RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **208695**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **381901**

(51) Int.Cl.
B09C 1/10 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **05.03.2007**

(54) **Sposób fitoremediacji gleb z produktów ropopochodnych metodą "in situ", wspomaganej biopreparatami**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.09.2008 BUP 19/08

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2011 WUP 05/11

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ANNA MAŁACHOWSKA-JUTSZ, Gliwice, PL
KORNELIUSZ MIKSCH, Gliwice, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Urszula Ziółkowska

PL 208695 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób fitoremediacji gleb z produktów ropopochodnych metodą „in situ", wspomaganej jednocześnie biopreparatem bakteryjnym i grzybowym.

Jednym z najważniejszych odnawialnych bogactw naturalnych Ziemi i podstawą funkcjonowania wszystkich istniejących na niej ekosystemów lądowych są gleby. Będąc zewnętrzną, powierzchniową warstwą litosfery są one w największym stopniu narażone na degradację w wyniku gospodarczej działalności człowieka. Powodem takiego stanu rzeczy jest intensyfikacja rolnictwa i przemysłu. Zanieczyszczenia kumulując się w glebach stanowią aktualne oraz potencjalne zagrożenie, nie tylko dla ekosystemów lądowych, ale również dla wód powierzchniowych, gruntowych i podziemnych oraz dla zdrowia i życia człowieka. Największy udział wśród zanieczyszczeń gleb i wód gruntowych stanowią substancje ropopochodne. Wraz z rosnącym skażeniem tych środowisk zasadnym staje się poszukiwanie jak najbardziej efektywnych metod ich usuwania (unieszkodliwiania). Wysoki stopień akceptacji społecznej mają metody biologiczne, wykorzystujące zarówno rośliny, jak również różnego rodzaju mikroorganizmy glebowe. Prawidłowy rozwój roślin na terenach zanieczyszczonych, wymaga wytworzenia przez nie odpowiednich mechanizmów ochronnych, w których specyficzną rolę odgrywają grzyby mikoryzowe. Zależność ta jest bardzo istotna w procesach fitoremediacji gruntów, które ze względu na łatwe wdrożenie i stosunkowo niskie nakłady stanowią alternatywę dla tradycyjnych procesów rekultywacji zanieczyszczonych gruntów.

Dotychczas rola mikoryzy w fitoremediacji skupiała się głównie na podniesieniu tolerancji roślin na skażenie gleby metalami ciężkimi oraz utrzymaniu wegetacji na terenach zanieczyszczonych w celu ich ochrony przed dalszą erozją. Powszechne występowanie mikoryz, ich kluczowa rola związana z odpornością roślin na stres oraz ich dominujący wpływ na interakcje zachodzące w ryzosferze skłaniają do wykorzystania grzybów mikoryzowych w procesach degradacji zanieczyszczeń organicznych podczas fitoremediacji. Sposób fitoremediacji gleb z produktów ropopochodnych metodą „in situ", wspomaganej biopreparatem bakteryjnym i grzybowym, charakteryzuje się tym, że jako preparat bakteryjny stosuje się autochtoniczne bakterie pobrane z próbek gruntu przeznaczonego do oczyszczania, z których izoluje się dominujące szczepy, o najwyższej zdolności do rozkładu węglowodorów, a jednocześnie nie wykazujące antagonizmu pomiędzy sobą, namnaża się je na podłożu minimalnym z dodatkiem 1% węglowodorów jako jedynego źródła węgla i wprowadza do zanieczyszczonego gruntu w ilości minimalnej, co najmniej 10^{11} komórek/kg suchej masy oczyszczanego gruntu. Równolegle wprowadza się biopreparat grzybowy, który stanowią żywe. nie porażone przez patogeny spory grzybów mikoryzowych wyizolowane z zanieczyszczonego gruntu przeznaczonego do oczyszczania. Spory grzybów mikoryzowych korzystnie w formie inokulum, wprowadza się do gruntu przeznaczonego do oczyszczania w ilości minimalnej 10^9 spor/kg gruntu przeznaczonego do oczyszczania. Po wprowadzeniu biopreparatów teren przeznaczony do oczyszczania obsiewa się wytypowanymi (w badaniach laboratoryjnych) roślinami odpornymi na zanieczyszczenia znajdujące się w oczyszczanym gruncie. Zarówno namnożone bakterie, jak i spory grzybów, wprowadza się do gruntu poprzez jego zraszanie.

Sposób według wynalazku polega na tym, że wprowadza się do oczyszczanego gruntu biopreparat grzybowy oraz bakteryjny, a także obsiewa się rekultywowany teren wybranymi roślinami.

- Biopreparat grzybowy stanowią żywe, nie porażone przez patogeny spory grzybów mikoryzowych wyizolowane z zanieczyszczonego gruntu przeznaczonego do oczyszczania. Spory grzybów mikoryzowych korzystnie w formie inokulum, wprowadza się do gruntu przeznaczonego do oczyszczania w ilości minimalnej 10^9 spor/kg gruntu przeznaczonego do oczyszczania. Równolegle obsiewa się rekutywowany teren roślinami (wytypowanymi wcześniej podczas badań laboratoryjnych) odpornymi na zanieczyszczenia znajdujące się w rekultywowanym gruncie.
- Jako preparat bakteryjny stosuje się autochtoniczne bakterie pobrane z próbek gruntu przeznaczonego do oczyszczania, z których izoluje się dominujące, o najwyższej zdolności do rozkładu węglowodorów, a jednocześnie nie wykazujące antagonizmu pomiędzy sobą, namnaża się i wprowadza do zanieczyszczonego gruntu w ilości minimalnej co najmniej 10^{11} komórek/kg suchej masy oczyszczanego gruntu.
- Równolegle obsiewa się rekultywowany teren roślinami (wytypowanymi wcześniej podczas badań laboratoryjnych) odpornymi na zanieczyszczenia znajdujące się w rekultywowanym gruncie.

Wynalazek pozwala na jeszcze bardziej efektywny sposób remediacji zanieczyszczeń organicznych z gruntów. Znane są bardzo liczne sposoby biodegradacji zanieczyszczeń organicznych. Szybkość przebiegu tych procesów zależy przede wszystkim od czynników fizyko-chemicznych, biologicz-

nych oraz środowiskowych. Istnieje tysiące opisów patentowych dotyczących sposobów mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych. Największą ich wadą jest ograniczony zakres stosowania, powolny rozkład zanieczyszczeń trwający od 2-5 lat, niski procent usunięcia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, a zwłaszcza tych z 4, 5 i 6 pierścieniami w cząsteczce. Z kolei największą barierę w procesach fitoremediacji stanowi wytworzenie odpowiedniej pokrywy roślinnej na terenach silnie zanieczyszczonych i zdegradowanych. Prawidłowy rozwój roślin na terenach zanieczyszczonych wymaga zatem wytworzenia odpowiednich systemów ochronnych przez rośliny. Jednym z takich systemów może być symbioza roślin z grzybami mikoryzowymi, w której wytworzona sieć powiązań pomiędzy rośliną i grzybem pozwala na zwiększenie efektywności pobierania wody, azotu, fosforu, mikro- i makroelementów. Wszystko to sprawia, że mikoryzowane rośliny wykazują mniejszą podatność na stres związany z zanieczyszczeniem środowiska, co istotnie zwiększa szanse ich przeżycia na obszarach skażonych.

Zaletą fitoremediacji wspomaganej biopreparatem grzybowym i bakteryjnym uzyskanym z rodzimych mikroorganizmów jest przyspieszenie biodegradacji zanieczyszczeń organicznych przez mikroorganizmy ryzosferowe bez okresu dodatkowej ich adaptacji. Dodatkowo dzięki wprowadzeniu grzybów mikoryzowych możliwe jest prawidłowe wykształcenie pokrywy roślinnej na terenach zanieczyszczonych oraz obniżenie stresu roślin związanego z brakiem dostępności niektórych składników pokarmowych, wody, jak również z samym skażeniem. Duża różnorodność mikroorganizmów ryzosferowych i szeroki wachlarz enzymatyczny jaki posiadają, zapewnia rozkład nawet najbardziej skomplikowanych i mało podatnych na biodegradację zanieczyszczeń.

Największą zaletą stosowania inokulum w postaci zarodników są ich niewielkie wymiary, dzięki czemu takie inokulum można wprowadzać do podłoży w formie roztworu podawanego przez linie kroplujące lub za pomocą opryskiwaczy, podobnie w przypadku biopreparatu bakteryjnego. Dodatkowo w razie potrzeby można przy użyciu tej samej instalacji wprowadzić substancje nawozowe.

Obsadzenie terenu roślinami (z dodatkiem biopreparatów) nie tylko wspomaga proces biodegradacji zanieczyszczeń, przyczynia się do ochrony rekultywowanego terenu przed dalszą erozją jak również posiada estetyczne walory krajobrazowe.

Wynalazek objaśnia przykład:

P r z y k ł a d

Z gruntu pochodzącego z rafinerii zanieczyszczonego produktami naftowymi pobrano do badań laboratoryjnych 1000 g próbki.

Dla porównania skuteczności w usuwaniu zanieczyszczeń ropopochodnych zastosowano biopreparat bakteryjny oraz grzybowy.

Biopreparat bakteryjny uzyskano w następujący sposób:

10 gramów oczyszczanego gruntu wprowadzono do sterylnej soli fizjologicznej (90 cm^3) i tak powstałą zawiesinę wytrząsano przez 72 godziny w temp. 20"C; po sedymentacji pobrano 10 cm^3 cieczy nadosadowej, którą wprowadzono do kolby ze sterylnym podłożem YS z dodatkiem 1% produktów naftowych i inkubowano przez 72 godziny w temp. 20°C. Z uzyskanej zawiesiny wykonano posiew metodą powierzchniową na podłoże stałe YS (z dodatkiem produktów naftowych); płytki Petriego inkubowano w temp. 20°C przez 72 godziny; spośród wyrosłych kolonii wybrano 10 dominujących, z których wyizolowano czyste kultury metodą wielokrotnego pasażowania.

Wykorzystując metodę testowania, wybrano szczepy najbardziej aktywne w stosunku do produktów naftowych i sprawdzono oddziaływania antagonistyczne pomiędzy nimi. Po 72 godzinach inkubacji spłukano skosy agarowe solą fizjologiczną; uzyskane w ten sposób roztwory wymieszano i określono ogólną liczebność komórek bakterii w 1 cm^3 uzyskanej zawiesiny, traktowanej jako biopreparat bakteryjny. Liczba komórek bakterii w biopreparacie wynosiła $6 \cdot 10^9$ komórek/1 cm^3 zawiesiny. Do odpowiednich prób wprowadzono 50 cm^3 biopreparatu/kg gleby.

Biopreparat grzybowy sporządzono z spor grzybów mikoryzowych wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi. Próbka 100 cm^3 biopreparatu zawierała 10^9 spor. Równolegle, w badaniach laboratoryjnych wytypowano rośliny najbardziej odporne na zanieczyszczenia znajdujące się w oczyszczanym gruncie i sprawdzono możliwość wytworzenia mikoryzy pomiędzy nimi a wyizolowanymi sporami grzybów arbuskularnych. Do odpowiednich prób wprowadzono 50 cm^3 zawiesiny biopreparatu/kg gleby.

Schemat prowadzenia badań z wykorzystaniem biopreparatu bakteryjnego i grzybowego przedstawiono poniżej:

- Gleba,
- Gleba + biopreparat bakteryjny,
- Gleba + biopreparat grzybowy,
- Gleba + roślina,
- Gleba + roślina + biopreparat bakteryjny,
- Gleba + roślina + biopreparat grzybowy.

Proces remediacji prowadzono w warunkach polowych przez 12 tygodni. Wykazano, że symbioza grzybów mikoryzowych z roślinami jednoliściennymi powoduje zwiększenie efektywności usuwania węglowodorów 2-pierścieniowych o ok. 39%, 3-pierścieniowych o ok. 41%, 4-pierścieniowych o ok. 44%, 5-pierścieniowych o ok. 39% i 6-pierścieniowych o ok. 32% - w porównaniu z próbkami, w których zastosowano same rośliny. W próbkach gleb, w których wykorzystano rośliny z biopreparatem grzybowym, wydajność usuwania węglowodorów 3-, 4-, 5- i 6-pierścieniowych była przeciętnie o 15% większa, aniżeli w próbkach, w których zastosowano rośliny wspomagane biopreparatem bakteryjnym. Do najtrudniej usuwanych zanieczyszczeń należały frakcje ciężkie. Wprowadzenie rośliny jednoliściennej oraz biopreparatu grzybowego podniosło efektywność tego procesu ok. 15 krotnie w odniesieniu do próbki kontrolnej i prawie 4 krotnie w porównaniu z próbką, w której użyto samej rośliny.

Wykazano, że w glebie skażonej węglowodorami samoistna kolonizacja grzybami mikoryzowymi podłoża zanieczyszczonego wysokimi stężeniami węglowodorów jest procesem długotrwałym. Czas ten można skrócić przez wprowadzenie propagul grzybów mikoryzowych w formie inokulum. Kolonizacja korzeni roślin przez grzyby arbuskularne korzystnie wpłynęła na ich wzrost i rozwój korzeni. Na podstawie analiz mikroskopowych stwierdzono średnio o ok. 40% wyższy wskaźnik infekcji mikoryzalnej korzeni roślin, do których wprowadzono biopreparat grzybowy w porównaniu z próbkami bez niego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób fitoremediacji gleb z produktów ropopochodnych metodą „in situ”, wspomaganej biopreparatem bakteryjnym i grzybowym, **znamienny tym**, że jako preparat bakteryjny stosuje się autochtoniczne bakterie pobrane z próbek gruntu przeznaczonego do oczyszczania, z których izoluje się dominujące, o najwyższej zdolności do rozkładu węglowodorów, a jednocześnie nie wykazujące antagonizmu pomiędzy sobą, namnaża się je na podłożu minimalnym z dodatkiem 1% węglowodorów jako jedynego źródła węgla i wprowadza do zanieczyszczonego gruntu w ilości minimalnej, co najmniej 10^{11} komórek/kg suchej masy oczyszczanego gruntu, przy czym biopreparat grzybowy stanowią spory grzybów mikoryzowych.

2. Sposób fitoremediacji zastrz. 1, **znamienny tym**, że namnożone bakterie wprowadza się do gruntu poprzez jego zraszanie.

3. Sposób fitoremediacji według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po wprowadzeniu bakterii obsiewa się rekultywowany teren roślinami, wytypowanymi wcześniej podczas badań laboratoryjnych, odpornymi na zanieczyszczenia znajdujące się w rekultywowanym gruncie.

4. Sposób fitoremediacji według zastrz. 1, **znamienny tym**, że biopreparat grzybowy stanowią żywe, nie porażone przez patogeny spory grzybów mikoryzowych, wyizolowane z zanieczyszczonego gruntu przeznaczonego do oczyszczania.

5. Sposób fitoremediacji według zastrz. 1, **znamienny tym**, że spory grzybów mikoryzowych korzystnie w formie inokulum, wprowadza się do gruntu przeznaczonego do oczyszczania w ilości minimalnej 10^9 spor/kg gruntu przeznaczonego do oczyszczania.

6. Sposób fitoremediacji zastrz. 1, **znamienny tym**, że spory grzybów wprowadza się do gruntu poprzez jego zraszanie.

Departament Wydawnictw UP RP
Cena 2,46 zł (w tym 23% VAT)