

# Mikrobiálna degradácia ropných uhľovodíkov v pôde

Daniel Kupka<sup>1</sup>

## Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in soil

The abilities of microorganisms to mineralize a wide range of pollutants are well known. Biological processes for the removal of crude oil hydrocarbons from environment are attractive because they consume less energy than conventional physico-chemical processes and offer possibilities for recycling chemicals in the framework of integrated system.

**Key words:** petroleum hydrocarbons biodegradation, soil bioremediation.

## Úvod

Eliminácia ropných látok zo životného prostredia pomocou mikroorganizmov je realizovaná vďaka tomu, že ropné uhľovodíky, podobne ako mnoho ďalších organických a anorganických, prírodných, alebo syntetických zlúčenín dokážu mikroorganizmy využívať pre svoj metabolizmus. Väčšinou sú to baktérie, avšak aj vláknité huby a kvasinky sú schopné štiepiť užšie, alebo širšie spektrum uhľovodíkov a využívať ich ako zdroj uhlíka, alebo energie. V podstate dnes nie je známy mikrobiálny kmeň, ktorý by bol schopný odbúrať celú škálu uhľovodíkov, prítomných napr. v surovej rope. Preto sa na ich degradácii podobne ako na kolobehu látok v prírode, podieľa skôr mikrobiálne spoločenstvo, než jediný druh mikrobov. Často produkt rozkladu jedného mikroorganizmu je substrátom pre ďalší druh, takže kompletná biochemická dráha degradácie je zabezpečená kombinovaným účinkom rozličných typov organizmov celej komunity.

Pretože život baktérií je striktné viazaný na vodné prostredie, všetky reakcie, na ktorých sa mikroorganizmy zúčastňujú prebiehajú vo vodných roztokoch a na rozhraniach (voda - plyn, voda - olej, voda - tuhá fáza, napr. povrch a póry pôdnych častíc). Vzhľadom na hydrofóbnosť a nízku rozpustnosť prevažnej väčšiny ropných produktov, významnú úlohu zohráva povrchový náboj a hydrofóbnosť bunecnej steny baktérií, ako aj prítomnosť surfaktantov. Prísun živín je limitovaný rýchlosťou ich difúzie v kvapalnej fáze. Pomalá difúzia v pôde zapríčiňuje zjavný lineárny rast baktérií. Pôdne baktérie sú adaptované na nízke koncentrácie živín. Pri zvýšenom prísune uhlíkatých zlúčenín, (akcidentálny výlev ropných látok) sa ostatné živiny, hlavne zdroje kyslíka, dusíka, fosforu a draslíka stávajú v dôsledku porušenia rovnováhy limitujúcimi. To môže spôsobiť zníženie výkonnosti degradácie uhlíkatého substrátu. Analýzou prvkového zloženia bakteriálnej biomasy (bunecnej hmoty) bolo zistené pomerné zastúpenie (Schonborn, 1986)

$$C : N : P : K = 50 : 10 : 4 : 1.$$

Pri aeróbnom odbúraní uhlíkatého substrátu sa 50 % uhlíka spotrebuje na tvorbu novej bakteriálnej masy a 50 % sa oxiduje na CO<sub>2</sub>. Ideálny pomer živín pri aeróbnom spracovaní bude teda:

$$C : N : P : K = 100 : 10 : 4 : 1.$$

V anaeróbných podmienkach sa 90 % degradovateľného uhlíka skonzumuje v energetickom metabolizme. Optimálny pomer živín bude v tomto prípade

$$C : N : P : K = 500 : 10 : 4 : 1.$$

Degradačná aktivita mikroorganizmov by teda mala byť podporená optimálnym zložením živín a ich rovnomerným rozmiestnením v celom objeme zeminy, či vody, čím sa zabezpečí homogenita prostredia a rovnomerný priebeh procesu degradácie. Mikrobiálne odbúranie uhľovodíkov môže

<sup>1</sup> RNDr. Daniel Kupka. Ústav geotechniky, Slovenská akadémia vied, Watsonova 45, 043 53 Košice  
(Recenzovali: Prof. Ing. František Špaldon, DrSc. a MVDr. Vladimír Kmet', DrSc. Revidovaná verzia doručená 23.10.1997)

prebiehať za aeróbnych aj anaeróbných podmienok. V prírode silne prevažujú aeróbne oxidačné procesy. Sú rýchlejšie a účinnejšie a využívajú sa pri cielej biodegradácii ropných látok.

### Izolácia mikroorganizmov s degradačnými schopnosťami

Prvým krokom biodegradačných projektov je získanie „obohatenej“ (enrichment) kultúry a následná izolácia čistých kmeňov s biodegradačnou schopnosťou. Získanie „obohatenej“ kultúry (zmesná kultúra s prevažným zastúpením daného kmeňa) je založené na jednoduchšej stratégii, použití selektívneho média, ktoré obsahuje príslušnú ropnú látku ako jediný zdroj uhlíka a energie. Médium uprednostňuje rast tých druhov mikroorganizmov, ktoré dokážu daný substrát využívať, t. j. rozkladať, odbúravať. Pre následnú izoláciu čistej kultúry navrhli Cook a spol. (Cook et al., 1983) nasledovný postup: Obohatená kultúra sa po príslušnom zriedení rozotrie po povrchu neselektívnej pevnej živnej pôdy, napr. na živný agar č. 1 (Imuna, Šarišské Michaľany, mäsopeptonový agar MPA). Vzorka každého jednotlivého typu z vyrastených kolónii sa preniesie do sterilného selektívneho tekutého média. Vzorky, u ktorých bol pozorovaný rast, sa opäť preočkujú na neselektívne platne. Ak si

po trojnásobnej procedúre v každom prípade kolónie zachovávajú identickú homogénnu morfológiu, kultúra sa považuje za čistú. Použitie neselektívneho média v tomto postupe dovoľuje detekciu kontaminantov, ktoré sú často prenesené spolu s predominantným kmeňom pri použití selektívnych platin.

Zloženie média môže významne ovplyvniť výsledok procedúry obohacovania kultúry.

Vo väčšine prípadov sa používajú také médiá a také podmienky inkubácie, pri ktorých sa selektujú aeróbne, heterotrófne, mezofilné mikroorganizmy s nízkymi požiadavkami na živiny. Za takýchto podmienok sú bežne izolované baktérie, patriace do rodov *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*. Inokulum sa najčastejšie berie z materiálu, ktorý bol dlhšiu dobu nepretržite exponovaný v prostredí, kde je prítomný skúmaný polutant vo vyšších koncentráciách (znečistené pôdy alebo voda, haldy, priemyselné odpady, atď.).

Vo väčšine prípadov sa izolácia žiadaného kmeňa z takéhoto prostredia ukázala ako úspešná. Prevažná časť sanačných postupov je založená na aeróbných oxidatívnych procesoch, pri mezofilných teplotných podmienkach. Aeróbná kultivácia mikróbov je taktiež relatívne jednoduchšia v porovnaní s anaeróbnymi kultivačnými technikami. To je jednou z príčin, prečo výsledkom selekcie sú väčšinou aeróbne baktérie, len zriedka ostatné organizmy, ako anaeróbne baktérie, kvasinky a huby, ktoré sú známe pomalším rastom. Práve tieto organizmy sa môžu vyznačovať novými degradačnými schopnosťami a v súčasnosti sú predmetom vedeckého bádania na celom svete. Adekvátnymi kultivačnými zmenami pri obohacovaní kultúry je možné tieto mikroorganizmy izolovať. Citlivejší selektívny tlak, ktorý je potrebný pre ich selekciu, sa dá vytvoriť napríklad v podmienkach kontinuálnej kultivácie (Leisinger et al., 1986).

### Biodegradácia ropných látok vo vzorke pôdy s reálnym ropným znečistením

Predmetom výskumu bolo overenie degradačných schopností vybraných bakteriálnych kmeňov na vzorke zeminy s reálnym znečistením. Mikroorganizmy boli izolované za účelom ich potenciálneho využitia pri sanácii zemín, znečistených ropnými látkami. Je všeobecne známe, že biodegradácia ropných uhľovodíkov prebieha v prírode aj bez umelých rekultivačných zásahov, vďaka aktivite všadeprítomných mikróbov. S cieľom intenzifikácie tohoto procesu sme testovali efekt prídavku bakteriálnych kmeňov s overenými degradačnými schopnosťami k pôvodnej autochtónnej mikroflore.

Vzorka znečistenej zeminy bola homogenizovaná a rozdelená do ôsmich samostatných sklenených nádob (akvárií), s označením V1 - V7 a K. Mikrobiologický rozbor ukázal koncentráciu buniek  $0,7 - 2 \cdot 10^9$  na gram pôdy. Pri 30 % vlhkosti to zodpovedá koncentrácii rádovo  $2 - 6 \cdot 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$  vody v pôde. Izolované boli baktérie, patriace do rodov *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, ďalej plesne a kvasinky. Chemický rozbor na prítomnosť ropných uhľovodíkov je uvedený v tabuľke 1.

Tab. 1. Chemický rozbor zeminy na vstupe (EKOLAB, Werferova 1, Košice).

Nepolárne extrahovateľné ropné látky NEL - UV	mg.kg <sup>-1</sup>	55 099
Nepolárne extrahovateľné ropné látky NEL - IC	mg.kg <sup>-1</sup>	16 562
Polyaromatické uhľovodíky PAU	mg.kg <sup>-1</sup>	3,783
Phenantren	mg.kg <sup>-1</sup>	0,211

Antracen	mg.kg <sup>-1</sup>	< 0,010
Chrysen	mg.kg <sup>-1</sup>	0,003
Benzo[b] fluor	ppm	0,001
Benzo[k] fluor	ppm	2,954

Pokračovanie tab. 1.

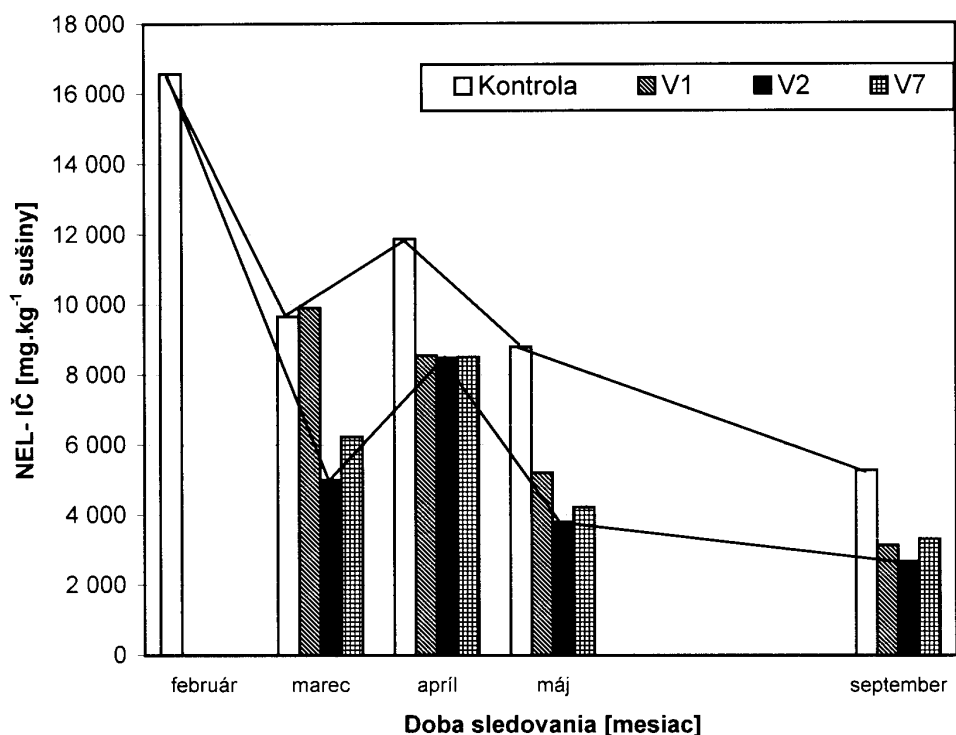
Dibenzoantracen	ppm	0,007
Benzopyrelen	ppm	0,087
Indenopyren	mg.kg <sup>-1</sup>	0,001

Pôda bola počas sanácie pravidelne zvlhčovaná a premiešavaná. Vzorky zeminy neboli sterilizované. Vo všetkých vzorkách bola teda zachovaná pôvodná autochtónna mikroflóra. Vlhkosť pôdy bola udržiavaná na hodnote 30 %. Pôda nebola sterilizovaná. Vo všetkých vzorkách bola teda zachovaná pôvodná autochtónna mikroflóra. Na vzorky s označením V1 - V7 boli aplikované preparáty bakteriálnych kmeňov, ktoré sú uvedené v tabuľke 2.

Tab.2. Zoznam bakteriálnych kmeňov, aplikovaných na príslušné vzorky pôdy.

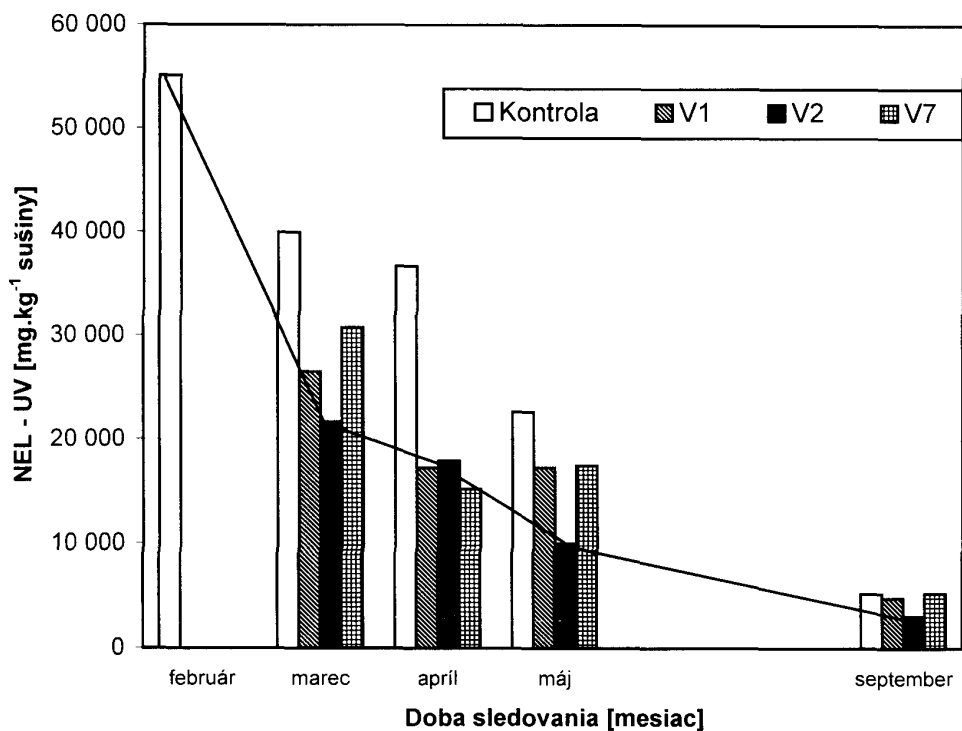
Označenie vzorky	aplikovaný mikroorganizmus
V1	Bacillus cereus
V2	Serratia marcescens
V3	Pseudomonas fluorescens
V4	Acinetobacter junii
V5	Pseudomonas putida
V6	Pseudomonas sp.
V7	Micrococcus varians
K	-

Pred aplikáciou na pôdu boli čisté kultúry mikroorganizmov namnožené v minerálnom médiu s glukózou v bankách s intenzívnym prevzdušňovaním. Zloženie média bolo nasledovné: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,56g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,27g, MgSO<sub>4</sub>· 7 H<sub>2</sub>O: 0,10g, NH<sub>4</sub>Cl: 2,0g, glukóza: 5,0g, destilovaná voda: 1000 ml. Vyrastené bakteriálne kultúry boli aplikované na príslušné vzorky v množstve 50 ml na 1 kg zeminy, čo zodpovedá približne 5 % vlhkosti pôdy. Vzorka s označením K slúžila ako kontrola bez prídavku bakteriálneho preparátu. Po aplikácii preparátu bol robený mikrobiologický a chemický rozbor pôd.



Obr.1. Priebek dekontaminácie ropných látok vo vzorkách pôdy (NEL metóda IČ-spektroskopie).

Počas desiatich až štrnástich dní po aplikácii bola zaznamenaná prevaha pomerného zastúpenia aplikovaných bakteriálnych kmeňov oproti zástupcom autochtónnej mikrofóry z kontrolnej vzorky. Priebek dekontaminácie bol monitorovaný osem mesiacov (február - október). Úbytok ropných látok analýzou nepolárnych extrahovateľných látok NEL metódou infračervenej IČ a ultrafialovej UV spektroskopie podľa ČSN 75 7952, vo vzorkách zeminy je znázornený na obr. 1 a 2.



Obr.2. Priebek dekontaminácie ropných látok vo vzorkách pôdy (NEL metóda UV-spektroskopie).

### Diskusia

Najvýraznejšie rozdiely v priebehu degradácie ropných látok medzi kontrolnou vzorkou a vzorkami zeminy, na ktoré boli aplikované preparáty vybraných kmeňov, môžeme pozorovať v prvých štyroch mesiacoch. V tomto časovom úseku bola rýchlosť odbúravania ropných látok najvyššia. Vo vzorke s označením V2 došlo po štyroch mesiacoch k zníženiu pôvodnej koncentrácie ropných látok približne o 75% pri stanovení nepolárnych extrahovateľných látok - NEL pomocou IČ aj UV spektroskopie. Približne po dvoch mesiacoch degradácie je zaujímavý pokles ropných látok NEL stanovených UV metódou a súčasný prudký nárast hodnôt NEL z IČ analýz. S postupujúcim priebehom dekontaminácie dochádza k zníženiu rozptylu hodnôt stanovených ropných látok medzi jednotlivými vzorkami V1 - V7, a k zníženiu rozdielov medzi kontrolnou vzorkou a vzorkami s aplikáciou preparátov. Pretože kompletná biologická degradácia ropných uhľovodíkov je realizovateľná skôr zmiešanou populáciou mikroorganizmov, než činnosťou jedného druhu mikroorganizmu, je potrebné v ďalšom priebehu proces intenzifikovať daným smerom.

### Záver

Výsledky laboratórnych výskumov a praktických skúseností, publikované v odbornej literatúre dokazujú, že biologický spôsob dekontaminácie ropného znečistenia je účinnou a ekonomicky výhodnou metódou, ktorá nemá nepriaznivý vplyv na životné prostredie. Okrem chemického dôkazu odstránenia ropných látok z prostredia, viaceré výskumné práce boli zamerané aj na posúdenie prípadného nepriaznivého vplyvu chemicky nedetekovateľných škodlivín na živé organizmy v kontaminovaných vzorkách zeminy a vôd v priebehu ich biologickej sanácie. Wang et al. (1990) stanovovali akútnu toxicitu a mutagenitu pôdy, znečistenej polyaromatickými uhľovodíkmi pomocou MIKROTOX - testu (King 1984) a AMES-ovho testu (Marcon et al., 1983). Po značnej počiatočnej mutagenite a toxicite sa znečistená pôda priblížila hodnotám pozadia (nekontaminovanej pôde) po 12 týždňoch biologickej sanácie.

### Literatúra

- Cook, A. M., Grossenbacher, H. & Hütter, R.: *Experientia* 1983, 39, p. 1191-1198.
- King, E.F. In: *Toxicity Screening Using Bacterial Systems*; Liu, D. L., Dutka, B. J., Eds.; Marcel Dekker; New York, 1984, 47, 763 pp.
- Leisinger, T. & Brunner, W.: Poorly degradable substances, Chapter 14. In: *Biotechnology Vol. 8*. H. J. Rehm and G. Reed Eds. VCH Publishers, Weinheim, 1986.
- Marcon, D. M. & Ames, O. M.: *Mutat. Res.* 1983, 113, 173.
- Schonbörn, W.: Historical Developments and ecological Fundamentals, Chapter 1. In: *Biotechnology Vol. 8*. H. J. Rehm and G. Reed Eds. VCH Publishers, Weinheim, 1986.
- Wang, X., Yu, X. & Bartha, R.: Effect of Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Soil. *Environ. Sci. Technol.*, 1990, 24, p. 1086-1089.