

WPŁYW pH NA EFEKTYWNOŚĆ BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH W GLEBIE

HANKA BOSZCZYK-MALESZAK, ANNA ZABOST, EWA BIESZKIEWICZ

Uniwersytet Warszawski, Instytut Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii Środowisk
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Keywords: biodegradation, inoculum, pH.

INFLUENCE OF pH ON EFFECTIVITY OF OIL PRODUCTS BIODEGRADATION IN SOIL

In this experiment mixed bacteria cultures, adapted to high concentrations of oil products were used. The application of the mixed bacterial cultures to oil biodegradation in oil of different pH values (5, 7, 9), was also studied. The biodegradation process was detected in all investigated soils independly on pH values, both in soil with autochthonous bacteria and with addition of mixed bacteria cultures. In the soil inoculated with mixed bacteria cultures after 21 days reduction of oil content was 40% ($\pm 1.63\%$) in acid soil, 42% ($\pm 0.82\%$) in soil with neutral pH and 31% ($\pm 1.41\%$) in soil with pH about 9. After 42 days biodegradation was carried out in all investigated pH values at about 60% ($\pm 1.63\%$) level of reduction of oil products. In control samples (only with autochthonous bacteria) during this time (42 days) the average 49% ($\pm 1.63\%$) decrease of oil products content was obtained. Addition of inoculum into soil influenced the effectivity of this process. The increase of oil removal by about 10% was noted.

Streszczenie

Przeprowadzono badania nad możliwością zastosowania bakterii zaadaptowanych do wysokich stężeń produktów naftowych do biodegradacji oleju w glebie o różnych wartościach pH (5,0; 7,0; 9,0). Stwierdzono, że proces biodegradacji zachodzi przy wszystkich badanych wartościach pH – zarówno w glebie z mikroflorą autochtoniczną jak i z dodatkiem szczepionki. Po 21 dniach w glebie szczepionej redukcja oleju wynosiła 40% ($\pm 1,63\%$) w glebie kwaśnej, 42% ($\pm 0,82\%$) w glebie o pH obojętnym i 31% ($\pm 1,41\%$) w glebie o pH 9, zaś po 42 dniach spadek zawartości oleju przy wszystkich badanych pH wyniósł około 60% ($\pm 1,63\%$). W próbach kontrolnych w tym czasie (42 dni) uzyskano średnio 49% ($\pm 1,63\%$) ubytek produktów naftowych. Dodatek szczepionki wpływał, zatem na zwiększenie efektywności tego procesu o około 10%.

WPROWADZENIE

Najistotniejszą rolę w przemianach związków ropopochodnych znajdujących się w glebie odgrywają procesy biologiczne. Szacuje się, że około 30% wprowadzonych zanieczyszczeń ulega biologicznemu rozkładowi. Bakterie biorące w tym udział wchodzi w skład naturalnej mikroflory gleby [9]. Biodegradację produktów naftowych głównie prowadzą bakterie należące do rodzajów: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* [1, 3, 6].

Proces biodegradacji węglowodorów uzależniony jest od wielu czynników: budowy chemicznej węglowodorów, stężenia węglowodorów i ich rozpuszczalności, obecności

mikroorganizmów przeprowadzających procesy biodegradacji, obecności pierwiastków biogennych, temperatury i pH gleby, ilości tlenu, rodzaju gleby i jej wilgotności, występowania substancji hamujących rozwój mikroorganizmów [5, 8, 10, 11].

Dużą rolę w procesie biodegradacji węglowodorów odgrywa odpowiednia wartość pH. W przeciwieństwie do ekosystemów wodnych, pH gleby jest bardzo zróżnicowane – od 2,5 w hałdach kopalni do 11 na terenach alkalicznych pustyń [3]. Większość bakterii heterotroficznych preferuje pH bliskie obojętnego, grzyby natomiast rozwijają się chętnie przy pH kwaśnym. Krańcowe wartości pH działają negatywnie na mikroorganizmy – mogą wpływać na wzrost bakterii oraz modyfikować ich właściwości fizjologiczne.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyto 12 szczepów bakterii, zaadaptowanych do rozkładu produktów naftowych o wysokich stężeniach, wyizolowanych z zaolejonej gleby, pochodzących z kolekcji szczepów Zakładu Mikrobiologii Środowisk.

Szczyepy bakteryjne wysiewano metodą posiewu powierzchniowego na płytki z agarem odżywczym. Po 24-godzinnej inkubacji wyrosłe kolonie zmywano solą fizjologiczną, a uzyskaną w ten sposób zawiesinę używano do zaszczepiania gleby.

Badania prowadzono na glebie ogrodowej – żyznej, o strukturze gruzelkowej, wilgotności około 60%, pH (H_2O) – 6,7. Zawartość $C_{ogólny}$ – 18% – oznaczano na analizatorze CHNS firmy Thermo Finnigan.

Podczas doświadczenia używano olej stanowiący mieszaninę lekkich i ciężkich węglowodorów zebrany ze ścieków rafinerijno-petrochemicznych w mechanicznej oczyszczalni ścieków.

W celu identyfikacji bakterii wykonano następujące testy diagnostyczne: barwienie metodą Grama, test na obecność L-alaninoamino-peptydazy, test API-20NE, test Kovacs'a na obecność oksydazy cytochromowej, test Hugh-Leifsona oraz prowadzono obserwacje mikroskopowe. Na podstawie uzyskanych wyników oznaczano badane szczepy bakteryjne wg schematu Bonde'a [2] oraz książki kodów API 20NE.

Hodowle prowadzono w krystalizatorach zawierających 100 g gleby zaszczepionej zawiesiną bakteryjną, w każdej z nich stężenie oleju wynosiło 3%. Glebę użytą do badań (pH = 6,7) poddano modyfikacjom w celu zmiany jej odczynu – zakwaszono lub alkalizowano roztworami 1 M HCl lub NaOH. Założono trzy serie doświadczeń różniących się wartościami pH (H_2O) gleby: 5, 7 i 9. Przez cały czas trwania doświadczenia pH gleby utrzymywano na pożądanym poziomie. Dla każdego wariantu prowadzono hodowle kontrolne nieszczepione. W hodowlach utrzymywano stały poziom wilgotności poprzez nawilżanie gleby oraz dokładnie je mieszało w celu lepszego napowietrzania. Każde z doświadczeń prowadzone było przez 42 dni w temperaturze pokojowej (w trzech powtórzeniach). W czasie trwania hodowli mierzono zawartość oleju co 7 dni (przez pierwsze 21 dni) oraz ostatniego – 42 dnia. W dniu założenia hodowli, 21 i 42 dnia określano liczbę bakterii. Wyniki podawano jako średnią z powtórzeń.

Liczbę bakterii oznaczano metodą płytkową wysiewając po 0,1 cm³ poszczególnych rozcieńczeń gleby (w trzech powtórzeniach).

Produkty naftowe oznaczano metodą wagową po ekstrakcji eterem naftowym (w trzech powtórzeniach).

Po zakończeniu każdego z eksperymentów na gleby o odpowiednim pH wysiewano gorczycę i obserwowano kiełkowanie nasion i wzrost roślin. Wyniki podano jako średnią.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania prowadzono w trzech etapach:

- identyfikacja bakterii wykorzystanych do szczepienia gleby,
- rozkład produktów naftowych w szczepionej glebie w trzech wariantach pH,
- sprawdzenie skuteczności bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem (kiełkowanie i wzrost gorczycy).

Identyfikacja bakterii wchodzących w skład szczepionki

Stwierdzono, że zastosowane bakterie należały do następujących rodzajów: *Arthrobacter* – 3 szczepy, *Agrobacterium* – 1 szczep, *Pseudomonas* – 7 szczepów, *Xanthomonas* – 1 szczep. Mieszankę tych szczepów użyto do zaszczepiania gleby.

Badania nad rozkładem produktów naftowych w glebie przy różnych wartościach pH

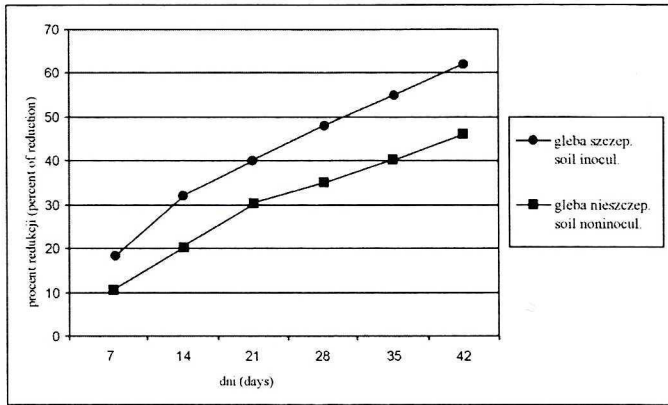
W celu zbadania zdolności do biodegradacji oleju niejałową glebę o trzech różnych wartościach pH (5,0; 7,0 i 9,0) zaszczepiono zawiesiną bakterii. Dla każdego wariantu pH prowadzono doświadczenie kontrolne (gleba bez inokulum bakteryjnego). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunkach 1–4.

Stwierdzono, że dodatek szczepionki bakteryjnej do gleby wpływa w wyraźny sposób na poprawę biodegradacji oleju. Obserwowano, że po 21 dniach w glebie szczepionej o pH 5 redukcja oleju wynosiła 40% ($\pm 1,63\%$), zaś w nieszczepionej była niższa i wynosiła 29% ($\pm 1,41\%$) (Rys. 1).

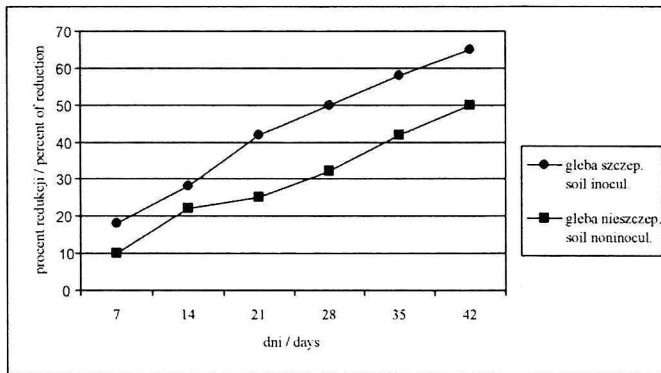
W glebie o pH neutralnym usuwanie produktów naftowych w tym samym czasie osiągnęło poziom 42% ($\pm 0,82\%$) w glebie szczepionej i 25% ($\pm 2,16\%$) w glebie nieszczepionej (Rys. 2), natomiast w glebie o pH 9 poziom ten wyniósł odpowiednio 31% ($\pm 1,41\%$) i 21% ($\pm 1,41\%$) (Rys. 3).

Doświadczenie kontynuowano przez kolejne 3 tygodnie w celu sprawdzenia możliwości adaptacji bakterii do znajdujących się w glebie produktów naftowych (Rys. 1–3). Po 42 dniach hodowli, w próbach szczepionych przy wszystkich stosowanych wartościach pH, ubytek oleju wyniósł ponad 60% ($\pm 1,63\%$). W próbach nieszczepionych uzyskano w tym czasie redukcję produktów naftowych mniejszą o średnio 10% ($\pm 0,81\%$). Ubytek węglowodorów w hodowlach kontrolnych w tym czasie związany był z działalnością mikroflory autochtonicznej. W ciągu pierwszych siedmiu dni eksperymentu następowało ulatnianie się lżejszych frakcji oleju (około 7–10%).

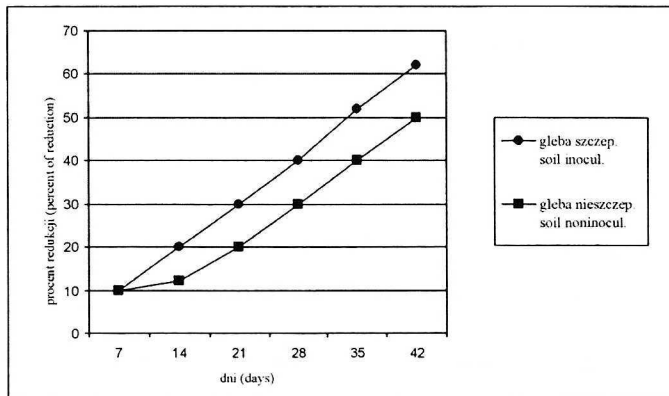
Zmiany liczby bakterii w czasie trwania doświadczenia przedstawiono na rysunku 4. Liczba bakterii w glebie we wszystkich wariantach doświadczenia w dniu założenia hodowli wynosiła $2,5\text{--}5,4 \times 10^9$ kom./g gleby, a po 21 dniach hodowli spadła w hodowlach o pH 7 i 9 do $6,0 \times 10^8$ kom./g, zaś w pH 5 pozostała na poziomie wyjściowym. Liczba bakterii autochtonicznych we wszystkich prowadzonych hodowlach, po 3 tygodniach trwania doświadczenia, spadła o 1 rząd wielkości z $4,8 \times 10^9$ do $3,5 \times 10^8$ kom./g. Być może produkty naftowe działają na niektóre bakterie toksycznie lub mikroorganizmy występujące stale w glebie nie są przystosowane do wykorzystywania zanieczyszczeń olejowych [4].



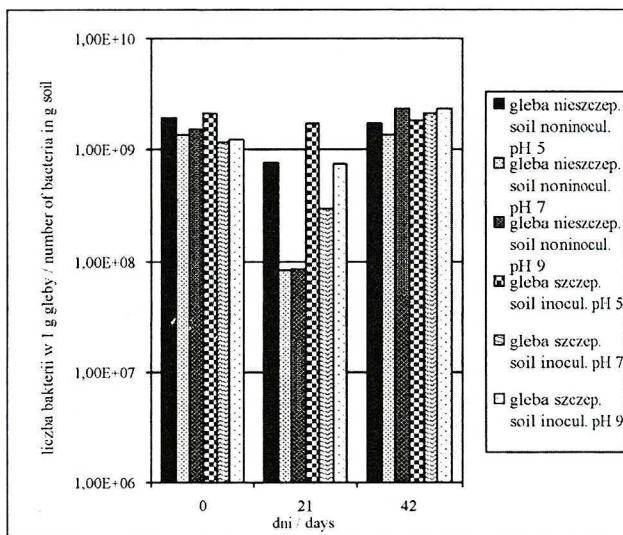
Rys. 1. Redukcja oleju w glebie o pH 5
Oil reduction in soil at pH 5



Rys. 2. Redukcja oleju w glebie o pH 7
Oil reduction in soil at pH 7



Rys. 3. Redukcja oleju w glebie o pH 9
Oil reduction in soil at pH 9



Rys. 4. Liczba bakterii w glebie o różnych wartościach pH
Number of bacteria in soil at different pH

Liczba bakterii po 42 dniach doświadczenia we wszystkich hodowlach wzrosła i wynosiła średnio $3,6\text{--}8,9 \times 10^9$ kom./g gleby. Prawdopodobnie wzrost ten wiązał się z adaptacją do węglowodorów zarówno autochtonicznej mikroflory jak i bakterii wprowadzonych do gleby.

Produkty naftowe, które nie zostały wykorzystane przez mikroorganizmy należą najprawdopodobniej do frakcji związków mało dostępnych dla bakterii i wymagają dłuższego czasu ekspozycji, również mogą to być węglowodory, które uległy nieodwracalnej sorpcji na cząstkach gleby [7].

W celu określenia przeżywalności i aktywności szczepów bakteryjnych, wprowadzonych w szczepionce, po zakończeniu doświadczenia przeprowadzono izolację bakterii z gleby o różnym pH. Z gleby o pH 5, po procesie bioremediacji, wyizolowano 7 szczepów bakterii należących do 3 rodzajów: *Arthrobacter* – 5, *Bacillus* – 1, *Pseudomonas* – 1. Z gleby o pH 7 wyizolowano 8 szczepów: *Arthrobacter* – 2, *Bacillus* – 5, *Achromobacter* – 1, zaś w glebie o pH 9 znaleziono 9 szczepów należących do 8 rodzajów: *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* – po 1 szczepie oraz *Bacillus* – 2.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że bakterie należące do rodzaju *Arthrobacter* zaadaptowane do wysokich stężeń oleju utrzymują się w glebie przy wszystkich badanych wartościach pH. Wszystkie szczepy wprowadzone ze szczepionką utrzymały swoją aktywność tylko w glebie o pH 9, w której również obserwowano największą różnorodność mikroflory autochtonicznej (oprócz bakterii wprowadzonych ze szczepionką stwierdzono również występowanie bakterii należących do innych rodzajów – 4 szczepy autochtoniczne). Natomiast w przypadku gleby o pH 5 i pH 7 znaleziono odpowiednio 1 i 2 szczepy autochtoniczne.

Sprawdzenie skuteczności bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem

Po zakończeniu bioremediacji gleby o różnych wartościach pH zanieczyszczonej 3% oleju wysiano na nią nasiona gorczycy (po 25 ziaren w każdym wariantcie doświadczenia). Po 10 dniach policzono kiełki. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Procent wykiełkowanych nasion gorczycy w różnych wariantach doświadczenia – w nawiasie przedstawiono procent wykiełkowanych nasion w stosunku do kontroli
Percent sprout of seed mustard in different variant of experiment – in bracket present percent sprout of seed in relation to control

pH	5	7	9
Gleba szczep. Soil inocul.	80 (100)	64 (80)	72 (90)
Gleba nieszczep. Soil noninocul.	76 (95)	64 (80)	48 (60)

Kontrolę stanowiły rośliny hodowane na glebie nie szczepionej i nie skażonej olejem; procent siewkowanych nasion wynosił 80.

Rośliny gorczycy rosnące na glebie poddanej bioremediacji, przy wszystkich badanych wartościach pH, charakteryzowały się drobniejszym ulistnieniem i były niższe od tych, które rosły na glebie kontrolnej (nie zanieczyszczonej olejem).

Na glebie skażonej (zarówno szczepionej jak i nie szczepionej) przy pH 5, po trzech tygodniach bioremediacji, nie zauważono wyraźnej różnicy w wyglądzie roślin. Wzrost gorczycy na glebie o pH 7 był większy w próbie szczepionej niż nie szczepionej. Na glebie alkalicznej wzrost kiełków był najslabszy w obu wariantach doświadczenia.

Po 10 dniach wzrostu rośliny ścięto, zważono, a następnie wysuszono do stałej masy w temperaturze 105°C. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Przedstawione powyżej wyniki dotyczące mokrej i suchej masy roślin (w przeliczeniu na 10 kiełków) potwierdzają wcześniejsze obserwacje słabego wzrostu gorczycy na glebie o pH 9 – niezależnie od obecności szczepionki.

Na glebie szczepionej o pH 5 i 7 stwierdzono lepszy przyrost masy roślin.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że:

- wprowadzenie do zanieczyszczonej produktami naftowymi gleby szczepów bakteryjnych zaadaptowanych do wysokich stężeń oleju przyspiesza proces bioremediacji we wszystkich badanych wartościach pH,

- glebowe bakterie autochtoniczne są w stanie rozkładać substancje ropopochodne po okresie adaptacji,

- zastosowana metoda bioremediacji pozwala na ponowne wykorzystanie oczyszczonej gleby do wzrostu roślin.

Tabela 2. Liczba kiełków oraz mokra (świeża) i sucha masa roślin użytych w doświadczeniu
 Number of sprouts and wet (fresh) and dry weight of plants used in experiment

	Liczba kiełków Number of sprouts	Mokra masa Wet weight g	Sucha masa Dry weight g	Mokra masa / 10 kiełków Wet weight / 10 sprouts g	Sucha masa/ 10 kiełków Dry weight / 10 seeds g
Kontrola Control	20	5,07	0,23	2,54	0,12
Gleba szczep. pH 5 Soil inocul. pH 5	20	2,00	0,13	1,00	0,07
Gleba nieszczep. pH 5 Soil noninocul. pH5	19	1,79	0,12	0,94	0,07
Gleba szczep. pH 7 Soil inocul. pH 7	16	1,73	0,11	1,08	0,07
Gleba nieszczep. pH 7 Soil noninocul. pH 7	16	1,51	0,13	0,94	0,08
Gleba szczep. pH 9 Soil inocul. pH 9	18	1,47	0,11	0,82	0,06
Gleba nieszczep. pH 9 Soil noninocul. pH 9	12	0,47	0,07	0,39	0,06

LITERATURA

- [1] Austin B., J. Calomiris, J. Walker, R. Colwell: *Numerical taxonomy and ecology of petroleum – degrading bacteria*, Appl. Environ. Microbiol., **34**, 60–68 (1997).
- [2] Bonde G.J.: *Bacterial indication of pollution*, [in:] M.R. Drop, H.W. Jannash (Eds.), *Advances in aquatic microbiology*, **1**, 273 (1997).
- [3] Bossert I., R. Bartha: *The fate of petroleum in soil ecosystems*, Macmillan Publishing Co., New York 1984.
- [4] Donderski W., A. Wódkowska: *Występowanie bakterii wodnych i glebowych zdolnych do degradacji olejów silikonowych*, [w:] Materiały V Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego, Ustroń-Jaszowiec 1997, 85–89.
- [5] Leahy J., R. Colwell: *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*, Microbiol. Rev., **54**, 305–315 (1990).
- [6] Łebkowska M., E. Karwowska, E. Miaśkiewicz: *Isolation and identification of bacteria from petroleum derivatives contaminated soil*, Acta Microbiol. Polon., **44**, 297–303 (1995).
- [7] Maliszewska-Kordybach B.: *Mikrobiologiczne przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym*, Post. Mikrobiol., **26**, 233–247 (1987)
- [8] Morgan P., R. Watkinson: *Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater*, Wat. Res., **26**, 73–78 (1992).
- [9] Olańczuk-Neyman K., J. Prejzner, M. Topolnicki: *Chemiczna i bakteriologiczna ocena skażenia gruntów stacji przeladunku paliw produktami ropopochodnymi*, Biotechnologia, **25**, 50–59 (1994).
- [10] Pitter P.: *Determination of biological degradability of organic substances*, Wat. Res., **10**, 231–235 (1976).
- [11] Sztompka E.: *Biodegradation of engine oil in soil*, Acta Microbiol. Polon., **48**, 185–196 (1999).

Wpłynęło: 24 lutego 2003, zaakceptowano do druku: 28 lipca 2003.