

Teresa Steliga*, Piotr Kapusta, Piotr Jakubowicz***

BIODEGRADACJA *EX SITU* GRUNTU Z KLASYCZNYCH GAZOWNI SKAŻONEGO WĘGLOWODORAMI ROPOPOCHODNYMI

1. WPROWADZENIE

Przemysłowa produkcja gazu z węgla, trwająca w danym obiekcie zazwyczaj kilkadziesiąt lat, doprowadziła do znacznego zanieczyszczenia terenów dawnych gazowni klasycznych.

Zanieczyszczenie gruntów węglowodorami naftowymi TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) oraz wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) następowało na skutek awarii w czasie produkcji oraz niewłaściwego zagospodarowania i składowania produktów odpadowych. Obecność, zwłaszcza w przypadku zmiany sposobu użytkowania terenu, zanieczyszczeń nieulegających samoistnej biodegradacji stanowi poważne zagrożenie [6]. W ostatnich latach coraz większe znaczenie zyskują badania dotyczące wprowadzenia metod biologicznych, które są przyjazne środowisku, skuteczne i tanie.

Biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych w skażonym środowisku uzależniona jest od wielu czynników fizyczno-chemiczno-biologicznych. Najbardziej istotne są [2, 3, 9]:

- właściwości fizykochemiczne gruntu,
- stężenie i struktura zanieczyszczeń ropopochodnych,
- stężenie związków biogennych (zwłaszcza azotu i fosforu),
- temperatura,
- zawartość tlenu,
- wilgotność,
- odczyn (pH),
- obecność związków toksycznych,
- skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów,
- aktywność biologiczna mikroorganizmów.

* Instytut Nafty i Gazu Oddział Krosno

** Instytut Nafty i Gazu w Krakowie

Bioremediacja podstawowa, w wyniku której zostaje uaktywniona naturalna mikroflora skażonego terenu, jest realizowana przez dostarczanie substancji biogennych (azot i fosfor) w postaci nawozów mineralnych, mające na celu uzyskanie optymalnych wartości C:N:P na poziomie 100:10:1. Prace badawczo-wdrożeniowe prowadzone przez pracowników INiG [9] oraz najnowsze doniesienia literaturowe dowodzą, że można osiągnąć znaczny stopień redukcji zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) [5, 16], a także obniżenie zawartości WWA w oczyszczanym gruncie [1, 4, 7, 12].

W celu przyspieszenia procesu biodegradacji zawartości zanieczyszczeń węglowodorowych (TPH, WWA) procesy biotechnologiczne prowadzi się przy wykorzystaniu efektywnych kultur mikroorganizmów uprzednio wyizolowanych ze skażonego terenu [5, 9, 13]. Do aktywnych kultur bakteryjnych zdolnych do biodegradacji WWA należą mikroorganizmy z grupy *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter*, *Pseudomonas* [18], *Norcardia*, *Mycobacterium* [12], *Sphingomonas* [5, 12]. Zadawalające efekty osiągnięto również stosując do biodegradacji WWA w gruncie biopreparaty na bazie grzybów *Phanerochaete chrysosporium* [13, 19].

W niniejszym artykule omówiono wyniki badań prowadzonych w skali laboratoryjnej metodą *ex situ* biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH, WWA) pochodzących z terenu gazowni klasycznej z zastosowaniem bioremediacji podstawowej w połączeniu z inokulacją biopreparatem sporządzonym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do opracowania wytycznych prowadzenia procesu biodegradacji w warunkach przemysłowych realizowanych metodą *in situ* [9].

Przebieg całego cyklu procesu oczyszczania gruntu pochodzącego z terenu gazowni klasycznej monitorowano za pomocą opracowanych chromatograficznych metod oznaczania TPH i WWA. Do oceny stopnia biodegradacji zastosowano biomarker $17\alpha(H),21\beta(H)$ -hopan (Supelco), który stanowi wyizolowaną frakcję z rop pochodzących ze złóż kalifornijskich [11].

Znormalizowane wyniki oznaczeń chromatograficznych TPH i WWAs wykonanych w trakcie prowadzenia procesu ich biodegradacji posłużyły do opracowania matematycznego modelu opisującego przebieg biodegradacji TPH i WWAs. Został on opisany równaniem

$$C/C_H = (C/C_H)_0 \exp(-kt),$$

gdzie:

- C – koncentracja analitu,
- C_H – koncentracja hopanu,
- $(C/C_H)_0$ – początkowe znormalizowane stężenie analitu,
- C/C_H – znormalizowane stężenie analitu w czasie,
- t – czas trwania procesu [dni],
- k – stała biodegradacji pierwszego rzędu [d^{-1}],

Przedstawienie przebiegu procesu biodegradacji TPH oraz WWAs powyższym równaniem znalazło potwierdzenie w doniesieniach literaturowych [15, 17].

2. METODYKA ANALITYCZNA

Na podstawie adaptacji istniejących i obowiązujących w tym zakresie norm polskich i zagranicznych oraz wieloletnich badań opracowano metodykę chromatograficznego oznaczania sumarycznej zawartości zanieczyszczeń węglowodorowych (TPH) w glebie [2, 8, 9, 14].

Opracowana metodyka obejmuje następujące etapy:

1. Izolację i wzbogacenie analitów (TPH) metodą ekstrakcji rozpuszczalnikowej modyfikowanej ultradźwiękami. Jako optymalny rozpuszczalnik zastosowano dichlorometan, czas oddziaływania ultradźwięków (30 kHz) na próbkę wynosił 30 min. Stopień odzysku analitu (98,6%) określono za pomocą standardu zastępczego SIS (*Surrogat Internal Standard*), którym był o-terfenyl.
2. Oczyszczenie analitów z substancji polarnych przeprowadzono przy zastosowaniu kolumnienek SPE wypełnionych sorbentem o nazwie Florisil.
3. Analizę identyfikacyjną i ilościową wykonano na chromatografie Clarus 500 GC firmy Perkin Elmer, wyposażonym w kolumnę kapilarną Quadrex 007 (30 m × 0,53 mm) firmy Panalytica, przy zastosowaniu programowanej temperatury pieca: 35°C – przebieg izotermiczny przez 2 min, 35÷300°C przyrost temperatury 10°C/min, 300°C przebieg izotermicznych przez 30 min.

Analiza chromatograficzna wykonana przy użyciu wzorców jakościowych i ilościowych umożliwia zidentyfikowanie węglowodorów alifatycznych, izoprenoidów, a także sumaryczne oznaczenie zawartości TPH.

W celu oznaczenia zawartości WWA w glebie pochodzącej z terenu gazowni klasycznej, wyizolowano frakcję aromatyczną i opracowano chromatograficzną metodykę oznaczania, która pozwala na zidentyfikowanie poszczególnych WWA oraz ich ilościowe oznaczenie [1, 7, 10, 13, 17]. Metodyka oznaczania WWA obejmuje następujące etapy:

1. Izolację analitów (WWA) poprzez zastosowanie ekstrakcji ciągłej (wg Soxhleta) za pomocą eteru naftowego frakcja 40÷60°C (firmy Merck) i zateżenie próbki do objętości 5 ml.
2. Wydzielenie frakcji WWA przez zastosowanie dwufazowych kolumnienek Bakerbond spe PAH Soil zawierających fazy: 500 mg Cyjano/1000 mg Silica Gel.
3. Elucję WWA z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników 3 × 3 ml acetonitrylu i toluenu (3:1).
4. Oczyszczenie analitu poprzez zastosowanie kolumnienki SPE z fazą Florisil (firmy Supelco).
5. Analizę chromatograficzną, którą wykonano na chromatografie Clarus 500 GC firmy Perkin Elmer wyposażonym w kolumnę kapilarną RTX-440 przy programie temperaturowym: 40°C – przebieg izotermiczny przez 2 min, 40÷240°C – przyrost temperatury 30°C/min, 240÷320°C przyrost temperatury 8°C/min, 320°C przebieg izotermiczny przez 10 min., temperatura inżektora i detektora FID – 320°C.

Analiza chromatograficzna przy zastosowaniu kalibracji wewnętrznej za pomocą wzorców jakościowych i ilościowych firmy Restek umożliwiła identyfikację poszczególnych WWA, a także sumaryczne oznaczenie ich zawartości (WWAs).

Niepewność wyników analiz chromatograficznych określono na podstawie normy ISO 6974-2 *Określenie niepewności wyników analizy chromatograficznej składu gazu ziemnego*, którą zaadaptowano na potrzeby powyżej przedstawionych chromatograficznych metodik analitycznych.

Do statystycznego przetworzenia otrzymanych wyników analiz chromatograficznych zastosowano program „Statistica” wersja 7.1.

3. CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU BADAWCZEGO

Do badań wytypowano grunt pochodzący z wyłączonej z eksploatacji gazowni klasycznej położonej na północy Polski. Próbkę do badań pobrano w pobliżu dołów ze smołą pogazową z głębokości 1÷1,5 m p.p.t., które zostały uśrednione i poddane analizom (próbka SW-1).

Dzięki opracowanej metodyce chromatograficznych oznaczeń zanieczyszczeń (TPH) w glebie zidentyfikowano węglowodory alifatyczne o długości łańcucha od n-C₁₀ do n-C₃₈ oraz węglowodory z grupy izoprenoidów: pristan (Pr) i fitan (F). Sumaryczna zawartość TPH wynosi 6268,5 mg/kg s.m., przy czym odnotowano stosunkowo wysoki udział węglowodórów ciężkich z zakresu n-C₁₉ – n-C₃₆ (tab. 1).

Tabela 1

Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodórów alifatycznych i izoprenoidów wchodzących w skład zanieczyszczeń (TPH) w próbce surowej (SW-1)

Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]	Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]	Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]
n-C ₁₀	297,02	n-C ₁₈	192,10	n-C ₂₆	102,58
n-C ₁₁	321,45	fitan (F)	32,24	n-C ₂₈	72,04
n-C ₁₂	280,05	n-C ₁₉	197,08	n-C ₃₀	68,11
n-C ₁₃	324,56	n-C ₂₀	212,40	n-C ₃₂	52,05
n-C ₁₄	279,45	n-C ₂₁	105,11	n-C ₃₄	34,08
n-C ₁₅	124,05	n-C ₂₂	274,58	n-C ₃₆	42,48
n-C ₁₆	358,50	n-C ₂₃	95,23	niezidentyf.	1984,00
n-C ₁₇	212,39	n-C ₂₄	182,10	Suma (TPH)	6268,50
pristan (Pr)	62,27	n-C ₂₅	62,48		

Analiza chromatograficzna umożliwiła zidentyfikowanie 16 WWA, których sumaryczna zawartość kształtuje się na wysokim poziomie wynoszącym 1068,77 mg/kg s.m. Przeważają WWA o liczbie pierścieni: 4 (54%), 5 (13,7%), 6 (15,4%) (tab. 2).

Tabela 2

Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbce gleby surowej (SW-1)

Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]	Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]
Naftalen (N)	16,01	Chryzen (CH)	111,61
Acenaftalen (Acl)	18,05	Benzo(b)fluoranten (BbF)	119,25
Acenaften (Ac)	9,31	Benzo(k)fluoranten (BkF)	18,57
Fluoren (Fluo)	5,25	Benzo(a)piren (BaP)	94,58
Fenantren (Fen)	41,50	Indeno(1,2,3,cd)piren (IndP)	82,48
Antracen (A)	48,50	Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	52,45
Fluoranten (F)	81,52	Benzo(g,h,i)perylene (BgHiP)	72,58
Piren (Pir)	121,58	niezidentyfikowane	42,94
Benzo(a)antracen (BaA)	132,59	Suma WWA (WWAs)	1068,77

Ponadto oznaczono chromatograficznie zawartości BTEX: ksylen – 29 mg/kg s.m. oraz fenol – 11,58 mg/kg s.m., o-krezol – 9,8 mg/kg s.m., 2,4 dimetylofenol – 4,8 mg/kg s.m., które nie przekraczają dopuszczalnych wartości dla obszaru „C” z głębokości 0÷2 m p.p.t. W próbce gleby SW-1 stwierdzono, że stosunek zawartości azotu do fosforu kształtuje się na poziomie 1:9, co odbiega od optymalnego stosunku wynoszącego 10:1 [2, 7] i świadczy o tym, że w badanym gruncie nie ma sprzyjających warunków do rozwoju mikroorganizmów. Odczyn (pH) gleby wynosi 5,67, natomiast wilgotność – 9,2% wag.

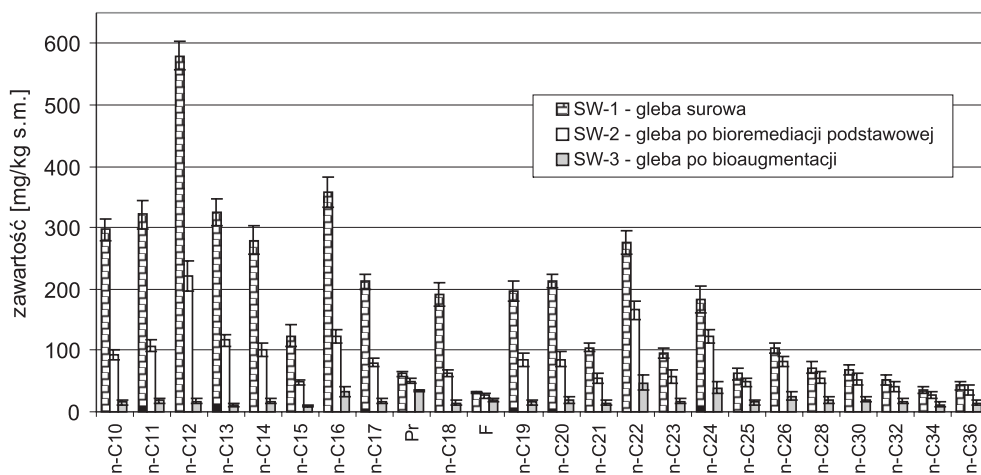
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH BIODEGRADACJI ZANIECZYSZCZEŃ TPH

Próbka gleby SW-1 pobrana na terenie gazowni stanowiła materiał w badaniach laboratoryjnych realizowanych metodą *ex situ*, które pozwalają na kontrolę przebiegu procesów biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych, dobór optymalnych dawek wapna nawozowego i nawozów mineralnych, wstępne określenie ram czasowych prowadzenia poszczególnych etapów oczyszczania oraz zapoznania się z efektywnością biopreparatu opracowanego na bazie mikroorganizmów autochtonicznych [9].

Glebę na stanowisku badawczym poddano procesowi bioremediacji podstawowej stymulowanej poprzez napowietrzanie oraz za pomocą stworzenia optymalnych warunków pokarmowych, wodnych, ustalenie odpowiedniego odczynu, a także warunków termicznych. W celu osiągnięcia odpowiedniego odczynu na poziomie pH ~7,5 oraz stosunku azotu do fosforu (1:10) w glebie zastosowano dawki wapna nawozowego i nawozu mineralnego (Azofoska o składzie: NO₂-N (7,5%), NH₃-N (10,5%), P₂O₅-P (11%), K₂O (19,1%),

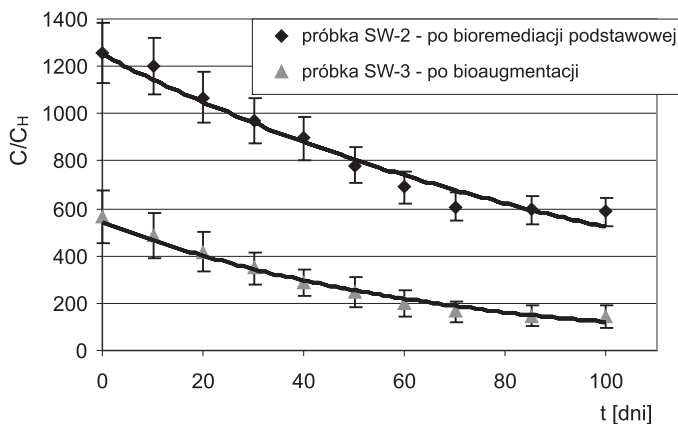
K₂SO₄ (4,4%)), które określono na podstawie badań laboratoryjnych. Temperaturę wewnątrz przyzmy utrzymywano na poziomie 17÷20°C, natomiast wilgotność w granicach 20÷25% wag., stosując zraszanie wodą. Opracowana metodyka chromatograficznego oznaczania TPH w glebie umożliwia pełną kontrolę przebiegu biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych.

W wyniku prowadzonego w warunkach laboratoryjnych procesu bioremediacji podstawowej stymulowanej poprzez dobór optymalnych parametrów jej przebiegu na podstawie analiz chromatograficznych można stwierdzić, że po okresie 70 dni nastąpiła znaczna redukcja zanieczyszczeń TPH z 6268,50 do 3042 mg/kg s.m. (51,4%), która utrzymuje się na zbliżonym poziomie w ciągu dalszych dni prowadzenia procesu bioremediacji (rys. 2). Wykonane analizy chromatograficzne pozwoliły również ocenić stopień biodegradacji poszczególnych węglowodorów alifatycznych wchodzących w skład TPH (rys. 1). Przedstawione wyniki analiz chromatograficznych pozwalają na stwierdzenie, że podczas bioremediacji podstawowej najwyższy stopień obniżenia zaobserwowano dla węglowodorów szeregu alifatycznego n-C₁₀ – n-C₂₀ w granicach 57,2÷69,0%, co szczególnie widoczne jest dla węglowodorów n-C₁₂ z 580,05 do 220,69 mg/kg s.m. oraz n-C₁₃ z 324,56 do 116,43 mg/kg s.m. oraz n-C₁₆ z 358,00 do 128,04 mg/kg s.m. Węglowodory cięższe z zakresu n-C₂₅ – n-C₃₆ ulegają biodegradacji w niższym stopniu, który kształtuje się na poziomie 16,2÷23,5%. Węglowodory z grupy izoprenoidów (Pr i F) ulegają trudno biodegradacji i mogą posłużyć jako wskaźnik stopnia biodegradacji w postaci stosunków n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F, które w wyniku prowadzonego procesu oczyszczania uległy zmniejszeniu odpowiednio z 3,419 do 1,658 oraz z 5,958 do 2,403.



Rys. 1. Zmiany zawartości zidentyfikowanych węglowodorów z terenu gazowni klasycznej po kolejnych etapach oczyszczania

Bioremediacja podstawowa polega jedynie na uaktywnianiu naturalnej mikroflory skażonego terenu, co wykorzystano do obniżenia początkowej koncentracji TPH. Uzyskano wzrost liczebności mikroorganizmów z $8,5 \times 10^5$ do $9,2 \times 10^6$ jtk/1 g s.m. gleby.



Rys. 2. Obniżenie zawartości TPH (C/C_H) znormalizowane hopenem po kolejnych etapach biodegradacji

Na podstawie badań mikrobiologicznych gleby SW-1 w połączeniu z analizami chromatograficznymi opracowano biopreparat z wyizolowanych, wyselekcjonowanych i namnożonych mikroorganizmów autochtonicznych, ukierunkowanych na biodegradację zidentyfikowanych wcześniej zanieczyszczeń ropopochodnych. Biopreparat opracowany w Zakładzie Mikrobiologii INiG zawierał 28 kultur bakteryjnych pochodzących z próbki gleby SW-1. Przy jego sporządzaniu szczególną uwagę zwrócono na wyizolowanie i namnożenie kultur bakteryjnych zdolnych do biodegradacji WWA [5, 12, 18, 19].

Etap inokulacji biopreparatem sporządzonym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych w postaci aktywnej zawiesiny o stężeniu 1×10^9 jtk/ 1 cm^3 , w warunkach laboratoryjnych przeprowadzono w dwóch seriach w ciągu 85 dni. Spowodował on obniżenie zawartości TPH do poziomu 733,06 mg/kg s.m., co stanowi 75% redukcji zanieczyszczeń (rys. 2). Wykonane analizy chromatograficzne pozwalają na stwierdzenie, że najwyższy stopień redukcji odnotowano dla szeregu alifatycznego od n-C₁₂ do n-C₂₂ na poziomie $92,3 \div 71,3\%$.

Węglowodory cięższe z zakresu od n-C₂₃ do n-C₃₆ również uległy biodegradacji w zadowalającym stopniu w granicach $70,0 \div 58,6\%$, co świadczy o szerokim spektrum działania biopreparatu (rys. 1). Obliczone wskaźniki stopnia biodegradacji węglowodorów alifatycznych uległy zmniejszeniu: n-C₁₇/Pr z 1,658 do 0,490 oraz n-C₁₈/F z 2,403 do 0,777.

W celu opracowania matematycznego modelu przebiegu procesu biodegradacji TPH w kolejnych etapach oczyszczania zastosowano w badaniach laboratoryjnych biomarker 17 α (H),21 β (H)-hopen względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji TPH oznaczanej w trakcie przebiegu procesu biodegradacji.

Przebieg procesu biodegradacji opisano równaniem

$$C/C_H = (C/C_H)_0 \exp(-kt).$$

Poszczególne współczynniki równania dla kolejnych etapów biodegradacji przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji TPH w kolejnych etapach procesu oczyszczania próbki gleby SW-1

Etap oczyszczania	k [d ⁻¹]	$(C/C_0)_0$	Współczynnik regresji r^2
Bioremediacja podstawowa (SW-2)	0,0087	1249	0,9554
Bioaugmentacja biopreparatem (SW-3)	0,0151	540	0,9683

Stała biodegradacji pierwszego rzędu (k) jest znacznie wyższa przy biodegradacji TPH podczas etapu bioaugmentacji opracowanym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych biopreparatem, co świadczy o większej dynamice przebiegu tego procesu. Współczynnik regresji (r^2) jest zbliżony do jednościci, co świadczy o zadowalającym dopasowaniu punktów pomiarowych do krzywych opisanych powyższym równaniem. Prawidłowość postępowania podczas próby opracowania modelu matematycznego biodegradacji potwierdzają doniesienia literaturowe [15, 17].

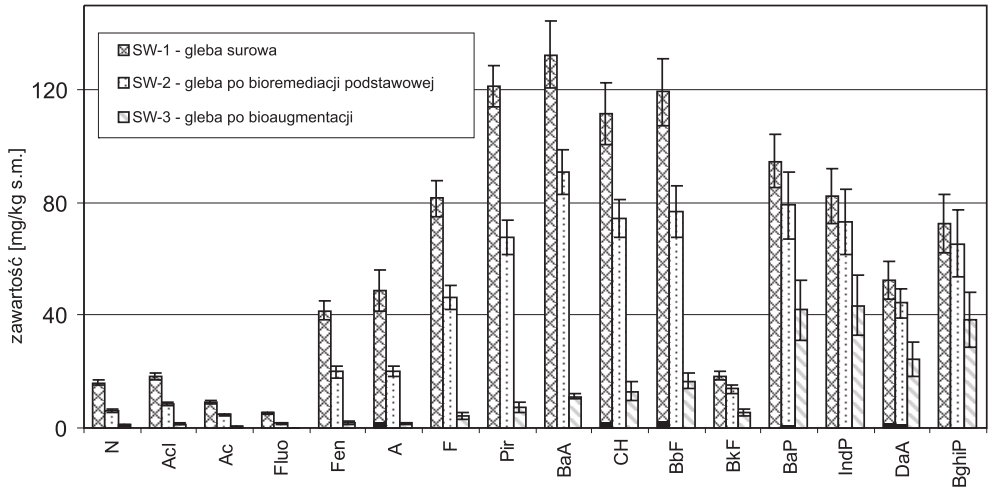
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH BIODEGRADACJI WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH (WWA)

Gleba (próbka SW-1) pochodząca z terenu gazowni klasycznej jest zanieczyszczona wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, których sumaryczna zawartość (WWAs) znacznie przekracza dopuszczalne normy. W składzie zanieczyszczeń przeważają cztero-, pięcio- i sześciopierścieniowe węglowodory aromatyczne (tab. 2).

Prowadzone badania laboratoryjne (metodą *ex situ*) procesu bioremediacji podstawowej, stymulowanej przez optymalny dobór parametrów jej przebiegu, wykazały, że osiągnięto obniżenie zawartości WWAs z 1068 do 698 mg/kg s.m. w okresie 80 dni. Analiza chromatograficzna pozwala na określenie stopnia redukcji poszczególnych WWA. Najwyższy stopień obniżenia zawartości zaobserwowano dla węglowodorów o najniższej liczbie pierścieni (3), których zawartość była najniższa i kształtował się on na poziomie 68,9÷50,2%. Natomiast dla czteropierścieniowych WWA (F, Pir, BaA, CH, BbF, BkF), stopień redukcji był nieznacznie niższy i zawierał się w granicach od 44 do 28%, co szczególnie dobrze widoczne jest dla: pirenu (z 121,58 do 64,77 mg/kg s.m.), chryzenu (z 11,69 do 74,9 mg/kg s.m.) oraz benzo(a)antracenu (z 132,58 do 90,82 mg/kg s.m.). Węglowodory pięciopierścieniowe (BaP oraz DaA) ulegają trudniej biodegradacji, której efektywność określono na poziomie 10,5÷5,6%, a dla węglowodorów o sześciu pierścieniach – IndP i BghiP – na poziomie 11,2÷9,2% (rys. 3).

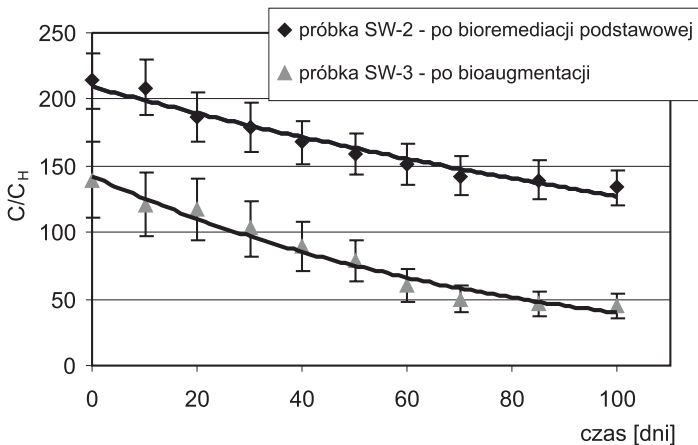
Przeprowadzenie etapu inokulacji biopreparatem przyczyniło się do znacznego obniżenia sumarycznej zawartości WWAs. Uzyskane wyniki dowodzą, że następuje stopniowy spadek zawartości WWAs zachodzący w okresie 85 dni z poziomu 698 do 212 mg/kg s.m. Wykonane analizy chromatograficzne pozwalają na stwierdzenie, że najwyższy stopień redukcji zawartości odnotowano dla Acl, Ac, Fluo, Fen, A – w granicach 82,3÷91,5%, zaś dla WWA – 4-pierścieniowych (F, Pir, BaA, CH, BbF, BkF) osiągnięto niższy stopień re-

dukcji w granicach 71,2 do 61,5%. Dla WWA zbudowanych z pięciu i sześciu pierścieni (BaP, IndP, DaA, BghiP) również osiągnięto znaczne obniżenie zawartości od 47,5 do 41,2% (rys. 3).



Rys. 3. Zmiany zawartości zidentyfikowanych WWA z terenu gazowni klasycznej po kolejnych etapach oczyszczania

W celu określenia szybkości biodegradacji WWA w badaniach laboratoryjnych zastosowano biomarker $17\alpha(H),21\beta(H)$ -hopan, względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji WWA zmieniającej się w trakcie prowadzenia kolejnych etapów procesu oczyszczania (rys. 4).



Rys. 4. Obniżenie zawartości WWA znormalizowane hopanem (C/C_H) po kolejnych etapach biodegradacji

Przebieg procesu biodegradacji WWAs opisano równaniem

$$C/C_H = (C/C_H)_0 \exp(-kt),$$

którego współczynniki przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji WWAs w kolejnych etapach procesu oczyszczania surowej próbki gleby (SW-1)

Etap oczyszczania	k [d ⁻¹]	$(C/C_H)_0$	Współczynnik regresji r^2
Bioremediacja podstawowa (SW-2)	0,0050	209	0,9631
Bioaugmentacja biopreparatem (SW-3)	0,0128	142	0,9721

Stała biodegradacji pierwszego rzędu (k) dla etapu bioremediacji podstawowej jest znacznie niższa niż dla bioaugmentacji aktywnym preparatem z mikroorganizmów autochtonicznych. Ponadto porównując stałe szybkości dla TPH i WWAs można stwierdzić, że szybkość biodegradacji TPH jest znacznie wyższa (tab. 3 i 4). Jednakże szybkość biodegradacji osiągnięta dla WWAs podczas inokulacji biopreparatem jest wysoka, co świadczy o efektywnym działaniu sporządzonego biopreparatu. Współczynnik regresji (r^2) kształtuje się na zadowalającym poziomie (0,963÷0,972), co świadczy o dobrym dopasowaniu krzywych pierwszorzędowego modelu biodegradacji do punktów pomiarowych. W celu głębszego oczyszczenia gleby z WWA wskazane jest powtórne przeprowadzenie procesu inokulacji biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych.

6. PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań dowodzą prawidłowości podjętych decyzji o zastosowaniu etapowego oczyszczania gleby z terenu gazowni klasycznej obejmującego bioremediację podstawową i inokulację biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych. Obniżenie zawartości zanieczyszczeń (TPH i WWA) w glebie z terenu gazowni do poziomu określonego przez standardy glebowe uzyskano dzięki optymalizacji czynników mających wpływ na przebieg biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

Dzięki opracowanej metodyce chromatograficznego jakościowego i ilościowego oznaczania zanieczyszczeń węglowodorowych (TPH i WWA) istnieje możliwość pełnej kontroli przebiegu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych. Pozwala ona na uchwycenie zmian zawartości poszczególnych węglowodorów alifatycznych i aromatycznych wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych, zachodzących podczas procesu ich biodegradacji w poszczególnych etapach oczyszczania.

Połączenie analiz chromatograficznych z badaniami mikrobiologicznymi pozwoliło na opracowanie biopreparatów na bazie mikroorganizmów autochtonicznych o składzie i za-

kresie działania ściśle dopasowanym do chemicznego charakteru zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH i WWA) występujących w glebie z terenu wyłączonej z eksploatacji gazowni klasycznej.

Zastosowanie biomarkera $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -hopanu do normalizacji stężeń TPH i WWAs w trakcie przebiegu poszczególnych etapów biodegradacji pozwoliło na stworzenie modelu matematycznego opisującego kinetykę biodegradacji TPH i WWAs.

LITERATURA

- [1] Alexander R.R., Tang J., Alexander M.: *Genotoxicity is Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Undergoing Biological Treatment*. J. Environ. Qual., No. 31, 2002, 150–154
- [2] Chaîneau C.H., Ypreman C., Vidalie J.F., Ducreux J., Ballerini D.: *Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments*. Water, Air, and Soil Pollut., 144, 2003, 419–40
- [3] Hejazi R.F., Husain T.: *Land form performance under aird conditions. 2. Evaluation of parameters*. Environ. Sci. Technol., No. 8, 2004, 2457–2469
- [4] Huesemann M.H., Hausmann T.S., Fortman T.J.: *Assessment of Bioavailability Limitations During Slurry Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Aged Soils*. Environm. Toxic. and Chemistry, vol. 22, No. 12, 2003, 2853–2860
- [5] Johnsen A.R., Winding A., Karlson U., Roslev P.: *Linking of Microorganisms to Phenathrene Metabolism in Soil by Analysis of ^{13}C -Labeled Cell Lipids*. Applied Environm. Microbiol., vol. 68, No. 12, 2002, 6106–6113
- [6] Piskowska-Wasiak J.: *Metody rekultywacji terenów wyłączonych z eksploatacji gazowni klasycznych*. Gaz, Woda i Technika Sanitarna, nr 3, 2005, 4–11
- [7] Saponaro S., Bonomo L., Petruzzelli G., Romele L., Barbaferi M.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Slurry Phase Bioremediation of A Manufacturing Gas Plant (MGP) Site Aged Soil*. Water, Air, and Soil Poll., No. 135, 2002, 219–236
- [8] Steliga T.: *The effectiveness of soil purification from petroleum hydrocarbons verify by usage ultrasound extraction combined with gas chromatography*. The XXVIII Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Katowice, 2003, 34–36
- [9] Steliga T.: *Technologia oczyszczania gruntów z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą in situ*. Kraków, Prace INiG, nr 133, 2006, 1–78
- [10] Spriggs T., Banks K., Schwab P.: *Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Manufactured Gas Plant- Impacted Soil*. J. Environ. Qual., No. 34, 2005, 1755–1762
- [11] Venosa A.D., Suidan M.T., Wrenn B.A., Strohmeier K.L., Haines J.R., Eberhart B.L., King D., Holder E.: *Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of delaware bay*. Env. Scien. & Techn., No. 30, 1996, 1764–1775
- [12] Wattiau P.: *Microbial Aspects in Bioremediation of Poluuted by Polyaromatic Hydrocarbons*. Biotechnology for the Environment: Strategy and Fudamentals, 2002 Kluwer Acad. Publishers, 69–89

- [13] Wiesche C., Martens R., Zadrazil F.: *The Effect of Interaction Between White- Rot Fungi and Indigenous Microorganisms on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil*. Water, Air, and Soil Poll., No. 3, 2003, 73–79
- [14] Wilcke W., Krauss M., Safroniv G., Fokin A.J., Kaupenjohann M.: *Polycyclic Hydrocarbons (PAHs) in Soils of the Moscow Region- Concentrations, Temporal Trends, and Small – Dcale Disteibution*. J. Environ. Qual., No. 34, 2005, 1581–15906
- [15] Xu R., Lau N.L.A., Ng K.L., Obbard J.P.: *Application of a Slow-Release Fertilizer for Oil Bioremediation in Beach Sediment*. J. Environ. Qual., No. 33, 2004, 1210–1216
- [16] Xu R., Obbard J.P.: *Effect of Nutrient Amendments on Indigenous Hydrocarbon Biodegradation in Oil-Contaminated Beach Sediments*. J. Environ. Qual., No. 32, 2003, 1234–1243
- [17] Xu R., Obbard J.P.: *Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oil-Contaminated Beach Sediments Treated with Nutrient Amendments*. J. Environ. Qual., 33, 2004, 861–867
- [18] Yu S.H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y.: *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments*. Environm. Internat., No. 31, 2005, 149–154
- [19] Zheng Z., Obbard J.P.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by Surfactant Solubilization and Phanerochaete chrysosporium Oxidation*. J. Environ. Qual., 31, 2002, 1842–1847