

Biodegradacja frakcji olejowej ścieków petrochemicznych przez bakterie izolowane z zaolejonej gleby

Ewa Bieszkiewicz

Roman Mycielski

Hanka Boszczyk-Maleszak

Beata Wyszkowska

Zakład Mikrobiologii Środowisk

Instytut Mikrobiologii

Uniwersytet Warszawski

Warszawa

1. Wstęp

Dużym zagrożeniem dla środowiska glebowego jest coraz częściej występujące skażenie produktami naftowymi. Na terenie rafinerii gleba skażona jest zarówno olejami znajdującymi się w ściekach, jak i zanieczyszczonymi wodami opadowymi. Rozkład biologiczny węglowodorów pochodzenia petrochemicznego w środowisku jest kompleksowym procesem, na który wpływa wiele czynników, takich jak: skład, rodzaj i ilość olejów, a także warunki środowiskowe oraz skład mikroflory (9). Biodegradacja olejów może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych; wiadomo jednak, że w warunkach beztlenowych proces ten przebiega wolniej (2,3). Zbyt duże ilości olejów przedostających się do gleby utrudniają atak mikrobiologiczny, ze względu na ograniczony kontakt olej — mikroorganizm. W badaniach przeprowadzonych przez Sirugera, Jobsona i Rambeloarisoa wykazano, że niektóre bakterie glebowe zdolne do efektywnej degradacji ropy naftowej, posiadają zdolność do jej emulsyfikacji (7,11,13). Rozkład węglowodorów w środowisku jest przede wszystkim przeprowadzany przez bakterie i grzyby. Bossert i Bartha (2) wyizolowali z gleby 22 gatunki bakterii i 31 gatunków grzybów zdolnych do metabolizowania węglowodorów. Wśród bakterii główną rolę w rozkładzie węglowodorów w środowisku pełnią bakterie z rodzajów *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* oraz *Pseudomonas*. Stopień degradacji węglowodorów przez te bakterie zależy od ich indywidualnych właściwości oraz warunków środowiskowych.

2. Cel pracy

Celem pracy była izolacja i wstępna identyfikacja bakterii pochodzących z zaolejonej gleby oraz określenie ich aktywności wobec frakcji olejowej ścieków petrochemicznych.

3. Materiały i metody

3.1. Frakcja olejowa

Stosowana w badaniach frakcja olejowa była mieszaniną węglowodorów zbieranych z powierzchni zbiorników osadowych mechanicznej oczyszczalni ścieków rafinerijno-petrochemicznych.

3.2. Bakterie

Bakterie zostały wyizolowane z zaolejonej gleby z terenu zakładów rafinerijno-petrochemicznych. Do 100 ml soli fizjologicznej dodano 1 g gleby, zawiesinę wytrząsano przez 60 min w temp. 28°C i przesączono przez bibułę. Odpowiednie rozcieńczenia przesączu wysiano na szalki z agarem odżywczym i podłożem mineralnym z dodatkiem 1000 mg/l olejów. Inkubację prowadzono w temp. 28°C przez 14 dni.

3.3 Podłoża

a. Podłoże mineralne

K_2HPO_4	- 7 g
KH_2PO_4	- 2 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	- 0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	- 1 g
woda destylowana	- 1000 ml.

Jako źródła węgla dodawano oleje w stężeniach 1000, 2500, 5000, 7500, 10 000 i 15 000 mg/l. Podłoże zestalano 1,5% agarem.

b. Bulion odżywczy.

c. Agar odżywczy.

3.4. Identyfikacja bakterii

Identyfikacji dokonywano na podstawie analizy wyników następujących testów diagnostycznych:

- barwienie metodą Grama,
- badanie ruchliwości,
- test Kovacs'a na obecność oksydazy cytochromowej,
- test Hugh-Leifsona na typ rozkładu glukozy,
- badanie zdolności do wytwarzania pigmentów na podłożu King A i King B.

3.5. Warunki hodowli

Prowadzono wytrząsane hodowle na podłożach płynnych w 300 ml kolbach zawierających po 200 ml podłoża. Hodowle inkubowano w temp. 28°C.

3.6. Oznaczenia biologiczne

3.6.1. Określanie liczby bakterii

Liczbę bakterii oznaczano metodą płytkową poprzez wysiew odpowiednich rozcieńczeń na płytki z agarem odżywczym lub agarem mineralnym z olejami.

3.7. Oznaczenia chemiczne

3.7.1. Oznaczanie ilości olejów

Oznaczenie polegało na wagowym określeniu w badanych próbach zawartości substancji organicznych, ekstrahujących się eterem naftowym. Wyniki podano w mg olejów/l.

4. Wyniki i dyskusja

Badania prowadzono w dwóch etapach. W pierwszym, wyizolowano i zidentyfikowano bakterie z zaolejonej gleby. W drugim, badano możliwość rozkładu frakcji olejowej ze ścieków petrochemicznych przez wybrane szczepy.

Z zaolejonej gleby wyizolowano 26 szczepów, z czego 19 wykazywało po kilku pasażach dobry wzrost na stałym podłożu mineralnym z olejami w stężeniu 1000 mg/l. Szczepy te hodowano następnie na płynnym podłożu mineralnym w obecności 1000 mg olejów/l jako jedyne źródła węgla i energii. Hodowlę prowadzono przez 42 dni, wysiewając co tydzień odpowiednie rozcieńczenia na stałe podłoże mineralne z olejami. Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Najintensywniejszy przyrost liczby bakterii większości szczepów obserwowany był przez pierwsze dwa tygodnie hodowli (logarytmiczna faza wzrostu). Największy wzrost liczby bakterii stwierdzono w hodowlach szczepów o numerach 13,15,17,18 i 19. Od 21. dnia hodowli nastąpił okres stagnacji wzrostu, a następnie liczba bakterii we wszystkich hodowlach zaczęła stopniowo spadać. Wszystkie szczepy poddano podstawowym testom identyfikacyjnym w celu ich sklasyfikowania (tab. 2). Najliczniejszą grupę wśród nich (7 szczepów) stanowiły bakterie należące do rodzaju *Arthrobacter*, który licznie reprezentuje grupę autochtonicznej mikroflory glebowej. Rodzaj ten obejmuje przede wszystkim liczne gramodatnie lub zmienne w reakcji Grama bakterie, które charakteryzują się często obserwowaną w trakcie trwania doświadczeń zmiennością morfologii komórek podczas cyklu życiowego. O zdolności bakterii należących do rodzaju *Arthrobacter* do rozkładu węglowodorów w glebie (również ich frakcji pierścieniowych) donosi wielu autorów (6,8).

TABELA 1
WZROST WYBRANYCH SZCZEPÓW NA PŁYNNYM PODŁOŻU MINERALNYM Z OLEJAMI (1000 mg/l)

Numer szczepu	Liczba bakterii w 1 ml			
	0 dni	14 dni	28 dni	42 dni
1	$4,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$
2	$2,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$
3	$2,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$
4	$8,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$
5	$1,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$
6	$1,2 \times 10^3$	$0,8 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$
7	$3,8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$
8	$1,1 \times 10^3$	$0,8 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
9	$1,7 \times 10^2$	$7,6 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$
10	$9,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$
11	$9,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^6$	$6,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
12	$8,7 \times 10^3$	$4,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$
13	$4,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^7$	$8,9 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$
14	$4,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$
15	$3,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$
16	$2,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$
17	$1,4 \times 10^3$	$7,0 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$
18	$3,2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$
19	$2,0 \times 10^3$	$6,2 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$

TABELA 2
IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW BAKTERII WYIZOLOWANYCH Z ZAOLEJONEJ GLEBY
I DOBRZE ROSNĄCYCH NA OLEJACH

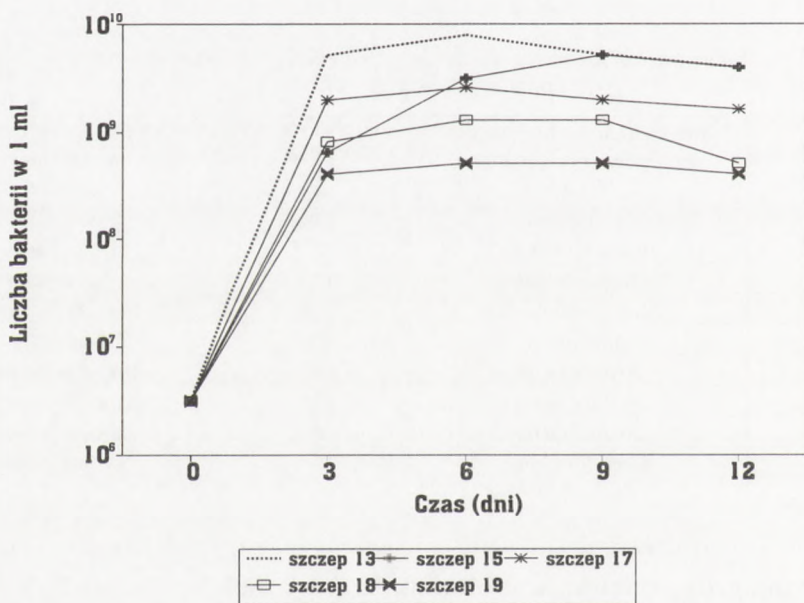
Numer szczepu	Identyfikacja do rodzaju szczepów rosnących na olejach	Numer szczepu	Identyfikacja do rodzaju szczepów rosnących na olejach
1	<i>Anitratum</i>	11	<i>Pseudomonas</i>
2	<i>Pseudomonas</i>	12	<i>Pseudomonas</i>
3	<i>Pseudomonas</i>	13	<i>Arthrobacter</i>
4	<i>Vibrio-Aeromonas</i>	14	<i>Pseudomonas</i>
5	<i>Anitratum</i>	15	<i>Flavobacter</i>
6	<i>Arthrobacter</i>	16	<i>Vibrio-Aeromonas</i>
7	<i>Arthrobacter</i>	17	<i>Arthrobacter</i>
8	<i>Arthrobacter</i>	18	<i>Arthrobacter</i>
9	<i>Pseudomonas</i>	19	<i>Arthrobacter</i>
10	<i>Flavobacter</i>		

Drugą liczną grupę bakterii wyizolowaną z gleby zaolejonej stanowiły bakterie gramujemne, należące do rodzaju *Pseudomonas* (6 szczepów). Zdolność licznych przedstawicieli tego rodzaju do metabolizowania węglowodorów obser-

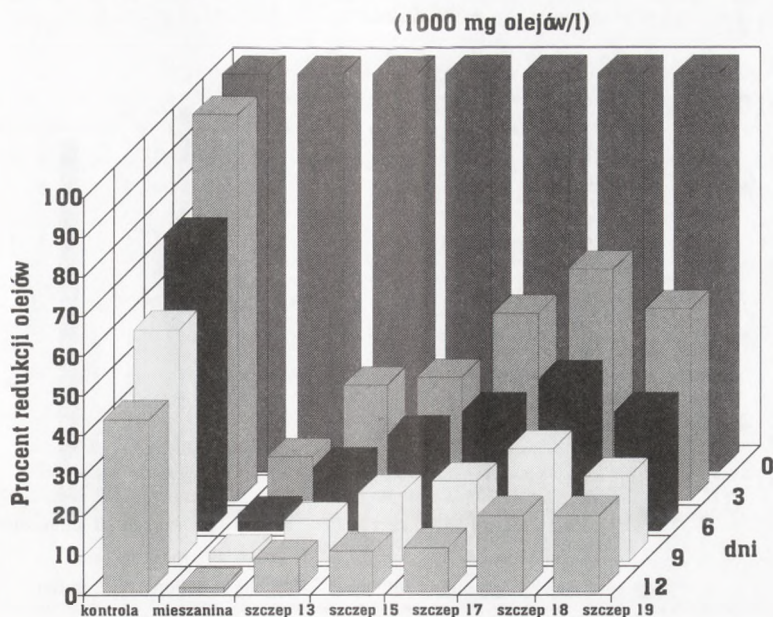
wowali także Radehaus, Cruden, Folsom, oraz Sigoillot (4,5,10,12). Wśród wyizolowanych szczepów mniej licznie były reprezentowane bakterie z grupy *Anitratum* oraz *Flavobacterium* i *Vibrio-Aeromonas*. W przeprowadzonych badaniach dotyczących taksonomii bakterii rozkładających ropę Austin potwierdził (1), że wyizolowane przez nas grupy bakterii są zdolne do wzrostu na olejach jako jedynym źródle węgla i energii.

Spośród 19 badanych szczepów 5 wykazywało największy i najszybszy przyrost liczby komórek w hodowlach płynnych na podłożu z olejami. Cztery z nich należały do rodzaju *Arthrobacter* (różniły się między sobą pojedynczymi cechami fizjologicznymi), a jeden do *Flavobacterium* i te właśnie szczepy wybrano do dalszych badań.

W celu określenia zdolności badanych szczepów do zużywania frakcji olejowej z podłoża założono sześć hodowli na płynnym podłożu mineralnym z dodatkiem 1000 mg/l olejów. Hodowle zaszczerpiono 14-dniową płynną hodowlą pojedynczych szczepów oraz ich mieszaniną. Jako kontrolę zastosowano nie zaszczerpione płynne podłoże mineralne z olejami w takim samym stężeniu. Hodowle wraz z kontrolą inkubowano w temp. 28°C, z wytrząsaniem, przez 12 dni. W odstępach kilkudniowych określano liczbę bakterii oraz stężenie olejów w podłożu. Wyniki przedstawiono na ryc. 1 i 2. Obserwowane zmiany stężenia olejów w kontroli, aż do 43% ubytku olejów po 12 dniach inkubacji, świadczą o wyparowywaniu lżejszych frakcji produktów naftowych. Po uwzględnieniu tego zjawiska wartości ubytku olejów z podłoża, wynikające z działalności pojedynczych szczepów sięgały od 37 do 50% za-



Ryc. 1. Zmiany liczby bakterii w hodowlach wybranych szczepów.



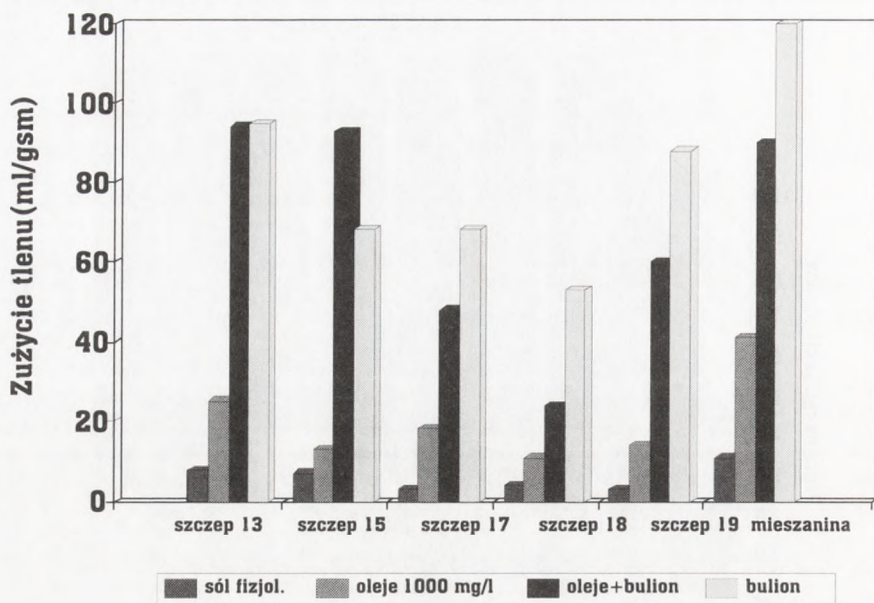
Ryc. 2. Zużycie olejów w hodowlach wybranych szczepów bakterii (1000 mg olejów/l).

leżnie od szczepu. Mieszanina szczepów usunęła 55% olejów po 12 dniach hodowli.

Ogólnie można stwierdzić, że ubytek frakcji olejowej w hodowlach pojedynczych szczepów wynosi 80-90%, a w hodowli mieszaniny szczepów – 98%. Rzeczywisty udział bakterii w rozkładzie frakcji olejowej jest na obecnym etapie badań trudny do określenia, gdyż ulatnianie się węglowodorów może się zmieniać w warunkach hodowli bakteryjnych. We wszystkich prowadzonych hodowlach największe tempo rozkładu olejów obserwowano w czasie pierwszych siedmiu dni doświadczenia. W okresie tym zauważono również największy przyrost liczby bakterii. Wyniki te wskazują na aktywny udział bakterii w rozkładzie olejów.

W dalszej części pracy zbadano intensywność oddychania poszczególnych szczepów i ich mieszaniny w obecności olejów w stężeniu 1000 mg/l jako jedyne źródła węgla i energii. Jako dodatkowe kontrole zastosowano podłoże mineralne z olejami wzbogacone bulionem (20 ml bulionu na 1000 ml podłoża) oraz bulion. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 3.

Największą aktywność oddechową na podłożu z olejami zaobserwowano w przypadku mieszaniny szczepów (42 ml O_2 /g s.m.), podczas gdy pojedyncze szczepy zużywały w ciągu 60 minut od 11 do 17 ml O_2 /g s.m. Znacznie wyższą intensywność oddychania stwierdzono na substracie bulionowym (do 120 ml O_2 /g s.m. w mieszaninie szczepów). Również na podłożu mineralnym z olejami z dodatkiem niewielkiej ilości bulionu intensywność oddychania była większa niż na podłożu z olejami, przy czym poszczególne szczepy re-



Ryc. 3. Aktywność oddechowa bakterii rozkładających oleje w obecności różnych substratów.

agowały różnie na takie wzbogacenie podłoża, np. szczep 15 oddychał w tych warunkach intensywniej niż na podłożu bulionowym. Wskazuje to na to, że wzbogacenie podłoża mineralnego w łatwo dostępne związki organiczne może przyspieszać rozkład olejów. W dalszych badaniach należałoby określić, czy rzeczywiście niewielki dodatek takich związków może zwiększyć wyraźnie tempo biodegradacji olejów oraz jaka minimalna dawka wzbogacenia podłoża mineralnego jest konieczna do ewentualnego przyspieszenia tego procesu.

Ostatni eksperyment miał na celu zbadanie zdolności mieszaniny szczepów do rozkładu wyższych od 1000 mg/l stężeń olejów. Założono 5 płynnych hodowli mieszaniny szczepów z olejami jako jedynym źródłem węgla i energii w stężeniach: 2500, 5000, 7500, 10 000 i 15 000 mg/l. Wyniki przedstawione w tabeli 3 wskazują, że po 14 dniach hodowli bakterii na podłożu zawierającym 1000 mg/l olejów nastąpiło 100% jego usunięcie.

Ponieważ wiadomo z doświadczeń kontrolnych, że około 43% olejów ulega ulotnieniu możemy przyjąć, że bakterie rozkładają około 570 mg olejów. W hodowli zawierającej oleje w stężeniu 2500 mg/l usunięciu uległo tylko 59%. Zakładając podobny współczynnik parowania możemy sądzić, że bakterie zużyły około 400 mg olejów. W sumie oba czynniki; ulatnianie się i zużycie bakteryjne doprowadziły do usunięcia 1475 mg olejów. Wydaje się, że jest to górna granica możliwości usuwania olejów z hodowli przez badaną mieszaninę szczepów bakteryjnych. W hodowli z wyższymi stężeniami usuwanie olejów sukcesywnie rosło w liczbach bezwzględnych, ale równocześnie malało od 47 do 39%. Wartości te są zbliżone do współczynnika ulatniania (43%), co może wskazywać, że udział bakterii w rozkładzie olejów w tych hodowlach jest niewielki.

TABELA 3
 ZUŻYCIE OLEJÓW W HODOWLACH MIESZANINY SZCZEPÓW PO 14 DNIAH INKUBACJI

Stężenie olejów w podłożu (mg/l)	Stężenie olejów po 14 dniach hodowli (mg/l)	Ubytek olejów w hodowlach	
		(mg)	(%)
1000	0	1000	100
2000	1025	1475	59
5000	2350	2250	47
7500	4200	3300	44
10 000	5900	4100	41
15 000	9150	5850	39

5. Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:

- mieszanina szczepów bakteryjnych wykazuje większą aktywność biodegradacji olejów niż pojedyncze szczepy,
- oleje mogą być usuwane przez mieszaninę szczepów bakteryjnych w stężeniach do 1500 mg/l.

Literatura

1. Austin B., Calomiris J. J., Walker J. D., Colwell R. R., (1977), *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 60.
2. Bossert I., Bartha R., (1984), *The fate of petroleum in soil ecosystems*, in: *Petroleum Microbiology*, Ed. Atlas R. M., Macmillan Publ. Co., New York, 434.
3. Conney J. J., (1984), *The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems*, in: *Petroleum Microbiology*, Ed. Atlas R. M., Macmillan Publ. Co., New York, 399.
4. Cruden D. L., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2723.
5. Folsom B. R., Chapman P. J., Pritchard P. H., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1279.
6. Heitkamp M. A., Cerniglia C. E., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1968.
7. Jobson A., McLaughlin M., Cook F. D., Westlake D. W. S., (1974), *Appl. Microbiol.*, 27, 1082.
8. Keuth S., Rehm H. J., (1991), *Appl. Biotechnol.*, 34, 804.
9. Leahy G., Colwell R. R., (1990), *Microbiol. Rev.*, 54, 305.
10. Radehaus P. M., Schmidt S. K., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2879.
11. Rambeloarisoa E., Rontani J. F., Giusti G., Duvnjak Z., Bertrand J. C., (1984), *Mar. Biol.*, 83, 69.
12. Sigoillot J. C., Nguyen M. H., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1308.
13. Siruger M. E., Finnerty W. R., (1984), *Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes*, in: *Petroleum microbiology*, Ed. Atlas R. M., Macmillan Publ.Co., New York, 160.

Biodegradation of the oily fraction of petrochemical wastewaters isolated from oily soil

Summary

The paper deals with the possibility of the degradation of the oily fraction of petrochemical wastewaters by bacteria isolated from oily soil. It was found that among 19 isolated strains of soil bacteria utilizing oils those belonging to the genera *Arthrobacter* and *Pseudomonas* were most numerous. Other strains were classified as *Vibrio-Aeromonas*, *Anitratum* and *Flavobacterium*. Growth of the strains for 12 days in the presence of 1000 mg/l of oil used as sole carbon and energy source resulted in 80-90% reduction of petroleum products. When a mixture of all strains was used, the removal of oil was almost complete. Since in a control culture 43% of oil was removed, the isolated strains degrade at least 50% of the petroleum products. An increase in oil content to 2.5 g or above visibly slowed the biodegradation. It seems that to achieve high removal of oil by microbiological processes the concentration of petroleum products should not exceed 1-2 g/l.

Key words:

biodegradation, petrochemical wastewater, oily soil, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*.

Adres do korespondencji:

Ewa Bieszkiewicz, Zakład Mikrobiologii Środowiska, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Karowa 18, 00-324 Warszawa.