

Teresa Steliga

Instytut Nafty i Gazu, Krosno

Biodegradacja odpadów wiertniczych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi

W artykule przedstawiono zagadnienia związane z problemem oczyszczania odpadów z zastarzałego dołu urobkowego, charakteryzujących się wysoką zawartością zanieczyszczeń ropopochodnych. Cały cykl oczyszczania odpadu wiertniczego z zanieczyszczeń ropopochodnych kontrolowany jest za pomocą opracowanej metodyki chromatograficznego oznaczania substancji ropopochodnych. Pozwala to na zaobserwowanie zmian zawartości n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych podczas procesu ich biodegradacji, w poszczególnych etapach oczyszczania oraz umożliwia ocenę stopnia biodegradacji n-alkanów za pomocą wskaźników: $n-C_{17}/Pr$ i $n-C_{18}/F$. Omówiono wyniki prac optymalizacyjnych podczas oczyszczania dołu urobkowego, wykorzystując etapową technologię oczyszczania odpadu wiertniczego z zanieczyszczeń ropopochodnych, obejmującą: rekultywację wstępną, bioremediację podstawową oraz bioaugmentację poprzez inokulację biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i grzybów, którą modyfikowano w zależności od charakteru zanieczyszczeń oczyszczanego obiektu. Zastosowanie w badaniach laboratoryjnych procesu biodegradacji biomarkera: $C_{30}17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopanu do normalizacji stężeń analitu (TPH) oraz $\Sigma n-C_8 - n-C_{22}$ i $\Sigma n-C_{23} - n-C_{36}$, pozwoliło na opracowanie matematycznego pierwszorzędowego modelu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, w kolejnych etapach prowadzonego procesu oczyszczania.

Biodegradation of petroleum pollutants in drilling wastes

The aim of this article is to present purification of waste from weathered waste pits with huge oil pollutants content. The whole process of purification is monitored with the use of chromatographic methodology of petroleum determination. It enables observation of n-alkanes content in oil pollutants during their biodegradation in consecutive stages of purification. What is more, this method enables estimation of n-alkanes biodegradation degree with the use of ratios $n-C_{17}/Pr$ and $n-C_{18}/F$. Results of optimisation research during the waste pit purification are discussed due to the phase technology of waste purification from petroleum pollutants. The technology consists of: initial remediation, basic bioremediation and bioaugmentation by inoculation (with a biological based on indigenous microorganisms and fungi), which was modified according to the type of the pollutant. A biomarker $C_{30}17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopane was used in laboratory tests in order to normalised the analyte concentration: TPH, $\Sigma n-C_8 - n-C_{22}$ and $\Sigma n-C_{23} - n-C_{36}$. Also, the biomarker enabled the creation of the first-order mathematical model of oil pollutants biodegradation in the following stages of the purification process.

Wprowadzenie

Rekultywacja terenów zestarzałych dołów urobkowych, zdegradowanych przez skażenie substancjami ropopochodnymi, należy do kluczowych problemów ekologicznych, jakie stają przed branżą górnictwa nafty i gazu.

Odpady wiertnicze na kopalniach terenu Podkarpacia powstały podczas wiercenia płytkich otworów (poniżej 1000 m ppt) z zastosowaniem metody udarowej, natomiast przy pogłębianiu otworów – metody obrotowo-płuczkowej. Oprócz urobku skalnego odpady zawierają składniki płuczki i ropę z nawierconych warstw wodonośnych. W wierceniach stosowano tylko płuczki iłowe, niemodyfikowane środkami chemicznymi.

Na podstawie przeglądu dokumentów archiwalnych wierceń oraz przeprowadzenia badań fizyczno-chemicznych i mineralogicznych odpadu z wytypowanych

do oczyszczania dołów urobkowych oraz analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropopochodnych, można zakwalifikować go jako odpad o kodzie **ex 17 05 03*** „gleba i ziemia zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi” [14].

Warunkiem wyboru optymalnej metody oczyszczania dołów urobkowych z zanieczyszczeń ropopochodnych jest interdyscyplinarna analiza wyników badań laboratoryjnych i terenowych środowiska gruntowo-wodnego. Prawidłowo wykonane badania pozwalają na wytypowanie optymalnych technologii likwidacji zanieczyszczeń [15, 27].

Procesy biotechnologiczne przy wykorzystaniu aktywnych kultur bakteryjnych, uprzednio wyizolo-

wanych ze skażonych środowisk naturalnych, zyskują coraz większe znaczenie. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz wysoką skuteczność, metody biologiczne znajdują praktyczne zastosowanie na skalę techniczną [3, 7, 10, 13, 17].

Bioremediacja zanieczyszczeń ropopochodnych w skażonym środowisku może być prowadzona pod warunkiem: obecności optymalnej liczby mikroorganizmów zdolnych do rozkładu i mineralizacji substancji ropopochodnych [1, 21], odpowiedniej zawartości nieorganicznych składników pokarmowych niezbędnych do wzrostu mikroorganizmów (azotu i fosforu) [4, 23, 24], odpowiedniej wilgotności, odczynu środowiska i temperatury gleby [26], przy czym koncentracja substancji ropopochodnych nie może przekraczać biologicznej tolerancji mikroorganizmów rozkładających te substancje [12].

Budowa chemiczna zanieczyszczeń ropopochodnych, obok uwarunkowań fizykochemicznych panujących w glebie, ma wpływ na ich biodostępność. Biodostępność może być głównym czynnikiem regulującym proces rozkładu biologicznego i zależy ściśle od starzenia gleby [5, 18, 19].

W artykule przedstawiono wyniki prac optymalizacyjnych podczas oczyszczania dołu urobkowego G-67 z wykorzystaniem opracowanej w INiG etapowej technologii oczyszczania odpadów z zanieczyszczeń ropopochodnych, obejmującej: rekultywację wstępną, modyfikację struktury odpadu, bioremediację podstawową oraz bioaugmentację biopreparatem sporządzonym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych, zmodyfikowanym w końcowym etapie oczyszczania o wyizolowane z oczyszczanego terenu grzyby [17].

Istotnym elementem umożliwiającym uzyskanie zadowalających efektów prowadzonych procesów bioremediacyjnych jest wykorzystanie opracowanych metod chromatograficznego oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH), które pozwalają na:

- oznaczenie sumarycznej zawartości substancji ropopochodnych (TPH) w odpadzie, wraz z jakościową i ilościową identyfikacją poszczególnych węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych,
- kontrolę efektywności prowadzonych etapów oczyszczania pod kątem zmian zawartości węglowodorów ropopochodnych podczas procesu ich biodegradacji,
- określenie stopnia biodegradacji węglowodorów ropopochodnych (n-alkanów), w postaci zmian wartości wskaźników: n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F,
- połączenie wyników analiz chromatograficznych i mikrobiologicznych, stanowiące podstawę przy doborze swoistych mikroorganizmów ukierunkowanych na biodegradację wcześniej zidentyfikowanych węglowodorów,
- określenie efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych dla opracowanego biopreparatu na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i grzybów,
- opracowanie matematycznego modelu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych podczas prowadzenia badań w skali laboratoryjnej (metoda *ex-situ*) przy zastosowaniu biomarkera: C₃₀ 17á(H), 21á(H)-hopanu [20, 25].

Wyniki badań laboratoryjnych prowadzonych metodą *ex-situ* w skali półtechnicznej są podstawą do opracowania wytycznych prowadzenia procesu oczyszczania terenu z zanieczyszczeń ropopochodnych, w warunkach przemysłowych realizowanego metodą *in-situ*.

Przeniesienie wyników badań laboratoryjnych na warunki przemysłowe stwarza duże trudności, jednakże przeprowadzone badania, mające na celu modelowanie przebiegu procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, pozwalają na prognozowanie efektów oczyszczania w warunkach terenowych (metoda *in-situ*).

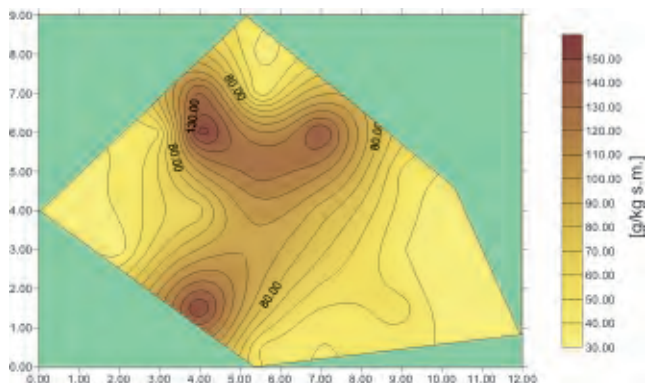
Charakterystyka materiału badawczego

W artykule przedstawiono badania przeprowadzone na dole urobkowym G-67. Głównym zanieczyszczeniem powodującym wstrzymywanie rozwoju i wzrostu flory na tym terenie są węglowodory ropopochodne.

W celu określenia rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych na dole urobkowym G-67 pobrano do analizy szereg próbek gleby, z różnych głębokości. Graficzny obraz wyników zawartości zanieczyszczeń ropo-

chodnych (TPH) dla próbek z głębokości 0-30 cm ppt uzyskano stosując metodę krigingu, która ze względu na swe własności stanowi metodę interpolacyjną, przydatną przy sporządzaniu map badawczych parametrów. Mapa rozkładu koncentracji zanieczyszczeń ropopochodnych pokazuje obszary zanieczyszczeń maksymalnych i sugeruje kierunki rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń. Obraz ten uwidacznia dwa obszary,

różniące się poziomem skażenia: **obszar A:** 40 258-67 259 mg TPH/kg s.m. oraz **obszar B:** 75 324-137 142 mg TPH/kg s.m. (rysunek 1).



Rys. 1. Mapka rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) na dole urobkowym G-67 w warstwie powierzchniowej (0-30 cm ppt)

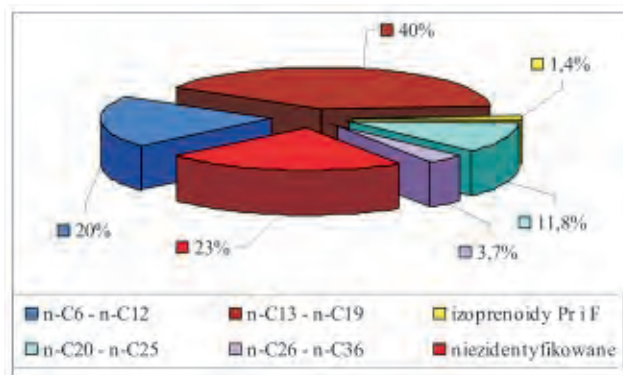
Analizy próbek gleby pobranych w głębszych warstwach wykazały, że gleba i ziemia na głębokości 0,8 m ppt jest zanieczyszczona w zakresie: 37 587-21 784 mg TPH/kg s.m., a dopiero na głębokości 1,8 m ppt wartości zanieczyszczeń TPH zbliżają się do poziomu standardów glebowych.

Analiza chromatograficzna zanieczyszczeń ropopochodnych wyizolowanych z próbek pobranych na obszarze dołu urobkowego G-67 wykazała obecność węglowodorów (n-alkanów) z zakresu n-C₆ – n-C₃₆, przy czym w przeważających ilościach odnotowano występowanie węglowodorów o długości łańcucha n-C₁₃ – n-C₁₉ (40% wag.), natomiast cięższe węglowodory o długości łańcucha od n-C₂₆ do n-C₃₆ występują na znacznie niższym poziomie (3,7% wag.). Zidentyfikowano także obecność węglowodorów z grupy izoprenoidów: pristanu (Pr) i fitanu (F) (rysunek 2).

Badania laboratoryjne procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych

Przeprowadzane badania laboratoryjne (metodą *ex-situ*) umożliwiają: prześledzenie i określenie efektywności poszczególnych etapów procesu oczyszczania, dobór optymalnych dawek wapna nawozowego i substancji biogennej, przybliżone określenie ram czasowych prowadzenia poszczególnych etapów oczyszczania oraz zapoznanie się z efektywnością biopreparatów opracowanych na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i grzybów.

Do prowadzenia procesu oczyszczania metodą *ex-situ*, jako materiał badawczy wykorzystano glebę i ziemię z dołu urobkowego G-67, po zabiegach remediacyjnych.



Rys. 2. Procentowy udział zidentyfikowanych węglowodorów ropopochodnych wchodzących w skład zanieczyszczeń (TPH)

Węglowodory aromatyczne w badanych próbkach występują w śladowych ilościach.

Analiza chemiczna ujednoliconych próbek gleby z poszczególnych obszarów dołu urobkowego G-67 wykazała, że odczyn odpadu, wynoszący 6,18-6,43, odbiega od optymalnego (7,5-7,8). Obliczone proporcje substancji biogennej (azotu i fosforu) znacznie odbiegają od optymalnych i kształtują się na poziomie N:P = 2:1, co dowodzi, że procesy mikrobiologiczne są zahamowane i bez korekty ilości tych składników autochtoniczna flora bakteryjna nie zostanie uaktywniona. Wyniki analiz chemicznych wykazały ponadto, że zawartości metali ciężkich i fenoli nie przekraczają dopuszczalnych wartości standardów glebowych.

Analiza mineralogiczna pozwala na stwierdzenie, że gleba z dołu urobkowego G-67 zawiera znaczne ilości minerałów ilastych, w postaci pakietów smektytowych (65%) i z tego względu należy podjąć działania zmierzające do rozluźnienia jej struktury, co może być zrealizowane poprzez zmieszanie z „czystym gruntem”, w określonych proporcjach.

Na podstawie badań laboratoryjnych oraz w oparciu o dyfraktogramy rentgenowskie frakcji ilastej i wyniki badań aktywności dehydrogenazowej, ustalono optymalne proporcje zmieszania gleby z dołu urobkowego G-67 z „czystym gruntem”, które wynoszą: **obszar A – 20:1, obszar B – 10:1.**

Laboratoryjne badania bioremediacji podstawowej, stymulowanej przez dodatek wapna nawozowego i nawozu mineralnego „Azofoska” (bogatego w substancje biogenne), pozwoliły na określenie optymalnych proporcji N:P, które stanowią podstawowy element procesu bioremediacji. Na podstawie zmian aktywności dehy-

drogenazowej wyznaczono proporcje wprowadzanych pierwiastków biogenych, które wynoszą: **obszar A – C: N:P = 100:7:1, obszar B – C: N:P = 100:5:1.**

Przeprowadzona w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*) bioremediacja podstawowa, stymulowana poprzez: napowietrzanie i stworzenie optymalnych warunków pokarmowych i wodnych, ustalenie odpowiedniego odczynu gleby, a także warunków termicznych, pozwoliła na uzyskanie w okresie 120 dni znacznej redukcji zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH); z 411 724 do 19 261 mg/kg s.m. Analizy chromatograficzne wykazały, że podczas bioremediacji podstawowej (I etap) najszybciej biodegradacji ulegają węglowodory z zakresu n-C₉ – n-C₂₀, w zakresie: 51,6-68,4%, natomiast węglowodory cięższe, o długości łańcucha węglowego n-C₂₁ – n-C₃₆, ulegają redukcji na niższym poziomie, w zakresie 13,3-48,2%.

Na podstawie prowadzonego monitoringu mikrobiologicznego można stwierdzić, że w wyniku bioremediacji podstawowej nastąpiło uaktywnienie flory bakteryjnej poprzez wzrost mikroorganizmów degradujących węglowodory ropopochodne. Badania mikrobiologiczne i analizy chromatograficzne umożliwiły opracowanie biopreparatu na bazie mikroorganizmów autochtonicznych, zawierającego 19 aktywnych kultur bakteryjnych [6, 9], należących do rodzajów: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Sphingomonas sp.*, wyizolowanych i namnożonych z gleby pochodzącej z dołu urobkowego G-67-1. W końcowej fazie oczyszczania wzbogacono go o grzyby wyizolowane z terenu dołu urobkowego G-67, należące do rodzajów: *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phanerochaete* [11, 22], sporządzając biopreparat G-67-2.

Inokulacja biopreparatami G-67-1 i G-67-2, realizowana metodą *ex-situ* (warunki laboratoryjne) w dwóch

seriach (II etap), umożliwiła obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych TPH z 19 241 do 1006 mg/kg s.m. W wyniku procesu inokulacji biopreparatami G-67-1 i G-67-2 biodegradacji najsilniej uległy węglowodory alifatyczne z zakresu n-C₇ – n-C₂₀, w granicach 88,7-96,5%. Węglowodory cięższe n-C₂₁ – n-C₃₆ również uległy biodegradacji w zadowalającym stopniu; 76,9-86,7%. W biopreparatach nie stwierdzono obecności mikroorganizmów patogennych ani potencjalnie chorobotwórczych. Obliczone wskaźniki stopnia biodegradacji po zastosowaniu biopreparatów G-67-1 G-67-2 ulegają odpowiednio zmniejszeniu: n-C₁₇/Pr z 12,066 do 0,044, a n-C₁₈/F z 5,491 do 0,033. Opracowany biopreparat charakteryzuje się wysoką efektywnością i szerokim spektrum działania, co predestynuje go do zastosowania w warunkach przemysłowych, w których proces oczyszczania jest prowadzony metodą *in-situ*.

W celu przeanalizowania przebiegu procesu biodegradacji TPH na odpadzie z dołu urobkowego G-67, opracowano model matematyczny przy zastosowaniu biomarkera C₃₀17α(H),21α(H)-hopanu, względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji TPH oznaczonej w trakcie prowadzenia procesu biodegradacji. Przebieg procesu biodegradacji opisano równaniem:

$$C/C_0 = (C/C_H)_0 \exp(-kt)$$

gdzie:

C – koncentracja analitu (TPH),

C_H – koncentracja hopanu,

$(C/C_H)_0$ – początkowe znormalizowane stężenie analitu,

t – czas trwania badania [dni],

k – stała biodegradacji [dni⁻¹].

Obliczone stałe biodegradacji pierwszego rzędu (k) pozwoliły prześledzić i porównać ze sobą kinetykę przebiegu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w kolejnych etapach procesu oczyszczania na dole urob-

Tablica 1. Wartości współczynników równania opisującego przebieg poszczególnych etapów procesu oczyszczania gleby z dołu urobkowego G-67

Etap oczyszczania	TPH			Σ n-C ₈ – n-C ₂₂			Σ n-C ₂₃ – n-C ₃₆		
	k[d ⁻¹]	(C/C _H) ₀	r ²	k[d ⁻¹]	(C/C _H) ₀	r ²	k[d ⁻¹]	(C/C _H) ₀	r ²
Etap I	0,0055 ± 0,007	7127 ± 89	0,9711	0,0070 ± 0,003	4393 ± 39	0,9829	0,0036 ± 0,002	519 ± 12	0,9829
Etap II G-67-1	0,0150 ± 0,007	2977 ± 21	0,9885	0,0184 ± 0,009	2245 ± 19	0,9748	0,0127 ± 0,007	410 ± 8	0,9701
Etap II G-67-1 G-67-2	0,0228 ± 0,004	3725 ± 31	0,9851	0,0259 ± 0,012	2033 ± 18	0,9878	0,0217 ± 0,009	387 ± 9	0,9878

kowym G-67. Ponadto, na podstawie porównania stałych biodegradacji pierwszego rzędu (k), można określić efektywność opracowanego biopreparatu na bazie mikroorganizmów autochtonicznych oraz zmodyfikowanego o wyizolowane z oczyszczanych terenów grzyby.

Stała biodegradacji pierwszego rzędu (k) jest większa przy biodegradacji TPH podczas etapu bioaugmentacji

biopreparatem G-67-2, co świadczy o większej dynamice przebiegu tego procesu. Współczynnik (r^2) zbliżony do jedności świadczy o zadowalającym dopasowaniu krzywych (opisanych równaniem) do punktów pomiarowych (tablica 1). Prawidłowość postępowania podczas próby matematycznego ujęcia procesu biodegradacji potwierdzają doniesienia literaturowe [8, 25].

Omówienie wyników badań poszczególnych etapów procesu oczyszczania dołu urobkowego G-67 (metoda *in-situ*)

Zabieg drenażu melioracyjnego-odciekowego przeprowadzony na terenie dołu urobkowego G-67 przyniósł zadowalające efekty obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych; zarówno w powierzchniowej, jak i w głębszych warstwach gleby. Pomimo znacznego obniżenia TPH, na obszarach najsilniej zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi nadal stwierdzono wysoki poziom skażenia; w warstwie 0-0,3 m ppt zawiera się on w granicach 48 478-18 121 mg/kg s.m., zaś na głębokości 0,8 m ppt – w zakresie 18 478-9256 mg/kg s.m. W warstwie na głębokości 1,8 m ppt wartość TPH zbliża się do standardów glebowych. Obniżenie zawartości zanieczyszczeń po drenażu jest szczególnie widoczne dla węglowodorów n-C₆ – n-C₁₅ (w zakresie 72,5-59,2%), nieznacznie niższe zanotowano dla n-C₁₆ – n-C₂₁ (na poziomie 49,6-32,7%), natomiast dla cięższych węglowodorów n-C₂₂ – n-C₃₆ kształtowało się ono w zakresie 20,8-14,95%.

Po zabiegu rekultywacji wstępnej (drenaż melioracyjno-odciekowy) zreaktywowaną glebę należy zmieszać z „czystym gruntem”, niezawierającym zanieczyszczeń ropopochodnych, w proporcjach ustalonych w badaniach laboratoryjnych.

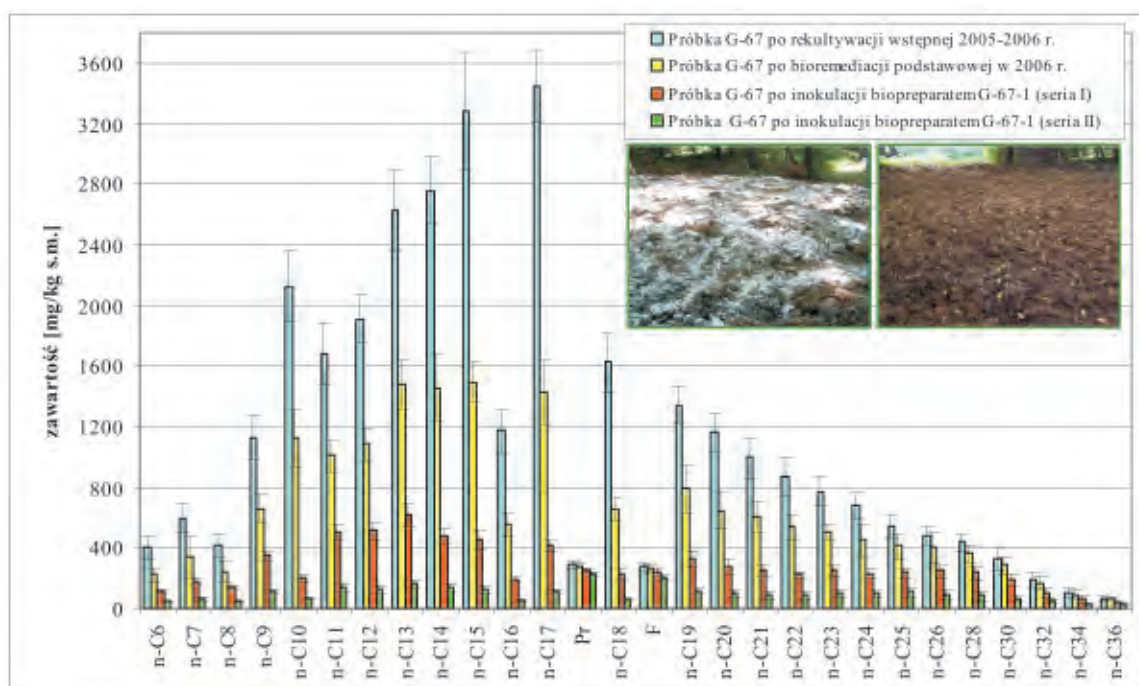
Proces bioremediacji podstawowej prowadzony przez okres 75 dni stymulowano poprzez wzbogacenie gleby z terenu dołu urobkowego G-67 substancjami odżywczymi uaktywniającymi florę bakteryjną. Substancje biogenne – w postaci wapna nawozowego i nawozu mineralnego (Azofoska), bogatego w azot i fosfor oraz mikroelementy – dozowane były w ilościach wyznaczonych w badaniach laboratoryjnych. Pozwoliło to na utrzymanie optymalnego odczynu gleby (7,5-7,6). Po upływie 20 dni przystąpiono do stopniowego nawożenia gleby i ziemi nawozem mineralnym „Azofoska”, który dozowano stopniowo w takich ilościach, aby stosunek azotu do fosforu (N:P) na wydzielonych obszarach dołu urobkowego G-67 był zbliżony do uzyskanego na podstawie badań laboratoryjnych. W razie potrzeby, dla

utrzymania wilgotności gleby na optymalnym poziomie, teren zraszano wodą.

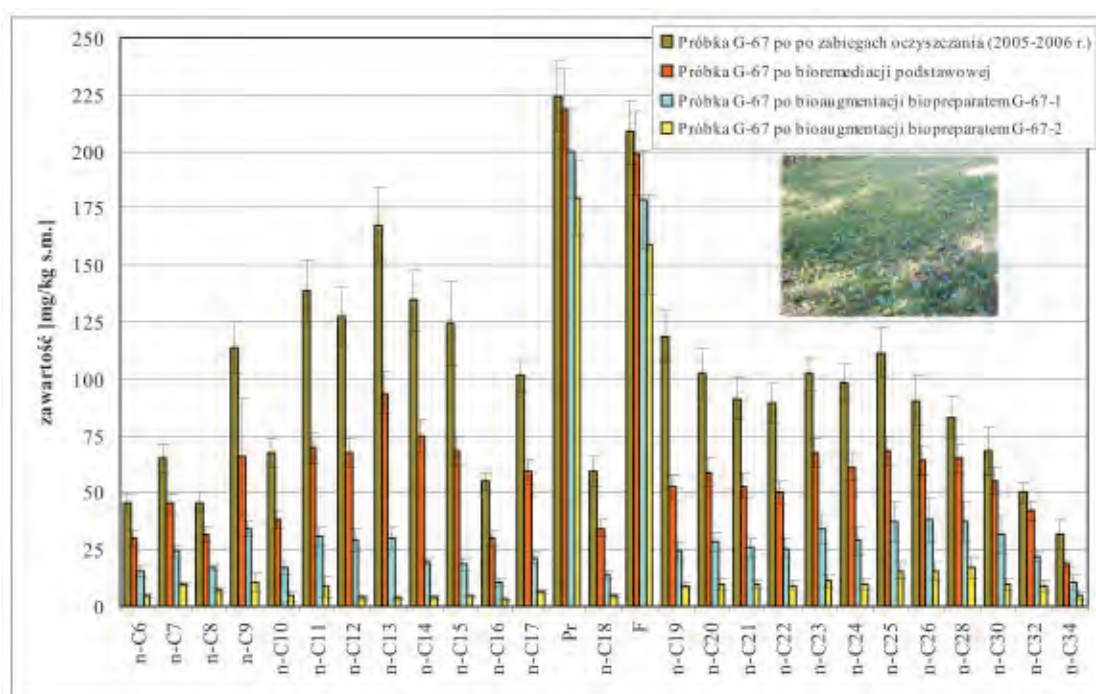
Zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) monitorowano przez cały okres trwania procesu, wykonując analizy chromatograficzne. W wyniku przeprowadzonego procesu bioremediacji podstawowej w warunkach przemysłowych, na dole urobkowym G-67 uzyskano obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych, które kształtowało się na poziomie: **obszar A** – z 33 749 do 20 792 mg/kg s.m., **obszar B** – z 42 245 do 25 429 mg/kg s.m. Najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych; n-C₇ – n-C₂₀ w granicach 42,3-59,7%, natomiast węglowodorów cięższych (z zakresu n-C₂₁ – n-C₃₆) na poziomie 6,1-39,2%. Ponadto zawartość węglowodorów niezidentyfikowanych uległa obniżeniu z 10 526 do 7803 mg/kg s.m., co stanowi 25,9% redukcji (rysunek 3). Nastąpiło uaktywnienie mikroflory bakteryjnej, wyrażone wzrostem liczby mikroorganizmów degradujących węglowodory ropopochodne, z poziomu $1,6 \cdot 10^5$ do $4,9 \cdot 10^5$ jtk/g s.m.

W porze letniej przeprowadzono dwie serie (85 dni) inokulacji biopreparatem G-67-1, sporządzonym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych wyizolowanych z terenu dołu urobkowego G-67. Przeprowadzone zabiegi bioaugmentacji biopreparatem G-67-1 pozwoliły na obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych; **obszar A** – do poziomu 3401 mg/kg s.m., **obszar B** – do 5588 mg/kg s.m. Najszybciej biodegradacji ulegały zanieczyszczenia ropopochodne w postaci węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha n-C₁₀ – n-C₂₀, w zakresie 60,9-81,3%, zaś dla węglowodorów cięższych (z przedziału n-C₂₁ – n-C₃₆) w granicach 48,4-58,9% (rysunek 3).

W następnym roku (2007) przeprowadzono modyfikację struktury gleby na obszarze o najwyższym stopniu skażenia substancjami ropopochodnymi (obszar B). Zabieg bioremediacji podstawowej, stymu-



Rys. 3. Porównanie zawartości zidentyfikowanych węglowodorów w glebie z dołu urobkowego G-67 po kolejnych etapach oczyszczania w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* w 2006 r. Liczba powtórzeń $n = 8$, $p < 0,05$



Rys. 4. Porównanie zawartości zidentyfikowanych węglowodorów w glebie z dołu urobkowego G-67 po kolejnych etapach oczyszczania w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* w 2007 r. Liczba powtórzeń $n = 8$, $p < 0,05$

Tablica 2. Zestawienie wskaźników określających stopień biodegradacji n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-67 metodą *in-situ*

Wskaźnik	Po wstępnej rekultywacji	Po bioremediacji podstawowej	Po inokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi w 2006 r.	Po inokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi i grzybami w 2007 r.
n-C ₁₇ /Pr	11,881 ± 0,908	5,087 ± 0,304	0,451 ± 0,059	0,037 ± 0,008
n-C ₁₈ /F	5,826 ± 0,412	2,433 ± 0,145	0,284 ± 0,024	0,0031 ± 0,006

lowany poprzez dozowanie substancji biogennej, w proporcjach wyznaczonych na podstawie badań na poziomie N:P = 7:1, miał na celu uaktywnienie naturalnej flory bakteryjnej po okresie zimowym. W wyniku przeprowadzonego procesu uzyskano obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych; **obszar A** – z 3664 do 2641 mg/kg s.m., **obszar B** – z 5588 do 3753 mg/kg s.m.

Kolejny etap oczyszczania z zastosowaniem biopreparatów G-67-1 (na bazie mikroorganizmów autochtonicznych) i G-67-2 (biopreparat zmodyfikowany o grzyby wyizolowane terenu dołu urobkowego G-67), wyprodukowanych w Zakładzie Mikrobiologii INiG, przeprowadzono w dwóch seriach: I seria z zastosowaniem biopreparatu G-67-1; czerwiec-lipiec 2007 r. (60 dni), II seria z zastosowaniem biopreparatu G-67-2; sierpień-wrzesień 2007 r. (55 dni).

Inokulacja biopreparatami przyczyniła się do obniżenia TPH na poziomie: **obszar A** – z 2641 do 967 mg/kg s.m., **obszar B** – z 3752 do 1008 mg/kg s.m. (rysunek 4).

Najszybciej biodegradacji ulegały węglowodory z zakresu n-C₁₀ – n-C₂₁, w granicach 83,1-94,0%, natomiast n-alkany o długości łańcucha n-C₂₂ – n-C₃₆ również były biodegradowalne na wysokim poziomie, wynoszącym 61,6-75,9% (rysunek 4).

Uzyskane wyniki świadczą o wysokim stopniu biodegradacji węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych. Biopreparat G-67-2, sporządzony na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i grzybów, posiada szeroki zakres działania, cechuje się wysoką efektywnością i w pełni nadaje się do zastosowania w warunkach przemysłowych realizowanych metodą *in-situ*.

Obliczone wskaźniki oceny stopnia biodegradacji n-alkanów, wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych (n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F) w kolejnych etapach oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-67 ulegają odpowiednio zmniejszeniu (tablica 2), co dowodzi, że biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych przebiega na zadowalającym poziomie.

Podsumowanie

1. Przedstawione wyniki potwierdzają słuszność przyjętej koncepcji oczyszczania gruntów z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą *in-situ*, obejmującej prowadzone procesy etapowo.
2. Opracowana metodyka chromatograficznego oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadzie wiertniczym/glebie stwarza możliwość pełnej kontroli przebiegu oczyszczania. Pozwala ona również na uchwycenie zmian zawartości n-alkanów, wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych, podczas przebiegu ich biodegradacji w kolejnych etapach oczyszczania. Ponadto umożliwia dokonanie oceny stopnia biodegradacji n-alkanów poprzez określenie zmian wartości wskaźników n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F.
3. Dzięki połączeniu badań mikrobiologicznych z analizami chromatograficznymi zanieczyszczeń ropopochodnych, opracowano biopreparaty na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i grzybów, o składzie i zakresie działania ściśle dostosowanych do chemicznego charakteru zanieczyszczeń ropopochodnych w nich występujących. Biopreparaty te charakteryzuje się szerokim spektrum oraz wysoką efektywnością działania.

Recenzent: prof. dr hab. inż. Józef Raczkowski

Literatura

- [1] Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J., Ballerini D.: *Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments*. Water, Air, and Soil Pollution, 144: 419-440, 2003.
- [2] Colleran E.: *Uses of bacteria in bioremediation: Methods in Biotechnology*. 2: Bioremediation Protocols (Sheehan D. red.) Humana Press. Inc. Totowa N.J., 1996.
- [3] Cunningham C.J., Jvshana J.B., Lozinsky V.I.: *Bioremediation of diesel contaminated soil microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol*. International Biodeterioration & Biodegradation, 54: 167-174, 2004.
- [4] Harmsen J., Rulkens W.H., Sims R.C., Rijtema P.E., Zwiers A.J.: *Theory and Application of Landfarming to Remediate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Mineral Oil-Contaminated Sediments; Beneficial Reuse*. J. Environ Qual., 36: 1112-1122, 2007.
- [5] Huesemann H.M., Hausmann T.S., Fortman T.J.: *Assessment of bioavailability limitations during slurry biodegradation of petroleum hydrocarbons in aged soils*. Environ. Toxicology and Chemistry, 12: 2853-2860, 2003.
- [6] Jiménez N., Viñas M., Bayona J.M., Albaiges J., Solanas A.M.: *The Prestige Oil Spill: Bacterial Community Dynamics During a Field Biostimulation Assay*. Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 77: 935-945, 2007.
- [7] Katsivela E., Moore E.R.D., Kalogerakis N.: *Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons: Specificity among*

- bacteria isolated from refinery waste sludge*. Water, Air, and Soil Pollut., 3: 103-115, 2003.
- [8] Namkoong W., Hwang E.Y., Choi J.Y.: *Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil With Composting*. Environ. Pollut., 119: 23-31, 2002.
- [9] Popp N., Schlomann M., Mau M.: *Bacterial Diversity in The Active Stage of a Bioremediation System For Mineral Oil Hydrocarbon-Contaminated Soils*. Microbiology 152: 3291-3304, 2006.
- [10] Rosa A.P., Trigui J.A.: *Bioremediation Process on Brazil Shoreline*. Environmental Science and Pollution Research, 14: 470-476, 2007.
- [11] Sašek W., Cajthaml T., Bhatt M.: *Use of fungal technology in soil remediation: A case study*. Water, Air, and Soil Pollution, 3: 5-14, 2003.
- [12] Siuta J.: *Podstawy biodegradacji ropopochodnych składników w glebach i odpadach*. Inżynieria Ekologiczna, 2: 23-35, 2003.
- [13] Spriggs T., Banks K., Schwab P.: *Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Manufactured Gas Plant-Impacted Soil*. J. Environ. Qual., 34: 1755-1762, 2005.
- [14] Steliga T., Jakubowicz P.: *Likwidowanie zanieczyszczeń ropopochodnych na terenach starych dołów urobkowych*. Bezpieczeństwo Pracy i Ochrona Środowiska w Górnictwie. Miesięcznik WUG, 8: 11-17, 2007.
- [15] Steliga T.: *Technologia oczyszczania gruntów z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą in-situ*. Prace INiG, Kraków, 133: 1-78, 2006.
- [16] Steliga T.: *Optimisation Research on Biodegradation of Hydrocarbon Pollutions in Weathering Soil Samples From Manufactured Gas Plant (MGP)*. Archives of Environmental Protection, 34: 75-94, 2008.
- [17] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P., Turkiewicz A.: *Modelowanie procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w zastarzałych odpadach wiertniczych z dołów urobkowych*. Wiertnictwo-Nafta Gaz AGH, 25/2: 667-677, 2008.
- [18] Talley J.W., Ghosh U., Tucker S.G., Luthy R.G.: *Particle-scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment*. Environ. Sci. Technol., 36: 477-483, 2002.
- [19] Thorsen W.A., Copo W.G., Shea D.: *Bioavailability of PAHs: Effect of soot carbon and PAH source*. Environ. Sci. Technol., 38: 2029-2037, 2004.
- [20] Venosa A.D., Suidan M.T., King D. Wrenn B.A.: *Use of Hopane as a Conservative Biomarker for Monitoring the Bioremediation Effectiveness of Crude Oil Contaminating a Sandy Beach*. J. Ind. Microbiol. Biot., 18: 131-139, 1997.
- [21] Vinas M., Sabate J., Espuny M.J., Solanas A.M.: *Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation During Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil*. Appl. Environ. Microbiol., 71: 7008-7018, 2005.
- [22] Wiesche C., Martens R., Zadrazil F.: *The effect of interaction between white-root fungi and indigenous microorganisms on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil*. Water, Air, and Soil Pollut., 3: 73-79, 2003.
- [23] Wirght A.L., Weaver R.W.: *Fertilization and bioaugmentation for oil biodegradation in salt march Mesocosms*. Water, Air, and Soil Pollut., 156: 229-240, 2004.
- [24] Xu R., Obbard J.P.: *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments*. J. Environ. Qual., 33: 861-867, 2004.
- [25] 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., 33: 1210-1216, 2004.
- [26] Zhou E., Crawford R.L.: *Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil*. Biodegradation, 6: 127-140, 1995.
- [27] Zieńko J.: *Technologie wykorzystujące metody fizyczne oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego*. Ekologia i Technika, 3: 89-94, 1999.



Dr inż. Teresa STELIGA – adiunkt, kierownik Zakładu Technologii Eksploatacji Płynów Złożonych INiG, zajmuje się realizacją prac naukowo badawczych m.in. z zakresu ochrony środowiska w górnictwie nafty i gazu i rekultywacji terenów górniczych. Autorka ponad 100 publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych (w tym z listy filadelfijskiej).