

## BIODEGRADACJA WYBRANYCH PRODUKTÓW NAFTOWYCH W ZMIENNYCH WARUNKACH TEMPERATURY I PH ŚRODOWISKA

Małgorzata Hawrot-Paw

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny

**Streszczenie.** W pracy badano podatność wybranych produktów naftowych na rozkład przy udziale wyselekcjonowanych szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* sp. i *Bacillus* sp. Doświadczenia prowadzono na płynnych podłożach hodowlanych. Stwierdzono, że badane produkty wykazywały zróżnicowaną podatność na biodegradację – maksymalne wartości mieściły się w zakresie od 65% dla oleju przekładniowego, poprzez 87% dla oleju napędowego, do 91% dla oleju silnikowego po 28 dniach inkubacji. Wyniki badań wskazują na wysoce istotny wpływ czynników środowiska: temperatury i pH, na szybkość i efektywność przebiegu procesu biodegradacji. Optymalne warunki dla badanych produktów to odczyn środowiska w zakresie 6,5–8 oraz temperatura 10–25°C.

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, mikroorganizmy, produkty ropopochodne

### WSTĘP

Mikrobiologiczny rozkład węglowodorów w środowisku związany jest z szeregiem fizycznych i chemicznych czynników takich jak stężenie i struktura chemiczna skażenia, właściwości fizyko-chemiczne gleby, zawartość soli biogennych, wilgotność, dostępność tlenu, zawartość związków organicznych oraz temperatura i pH gleby.

Temperatura wpływa na fizyczne i chemiczne właściwości składników oleju, na tempo metabolizowania węglowodorów przez mikroorganizmy oraz na skład ich populacji [Atlas 1981]. Optymalna temperatura dla biodegradacji węglowodorów ropopochodnych wynosi 25–30°C [Fu i in. 1996, Eriksson i in. 1998], przy czym proces ten może zachodzić w temperaturze 0°C [Traxler 1973 za Atlas 1981], a nawet przy 75°C [Chen i Taylor 1997]. Niskie temperatury powodują zmniejszenie rozpuszczalności węglowodorów i obniżają szybkość działania enzymów [Zhou i Crawford 1995], natomiast temperatury zbyt wysokie zwiększają aktywność węglowodorów w stosunku do błon komórkowych bakterii, a tym samym powodują wzrost ich toksyczności [Bossert i Bartha 1984].

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr Małgorzata Hawrot-Paw, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, e-mail: [Malgorzata.Hawrot-Paw@zut.edu.pl](mailto:Malgorzata.Hawrot-Paw@zut.edu.pl).

Odczyn środowiska wpływa na szybkość i kierunek procesów biologicznych w glebie [Turek-Szytów i in. 1998]. Jak podaje Siuta [1993], mikroorganizmy rozkładające węglowodory wymagają środowiska o pH 6,0–9,9, przy czym optymalny zakres wynosi 6,5–7,5. Jest to odczyn sprzyjający rozwojowi bakterii, które odgrywają zasadniczą rolę w procesie biodegradacji, a ograniczający wzrost grzybów. Bakteryjny szlak rozkładu jest stosunkowo szybki, efektywny i bezpieczny, w przeciwieństwie do biodegradacji przy udziale grzybów, w wyniku której mogą pojawiać się szkodliwe, biologicznie czynne formy epoksydowe [Maliszewska-Kordybach 1987, Cerniglia 1992].

W prezentowanej pracy badano wpływ wybranych czynników środowiska (temperatury i pH) na efektywność rozkładu różnych produktów ropopochodnych przy udziale mikroorganizmów aktywnych w procesie ich biodegradacji.

## MATERIAŁ I METODY

W badaniach użyte zostały trzy produkty naftowe: olej napędowy pobrany z dystrybutora stacji paliw, olej silnikowy (Mobil Super) o klasie lepkości API SJ/CF (SAE 15W/40) wyprodukowany przez Mobil Oil Corporation oraz olej przekładniowy (Hipol) o klasie lepkości API GL5 (SAE 85W/90).

W doświadczeniach wykorzystano trzy szczepy bakterii wyizolowane z gleb skażonych produktami ropopochodnymi. Przydatność tych szczepów – oznaczonych jako BS 101 (*Pseudomonas* sp.), BS 126 i BS 135 (*Bacillus* sp.) – pod kątem ich zastosowania w procesie biodegradacji oleju napędowego została oceniona i opisana we wcześniejszej publikacji [Hawrot i Nowak 2003].

Doświadczenie prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 300 ml, zawierających 50 ml pożywki mineralnej o składzie ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 4,35,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,7,  $\text{MgSO}_4$  – 0,2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 2,1,  $\text{MnSO}_4$  – 0,05,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,01,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,03, plus woda destylowana – 1000  $\text{cm}^3$ , oraz 2500 mg badanego produktu ropopochodnego. Hodowle z pożywką o pH 5, 6,5 oraz 8 inkubowano w temperaturze 5°C, 25°C i 35°C. Pożywki zaszczerpiono 48-godzinnym inokulum bakteryjnym. Pożywka nieszczerpiona stanowiła kontrolę. Dla wszystkich kombinacji przygotowano trzy powtórzenia. Doświadczenie prowadzono w okresie 28 dni. W odstępach 7-dniowych wykonywano analizy chemiczne – pomiar pozostałości olejów w podłożu hodowlanym.

Zawartość produktów naftowych w podłożu oceniano po ekstrakcji pentanem. W tym celu do 50 ml pożywki umieszczonej w rozdzielaczu o pojemności 500 ml dodawano 200 ml pentanu i całość wytrząsano przez 15 min. Rozdzielacz pozostawiano do momentu rozdzielenia faz. Po rozwarstwieniu fazę pentanową przesączano przez bezwodny siarczan sodowy ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), a następnie odparowywano w aparacie Kudern-Danisha w temperaturze 60°C. Pozostały po odparowaniu pentanu olej oznaczano wagowo. Przy obliczaniu wyników uwzględniono straty substratu w wyniku procesów abiotycznych w próbach kontrolnych – nieszczerpionych.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując program komputerowy Statistica ver. 5.1. Przygotowano wieloczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ .

## WYNIKI

Analiza statystyczna wykazała wysoce istotny wpływ temperatury i pH środowiska na szybkość biodegradacji produktów ropopochodnych w stosunku do wszystkich badanych szczepów (tab. 1).

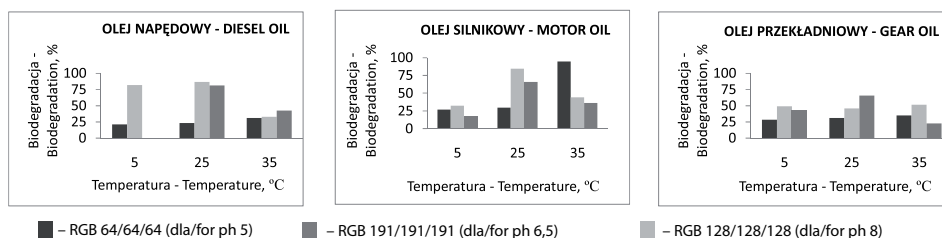
Tabela 1. Wyniki statystycznej analizy dla biodegradacji produktów ropopochodnego  
Table 1. Results of statistical analysis for the biodegradation of selected petroleum products

Czynnik nr Factor	Liczba stopni swobody Number of independent variables	Średnia $\Sigma$ kwadratów Mean square sum	Liczba stopni swobody błędu Number of independent variables for error	Średnia kwadratów błędu Mean square sum for error	Wartość F F value	Wartość $p \leq 0,05$ $p$ value $p \leq 0.05$
Factor						
Szczep BS 101 – Strain BS 101						
1	2	17,93453	54	0,007302	2456,036	0,00
2	2	9,17461	54	0,007302	1256,413	0,00
3	2	3,31458	54	0,007302	453,913	0,00
1:2	4	13,69246	54	0,007302	1875,108	0,00
1:3	4	8,25864	54	0,007302	1130,975	0,00
2:3	4	9,22760	54	0,007302	1263,670	0,00
1:2:3	8	3,20315	54	0,007302	438,655	0,00
Szczep BS 126 – Strain BS 126						
1	2	15,17778	54	0,093739	161,9149	0,00
2	2	8,70679	54	0,093739	92,8831	0,00
3	2	47,81585	54	0,093739	510,0940	0,00
1:2	4	2,97806	54	0,093739	31,7696	0,00
1:3	4	3,10232	54	0,093739	33,0952	0,00
2:3	4	12,82005	54	0,093739	136,7628	0,00
1:2:3	8	2,48025	54	0,093739	26,4590	0,00
Szczep BS 135 – Strain BS 135						
1	2	20,64211	54	0,139069	148,4307	0,00
2	2	4,99387	54	0,139069	35,9093	0,00
3	2	25,14980	54	0,139069	180,8441	0,00
1:2	4	2,29964	54	0,139069	16,5360	0,00
1:3	4	1,84273	54	0,139069	13,2504	0,00
2:3	4	10,82272	54	0,139069	77,8227	0,00
1:2:3	8	2,14430	54	0,139069	15,4190	0,00

Czynniki: 1 – pH, 2 – temperatura, 3 – rodzaj produktu ropopochodnego.

Factors: 1 – pH, 2 – temperature, 3 – kind of petroleum products.

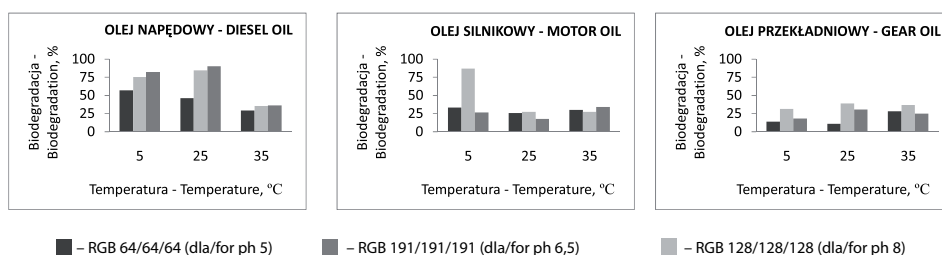
Najwyższy stopień – 86,53%, biodegradacji oleju napędowego w hodowli ze szczepem BS 101 oznaczono w temperaturze 25°C, przy pH 6,5 (rys. 1). Poziom biodegradacji oleju silnikowego, zależnie od temperatury oraz zastosowanego pH, mieścił się w granicach 18–95%; najwyższą wartość (94,87%) oznaczono w temperaturze 5°C, przy pH 6,5. W przypadku oleju przekładniowego Hipol biodegradacja przy pH 5 przebiegała słabo, natomiast przy pH 6,5, niezależnie od temperatury, była wyższa średnio o 47–72%. Przy pH 8 biodegradacja przebiegała najintensywniej w temperaturze 25°C. W tych warunkach oznaczono ponad 65-procentowy ubytek oleju w podłożu.



Rys. 1. Efekt biodegradacji produktów naftowych przy udziale szczepu BS 101

Fig. 1. Biodegradation of petroleum products with the participation of strain BS 101

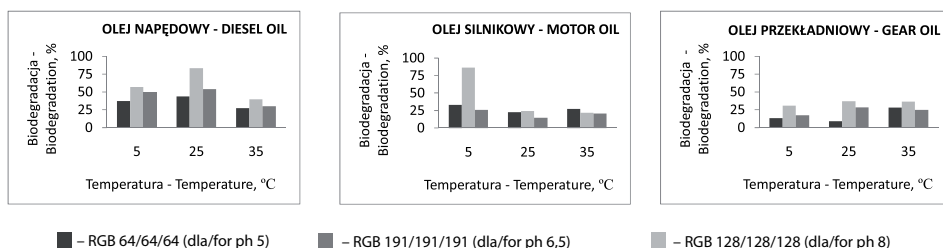
W hodowli ze szczepem BS 126 najwyższy stopień biodegradacji oleju napędowego – 89,92%, stwierdzono w kombinacji 25°C i pH 8 (rys. 2). W przypadku oleju silnikowego największe zmiany obserwowano przy pH 6,5. W temperaturze 5°C i przy pH 6,5 po 28 dniach inkubacji biodegradacji uległo niemal 87% substratu. Największe zmiany w zawartości oleju przekładniowego w hodowli ze szczepem BS 126 określono dla temperatury 25°C i pH 6,5 – wyniosły one 38,79%.



Rys. 2. Efekt biodegradacji produktów naftowych przy udziale szczepu BS 126

Fig. 2. Biodegradation of petroleum products with the participation of strain BS 126

Biodegradacja oleju napędowego przez szczep BS 135 najbardziej efektywnie przebiegała w temperaturze 25°C i przy pH 6,5 (rys. 3). Najwyższy ubytek oleju silnikowego stwierdzono w 5°C i przy pH 6,5 – 86,35% po 28 dniach inkubacji. W pozostałych kombinacjach – poza 5°C oraz pH 5 – niezależnie od stosowanej temperatury i odczynu podłoża, biodegradacja oleju nie przekroczyła 33%. Olej przekładniowy ulegał biodegradacji w niewielkim stopniu – maksymalnie było to ok. 36,79% w temperaturze 25°C przy pH 6,5.



Rys. 3. Efekt biodegradacji produktów naftowych przy udziale szczepu BS 135  
 Fig. 3. Biodegradation of petroleum products with the participation of strain BS 135

## DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że produkty ropopochodne stanowiące substrat w procesie biodegradacji wykazują zróżnicowaną podatność na rozkład. Niezależnie od szczepu bakterii, rozkładowi w największym stopniu ulegały olej napędowy – w zakresie 21–90%, oraz olej silnikowy – w zakresie 14–95%. Najmniejszy ubytek substratu odnotowano w hodowlach z olejem przekładniowym Hipol; maksymalna biodegradacja, w hodowli ze szczepem BS 101, wynosiła tu ok. 65%, natomiast dla szczepu BS 126 było to maksymalnie 39%, a dla BS 135 – 37%. Liczni autorzy [Furdyn i Kawala 1996, Śliwka i in. 1997, Łebkowska i in. 1997, Kołwzan i in. 1997, Bieszkiewicz i in. 1999, Sztompka 1999] podatność na biodegradację wiążą z budową chemiczną i masą cząsteczkową węglowodorów wchodzących w skład produktów naftowych, inni zaś [Neryng 1976] łączą to ze specyficznością substratów mikroorganizmów wobec różnych węglowodorów. Rozkład przy udziale mikroorganizmów stanowi więc wypadkową między właściwościami chemicznymi substancji ropopochodnych a swym systemem enzymatycznym danego szczepu.

Wyniki badań prezentowanych w niniejszej pracy wskazują na wysoce istotny wpływ czynników środowiska: temperatury i pH, na szybkość i efektywność przebiegu procesu biodegradacji. Takie wnioski prezentują również inni autorzy [Atlas 1981, Bossert i Bartha 1984, Turek-Szytów i in. 1998, Bieszkiewicz i in. 1999, Sztompka 1999]. Optymalne warunki biodegradacji odnotowano w zakresie temperatur 5–25°C przy pH 6,5–8. Istotny wpływ na uzyskane wyniki mogła mieć m.in. zmiana parametrów fizycznych badanych produktów naftowych inkubowanych w różnych temperaturach.

Efektywna biodegradacja w 5°C – podobnie jak w badaniach Margesin i Schinnera [1997] – oznacza, że odpowiednio dobrane mikroorganizmy mogą rozkładać produkty ropopochodne w warunkach, które wykraczają poza przyjęty przez większość autorów zakresem 20–30°C [Siuta 1993, Zhou i Crawford 1995, Fu i in. 1996, Demque i in. 1997]. Zakres pH 6,5–8 wyznaczony w doświadczeniu jako optymalny dla przebiegu procesu biodegradacji, odpowiada wartościom podawanym również przez Siutę [1995].

## WNIOSKI

1. W zależności od warunków środowiska oraz rodzaju zastosowanego szczepu olej napędowy ulegał biodegradacji średnio w 20–87%, olej silnikowy w 14–91%, a olej przekładniowy Hipol w 7–65%. Produkty ropopochodne różnią się zatem podatnością

- na biodegradację przy udziale wyspecjalizowanych mikroorganizmów, które mogą wykorzystywać zawarte w nich węglowodory jako jedyne źródło węgla i energii.
2. Temperatura i pH środowiska, w którym przebiega biodegradacja substancji ropopochodnych, w istotny sposób wpływały na jej efektywność. Na ogół optymalne warunki biodegradacji dla olejów napędowego i przekładniowego to temperatura 25°C i pH 6,5; dla olej silnikowego jest to temperatura 5°C, przy takim samym pH 6,5.

## PIŚMIENNICTWO

- Atlas R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.*, 45(1), 180–209.
- Bieszkiewicz E., Pakuła A., Boszczyk-Maleszak H., Mycielski R., 1999. Badania nad rozkładem frakcji olejowej pochodzącej z mechanicznej oczyszczalni ścieków rafineryjno-petrochemicznych przez szczepy bakterii wyizolowane z osadu czynnego. *Mat. VI Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. Biotechnologia Środowiskowa*, w ramach I Kraj. Kongr. Biotechnol. Wrocław, 23–24 września 1999, 39–46.
- Bossert I., Bartha R., 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. *Petroleum Microbiology* New York.
- Cerniglia C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351–368.
- Chen C.-I., Taylor R.T., 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 121–128.
- Demque D.E., Biggar K.W., Heroux J.A., 1997. Land treatment of diesel contaminated sand. *Can. Geotech. J.* 34, 421–431.
- Eriksson M., Swartling A., Dalhammar G., 1998. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 129–134.
- Fu C., Pfanstiel S., Gao C., Yan X., Govind R., 1996. Studies on contaminant biodegradation in slurry, water and compacted soil tube reactors. *Environ. Sci. Technol.* 30, 743–750.
- Furdyn G., Kawala Z., 1996. Odnowa zanieczyszczonych gruntów metodami *in situ*. *Ochr. Śr.* 2(61), 27–34.
- Hawrot M., Nowak A., 2003. Evaluation of microorganism activity in a process of diesel fuel biodegradation during culturing under laboratory conditions. *Pol. J. Nat. Sci.*, 15, 619–627.
- Koźwzan B., Traczewska T., Piekarska K., Juchniewicz M., 1997. Mikrobiologiczna ocena możliwości bioremediacji gruntów skażonych produktami naftowymi. *Mat. V Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. Biotechnologia środowiskowa. Ustroń Jaszowiec*, 10–12 grudnia 1997, 11–16.
- Lebkowska M., Muszyński A., Sztompka E., Karwowska E., Miałkiewicz E., 1997. Mikrobiologiczne oczyszczanie gruntów ze składników ropopochodnych. *Mat. I Konf. Nauk.-Tech. Technologie odolewania gruntów, odpadów, ścieków. Gorlice – Wysowa Zdrój*, 115–118.
- Maliszewska-Kordybach B., 1987. Mikrobiologiczne przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym. *Post. Mikrobiol.* 26(3), 233–248.
- Margesin R., Schinner F., 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 462–468.
- Neryng A., 1976. Metabolizowanie węglowodorów przez drobnoustroje. *Post. Mikrobiol.* 15(1), 57–69.
- Siuta J. 1993. Podstawy biodegradacji ropopochodnych składników w glebach i w odpadach. [W:] *Biodegradacja ropopochodnych składników w glebach i w odpadach*. Red. J. Siuta. *Inst. Ochr. Śr. Warszawa*, 9–22.
- Siuta J., 1995. Gleba, diagnozowanie stanu i zagrożenia. *Inst. Ochr. Śr. Warszawa*.

- Sztompka E., 1999. Biodegradacja oleju napędowego w gruncie. Mat. VI Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. Biotechnologia środowiskowa, w ramach I Kraj. Kongr. Biotechnol. Wrocław, 23–24 września 1999, 243–252.
- Śliwka E., Kałuzińska I., Kołwzan B., Surygała J., 1997. Badania podatności olejów napędowych na biodegradację. Mat. I Konf. Nauk.-Techn. Technologie odolejania gruntów, odpadów i ścieków. Gorlice – Wysowa Zdrój, 97–102.
- Turek-Szytow J., Popławska M., Miksch K., 1998. Wpływ oleju antracenowego na właściwości fizyko-chemiczne gleby. Mat. Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. Bioremediacja gruntów. Wisła Bukowa, 8–11 grudnia 1998, 107–116.
- Zhou E., Crawford R.L., 1995. Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. Biodegradation 6, 127–140.

## BIODEGRADATION OF SELECTED PETROLEUM PRODUCTS UNDER VARIABLE ENVIRONMENTAL TEMPERATURE AND PH CONDITIONS

**Abstract.** In the paper is presented the biodegradability of selected petroleum products with the participation of selected bacterial strains of the genera *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.* The experiment was carried out on liquid culture media. The examined products were found to show different biodegradability, with maximum value ranging from 65% for gear oil, through 90% for diesel fuel to 95% for motor oil after 28 days of incubation. The study results point to highly significant effect of environmental factors, i.e. temperature and pH, on the speed and efficiency of the course of biodegradation process, with optimal conditions for the examined products being within the range of 6.5–8 for pH and 5–25°C for temperature.

**Key words:** biodegradation, microorganisms, oil products

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 1.07.2010*