

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**AR NAFTAS PRODUKTIEM VĒSTURISKO  
PIESĀRŅOJUMU ATTĪRĪŠANAS POTENCIĀLA  
NOVĒRTĒŠANA**

Bakalaura darbs

Autors: Arturs Eglītis

Stud. apl. Nr. ae13013

Darba vadītāja: Dr. biol. Olga Mutere

Recenzents: Dr. biol. Reinis Rutkis

Katedras vadītājs: Prof., Dr. hab. biol. Indriķis Muižnieks

**RĪGA 2016**

# SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS.....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	9
1.1. Jēlnaftas savienojumi augsnē .....	9
1.2. Fizikāli-ķīmiskās attīrīšanas metodes.....	9
1.3. Bioloģiskās attīrīšanas metodes.....	10
1.3.1. Fitoremediācija .....	10
1.3.2. Mikrobioloģiskā biodegradācija.....	11
1.3.3. Naftas savienojumu aerobā degradācija.....	12
1.4. Biodegradāciju ietekmējošie faktori.....	14
1.4.1. Bioloģiska pieejamība.....	14
1.4.2. Fizikāli-ķīmiskie faktori.....	15
1.4.3. Mikroorganismu elpošanas intensitāte .....	15
2. MATERIĀLI UN METODES.....	16
2.1. Materiāli .....	16
2.2. Iekārtas.....	16
2.3. Datu matemātiskā un statistiskā apstrāde .....	16
2.4. Piesārņotā grunts, gruntsūdeņi un pazemes ūdeņi.....	16
2.5. Eksperimenta shēma .....	17
2.6. Piedevas biostimulācijai.....	18
2.7. Baktēriju konsorcijs bioaugmentācijai.....	21
2.8. Fizikāli-ķīmisko rādītāju testēšana.....	21
2.9. $C_{org}$ noteikšanas metode pēc Walkley-Black .....	21
2.10. Mikrobioloģiskā testēšana .....	22
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	23
3.1. Grunts pH vērtību izmaiņas atkarībā no pievienotās $CaCO_3$ koncentrācijas.....	23
3.2. Grunts pH vērtības un elektrovadītspēja variantos ar dažādiem apstrādes veidiem pēc 23 diennakts inkubācijas.....	25
3.3. Mikroorganismu elpošanas intensitāte gruntī inkubācijas laikā. ....	26
3.4. Grunts mitruma ietekme uz mikroorganismu aktivitāti .....	27

3.5. Grunts mikrobioloģiskā testēšana.....	29
3.6. Organiskā oglekļa daudzuma noteikšana gruntī.....	31
4. SECINĀJUMI .....	33
5. PATEICĪBAS .....	34
6. LITERATŪRAS SARAKSTS.....	35
Pielikumi .....	41

## KOPSAVILKUMS

Ar ogļūdeņražiem piesārņoto grunts testēja laboratorijas apstākļos 23 diennaktis ar mērķi, novērtēt biodegradācijas potenciālu grunts attīrīšanai. Tika izmantoti ogļūdeņražu piesārņoti augsnes paraugi, kas ņemti no [0 – 3] metru dziļuma. Kopumā darbam bija trīs varianti, katram divi atkārtojumi. Variantiem pievienoja dažādas piedevas, lai veiktu biostimulāciju, kā arī baktēriju konsorciju. Visiem grunts paraugiem noteica pH, elektrovadītspēju (EC), elpošanas intensitāti, mitrumu, kolonijas veidojoši vienību (KVV) skaitu, tika veikta mikroskopēšana un noteikts  $C_{org}$  daudzums gruntī. Pēc 48st. inkubācijas kopš biostimulācijas, mikroorganismu elpošanas intensitāte variantos ar Mix A un Mix C sasniedza attiecīgi,  $2.64 \text{ mg CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$  un  $2.17 \text{ mg CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$ . Kontroles variantam mikroorganismu elpošanas intensitāte bija zemā līmenī  $<0,5 \text{ mg CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$ . Kontroles variantam EC bija robežās no 0.0115 līdz 0.022  $\text{mS cm}^{-1}$ , kas liecina par zemu sāļu saturu gruntī. Vislielākais KVV skaits tika konstatēts otrajam variantam.

Darbs izstrādāts LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta Vides mikrobioloģijas laboratorijā, laika posmā no 2016.g.janvāra līdz 2016.g.maijam.

Literatūras apskats, metodes un rezultāti ir apkopoti 5 tabulās, 11 attēlos, 1 pielikumā un izmantots 67 literatūras avots.

**Atslēgvārdi:** ogļūdeņraži, biodegradācija, biostimulācija, elektrovadītspēja, elpošanas intensitāte

## SUMMARY

Hydrocarbon contaminated soil tested under laboratory conditions during 23 days with the aim to assess the biodegradation potential of soil treatment. Hydrocarbon contaminated soil samples were taken from [0-3] m depth. Overall, three biostimulation compositions were tested in duplicate. Different formulations with nutrients, as well as bacterial consortium was added to soil. The pH value, electrical conductivity (EC), respiration intensity, moisture, colony forming units (CFU),  $C_{org}$  and cell morphology was tested. After 48h of incubation since the first biostimulation, microbial respiration intensity in the sets with Mix A and Mix C reached  $2.64 \text{ mg CO}_2 \text{ dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and  $2.17 \text{ mg CO}_2 \text{ dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectively. Microbial respiration intensity in the control variant was at a low level, i.e.,  $<0.5 \text{ mg CO}_2 \text{ dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . EC in the control variant was from 0.0115 to  $0.022 \text{ mS cm}^{-1}$ , which indicates a low salt content in the soil. The largest number of CFU was found in the set with Mix A.

Work has been developed at the Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, Environmental Microbiology Laboratory for the period from January, 2016 to May, 2016.

Literature review, methods and results are summarized in 5 tables, 11 figures, 1 annex; 67 literature references are used.

**Keywords:** hydrocarbons, biodegradation, biostimulation, electric conductivity, respiratory intensity

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

PAO – policikliskie aromātiskie savienojumi

BS – biosurfaktanti

EC – elektrovadītspēja

SOM – augsnes organiskais materiāls

KLE – kāpostu lapu ekstrakts

KVV - koloniju veidojošo vienību skaits

NPI – naftas produktu indekss

## IEVADS

Nafta ir galvenais enerģijas avots visā pasaulē. Nereti transportējot naftu var notikt dažādi negadījumi, kur nafta nokļūst vidē, vai tā tiek „nejauši” izlieta. Šo savienojumu atbrīvošana rada draudus ūdens un augsnes ekosistēmām. Tādējādi, daudzas metodes tiek izstrādātas, lai attīrītu ogļūdeņražu piesārņotas vides. Bioloģiskā ogļūdeņražu degradācija piesārņotās augsnēs, kur izmanto mikroorganismus, lai samazinātu piesārņojumu, ir izveidota kā efektīva, ekonomiska, daudzpusīga un videi draudzīga attīrīšana (*Mehrasbi et al., 2003*). Bioloģiskā attīrīšana ir efektīvāka un lētāka nekā ķīmiskās un fizikālās metodes. Attiecībā uz bioloģisko attīrīšanas tehnoloģiju, jēlnaftas degradācijā izmanto mikroorganismus, kas spēj pārveidot naftas ogļūdeņražus par mazāk toksiskiem savienojumiem. Tomēr zemā šķīdība ūdenī un absorbcija ir divas galvenās īpašības lielmolekulāriem ogļūdeņražiem, kas ierobežo to pieejamību mikroorganismiem (*Millioli et al., 2009*). Bez tam, ogļūdeņražu koncentrācijas virs 3-5 % un smago metālu u.c. toksisko savienojumu klātbūtne var būtiski inhibēt mikroorganismu biodegradācijas aktivitāti.

Bioaugmentācija ir daudzsološa un zemu izmaksu bioloģiskā attīrīšanas metode, kurā pielieto efektīgu baktēriju izolātus vai mikrobu konsorcijs, kas spēj degradēt naftas ogļūdeņražus. Dažāda veida vietējā mikroflora parasti tiek pielietota šajā tehnikā (*Gentry et. al. 2004*). Dažreiz, pievienojot ogļūdeņražu degradētspējīgus mikroorganismus, var novest pie bioaugmentācijas nevioksmes (*Vogel 1996*). Tas ir tāpēc, ka mikroorganismu izdzīvošana un degradētspēja ir ļoti atkarīga no vides apstākļiem (*Vogel 1996*).

Bioestimulācija balstās uz vietējo baktēriju pieaugošo aktivitāti, nodrošinot tām barības vielas, skābekli, virsmaktīvās vielas un ūdeni (*Coulon and Delille 2003*) vai mainot vides apstākļus (piemēram, temperatūra, pH, redoks potenciāls). Tiek uzskatīts, ka vietējās baktērijas ir vislabāk piemērotas piesārņotās vietās (*Rahman 2003 et al.*). Bioestimulācija, ne vienmēr var noritēt labi, jo vietējie mikroorganismi, kas degradē ogļūdeņražus var būt inhibēti augstā piesārņotāju koncentrācijā (*Ueno et 2007 al.*).

Bakalaura darbā ir apkopoti autora pētījumi vides biotehnoloģijas jomā, kā galveno jautājumu atspoguļojot biodegradācijas un bioatveseļošanās procesus gruntī ar vēsturisko ogļūdeņražu piesārņojumu, testējot dažādus tehnoloģiskos paņēmienus.

**Darba mērķis:** Novērtēt ar naftas produktiem vēsturiski piesārņotās grunts attīrīšanas potenciālu.

**Darba uzdevumi:**

1. Raksturot grunts paraugu fizikāli-ķīmiskās īpašības un mikrobioloģisko sastāvu.
2. Noteikt trīs grunts apstrādes veidus un izveidot eksperimenta shēmu.
3. Salīdzināt ogļūdeņražu biodegradācijas aktivitāti pēc mikroorganismu elpošanas intensitātes gruntī dinamikā.
4. Novērtēt fizikāli-ķīmisko un bioloģisko rādītāju izmaiņas atkarībā no apstrādes veida.

**Par pētījuma rezultātiem ziņots konferencēs:** Eglitis A., Dokukins E., Berzins A., Muter O. Solutions for decreasing a crude oil inherent toxicity to bacteria-biodegraders. Journal of Biotechnology, In Press, European Biotechnology Congress, Riga, Latvia, May 5-7, 2016.  
(1.pielikums)

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Jēlnaftas savienojumi augsnē

Ir labi zināms, cik kaitīgi naftas savienojumi var būt dabai. Kā arī, cik grūti var būt, lai augsni un gruntsūdeņus attīrītu no naftas noplūdēm vai piesārņojuma.

Jēlnafta ir kompleksa maisījums, kas satur simtiem tūkstošu ogļūdeņražu (*Cooney, 1980*). Jēlnaftas savienojumus var iedalīt trīs vispārējās kategorijās, kas sastāv no piesātinātajiem ogļūdeņražiem, aromātiskajiem ogļūdeņražiem un polāriem organiskiem savienojumiem (*Huesemann un Moore, 1993*). Augsne, kas ir kontaminēta ar ogļūdeņražiem veicina plašus ekosistēmas piesārņojumus, jo piesārņojošo vielu uzkrāšanās dzīvnieku un augu audos, var izraisīt to nāvi vai mutācijas (*Alvarez et al., 1991*). Jēlnafta ir fiziski, ķīmiski un bioloģiski kaitīga augsnei, jo tā satur daudz toksiskus savienojumus relatīvi augstās koncentrācijās, piemēram, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu, benzolu un tā aizvietotājus, cikloalkānu gredzenus (*2004. Franco et al.*). Lielmolekulāru savienojumu klātbūtne ar ļoti zemu šķīdību ūdenī var novērst dabas biodegradācijas procesus ogļūdeņražu piesārņotās augsnēs. Šie savienojumi iekļūst augsnes makro un mikroporās, tādējādi ierobežojot ūdens un gaisa transportu, kas būtu nepieciešams, organisko vielu degradācijā (*Caravaca un Roldan, 2003*). Parasti, naftas ogļūdeņražu savienojumi saistās ar augsnes daļiņām un līdz ar to, tos ir grūti degradēt. Biosurfaktanti (BS), var emulgēt ogļūdeņražus, tādējādi uzlabojot to šķīdību ūdenī, samazinot virsmas spraigumu un palielinot eļļainu vielu novirzi no augsnes daļiņām (*Banat, 1995a, b; Banat et al., 2000*). Piesārņojumi ar naftas savienojumiem svārstās no noplūdēm mājāsaimniecībās, tankkuģu noplūdēm, vecām un jaunām degvielas uzpildes stacijām, kā arī teritorijās, kur uzglabā naftu, cauruļvadiem, termināļiem un pārstrādes rūpnīcām.

Biodegradācija ir viena no galvenajiem mehānismiem naftas ogļūdeņražu noārdīšanā no piesārņotiem apvidiem (*Atlas, 1988., NRC, 1985*).

## 1.2. Fizikāli-ķīmiskās attīrīšanas metodes

Metodes, ko izmanto naftas piesārņoto augšņu attīrīšanai var grupēt kā fizikāli ķīmiskos procesus (augšnes virskārtas sajaukšanu, oksidēšana-reducēšana, hidrolīze, neitralizācija, stabilizācija, cietināšana, mobilizācija-imbilīzācija, augsnes skalošana un mazgāšana), termisko apstrādi izmanto, lai sadedzinātu, sadalītu, iznīcinātu vai izkausētu no dažādiem

piemaisījumiem, un bioloģiskos procesus (bioventilēšana, biosmidzināšana, hidrauliskā un pneimatiskā dalīšana, augsnes bioinjekcijas, gaisa un ūdens skalošana, biopolimēra aizsargmateriāli un fitoatveseļošanās). Jautājums par to, kuru metodi izmantot naftas piesārņotajās teritorijās ir atkarīga no ķīmiskām, fizikālām un bioloģiskām īpašībām. Ķīmiskās metodes var tikt izmantotas, lai no augsnes atdalītu smagos metālus. Izmantojot termiskās apstrādes, vislielākā problēma ir bīstamie atkritumi, kuri rodas dedzināšanas procesos veidojot blakusproduktus, piemēram, polihlordibenzofurānu (PCDF), hlorētu benzolu, hlorētu fenolu un slāpekļa oksīdu (*Song et al, 1992;.. NITO et al, 1997*). Gadiem ilgi tiek izmatotas vecās metodes, lai attīrītu augsni no naftas piesārņojuma, piemēram, vēdināšana, rakšana, transportēšana un dedzināšana. (*Eckenfelder and Norris, 1993*). Svarīgākais ierobežojums tradicionālajai tīrīšanas metodei, ir tā, ka tā ne vienmēr var novērst piesārņojumu no augsnes pilnībā tāpēc, lai pabeigtu attīrīšanas procesu, pēc šādas apstrādes pielieto bioloģisko attīrīšanu.

No tehnoloģijām un metodēm, kas tiek pētītas, lai piesārņotu augsni attīrītu no naftas, bioloģiskā attīrīšana ir vēlamākā pieeja, sakarā ar tās zemajām izmaksām un spēju kavēt sārņu uzkrāšanos (*Bonnier et al, 1980;.. El-Nawawy et al, 1987*).

### **1.3. Bioloģiskās attīrīšanas metodes**

Augsnes bioloģiskā attīrīšana ir process, kurā lielākā daļa organisko piesārņotāju tiek sadalīti ar augsnes mikroorganismiem un tiek pārvērsti par nekaitīgiem gala produktiem, piemēram, oglekļa dioksīdu, metānu un ūdeni (*Walter et al., 1997*).

#### **1.3.1. Fitoremediācija**

Fitoremediāciju izmanto, lai veicinātu piesārņotās vides attīrīšanu. Tā ir tehnoloģija, kas efektīvi, lēti, un mazāk traucējoši attīra naftas piesārņotu vidi (*Stomp, et al, 1993,.. Schnoor, et al, 1995*). Fitoremediācija ietver procesus, kas palīdz atjaunot piesārņotās ekosistēmas (*Cunningham and Berti, 1993*). Zaļie augi ir saules – darbināmi sūkņi un efektīgi filtrējoši organismi, kas spēj uzņemt degradējošas vielas lielos apjomos (*Salt, et al., 1995*). Sāļo purvu augi spēj uzņemt ogļūdeņražus no naftas piesārņotiem sedimentiem un uzlabot ogļūdeņražu vai kopējo lipīdu frakcijas daļas no dažādām auga daļām (*Lytle and Lytle, 1987*).

Ir trīs galvenie mehānismi, kā augi uzņem naftas piesārņotus apvidus un šie augi uzņem petrolejas ogļūdeņražus savos audos; fermentu un eksudātu atbrīvošana, kas stimulē ogļūdeņražu uzņemšanu mikroorganismos un tiešas bioķīmiskās pārvērtības naftas ogļūdeņražos; degradācijas uzlabošanās pateicoties kontaminantiem rizosfērā, mikorizo sēņu un mikroorganismu konsorcijs aktivitātes dēļ (*Schnoor et al., 1995*). Augi, kas ir izturīgi pret

jēlnaftas toksicitāti, piemēram, alksnis un vītols, ir bijuši ļoti efektīvi piesārņotu augšņu attīrīšanā (*Shank, McEwan, 1998*). Viens svarīgs aspekts fitoremediācijas procesā ir, ka augi sliecas uz konkurenci par ogļūdeņražu uzņemošajām baktērijām, kas fiksē slāpekli un fosforu. Fitoaremediācija var paātrināt naftas koncentrācijas gan uz virszemes, gan dziļākos slāņos, tādejādi atjaunojot kultūraugu audzēšanas potenciālu un samazinot erozijas riskus.

Fitoaremediāciju arī sauc par zaļo attīrīšanu, botano- attīrīšanu un veģetatīvo atveseļošanu. Augu sakņu sistēmai ir svarīga nozīme, lai šīs reakcijas notiktu. Šis process ir īpaši noderīgs blīvām augsnēm, kas sniedz priekšroku pār citām bioloģiskām metodēm (proti, bioventilēšanu un bioskalošanu), kas nedarbojas uz blīvajām augsnēm. Augi, piesārņotās vietās, var veicināt sārņu uzkrāšanos un uzlabot biodegradāciju (*Johns un Nyer, 1996*).

Fitoaremediācija un augsnes atjaunošana ir ērtāk pieejama, jo tai nav nepieciešami lieli ieguldījumi un augsni var atbrīvot no piesārņojuma īsākā laika periodā. Fitoremediācijā izmanto augus, lai daļēji vai būtiski mazinātu piesārņotu augsni no piesārņojuma, nogulsnēm, dūņām, notekūdeņiem, virszemes ūdeņos un gruntsūdeņos.

### **1.3.2. Mikrobioloģiskā biodegradācija**

Bioloģisko attīrīšanu ir definējis (*Madsen 1991*), kā pārvaldītu vai spontānu procesu, kurā bioloģiska, īpaši mikrobu, katalīze iedarbojas uz piesārņojošo vielu savienojumiem, tādejādi samazinot vai likvidējot vides piesārņojumu. Faktiski bioloģiskās attīrīšanas mērķis ir optimizēt apstākļus mikroorganismiem, ogļūdeņražu degradācijā, un tas saņēma arvien lielāku uzmanību kā attīrīšanas tehnoloģija (*Wang un Bartha, 1990*).

Neviena atsevišķa mikroorganismu suga nespēj degradēt visas jēlnaftas sastāvdaļas, pilnīga naftas noārdīšana prasa vienlaicīgu iedarbību dažādu mikroorganismu populācijās. Viens no faktoriem, kas ierobežo augsnes biodegradāciju no piesārņotājiem ir to ierobežotā pieejamība mikroorganismiem (*Providenti et al., 1995*). Augsnes mikroorganismi ir fundamentāli svarīgs komponents sauszemes biotopiem. To galvenā loma ir regulēt barības vielu ciklus un uzturēt augsnes struktūru. Raksturīga iezīme augsnes mikroorganismiem ir to sarežģītība, gan mikroorganismu skaita, gan to ģenētiskās daudzveidības ziņā. Augsnes mikroorganismu daudzveidība variē dažādos augsnes līmeņos. Augsnes mikroorganismu daudzveidība augsni var ietekmēt gan pozitīvi, gan negatīvi, piemēram, tie var pasliktināt augsni veidojot toksiskas vielas vai pozitīvās - pārvērst organisko piesārņojumu uz nekaitīgiem bioloģiskajiem produktiem. Bioloģiskā attīrīšana, galvenokārt, balstās uz mikroorganismu izmantošanu un to uzturēšanu, lai tie varētu izdzīvot augsnē. Ir daudzas bioloģiskas metodes ko izmanto augsnes un ūdens avotu attīrīšanai (t.i., bio ventilācija, bio apsmidzināšana, hidrauliskā, pneimatiskā dalīšana, augsnes

bio injekcijas, gaisa un ūdens skalošana, biopolimēra aizsarg materiāli un fitoremediācija). Lielākajā daļā šo metožu, tiek lietotas biostimulācijas, kur tiek pievadīts skābeklis, ūdens un minerālās, un organiskās barības vielas (*Orzech et al, 1991; Turgay et al, 2010.*). Ogļūdeņražu biodegradāciju augsnē ietekmē vairāki vides faktori, piemēram, mikroorganismu populācijas, skābekļa piegāde, pH, augsnes mitrums, temperatūra, barības vielu pieejamība, organisko vielu daudzums, bioloģisko piesārņotāju kvalitāte un augsnes īpašības (*Atlas, 1995*). Bioloģiskās attīrīšanas metodes paātrina dabīgā biodegradācija, optimizējot nosacījumus biodegradācijā un kontrolējot minerālvielu daudzumu, pH un temperatūru (*Norris et al, 1994; Atlas and Bartha, 1992, Morgan and Watkinson, 1989*). No ķīmijas viedokļa, organiskie savienojumi ir tie, kas satur oglekļa un ūdeņraža atomus. Daži mikroorganismi var izmantot savā metabolismā organiskās vielas, piemēram, degvielu vai šķīdinātājus, kas ir bīstami cilvēkiem. Mikroorganismi nojauc organiskos sārņus un tos sadala nekaitīgos produktos, kas galvenokārt ir oglekļa dioksīds un ūdens.

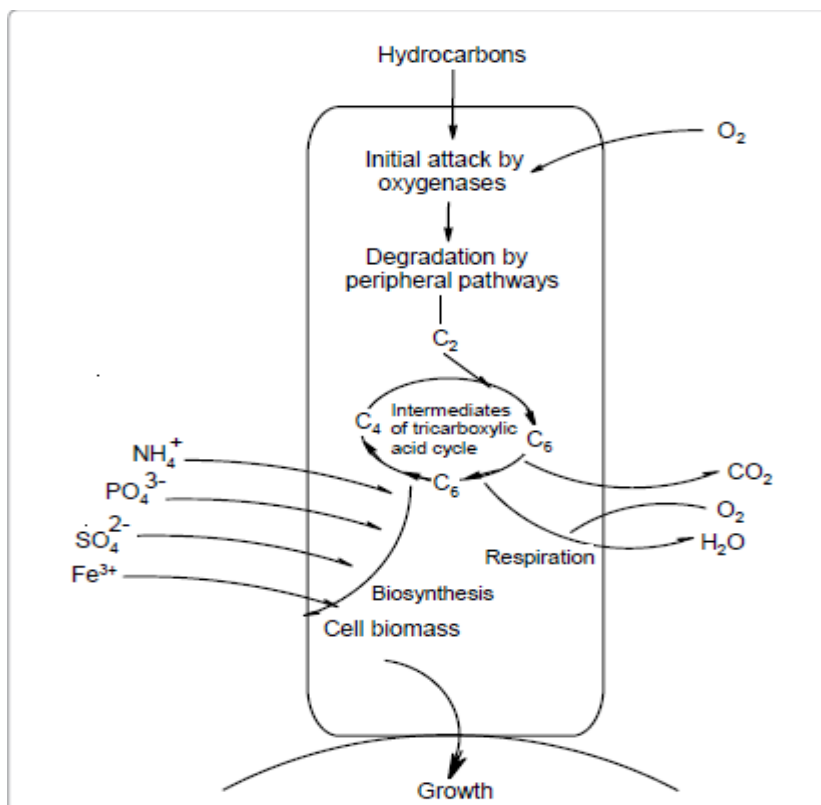
Sazarotie alkāni bioloģiski sadalās lēnāk, lai gan šis process ir līdzīgs tam, kāda ir n-alkāna degradācija. (*Klimiuk & Lebkowska, 2005*).

Mazām molekulām (ar diviem vai trīs gredzeniem) aromātiskie ogļūdeņraži tiek degradēti ar daudzām augsnes baktērijām, kā arī daudz sēņu ģintīm, piemēram, *Rhizopus, Aspergillus, Candida, Penicillium, Psilocybe* un *Smittum*. Savukārt, spēja degradēt lielas molekulas (četri vai vairāk gredzeni), piem., kā PAO (policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži) ir diezgan reti sastopami baktērijām (piemēram, *Pseudomonas putida, P. aeruginosa, P. saccharophila, Flavobacterium sp., Burkholderia cepacia, Rhodococcus sp., Stenotrophomonas sp.* un *Mycobacterium sp.*). Šādus savienojumus labāk spēj degradēt ligninolītiskās sēnītes, piemēram: *Phanaerochaete chrysosporium, Trametes versicolor, Bjerkandera sp, Pleurotus ostreatus*, un neligninolītiskās (nonlygninolytic) sēnes, piemēram, *Cunninghamella elegans, Penicillium janthinellum* un *Syncephalastrum sp.* (*Austin et al, 1977; Kirk & Gordon, 1988; Wolicka et al, 2009*). Savienojumu degradācija ar pieciem vai vairākiem aromātiskiem gredzeniem lielā mērā ir atkarīga no jauktu mikroorganismu populāciju aktivitātes. Metabolisms simbiotiskās sistēmās var būt vienīgais metabolisma veids šādos savienojumos (*Bogan et., Al, 2003*).

### 1.3.3. Naftas savienojumu aerobā degradācija

Visstraujākā un pilnīgākā organisko piesārņotāju degradācija notiek aerobos apstākļos. Pirmajā attēlā redzams galvenais princips aerobai ogļūdeņražu noārdīšanai (*Fritsche W, Hofrichter M., 2000*). Sākotnējā šūnu reakcija uz organiskiem piesārņotājiem ir oksidatīvs process. Oksigenāzes un peroksidāzes katalizē galveno enzimatisko reakciju t.i. skābekļa

aktivāciju un inkorporāciju. Perifērās noārdīšanās ceļi pārvērstu organiskos piesārņotājus soli pa solim uz starpproduktu centrālo starpmetabolismu, piemēram, trikarboksilskābes ciklu. Šūnu biomasas biosintēze ir saistīta ar prekursoru metabolītiem, piemēram, acetil-CoA, sukcinātu un piruvātu.



1.attēls. Galvenais princips ogļūdeņražu aerobai noārdīšanai ar mikroorganismiem. (Fritsche W, Hofrichter M., 2000)

Figure 1. Main principle of aerobic degradation of hydrocarbons by microorganisms. (Fritsche W, Hofrichter M., 2000)

#### 1.4. Biodegradāciju ietekmējošie faktori

Galvenie faktori, kas kavē naftas savienojumu biodegradāciju augsnēs ietver: ķīmisko struktūru, koncentrāciju un ogļūdeņražu toksiskumu attiecībā uz mikrofloru, mikrobioloģisko augsnes potenciālu (biomasas koncentrācija, populācijas mainīgums, fermentu aktivitāte), fizikāli ķīmiskos vides parametrus (piemēram, pH, elektrovadītspēja, temperatūra, organisko vielu saturs, mitrums), un ogļūdeņražu pieejamību mikroorganismu šūnām.

### 1.4.1. Bioloģiskā pieejamība

Pat tad, ja tiek nodrošināti optimāli apstākļi ogļūdeņraža biodegradācijai lauka apstākļos, ir pierādīts, ka atlikušo ogļūdeņražu daļas paliek nedegradētas. Proti, pēc nokļūšanas augsnē, organiskie piesārņotāji var pazust pēc biodegradācijas, izskalošanas vai iztvaikošanas. Ātrums, kādā ogļūdeņražu degradēt spējīgie mikroorganismi var pārvērst ķīmikālijas ir atkarīgs no ātruma, kādā tās nonāk šūnā un ātrumā, kādā tās uzņem šīs vielas, un no mikroorganismu metabolisma ātruma. Tas tiek kontrolēts ar vairākiem fizikāli-ķīmiskiem procesiem, piemēram, sorbciju / desorbciju, difūziju, un šķīdināšanu (*Brassington et al, 2007*;.. *Cuypers et al 2002*;.. *Maletić et al, 2011*;.. *Semple et al, 2003*). Termins "biopieejamība" attiecas uz daļu ķīmisko vielu augsnē, kas var tikt izmantoti, vai transformēti ar dzīviem organismiem. Naftas piesārņotās augsnes bionoārdīšanos var arī nopietni ietekmēt piesārņojuma laikā, sakarā ar atmosfēras procesiem, kas samazina bioloģisko piesārņotāju pieejamību mikroorganismiem. (*2011 Maletić et al*;.. *Loeher et al, 2001*). Šie procesi uzlabo hidrofobo organisko piesārņotāju absorbciju uz augsnes matricas, samazinot biodegradācijas ātrumu un apjomu. Turklāt naftas piesārņota augsne parasti satur smagus ķīmiskus savienojumus, kas sastāv galvenokārt no lielmolekulāriem ogļūdeņražiem un kurus nevar degradēt vietējie mikroorganismi (*Balba et al, 1998*;.. *Maletić et al, 2011*;.. *Loeher et al, 2001*). Turpretī, nesenā pagātnē naftas piesārņota augsne satur lielāku daudzumu piesātinātos un alifātiskos savienojumus, kur mikroorganismi ir vēl jūtīgāki pret šo vielu degradāciju. Šie savienojumi nesen piesārņotā augsnē ir potenciāli toksiski vietējiem mikroorganismiem, kā rezultātā tas prasa ilgāku mikroorganismu adaptācijas laiku (lag fāze) pirms piesārņotāja degradācijas un pat prasa ilgāku inhibīcijas bionoārdīšanās procesu (*Margesin et al, 2000*;.. *Loeher et al., 2001* ; *Petrović et al, 2008*).

### 1.4.2. Fizikāli-ķīmiskie faktori

Augsnes elektrovadītspēja (EC) ir augsnes sāļu summas rādītājs (augsnas sāļums). Tas ir svarīgs rādītājs augsnes kvalitātei. Tas ietekmē augu ražību, ražas piemērotību, augu barības vielu pieejamību un augsnes mikroorganismu aktivitāti, kas ietekmē galvenos augsnes procesus, tostarp siltumnīcefekta gāzu emisiju, piemēram, slāpekļa oksīds, metāns un oglekļa dioksīds. Lai gan EC, nesniedz tiešu specifisko jonu mērījumus, vai sāļu savienojumus, tas ir savstarpēji saistīts ar nitrāta, kālija, nātrija, hlorīda, sulfāts, un amonjaka koncentrāciju. Augsnas EC noteikšana var būt ērts un ekonomisks veids, kā noteikt pieejamo slāpekļa (N) koncentrāciju.

Raksturīgākie faktori, kas ietekmē EC ietver augsnes minerālvielas, klimats, un augsnes struktūra.

### 1.4.3. Mikroorganismu elpošanas intensitāte

Mikroorganismu elpošanas intensitāti izmanto kā vienu no svarīgākajiem rādītājiem biodegradācijas procesa novērtēšanai. Augsnes elpošana ir oglekļa dioksīda (CO<sub>2</sub>) mērījums, kas tiek atbrīvots no augsnes, sašķeļot augsnes organisko materiālu (SOM) ko veic augsnes mikroorganismi, augu sakņu elpošana un augsnes fauna. Tas ir svarīgs rādītājs augsnes veselībai, jo tas norāda mikroorganismu aktivitātes pakāpi, SOM saturu un tās sadalīšanos. Šis rādītājs parāda barības vielu ietvertās organiskās vielas un kas tiek pārvērstas par pieejamākiem savienojumiem augu kultūrām (piemēram, fosfāti kā PO<sub>4</sub>, slāpekļa nitrāti kā NO<sub>3</sub>, un sulfāti kā SO<sub>4</sub>). Īstermiņā jēdziens augsts augsnes elpošanas rādītājs ne vienmēr ir labākais; tas var liecināt par nestabilu sistēmu un augsnes organisko vielu zudumu (SOM), tāpēc pārmērīga augsnes apstrāde, vai citi faktori, pazemina augsnes veselību. (*Anonīms*)

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

Laboratorijas trauki un instrumenti: stikla mēģenes, stikla kolbas, stikla mērcilindri, skalpelis, stikla glāzes, sikla nūjiņas („Simax”, Čehija; „Pyrex”, Anglija; „TGI”, Vācija); 500 ml Erlenmeijera kolbas, 10-un 20-ML dozators, 50ml birete, kvēlspuldze.

Pipešu uzgaļi, koniskās mēģenes (3 mL, 30 mL, 50 mL), Petri plates (d= 60mm); automātiskās pipetes („Huawei”, Ķīna); 5L plastmasas trauki. Filtrpapīrs (“Nuova Aptaca”, Itālija); metāla un plastmasas mēģeņu statīvi (“Nuova Aptaca”, Itālija); parafilma („Alcan”, ASV); spirta lampiņa (“TGI”, Vācija).

### 2.2. Iekārtas

Analītiskie svāri Tecator 6110 Balance („Tecator”, Vācija); gaismas mikroskops („Motic”, DM - 1802 – A, Ķīna); fotoaparāts („Olympus”, Ķīna); pH-metrs Hanna pH 213 („Hanna Instruments”, Vācija); svāri („Kern EG/EW”, Vācija); termostats („Labof”, Ungārija); žāvējamais skapis (KC-65, Polija); elektovadītspēju mērīšanas ierīce (SensoDirect Con 110); magnētiskais maisītājs (MM3M, Krivija).

### 2.3. Datu matemātiskā un statistiskā apstrāde

Matemātiskajiem aprēķiniem izmantota datorprogramma Microsoft Excel, kurā aprēķinātas vidējās vērtības un standartnovirzes ( $P < 0.05$ , būtiskuma līmenis).

### 2.4. Piesārņotā grunts

Grunts (1.tabula). 3 vidēji paraugi, kurus ievāca no 0m-1m; 1m-2m; un 2m-3m dziļuma; 15 L no katra.

1.tabula.

Grunts paraugu testēšanas rezultāti. Kopējā fosfora, slāpekļa, ogļūdeņražu koncentrācija un pH vērtības. (Intergeo-R).

Table 1

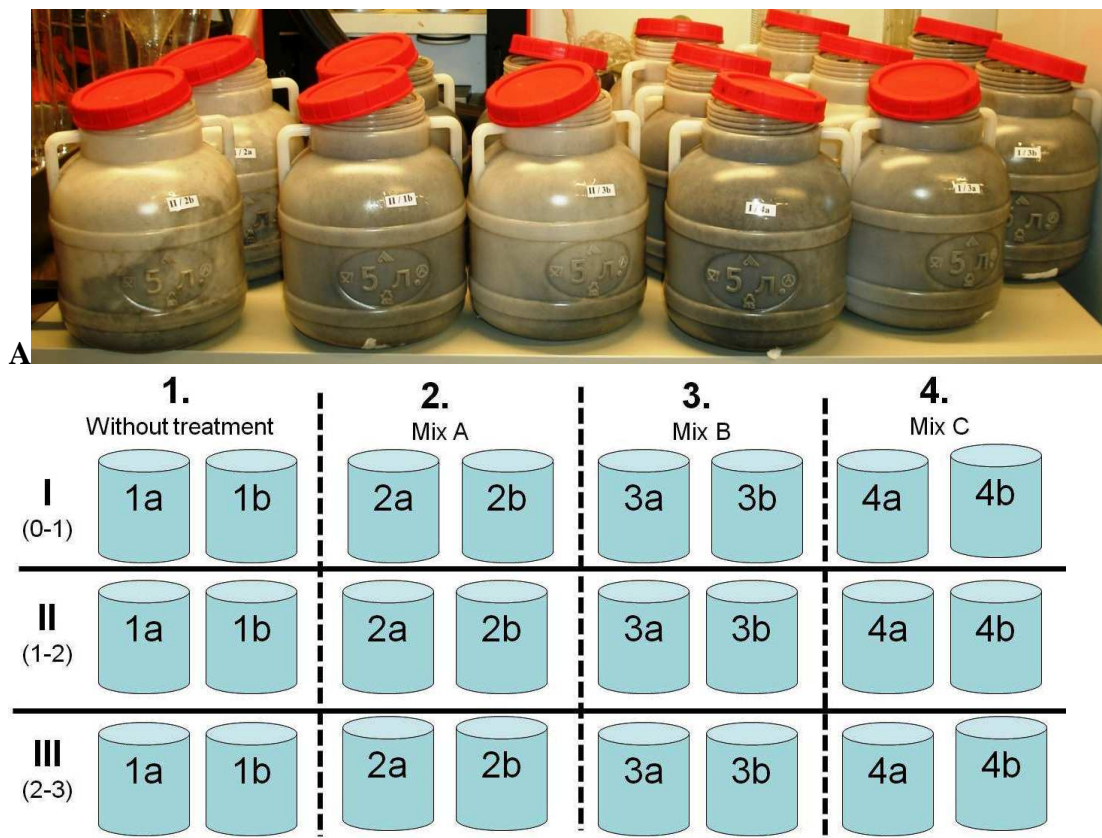
Soil testing results. Concentration of the total phosphorus, nitrogen, hydrocarbons and the pH value. (Data were provided by Intergeo-R).

Grunts paraugu ievākšanas dziļums, m	$P_{kop}$ , mg/kg $P_{total}$	$N_{kop}$ , mg/kg $N_{total}$	pH-KCl	NPI
Sampling depth, m	mg/kg	mg/kg		mg/kg
I – [0m-1m]	60	341	3.98	21200
II – [1m-2m]	47	260	4.00	8070
III – [2m-3m]	42	197	4.20	3400

## 2.5. Eksperimenta shēma

Eksperimentu veica 5L plastmasas traukos pie 23 °C, laboratorijas apstākļos. Katram traukam tika pievienots 1 L mitras grunts (2A.att.). Katram no trīs grunts variantiem (no dažāda dziļuma) testēja trīs apstrādes veidus un kontroli bez apstrādes, divos atkārtojumos. Kopā 24 trauki (2B.att.).

Grunti inkubēja atvērtā traukā, grunti periodiski samaisot (reizi 48st.). Trauku hermētiski taisīja ciet, mērot mikroorganismu elpošanas intensitāti (5 reizes pa 4 st., 23 diennakts laikā).



**B**  
2.attēls. Eksperimenta shēma. A - Eksperimenta ierīkošana plastmasas traukos; B – grunts apstrādes veidi. Piedevu sastāvs katram apstrādes veidam ir norādīts 2.tabulā. I, II, III – grunts ievākšanas dziļums, attiecīgi, 0m-1m; 1m-2m; 2m-3m. Trauks satur 1 L grunts. Katrs variants ierīkots divos atkārtojumos (a, b).

Figure 2. Experiment scheme. A - Experiment setup in plastic bottles. B – types of soil treatment. Composition of amendments for each treatment type is shown in Table 2. I; II; III – soil sampling depth 0m-1m; 1m-2m; 2m-3m, respectively. A bottle contains 1 L soil. Each set was performed in duplicate (a, b).

## 2.6. Piedevas biostimulācijai

Lai stimulētu mikroorganismu aktivitāti, barības u.c. vielu kompozīcija tika pievienota gruntij eksperimenta 2.dienā (2.tab.) un pēc 14 dienām (3.tab.). Mix A, Mix B un Mix C atbilst, attiecīgi, 2., 3. un 4. variantam.

Kāpostu lapu ekstrakts. Pagatavošana: 1 kg svaigu galviņkāpostu lapas sagrieza gabaliņos, pievienoja 1 l ūdens un vārīja 100°C 30 minūtes, pēc tam šķidrumu atdzesēja un izfiltrēja caur Miliporu filtru (Millipore), 0,45 µm, salēja kolbās un sterilizēja pie 0,5 atmosfērām 15 minūtes. Sagatavoto šķidrumu uzglabāja +4°C līdz izmantošanas brīdim (Muter et al., 2008).

2.tabula

Piedevu sastāvs 1.biostimulācijai (pēc 2 dienu inkubācijas).

Table 2

Composition of amendments for the 1<sup>st</sup> biostimulation (after 2 days incubation).

Sastāvdaļas uz 1L/ Compounds per 1L	Mix A	Mix B	Mix C
Bioversal HC/HC-S, 1%	30 mL	30 mL	30 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	2 g	2 g
CaCO <sub>3</sub>	50 g	-	-
Melase, 30%	3.3 mL	-	-
Kāpostu lapu ekstrakts ūdenī, 100%	50 mL	-	-
Rauga ekstrakts, 10%	5 mL	-	-
Kokogle (iegūta no koksnes)	-	25 g	-
Kāpostu biomasa pēc ekstrakcijas	-	-	80 g

3.tabula

Piedevu sastāvs 2.biostimulācijai (pēc 14 dienu inkubācijas).

Table 3

Composition of amendments for the 2<sup>nd</sup> biostimulation (after 14 days incubation).

Sastāvdaļas uz 1L / Compounds per 1L	Mix A*	Mix B*	Mix C*
Bioversal HC/HC-S, 1%	30 mL	30 mL	30 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	2 g	2 g
CaCO <sub>3</sub>	-	-	-
Melase, 30%	3.3 mL	-	-
Kāpostu lapu ekstrakts ūdenī	50 mL	-	-
Rauga ekstrakts Yeast extract, 10%	5 mL	-	-
kokogle (iegūta no koksnes)	-	-	-
Kāpostu biomasa pēc ekstrakcijas	50 mL	-	-

Kāpostu lapu ekstrakta (KLE) izmantošnaia biostimulācijas formulā ir šāds pamatojums. KLE stimulē dažādu mikroorganismu augšanu un aktivitāti, piemēram, streptokokus (*Ayers and Mudge, 1921*). Mūsu pētījumos bija pierādīta KLE stimulējošā ietekme uz nitroaromātisko vielu biodegradāciju (*Muter et al., 2008*). Bija salīdzināti 6 kāpostu kultivāri pēc to sastāva, t.sk., C, N, reducējošo cukuru koncentrācijas (4.tab.) (*Grube et al., 2008*). Acīmredzot, KLE ietekme uz mikroorganismu aktivitāti ir atkarīga no mikroorganisma sugas un kāpostu fizikāli-ķīmiskām īpašībām. Turklāt, augsnes īpašības un KLE pagatavošanas shēma arī ietekmē biodegradācijas dinamiku (*Muter et al., 2008; Grube et al., 2008*).

4.tabula

Oglekļa, slāpekļa un reducējošo cukuru koncentrācija dažādos kāpostu lapu ekstraktos (1-3 – baltie kāposti; 4 – savojas kāposti; 5 – ķīnas kāposti; 6 – sarkanie kāposti). (*Grube et al., 2008*).

Table 4

The content of carbon, nitrogen and reducing sugars in different CLE (1-3 – White cabbage; 4 – Savoy cabbage; 5 – Chinese cabbage; 6 – Red cabbage). (*Grube et al., 2008*).

CLE sample <sup>a</sup>	Carbon (vol.%)	Total nitrogen (vol.%)	N/C	Sucrose (g 100 ml <sup>-1</sup> )	Glucose (g 100 ml <sup>-1</sup> )	Fructose (g 100 ml <sup>-1</sup> )	Total reducing sugars (g 100 ml <sup>-1</sup> )
1	0.555	0.38	0.68	0.57	7.08	6.03	13.68
2	1.186	0.29	0.24	1.33	13.41	10.24	24.98
3	1.221	0.57	0.47	1.04	11.01	8.74	20.79
4	1.186	1.00	0.84	1.38	6.06	4.97	12.41
5	0.823	0.38	0.46	0.64	6.38	5.51	12.53
6	1.251	0.22	0.18	2.09	10.79	8.30	21.18

Koksnes bioogles kā vienai no piedevām (Mix B, 3.tab.) izmantošanai ir šāds pamatojums. Bioogli plaši izmanto augsnes auglības paaugstināšanai, kā arī piesārņotās augsnes attīrīšanai un atveseļošanai. Bioogles svarīgākas īpašības ir šādas: paaugstina pH līmeni; nodrošina augsni ar C, N, P un mikroelementiem, un otrādi, kalpo kā sorbents; irdina augsni, veicinot aerāciju. Bioogles ietekme uz augsnes īpašībām lielā mērā ir atkarīga no ogles izejmateriāla, pirolīzes apstākļiem, tās koncentrācijas augsnē, augsnes sastāva. Eksperimentā izmantojam bioogli, kuru testējam iepriekšējos eksperimentos par pesticīdu biodegradāciju (5.tab.) (*Muter et al., 2014*). Bioogles piegādātājs: Black Carbon A/S, Barritskovvej 36, 7150 Barrit, Denmark.

Koksnes bioogles fizikāli ķīmiskas īpašības (*Muter et al., 2014*).

Table 5

Physicochemical properties of woodchip biochar (*Muter et al., 2014*).

Prametrs	Koksnes bioogle
pH [KCl]	7.39
Redoks potenciāls, mV	-26.6
Pelni, %	3.3
N, %	0.28
C, %	85.76
S, ppm	47.90
H, %	2.456
O, %	2.475
BET virsma, m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	3.72
Kopējais poru tilpums, m <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	2.83
Mikroporu tilpums, m <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	1.53
Poru izmērs, nm	25.4
HCl sorbcija, mg g <sup>-1</sup>	11.8

### 2.7. Baktēriju konsorcijs bioaugmentācijai

Baktēriju konsorcijs ar ogļūdeņražu degradēt spēju sastāv no pieciem *Stenotrophomonas maltophilia* celmiem un trīs *Pseudomonas* spp. celmiem (*Laškova et al., 2011*).

### 2.8. Fizikāli-ķīmisko rādītāju testēšana

Grunts mitrumu noteica žāvējot gaisā līdz konstantam svaram. Grunts pH mērīja 1 M KCl suspensijā (1:4) pie 23 °C ar pH metru Hanna Instruments pH 213, iepriekš kalibrējot elektrodu. Elektrovadītspēju noteica ūdens suspensijā (1:2) ar Conductivity meter SensoDirect Con 110.

### 2.9. C<sub>org</sub> noteikšanas metode pēc Walkley-Black

C<sub>org</sub> noteica pēc Walkley-Black metodes (*Schulte, 1988*).

Reaģenti: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>85%., koncentrēta sērskābe H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%)., NaF – ciets

Standartšķīdums 0. 167M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: izšķīdina 49.04 g (105 ° C) K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ūdenī to karsējot un atšķaida līdz 1 L.

0.5 M Fe<sup>2+</sup> šķīdums: izšķīdina 196.1 g Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>) • 6H<sub>2</sub>O 800 ml ūdens kas satur 20 ml koncentrētas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> un atšķaida līdz 1 L. Fe<sup>2+</sup> šajā šķīdumā lēnām oksidējas gaisā.

Ferroin indikators: Lēnām izšķīdina 3,71 g o-fenantrolīna un 1,74 g FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 250 ml ūdens.

Norise:

1. Iesver 0,10 līdz 2,00 g žāvētu augsnes paraugu un pārnes uz 500 ml Erlenmeijera kolbu. Paraugam jābūt 10 līdz 25 mg organiskā C (17-43 mg organisko vielu). 1 g augsnes parauga būtu 1,2-4,3% organisko vielu. Izmantot līdz 2,0 g parauga kas ir gaišas krāsas un 0,1 g parauga tumšās, organiskās augsnēs.
2. Ar pipeti pievieno 10 mL 0.167 M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
3. Ar dozatoru pievieno 20 ml koncentrētas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> un maigi virpuļojot samaisa. Izvairīties no pārmērīgas kratīšanas, jo rezultātā organiskās daļiņas no šķīduma pielips pie kolbas sienām.
4. Ļauj nostāvēties 30 minūtes. Kolbas jānovieto uz karstuma novērsošu spilventiņu, lai novērstu pārmērīgi strauju siltuma zudumu.
5. Suspensiju atšķaida ar aptuveni 200 ml ūdens, lai nodrošinātu skaidrāku suspensiju apskatei.
6. Pievieno 10 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, izmantojot piemērotu dozatoru, un 0,2 g NaF. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> un NaF pievieno pie Fe<sup>3+</sup>, kas norādīs uz titrēšanas beigām.
7. Pievieno 10 pilienus ferroin indikatora. Indikators jāpievieno tieši pirms titrēšanas, lai izvairītos no absorbcijas deaktivācijas uz māla virsmām.
8. Titrē ar 0,5 M Fe<sup>2+</sup> + līdz bordo krāsojumam. Sākumā šķīduma krāsa ir dzeltena, oranža līdz tumši zaļai, atkarībā no nereaģējušā K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> apjoma, kas pāriet uz duļķaini pelēku pirms titranta beigām un pēc tam krāsa strauji mainās uz vīna sarkanu titrēšanas beigās. Izmantot magnētisko maisītāju un kvēlspuldzi spīdinot cauri šķīdumam ir vieglāk redzēt duļķainā šķīduma krāsu (dienasgaismas apgaismojums dod atšķirīgu krāsojumu).

## 2.10. Mikrobioloģiskā testēšana

Kolonijas veidojošo vienību (KVV) skaitu noteica, izsējot grunts suspensijas decimālos atšķaidījumus uz agarizētās barotnes. Aerobo heterotrofo baktēriju KVV skaita noteikšanai izmantoja Tryptone Glucose Yeast Extract Agar (TGA, Sifin) (inkubācijas periods 24st. pie 37 °C); micēlijsēņu un rauga KVV noteikšanai – Rose Bengal Agar with Chloramphenicol (Biolife, Italy) (inkubācijas periods 96st. pie 23 °C); ogļūdeņražus degradējošo mikroorganismu KKV noteikšanai – Bushnell Haas (pH 7.0 +/- 0.2) (barotni ar 2 % agara un 1% dīzeļdegvielas (inkubācijas periods 7 diennakts pie 37 °C).

Mikroorgansimu elpošanas intensitāti noteica, ievietojot sverglāzi ar 5 mL 0.1 M NaOH eksperimentālā traukā ar grunti un aizverot trauku. Pēc 4 stundu inkubācijas NaOH šķīdumu titrēja ar 0.1 M HCl, iepriekš tam pievienojot indikatoru 1% fenolftaleīnu. Ogļskābās gāzes koncentrāciju noteica pēc (Rowel, 1994).

6.tabula

Bushnell Haas barotnes sastāvs.

Table 6

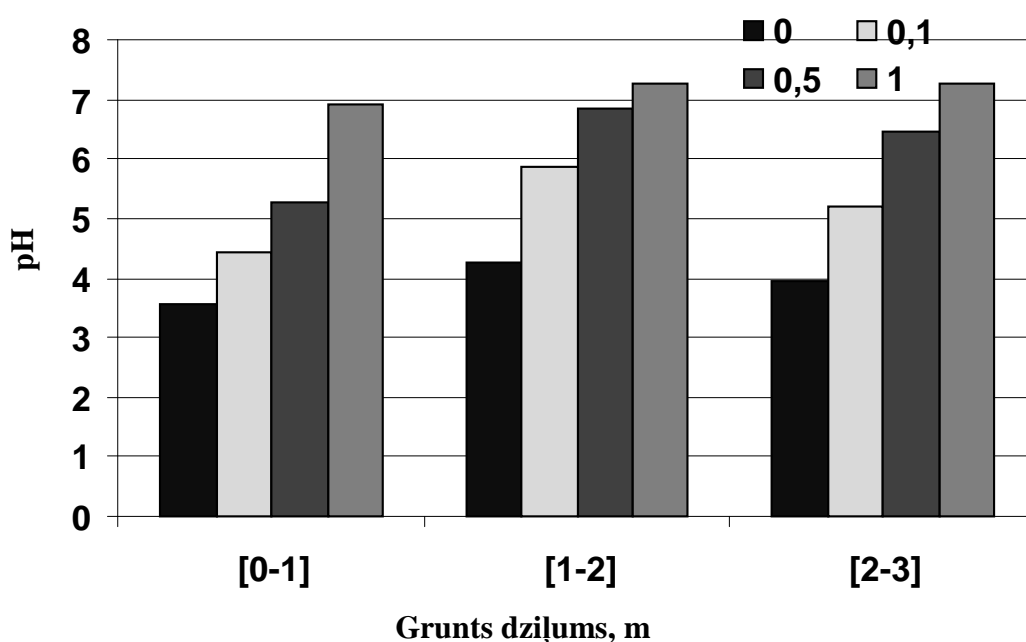
Bushnell Haas medium composition.

Sastāvdaļas	g/L
Magnija sulfāts	0.2
Kalcija hlorīds	0.02
Kālija fosfāts	1.0
Kālija hidroģēnfosfāts	1.0
Amonija nitrāts	1.0
Dzelzs hlorīds	0.05

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. Grunts pH vērtību izmaiņas atkarībā no pievienotās CaCO<sub>3</sub> koncentrācijas

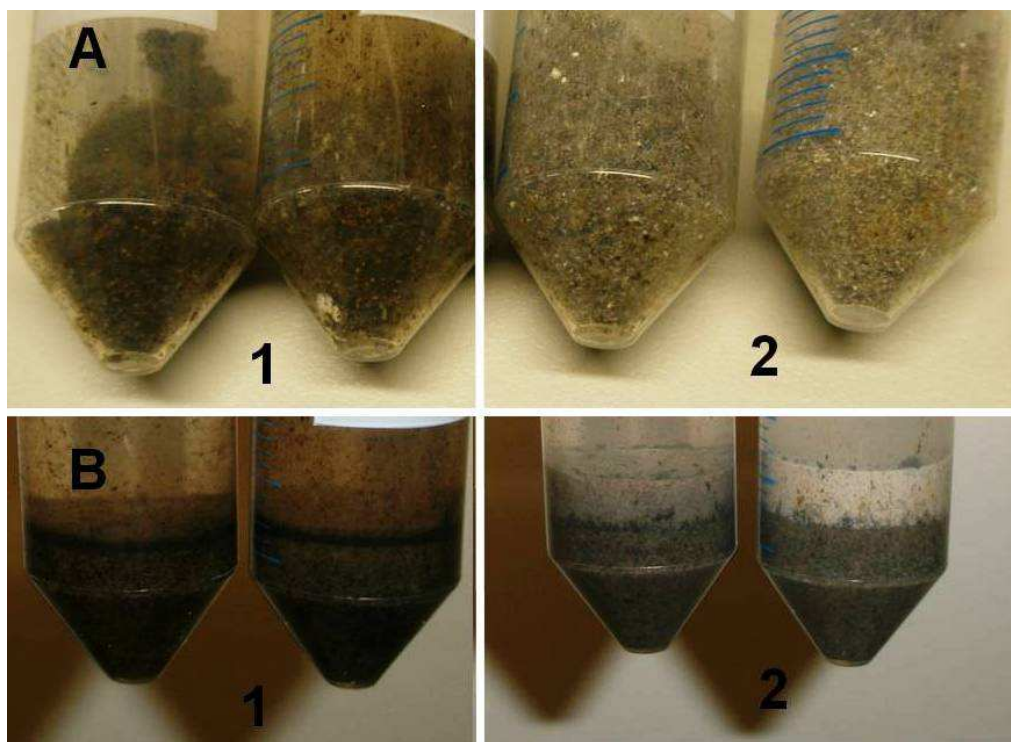
Lai paaugstinātu grunts pH līmeni, salīdzināja CaCO<sub>3</sub> dažādu koncentrāciju ietekmi uz grunts pH. Kā redzams 3. attēlā CaCO<sub>3</sub> pievienošana 0.5% koncentrācijā paaugstina pH līmeni vidēji trīs dziļuma slāņiem no 3.9 līdz 6.2, kas varētu labvēlīgi ietekmēt baktēriju dzīvotspēju un biodegradācijas aktivitāti (3,4.att.). No testētiem variantiem, tikai 2.variantam bija apstrāde ar Ca karbonātu. Trešajā attēlā var redzēt kā 0,5% CaCO<sub>3</sub> ir nogulsņējis grunts augšējos slāņos.



3.attēls. Grunts pH vērtību izmaiņas atkarībā no pievienotās CaCO<sub>3</sub> koncentrācijas.

0; 1; 5; 10 - CaCO<sub>3</sub> koncentrācijas (% , w/w).

Figure 3. Changes of the soil pH value in dependence on the concentration of CaCO<sub>3</sub> added to soil. 0; 1; 5; 10 – concentration of CaCO<sub>3</sub> (% , w/w).



4.attēls. Grunts bez apstrādes (1) un ar 0.5% CaCO<sub>3</sub> (2). A – sausa grunts; B – grunts slāņi sedimentācijas rezultātā ūdenī.

Figure 4. Soil without treatment (1) and amended with 0.5% CaCO<sub>3</sub>. A – dry soil; B – soil layers after sedimentation in water.

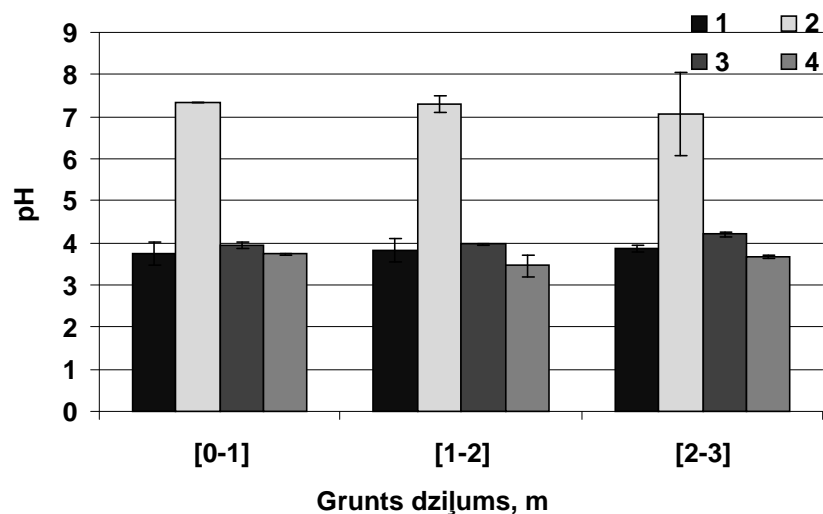
### 3.2. Grunts pH vērtības un elektrovadītspēja variantos ar dažādiem apstrādes veidiem pēc 23 diennakts inkubācijas

Aplūkojot grunts pH vērtības dažādos dziļumos pēc 23 diennaktīm (5.attēlsA), var redzēt, ka 2. variantam, pateicoties kaļķošanai, pH līmenis ir normas robežās, kas atbilst mikroorganismiem optimālajam augsnes pH līmenim kas ir 6-7. Augsnes pH līmenis [2m-3m] dziļumā statistiski būtiski atšķiras ar paraugu kas tika ņemts no [0m-1m] dziļuma. Trešajam un ceturtajam paraugam pH līmenis statistiski būtiski neatšķiras no kontroles varianta, kur pH līmenis ir virs 3,5.

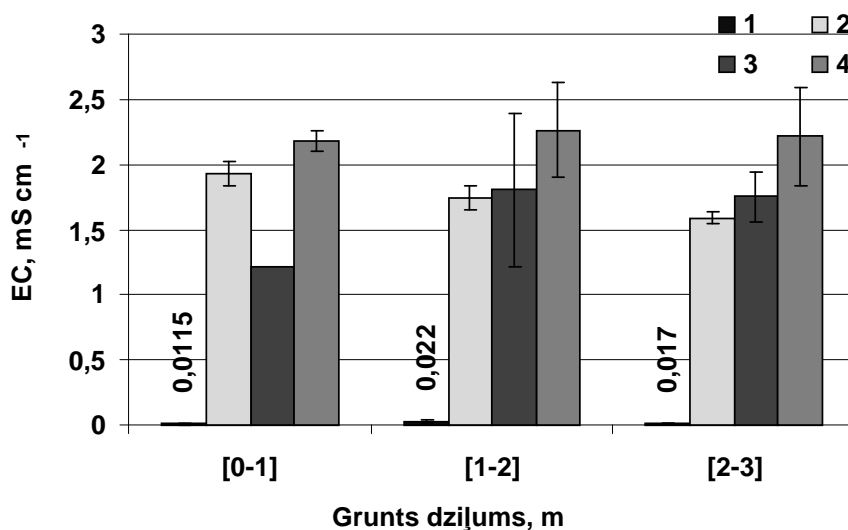
Nosakot augsnes elektrovadītspēju (5.att.B) var novērot, ka kontroles variantam EC ir ļoti zems, t.i., no 0.0115 līdz 0.022 mS cm<sup>-1</sup>, kas liecina par ļoti zemu sāļu saturu augsnē. Salīdzinot 2.,3., un 4.variantu var novērot, ka 4.variantam ir visaugstākā elektrovadītspēja, kas liecina par optimālu sāļu, minerālvielu daudzumu, ko varētu uzņemt mikroorganismi. Elektrovadītspējas vērtības korelē ar NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> jonu koncentrāciju augsnē (*Sumner, M. E., and W. P. Miller. 1996*)

Salīdzinot grunts pH vērtības ar elektrovadītspēju (5.att.A,B), kontroles variantam ir visnelabvēlīgākie augšanas apstākļi mikroorganismu sekmīgai attīstībai, jo pH līmenis ir mazāks

par 4 un grunts elektrovadītspēja arī ir ļoti zema, savukārt pēc 23 diennakšu ilgu inkubācijas perioda 2.variantam ir vispiemērotākie apstākļi mikroorganismu augšanai un attīstībai.



A



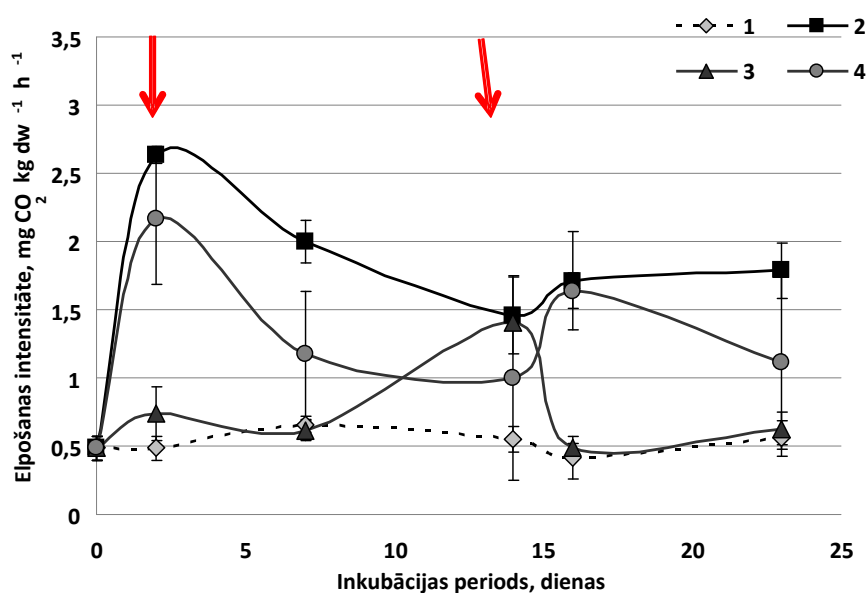
B

5.attēls. pH vērtības un elektrovadītspēja gruntī pēc 23 dienu eksperimenta. 1, 2, 3, 4 – apstrādes veidi (apstrādes veidu atšifrējumu skat. 1.att., 4.,5.tab.).

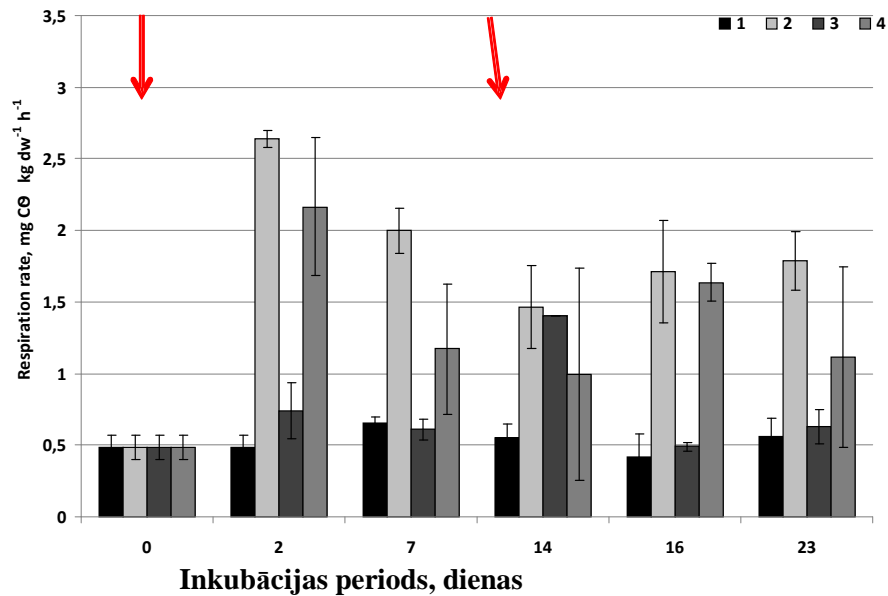
Figure 5. The pH values and electrical conductivity in soil after 23 days experiment. 1, 2, 3, 4 – types of treatment (description of treatments see in Fig.1, Tables 4 and 5).

### 3.3. Mikroorganismu elpošanas intensitāte gruntī inkubācijas laikā

Barības u.c. palīgvielu pievienošana gruntij ievērojami stimulēja mikroorganismu aktivitāti (6.att.). Tā, pēc 48st. inkubācijas kopš biostimulācijas, mikroorganismu elpošanas intensitāte variantos ar Mix A un Mix C sasniedza attiecīgi,  $2.64 \text{ CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$  un  $2.17 \text{ mg CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$ . Otrajam variantam elpošanas intensitāte bija visizteiktākā, salīdzinot ar visiem testētiem variantiem, Ņemot vērā komplekso formulu grunts apstrādei (Mix A), nav iespējams secināt par katras atsevišķas sastāvdaļas efektivitāti biostimulācijas procesā. Lai optimizētu piedevas sastāvu, ir nepieciešami papildus eksperimenti. Ceturtajam variantam elpošanas intensitāte arī bija salīdzinoši augsta, pēc sastāvdaļu pievienošanas. Kāpostu lapu gabaliņi grunti padara irdenāku un mikroorganismiem tiek nodrošināti aerobi apstākļi, tāpēc biodegradācija var notikt daudz sekmīgāk. Taču pēc 2.biostimulācijas 14 dienā, var novērot elpošanas intensitātes samazināšanos. Savukārt, variantā ar pievienoto bioogli (Mix B), mikroorganismu elpošanas intensitāte bija salīdzināma ar kontroli bez apstrādes, attiecīgi,  $0.74 \text{ CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$  un  $0.49 \text{ CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$  (6.att.).



A



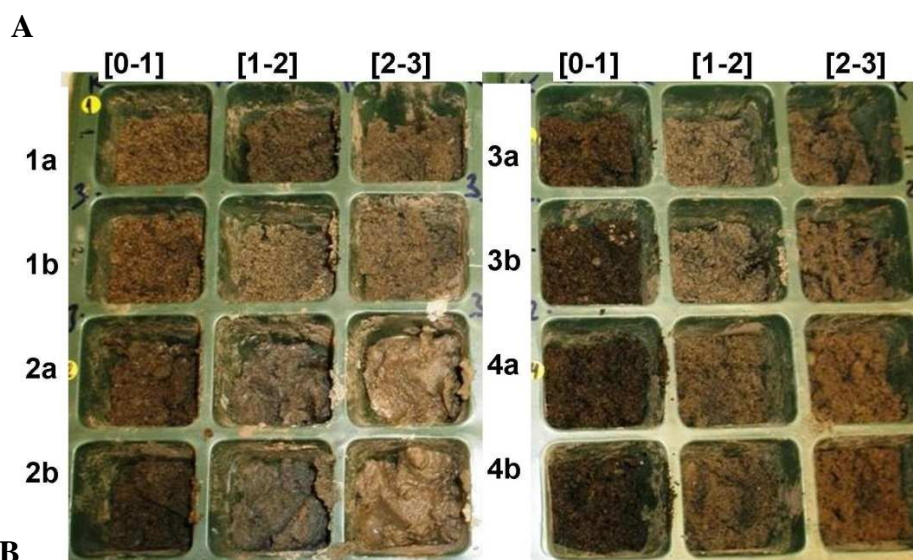
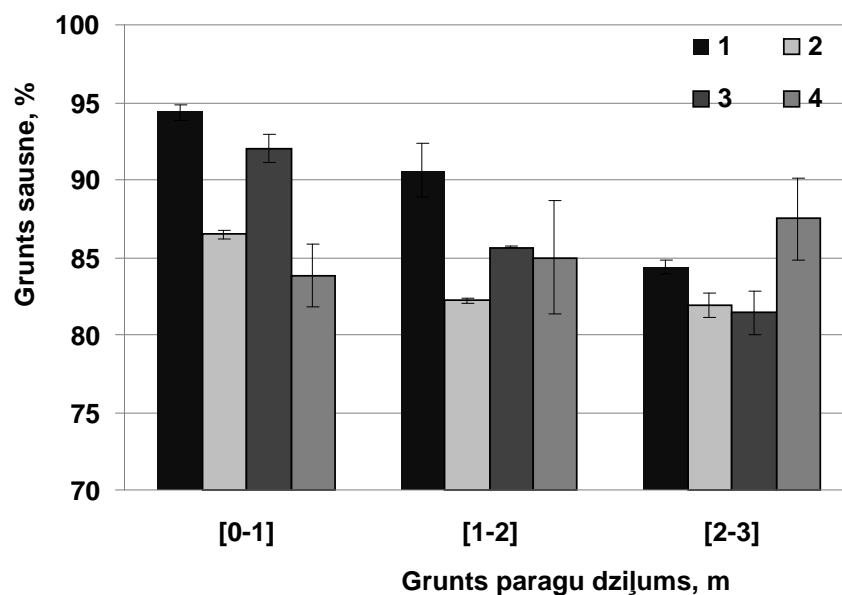
**B**

6.attēls. Mikroorganismu elpošanas intensitāte gruntī inkubācijas laikā. Sarkanās bultas norāda uz barības vielu pievienošanas dienu (1. un 2.biostimulācija). 1, 2, 3, 4 – apstrādes veidi (apstrādes veidu atšifrējumu skat. 2.att., 4.,5.tab.). A, B – identiski dati atspoguļti dažādā veidā.

Figure 6. Intensity of microbial respiration in soil during incubation. Red arrows indicate to the biostimulation (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> biostimulation). 1, 2, 3, 4 – types of treatment (description of treatments see in Fig.2, Tables 4 and 5). A, B – identical data are shown by different chart types.

### 3.4.Grunts mitruma ietekme uz mikroorganismu aktivitāti

Kā zināms, mitrums var ievērojami ietekmēt augsnes mikroorganismu aktivitāti, mainot tās fizikāli-ķīmiskās īpašības, t.sk. skābekļa pieejamību. Gruntij tika noteikts mitruma procentuālais daudzums, ko var apskatīt 6.Aattēlā. Kā redzams lielākais mitruma daudzums bija kontroles variantam [0m – 2m] dziļumam. Ūdens daudzums palielinās gruntī, palielinoties dziļumam, kā redzams paraugiem, kas ņemti dziļākos slāņos, tā vizuāli izskatās blīvāka. Aplūkojot grunts konsistenci un krāsu ir iespējams saskatīt virsējo slāņu [0m-1m] lielāko piesārņojumu ar ogļūdeņražiem, kas atbilst ķīmiskās testēšanas rezultātiem (1.tab.). Ogļūdeņražu frakcija grunts virsējos slāņos [0m-1m] ir ievērojami lielāka un to daļiņas ir izkārtotas biežāk. Savukārt grunts dziļākos slāņos tika novērots, ka ogļūdeņražu piesārņojuma fragmenti diametrā ir daudz lielākas ~5 cm, taču to sastopamības biežums augsnē bija ievērojami retāks.



7.attēls. Grunts paraugu atšķirības pēc mitruma. A – mitruma rādījumi; B – grunts konsistence un krāsa. 1, 2, 3, 4 – apstrādes veidi (apstrādes veidu atšifrējumu skat. 2.att., 4.,5.tab.).

Figure 7. Difference of soil samples by their moisture. A – data on moisture; B – soil consistence and color. 1, 2, 3, 4 – types of treatment (description of treatments see in Fig.2, Tables 4 and 5).

### 3.5. Grunts mikrobioloģiskā testēšana

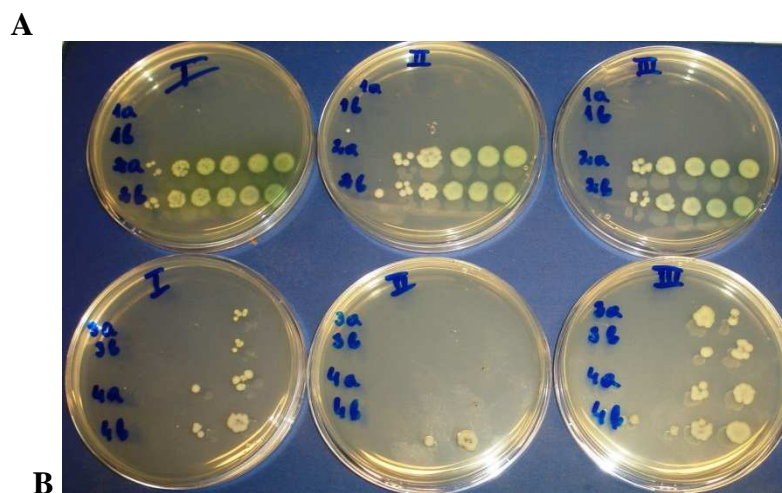
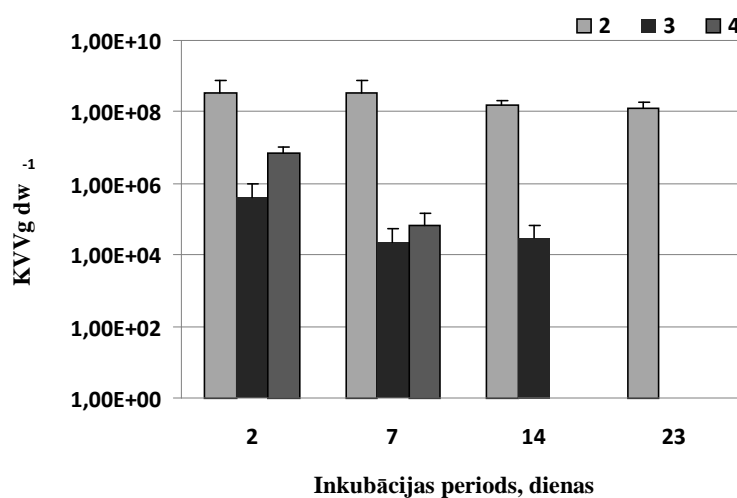
Grunts mikrobioloģiskā testēšana ietvēra pārbaudi uz dažādu mikroorganismu fizioloģisko grupu (t.i., aerobo heteterotrofu, aktinomicešu, rauga un micelijsēņu) klātbūtni. Grunts (kontroles variants, bez apstrādes) suspensijas kultivēšanas rezultātā netika konstatēta neviena KVV. Turpmāko inkubācijas periodu aerējot augsni (23 dienas) arī netika noteikta neviena mikroorganismu kolonija.

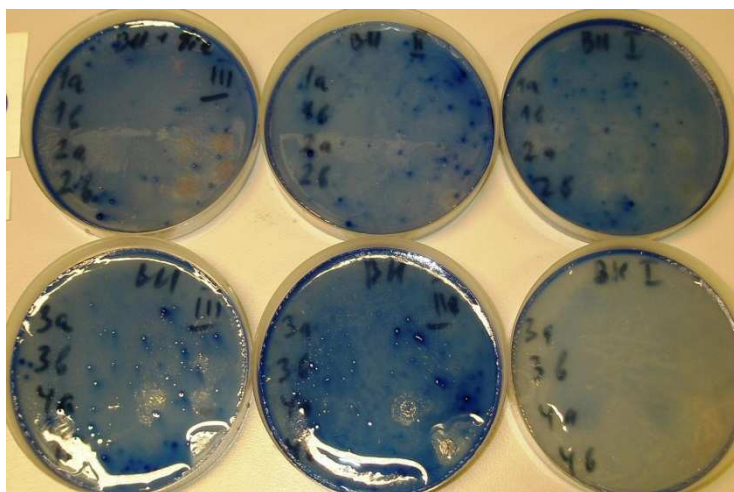
Salīdzinot visus trīs variantus vislielākais KVV skaits tika konstatēts otrajam variantam, 3. un 4. variantiem arī konstatēts samērā augsts KVV skaits, tomēr tas bija ievērojami ( $\approx 2-3$  pakāpes) mazāks, salīdzinot ar 2. variantu (8.A,B.att.).

Grunts suspensiju inkubēja uz selektīvās barotnes, kurai dīzeļdegviela ir pievienota kā vienīgais oglekļa avots. Šis tests pierādīja, ka mikroorganismiem gruntī piemīt ogļūdeņražu degradācijas aktivitāte (8.C.att.).

Micelijsēņu un aktinomicešu kolonijas nebija konstatētas nevienā no testētajiem variantiem.

Trešajam un ceturtajam variantam tika konstatētas arī raugu šūnas (9.att.)

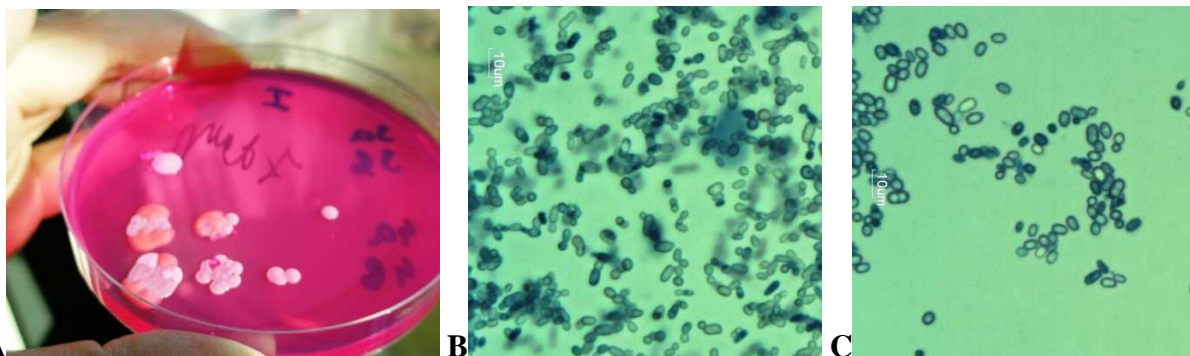




C

8.attēls. Kolonijas veidojošo vienību (KVV) skaita noteikšana gruntī inkubācijas laikā. A – KVV skaits gruntī dinamikā. Tryptone Glucose Yeast Extract Agar. B – Plates ar kolonijām. C – Bushnell Haas ar 2% agaru un 1% dīzeļdegvielu. Pēc 7 dienu inkubācijas agaru ar kolonijām nokrāsoja ar DCPIP (2.6-dichlorphenol indophenol), koloniju kontrastākai vizualizācijai.

Figure 8. The number of colony forming units (CFU) in soil during incubation. A – CFU count in soil in dynamics. Tryptone Glucose Yeast Extract Agar. B – Plates with colonies. C – Bushnell Haas with 2% agar and 1% diesel oil. After 7 days incubation, the agar with colonies was stained with DCPIP (2.6-dichlorphenol indophenol), for more contract visualization.



A

B

C

9.attēls. Rauga koloniju veidošana. A – plate ar rauga kolonijām. Rose Bengal Agar with Chloramphenicol. B, C – Rauga šūnu mikrogrāfijas. Bar=10µm.

Figure 9. Growth of yeast colonies. A – plate with yeast colonies. Rose Bengal Agar with Chloramphenicol. B, C – Yeast cells micrographs. Bar=10µm.

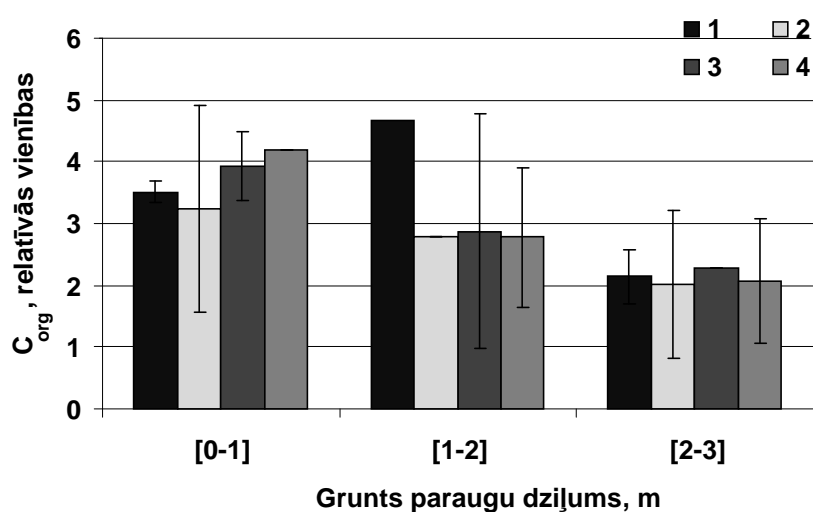
### 3.6. Organiskā oglekļa daudzuma noteikšana gruntī

Organiskā oglekļa ( $C_{org}$ ) koncentrācijas noteikšanu veica ar mērķi salīdzināt  $C_{org}$  gruntī bez apstrādes un pēc 23 d. eksperimenta. Tomēr, salīdzinot iegūtos datus, var secināt, ka pēc 23 d. inkubācijas vēl nav iespējams ar šo metodi novērot būtiskas atšķirības starp dažādiem grunts apstrādes veidiem un kontroli.

Dotajam piesārņojumam ir izteikti diskrēts raksturs, jo gruntī atrodas dažāda izmēra ogļūdeņražu frakcijas, kas ietekmē noteikšanas precizitāti. Visi trīs apstrādes veidi ietver sevī barības vielu un organisko vielu pievienošanu gruntij. Līdz ar to, kopējā organiskā oglekļa koncentrācija paraugos sastāv no grunts un biostimulācijas kompozīcijas organikas.

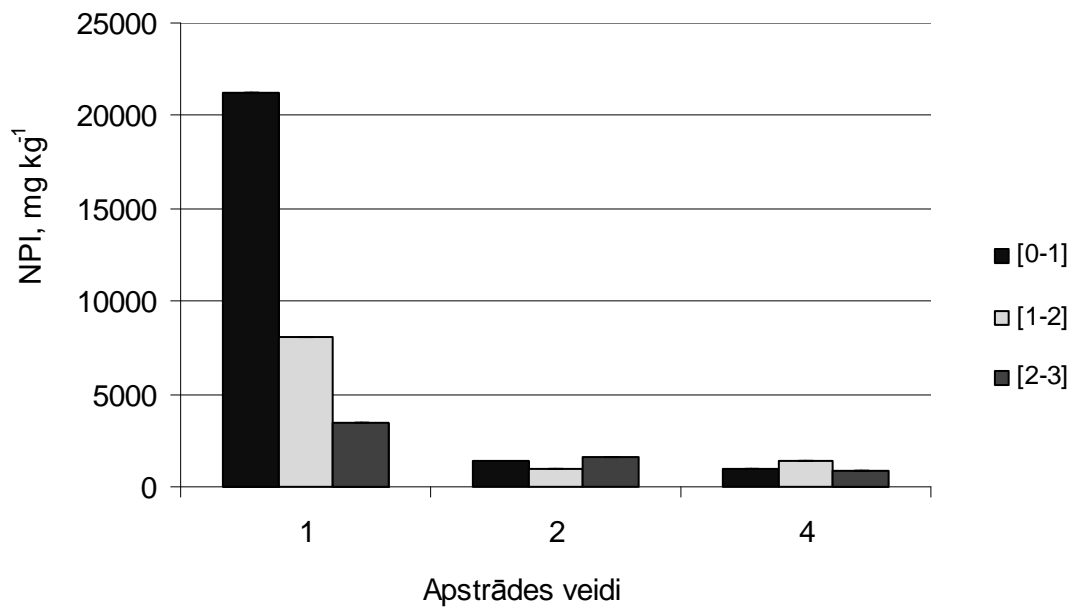
Ir novērota tendence  $C_{org}$  samazināties no grunts virsējā slāņa uz dziļumu (10.att.). Šāda tendence ir arī ogļūdeņražu koncentrācijai (11.att.).

Grunts testēšana uz ogļūdeņražu koncentrāciju ar hromatogrāfijas metodi pierādīja NPI samazināšanos pēc 23 d. apstrādes. Tas attiecināms uz visiem trīs dziļuma paraugiem (11.att.).



10.attēls. Organiskā oglekļa daudzuma noteikšana gruntī pēc 23 dienu inkubācijas. 1, 2, 3, 4 – apstrādes veidi (apstrādes veidu atšifrējumu skatīt 1.att., 4.,5.tab.).

Figure 10. Measurement of organic carbon in soil after 23 days incubation. 1, 2, 3, 4 – types of treatment (description of treatments see in Fig.1, Tables 4 and 5).



11.attēls. Ogļūdeņražu koncentrācija gruntī pēc 23 dienu inkubācijas. 1, 2, 4 - apstrādes veidi`1 (apstrādes veidu atšifrējumu skat. 2.att., 4.,5.tab.). NPI – naftas produktu indekss. (Intergeo-R).

Figure 11. Concentration of hydrocarbons in soil after 23 days incubation. 1, 2, 4 – types of treatment (description of treatments see in Fig.2, Tables 4 and 5). NPI – hydrocarbon oil index. (Data were provided by Intergeo-R).

#### 4. SECINĀJUMI

1. Testētajā gruntī (no trīs dziļuma līmeņiem) netika konstatēts neviens mikroorganisms, kurš spētu veidot koloniju. Tas norāda uz obligātu bioaugmentāciju (mikroorganismu pievienošana augsnei), lai uzsāktu biodegradācijas procesu. Eksperimentā izmantots baktēriju konsorcijs, kurš 23 diennakšu eksperimentā demonstrēja augstu izdzīvošanu ( $\approx 10^8$  KVV  $g^{-1}$ ) un elpošanas intensitāti.
2. Barības u.c. palīgvielu pievienošana gruntij ievērojami stimulēja mikroorganismu elpošanas intensitāti, kura pēc 48st. inkubācijas variantos ar Mix A un Mix C sasniedza attiecīgi,  $2.64 \text{ CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$  un  $2.17 \text{ mg CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ st}^{-1}$ . Ņemot vērā komplekso formulu grunts apstrādei, nav iespējams secināt par katras atsevišķas sastāvdaļas efektivitāti biostimulācijas procesā. Lai optimizētu piedevas sastāvu, ir nepieciešami papildus eksperimenti.
3. Grunts testēšana uz oglekļa dioksīda koncentrāciju ar hromatogrāfijas metodi pierādīja NPI samazināšanos pēc 23 d. apstrādes. Tas attiecināms uz visiem trīs dziļuma paraugiem.
4. Koksnes bioogles pievienošana piesārņotajai gruntij 2,5% koncentrācijā neuzrādīja biodegradācijas stimulējošo efektu testētajos apstākļos.
5. Mitruma daudzums grunts paraugos svārstījās no 5% līdz 19%. Tomēr, šīs atšķirības būtiski neietekmēja mikroorganismu koncentrāciju un aktivitāti. Noteicošais procesa norisē bija grunts apstrādes veids.

## 5. PATEICĪBAS

Vislielāko pateicību izsaku darba vadītājai Dr.biol. **Olgai Muterei** par palīdzību un atbalstu bakalaura darba tapšanas laikā!

Paldies LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtam par iespēju izstrādāt bakalaura darbu, kā arī institūta darbiniekiem par sadarbību!

Paldies darba recenzentam Dr.biol. **Reinim Rutkim** par darba recenzēšanu!

Izsaku pateicību LU Bioloģijas fakultātes un Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras darbiniekiem par sadarbību!

Darbs izstrādāts, pateicoties Valsts Pētījuma Programmas apakšprojekta **Y3-200033-ZR-N-270 un līgumdarba L-20180-ZR-S-270** finansējumam.

## 6. LITERATŪRAS SARAKSTS

- Alvarez, P.J.J., P.J. Anid and T.M. Vogel, 1991. Kinetics of aerobic biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material. *Biodegradation*, 2: 43-51.
- Anonīms, United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Soil respiration  
[http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/nrcs142p2\\_053267.pdf](http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_053267.pdf)
- Askari, K. & Pollard, S.J.T. (2007). Weathered Hydrocarbon Wastes: A Risk Management Primer. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 37, No. 3, pp. 199-232, ISSN 1064-3389.
- Atlas, R. M., (1988). Biodegradation of hydrocarbons in the environment, In: *Environmental Biotechnology* Omenn, GS EdPlenum Press, NewYork.
- Atlas, R.M. and R. Bartha, 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Adv. Microbial Ecol.*, 12: 287-338.
- Atlas, R.M., 1995. Bioremediation. *Chem. Eng. News*, 73: 32-42.
- Austin, B.; Calomiris, J. J. Walker, J. D. & Colwell R. R. (1977). Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, pp. 60-68
- Ayers SH, Mudge CS. 1921. The relation of vitamins to the growth of a *Streptococcus*. *J Bacteriol*, VII:449–464.
- Balba, M.T.; Al-Awadhi, N. & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 32, No. 2, pp. 155–164, ISSN 0167-7012.
- Banat, I.M., 1995. Biosurfactans characterization and use in pollution removal: State of the art: A review. *ACTA Biotechnol.*, 15: 251-267.
- Banat, I.M., R.S. Makkar and S.S. Cameotra, 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 53: 495-508.
- Bogan B.W.; Lahner, L.M., Sullivan, W.R. Paterek, J.R. (2003). Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *J. App. Microbiol.* 94, pp. 230-239
- Bonnier, P.D., G.L. Akoun, E.C. Cadron, E.D. Edwards and W. Hockness, 1980. A technique for the disposal of oily refinery wastes. Report No. 3/10. The Hague: Concawe.
- Caravaca, F. and A. Roldan, 2003. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean condition. *Geoderma*, 117: 53-61.

- Cooney, J.J., 1980. Microorganisms capable of degrading refractory hydrocarbons in ohio waters. Ohio Water Resources Center, Columbus, OH for the Office of Water Research and Technology, Washington, D.C. Report No. 493X. [https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/1811/36346/1/OH\\_WRC\\_493X.pdf](https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/1811/36346/1/OH_WRC_493X.pdf).
- Coulon F, Delille D (2003) Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil Gas Sci Technol* 58:469–479
- Cunningham, S. D., Berti, W. R., (1993). Remediation of contaminated soil with green plants: An overview. In: *Vitro cellular and Developmental Biology*, Plant 29. 207-212.
- Cuypers, C.; Pancras, T.; Grotenhuis, T. & Rulkens, W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-  $\beta$ -cyclodextrin and triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*, Vol. 46, No. 8, pp. 1235–1245, ISSN 0045-6535.
- Eckenfelder, W.W.J. and R.D. Norris, 1993. Applicability of Biological Process for Treatment of Soils. In: *Emerging Technologies in Hazardous Waste Management*, Tedder, D.W. and F.G. Pohland (Eds.). American Chemical Society, Washington, D.C., pp: 138-158.
- Edwards KR, Lepo JE, Lewis MA. 2003. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Mar Pollut Bull.* 46(10):1309-16.
- El-Nawawy, A.S., F. Ghobrial and A. Elimam, 1987. Feasibility study of disposal of oily sludge in Kuwait. *Proceedings of the 2nd International Conference on New Frontiers for Hazardous Waste Management*, Sept. 27-30, Pittsburgh, PA., USA., pp: 162-168.
- Fleming HP, Kyung KH. 1994. Antibacterial activity of cabbage juice against lactic acid bacteria. *J Food Sci*, 59:125.
- Franco, I., M. Contin, G. Bragato and M. De Nobili, 2004. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma*, 121: 17-30.
- Fritsche, W., and M. Hofrichter. 2000. Aerobic degradation by microorganisms, p. 146-155. In J. Klein (ed.), *Environmental processes II—soil decontamination*, vol. 11b. *Biotechnology*, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. Brassington, K.J.; Hough, R.L.; Paton, G.I.; Semple, K.T.; Risdon, G.C.; Crossley, J.; Hay, I.;
- Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Tech* 34:447–494

- Grube M, Muter O, Strikauska S, Gavare M, Limane B. 2008. Application of FT-IR for control of the medium composition during biodegradation of nitroaromatic compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 1545-1549.
- Headley J.V., Goudey S., Birkholz D., Linton L.R., Dickson L.C. 2001. Toxicity Screening of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene (BTEX) Hydrocarbons in Groundwater at Sour-Gas Plants , *Canadian Water Resources Journal / Revue canadienne des ressources hydriques*, 26:3, 345-358, DOI: 10.4296/cwrj2603345
- Hooper M. Soil toxicity and bioassessment test methods for ecological risk assessment. Office of Environmental Health Hazard Assessment. OEHHA Ecotoxicology 2008.
- Huesemann, M.H. and K.O. Moore, 1993. Compositional changes during landfarming of weathered Michigan crude oil-contaminated soil. *J. Soil Contam.*, 2: 245-264.
- Johns, F.J. and E.K. Nyer, 1996. Miscellaneous in Situ Treatment Technologies. In: *In situ Treatment Technology*, Nyer, E.K., D.F. Kidd, P.L. Palmer, T.L. Crossman and S. Fam et al. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp: 289-319.
- Kirk, P. W. & Gordon A. S. (1988). Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. *Mycologia*, 80, pp. 776-782
- Klimiuk E. & Łebkowska M. (2005). Biotechnology in protection of environmental (in Polish). Wydawnictwo Naukowe PWN S.A, Warszawa
- Laškova A, Laškova E, Grinbergs A, Uljanovs A, Mutere O. 2011. Consortium of microorganisms-destructors P1035 and uses thereof for oil product degradation. Latvian patent LV 14347, *Patenti un preču zīmes*, vol.5, pp. 647-648, 2011.
- Lewis A. 1991. CHRONIC AND SUBLETHAL TOXICITIES OF SURFACTANTS TO AQUATIC ANIMALS: A REVIEW AND RISK ASSESSMENT. *War. Res. Vol. 25(1):101-113.*
- Loeber, R.C.; Mc Millen, S.J. & Webster, M.T. (2001). Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons. *Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management*, Vol. 5, No. 2, pp. 78–87, ISSN 1090-025X.
- Lytle, J. S. and Lytle, T. F., (1987). The role of *Juncos roemerianus* in clean up of oil-polluted sediments. *Proceeding of the 1987 Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute, Washington, DC. 495-501.
- Madsen, E.L., 1991. Determining in situ biodegradation: Facts and challenges. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1663-1673.
- Maletić, S.; Dalmacija, B.; Rončević, S.; Agbaba, J. & Ugarčina Perović, S. (2011). Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil.

- Journal of Environmental Science and Health, Part A, Vol. 46, No. 10, pp. 1042-1049, ISSN 1093- 4529.
- Margesin, R.; Zimmerbauer, A. & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, Vol. 40, No. 4, pp. 339–346, ISSN 0045-6535.
- Mehrasbi et Iranian J Publ Health, Vol. 32, No. 3, pp.28-32, 2003. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil
- Millioli VS, Servulo ELC, Sobral LGS, Carvalho DD. Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global NEST Journal*. 2009;11:181–188.
- Morgan, P. and R.J. Watkinson, 1989. Hydrocarbon degradation in soils and method for soil biotreatment. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 8: 305-333.
- Muter O, Berzins A, Strikauska S, Pugajeva I, Bartkevics V, Truu J, Truu M, Steiner C. 2014. The effects of woodchip- and straw-derived biochars on the persistence of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109, 93-100.
- Muter O, Versilovskis A, Scherbaka R, Grube M, Zarina Dz. 2008. Effect of plant extract on the degradation of nitroaromatic compounds by soil microorganisms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 1539-1543.
- National Research Council (NRC), (1985). *Oil in the sea; inputs, fates and effects*. National Academy Press, Washington, DC.
- Nito, S., Y. Akimoto, T. Imagawa and Y. Inouye, 1997. Comparative study of on formations of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, polychlorinated dibenzofuran and related compounds by pyrolysis. *Chemosphere*, 35: 1717-1727.
- Norris, R.D., R.E. Hinchee, R. Brown, P.L. McCarty and L. Semprini et al., 1994. *Handbook of Bioremediation*. 1st Edn., Lewis Publishers, Boca Raton, ISBN: 1566700744, pp: 257.
- Orzech, M., J. Solyst and P. Thompson, 1991. *State`s Use of Bioremediation: Advantages, Constraints and Strategies*. enter for Policy Research, National Governors Association, USA.
- Petrović, O.; Knežević, P.; Marković, J. & Rončević, S. (2008). Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 74, No. 2-3, pp. 110–113, ISSN 0167-7012.

- Poremba K., Gunkel W., Lang S., Wagner F. 1991. Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environmental Toxicology and Water Quality Special Issue: Second Biennial Water Quality Symposium*, vol.6(2): 157-163.
- Providenti, M.A., C.A. Flemming, H. Lee and J.T. Trevors, 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17: 15-26.
- Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol* 90:159–168
- Rowel DL. *Soil Science: Methods and Applications*. Taylor & Francis, 1994.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Rumor, N. P., Dushenkuv, V., Ensley, B. D., Chet, I., Raskin, I., (1995). Phytoremediation A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment, using plants. *Biotechnol.*, 13, 468-474.
- Schnoor, J. L., Licht, L. A., McCutcheon, S. C., Wolfe, N. L., Carreira, L. H., (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 29 (7), 318A-323A.
- Schulte EE. Recommended Soil Organic Matter Tests. In: Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region, North Central Regional Publication No. 221, North Dakota Agricultural Experiment Station, North Dakota State University, Fargo, 1988, Chapter 8, pp.52-60.
- Semple, K.T.; Morris, A.W.J. & Paton, G.I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, Vol. 54, pp. 809-818, ISSN 0022-4588.
- Shanks and McEwan (Southern) Ltd. (1998). Calvert. Landfill site; Information Booklet, Woodside House, Church Road, Woburn Sands, Milton Keynes, Bucks MK17 8TA.
- Song, X.M., A. Hase, A. Laukkarinen, S. Salonen and E. Hakala, 1992. The effect of oxygen enriched burning in hazardous-Waste incineration. *Chemosphere*, 24: 249-259.
- Stomp, A. M., Han, K. H., Gordon, M. P., (1993). Genetic improvement of tree species for remediation of hazardous wastes. *In vitro cellular and Developmental Biology-Plant*. 29, 227-232.
- Sumner, M. E., and W. P. Miller. 1996. Cation exchange capacity and exchange coefficients. Pages 1201-1229 in D. L. Sparks, A. L. Page, and P. A. Helmke, editors, *Methods of Soil Analysis. Part 3, Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.

- Turgay, O.C., E.E. Erdogan and A. Karaca, 2010. Environmental Monitoring and Assessment. Vol. 170, Springer, Netherlands, pp: 45-58.
- Ueno A, Ito Y, Yumoto I, Okuyama H (2007) Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. World J Microbiol Biotechnol 23:1739–1745
- Vogel TM (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Curr Opin Biotechnol 7:311–316
- Walter, M.V., E.C. Nelson, G. Firmstone, D.G. Martin, M.J. Clayton, S. Simpson and S. Spaulding, 1997. Surfactant enhances biodegradation of hydrocarbons: Microcosm and field study. J. Soil Contam., 6: 61-77.
- Wang, X. and R. Bartha, 1990. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. Soil Biol. Biochem., 22: 501-505.
- Wolicka, D.; Suszek, A. Borkowski, A. & Bielecka A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products, Bioresource Technology, pp. 3221-3227

Eglitis A., Dokukins E., Berzins A., Muter O. Solutions for decreasing a crude oil inherent toxicity to bacteria-biodegraders. [Journal of Biotechnology](#), In Press, European Biotechnology Congress, Riga, Latvia, May 5-7, 2016.

## Solutions for decreasing a crude oil inherent toxicity to bacteria-biodegraders



**Arturs Eglitis, Eduards Dokukins, Andrejs Berzins, Olga Muter**  
 Institute of Microbiology & Biotechnology, University of Latvia, 1 Jelgavas Str., Riga LV-1004, Latvia

### Introduction

Microorganisms with hydrocarbons-degrading activity have a great biotechnological potential. However, the process of biodegradation could be notably inhibited due to an inherent toxicity of crude oil. A broad spectrum of technological solutions has been recently applied worldwide to overcome this limitation. Our study was focused on the optimization of environmental conditions for bacterial activity in the presence of crude oil. It attributed to both, production of microbial biomass and its introduction to the contaminated soil/water.

### Materials & Methods

The bacterial consortium with hydrocarbons degrading activity containing five *Stenotrophomonas maltophilia* strains and three *Pseudomonas* spp., was used in this study [1]. Oxygen consumption by consortium bacteria was measured using OxiTop® OC100 Inductive Stirring System (WTW Measurement Systems, Germany). The bottles contained BH medium as a base, and the total volume of liquid in one bottle was 100 mL. Ceramic granules fabricated from Quaternary clay at 1200 °C, were tested for their flotation ability in the water model system containing silicone oil. In the biodegradation experiments with soil contaminated by crude oil, microbial activity was estimated by respiration intensity chromatography methods. An intensity of microbial respiration was determined by titration of 5 mL 0.1 M NaOH with 0.1 M HCl, using 1% phenolphthalein as an indicator, after 4 h incubation of the flask with NaOH in the (closed) bottle with soil.

### Results & Discussion

Experiments on adaptation of bacterial culture to the hydrocarbons during serial inoculations have revealed the preferences among different hydrocarbons, e.g., diesel oil, paraffin, etc.

A directed evolution in case of the paraffin-amended medium considerably improved bacterial activity. It can be stated that only adapted bacteria can effectively degrade paraffin's components under tested conditions (Fig. 1). Despite the fact of intensive bacteria growth in medium with 0.5% molasses, addition of contaminated soil resulted in a decrease of BOD, as compared to the sets with media amended by paraffin and diesel, i.e.,  $628 \pm 28 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ;  $806 \pm 70 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  and  $821 \pm 14 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ , respectively (Fig. 2) [2].

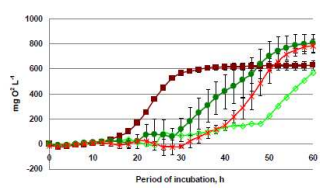


Fig. 1. Evolution of the biological oxygen demand by bacterial consortium during serial inoculations in the OxiTop® OC100 system (20°C). Paraffin was used as a nutrient amendment to the BH medium. PI, PII – 3 vol% paraffin; S – 3g soil in BH medium without consortium. PIII contained 95 mL BH medium; 3g soil contaminated with crude oil and 2 mL inoculum from the series II with corresponding amendment. I, II, III – serial inoculations of bacterial consortium.

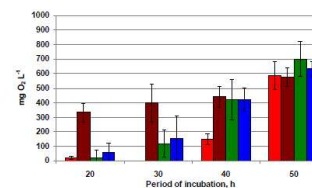


Fig. 2. Biological oxygen demand by bacterial consortium incubated in BH broth with soil (S) contaminated by crude oil ( $94020 \pm 990 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Bacterial consortium was previously incubated in the presence of 0.5% molasses (MII); 3% paraffin (PIII) and 3% diesel oil (DII). Each bottle contained 95 mL BH medium; 3g soil contaminated with crude oil and 2 mL inoculum from the series II.

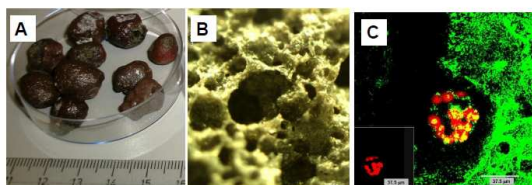


Fig. 3. Surface of ceramic granules. A – size and shape of the granules; B – light micrograph; C – confocal laser scanning micrographs of ceramic granules after the 70 day flotation experiment in water model system (WMS) spiked with mineral oil and bioaugmented by a hydrocarbon-degrading bacterial consortium. Green colour corresponds to abiotic, while red and yellow – biotic substances, respectively. Black zones correspond to non-scanned surfaces, which are situated either above or below the scanning zone [4].

Composition of nutrient amendments added to soil plays a crucial role in the biodegradation process. Different nutrient formulations were tested in order to enhance the microbial viability and activity. Soil contaminated by crude oil (up to  $21 \text{ g kg}^{-1}$ ), did not contain culturable microorganisms. Addition of a specific nutrient formulation to soil resulted in a considerable increase of microbial respiration activity (Fig. 4), as well as appearance of culturable yeasts. Chromatography analysis indicated, that biostimulation resulted in a decrease of hydrocarbons concentration in soil during 14 days laboratory experiment (Fig. 5).

Immobilization of cells on the ceramic support was performed. Alterations in cell growth, physiology and metabolic activity may be induced by cell immobilization. A selection of the most appropriate types of ceramic beads for bacteria immobilization was made in our earlier study [3]. Besides, the beads with a density below  $1 \text{ g cm}^{-3}$  were fabricated and tested for capturing the floating oils. The presence of oil in the liquid phase improved granules' flotation, probably due to sorption of oil by ceramics. Granules were shown to be appropriate for bacterial colonization. Randomly distributed cells as well as microcolonies were detected on the surface of granules (Fig. 3). Bacteria formed long finger-like colonies on the surface and the colonies were not observed deep inside pores [4].

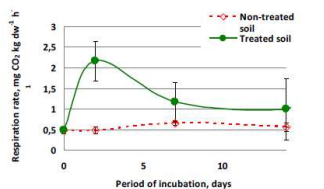


Fig. 4. Intensity of microbial respiration in soil during incubation.

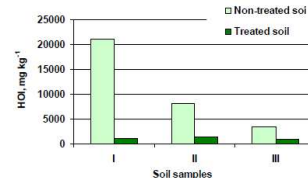


Fig. 5. Changes of the hydrocarbons concentration in soil after 14 days laboratory experiment. HOI – hydrocarbon oil index.

### Conclusions

Bacterial respiration studied in the OxiTop® device, indicated that a directed evolution in case of the paraffin-amended medium considerably improved the bacterial activity.

Ceramic granules fabricated from Quaternary clay at 1200 °C, were shown to have a high flotation ability during the first 20 days, which was increased by the presence of oil in the water model system. Granules were shown to be appropriate for bacterial colonization.

Addition of a specific nutrient formulation to soil resulted in a considerable increase of microbial respiration activity. Further study on soil clean-up technology is necessary, with emphasis on: i) maintaining the microbial activity during a long period, when easily degradable hydrocarbons are degraded; ii) scaling-up of the process, according to the specific environmental conditions.

### References

- [1] A. Laškovs, E. Laškovs, A. Grinbergs, A. Uļjanovs, O. Mutere, „Consortium of microorganisms-destroyers P1035 and uses thereof for oil product degradation”, Latvian patent LV 14347, *Patenti un precu žinies*, vol.5, pp. 647-648, 2011.
- [2] E. Dokukins, O. Muter. Comparison of paraffin and diesel oil as cultivation medium supplements for preparing a hydrocarbon-degrading bacterial biomass. *Scientific Journal of RTU. Materials Sciences and Applied Chemistry*, Accepted, 2016.
- [3] O. Muter, K. Potapova, V. Nikolajeva, Z. Petriņa, T. Griba A. Patmalnieks, R. Švinka, V. Švinka. Comparative study on bacteria colonization onto ceramic beads originated from two Devonian clay deposits in Latvia. *Scientific Journal of RTU. Materials Sciences and Applied Chemistry*, 2012 (26), 134-139.
- [4] O. Muter, A. Berzins, T. Petriņa, D. Driņķis, V. Švinka. Bacterial colonization on ceramic beads for