

STUDIU PRIVIND BIODEGRADABILITATEA PRODUSELOR PETROLIERE FOLOSIND UNELE TULPINI MICROBIENE

Dana-Camelia COCUȚ¹,
Mariana DIACONU¹, C. COJOCARU¹,
M. MACOVEANU¹

¹ Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" Iași, Facultatea
de Inginerie Chimică și
Protecția Mediului,
e-mail: *adomnicaic@yahoo.com

The authors studied the possibility of decontamination of some soils polluted with petroleum products so as to obtain performante strains, which shall be applied in a final phase, in an experimental field through bioaugmentation method. The paper analyzes the capacity of biodegradation of diesel fuel by some microbial strains isolated and purified from a soil contaminated with petroleum products. These strains have been internal cultivated, on liquid medium with synthetic formula, with diesel fuel as unique carbon source. The biodegradation potential of petroleum products by selected microorganisms was established, and superior strains were identified.

Key words: bioaugmentation, biodegradation, inoculum.

În prezent și în România, gospodărirea și asigurarea unor condiții de calitate bune a solurilor, a devenit o problemă majoră în contextul alinierii țării noastre la standardele și cerințele impuse pe plan mondial. De asemenea, poluarea solului cu produse petroliere, face parte din cele mai evidente probleme de mediu cu care se confruntă România în ultimii ani, având în vedere ritmul tot mai accelerat și intensiv de folosire a acestor substanțe pentru satisfacerea nevoilor de echitate și de energie.

Metodele convenționale de depoluare a solurilor contaminate cu produse petroliere se aplică cu succes la scară internațională, însă, majoritatea prezintă următoarele inconveniente: generarea unor efluenți lichizi sau gazoși ce necesită o tratare/depozitare suplimentară, perioade mari de operare, dificultăți de monitorizare și control, costuri ridicate de capital și operare.

Pe plan mondial se observă tendința de dezvoltare a unor metode simple, rapide, ieftine și eficiente, care să asigure prin aplicarea lor *in-situ* blocarea migrării poluanților din zona deversării de produs petrolier în subteran sau alte zone învecinate, distrugerea poluanților și refacerea cadrului natural.

După anii 70, a avut loc în microbiologia solului un salt de la aplicarea acestei științe în agricultură, la folosirea microorganismelor în decontaminarea mediului poluat, iar după anii 80, bioremedierea solurilor devine din ce în ce mai

importantă. Pornind de la activitățile degradative ale microorganismelor au fost elaborate tehnologii de depoluare, care sunt cuprinse generic în termenul de bioremediere [1].

Orice compus chimic a cărui acumulare în natură devine periculoasă pentru mediu poate fi considerat poluant, iar înlăturarea lui cu ajutorul microorganismelor poate fi considerată bioremediere.

Procesul de biodegradare a hidrocarburilor petroliere este un proces natural lent. Tehnologiile de decontaminare prin biodegradare (bioremediere) pot ajuta ca procesul de biodegradare să fie accelerat.

Cercetările realizate de Purohit H. în 2006, arată eficiența utilizării bioremedierii ca metodă de tratare a solurilor contaminate cu produse petroliere și necesitatea stimulării procesului prin adăugare de nutrienți, procedeu numit biostimulare și de microorganisme specializate, procedeu numit bioaugmentare.

Biodegradarea hidrocarburilor petroliere existente în diferite medii, în particular în sol, se bazează pe de o parte pe utilizarea microorganismelor indigene, deja existente în natură și adaptate la poluantul respectiv, iar pe de altă parte pe introducerea de microorganisme alohtone. Tocmai de aceea, în procesul de depoluare apare de multe ori necesitatea selectării din multitudinea de microorganisme existente în natură pe acelea care corespund scopului urmărit.

În acest sens, bacteriile de interes sunt selectate din mediile poluate și apoi sunt supuse unui screening de laborator, care permite alegerea acelor tulpini sau asociații care manifestă performanțele cele mai bune în degradarea hidrocarburilor reziduale.

Microorganismele capabile să utilizeze hidrocarburi petroliere ca sursă unică de carbon și energie au fost denumite de Ahearn, în 1973, microorganisme hidrocarbon-oxidante sau „hidrocarbonoclastice”.

Preparatele microbiene, deja larg comercializate în lume, pentru bioremedierea mediilor poluate au la bază consorții microbiene în care predomină reprezentanți, în special, ai genului *Bacillus*, *Pseudomonas* și *Xanthomonas* [4].

Cercetările realizate de Mohammed D. și Ramsubhad A. (2007), subliniază faptul că, culturile microbiene indigene îmbunătățite au biodegradat, în general, în primele cinci zile ale procesului de bioremediere într-o măsură mai mare hidrocarburi petroliere decât biopreparatele comerciale, acestea din urmă înregistrând o rată mai mare de biodegradare după 18 zile de la inoculare.

Studiile făcute de Embar K. și alții (2006), arată eficacitatea bioaugmentării solului poluat cu țigări, utilizând pentru îmbunătățirea procesului de biodegradare și un agent de gonflare.

În natură, dar și în laborator, microorganismele pot trăi și se pot înmulți dacă sunt respectate condițiile optime de temperatură, aerare, pH, substanțe nutritive. Pornind de la aceste considerente generale, ne-am propus să selectăm dintr-un sol poluat cu produse petroliere tulpini microbiene, să adaptăm aceste microorganisme la condițiile de laborator și să testăm capacitatea lor biodegradativă, aplicând bioaugmentarea ca procedeu de remediere a poluării cu motorină a solului.

Pentru realizarea scopului propus, au fost recoltate probe de sol contaminate din apropierea unei benzinării de pe raza orașului Iași.

MATERIAL ȘI METODĂ

Procedeeul experimental pentru studiul procesului de biodegradare a urmat următoarele etape: Izolarea, purificarea și selectarea unor microorganisme cu capacități biodegradative, prezente în probele de sol puternic contaminate, prin cultivarea pe medii cu motorină ca unică sursă de carbon și energie și adaptarea microorganismelor selectate în condiții de laborator. Prima etapă a constat în pregătirea suspensiei diluție de sol poluat cu produs petrolier în vederea izolării microorganismelor hidrocarbon-oxidante. 10 g de sol poluat cu produs petrolier s-au suspendat în 100 ml ser fiziologic steril, agitate timp de 10 min la 200 rot/min. S-a lăsat la sedimentare și s-a luat din supernatant câte 1 ml, care s-a adăugat în 3 eprubete sterile în care s-au introdus și câte 9 ml ser fiziologic steril. Pentru izolarea microorganismelor în cultură pură s-a folosit metoda diluțiilor succesive (s-au efectuat suspensii diluții de sol 10^{-1} - 10^{-3}). A doua etapă a presupus însămânțarea diluțiilor realizate pe medii de cultură solide pentru obținerea de colonii izolate, în care unica sursă de carbon și energie a fost reprezentată de un conținut de motorină de 0,5% (W/V). S-a utilizat un mediu de cultură cu următoarea compoziție: $Mg(NH_4)PO_4$ - 1,0 g, $MgSO_4$ - 2 g, K_2HPO_4 - 1,0 g, Na_2HPO_4 - 1,0 g, NH_4Cl - 1,0 g, $CaCO_3$ - 0,1 g, $FeCl_3$ - urme (2-3 cristale), agar - 20 g, 1000 ml apă distilată, pH - 7,2, sterilizare 0,8 atm cu adaos de 0,5% motorină (W/V). În plăcile Petri s-a pus câte 1 ml suspensie diluție de sol și apoi s-a turnat în fiecare placă mediul nutritiv solid la temperatura de 40 °C. După solidificare plăcile s-au pus în condiții de termostatare la 28 °C, controlându-se dezvoltarea coloniilor. După aceasta a urmat operația de repicare și de pasare a tulpinilor obținute pe medii minerale solide cu aceeași formulă sintetică, în care unica sursă de carbon a fost reprezentată de motorină (0,5%), atât pe plăci Petri cât și în eprubete, în vederea obținerii unor culturi pure.

Pentru adaptarea microorganismelor selectate, în condiții de laborator a fost necesară cultivarea microorganismelor selectate în fermentație submersă la temperatura camerei, în flacoane de 200 ml, la agitatorul rotativ, la 120 de rot/min. S-au pregătit 6 flacoane sterile de 200 ml, primul flacon fiind martorul, în care s-au adăugat 95 ml mediu de cultură și 5 ml suspensie celulară. În celelalte flacoane s-au introdus câte 95 ml mediu de cultură lichid (cu aceeași formulă sintetică cu a mediului solid, cu excepția agarului), sterilizat la autoclav, 5 ml suspensie celulară și sursa de carbon, reprezentată de motorină, după cum urmează: în flacoanele 2,3,4,5,6 s-au introdus câte 5 % motorină (W/V) (4,75 g la 95 ml mediu), respectiv 7,5 % (7,12 g), 10 % (9,50 g), 12,5 % (11,87 g), 15 % (14,25 g) motorină. S-au pus flacoanele la cultivare prin agitare timp de 120 de ore, la 120 rot/min. Gradul de dezvoltare a tulpinilor microbiene luate în studiu s-a exprimat prin citirea rezultatelor în dinamică de densitate optică. Din 24 în 24 de ore s-a citit D (densitatea optică) la spectrofotometru Heliosε (Thermo Spectronic digital), la 600 nm.

O altă etapă a studiului procesului de biodegradare a constat în cinetica degradării stratului superficial de motorină. Mediul de cultură (cu aceeași formulă sintetică) a fost repartizat în flacoane Erlenmeyer cu capacitatea de 200 ml, apoi s-au introdus câte 5 ml suspensie celulară (inocul) în fiecare flacon și o cantitate de motorină de 3,10 g. Probele au fost puse la incubatorul cu agitare orbitală GFL tip 3031, la 120 rot/min, la o temperatură de 31 °C, un pH de 6,97, timpul reprezentativ fixat fiind de 96 de ore de cultivare submersă. După ce probele au fost puse la cultivare prin agitare, acestea au fost centrifugate și apoi transvazate într-un cilindru gradat

pentru stabilirea grosimii stratului superficial de motorină. Stratul inițial de motorină în fază peliculară a fost măsurat, acesta fiind de 8,5 mm (*fig.1*).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Screening-ul calitativ efectuat pe o probă de sol contaminat cu hidrocarburi petroliere, a dus la izolarea în cultură pură a unor microorganisme care s-au dezvoltat în prezența motorinei ca unică sursă de carbon și energie. Tulpinile izolate aparțin genului *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Saccharomyces sp.* Bacteriile din genul *Pseudomonas* sunt Gram negative, au formă de bastonaș, sunt flagelate, aerobe și pigmentează mediul de cultură în galben fluorescent. Aceste bacterii sunt locuitori comuni ai solului și apei. Bacteriile din genul *Bacillus* sunt Gram pozitive, sporulate, au formă de bastonaș și sunt aerobe sau facultativ anaerobe. Bacteriile din genul *Xanthomonas sp.* sunt mobile, Gram-negative, au formă de bastonaș, sunt aerobe și produc pigmenți galbeni. *Acinetobacter* este un gen din care fac parte bacterii Gram-negative, imobile, sub formă de bastonaș, strict aerobe și sunt organisme importante în sol unde contribuie și la mineralizarea compușilor aromatici. Aceste microorganisme cu suprafețe hidrofobe au capacitatea de a adera la suprafețe hidrofile (așa cum sunt picăturile de țiței) și de a sintetiza o gamă largă de enzime, care asigură degradarea hidrocarburilor reziduale și potențialul de îndepărtare sau de conversie a țițeiului din mediu. Coloniile de *Saccharomyces sp.* sunt plate, netede și au textură cremoasă.

Pentru determinarea randamentului de biodegradare a stratului superficial de motorină a fost utilizată tulpina care a dovedit cea mai bună adaptabilitate la diferite conținuturi de motorină, tulpina aparținând genului *Pseudomonas sp.* Aceste microorganisme sunt utilizate în controlul poluării.



Figura 1 Colonii de *Bacillus sp.* izolate din proba de sol contaminată cu produse petroliere

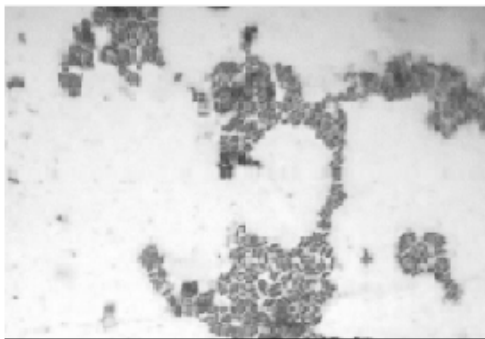
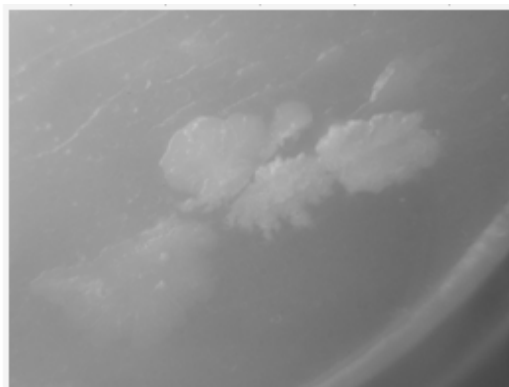
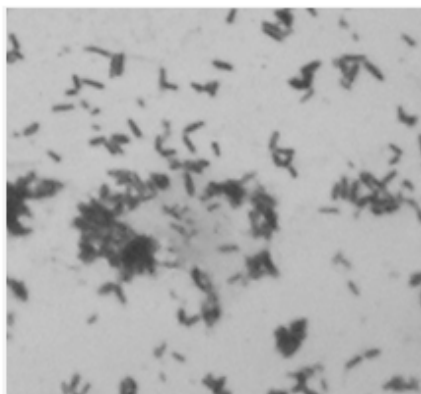


Figura 2 Aspect microscopic al tulpinii de *Bacillus sp.*

Figura 3 Colonii de *Pseudomonas* sp. izolateFigura 4 Aspect microscopic al tulpinii de *Pseudomonas* sp.

Experimentele realizate pentru determinarea gradului de dezvoltare a tulpinilor microbiene în prezența unor doze variate de motorină au demonstrat următoarele: în cazul tulpinii aparținând genului *Bacillus* sp. constatăm că densitatea optică (D) crește progresiv în primele 96 de ore de fermentație, după care rămâne aproape constantă. Însă, valoarea maximă a densității optice de 0,974 a fost înregistrată la 120 de ore, pentru un conținut de motorină de 10 % (tab.1). Valori mari ale densității optice s-au înregistrat și pentru mediile conținând 12,5 % și 15% motorină.

Tabelul 1

Influența cantității de motorină asupra dezvoltării tulpinii de *Bacillus* sp.

Proba	Motorină	Dt ₀	24 (h)	48 (h)	72 (h)	96 (h)	120 (h)
1	martor	0,331	0.248	0.2	0.205	0.243	0.213
2	5%	0,316	0.367	0.539	0.577	0.503	0.5
3	7,5%	0,289	0.292	0.238	0.252	0.294	0.345
4	10%	0,268	0.589	0.808	0.814	0.847	0.974
5	12,5%	0,296	0.515	0.844	0.88	0.834	0.826
6	15%	0,346	0.476	0.574	0.689	0.876	0.834

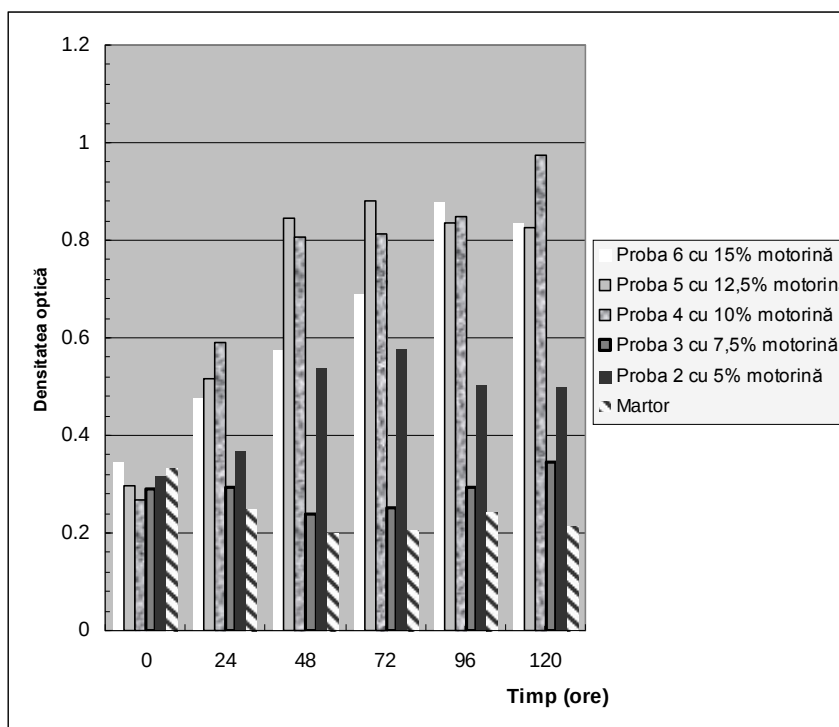


Figura 5 **Dinamica densității optice la diferite cantități de motorină în prezența tulpinii de *Bacillus* sp.**

În cazul tulpinii aparținând genului *Pseudomonas* sp., microorganismele au dovedit o mai bună dezvoltare pentru un conținut de motorină de 7 % și 12,5%, valoarea maximă înregistrată fiind de 0,907 la 96 de ore de cultivare pentru un conținut de 12,5 % motorină. În celelalte cazuri valorile densității optice au urmat o traiectorie aproximativ constantă după 96 de ore de cultivare submersă (tab.2).

Tabelul 2

Influența cantității de motorină asupra dezvoltării tulpinii *Pseudomonas* sp.

Proba	Motorină	Dto	24 (h)	48 (h)	72 (h)	96 (h)	120 (h)
1	martor	0.164	0,29	0,185	0,213	0,223	0,179
2	5%	0.274	0,205	0,257	0,378	0,526	0,6
3	7,5%	0.142	0,37	0,521	0,678	0,865	0,875
4	10%	0.102	0,238	0,485	0,521	0,7	0,623
5	12,5%	0,117	0,374	0,56	0,783	0,907	0,87
6	15%	0,103	0,277	0,361	0,401	0,475	0,517

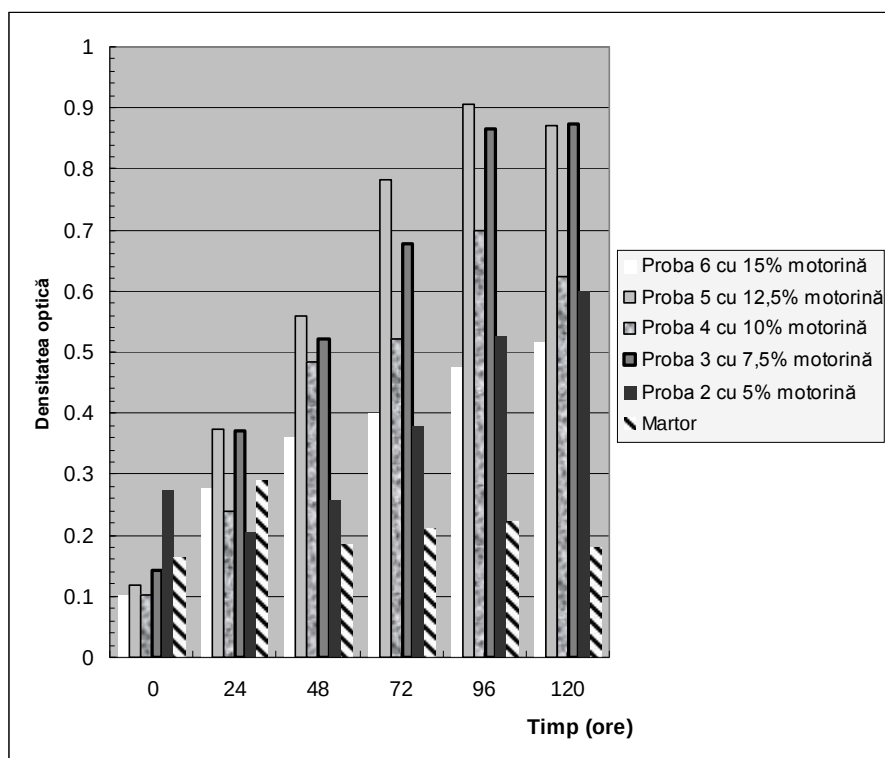


Figura 6 **Dinamica densității optice la diferite cantități de motorină în prezența tulpinii de *Pseudomonas sp.***

În cazul probelor în care s-a inoculat tulpina aparținând genului *Xanthomonas sp.*, constatăm că D crește progresiv în primele 72 de ore de cultivare submersă, pentru un conținut de motorină de 5% și 10%, după care înregistrează o traiectorie descendentă. Pentru probele conținând 7,5% și 12,5% motorină, valorile densității optice au înregistrat o traiectorie ascendentă la 120 de ore de cultivare, valoarea maximă a D fiind de 0,864 pentru un conținut de motorină de 7,5%.

Tabelul 3

Influența cantității de motorină asupra dezvoltării tulpinii de *Xanthomonas sp.*

Proba	Motorină	Dto	24 (h)	48 (h)	72 (h)	96 (h)	120 (h)
1	martor	0,231	0,257	0,219	0,21	0,206	0,187
2	5%	0,291	0,367	0,449	0,798	0,758	0,662
3	7,5%	0,234	0,345	0,404	0,5	0,615	0,864
4	10%	0,129	0,265	0,276	0,476	0,412	0,33
5	12,5%	0,126	0,343	0,404	0,467	0,537	0,73
6	15%	0,098	0,149	0,276	0,314	0,46	0,328

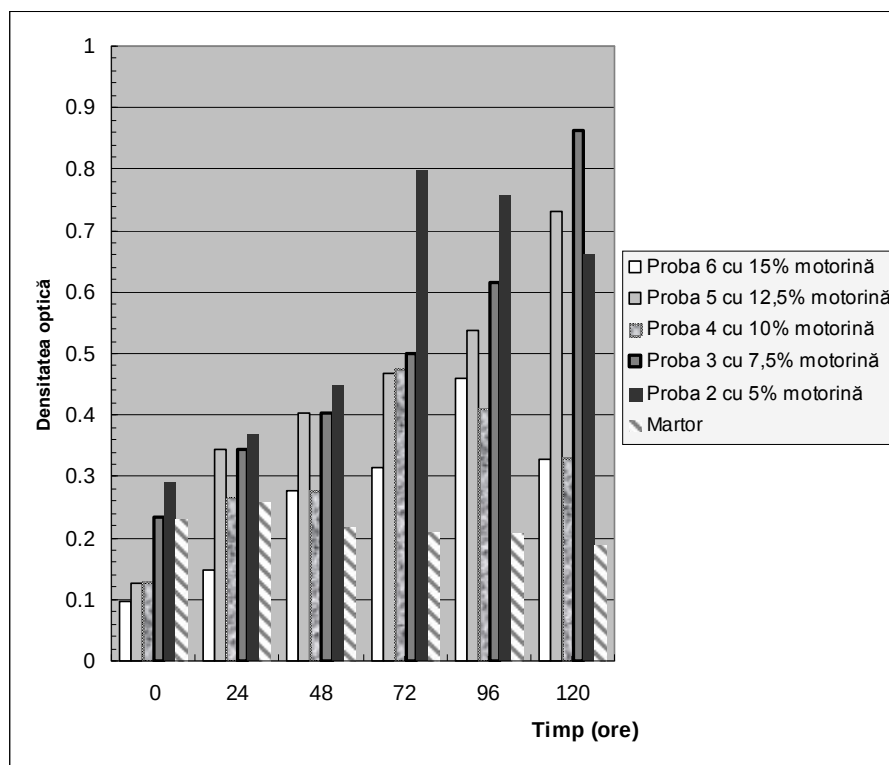


Figura 7 **Dinamica densității optice la diferite cantități de motorină în prezența tulpinii de *Xanthomonas* sp.**

În cazul tulpinii aparținând genului *Acinetobacter*, constatăm că microorganismele au dovedit o mai bună adaptabilitate pentru un conținut de motorină de 5%. Valoarea maximă a densității optice de 0,998 s-a înregistrat la 120 de ore de cultivare submersă pentru un conținut de motorină de 5%. În celelalte cazuri microorganismele nu au dovedit o bună adaptabilitate, valorile D menținându-se aproximativ constante pe toată durata cultivării (tab 4).

Tabelul 4
Influența cantității de motorină asupra dezvoltării tulpinii de *Acinetobacter* sp.

Proba	Motorină	Dto	24 (h)	48 (h)	72 (h)	96 (h)	120 (h)
1	martor	0,5	0,595	0,599	0,596	0,604	0,6
2	5%	0,496	0,618	0,887	0,896	0,892	0,998
3	7,5%	0,434	0,591	0,453	0,582	0,665	0,696
4	10%	0,489	0,572	0,575	0,568	0,626	0,69
5	12,5%	0,505	0,585	0,609	0,591	0,608	0,697
6	15%	0,497	0,598	0,514	0,592	0,655	0,7

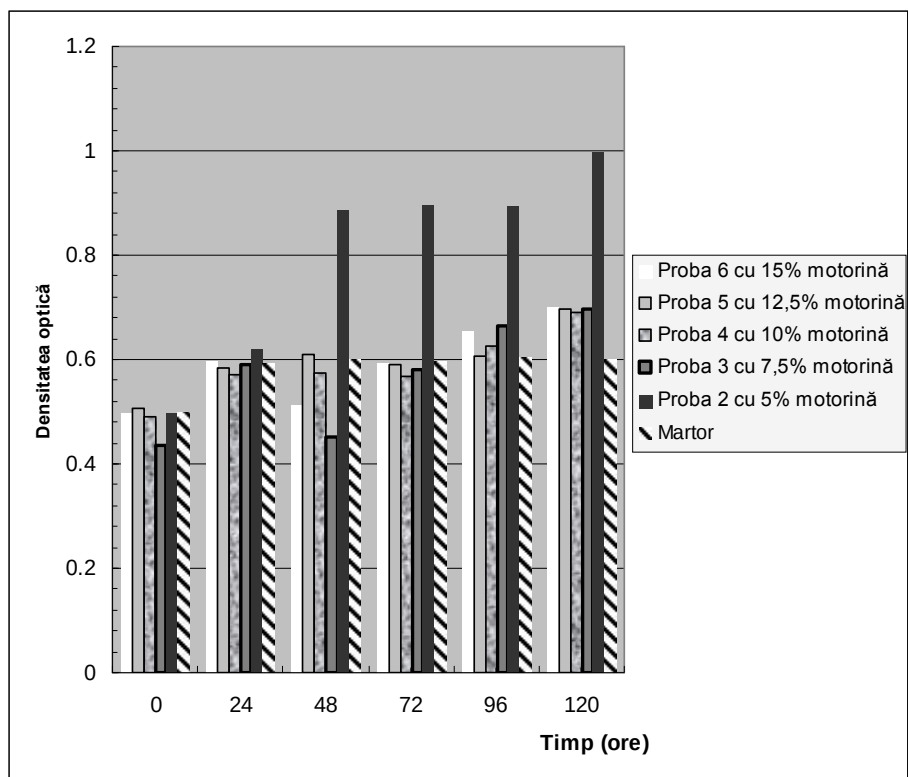


Figura 8 **Dinamica densității optice la diferite cantități de motorină în prezența tulpinii de *Acinetobacter* sp.**

Pentru probele în care s-a inoculat tulpina aparținând genului *Saccharomyces* sp., s-a observat o creștere progresivă în primele 96 de ore de incubare, după care s-a înregistrat un declin. Valori mari ale D s-au pentru un conținut de motorină de 7,5%, 10% și 12,5% (tab.5). Însă, valoarea maximă a densității optice s-a înregistrat la 120 de ore pentru un conținut de motorină de 10%, aceasta fiind de 0,54.

Tabelul 5

Influența cantității de motorină asupra dezvoltării tulpinii de *Saccharomyces* sp.

Proba	Motorină	Dto	24 (h)	48 (h)	72 (h)	96 (h)	120 (h)
1	martor	0,229	0,216	0,224	0,218	0,2	0,218
2	5%	0,243	0,251	0,265	0,354	0,364	0,378
3	7,5%	0,278	0,316	0,351	0,401	0,533	0,288
4	10%	0,3	0,328	0,419	0,461	0,477	0,54
5	12,5%	0,231	0,247	0,27	0,301	0,509	0,231
6	15%	0,241	0,287	0,297	0,324	0,328	0,242

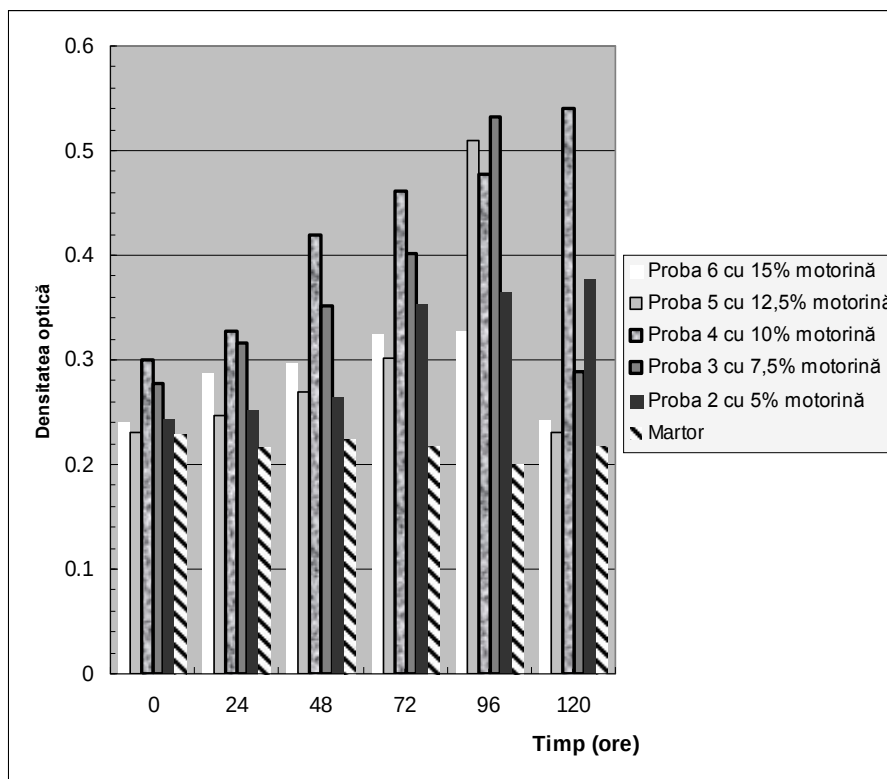


Figura 9 **Dinamica densității optice la diferite cantități de motorină în prezența tulpinii de *Saccharomyces* sp.**

Randamentul biodegradării stratului superficial de motorină a fost de 96 % la 266 de ore de cultivare submersă, stratul grosier ajungând la o grosime de 0,34 mm raportat la stratul inițial de motorină de 8,5 mm (tab.6).

Tabelul 6

Randamentul biodegradării stratului superficial de motorină

Timp de agitare (T)	Grosimea stratului – hf (mm)	Randamentul - Yh
96 (h)	1,7	80 %
170 (h)	1,4	83,52 %
218 (h)	0,83	90,23 %
266 (h)	0,34	96 %

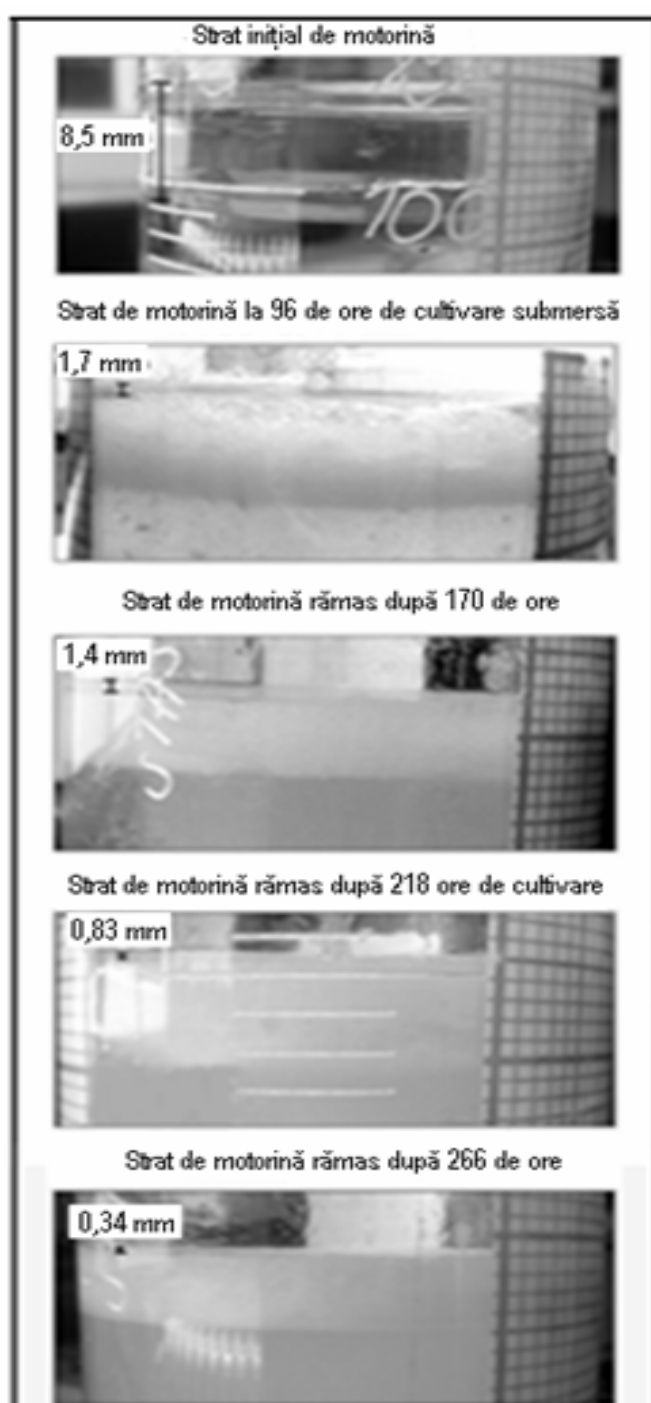


Figura 10 Cinetica degradării stratului grosier de motorină

CONCLUZII

Tulpinile bacteriene au fost izolate și selecționate din microflora autohtonă a unui sol poluat cu hidrocarburi petroliere și aparțin genului *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Saccharomyces sp.* Tulpinile izolate au fost testate în laborator pentru evidențierea capacității de biodegradare a hidrocarburilor petroliere prin însămânțarea acestora pe medii minerale, cu formulă sintetică, la care s-a adăugat motorină, drept unica sursă de carbon și energie. Pentru stabilirea capacității biodegradative a microorganismelor selectate s-au efectuat experimente în care s-a variat cantitatea de motorină introdusă în mediul de cultură, ca unică sursă de carbon. Rezultatele obținute după cultivarea submersă a microorganismelor din genul *Bacillus* au demonstrat că cel mai mare consum de motorină s-a constatat pe mediul de cultură la care s-a adăugat 10 % motorină, la 120 de ore de cultivare prin agitare, iar în cazul microorganismelor din genul *Pseudomonas*, pe mediul la care s-a adăugat 12,5 % motorină, la 96 de ore de cultivare. În cazul microorganismelor din genul *Xanthomonas* cel mai mare consum s-a înregistrat în probele la care s-a adăugat 7,5% motorină, la 120 de ore de cultivare, iar la cele din genul *Acinetobacter* la 5%, la 120 de ore.

Privind în ansamblu rezultatele studiului, s-a stabilit că tulpina de *Pseudomonas* a dovedit cea mai bună adaptabilitate în condițiile date, urmând a fi folosită și în alte studii experimentale.

Randamentul experimental al procesului de biodegradare al stratului superficial de motorină, obținut în condițiile optime stabilite reprezintă randamentul de decontaminare maxim (96 %), la un timp reprezentativ de 266 de ore.

BIBLIOGRAFIE

1. Alexander, M., 1994 - *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press.
2. Embar, K., Forgacs, C., and Sivan, A., 2006 - *The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil*, journal Biodegradation, publisher Springer Netherlands.
3. Lazăr, I., 2006 - *Lucrări practice la cursul de bioremediere*, Univ. de științe agronomice și medicină veterinară, Fac. de biotehnologii, Buc.
4. Mohammed, D., Ramsubhag, A. and Beckles, D. M., 2007 - *An Assessment of the Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil Using Non-indigenous, Commercial Microbes*, journal Water, Air, & Soil Pollution, publisher Springer Netherlands.
5. Purohit, H., 2006 - *Impact of Bioaugmentation with a Consortium of Bacteria on the Remediation of Wastewater-Containing Hydrocarbons*, journal Environmental Science and Pollution Research, publisher Springer Berlin / Heidelberg.