



Kruunuvuoren entisen öljyvaraston biopuhdistaminen uusiokäytön mahdollistamiseksi

101010179

Tekijä
Aura Nousiainen (AFRY Finland)
Mikrobiologi, MMT

Puhelin
044 576 1669
E-mail
aura.nousiainen@poyry.com

Päivämäärä
20/12/2019
Projektinumero
101010179

Asiakas
Energiateollisuus R.y., Skanska Talonrakennus Oy, Helen Oy

Kruunuvuoren entisen öljyvaraston biopuhdistaminen uusiokäytön mahdollistamiseksi

Tarkistaja
Anna Reunamo (Suomen ympäristökeskus SYKE)
Mikrobiologi, FT

Sisältö

1	JOHDANTO	3
2	HANKKEEN TOTEUTUS	3
3	MENETELMÄT	4
4	TULOKSET	5
4.1	Öljypitoisuus akvaarioissa	5
4.2	Öljynhajotusgeenien lukumäärät	6
4.3	Mikrobiyhteisöt	8
5	JOHTOPÄÄTÖKSET	9
6	LIITTEET	10

1 JOHDANTO

Tutkimushankkeessa testattiin Itämeressä luontaisesti esiintyvien öljyä hajottavien mikrobin hyödyntämistä käytöstä poistettujen öljyvarastoluolien biologisessa puhdistuksessa. Hanke tähtää entisten öljyvarastojen hyödyntämiseen lämpöenergian kausivarastona.

2 HANKKEEN TOTEUTUS

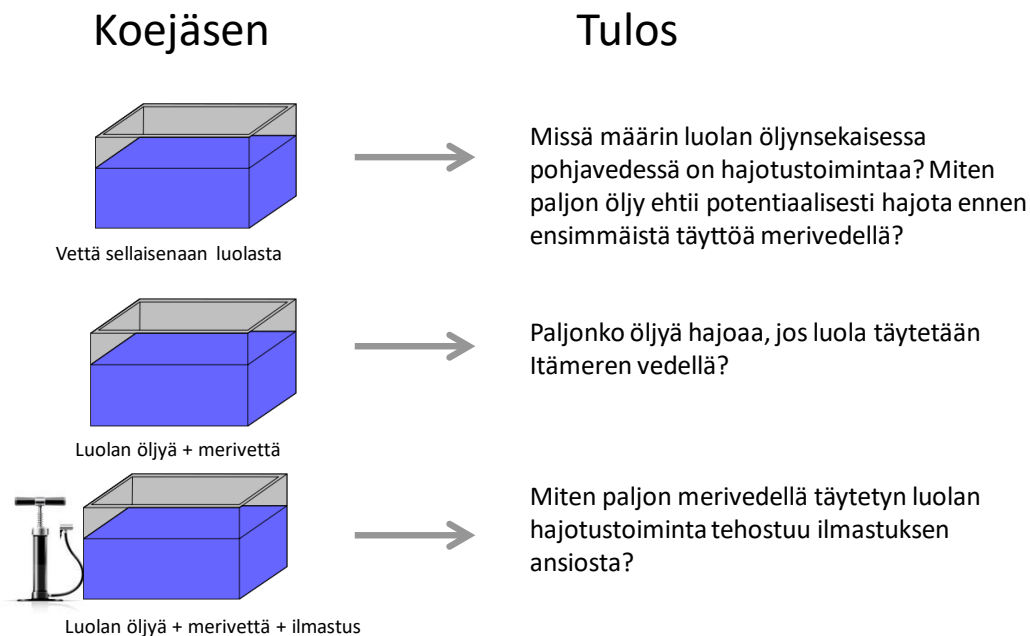
Hankkeessa testattiin pilot-mittakaavan akvaariokokeessa Itämeren luontaisen öljynhajottajamikrobiston tehokkuutta, öljyn määrän vähenemistä ja ilmastuksen vaikutusta laboratorio-olosuhteissa öljynhajotuksen tehokkuuteen.

Projektin tarkoituksena oli selvittää

- 1) mikä on meriveden bakteerien potentiaali hajottaa öljy-yhdisteitä,
- 2) selvittää tehostaako veden hapetus öljynhajotusta ja
- 3) ennakoida luolasta purettavan veden öljymäärää ja siten jatkopuhdistustoimenpiteiden tarvetta esimerkiksi aktiivihillisuodatuksen avulla.

Näiden seikkojen valottamiseksi projektissa tutkittiin kolmea koejäsentä (kuva 1)

Pilottikoe: koesuunnitelma (VAIHE I)



1

Kuva 1. Pilottikokeen koejäsenet

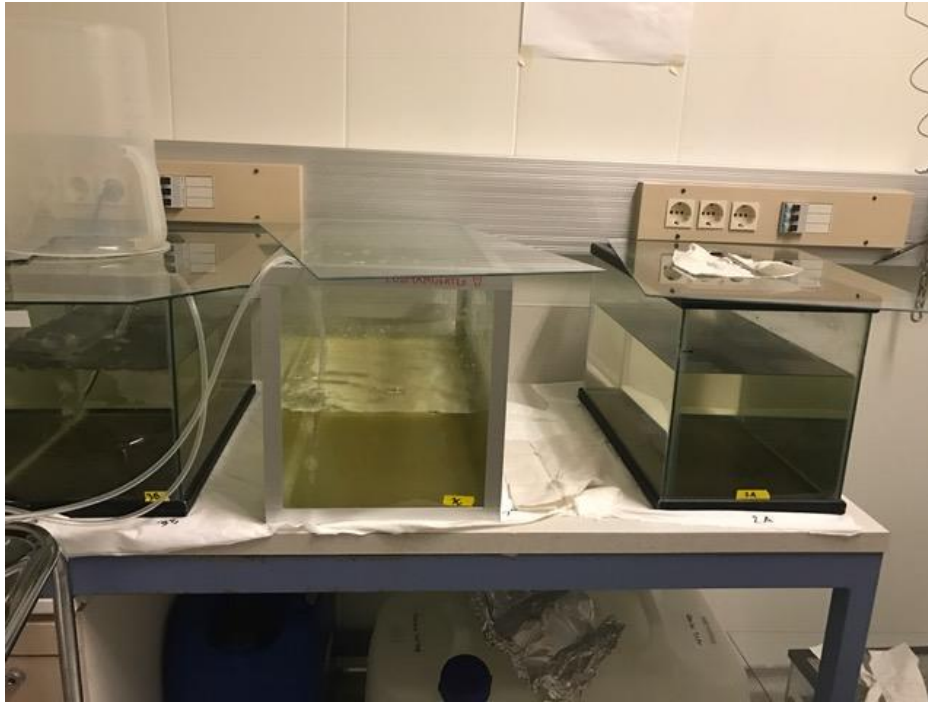
Tutkimuskohde sijaitsee Helsingin Kruunuvuorenrannan kaupunginosassa noin 3,3 kilometrin päässä kaupunkikeskustasta itään (kuva 1). Koetta varten noudettiin vettä Haakoninlahdelta sekä Kruunuvuoren entisistä öljyluolista.



Kuva 2. Selvitysalueen sijainti. Meriveden näytteenottoaikka merkitty punaisella, öljyluolien sijainti sinisellä värillä

3 MENETELMÄT

Akvaariokokeet perustettiin jäljittelemään mahdollisimman tarkasti olosuhteita luolassa, joten akvaariokokeen olosuhteet olivat + 10 °C, pimeä ja mahdollisuuksien mukaan suljettu järjestelmä, jossa kaasut eivät vaihdu akvaariosta. Akvaarioissa oli joko 20 litraa luolavettä tai 7 litraa luolavettä ja 13 litraa merivettä.



Kuva 3. Tutkimusakvaariot

Akvaarioista kerättiin vesinäytteitä ajanhetkellä 0 h, 1 viikko, 2 viikkoa ja 6 viikkoa. Näytteistä määritettiin öljyhiilivetyypitoisuus sekä biologisessa öljynhajotuksessa tarvittavien geenien lukumäärä. Lisäksi DNA-näytteitä käytettiin selvittämään muutos akvaarioiden mikrobipopulaation (bakteerit, arkeonit ja sienet) erot käsittelyn alussa ja lopussa sekvensoimalla bakteerien lajintunnistuksessa käytetty 16S rDNA-geeni. Bakteerilajiston muutos antaa arvokasta lisätietoa hapetuksen vaikutuksesta öljyn biohajottajiin.

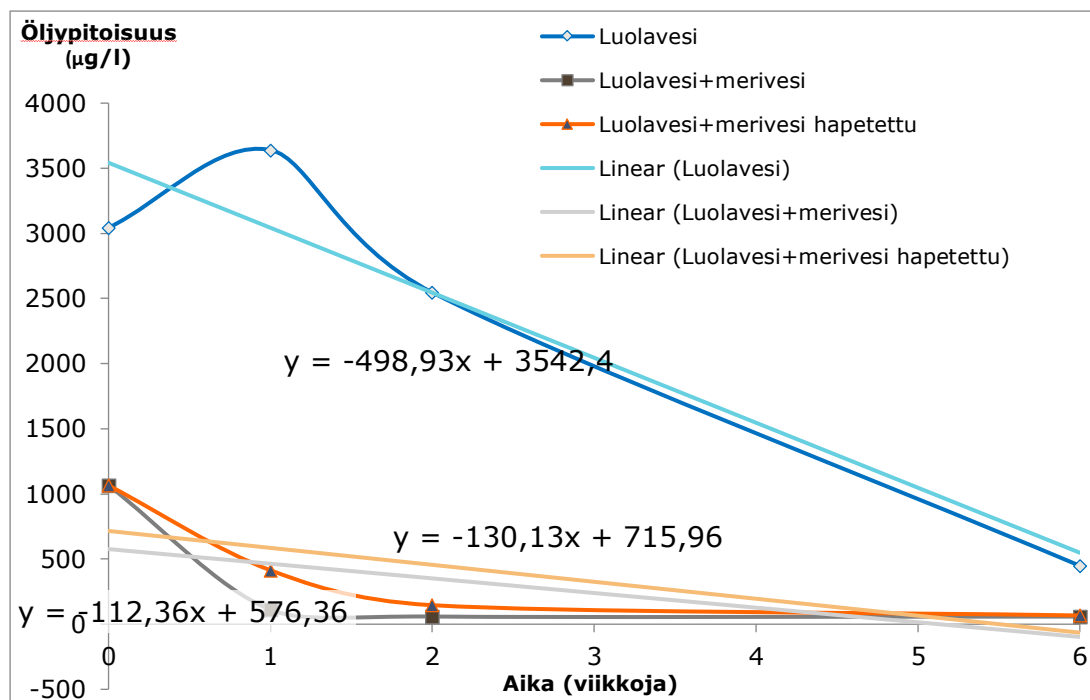
4 TULOKSET

4.1 Öljypitoisuus akvaarioissa

Öljyhiilivetyjen pitoisuudet on esitetty ajan funktiona kuvassa 4.

Öljy väheni nopeasti kaikissa akvaariokäsittelyissä. Kuuden viikon aikana 72 % luolaveden öljystä oli hajonnut laboratorio-olosuhteissa. Veden sekoittaminen meriveteen lisäsi hajonneen öljyn osuutta 96 %:iin. Hapettaminen ei tehostanut hajoamista.

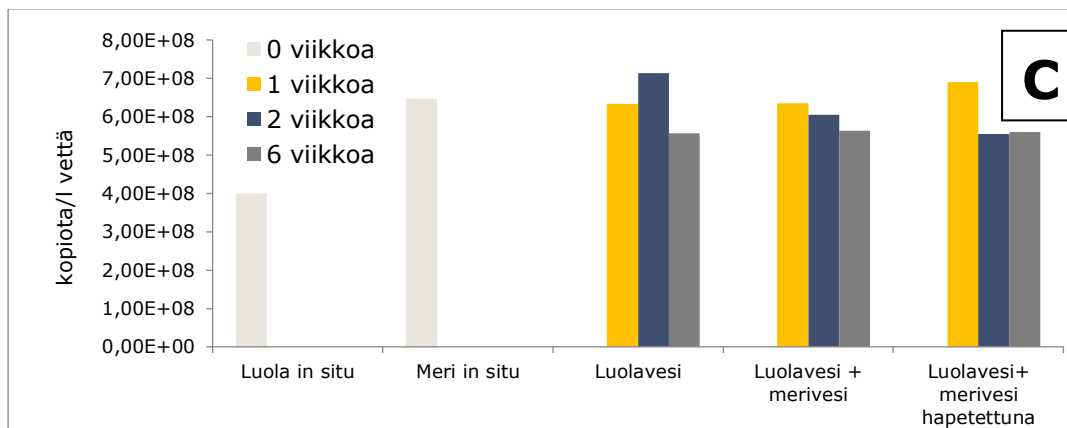
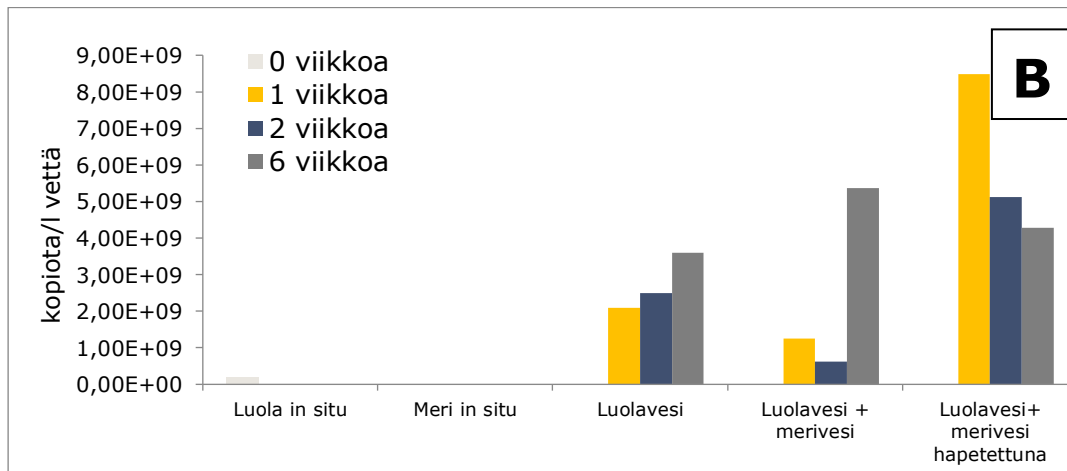
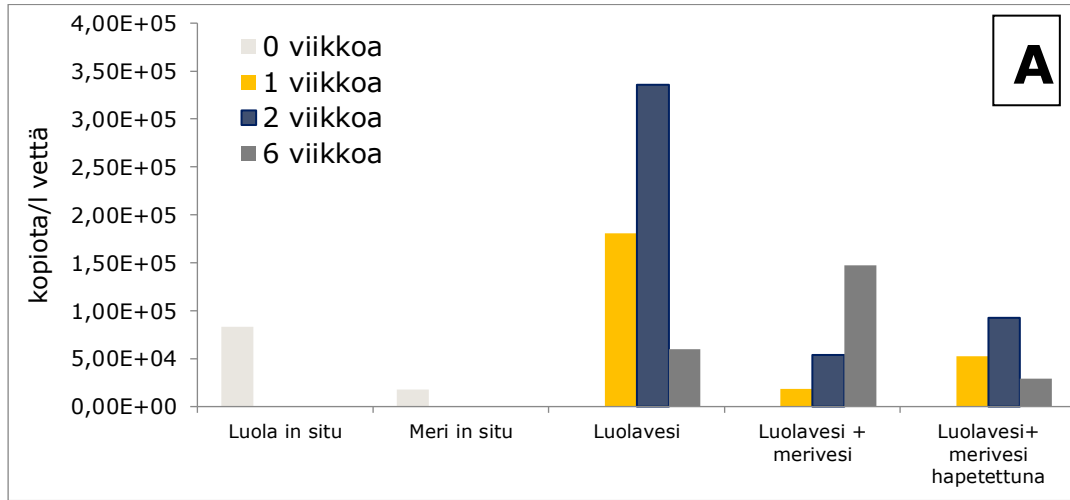
Meriveden lisäyksestä johtuvan laimentumisen vuoksi merivesikäsitellyt akvaariot sisälsivät noin kolmanneksen öljyä luolavesiakvaarioon verrattuna. Näistä akvaarioista öljy hajosi jo kahdessa viikossa.



Kuva 4. Öljyhiilivetyjen C10-C40 pitoisuudet akvaarioissa kuuden viikon käsittelyn aikana.

4.2 Öljyhajotusgeenien lukumäärät

Vesinäytteistä määritettiin kvantitatiivisella PCR:llä SYBR Green-menetelmällä Suomen ympäristökeskuksen merentutkimuslaboratoriossa geenikopiomäärät geeneille, joita mikrobit tarvitsevat öljy-yhdisteiden hajotuksessa. Tutkittuja geenejä olivat RHDa Gram positiivisille ja Gram negatiivisille bakteeriryhmille, joita tarvitaan PAH-yhdisteiden hajotukseen, sekä AlkB, jota bakteerit tarvitsevat alkaaniyhdisteiden hajotukseen. Näiden lisäksi tutkittiin bakteerien kokonaismäärää kuvaavaa 16SrRNA-geenin kopiolumäärät. Geenikopiomäärät on esitetty kuvassa 5.

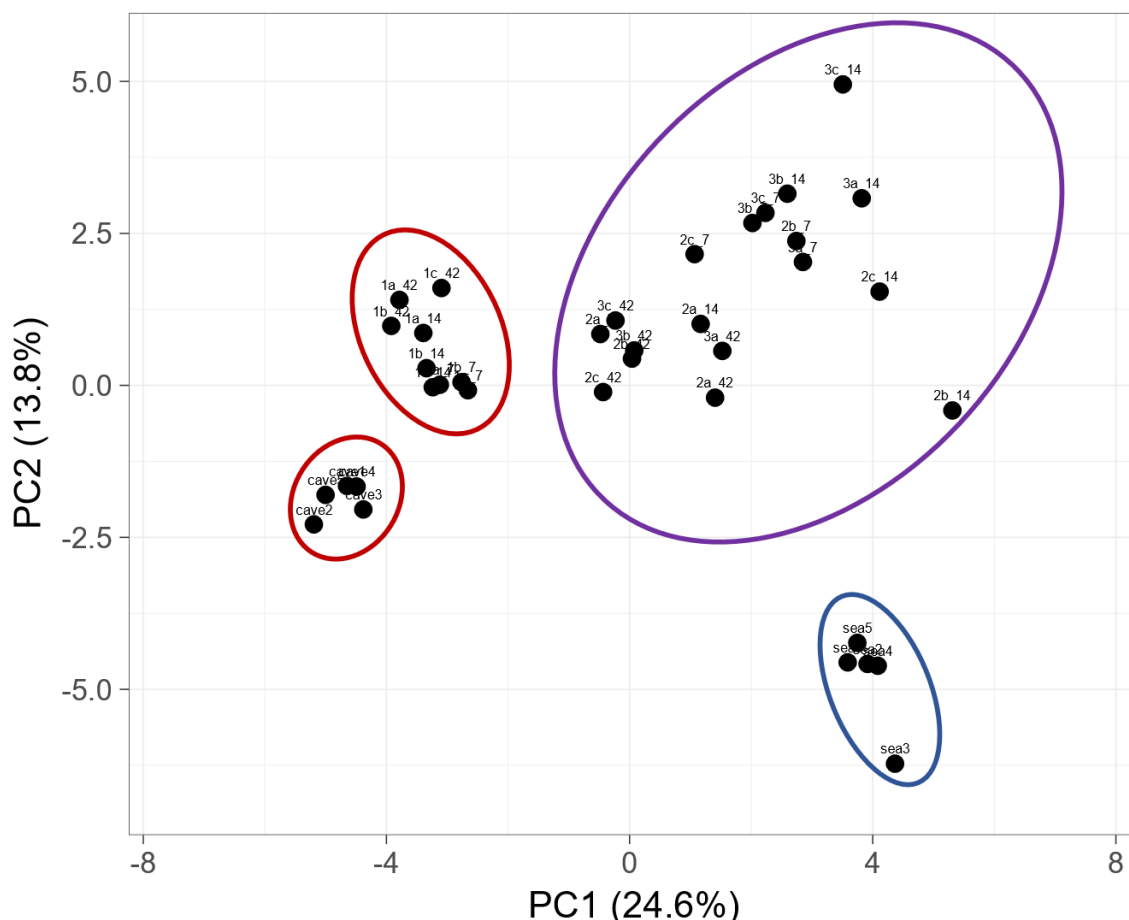


Kuva 5. Geenikopioluvut akvaarioissa ajan funktiona. A) PAH-hajotusgeenit, B) alkaaninhajotusgeenit, C) bakteerien lukumäärää kuvaavat 16SrRNA-geenit

4.3 Mikrobiyhteisöt

Akvaariokokeiden vedestä eristettiin kokonais-DNA, josta sekvensoitiin Ion Torrent-sekvensoinnilla (Oulun yliopiston biokeskuksen sekvensointipalvelu) bakteerit, arkeonit ja sienet. Näytteet sekvensoitiin kokeen eri aikapisteistä, jotta pystyttiin näkemään miten mikrobiyhteisöt muuttuvat ajan kuluessa. Sekvenssidata analysoitiin Mothur -ohjelmalla. Tulokset osoittavat selvän eron luolaveden ja meriveden mikrobiomin osalta alkutilanteessa.

Monet mikrobit kykenevät hajottamaan öljy-yhdisteitä ympäristössä. Pelkän yhteisörakenteen perusteella ei voida tietää, millaisia ominaisuuksia mikrobeilla on, sillä eri ryhmien metabolia voi olla samanlaista. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kuitenkin nimenomaan tarkastella, millainen on 1. luolan mikrobiyhteisö, 2. läheisen merialueen mikrobiyhteisö ja 3. miten yhteisöt muuttuvat niiden sekoituttua ja meriveden altistuttua luolan öljyjäämille ja 4. tehostaako se ja toisaalta ilmastus öljy-yhdisteiden hajoamista.



Kuva 6. Pääkomponenttianalyysi, joka perustuu bakteeriyhteisöanalyysiin. Luolan ja meriveden alkuperäiset yhteisöt poikkeavat selvästi toisistaan. Luolaveden (cave) yhteisöt muuttuvat laboratorio-olosuhteissa omanlaisikseen (käsittely 1) ja luola-merivesi-yhteisöt (2 ja 3) muodostavat enemmän vaihtelua sisältävän yhteisöryhmän. Hapetuksella on jonkin verran vaikutusta, mutta näytteet (2 ja 3) ryhmittyvät yhteen

enemmän aikapisteiden kuin hapetuksen perusteella. Näytekoodin perässä oleva luku (7, 14, 42) kertoo aikapisteiden. Sea 1-5 ja cave 1-5 ovat rinnakkaisia in situ -näytteitä.

Bakteerit

Bakteerit muodostivat suurimman ryhmän mikrobeista sekvensointituloksien perusteella. Kun kokeessa yhdistettiin luola- ja merivedettä, muuttuivat bakteeriyhteisöt erilaisiksi koeyksiköissä, joissa käytettiin hapetusta (käsittely 3.) ja koeyksiköissä, joissa ei ollut hapetusta (käsittely 2.). Myös pelkkää luolavettä sisältäneissä koeyksiköissä yhteisöt muuttuivat. Tämä oli odotettavaa, koska luolavesi altistui hyvin erilaisille ympäristöolosuhteille (valo, happipitoisuus), kun se nostettiin luolasta ja siirrettiin laboratorioon.

Bakteerien sekvenssidatalle ajettiin ns. source tracking analyysi R-ohjelmalla, jonka avulla voidaan päätellä merivedestä tai luolavedestä peräisin olevien bakteeriryhmien suhteellisia osuuksia eri käsittelyissä ja aikapisteissä. Tulokset osoittivat, että meri- ja luolavettä sekoitettaessa molemmista nousee bakteeriryhmiä, jotka yleistyvät koeyksiköissä, eikä meriveden bakteeristo yksin hallitse yhteisöä. Liitteenä 1. on kuva, jossa näkyy kunkin näytteen runsaimmat bakteeriryhmät sukutasolla (correlation distance, Ward linkage).

Sienet ja arkeonit

Useiden mikrobisientien tiedetään pystyvän hajottamaan öljy-yhdisteitä. Valitettavasti etenkin akvaattisten sienten tuntemus on vielä heikkoa, eikä niiden roolia öljynhajotusprosessissa tunneta kunnolla. Tässä kokeessa todettiin, että suuri osa sekä meren, että luolaveden sienistä ei luokitunut mihinkään tunnettuun ryhmään, kun sekvenssejä verrattiin uusimpiin tietokantoihin. Luolavedessä tunnetuista sieniryhmistä runsaimmat olivat askomykeetit (Ascomycota) ja basidiomykeetit (Basidiomycota), kun taas merivedessä näiden ryhmien lisäksi runsaana esiintyi ryhmä piiskasiimasienet (Chytridiomycota). Sieniyhteisöjen muutoksessa kokeen aikana eri käsittelyissä ei ollut niin selvää kuviota kuin bakteerien osalta ja yhteisörakenne vaihteli suuresti jopa rinnakkaisten koeyksiköiden välillä. Luokkatasolla selvimmät havainnot olivat, että piiskasiimasienet (unclassified Chytridiomycota) olivat runsastuneet luolavesiakvaarioissa 2 viikon inkuboinnin jälkeen ja luola-merivesiakvaarioissa (ilman hapetusta) viikon ja 2 viikon aikapisteissä. Lisäksi ryhmä Saccharomycetes oli runsastunut huomattavasti 6 viikon inkuboinnin jälkeen luola-merivesiakvaarioissa (ilman ja hapetuksen kanssa).

Arkeonien roolista öljyn hajotuksessa tiedetään vain hyvin vähän. Niiden määrä sekä luola- että merivedessä oli noin kolmasosan pienempi kuin bakteerien sekvensointitulosten perusteella. Arkeonien pääjaksoista merivedessä runsaimmat ryhmät olivat euryarkeonit (Euryarchaeota), taumarkeonit (Thaumarchaeota) ja krenarkeonit (Crenarchaeota). Myös tuntemattomia arkeoniryhmiä oli runsaasti. Luolavedessä runsaimmat ryhmät olivat samoja, mutta tuntemattomien arkeoniryhmien osuus oli noin kaksi kertaa suurempi.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

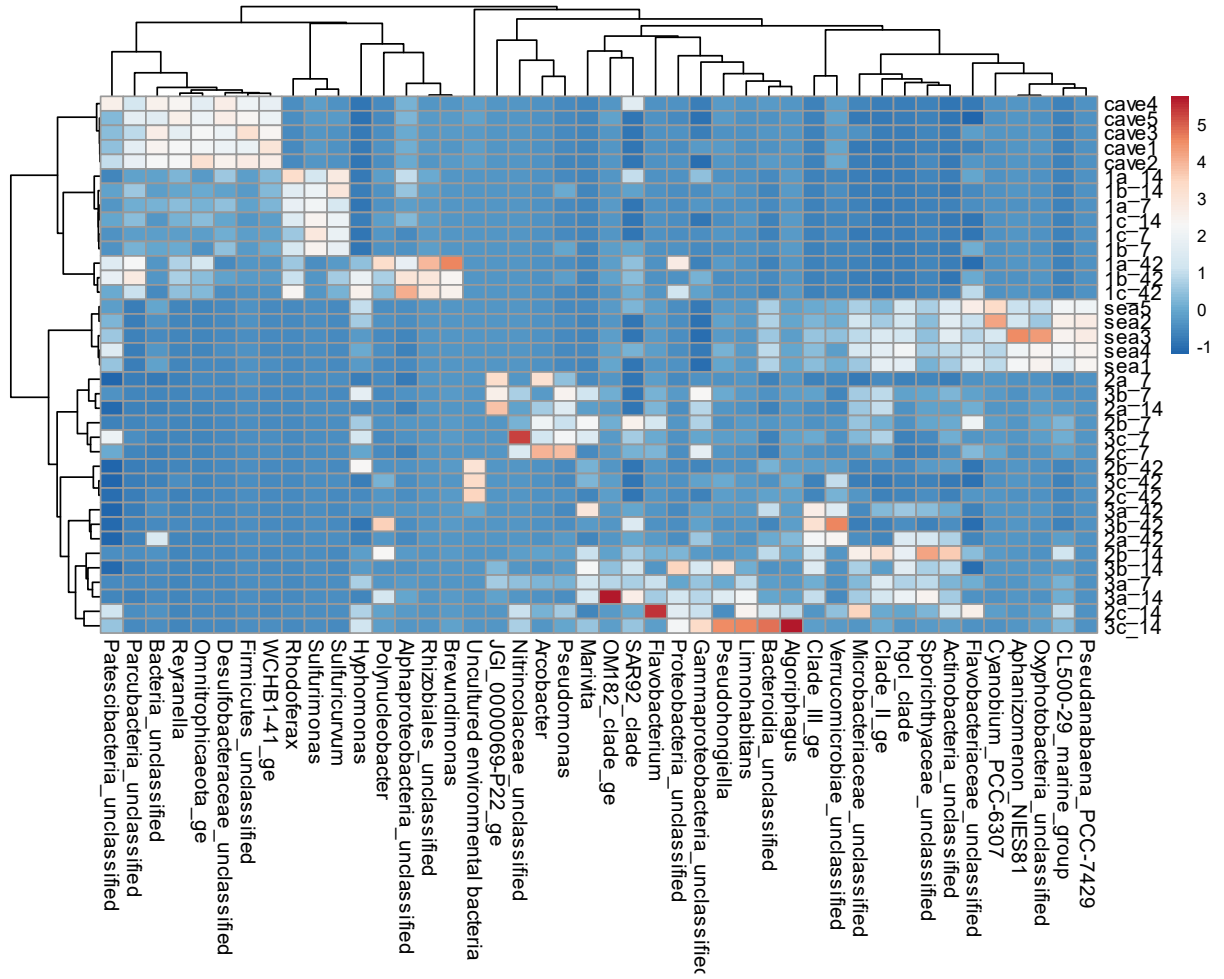
Akvaariokokeessa öljy hajosi luontaisesti kaikissa käsittelyissä, myös akvaariossa joka sisälsi pelkkää luolavettä. Meriveden lisäys kuitenkin tehosti hajoamisnopeutta, sen sijaan hapetuksella ei ollut akvaariomittakaavassa merkitystä.

Hajotusnopeutta voidaan selittää osittain meriveden sisältämällä mikrobeilla. Meriveden mikrobiyhteisöt erosivat pääkomponenttianalyysin (kuva 6) perusteella luolaveden yhteisöistä merkittävästi. Sekä meressä että luolassa oli alun perin omankaltaisensa bakteeriyhteisö, ja vesien sekoittaminen johti uudenlaisen bakteeriyhteisön muodostumiseen. Bakteerien lukumäärä pysyi jotakuinkin samaa käsittelyistä tai käsittelyajasta riippumatta. Luolavedessä oli jonkin verran PAH-yhdisteiden hajotuksessa tarvittavia geenejä, ja vähäisiä määriä alkaaninhajotusgeenejä. Merivedestä näitä ei havaittu, mutta vesien sekoittaminen lisäsi hajotusgeenien määriä.

Tämän kokeen tulosten perusteella voidaan päätellä, että sekä merivedessä (Haakoninlahti), että Kruunuvuoren öljyluolassa olevassa vedessä on öljy-yhdisteitä hiilenlähteenään käyttämään kykeneviä mikrobeja. Bakteerit ovat todennäköisesti pääroolissa öljynhajotusprosessissa, mutta sienillä ja arkeoneilla voi olla niiden toimintaa tukevia tehtäviä. Todennäköisesti olosuhteet luolassa ovat sellaiset, ettei siellä oleva mikrobisto pysty kovin tehokkaasti hajottamaan öljyjäämiä. Meriveden lisääminen luolaan tuo sinne happea ja muita öljynhajotusta lisääviä tekijöitä (typpi, fosfori) ja siten tehostaa öljyn hajoamista. Tässä kokeessa ei sen lyhyen keston ja pienen mittakaavan vuoksi havaittu hapetuksen tehostavan öljyn hajoamista, mutta aiemman tutkimustiedon valossa on kuitenkin selvää, että hapettomissa oloissa öljyn biohajoaminen on merkittävästi hitaampaa.

On huomioitava, että pienen mittakaavan kokeen tulosten soveltaminen suurempaan mittakaavaan lisää epävarmuuksien määrää, sillä vesien tasainen sekoittuminen on hitaampaa luolamittakaavassa. Akvaarioiden kaasut myös vaihtuvat näytteenotossa.

6 LIITTEET



Liite 1. Runsaimmat bakteeriryhmät sukutasolla (correlation distance, Ward linkage). Näyttekoodin perässä oleva luku (7, 14, 42) kertoo aikapisteen. Sea 1-5 ja ja cave 1-5 ovat rinnakkaisia in situ -näytteitä ja kirjaimet a,b ja c viittaavat rinnakkaisiin akvaarioihin, joissa oli sama käsittely.