



# Możliwość biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach zanieczyszczonych przez przemysł naftowy

## Biodegradation potential of total petroleum hydrocarbons in oil industry contaminated soils

Maria KOPYTKO <sup>1)</sup>, Diana Marcela IBARRA MOJICA <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Faculty of Environmental Engineering; Universidad Pontificia Bolivariana; Autopista a Piedecuesta Km. 7 – Bucaramanga, Colombia; tel.: +57-7-6796220 ext. 478; fax: +57-7-6796221; e-mail: mkopytko2001@yahoo.com

<sup>2)</sup> Faculty of Environmental Engineering; Universidad Pontificia Bolivariana; Autopista a Piedecuesta Km. 7 – Bucaramanga, Colombia; tel.: +57-7-6385222; e-mail: dibarramojica@gmail.com

RECENZENCI: prof. Ing. Peter FEČKO, dr hab. inż. Barbara TORA

### Streszczenie

Zbadano gleby zanieczyszczone przez przemysł naftowy pochodzące z pola naftowego Santander w Kolumbii. Gleby charakteryzowały się trzema różnymi okresami trwania zanieczyszczenia związkami ropopochodnymi. Wszystkie badane gleby wykazywały szybką infiltrację i wysoką przepuszczalność, co jest charakterystyczne dla gleb piaszczystych. Pomimo to, hydrofobowy charakter węglowodorów miał wpływ na ich zdolność retencji wody i porowatość. Stosunek pierwiastków węgiel: azot, fosfor, temperatura i pH ocenione dla badanych gleb wykazywały optymalne wartości – odpowiednie dla procesu bioremediacji [bioregeneracji]. Najlepsze wyniki pod względem usuwania węglowodorów (42,6%) uzyskano wówczas, gdy próbki gleby oczyszczano oddzielnie, mieszając je z czystą, pozbawioną nie tylko dodatku wybranej i rozwiniętej mieszaniny drobnoustrojów, lecz również pozbawionej wstępnego działania bio-surfaktantów, (*Serratia*) gleby. Mieszanina gleb składająca się w 50% z gleby o najdłuższym okresie zanieczyszczenia oraz po 25% z gleb o średnim i krótkim okresie zanieczyszczenia wykazała średni stopień usunięcia sumy węglowodorów ropopochodnych (TPH – total petroleum hydrocarbons) wynoszący 28,6%. Gleba ta została poddana wstępnemu działaniu biosurfaktantu przez okres tygodnia oraz dodano do niej mieszanki drobnoustrojów na początku i w połowie trzytygodniowego okresu biodegradacji. Biorąc pod uwagę, że prowadząc biodegradację gleby używając wyłącznie mieszaniny zanieczyszczonych gleb do tego celu pozwala się uniknąć przenoszenia zanieczyszczenia do czystej gleby, i oczyszczanie za pomocą tej techniki pozwoliło osiągnąć 3,0% zawartości końcowej TPH (wartość zalecana przez Zarządzenie 29B Stanu Louisiana, stosowane w Kolumbii), takie oczyszczenie byłoby zalecane w połączeniu z optymalnymi stwierdzonymi warunkami oczyszczania.

### Summary

Three sources of soil with different petroleum contamination ages were studied in an oil field in the province of Santander, Colombia. All the studied soils showed rapid infiltration and high permeability, characteristics of sandy soils. Nonetheless, water retention capacity and porosity were affected by the hydrophobic character of the hydrocarbons. The carbon-nitrogen-phosphorus ratio, temperature and pH evaluated in the contaminated soils, showed optimum values, adequate for bioremediation processes. The best results, in terms of hydrocarbon elimination (42.6%), were obtained when the soils were treated separately, mixed with clean soil, lacking not only the addition of the selected and enlarged mixed microbial pool, but also the pre-treatment with the bio-surfactant, which was composed by bacteria of the genus *Serratia*. The soil mixture composed of 50% of the soil with the oldest contamination, and an equal 25% proportion of both the medium and shortest contamination age soils, showed a total petroleum hydrocarbon (TPH) elimination percentage of 28.6%. This soil underwent one week of pre-treatment process, and a mixed microbial pool addition at the beginning and half way through a three-week biodegradation treatment period. An independent remediation treatment, without addition of both pre-treatment and microbial pool was conceived for the initial treatment design. However, considering that biodegrading soil solely as a mixture of contaminated soils avoids the transfer of contaminants to the clean soil, and that the best treatment using this technique reached a 3.0% content of total hydrocarbons (value recommended by the Louisiana 29B regulation), this treatment was recommended combined with the optimum treatment conditions obtained.

Słowa kluczowe: bioremediacja (bioregeneracja), gleby, całkowita zawartość węglowodorów (TPH).

Keywords: Bioremediation, soils, total petroleum hydrocarbons (TPH).

### Wstęp

Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Amerykański Instytut Ropy Naftowej wykazały, że głównymi źródłami zanieczyszczeń na polach naftowych są ropopochodne szlamy, zanieczyszczone ropą zwierciny, skorodowane rury, wycieki i miejsca zrzutu ropopochodnych odpadów o konsystencji pół-stałej [1].

### Introduction

Previous research performed by the American Petroleum Institute showed that the main sources of contamination in oil fields are the inverse type petroleum mud, cuts, corroded pipes spills, and semi-solid oil waste dumps [1].

Niektóre fizyczne i chemiczne metody oczyszczania mające prowadzić do rekultywacji skażonych gruntów polegają na ekstrakcji z parą wodną, obmywaniu gleby, przeprowadzaniu odpadów w stan stały i ich stabilizacji, termicznej desorpcji, rozdzielaniu technikami elektrokinezycznymi, spalaniu, ekstrakcji za pomocą rozpuszczalników, procesach utleniania i redukcji i usuwania związków chlorowcowych drogą chemiczną. Chociaż metody te są skuteczne w przypadku usuwania zanieczyszczeń, są one na ogół pomyślane jako rozwiązania doraźne i często zanieczyszczenia te są przenoszone do innego ośrodka. W chwili obecnej bioremediacja stanowi jedyną metodę rekultywacji gleby, która oznacza skuteczne przekształcenie zanieczyszczeń w nieszkodliwe substancje; ponadto jest to metoda bardzo efektywna i ekonomiczna [2].

W zwykłym procesie degradacji za pomocą drobnoustrojów wykorzystuje się aktywność metaboliczną albo do usunięcia pewnych substancji zanieczyszczających, albo do przekształcenia ich w inne, mniej agresywne substancje, zmniejszając przez to zagrożenie dla środowiska i dając priorytet normalnym enzymatycznym procesom biodegradacji odpowiedzialnym za procesy samooczyszczania w środowisku naturalnym [3].

Aby procesy biodegradacji były skuteczne, należy zoptymalizować niektóre parametry fizyczne i chemiczne, takie jak wilgotność, natlenienie i pH. Różne rodzaje gleby charakteryzują się różnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi, co wpływa na ważność utrzymania na odpowiednim poziomie pewnych określonych parametrów. Do najbardziej istotnych należą tekstura, struktura, porowatość, przepuszczalność, infiltracja, gęstość, wilgotność, pH oraz zawartość substancji odżywczych [4].

Wartość pH uważa się za najważniejszy parametr w procesie biodegradacji, ponieważ stanowi on kluczowy czynnik dla dostępności substancji odżywczych, a tym samym dla rozwoju drobnoustrojów w glebie. Na ogół bakterie nie tolerują warunków nadmiernie kwaśnych; wskaźnik pH gleby powinien utrzymywać się w przedziale pomiędzy 6 a 8 [5].

Z chwilą gdy ropa przedostanie się do gleby, jej składniki mogą zostać przeniesione do jezior, rzek i wody gruntowej. Mogą także przywrzeć do cząstek stałych lub odparować do powietrza (składniki lekkie). Węglowodory posiadają zdolność rozpuszczania tkanek roślin, uniemożliwiając roślinom odpowiednią wymianę gazową z otoczeniem, doprowadzając przez to do uduszenia się rośliny. U ludzi i zwierząt, wdychanie/połykanie węglowodorów może prowadzić do podrażnienia dróg oddechowych i przewodu pokarmowego. Długotrwałe wystawienie na lotne związki organiczne może powodować czasowe lub stałe zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym [6].

Biodegradacji węglowodorów sprzyja duża różnorodność drobnoustrojów, które wytwarzają w tym celu specjalne enzymy [7].

Some physical and chemical treatment strategies to recover affected lands are: vapor extraction, soil washing, solidification and stabilization, thermal desorption, electro-kinetic separation, incineration, extraction with solvents, oxidation and reduction processes and chemical de-halogenations. Although these strategies are efficient for contaminant removal, they are generally conceived as temporary solutions and often, the contamination is transferred to other medium. At the moment, bioremediation is the only method for soil recovery that implies an effective contaminant transformation into innocuous substances; in addition, it is very efficient and economical [2].

In a regular microbial degradation process, metabolic activity is used either to eliminate certain contaminant substances or to transform them into other substances that are less aggressive, therefore reducing environmental risks and favoring the normal enzymatic biodegradation processes responsible for the self depurative action of the environment [3].

In order to have a successful biodegradation process, some physical and chemical parameters like humidity, temperature, aeration and pH should be optimized. Different types of soil have different physical and chemical properties which affects the importance of controlling some specific parameters. Among these, texture, structure, porosity, permeability, infiltration, density, humidity, pH and nutrient content are the most relevant [4].

The pH is considered the most important parameter in biodegradation processes because it constitutes a key factor for nutrient availability, and therefore for organisms' development in soil. Generally, bacteria do not tolerate exceedingly acidic conditions; soil must maintain a pH between 6 and 8 [5].

Once oil has reached the soil, its components can be dragged or transported to lakes, rivers and groundwater. They can also become adhered to soil particles or volatilized into air (light compounds). Hydrocarbons are capable of dissolving plant tissue, preventing the plant from having an adequate gas exchange with the environment, thus suffocating the plant. In human beings and other animals, hydrocarbon ingestion can generate irritation of the respiratory and digestive pathways. Prolonged exposure to volatile organic compounds can cause temporary or permanent alterations of the central nervous system [6].

Hydrocarbon biodegradation is favored by a great variety of microorganisms which produce specific enzymes for this purpose [7].

Jedną z najczęstszych technik biodegradacji gleby stosowaną w przemyśle naftowym jest tzw. *landfarming*. Stosowanie tej techniki polega na układaniu zanieczyszczonej gleby warstwami. Warstwy te nie są zazwyczaj dużej grubości i wymagają regularnego nawadniania aby stymulować proces biodegradacji. Aby przyspieszyć ten proces często dodaje się drobnoustrojów rodzimych lub obcego pochodzenia. Można je znaleźć w specyficznych konsorcjach drobnoustrojów prowadzących biodegradację pewnych związków. Jednakże nie zawsze są one wydajne z uwagi na ich brak zdolności adaptacyjnych lub negatywne wzajemne oddziaływanie z rodzimymi drobnoustrojami.

Często sporządza się mieszaninę zanieczyszczonej i czystej gleby, aby poprawić warunki fizyczne i chemiczne zanieczyszczonej gleby i obniżyć stężenie zanieczyszczeń. Według cytowanych prac nie ma żadnych doniesień na temat poprawy warunków fizykochemicznych lub mikrobiologicznych procesu bioremediacji w przypadku mieszania gleb zanieczyszczonych ropą naftową. Niniejsza praca stanowi ważny wkład w ulepszenie techniki bioregeneracji, ponieważ nie następuje przeniesienie zanieczyszczenia do czystej gleby i objętość poddawanej oczyszczaniu gleby, zmniejsza się gdy obniżeniu ulega zawartość czystej gleby stosowanej w mieszance.

Niniejsze badania skupiają się na glebach zanieczyszczonych ropą. Wiadomo, że gleby, które są zanieczyszczone już od dłuższego czasu wykazują dużą różnorodność drobnoustrojów przystosowanych do węglodorów. Opierając się na tym fakcie, połączono gleby zawierające różne okresy trwania zanieczyszczenia, w celu stymulowania procesu biodegradacji i uniknięcia przenoszenia zanieczyszczeń do czystej gleby.

Kilka gatunków bakterii i grzybów, otrzymanych z badanych zanieczyszczonych gleb, użyto do biologicznego oczyszczania tych ziem i zastosowano w procesie bioremediacji w celu stymulowania biodegradacji TPH. Przeprowadzono także wstępny proces działania bio-surfaktantów w celu zwiększenia dostępności biologicznej TPH.

## Procedura doświadczalna

Niniejsze badania zostały przeprowadzone etapowo. Rys. 1 przedstawia procedurę doświadczalną, według której przeprowadzono badania.

Pierwszy etap obejmował pobieranie próbek odpowiednich rodzajów gleby: badania w terenie oraz analizy fizykochemiczne i mikrobiologiczne. Pobrane próbki oznaczono symbolami S1, S2, i S3 – były to próbki o odpowiednim najwyższym, średnim i najniższym czasie trwania zanieczyszczenia.

Analizy fizyczne i chemiczne, które przeprowadzono w celu oceny zdolności gleby do biodegradacji zanieczyszczeń obejmowały infiltrację, przepuszczalność, temperaturę, strukturę, teksturę, porowatość, potencjalną retencję strefy aeracji, pH oraz stosunek węgla do azotu do fosforu (C:N:P).

One of the most common soil biodegradation techniques used by the oil industry is *Landfarming*. Using this technique involves depositing contaminated soil in layers. These layers are commonly not very deep and they require regular irrigation to stimulate biodegradation. In order to accelerate the process, autochthonous or allochthonous microorganisms are frequently added. These can be found as part of specific microbiological consortia which biodegrade some compounds. However, they are not always efficient due to either the microorganisms' inability to adapt to the media or negative interactions with native microorganisms.

It is common to make a mixture of contaminated soils with clean soil, in order to improve the physical and chemical conditions of the affected soils and diminish the contaminant concentration. According to the consulted references, there are not any citations on physical, chemical and microbiological conditions improvement of bioremediation processes when contaminated soils are mixed. This research is an important contribution in bioremediation technique improvement because there is no contaminant transfer to clean soil and the volume of processed soil is diminished when the use of clean soil for the mixture is suppressed.

This research is focused on oil contaminated soils. Soils with an elevated contamination age are known to have a great variety of hydrocarbon adapted microorganisms. Based on this fact, soils with different contamination ages were combined in order to stimulate the biodegradation process and avoid contaminant transfer to clean soil.

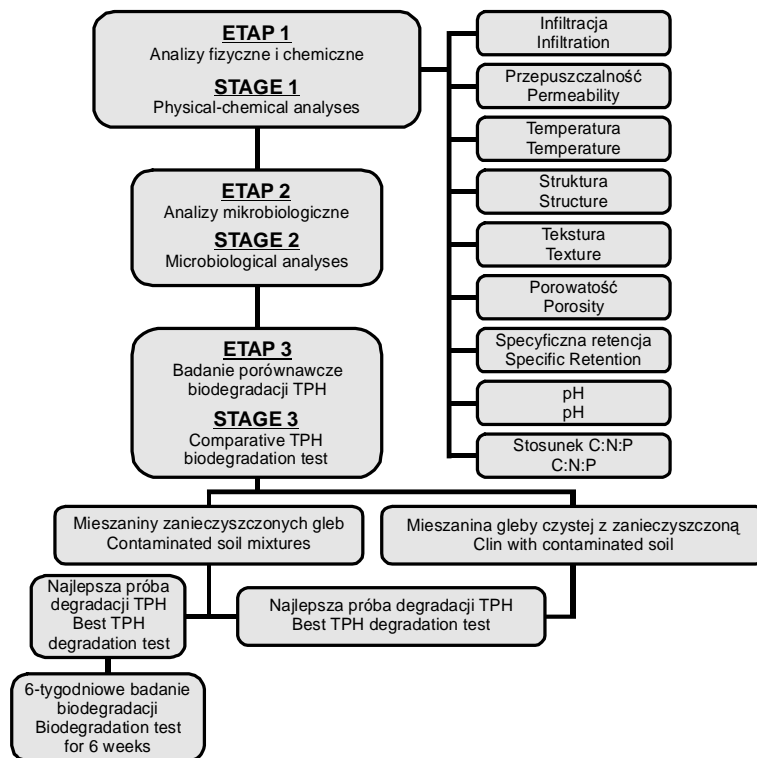
Several bacteria and fungi, specifically obtained from the studied contaminated soils, were adopted for the biological treatment and applied during the bioremediation process to stimulate TPHs biodegradation. A pretreatment with a biosurfactant was performed in order to increase TPHs bioavailability.

## Experimental procedure

This research was conducted in stages. Figure 1 shows the experimental procedure that was followed.

The first stage involved sampling of the corresponding types of soils: field tests and physical-chemical and microbiological analyses. The soil samples taken were named S1, S2, and S3: soils with the highest, intermediate and lowest contamination ages, respectively.

The physical and chemical analyses performed in order to assess the soil's biodegradation potential were: infiltration, permeability, temperature, structure, texture, porosity, specific retention, pH and the carbon-nitrogen-phosphorus ratio (C:N:P).



Rys. 1  
Procedura doświadczalna

Fig. 1  
Experimental procedure

W drugim etapie drobnoustroje rodzime posiadające zdolność biodegradacji TPH udało się wyizolować za pomocą modyfikowanych kultur przygotowanych w wodzie z dodatkiem próbki gleby i następującej pożywki: odżywka, bulion z serc, pożywka *rose bengal* i wyciąg z drożdży; pierwsze dwie użyto do bakterii, pozostałe do grzybów. Posiewu dokonano w wodnych roztworach zawierających glebę, które poddano 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. W sumie przygotowano 96 szalek Petriego na bakterie i grzyby pochodzące z trzech różnych próbek gleby.

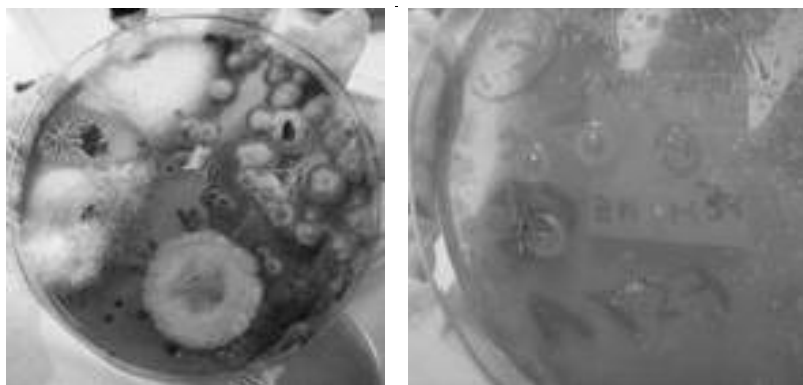
Dokonano klasyfikacji drobnoustrojów wyhodowanych na szalkach Petriego pod względem ich zaobserwowanych makroskopowych i mikroskopowych cech morfologicznych. Bakterie obserwowano po czasie dwóch dni, a grzyby po dwóch tygodniach (patrz rys. 2).

Na podstawie dokonanych obserwacji niektóre grzyby i bakterie wybrano do dalszej procedury biorąc także pod uwagę odnośniki literaturowe dotyczące biodegradacji węglowodorów. Drobnoustroje te poddano bioaugmentacji w kulturach w środowisku wodnym, aby dokonać porównawczej analizy biodegradacji TPH. Podczas analizy badano biodegradację zachodzącą w mieszaninach zanieczyszczonych gleb i mieszaninach gleby czystej i zanieczyszczonych gleb – każda analizowana osobno. W niektórych sytuacjach rozważano obecność/brak wyizolowanych mieszanek drobnoustrojów, jak również wstępne traktowanie za pomocą bio-surfaktantów (zawierających bakterie należące do rodzaju *Serrata* (patrz rys. 3).

In the second stage, autochthonous microorganisms, with the ability to biodegrade TPHs were successfully isolated using modified cultures prepared with water, a portion of the soil sample and the corresponding broth: nutritive, brain heart, Bengal rose and yeast extract; the first two for bacteria and the rest for fungi. Inoculation was done in water-soil solutions that were incubated for 24 hours at 37°C. 96 petri dishes were prepared for bacteria and fungi extracted from the three different soil samples.

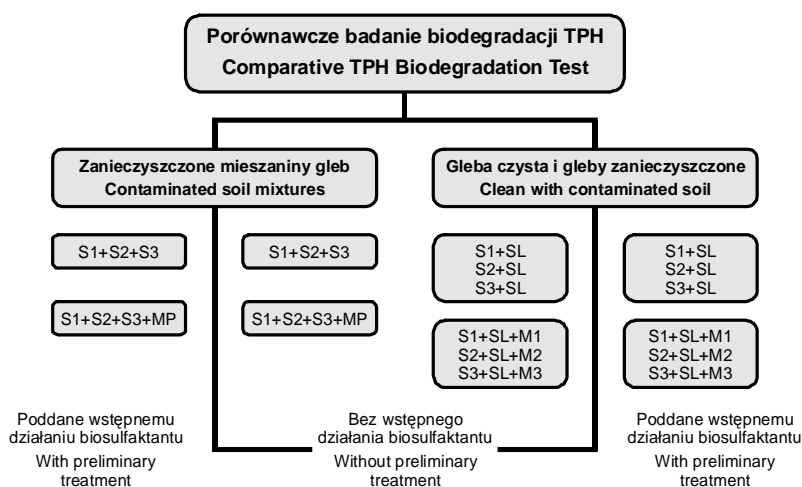
The microorganisms that grew on the petri dishes were classified according to their observed macroscopic and microscopic morphological characteristics. Bacteria were observed after a growing period of four days and fungi after two weeks. (See fig. 2).

Based on observations, some fungi and bacteria were selected for posterior procedures taking into account bibliographic references in hydrocarbon biodegradation. These microorganisms were bio-augmented in aqueous media cultures in order to perform a comparative TPH biodegradation analysis. The analysis studied biodegradation among contaminated soil mixtures and mixtures of clean with contaminated soils. In some situations, presence/absence of the isolated microbial pool was considered, as well as the preliminary treatment with the biosurfactant (composed of bacteria of the genus *Serrata*, (See figure 3).



Rys. 2  
Wyzolowanie bakterii i grzybów

Fig. 2  
Bacteria and fungi isolation



Rys. 3  
Analiza porównawcza biodegradacji TPH  
S1, S2 i S3 – próbki gleb o różnym okresie trwania zanieczyszczeń; SL – gleba czysta;  
M1, M2, M3 – odpowiadające im mikroorganizmy gleby, MP – mieszanina drobnoustrojów z gleb S1, S2, S3

Fig. 3  
Comparative TPH biodegradation analysis  
S1, S2, S3 – soils with different contamination ages; SL – clean soil;  
M1, M2, M3 – corresponding soil microorganisms; MP – microbial pool

Mieszaniny gleb charakteryzowano początkowo przez określenie ich zdolności retencji strefy aeracji potencjalnej i wilgotności określanej grawimetrycznie w 24 godziny po rozpoczęciu eksperymentu oraz codziennie przez okres tygodnia, aby wyznaczyć tendencję spadku wilgotności i zawartości wody względem grawimetrycznie wyznaczonej wilgotności (mililitrów wody na kilogram suchej gleby). Krzywe otrzymane na podstawie tych danych pomogły w ustaleniu wielkości nawodnienia, jakie jest konieczna dla utrzymania wilgotności na poziomie od 50 do 80% zdolności retencji strefy aeracji potencjalnej każdego z rodzajów gleby, w zależności od tego, jaka wielkość jest zalecana w literaturze.

Tablica 1 przedstawia wstępne badania przeprowadzone przy użyciu próbek gleby o różnych proporcjach w celu ustalenia najkorzystniejszej dla procesu biodegradacji mieszaniny gleb.

The soil mixtures were initially characterized by defining their specific retention capacity and gravimetric humidity, which was determined 24 hours after experiment initiation and on a daily basis for one week, to establish the tendency of humidity loss and water content versus gravimetric humidity (milliliters of water per kilogram of dry soil). The curves built with these data helped to determine the irrigation volumes needed to maintain humidity around 50 to 80% of the specific retention capacity of each soil, according to what is bibliographically recommended.

Table 1 shows the preliminary tests performed using different soil proportions in order to determine the most favorable soil mixture for the biodegradation process.

Tablica 1  
Wstępne proporcje każdej gleby nieczyszczonej w próbkach

Table 1  
Proportions of contaminated soils mixtures

Nr próby Test	Procentowy udział gleby (%) w mieszance poddawanej biodegradacji Soil proportion (%)		
	Gleba 1 Soil 1	Gleba 2 Soil 2	Gleba 3 Soil 3
1	50	25	25
2	25	50	25
3	25	25	50
4	33,3	33,3	33,3

Aby usprawnić zachodzący proces, do każdej mieszanki gleby dodano wyizolowaną i poddaną bioaugmentacji mieszkę drobnoustrojów. Pożywkę dla drobnoustrojów dodano na początku i w połowie trzytygodniowego okresu. W tym czasie przeprowadzono wstępne badania biodegradacji. W celu określenia efektywności, przeprowadzono analizy TPH w dniu zerowym i na końcu trzytygodniowego okresu.

Według wstępnych badań najlepsza proporcja zanieczyszczonych gleb została użyta do analizy porównawczej biodegradacji. W tym etapie dokonano oceny przebiegu procesu biodegradacji przy użyciu mieszaniny zanieczyszczonych gleb (warunki 1) i zanieczyszczonych gleb zmieszanych z czystą glebą (warunki 2). W obydwu typach warunków zbadano zmienność (obecność lub brak) wstępnego oczyszczania i stosowania mieszanki mikrobów (bakterie i grzyby wyizolowane z zanieczyszczonych gleb).

Próby z wstępnym traktowaniem gleby trwały cztery tygodnie (jeden tydzień dodatkowo na wstępne traktowanie gleby) a testy bez wstępnego traktowania trwały 3 tygodnie.

Dodatkowe próby przeprowadzono w celu sprawdzenia procesu biodegradacji węglowodorów, zachodzące w mieszaninie zanieczyszczonych gleb. Badania te trwały 6 tygodni i były przeprowadzone w optymalnych warunkach ustalonych podczas prób wstępnych..

## Wyniki i dyskusja

Próbki gleb zostały pobrane z obszaru o następujących cechach: położonego 100 do 300 m nad poziom morza, o rocznych opadach wynoszących 3089,2 mm/rok o stosunkowo zróżnicowanych porach deszczowych i słonecznych, o maksymalnej temperaturze w ciągu roku wynoszącej 27,8°C sprzyjającej procesowi bioremediacji. Tablica 2 przedstawia miejsca pobierania próbek i daty zanieczyszczenia gleby.

### Charakterystyka fizyczna i chemiczna

Przepuszczalność i infiltracja: Tablica 3 przedstawia wyniki tych parametrów.

Szybkość infiltracji i przepuszczalność miały wysokie wartości dla trzech rodzajów analizowanych tu gleb.

To improve the process, the isolated and bio-augmented microbial pool was added to each soil mixture. The microbial broth was incorporated at the beginning and a halfway through a three week period. During this time the preliminary biodegradation tests were performed. In order to assess efficiency, TPH analyses were performed at day 0 and at the end of the third week.

The best soil mixture according to the preliminary tests was used for the biodegradation comparative analysis. During this phase, the biodegradation process with a mixture of contaminated soils (condition 1) and contaminated soils mixed with clean soil (condition 2) was evaluated. The variables presence/absence of preliminary treatment and microbial pool (bacteria and fungi isolated from the contaminated soils) were examined for both conditions.

Tests with preliminary treatment lasted four weeks (one week for the preliminary treatment) and tests without preliminary treatment lasted for 3 weeks.

Additional tests were performed to verify the hydrocarbon biodegradation process in the different soil mixtures. These tests lasted 6 weeks and were performed under the optimum conditions obtained during the preliminary tests.

## Results and discussion

The soil samples were taken from an area with the following characteristics: located 100 to 300 meters above sea level, with an annual precipitation of 3089.2 mm/year with relatively differentiated rainy and sunny seasons, an annual maximum temperature of 27.8°C favorable for bioremediation processes. Table 2 shows the sampling sites and dates of contamination.

### Physical and chemical characterization

Permeability and infiltration: table 3 shows the results for these parameters.

Infiltration velocity and permeability were high for the three types of soil that were analyzed. This

Tablica 2  
Miejsca pobierania próbek i daty zanieczyszczenia gleby

Table 2  
Sampling sites and date of contamination

Gleba Soil	Miejsce pobrania próbki Site	Data wycieku ropy naftowej Hydrocarbon spill date
S1	Payoa 1	30 czerwca 2006 June 30 <sup>th</sup> 2006
S2	Payoa 2	3 kwietnia 2007 April 3 <sup>rd</sup> 2007
S3	Payoa 3	Naturalna emanacja zanieczyszczeń Natural emanation

Tablica 3  
Przepuszczalność i infiltracja zanieczyszczonych gleb

Table 3  
Permeability and infiltration of contaminated soils

Gleba Soil	Szybkość (cm/godz.) Infiltration velocity (cm/hr)	Typ infiltracji Type of infiltration	Przepuszczalność Permeability
S1	29 (szybka) (very fast)	FS, S	Wysoka lub bardzo wysoka High or very high
S2	33,44 (skrajnie szybka) (extremely fast)	FS, S	Wysoka lub skrajnie wysoka High or extremely high
S3	7,98 (umiarkowanie szybka) (moderately fast)	FS	Wysoka High

Warunek ten wskazuje, że gleba ma niską lub bardzo niską zdolność retencji, w związku z czym należy glebę często nawadniać podczas procesu biodegradacji aby utrzymać optymalną wilgotność.

Temperatura: w każdej z gleb panowała podobna temperatura, około 24°C, co według danych literaturo- wych uważa się za temperaturę wystarczającą do rozwoju drobnoustrojów (20–35°C).

Struktura: rys. 4a przedstawia strukturalną charakterystykę gleby 1. Jak widać z rysunku, wygląd gleby wskazuje na to, że jest ona utworzona z bloków, zgodnie z danymi mówiącymi o wysokich współczynnikach infiltracji i niskich wartościach retencji wody.

Gleby 2 i 3 nie wykazywały określonej struktury. Gleba 2 składała się z luźnych ziaren i miała umiarkowaną zdolność retencji (rys. 4b). Gleba 3 składała się ze spójnej masy o wysokiej zawartości węglowodorów, która zmieniała jej naturalne właściwości związane z retencją wody i nasiąkliwością (rys. 4c).

Tekstura: teksturę określono metodą hydrodynamiczną i przeprowadzonymi później badaniami granulometrycznymi. Tablica 4 pokazuje wyniki uzyskane za pomocą pierwszej z tych metod.

Wymienione 3 typy gleb określono jako piaszczyste, zgodnie z trójkątem tekstury gleby i udziałem procentowym składników (jak podano w tablicy 4).

condition suggests that the soil has low or very low water retention capacity, so irrigation must be frequent during the hydrocarbon biodegradation process in order to maintain optimum humidity conditions.

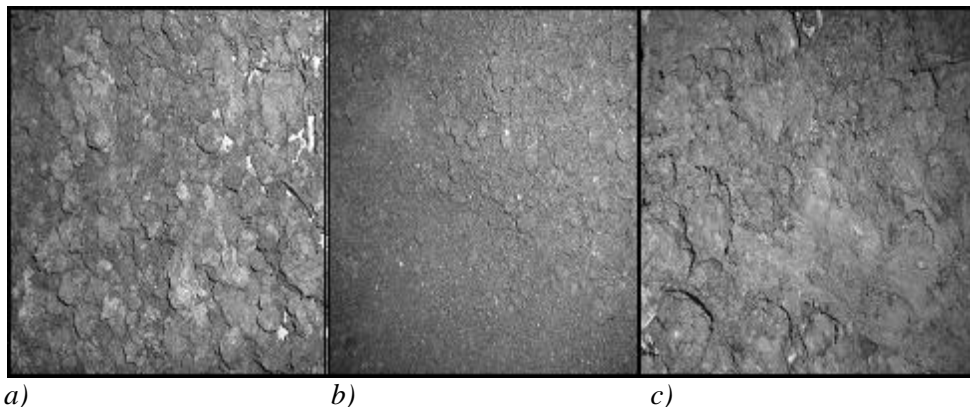
Temperature: temperature in each soil was very similar, around 24° C, which is considered to be adequate for microbial growth (20-35° C) according to bibliographical references.

Structure: figure 4a shows the structural characteristics soil 1. As seen in the figure, the soil appears to be formed by blocks, consistent with high infiltration rates and low water retention.

Soils 2 and 3 did not show a defined structure. Soil 2 was composed by loose grains with a moderate water retention capacity (figure 4b). Soil 3 was composed by a cohesive mass with elevated hydrocarbon content which changes its natural water retention and permeability characteristics (figure 4c).

Texture: texture was established by the hydro-metric method and posterior granulometric tests. Table 4 shows the results obtain with the first method.

The three types of soils were defined as sandy, according to the soil texture triangle and the particle percentage (shown in the table 4).



Rys. 4  
Strukturalna charakterystyka gleb  
a) – struktura gleby S1,  
b) – struktura gleby S2,  
c) – struktura gleby S3

Fig. 4  
Structural characteristics soil  
a) – structure S1,  
b) – structure S2,  
c) – structure S3

Tablica 4  
Tekstura gleb zanieczyszczonych – metoda hydrometryczna

Table 4  
Contaminated soils texture – hydrometre method

Gleba Soil	Piasek (%) Sand (%)	Glina (%) Clay (%)	Pył (%) Silt (%)
S1	96,2	2,9	0,9
S2	97,5	1,7	0,8
S3	95,3	3,6	1,1

Granulometryczne wyniki zanieczyszczonych gleb pokazano w tablicy 5 i na wykresie – rys. 5 (krzywe tekstury).

Żadna z gleb nie wykazała zawartości frakcji drobnej powyżej 50%, co klasyfikuje te gleby jako piaszczyste.

Gleba 3 wykazuje wyższy udział frakcji drobnych (z sita Nr 200) niż gleby 1 i 2, co może wskazywać na wyższą wodochłonność właściwą wody. I przeciwnie, gleba 1 wykazywała niższą zawartość ziaren drobnych (sita od 4 do 10), gęstych piasków (sita od 10 do 40), i średnich piasków (sita od 40 do 100) niż gleba 2, co wskazuje na to, że jej retencja strefy aeracji potencjalna powinna być mniejsza w porównaniu do gleby 2 i 3. Gleba 2 wykazywała najwyższą zawartość ziaren drobnych, średnich i gęstych piasków co sugeruje jej najlepszą w retencji strefy aeracji potencjalnej.

Piaszczysta tekstura trzech wymienionych gleb może przyczyniać się do procesu bioremediacji poprzez ułatwianie dostęp drobnoustrojów do węglowodorów, zmniejszenie spoistości materiału i zapewnienie dostatecznego przepływu powietrza przez porowaty ośrodek gleby i jej porowate ośrodki.

**Porowatość:** Tablica 6 przedstawia dane otrzymane dla gęstości i porowatości dla całkowitej porowatości uzyskanej dla każdego badanego rodzaju gleby.

The granulometric results of the contaminated soils are shown in table 5 and graph – fig. 5 (textures curves).

None of the soils showed fine contents higher than 50% which classifies these soils as sandy.

Soil 3 showed a higher proportion of fines (from sieve 200) than soil 1 and 2, which may indicate an elevated specific water capacity. On the contrary, soil 1 showed lesser content of fine grains (sieve 4 to 10), thick (sieve 10 to 40) and medium (sieve 40 to 100) sands than soil 2, indicating that its specific retention capacity should be smaller in comparison with soils 2 and 3. Soil 2 showed the highest content of fine grains, medium and thick sands, which suggests the best specific retention capacity.

The sandy texture of the three soils may contribute to the bioremediation process by facilitating microorganism's access to hydrocarbons, diminishing material cohesion and providing adequate air flow through the soil porous media inside the soil and its porous media.

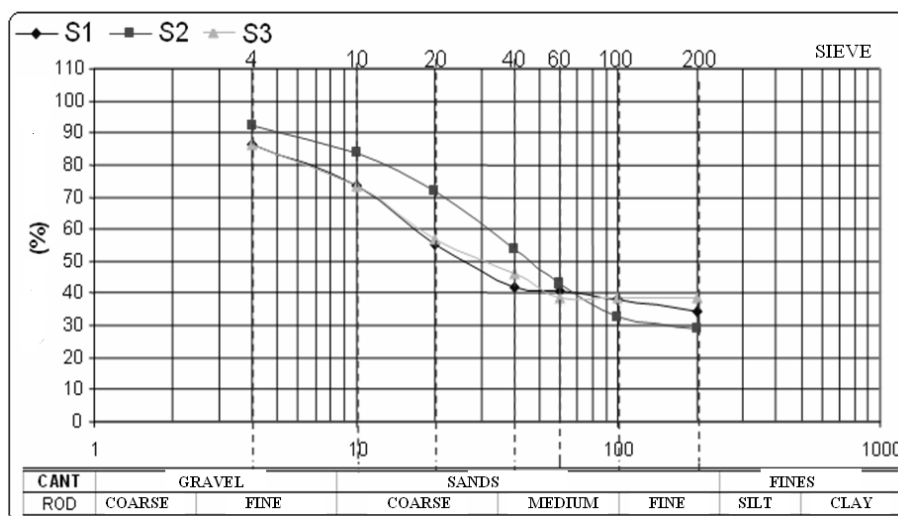
**Porosity:** table 6 shows the data obtained for density and porosity for total porosity determinations in each studied soil.



Tablica 5  
Wyniki badań granulometrycznych dla badanych gleb

Table 5  
Contaminated soils granulometric results

Nr sita Sieve N°	% gleby przechodzącej przez sito % of soil that passes the sieve		
	S1	S2	S3
4	86,41	92,08	86,4
10	73,37	83,48	73,41
20	55,05	71,88	56,85
40	42,11	53,76	45,88
60	40,97	43,18	38,8
100	38,21	32,96	38,65
200	34,35	28,99	38,49



Rys. 5  
Krzywe tekstury zanieczyszczonych gleb

Fig. 5  
Contaminated soils texture curves

Tablica 6  
Gęstość pozorna, gęstość rzeczywista gęstość i porowatość zanieczyszczonych gleb

Table 6  
Apparent density, real density and porosity of contaminated soils

Gleba Soil	Gęstość pozorna Apparent density	Gęstość rzeczywista Real density	Porowatość Porosity
S1	1,65	2,38	30,67
S2	1,85	2,128	13,06
S3	1,96	2,22	11,71

Otrzymane wyniki klasyfikują badane gleby jako gleby spoiste, o niskiej zawartości substancji organicznych. Chociaż miały one teksturę piaszczystą, to hydrofobowy charakter węglowodorów należy traktować jako ważny czynnik. Taki charakter gleby może sprawiać, że jest ona w mniejszym stopniu przepuszczalna a odprowadzanie wody może zostać zagrożone, prowadząc do nadmiaru wody, który mógł być uznany za pozornie wyższą retencję strefy aeracji.

The results classify the soils as compact with low organic matter content. Although their texture was sandy, the hydrophobic character of the hydrocarbons should be considered as an important factor. This character could make the soil more impermeable and water drainage could be compromised, generating an excess of water that could be considered as an apparent higher specific retention.

Wyniki otrzymane przy badaniu pozornej gęstości i porowatości wskazują, że trzy badane gleby są spoiście i mają niską zawartość substancji organicznych. Pomimo tego, że gleby te były pierwotnie piaszczyste, należy wziąć pod uwagę fakt, że hydrofobowy charakter węglowodorów pochodzących z analizowanych rodzajów gleby może powodować większą nieprzepuszczalność a także utrudniać odsączanie wody przez pory, tworząc obszary zalane, co przydaje glebie pozornej dodatkowej zdolności retencji wody.

Wilgotność: Zawartość wody pokazano na podstawie danych grawimetrycznych (HG) i wilgotności wyznaczonej objętościowo (HV) Otrzymane wyniki zestawiono w tablicy 7.

Dokonana klasyfikacja gleb, przeprowadzona na podstawie zawartości wody, pokazuje zmiany zachodzące w glebie w obecności węglowodorów. Gleby te mają tendencję do tworzenia spoiwych struktur, które nie nadają się do odsączania wody, gdy woda osiągnie wewnętrzną część szkieletu gruntowego, na ogół poprzez pęknięcia a niekoniecznie przez porowate zagłębienia.

Retencja strefy aeracji potencjalna: Tablica 8 przedstawia wyniki oznaczanej grawimetrycznie wilgotności do retencji strefy aeracji potencjalnej badanych gleb.

Gleba 3 wykazuje najwyższą procentowo wilgotność do zdolności retencji strefy aeracji potencjalnej, następną w kolejności jest gleba 1 a następną gleba 2. Różnice te wskazują, że mieszanina tych trzech gleb może poprawić warunki dotyczące wilgotności dla procesu bioremediacji.

pH: wyznaczono metodą rozcieńczenia woda-gleba w stosunku 1:1 (wagowo-objętościowym). Tablica 9 przedstawia wyniki pH dla każdej z gleb.

The results obtained from apparent density and porosity assays indicate those three soils as compact ones, with low organic matter content. In spite of the fact that those soils were originally sandy, it must be taken into account that the hydrophobic characteristics in current hydrocarbons from the analyzed soils may confer greater impermeability and also difficult water drainage through its pores, creating flooding which provides the soil with apparent additional water retention capacity.

Humidity: the water content is shown by the gravimetric (HG) and volumetric humidity (HV). The obtained results are summarized in table 7.

The classification given to the soils, according to its water content, shows the changes that occur in soils when hydrocarbons are present. The soils tend to form cohesive structures that are not adequate for water drainage when the water reaches the interior portion of the soil matrix, generally through cracks and not necessarily through porous cavities.

Specific retention capacity: table 8 shows the results of gravimetric humidity to specific water retention for the studied soils.

Soil 3 shows the highest percentage of humidity to specific water retention followed by soil 1 and then by soil 2. These differences suggest that the mixture of the three soils could improve the conditions of humidity for the bioremediation process.

pH: was determined by the water-soil 1:1 dilution method (weight – volume). Table 9 shows the pH results for each soil.

Tablica 7  
Zawartość wody w zanieczyszczonych glebach oraz typ gleby

Table 7  
Contaminated soils water content and type of soil

Gleba Soil	HG (%)	HV (%)	Typ gleby Type of soil
S1	11,4	18,8	C, C-S, C-L
S2	7,2	13,4	F, FL,L
S3	9,1	17,8	FC, FCL, FCS

gdzie:  
S – gleba piaszczysta, C – gleba gliniasta, F – gleba typu franc,  
FL – gleba typu franc-wapienna, L – gleba wapienna

where:  
S – sandy soil, C – claysy soil, F – franc soil,  
FL – franc lime soil, L – lime soil

Tablica 8  
Grawimetrycznie wyznaczana wilgotność zanieczyszczonych gleb do retencji strefy aeracji potencjalnej

Table 8  
Contaminated soils gravimetric humidity to specific retention capacity

Gleba Soil	S1	S2	S3
% HG	5,86	2,59	8,34

Tablica 9  
Wskaźnik pH badanych zanieczyszczonych gleb

Table 9  
pH for the studied contaminated soils

Gleba Soil	S1	S2	S3
pH	6,8	7,3	7,1

Badane trzy gleby wykazywały wartości pH bliskie odczynowi obojętnemu, między 6,5 a 7,5, charakterystyczne dla gleb pochodzących z terenów półwilgotnych i półsuchych. Takie warunki pH sprzyjają rozwojowi drobnoustrojów i rozpuszczalności substancji odżywczych (np. fosforu), minimalizując transport metali ciężkich wewnątrz gleby.

Stosunek węgla:azot:fosfor (C:N:P). Tablica 10 przedstawia skrótowo udziały procentowe pierwiastków C, N, P stwierdzone w glebie ich wzajemne proporcje.

Badane trzy rodzaje gleb wykazywały dobre stosunki pierwiastków C: N: P, zgodne z zalecanymi w literaturze dla procesu bioregeneracji (1:0,1:0,01). Wartości pH tych gleb sprzyjają dostępności fosforu: jest to jeden z powodów dla którego jest on łatwo wykrywalny i występuje w dużej ilości.

TPH: Początkową zawartość TPH w każdej z badanych gleb przedstawiono w tablicy 11.

Gleba 3, o najdłuższym okresie trwania zanieczyszczenia, miała najbardziej podwyższoną zawartość TPH, następna pod względem zawartości TPH była gleba 2 a potem 1.

#### **Charakterystyka mikrobiologiczna**

Gleba 1. Wykres na rys. 6 przedstawia częstość obserwowania niektórych bakterii, zaklasyfikowanych według ich morfologii.

The three soils showed values close to neutrality between 6.5 and 7.5, characteristic of soils from semi humid and semi arid lands. This pH condition favors the development of microorganisms and nutrient solubility (e.g. phosphorus) while minimizing the heavy metals transport inside the soil.

Carbon: Nitrogen: Phosphorus ratio (C:N:P) table 10 summarizes the C, N, P percentages found in the soil and their relation.

The three soils showed a good C: N: P ratio, as recommended by literature for bioremediation (1:0.1:0.01). The pH in these soils facilitates phosphorus availability, one reason why it is easily detectable and abundant.

TPH: the initial TPH content for each soil is shown in table 11.

Soil 3 with the oldest contamination event showed the most elevated TPH content, followed by soils 2 and 1.

#### **Microbiological characterization**

Soil 1. Graph in fig. 6 shows the frequency of observation of some bacteria, classified according to their morphology.

Tablica 10  
Stosunek pierwiastków c/n/p w badanych glebach

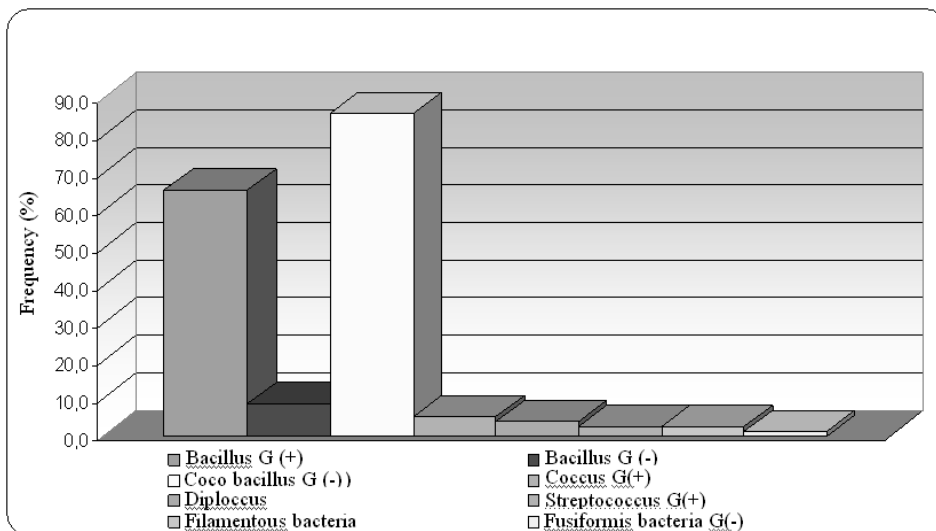
Table 10  
C/N/P ratio for the studied soils

Gleba Soil	Węgiel (%) Carbon (%)	Azot (%) Nitrogen (%)	Fosfor (%) Phosphorus (%)	Stosunek C:N:P Ratio C:N:P
S1	0,58	0,07	0,058	1:0,1:0,1
S2	0,32	0,04	0,037	1:0,1:0,1
S3	0,37	0,035	0,012	1:0,1:0,03

Tablica 11  
Stosunek pierwiastków c/n/p w badanych glebach

Table 11  
C/N/P ratio for the studied soils

Gleba Soil	TPH (%)
S1	6,3
S2	7,8
S3	9,4



Rys. 6  
Grupy bakterii wyizolowane z gleby 1

Fig. 6  
Bacterial genders isolated from soil 1

Bakterie należące do rodzaju najczęściej występującego w tej glebie to Gram-ujemne bakterie *coco bacillus*, następnie bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Około 90% zaobserwowanych próbek bakterii posiadało endospory, które dają większą odporność bakterii na wysuszenie, silne nasłonecznienie i obecność zanieczyszczeń.

Stwierdzono obecność następujących gatunków grzybów: *aspergillus spp.*, *fusarium spp.*, *penicillium spp.*, *stenphylium spp.*, *cladosporium spp.*, *helmitosporium spp.*, *hormodemdrum spp.*; niemniej jednak *aspergillus spp* i *cladosporium spp.* uznano za bardzo interesujące w procesie biodegradacji węglowodorów.

Gleba 2. (Wykres na rys. 7) Bakterie należące do rodzaju najczęściej występującego w tej glebie to Gram-ujemne bakterie *coco bacillus*, następnie bakterie Gram-dodatnie. W dalszej kolejności pod względem ilości znaleziono bakterie Gram-ujemne, Gram-dodatnie coccus i Gram-dodatnie diplococcus znaleziono w malejącej ilości. Około 70% zaobserwowanych próbek bakterii miało endospory.

Stwierdzono obecność następujących gatunków grzybów: *aspergillus spp.*, *nigrospora spp.*, *pestalotia spp.*, *penicillium spp.*, *diplosporium spp.*, *cladosporium spp.*, *cephalosporium spp.*, *hormodemdrum spp.*, *clamidosporium spp.* i drożdże, oraz gatunki *aspergillus spp.*, *cladosporium spp* oraz drożdże rozważono pod kątem procesu biodegradacji węglowodorów.

Gleba 3. Wykres na rys. 8 przedstawia bakterie zaobserwowane w tej glebie: Gram-ujemne należące do grupy *coccobacillus*, następie Gram-dodatnie *bacillus* oraz w dalszej kolejności gram-ujemne *bacillus*, gram-dodatnie *coccus* oraz bakterie nitkowate.

Mniej niż 35% próbek bakterii z gleby 3 posiadało endospory. Wskazuje to zarówno na mniejszą adaptację bakterii do węglowodorów i mniejszą odporność na niekorzystne warunki środowiska.

The bacterial genus which appeared most frequently in this soil was the gram negative coco bacillus, followed by the gram positive and gram negative bacillus, respectively. Around 90% of the observed bacillus samples had endosporas, which provide higher resistance for desiccation events, intense solar radiation and contaminant presence.

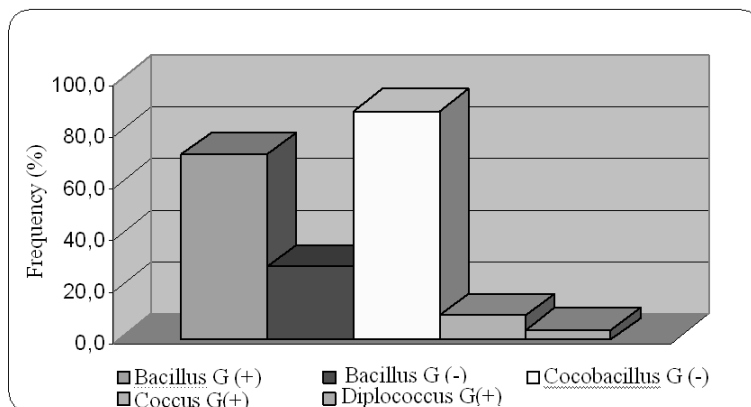
The fungal species found were: *aspergillus spp.*, *fusarium spp.*, *penicillium spp.*, *stenphylium spp.*, *cladosporium spp.*, *helmitosporium spp.*, *hormodemdrum spp.*; nonetheless, some *aspergillus spp* and *cladosporium spp.* these were considered of great interest for the hydrocarbon biodegradation process.

Soil 2. (Graph in fig. 7) The bacterial genus which appeared most frequently in this soil was the gram negative coco bacillus, followed by the gram positive bacillus. The gram negative bacillus, gram positive coccus and gram positive diplococcus were found in decreasing amounts. Around 70% of the observed bacillus samples had endospores.

The fungal species found were: *aspergillus spp.*, *nigrospora spp.*, *pestalotia spp.*, *penicillium spp.*, *diplosporium spp.*, *cladosporium spp.*, *cephalosporium spp.*, *hormodemdrum spp.*, *clamidosporium spp.* and yeast, cepa from the species *aspergillus spp.*, *cladosporium spp* and the yeasts were considered for hydrocarbon biodegradation process.

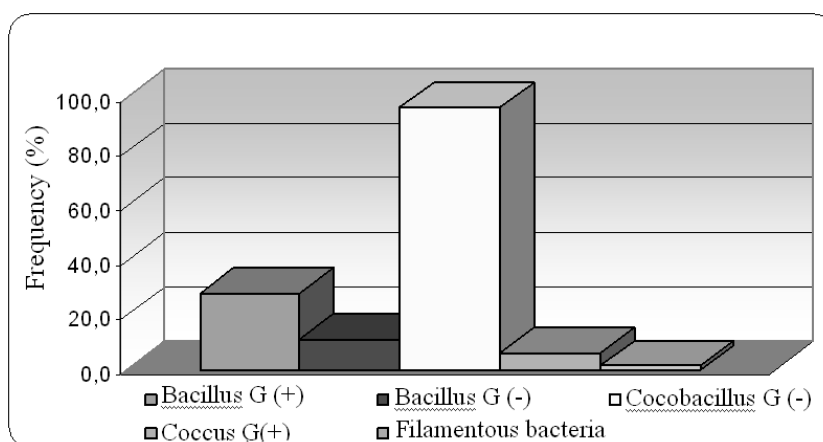
Soil 3. Graph in fig. 8 shows the bacterial genera observed in this soil: gram negative *coccobacillus*, followed by gram positive *bacillus* and decreasingly fewer gram negative *bacillus*, gram positive *coccus* and filamentous bacteria.

Less than 35% of the bacillus samples of soil 3 showed endosporas. This suggests both a smaller hydrocarbon bacterial adaptation and smaller resistance to adverse environmental conditions.



Rys. 7  
Grupy bakterii wyizolowane z gleby 2

Fig. 7  
Bacterial genders isolated from soil 2



Rys. 8  
Grupy bakterii wyizolowane z gleby 3

Fig. 8  
Bacterial genders isolated from soil 3

Pomimo tego, że w glebie 3 zaobserwowano wiele grzybów, tylko gatunek *cladosporium spp.* wyselekcjonowano do procesu biodegradacji.

#### **Analiza porównawcza biodegradacji TPH**

**Wielkość nawodnienia:** Tablica 12 pokazuje, że zdolność retencji strefy aeracji potencjalnej ulega zmianie po zmieszaniu gleb. Efekt ten obserwowano w obu przypadkach: dla mieszaniny gleb zanieczyszczonych i mieszaniny gleb zanieczyszczonych z glebą czystą.

Wykres na rys. 9 przedstawia krzywe utraty wilgotności dla poszczególnych mieszanin gleb.

Zgodnie z wcześniejszymi wykresami, które ukazują zapotrzebowanie gleb na wodę, przyjęto nawadnianie z częstotliwością dwóch razy tygodniowo. Wysokości słupa wody obliczone dla każdej mieszaniny gleby przedstawiono w tablicy 13.

**Badania wstępne:** Tablica 14 przedstawia wyniki biodegradacji TPH (w zanieczyszczonych glebach) uzyskane podczas badań wstępnych.

Even though many fungi were observed in soil 3, only *cladosporium spp.* species were selected for the biodegradation process.

#### **Comparative TPH biodegradation analysis**

**Irrigation volume for the soil mixtures:** table 12 shows that the specific retention capacity changes when soils are mixed. This effect is observed in both cases: mixture among contaminated soils and contaminated soils with clean soil.

Graph in fig. 9 shows the humidity loss curves for each specific soil mixture.

According to the previous curves, which reveal the soil's water requirements, twice a week irrigation frequency was established. The water volumes calculated for each soil mixture are shown in table 13.

**Pretests:** table 14 shows the results for TPH biodegradation (among contaminated soils) obtained during the pretests.

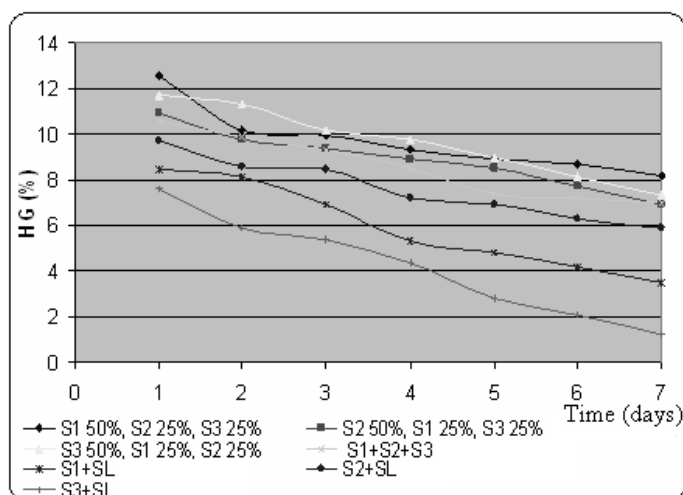
Najwyższy, wyrażony w procentach, stopień usunięcia TPH stwierdzono w glebach o podwyższonym udziale gleby S1. Można to przypisać drobnoustrojom zawartym w glebie S1, które są lepiej przystosowane do biodegradacji TPH.

The highest TPH elimination percentages were found among soils with elevated proportions of soil S1. This could be attributed to S1 microorganisms' being better adapted for TPH biodegradation.

Tablica 12  
Procent wilgotności oznaczanej grawimetrycznie do retencji strefy aeracji potencjalnej dla mieszanin gleb

Table 12  
%HG to specific retention capacity for the soil mixtures

Poszczególne rodzaje gleb niez mieszane Soils on their own			
S1	S2	S3	SL
5,86	2,59	8,34	10,8
Mieszanki zanieczyszczonych gleb Contaminated soil mixtures			
S1 50%, S2 25%, S3 25%	S2 50%, S1 25%, S3 25%	S3 50%, S1 25%, S2 25%	S1=S2=S3
9,82	7,61	11,50	11,97
Mieszanki poszczególnych gleb z glebą czystą Soil's mix separately with clean soil			
S1+SL		S2+SL	
13,16		12,18	
		S3+SL	
		14,06	



Rys. 9  
Krzywe utraty wilgotności dla trzech mieszanin gleby

Fig. 9  
Humidity loss curves for the soil mixtures

Tablica 13  
Wielkość nawodnienia dla każdej mieszaniny gleb

Table 13  
Irrigation volumes for each soil mixture

Wielkość nawodnienia dla mieszanin gleb zanieczyszczonych Irrigation volumes for contaminated soils mixtures			
S1 50% + S2 25% + S3 25%	S2 50% + S1 25% + S3 25%	S3 50% + S1 25% + S2 25%	S1 = S2 = S3
220 ml	235 ml	265 ml	225 ml
Wielkość nawodnienia dla gleb zanieczyszczonych zmieszanych z glebą czystą mieszanin Irrigation volumes for contaminated soils mixed with clean soil			
S1 + SL		S2 + SL	
310 ml		230 ml	
		S3 + SL	
		265 ml	

Tablica 14  
Degradacja TPH podczas badań wstępnych

Table 14  
TPH degradation during pre-tests

Proporcje mieszanki Mixture ratio			Początkowa zawartość TPH (%) Initial TPH (%)	Końcowa zawartość TPH (%) Final TPH (%)	Stopień degradacji TPH (%) TPH degradation (%)
S1	S2	S3			
2	1	1	11,7	8,2	29,9
1	2	1	8,7	10,8	-19,4*
1	1	2	9,0	7,9	12,2
1	1	1	8,3	7,1	14,5

\* możliwość zmienności próbki na skutek aglutynacji gleby przez węglowodory

\* possible simple alterations caused by Hydrocarbons- soil agglutinations

Analiza porównawcza biodegradacji TPH: Tablica 15 i wykres na rys. 10 przedstawiają wyniki uzyskane na podstawie badań i odpowiadających im mieszanin.

Najlepsze wyniki przy zmieszaniu gleby zanieczyszczonej i czystej uzyskano przy braku adaptowanych drobnoustrojów i bez wstępnego działania na glebę. Stwierdzenie tego faktu może oznaczać negatywne wzajemne oddziaływanie (konkurencję) między rodzimymi mikroorganizmami czystej gleby oraz uprzednio wyizo-

Comparative TPH biodegradation analysis: table 15 and graph in fig. 10 shows the results obtained from the tests and the corresponding mixture that was evaluated.

The best results when contaminated soil was mixed with clean soil were obtained in the absence of both adapted microorganisms and preliminary treatment. This finding could indicate a negative interaction (competition) among the clean soil micro

Tablica 15  
Porównawcze próby degradacji TPH

Table 15  
Comparative tests TPH degradation

Mieszanka Mixture	Początkowa zawartość TPH (%) Initial TPH (%)	Końcowa zawartość TPH (%) Final TPH (%)	Stopień degradacji TPH (%) TPH elimination (%)
S1 50%, S2 25%, S3 25%	4,2	3,5	16,7
S1 50%, S2 25%, S3 25% (M)	4,2	3,4	19,5
S1 50% S2 25%, S3 25% (B)	4,2	3,1	26,19
S1 50%,S2 25%,S3 25%(MB)	4,2	3	28,6
S1+SL*	6,8	≤1	42,645
S1+SL (M)	6,8	1,6	38,24
S1+SL (B)	6,8	≤1	42,65
S1+SL (MB)	6,8	2,1	34,56
S2+SL	5,1	≤1	40,195
S2+SL (M)	5,1	≤1	40,195
S2+SL (B)	5,1	≤1	40,195
S2+SL (MB)	5,1	1,8	32,355
S3+SL	4,4	≤1	38,635
S3+SL (M)	4,4	6,8**	-27,2
S3+SL (B)	4,4	6,9**	-28,4
S3+SL (MB)	4,4	3,1	14,8

gdzie:

(M) – dodatek mieszanki bakterii;

(B) – wstępne działanie bio-surfaktantem;

(MB) – wstępne działanie bio-surfaktantem i dodatek mieszanki drobnoustrojów

\* mieszanka o tych samych proporcjach,

\*\* możliwość zmienności próbki na skutek aglutynacji gleby przez węglowodory

Where:

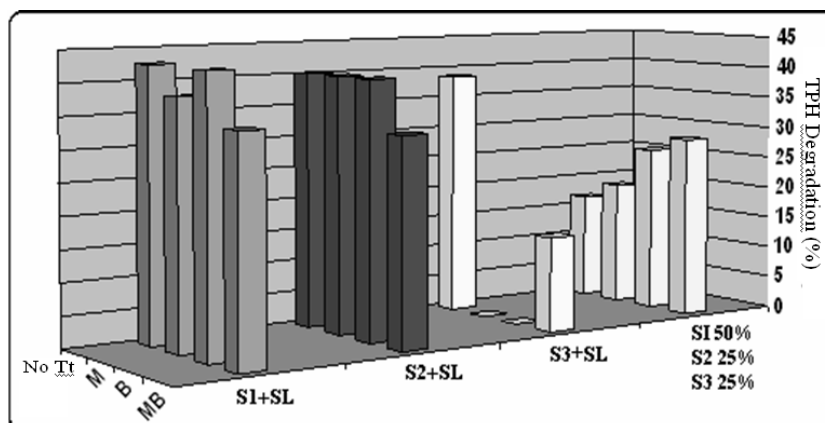
(M), – microbial pool addition;

(B) – preliminary treatment with bio-surfactant;

(MB),– both preliminary treatment and microbial pool addition.

\* same proportion mixture,

\*\* possible simple alterations caused by Hydrocarbons- soil agglutinations



gdzie:  
No Tt = próba kontrolna

Where:  
No Tt = control test

Rys. 10  
Testy porównawcze rozkładu TPH

Fig. 10  
Comparative tests TPH degradation

lowanej i poddanej bioaugmentacji mieszance drobnoustrojów i bio-surfaktantów (bakterii należących do grupy *Serratia*) stosowanych podczas wstępnego działania na próbki gleb. Z drugiej strony, wyniki uzyskane, gdy gleby były mieszane pomiędzy sobą wykazały, że zarówno działanie wstępne oraz dodatek mieszanki drobnoustrojów polepszały biodegradację TPH na krótką metę. Uzyskane wyniki wykazują 3% końcową zawartość THP, co stanowi najwyższą dopuszczalną zawartość w glebie zgodnie z Zarządzeniem 29B Stanu Louisiana (USA).

Ostatecznie uzyskano stopień eliminacji TPH wynoszący 65,77% podczas prób bioremediacji przeprowadzonych w okresie sześciu tygodni. Wyniki te wykazały ogromne zalety procesu bioremediacji, gdzie uzyskano końcową zawartość THP wynoszącą 3%, co, jak poprzednio, zgodne jest w Zarządzeniem 29B Stanu Louisiana (USA). Tablica 16 przedstawia uzyskane wyniki.

### Wnioski

Będące przedmiotem badania zanieczyszczone gleby pochodzące z pola naftowego w Santander w Kolumbii wykazały szybką infiltrację i wysoką przepuszczalność – charakteryzującą gleb o teksturze piaszczystej. Pomimo to, badania wykazały, że na ich porowatość i czas retencji miała wpływ obecność węglowodorów i ich hydrofobowy charakter.

biota and the previously isolated and bio-augmented microbial pool and the bio-surfactant (bacteria from the *Serratia* genus) applied during the preliminary treatment. On the other hand, the results obtained when soils were mixed among themselves, demonstrated that both the preliminary treatment and the addition of the microbial pool enhanced TPH biodegradation in the short term. The results obtained indicate a final 3% TPH content, which is the maximum value allowed in soils according to the Louisiana 29B Regulation (USA).

Finally, a 65.77% TPH elimination was accomplished during the bioremediation tests performed in a six week period. These results showed the great benefits of the biodegradation process, where a final 3% TPH content was obtained, once again in accordance with the Louisiana 29B Regulation (USA). Table 16 show the results obtained.

### Conclusions

The contaminated soils studied from an oil field in Santander – Colombia, showed rapid infiltration and high permeability, characteristics of sandy textures. Nonetheless, this research established that the porosity and specific retention were affected by the presence and hydrophobic character of the hydrocarbons.

Tablica 16  
Sześciotygodniowe próby degradacji TPH

Table 16  
Six week tests TPH degradation

Mieszanka Mixture	Początkowa zawartość TPH (%) Initial TPH (%)	Końcowa zawartość TPH (%) Final TPH (%)	Stopień degradacji TPH (%) TPH elimination (%)
S1 50%, S2 25%, S3 25%	8,94	5,93	33,67
S1 50%, S2 25%, S3 25% (MB)	8,94	3,06	65,77



Stosunek pierwiastków C:N:P, temperatura i pH zanieczyszczonych gleb miały optymalne wartości dla postępu procesu bioregeneracji.

Najlepsze wyniki eliminacji TPH uzyskano wówczas, gdy poszczególne gleby poddano oczyszczaniu oddzielnie w mieszaninie z czystą glebą, bez obecności zarówno mieszaniny bakterii i bez poddaniu wstępnemu traktowaniu.

Próby przeprowadzone przez zmieszanie zanieczyszczonych gleb wykazały, że mieszanina zawierająca 50% gleby o najdłuższym czasie zanieczyszczenia, 50% gleby o średnim czasie zanieczyszczenia i 25% gleby o najkrótszym czasie zanieczyszczenia miały najwyższy stopień usunięcia TPH (28,6%) przy stosowaniu dodatku mieszaniny bakterii i bio-surfaktantów.

Czterotygodniowy proces biodegradacji przeprowadzony na zanieczyszczonych glebach, który obejmował wstępne traktowanie i dodatek mieszaniny drobnoustrojów dał wyniki zgodne z Zarządzeniem 29B Stanu Louisiana (USA). Fakt ten wskazuje na to, że proces ten można stosować jako rozwiązanie alternatywne dla bioregeneracji zanieczyszczonej gleby, zmniejszając tym samym zarówno przenoszenie zanieczyszczeń do czystej gleby i objętości gleby, która musi zostać poddana oczyszczaniu.

The C:N:P ratio, temperature and pH for the contaminated soils had optimum values for the development of bioremediation processes.

The best TPH elimination results were obtained when soils were treated separately mixed with clean soil, without the presence of both the microbial pool and the preliminary treatment.

The tests performed by mixing the contaminated soils showed that the mixture formed by 50% soil with the oldest contamination age, 25% soil with intermediate contamination age and 25% soil with shortest contaminated age had the best TPH elimination % (28,6%) with the addition of the microbial pool and the bio-surfactant.

The four week TPH biodegradation process performed on the contaminated soils, which included preliminary treatment and microbial pool addition, was in accordance with the Louisiana 29B Regulation. This fact indicates that the process can be applied as an alternative for TPH bioremediation on contaminated soil, thus minimizing both the transference of contaminants to clean soil and the volumes of soil that must be treated.

### **Podziękowanie – Acknowledgements**

Special thanks to: Eng.Luz Adriana Puentes Jàcome

The Research Management Office at Pontificia Bolivariana University for their continuous support in the development of this research.

The corresponding fellows from the petroleum industry for their technical collaboration and financial support.

Family and friends, for their unconditional help every day, all time.

### **Literatura – References**

1. LOPEZ DE MESA, Joaquín, QUINTERO, Gladis, GUEVARA VIZCAINO, Andrea Liliana, JAIMES CACERES, Diana Carolina, GUTIERREZ RIAÑO, Sandra Milena, MIRANDA GARCIA, Johanna. *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Enero-Junio de 2006. Disponible en Internet: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREVIS1\\_5.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf)*
2. HERNANDEZ, Diana, PLAZA, Cesar, POLO, Alfredo. *Consideraciones generales sobre la contaminación y restauración de suelos. Residuos, 2003 N° 67.*
3. MANACORDA, Ana María, CUADROS, Daniela. *Técnicas de remediación biológica. Disponible en Internet: [http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia\\_ambiental/tecnicas\\_de\\_remediacion\\_biologicas.pdf](http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/tecnicas_de_remediacion_biologicas.pdf)*
4. BARQUIN, ML., PUCCI OH., PUCCI GN. *Biodegradación de hidrocarburos en tres suelos patagónicos por microorganismos esporulados. Centro de estudios e investigaciones en microbiología aplicada-CEIMA. Facultad de ciencias naturales. Universidad nacional de la patagonia San Juan Bosco. Argentina. Disponible en Internet: <http://biblioteca.iapg.org.ar/iapg/ArchivosAdjuntos/JornadasPreservacionVI/008.pdf>*

5. HARRISON, Roy M. *El Medio Ambiente: introducción a la química medioambiental y a la contaminación*. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA S.A. 2003. p 214.
6. LAGREGA, Michael D., BUCKINGHAM, Phillip L., EVANS, Heffrey C. *Gestión de residuos tóxicos: tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. Madrid, McGraw-Hill, 1996, p. 197.
7. PELLINI, Leandro. *Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos*. Escuela superior de Salud y Ambiente, Universidad Nacional de Comahue, 2006. Disponible en Internet: <http://www.tesis.bioetica.org/lp.htm>
8. EWEIS, Juana B., ERGAS, Sarina J., CHANG, Daniel P. Y. y SCHROEDER, Edward D. *Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos*. España: Editorial McGraw Hill/Interamericana de España S. A. U., 1999. p. 133.