

Słowa kluczowe: ropa naftowa, węglowodory, bakterie glebowe, biodegradacja

Franciszek CZECHOWSKI*, Barbara KOŁWZAN**

BIODEGRADACJA ROPY NAFTOWEJ Z OTWORU RADOSZYN-1 PRZEZ MIKROORGANIZMY GLEBOWE

Bakterie glebowe wykazały sekwencyjność biodegradacji składników molekularnych ropy naftowej z otworu Radoszyn-1, zachodzącej w wodnej emulsji. Najwyższą podatność na biodegradację wykazują węglowodory prostolańcuchowe oraz jednopierścieniowe alicykliczne i aromatyczne zawierające podstawnik prostolańcuchowy. Wzrost liczby atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym prostym oraz wystąpienie w nim rozgałęzień łańcucha zmniejsza podatność składnika molekularnego na biodegradację. Wśród policyklicznych węglowodorów aromatycznych oraz polimetyloaromatycznych wzrost podatności na biodegradację wiąże się ze zmniejszaniem liczby podstawników metylowych oraz liczby pierścieni aromatycznych. Wielopierścieniowe węglowodory alicykliczne (terpeny) w warunkach doświadczenia wykazały brak podatności na biodegradację.

1. WSTĘP

Unieszkodliwianie zanieczyszczenia środowiska przyrodniczego ropą naftową, będącą mieszaniną wielu związków chemicznych, z których większość wykazuje niepożądane działanie na funkcjonowanie gleby oraz toksyczne działanie na organizmy żywe, stanowi ważny problem w ochronie środowiska. Szczególnie niebezpiecznymi jej składnikami są związki aromatyczne i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (np. o działaniu kancerogennym: benzen, benzo(a)piren) oraz niektóre metabolity ich rozkładu przez mikroorganizmy. Istotnym czynnikiem skutecznego usuwania zanieczyszczenia ropą naftową jest skrócenie czasu jej zalegania w środowisku, na który mają wpływ zjawiska o charakterze fizyczno-chemicznym jak i biologicznym. Kierunki chemicznych i mikrobiologicznych przekształceń składników ropy naftowej w środowisku gruntowo-wodnym są

* Wydział Nauk o Ziemi i Kształtowania Środowiska, Uniwersytet Wrocławski, ul. Cybulskiego 32, 50-205 Wrocław, e-mail: franciszek.czechowski@ing.uni.wroc.pl

** Wydział Inżynierii Ochrony środowiska, Politechnika Wrocławska, pl. Grunwaldzki 9, 50-377 Wrocław, e-mail: barbara.kolwzan@pwr.wroc.pl

uwarunkowane przebiegiem procesów odparowania, utleniania, rozpuszczania w wodach gruntowych i powierzchniowych, emulsyfikacji, dyspersji, sedymentacji czy adsorpcji. Ponadto zależą od stężenia i chemicznej budowy węglowodorów, temperatury, dostępności tlenu, stężenia biogennych związków azotu i fosforu, ilości i jakości drobnoustrojów. W tych procesach najważniejszym elementem skuteczności eliminacji zanieczyszczenia środowiska przyrodniczego ropą naftową jest biodegradacja. Efektywność biodegradacji jest związana, m. in., z dostępnością dla mikroorganizmów składników ropy naftowej oraz ich natury chemicznej, gdyż podatność na biodegradację tych składników jest zróżnicowana i uzależniona, między innymi, od długości łańcucha węglowodorowego oraz występowania w nim rozgałęzień bądź grup funkcyjnych, czy liczby pierścieni alicyklicznych lub aromatycznych w związkach wielopierścieniowych.

Praca niniejsze prezentuje wyniki badań kolejności biorozkładu składników molekularnych krajowej ropy naftowej z otworu Radoszyn-1 przez mikroorganizmy głębokie w warunkach wodnej emulsji ropy naftowej.

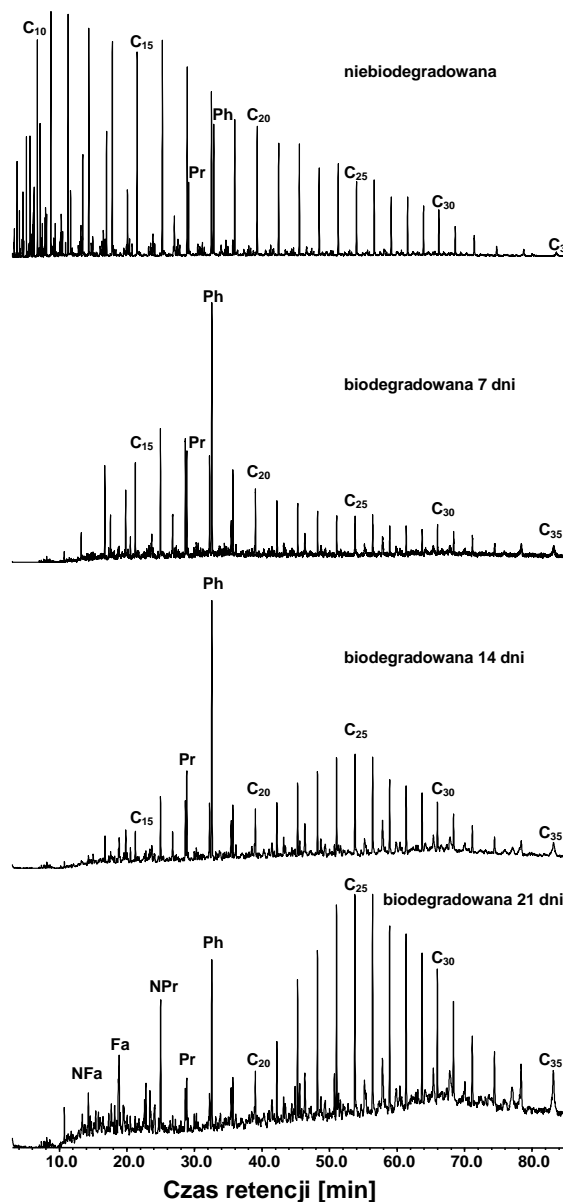
2. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Ropa naftowa do badań pochodzi z utworów dolomitu głównego otworu Radoszyn-1 k. Świebodzina. Do biodegradacji służyły naturalnie wyselekcjonowane autochtoniczne bakterie zachowane w powierzchniowej glebie gliniastej z rejonu Nowego Kisielina, zanieczyszczonego w latach 70-tych ubiegłego stulecia ropą naftową. Wyciąg wodny z badanej glebowy w ilości 1 litra, otrzymany zgodnie z normą DIN 38414, wzbogacono w składniki biogenne (KH_2PO_4 - 1,56 g, Na_2HPO_4 - 2,13 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ - 0,02 g), ropę naftową (1%mas.) oraz Tween 80 (500 mg). W tak przygotowanej hodowli liczebność bakterii degradujących węglowodory, oznaczona metodą najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL), wynosiła $110 \cdot 10^5$ komórek w 1 mL. Hodowlę podzieloną na trzy równe próbki inkubowano w temperaturze 20 ± 2 °C odpowiednio przez 7, 14 i 21 dni.

Hodowle po inkubacji ekstrahowano n-heksanem i po zateżeniu rozpuszczalnika do objętości 1 mL analizowano składniki węglowodorowe przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią mas. Rozdziału węglowodorów dokonano przy użyciu chromatografu HP 5890 używając kolumny kapilarnej HP-5 (średnica wewnętrzna 0.32 mm, grubość filmu fazy aktywnej 0.25 μm , ogrzewana od 25 do 290°C z narostem temperatury 3 °C/min i czasie przytrzymania w końcowej temperaturze przez 30 min) o długości 30 m. Detekcję rozdzielanych składników prowadzono przy użyciu quadropola masowego 5971A pracującego przy energii jonizacji 70 eV, a skład poszczególnych grup związków określono na podstawie ekstrakcji selektywnych jonów m/z z całkowitego chromatogramu masowego TIC.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przebieg biodegradacji ropy naftowej Radoszyn-1 przez bakterie glebowe oceniono na podstawie jakościowo-ilościowych zmian składu molekularnego analizowanych grup związków. Dominującą grupą związków w analizowanej ropie naftowej stanowiły homologi $C_9 - C_{35}$ n-alkanów z dominacją homologu C_{12} . Rys. 1 ilustruje zmiany w składzie molekularnym n- i izoalkanów po biodegradacji odpowiednio przez okres 7, 14 i 21 dni. Już po upływie 7 dni zbiodegradowana została główna ilość n-alkanów z preferencją składników niskomolekularnych. Izoalkany tj. pristan (Pr) i fitan (Ph) po tym czasie zostały naruszone tylko w niewielkim stopniu i są dominującymi składnikami pozostałej części analizowanej grupy związków. Zarysowany kierunek zmian pogłębia się po 14 dniach biodegradacji, która spowodowała znaczne usunięcie n-alkanów średniomolekularnych $C_{14} - C_{20}$ oraz zaznaczyła początek szybszej biodegradacji Pr od Ph. Po upływie 21 dni biodegradacji praktycznie zanikły średniomolekularne homologi n-alkanów oraz, przy ich braku, znacząco pogłębiła się biodegradacja izoalkanów Pr i Ph. n-Alkany wysokomolekularne (homologi powyżej C_{25}) ulegają utrudnionej biodegradacji.

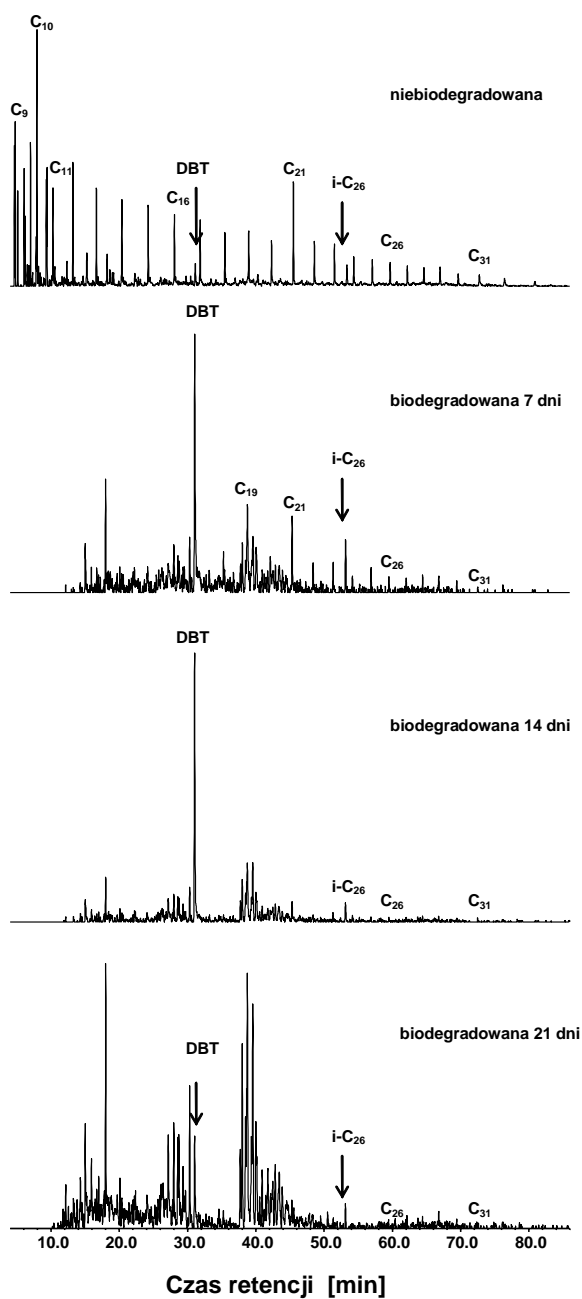


Rys. 1. Zmiany składu n- i izoalkanów w procesie biodegradacji ropy naftowej Radoszyn-1.

Legenda: 'x' przy C_x opisuje ilość węgla w łańcuchu n-alkanu, NFa – norfarnezan, Fa – farnezan, NPr – norpristan, Pr – pristan, Ph – fitan.

Ocena ilościowa postępu biodegradacji n-alkanów wskazuje, że po upływie kolejno 7, 14 i 21 dni zbiodegradowanych zostało 85, 93 i 97% ich początkowej masy. Podobnie jak dla n-alkanów, szybki przebieg biodegradacji obserwowano dla, n-alkilocykloheksanów, których zawartość w ropie naftowej jest niewielka. Po 7 dniach procesu pozostały tylko ślady ich wysokomolekularnych homologów, a po 14 dniach biodegradacji nastąpił całkowity zanik (ilustracji nie zamieszczono w tekście).

Przebieg biodegradacji n- i izoalkilobenzenów zilustrowano odpowiednimi chromatogramami masowymi na rys. 2. Ich dystrybucja w wyjściowej ropie naftowej charakteryzuje się dominacją składników niżej molekularnych i podwyższoną koncentracją homo-logu C_{21} w odniesieniu do najbliższych odpowiedników C_{20} i C_{22} . Omawiany chromatogram masy zawiera także pik jonu fragmentacyjnego dibenzotiofenu (DBT) oraz składnik zawierający podstawnik izoprenoidowy tj. fitanylobenzen ($i-C_{26}$). Szybkie zbiodegradowanie tej grupy związków nastąpiło już po 7 dniach procesu. Oporniejszymi składnikami na biodegradację okazały się nieparzystowęglowe homologi C_{19} i C_{21} oraz fitanylobenzen, co jest zgodne z obserwacjami dla izoalkanów.

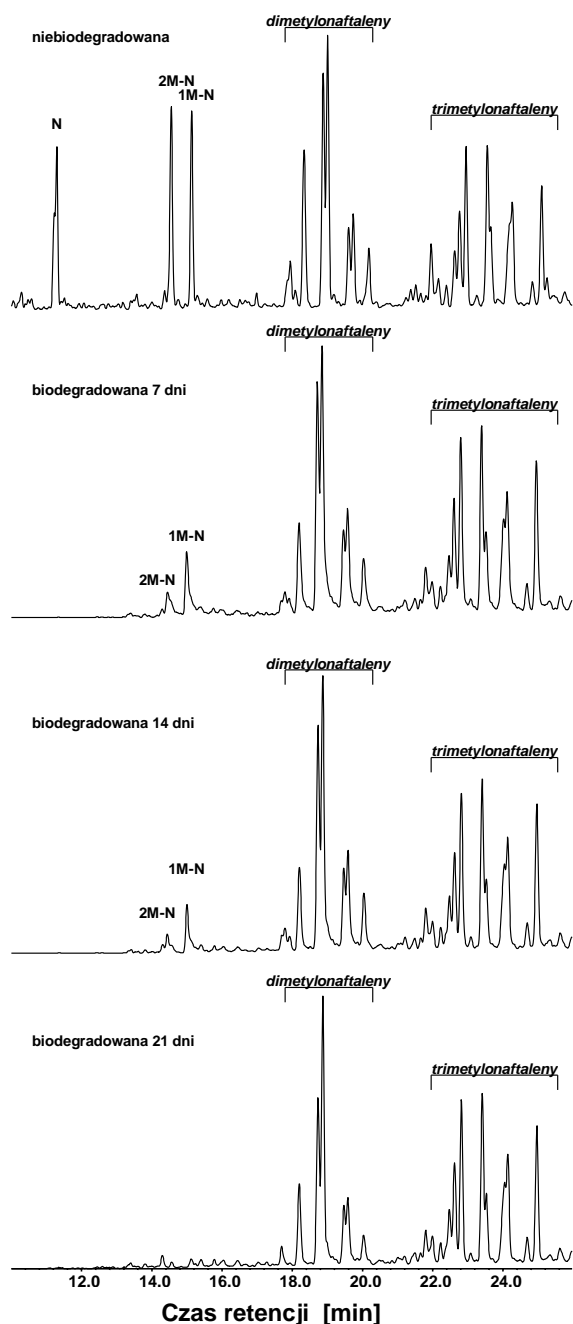


Rys. 2. Zmiany składu n- i izoalkilobenzenów w procesie biodegradacji ropy naftowej Radoszyn-1.

Legenda: indeks 'x' przy C_x opisuje całkowitą ilość węgla w alkilobenzenie, DBT – dibenzotiofen.

Podatność na biodegradację wielopierścieniowych związków aromatycznych oraz ich polimetylopo pochodnych przedstawiono, na przykładzie naftalenu oraz metylo- (M-N-y), dimetylo- i trimetylonaftalenów, rys. 3. Równoległe z efektywną biodegradacją n-alkanów oraz n-alkilocykloheksanów i n-alkilobenzenów przebiegała szybka degradacja niepodstawionego grupą metylową naftalenu, którego całkowity zanik nastąpił po 7 dniach procesu. W tym czasie zbiodegradowane znacząco zostały M-N-ny, spośród których biodegradacja 2M-N przebiegała szybciej od 1M-N. Zanik M-N-ów nastąpił dopiero po upływie 21 dni procesu. Pochodne naftalenu podstawione większą ilością grup metylowych tj di- oraz szczególnie trimetylonaftaleny uległy w tym czasie biodegradacji w bardzo niewielkim stopniu.

Trójpierścieniowe odpowiedniki powyższych związków jak DBT (rys. 2) oraz fenantren i ich polimetylopo pochodne były jeszcze bardziej odporne na rozkład z udziałem bakterii od odpowiedników naftalenowych. Częściowa biodegradacja DBT oraz fenantrenu (w tekście ilustracji chromatogramów nie zamieszczono) nastąpiła dopiero po 14 dniu procesu, przy nienaruszonych lub naruszonych w bardzo niewielkim stopniu ich polimetylopo pochodnych.



Rys. 3. Zmiany składu naftalenu (N), metylo- (M-N), dimetylo- i trimetylonaftalenów w procesie biodegradacji ropy naftowej Radoszyn-1.

Przeprowadzone badania nie wykazały przebiegu biodegradacji dwucyklicznych seskwiterpenów oraz pięciocyklicznych triterpenów występujących w ropie naftowej Radoszyn-1.

4. PODSUMOWANIE

Badania biodegradacji ropy naftowej z otworu Radoszyn-1 z przy użyciu bakterii glebowych potwierdziły, opisaną dla innych rop naftowych [1–3], sekwencyjność rozkładu jej składników. Stwierdzona podatność węglowodorów na biodegradację maleje w kierunku: *n-alkany* > *n-alkilocykloheksany* + *n-alkilobenzeny* > *izoalkany* + *izoalkilobenzeny* ≥ *rdzeniowe węglowodory aromatyczne* + *rdzeniowe węglowodory aromatyczne zawierające siarkę* > *rdzeniowe węglowodory aromatyczne podstawione grupami metylowymi (alkilowymi)* > *wielopierścieniowe węglowodory alicykliczne (dwucykliczne seskwiterpeny i pięciocykliczne triterpeny)*. W obrębie danej grupy związków biodegradacja jest bardziej efektywna dla składników niżejcząsteczkowych oraz wśród polimetylopo pochodnych węglowodorów aromatycznych zawierających mniejszą liczbę pierścieni aromatycznych i podstawników metylowych (alkilowych). Uzyskane wyniki są użyteczne w rozwiązywaniu problemów zanieczyszczenia środowiska przyrodniczego ropą naftową.

LITERATURA

- [1] Fedorak, P.M., Westlake, D.W.S. 1981. Degradation of aromatics and saturates in crude oil by soil enrichments. *Water Air Soil Pollut.* 16: 367–375.
- [2] Atlas, R.M., Bartha, R. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Adv. Microb. Ecol.* 12: 287–338.
- [3] Oudot J., Merlin F.X. and Pinvidic P. 1998. Weathering Rates of Oil Components in a Bioremediation Experiment in Eustarine Sediments. *Marine Environmental Research.* 45: 113–125.

BIODEGRADATION OF PETROLEUM FROM RADOSZYN-1 BOREHOLE BY SOIL MICROORGANISMS

The stepwise biodegradation of petroleum from Radoszyn-1 borehole using naturally selected bacteria isolated from soil, which was contaminated with petroleum 30 years ago, revealed order of susceptibility of various biomarker classes to the process in water emulsion. Highly susceptible are chained hydrocarbons: *n*-alkanes, *n*-alkylcyclohexanes and *n*-alkylbenzenes. Their low molecular-weight constituents are more susceptible than their high molecular-weight homologs. Isoprenoids are more resistant to biodegradation while dicyclic sesquiterpanes and pentacyclic triterpanes revealed no evidence of biodegradation in performed process. Among polyalkyl aromatic compounds susceptibility to biodegradation increases with decreasing number of aromatic rings and alkyl substituents.