

KHẢ NĂNG SỬ DỤNG HYDROCACBON DẦU MỎ CỦA BA CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ CẶN THẢI XĂNG DẦU Ở VIỆT NAM

NGUYỄN BÁ HỮU, VŨ HỒNG ANGA,
ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

Viện Công nghệ sinh học

Cùng với sự phát triển của nền kinh tế, nhu cầu về năng lượng của Việt Nam ngày càng tăng. Hàng năm, một khối lượng lớn nhiên liệu được nhập khẩu và vận chuyển do đó nguy cơ gây ô nhiễm rất lớn. Ngoài ra, trong quá trình tồn chứa nhiên liệu; xú, rửa và vệ sinh bồn bể chứa trong nhà máy, trạm bơm, các phương tiện vận tải, tàu chở dầu .v.v. nước thải và cặn thải xăng dầu cũng là một trong những yếu tố gây ô nhiễm môi trường nếu không được kịp thời xử lý.

Xí nghiệp xăng dầu Quảng Ninh có khu bể chứa xăng, dầu lớn, mỗi năm quá trình xú rửa và vệ sinh các bồn chứa đã thải ra khoảng 80 tấn cặn nhiễm xăng dầu. Ngoài các chất rắn thô như đất, cát, v.v. cặn thải xăng dầu còn chứa hydrocacbon thơm, các hợp chất chứa lưu huỳnh, đặc biệt chúng còn chứa các thành phần khó phân hủy như n-parafin mạch dài, asphalten, resin. Nếu không xử lý cặn thải nhiễm xăng dầu kịp thời sẽ dẫn đến ô nhiễm môi trường và nước ngầm. Hiện nay có một số phương pháp để xử lý loại cặn thải này như tách dầu bằng phương pháp cơ học, hóa học, đốt, chôn lấp .v.v. và xử lý làm sạch bằng phân hủy sinh học [7, 10, 13]. Phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) hiện nay được áp dụng nhiều nhất do giá thành rẻ, dễ áp dụng và an toàn đối với môi trường. Công nghệ này đã được Viện Công nghệ sinh học và Công ty xăng dầu B12 áp dụng xử lý nước thải, cặn thải nhiễm xăng dầu và cho những kết quả khả quan. Để góp phần xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ làm sạch cặn đáy từ các bể chứa dầu theo hướng phân hủy sinh học, chúng tôi đã tiến hành phân lập, nghiên cứu khả năng phân hủy dầu và các thành phần khác nhau của các chủng vi sinh vật tồn tại trong cặn thải nói trên. Các kết quả thu được sẽ là cơ sở quan trọng để

thiết kế quy trình phân hủy sinh học làm sạch cặn đáy nhiễm dầu có hiệu quả.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ba chủng vi khuẩn: HK-HF6, HK-T3F1 và HK-B₃1 phân lập từ cặn thải xăng dầu của kho K130, Xí nghiệp xăng dầu Quảng Ninh, Công ty xăng dầu B12.

Môi trường hiếu khí tổng số, môi trường khoáng được dùng để phân lập, nuôi cấy và nghiên cứu khả năng sử dụng dầu nhiên liệu (FO), dầu thô tầng mioxen của mỏ Bạch Hổ theo các phương pháp đã miêu tả trước đây [4, 8]. Các phương pháp để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, độ pH, nồng độ NaCl đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn trên môi trường khoáng được miêu tả ở các công trình đã công bố trước đây. Hình thái tế bào vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử xuyên JEM T8, kính hiển vi điện tử quét JEOL. Vi khuẩn đã được phân loại theo kết chuẩn API 20E. Khả năng sử dụng hexadecan (C₁₆H₃₄), pristan (2,6,10,14-tetramethylpentadecan), eicosan (C₂₀H₄₂), ocosan (C₂₈H₅₈), FO và dầu thô của các chủng vi khuẩn đã được đánh giá bởi sự thay đổi độ đục của môi trường và thay đổi tính chất lý học của dầu. Khả năng sử dụng FO của hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 bằng máy sắc ký khí Shimadzu theo các phương pháp mô tả trước đây [4, 5, 8].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

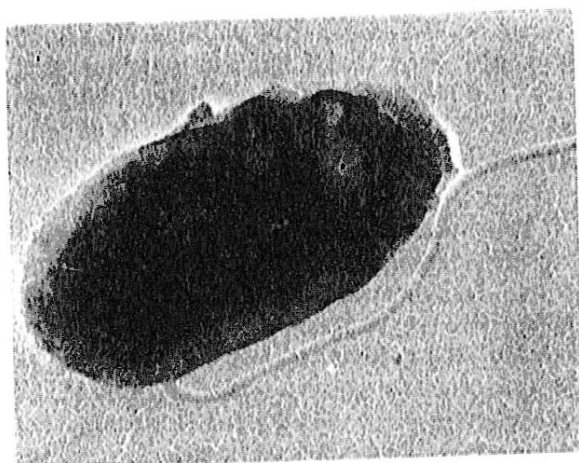
1. Phân loại sơ bộ các chủng vi khuẩn

a) Đặc điểm hình thái học

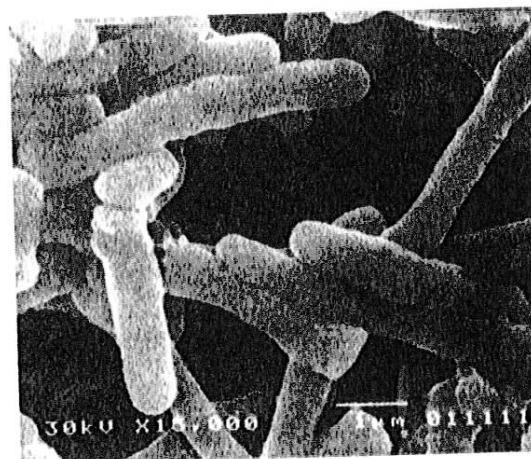
Đặc điểm hình thái học của ba chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 1.

Đặc điểm hình thái học của ba chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc			Tế bào		
	Kích thước (mm)	Màu sắc	Hình dạng	Kích thước (μm)	Hình dạng	Tiền mao
HK-T3F1	5-7	xanh	tròn, trơn, hơi dẹt	0,58-0,71 \times 1,75-1,88	que, không bào tử, gram âm	đơn cực
HK-HF6	5-7	nâu	tròn, trơn, hơi dẹt	0,54-0,58 \times 1,33-1,67	que, không bào tử, gram âm	không
HK-B ₃ 1	1-1,5	đỏ gạch	tròn, trơn, lõm ở tâm	0,5-0,67 \times 4,00-5,00	que dài, không bào tử, gram dương	không



Hình 1. Ảnh kính hiển vi diện từ xuyên tế bào chủng HK-T3F1 ($\times 39.000$)



Hình 2. Ảnh kính hiển vi điện tử quét tế bào chủng HK-B₃1 ($\times 15.000$)

b) Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự phát triển của vi khuẩn

Ba chủng vi khuẩn đều có khả năng tồn tại và phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 28-45 °C. Ở các nhiệt độ 4°C và 50°C, các chủng này đều không phát triển. Hai chủng HK-B₃1 và HK-HF6 phát triển tốt nhất ở 37°C, trong khi đó chủng HK-T3F1 phát triển tốt nhất ở 28°C. Ba chủng HK-B₃1, HK-T3F1 và HK-HF6 phát triển và tồn tại trong môi trường có độ pH từ 5 đến 11. Độ pH tối ưu cho phát triển của ba chủng vi khuẩn này trong khoảng từ 7 đến 8. Hai chủng HK-HF6 và HK-T3F1 có khả năng tồn tại trong

môi trường chứa từ 0 đến 5% NaCl, riêng chủng HK-B₃1 có thể tồn tại ở nồng độ NaCl cao hơn (10%), ba chủng HK-HF6, HK-B₃1 và HK-T3F1 phát triển tốt nhất ở 0-0,5% NaCl. Nước thải, cặn thải trong các bồn chứa xăng dầu kho K130 bị ảnh hưởng của nước biển do các hoạt động xúc rửa tàu chứa dầu, do đó các chủng vi khuẩn trên có thể tồn tại trong môi trường chứa 5-10% NaCl. Qua các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sự phát triển của ba chủng vi khuẩn trong cặn đáy cho thấy chúng có đặc điểm không khác xa với các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu đã công bố trước đây [4, 5, 8].

c) Phân loại sơ bộ vi khuẩn

Sau khi thực hiện các phản ứng với hai chủng vi khuẩn gram âm HK-T3F1 và HK-HF6, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Kết quả các phép thử API 20E

Phép thử	HK-T3F1	HK-HF6
ONPG	-	-
ADH	+	+
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	+	+
H ₂ S	-	-
URE	+	+
TDA	+	+
IND	-	-
VP	-	-
GEL	+	+
GLU	+	+
MAN	-	-
INO	-	-
SOR	-	-
RHA	-	-
SAC	-	-
MEL	-	-
AMY	-	-
ARA	-	-
OX	-	-
NO ₂	+	+

Dựa trên các đặc điểm hình thái học, sinh lý, kết hợp với phân loại theo API 20E, hai chủng HK-T3F1 và HK-HF6 có thể thuộc chi *Pseudomonas*. Tuy nhiên, do có nhiều đặc điểm hình thái khác nhau nên hai chủng này thuộc hai loài khác nhau *Pseudomonas* sp. HK-T3F1 và *Pseudomonas* sp. HK-HF6. Chủng HK-B₃1 có nhiều đặc điểm hình thái và sinh trưởng

giống như các chủng thuộc chi *Rhodococcus* [3, 10, 11]. Kết quả phân loại sơ bộ cho thấy ba chủng vi khuẩn trên thuộc các chi vi khuẩn sử dụng dầu thường gặp ở trên thế giới và Việt Nam [2, 4, 5, 8]. Để có các kết luận xa hơn về vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn này, cần có các nghiên cứu tiếp về thành phần hóa học tế bào cũng như các trình tự gen 16S rARN và khi cần thiết phải sử dụng kỹ thuật lai ADN: ADN.

2. Khả năng sử dụng FO và các thành phần nhóm của FO của hai chủng HK-HF6, HK-B₃1

FO là một trong các loại dầu chính được tồn chứa tại kho K130. Để có thêm dẫn chứng về vai trò của vi sinh vật bản địa trong quá trình xử lý cặn thải xăng dầu, trong nghiên cứu này FO đã được dùng làm nguồn cơ chất cho các chủng vi sinh vật. Trong 3 chủng vi khuẩn trên, hai chủng HK-B₃1 và HK-HF6 sử dụng FO, chủng HK-T3F1 hoàn toàn không sử dụng loại dầu này. Tuy nhiên, ba chủng này đều sử dụng rất tốt dầu thô tầng mioxen mỏ Bạch Hổ có hàm lượng n-paraffin cao (kết quả không trình bày ở đây).

Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng với FO là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất chủng HK-HF6 sử dụng 76,25% lượng FO, chủng HK-B₃1 sử dụng 57,47% lượng FO. So với hai chủng *Pseudomonas* sp. 6TBX-CL và *Streptomyces* sp. ĐG-XK4 phân lập từ Cát Lái và Đức Giang [6] chủng HK-B₃1 sử dụng FO tương đương, chủng HK-HF6 phân hủy FO tốt hơn mặc dầu thời gian nuôi cấy của HK-HF6 và HK-B₃1 ngắn hơn. Hai chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này cũng thể hiện khả năng sử dụng FO tốt hơn so với hỗn hợp chủng *Pseudomonas* CBT3 phân lập từ vùng biển phía Nam Việt Nam [7].

Hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 đều có thể sử dụng các thành phần nhóm khác nhau của FO. Hàm lượng các thành phần nhóm của FO đều giảm rõ rệt, nhất là đối với chủng HK-HF6 (hình 4). Hai chủng này đã sử dụng 78,87% và 84,04% hydrocacbon no, 72% và 77,33% hydrocacbon thơm. FO là loại dầu khó bị phân hủy hơn so với các loại dầu khác do thành phần chủ yếu của nó là hydrocacbon mạch dài và các hợp chất phân cực (hình 3, 4), tuy nhiên cũng có các công bố về khả năng sử dụng các thành

phần này [5, 7, 13]. Hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 đều có thể sử dụng rất tốt thành phần phân cực đặc biệt là chủng HK-HF6.

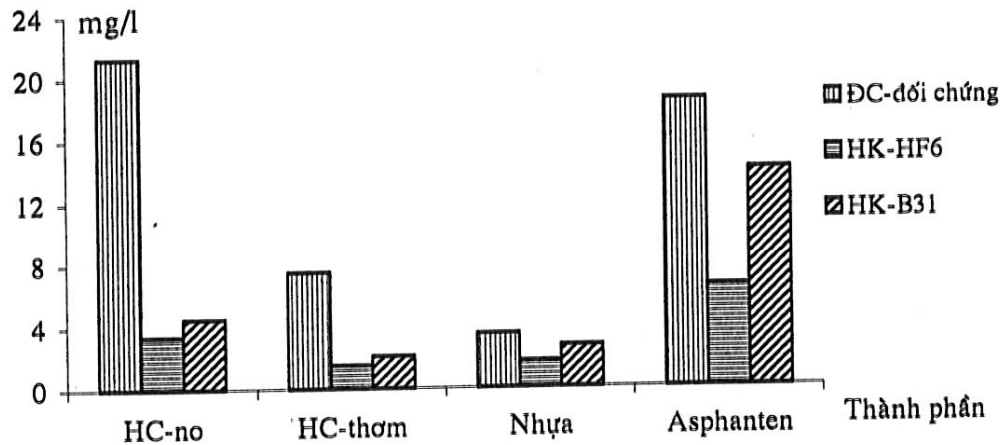
Trong thành phần hydrocacbon no của FO, hydrocacbon mạch dài từ n-C₁₆ đến n-C₃₄ chiếm 79,95% tổng n-paraffin. Trong tự nhiên tồn tại nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau và mỗi vi

sinh vật sử dụng các mạch cacbon có độ dài khác nhau. Hai chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có khả năng sử dụng tất cả các thành phần của n-paraffin từ n-C₁₁ đến n-C₄₈, tuy nhiên chủng HK-HF6 có thể sử dụng n-C₂₆ đến n-C₃₀ tốt hơn chủng HK-B₃1 (hình 3).

Bảng 3:

Hàm lượng dầu tổng số và các hệ số đặc trưng của các mẫu dầu FO

Mẫu	Lượng dầu thu hồi (g)	Lượng dầu bị phân hủy (%)	n-C17/Pristan	n-C18/Phytan
Đối chứng	2,4612	0	1,55	1,76
HK-HF6	0,5846	76,25	0,33	0,27
HK-B ₃ 1	1,0468	57,47	0,36	0,13



Hình 3. Hàm lượng các thành phần nhóm trong các mẫu dầu FO

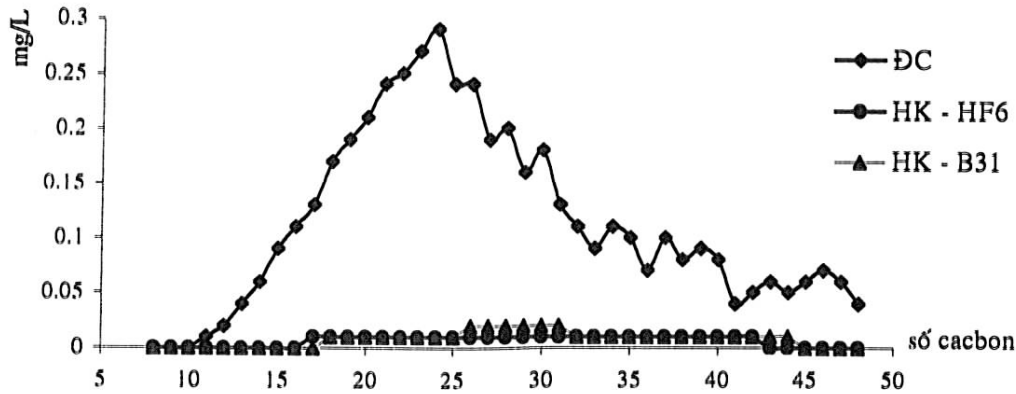
Mạch cacbon có độ dài trung bình từ C₁₀ đến C₂₄ rất dễ bị phân hủy bởi nhiều chủng vi sinh vật, nhưng đối với những mạch dài hơn các chủng vi sinh vật khó sử dụng hoặc sử dụng rất chậm. Gần đây, có một số thông báo về khả năng sử dụng hydrocacbon mạch dài của các nhóm vi sinh vật khác nhau, kể cả vi khuẩn kỵ khí [1, 3, 5, 7, 11]. Trong khoảng từ 24-32 giờ chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. 094 sử dụng alkan mạch ngắn (C₁₁ đến C₁₅) nhanh hơn alkan mạch dài (C₂₅ đến C₃₃) [3]. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. ĐG-XK4 sử dụng mạch hydrocacbon từ n-C₁₇ đến n-C₃₀. Chủng nấm sợi *Penicillium purpurogenum* Stoll M4-45 CL sử

dụng mạch hydrocacbon từ n-C₂₄ trở lên [5]. Trong điều kiện nuôi cấy kỵ khí các chủng vi khuẩn khử sunphat Hxd3 sử dụng n-alkan từ C₁₂ đến C₂₀ và chủng Pnd3 sử dụng C₁₄ đến C₁₇ [1]. Trong nghiên cứu này, thành phần n-paraffin trong các mẫu FO thu hồi được phân tích đến tận n-C₄₈, trong khi các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam chỉ phân tích được đến khoảng n-C₃₅. Sau 7 ngày nuôi cấy, hai chủng trên đều có thể sử dụng hydrocacbon có mạch cacbon lớn hơn C₂₀, thậm chí đến tận C₄₈.

Do số lượng hexadecan và pristan, eicosan và ocosan không nhiều nên trong nghiên cứu này chỉ kiểm tra được khả năng sử dụng một số

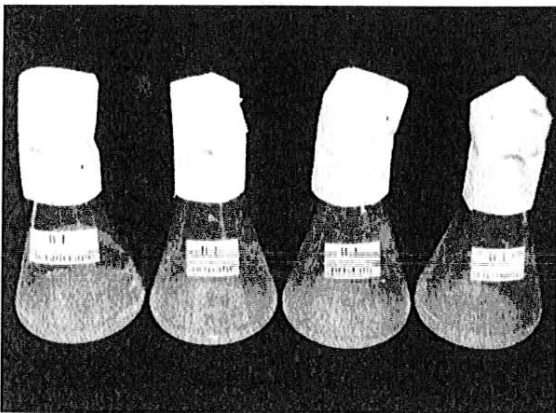
hydrocacbon no mạch thẳng và mạch nhánh của chủng HK-B₃1. Kết quả cho thấy chủng HK-B₃1 sử dụng rất tốt hexadecan và pristan. Eicosan và ocosan là các hydrocacbon no mạch dài tồn tại

ở dạng rắn khó bị phân hủy bởi vi sinh vật, nhưng HK-B₃1 có thể sử dụng cả hai hợp chất trên tuy nhiên chủng này sử dụng ocosan yếu hơn eicosan (hình 5).



Hình 4. Phân bố n-parafin trong các mẫu dầu FO

Kết quả này cũng phù hợp với công bố về khả năng sử dụng hydrocacbon có độ dài mạch khác nhau của chủng *Rhodococcus* sp. Q15 phân lập tại Ontario, Canada [11]. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác cần có kết quả phân tích hàm lượng các hợp chất trên sau khi nuôi cấy vi khuẩn.



Hình 5. Khả năng sử dụng n-alkan của chủng HK-B₃1

Trong các thành phần của dầu mỏ, hydrocacbon thơm là nhân tố gây độc nhất cho người và động vật. Hình 6 cho thấy, chủng HK-HF6 có thể sử dụng 80% hydrocacbon thơm, còn chủng HK-B₃1 sử dụng 72% hydrocacbon

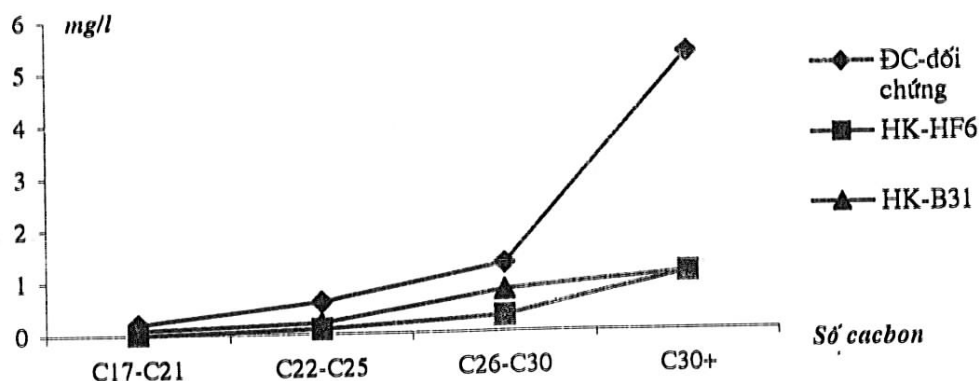
thơm có trong FO. So với một số kết quả đã công bố cho thấy hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 thuộc loại sử dụng hydrocacbon thơm tốt [5, 7], tuy nhiên chủng HK-HF6 có khả năng sử dụng hydrocacbon thơm tốt hơn. Sau 7 ngày nuôi cấy chủng HK-HF6 phân hủy hết 83,33% lượng hydrocacbon thơm trong vùng C₂₂ đến C₃₅; 76,92% lượng hydrocacbon thơm trong vùng C₂₅ đến C₃₀; và 79,25% lượng hydrocacbon thơm trong vùng từ C₃₀ trở lên. Chủng HK-B₃1 phân hủy hết 66,67% lượng hydrocacbon thơm trong vùng C₂₂ đến C₃₅; 38,46% lượng hydrocacbon thơm trong vùng C₂₅ đến C₃₀; 79,25% lượng hydrocacbon thơm trong vùng từ C₃₀ trở lên.

Các hợp chất hydrocacbon thơm đa vòng có số nguyên tử cacbon lớn thường có tính độc hơn đối với sức khỏe con người. Hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 đều có thể sử dụng hydrocacbon thơm trong các vùng từ C₂₂ trở lên, do đó có thể chúng có khả năng sử dụng hydrocacbon thơm đa nhân, điều này cần được kiểm tra trong các nghiên cứu tiếp theo.

Mỗi loại dầu đều có các hệ số đặc trưng và được đánh giá thông qua các tỷ lệ n-C17/pristan và n-C18/phytan. Do pristan và phytan là các n-alkan mạch nhánh khó bị phân hủy bởi vi sinh vật nên các tỷ lệ n-C17/pristan, n-C18/phytan thường được dùng để đánh giá sự phân hủy của

dầu do tác động của vi sinh vật. Các tỷ lệ n - C17/pristan, n-C18/phytan trong các mẫu dầu FO sau khi nuôi cấy hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 đều thấp hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng, kết quả này cũng phù hợp với kết quả về

phân tích thành phần nhóm n-paraffin (hình 4). Kết quả phân tích ở các hình 3, 5 cho thấy hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 có khả năng phân hủy các thành phần khác nhau trong FO dẫn đến các hệ số đặc trưng của dầu FO đã thay đổi (bảng 3).



Hình 6. Phân bố hydrocacbon thơm trong các mẫu dầu FO

Hiện nay, đã có nhiều công bố về khả năng sử dụng pristan và phytan, do đó để đánh giá chính xác hơn tác động của vi sinh vật đến quá trình phân hủy dầu người ta đã thay thế pristan và phytan bằng hoptan [2]. Tuy nhiên do điều kiện kỹ thuật ở Việt Nam chưa cho phép, nên các tỷ lệ n-C17/pristan, n-C18/phytan vẫn được dùng để xem xét tác động phân hủy dầu của vi sinh vật.

Hai chủng vi khuẩn HK-HF6 và HK-T3F1 thuộc chi *Pseudomonas*. Đây là chi vi khuẩn sử dụng dầu thường gặp. Hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 có thể sử dụng hydrocacbon thơm và hydrocacbon no mạch dài và thành phần phân cực có trong FO, đây là một trong những đặc điểm rất quan trọng của tập đoàn vi sinh vật bản địa. Điều này một lần nữa cho ta thấy khả năng của biện pháp phân hủy sinh học có thể làm sạch triệt để cặn thải nhiễm dầu.

III. KẾT LUẬN

1. Ba chủng vi khuẩn HK-HF6, HK-T3F1 và HK-B₃1 sử dụng dầu đã được phân lập từ cặn thải xăng dầu ở kho K130 thuộc Xí nghiệp xăng

dầu Quảng Ninh. Hai chủng HK-HF6 và HK-T3F1 là các vi khuẩn gram âm có tế bào hình que, tế bào chủng HK-T3F1 có tiên mao đơn cực. Chủng HK-B₃1 thuộc nhóm vi khuẩn gram dương, tế bào hình que dài. Dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý và kết quả phép thử API 20E, có thể xếp hai chủng HK-HF6 và HK-T3F1 vào chi *Pseudomonas*.

2. Ba chủng vi khuẩn này phát triển tốt trong môi trường khoáng chứa 5% FO hoặc dầu thô, ở nhiệt độ 28-37°C, pH = 7 và nồng độ muối từ 0-0,5%.

3. Các chủng vi khuẩn đều có thể sử dụng dầu thô của mỏ Bạch Hổ, hai chủng HK-HF6 và HK-B₃1 sử dụng rất tốt FO. Chủng HK-HF6 sử dụng 76,25% lượng dầu tổng số, 84,04% hydrocacbon no, 77,33% hydrocacbon thơm, 51,43% nhựa và 64,86% asphaten. Chủng HK-B₃1 sử dụng 57,47% lượng dầu tổng số, 78,87% hydrocacbon no, 72% hydrocacbon thơm, 22,86% nhựa và 24,32% asphaten. Chủng HK-B₃1 sử dụng tốt hexadecan, pristan, eicosan, ocosan. Hai chủng vi khuẩn này có khả năng phân hủy dầu cao, sử dụng tất cả các thành phần của dầu, đặc biệt là hydrocacbon mạch dài,

nhựa và asphaten là các thành phần rất khó phân hủy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atlas R. M., R. Bartha, 1992: Advances in microbial ecology, 12: 287-338.
2. Aeckerberg F. et al., 1998: Arch. Microbiol., 170: 361-369.
3. Bredholt H. et al., 1998: Can. J. Microbiol., 44: 330-340.
4. Đặng Thị Cẩm Hà và cs., 1996: Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1995. NXB KH&KT, Hà Nội, 356-365.
5. Đinh Thúy Hằng và cs., 1998: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 36(3): 1-12.
6. Genouw G. et al., 1994: Biodegradation, 5: 37-46.
7. Lại Thúy Hiền và cs., 1999: Tuyển tập các báo cáo khoa học tại Hội nghị môi trường toàn quốc năm 1998. NXB KH&KT, Hà Nội, 590-603.
8. Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà. 1998: Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1997. NXB KH&KT, Hà Nội.,
9. Song H.-G. et al., 1990: Appl. Envir. Microbiol., 56: 652-656.
10. Whyte L. G. et al., 1995: Can. J. Microbiol., 42: 99-106.
11. Whyte L. G. et al., 1998: Appl. Envir. Microbiol., 64: 2578-2584.
12. Vecchioli G. I. et al., 1997: J. Chem. Tech. Biotechnol., 70: 331-336.
13. Venkateswaran K. et al., 1995: Can. J. Microbiol., 41: 418-424.

SURVEY OF THE PETROLEUM HYDROCARBON-DEGRADING CAPACITY OF THREE BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM THE OIL SLUDGE IN VIETNAM

NGUYEN BA HUU, VU HONG NGA, DANG THI CAM HA

SUMMARY

Three petroleum hydrocarbon-degrading bacterial strains were isolated from the oil sludge of the K130 gasoline and oil storage in Northern Vietnam and designed as HK-T3F1, HK-HF6 and HK-B31. Based on the morphological, physiological characteristics and the results of API 20E tests, we proposed that two strains HK-T3F1 and HK-HF6 should be placed to genus *Pseudomonas*. These bacterial strains grew optimally in the mineral medium contained 5% fuel oil or heavy crude oil at 28-37°C, 0-0,5% NaCl and pH = 7.

The strain HK-HF6 degraded 76.25% total fuel oil, 84.04% saturated hydrocarbon fractions, 77.33% aromatic hydrocarbon fractions, 51.43% resin and 64.86% asphaten. The strain HK-B₃1 degraded 57.47% total fuel oil, 78.87% saturated hydrocarbon fractions, 72% aromatic hydrocarbon fractions, 22.86% resin and 24.32% asphaten. Two of these three strains the utilized the long chain hydrocarbons, the resin and the asphaten in the fuel oil. Especially, the strain HK-B31 utilized pristane, and the long chain alkanes including hexadecane, eicosane and ocosane such as the sole carbon and energy sources.

Ngày nhận bài: 25-6-2002