The microbiological lies in determination: generally number of bacteria in the soil tests, majority number of genus bacteria in the soil tests and relationship of bacteria in comparison with generally number of bacteria in the soil controls and cultivating the chosen of genus bacteria in the artificial medium (solid and liquid) in order to apply some genus of the bacteria in to the soils, which was contaminated with product of petroleum origin (petrol, petroleum and oil). carry out a. conduct a. do research; The research in-situ was carried out into on ways of vases with the clayey of light soil. The pollution content in the soil were: petrol (B) 3200 ppm, petroleum (R) 20030 ppm and oil (O) 2140 ppm. The mixture of 3 bacteria genus : Bacillus sp., Pseudomonas sp, Micrococcus sp. (150 ml) was added in to every vases of soil. There are 9 genuses of bacteria Comamonas sp., Pseudomonas sp., Bacillus sp. Chromobacterium sp., Agrobacterium sp., Flavobacterium sp, Micrococcus sp., Stapylococcus sp. and Acinebacter sp. were presented in the 3 of the studied soils, which was contaminated with product by compounds of hydrogen carbon. It was effectively in removing of contaminated with hydrogen carbon in the studies soils. The general percent of removing polluted are 99,7%. Effectiveness of 3 genus bacteria action in studies soils are achieving from 56,1 to 69,8%.

Key words: bacteria, petroleum, petrol, oil, in-situ