

Teresa Steliga

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

Ocena efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w zastarzałym odpadzie z dołu urobkowego Graby-59 w warunkach przemysłowych metodą *in-situ*

W artykule przedstawiono etapowe oczyszczanie zastarzałego odpadu wiertniczego zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi, zdeponowanego w starym dole urobkowym Graby-59. Opracowana technologia była realizowana w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* i obejmowała następujące etapy: remediację wstępną – polegającą na drenażu melioracyjno-odeiekowym, modyfikację struktury odpadu, bioremediację podstawową – stymulowaną przez wapnowanie i wzbogacanie środowiska odpadu w składniki biogenne oraz inokulację biopreparatami opracowanymi na bazie autochtonicznych niepatogennych bakterii, grzybów i drożdży wyizolowanych z terenu oczyszczanego dołu urobkowego. Cały proces oczyszczania odpadu wiertniczego z zanieczyszczeń ropopochodnych kontrolowano za pomocą kompleksowego monitoringu, obejmującego badania fizykochemiczne odpadu, analizy chromatograficzne zanieczyszczeń ropopochodnych, badania mikrobiologiczne z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii molekularnej, co pozwoliło na optymalizację przebiegu procesów bioremediacyjnych oraz na ocenę ich efektywności. Wielokryterialną ocenę skuteczności bioremediacji odpadu wiertniczego z terenu starego dołu urobkowego Graby-59 rozszerzono o badania toksykologiczne z wykorzystaniem testu Microtox[®] SPT, co pozwoliło na obserwację zmian własności toksycznych w trakcie prowadzenia procesów oczyszczania odpadu i prześledzenie powstawania metabolitów pośrednich podczas biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych. Przedstawiony tok postępowania w prowadzonym procesie oczyszczania silnie skażonego substancjami ropopochodnymi odpadu z dołu urobkowego Graby-59 umożliwił po okresie 3 lat uzyskanie obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych do poziomu nieprzekraczającego dopuszczalnych wartości określonych przez obowiązujące standardy jakości gleby i ziemi. Pozwoliło to na zakończenie rekultywacji terenu dołu urobkowego i przekazanie go do zagospodarowania jako użytku leśnego. W trakcie prowadzonego procesu rekultywacji spełniono obowiązujące wymagania administracyjno-prawne w zakresie polskiego ustawodawstwa, co zaowocowało uzyskaniem decyzji o zakończeniu rekultywacji.

Słowa kluczowe: odpady wiertnicze, dół urobkowy, zanieczyszczenia ropopochodne, bioremediacja, mikroorganizmy autochtoniczne, inokulacja, ekotoksykologia.

Estimation of biodegradation effectiveness of petroleum hydrocarbons in weathered wastes from the Graby-59 pit in industrial conditions using the *in-situ* method

The aim of this article is to present the remediation problem of 50-year-old weathered wastes (soil) from the Graby-59 waste pit. This work presents effects of wastes remediation with the use of a stage technology: initial reclamation, modification in the wastes structure in order to increase microorganisms and nutrients bioaccess to petroleum hydrocarbons; basic bioremediation stimulated by liming and waste environment enrichment with biogenic substances and bioaugmentation consisting of inoculation of the pre-treated wastes with biopreparations developed on the basis of indigenous bacteria, enriched with isolated fungi and yeast during the final phase of inoculation. The entire process of drill wastes remediation was controlled with the use of monitoring, which consisted of: physico-chemical research on waste, chromatographical analysis of petroleum pollutants, microbiological tests with an application of an innovative technology of molecular biology. This enabled optimisation of bioremediation and estimation of

its effectiveness. Multi-criteria estimation of Graby-59 waste bioremediation effectiveness was aided with toxicological research using the Microtox[®] SPT test. This enabled observation of toxicological properties alternations during wastes purification and observation of indirect metabolites development during petroleum hydrocarbons biodegradation. The above presented remediation technology, applied to strongly polluted weathered wastes from waste pit, resulted in decrease in petroleum pollutants content to a satisfactory level in 3 years. Recultivation of waste pit area was completed and the area could be re-forested. During recultivation, all required legal and administrative standards concerning Polish law were taken into consideration, which resulted in the administrative decision of recultivation completion.

Key words: drill wastes, waste pit, petroleum contaminants, bioremediation, indigenous microorganisms, inoculation, ecotoxicology.

Wstęp

Górnictwo naftowe eksploatuje cenne zasoby gazu ziemnego i ropy naftowej, a także wytwarza odpady powodujące trudno odwracalne zmiany w środowisku naturalnym. Odpady wiertnicze pochodzące z wierceń prowadzonych przed 50–60 laty deponowano w dołach urobkowych. Odpady te zawierały, oprócz urobku skalnego, składniki płuczki (najczęściej bentonit) i ropę z nawierconych warstw roponośnych oraz ziemię, którą dodawano podczas wstępnych zabiegów ich likwidacji. Uszczelnienie iłowe dołów urobkowych, dotychczas skutecznie powstrzymujące rozprzestrzenianie się substancji ropopochodnych w środowisku, nie zawsze będzie wystarczającym zabezpieczeniem przed skażeniem wód podziemnych. Ponadto niestabilność mechanicznej górnej warstwy odpadu i ewentualna utrata żelowej struktury koloidalnej odpadu w wyniku zjawiska tiksotropii mogą spowodować zagrożenia dla ludzi, zwierząt, oraz sprzętu używanego do prac leśnych.

Wysoka zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych (70 000÷200 000 mg TPH/kg s.m.) w odpadach wiertniczych zdeponowanych w starych dołach urobkowych stwarza duże trudności podczas prowadzenia prac bioremediacyjnych. Z tego względu koncepcję technologiczną oczyszczania odpadów oparto na etapowej realizacji kolejnych procesów oczyszczania, pozwalających na stopniowe obniżanie poziomu zanieczyszczeń ropopochodnych, co umożliwi sukcesywne wprowadzanie kolejnych metod coraz głębszego oczyszczania skażonego terenu. W celu obniżenia wysokiej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych do poziomu umożliwiającego zastosowanie metod biologicznego oczyszczania (poniżej 50 000 mg/kg s.m.) konieczne jest przeprowadzenie wstępnej remediacji polegającej na drenażu melioracyjno-odciekowym, który pozwala na 50÷75-procentowe obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych w całej masie odpadu zgromadzonego w dole urobkowym [31, 32, 34].

Do biodegradacji skażeń substancjami ropopochodnymi w środowisku glebowym, oprócz obecności mikroorganizmów

zdolnych do rozkładu tych zanieczyszczeń, niezbędna jest także odpowiednia zawartość składników pokarmowych, natlenienie, warunki temperaturowe, odczyn (pH) gleby oraz odpowiednia wilgotność i eliminacja związków toksycznych [11, 26, 42]. Jednym z głównych czynników decydujących o podatności ww. odpadów na biodegradację jest budowa chemiczna węglowodorów ropopochodnych (długość łańcucha, jego rozgałęzienie, obecność tlenu w cząsteczce węglowodorów, występowanie i położenie podstawników, struktura i liczba pierścieni) [10, 27]. Równie ważnym czynnikiem jest biodostępność mikroorganizmów do węglowodorów ropopochodnych, która zależy od struktury gleby, właściwości geologicznych, pochodzenia zanieczyszczeń i czasu ich kontaktu z glebą oraz od właściwości fizjologicznych mikroorganizmów [9, 37, 38, 39].

Zadaniem bioremediacji podstawowej jest zwiększenie liczebności mikroorganizmów autochtonicznych przez wzbogacenie środowiska w składniki odżywcze i optymalizację parametrów przebiegu procesu. Węglowodory ropopochodne, tak jak każda substancja organiczna, mogą być wykorzystywane jako źródło węgla do budowy biomasy komórek. Rozwój drobnoustrojów warunkuje jednak także dostęp do innych składników pokarmowych, takich jak: azot, fosfor, siarka, wapń, magnez i potas. W glebach, które uległy skażeniu substancjami ropopochodnymi, drastycznie zostaje zakłócony stosunek azotu do fosforu. Powszechnie uważa się, że optymalny dla rozwoju mikroorganizmów udział poszczególnych pierwiastków biogennych kształtuje się na poziomie: C:N:P = 100:10:1, czyli zbliżonym do ich zawartości w komórkach drobnoustrojowych [43, 45]. Jednakże, ze względu na różne szybkości rozkładu poszczególnych węglowodorów i nieznaną stopień przyswajania nutrietów przez mikroorganizmy w zależności od rodzaju gleby, optymalne ilości nawozów mineralnych należy ustalić w badaniach laboratoryjnych [15, 29]. Dobór dawki substancji biogennych dokonano poprzez wyznaczenie wzajem-

nych zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenazową odpadu a ilością dozowanych substancji biogennych oraz obniżeniem się zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych w oczyszczanym odpadzie [33].

Obecnie prowadzone są badania nad przyspieszeniem biodegradacji węglowodorów na drodze procesów biotechnologicznych, przy wykorzystaniu aktywnych kultur bakteryjnych uprzednio wyizolowanych z silnie skażonych środowisk naturalnych. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz wysoką skuteczność, metody biologiczne znajdują praktyczne zastosowanie na skalę techniczną [5, 14, 15]. Ropa naftowa stanowi skomplikowany, wieloskładnikowy układ i z tego względu do jej rozkładu wskazane jest zastosowanie mieszaniny kultur bakteryjnych o rozbudowanym aparacie enzymatycznym. W celu uniknięcia antagonizującego oddziaływania mikroflory autochtonicznej gleby na obce kultury drobnoustrojów nieprzystosowane do danego środowiska, preferuje się sporządzenie konsorcjów bakteryjnych na bazie uprzednio wyizolowanych z gleby mikroorganizmów autochtonicznych [3, 4, 16, 21].

Zdolność mikroorganizmów do adaptacji zanieczyszczeń odgrywa szczególnie istotną rolę w rozkładzie ksenobiotyków. Do najaktywniejszych bakterii posiadających zdolność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych (alifatycznych i aromatycznych) najczęściej opisywanych w literaturze należą bakterie: *Rhodococcus erythropolis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas veronii*, *Rhizobium daejeonense*, *Mycobacterium frederiksbergense*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Nocardia asteroides*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas yanokuyae* [6, 11, 18, 40, 44].

Grzyby również odgrywają znaczącą rolę w usuwaniu węglowodorów ropopochodnych poprzez wytwarzanie produktów pośrednich o często zmniejszonej toksyczności i zwiększonej podatności na rozkład z udziałem bakterii i dlatego nie powinny zostać zignorowane w rozwoju skutecznych strategii bioremediacji. W literaturze światowej przedstawiono szereg badań procesu biodegradacji z wykorzystaniem następujących grzybów: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma asperellum*, *Cladophialophoria* [12, 20, 28, 35, 41].

Drożdże należące do gatunku *Yarrowia lipolytica* wykazują duże zdolności asymilacyjne w stosunku do węglowodorów i są wykorzystywane w procesie bioremediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi [24]. Wprowadzenie do składu biopreparatu niepatogennych gatunków drożdży przyspiesza proces oczyszczania gruntu.

W trakcie badań mikrobiologicznych, mających za zadanie opracowanie profesjonalnego biopreparatu na bazie niepatogen-

nych bakterii i grzybów pochodzących z przeznaczonych do oczyszczania silnie skażonych substancjami ropopochodnymi terenów dołów urobkowych, stwierdzono, że zakres mikrobiologicznych analiz klasycznych należy rozszerzyć o badania opierające się na technikach molekularnych. Przy założeniu dużej bioróżnorodności opracowanych biopreparatów, badania te są wskazane w celu dokładnej identyfikacji mikroorganizmów, poprzez przeprowadzenie sekwencjonowania genu kodującego 16SrRNA dla bakterii i 18SrRNA dla grzybów. Powyższe badania należą do nowoczesnych technik molekularnych, często wykorzystywanych do określania różnorodności populacji mikroorganizmów w procesach bioremediacyjnych [7, 8, 22, 25, 33]. Identyfikacja metodami molekularnymi bakterii i grzybów wchodzących w skład biopreparatów ma duże znaczenie również ze względu na możliwość określenia, czy nie należą one do gatunków patogennych. W badaniach tych oparto się na liście klasyfikacji stosowanej przez American Type Culture Collection (ATCC) numer 1 (Biosafety Level – 1) oraz klasyfikacji wprowadzonej przez European Confederation of Medical Mycology (ECMM) określającej poziom szkodliwości poszczególnych grzybów pleśniowych [33].

W wyniku prowadzonych przez INiG – PIB (Zakład Technologii Eksploatacji Płynów Włózkowych oraz Zakład Mikrobiologii) długoletnich badań laboratoryjnych i terenowych opracowana została etapowa technologia oczyszczania z zanieczyszczeń ropopochodnych zastarzałych odpadów z dołów urobkowych. Wytyczne przeprowadzenia kolejnych etapów oczyszczania terenu danego dołu urobkowego w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* opracowano na podstawie badań laboratoryjnych (metoda przyzmożenia *ex-situ*) [31, 32, 33].

Obejmowała ona następujące etapy:

- remediację wstępną – polegającą na drenażu melioracyjno-odciekowym,
- modyfikację struktury odpadu,
- bioremediację podstawową – stymulowaną poprzez dostarczenie tlenu (napowietrzenie oczyszczanej gleby i ziemi) i substancji biogennych w celu uaktywnienia mikroflory autochtonicznej,
- bioaugmentację – polegającą na wprowadzeniu do ekosystemu oczyszczanego terenu aktywnego biopreparatu sporządzonego na bazie wyizolowanych, wyselekcjonowanych i namnożonych niepatogennych gatunków bakterii autochtonicznych,
- bioaugmentację – polegającą na wprowadzeniu do ekosystemu oczyszczanego terenu aktywnego biopreparatu sporządzonego na bazie bakterii autochtonicznych, zmodyfikowanego poprzez wzbogacenie go o wytypowane niepatogenne gatunki grzybów i drożdży wyizolowane z terenu oczyszczanego dołu urobkowego.

Na drodze przemian chemicznych i mikrobiologicznych podczas procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych mogą powstawać metabolity o zróżnicowanej lub słabo poznanej aktywności biologicznej [17, 19]. Oznaczenie poziomu stężeń pozostałych metabolitów jest trudne i dlatego coraz częściej ocenę stopnia skażenia wykonuje się za pomocą testów toksykologicznych, które ponadto dają obraz badanych populacji w zakresie śmiertelności, wzrostu, reprodukcji i zaburzeń fizjologicznych [23, 30].

W procesach bioremediacyjnych zanieczyszczeń ropopochodnych na szczególną uwagę zasługuje test *Microtox*[®] *SPT*, w którym jako bioindykatory zastosowane zostały bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri* (ISO 113480), żywiące w normalnych warunkach około 10% metabolizmu na wytwarzanie światła. W obecności substancji toksycznych, wpływających ujemnie na metabolizm komórkowy, bakterie te bardzo szybko reagują spadkiem luminescencji [1, 2, 13, 36].

Charakterystyka materiału badawczego

Dół urobkowy Graby-59 pochodzący z lat 1947–1983 zawierał 1235 m³ odpadu i należał do „dołów mokrych” z dużymi widocznymi plamami substancji ropopochodnych na powierzchni (rysunek 3).

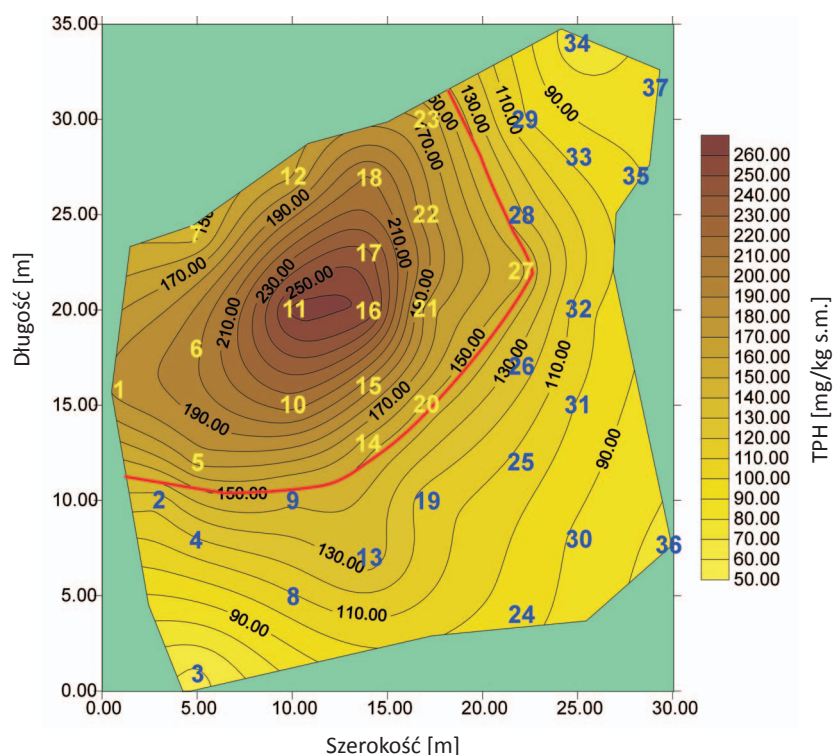
Na podstawie chromatograficznych analiz zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) odpadu z dołu urobkowego Graby-59, z głębokości 0÷0,50 m ppt, wyodrębniono dwa obszary, różniące się poziomem skażenia: obszar A (18 910÷158 908 mg TPH/kg s.m.) oraz obszar B (16 479÷92 264 mg TPH/kg s.m.) – rysunek 1.

kształtuje się na poziomie: 27 271÷106 473 mg TPH/kg s.m., a dopiero na głębokości 170 cm ppt wartości zanieczyszczeń TPH zbliżyły się do poziomu standardów glebowych. Analiza chromatograficzna wykazała, że n-alkany o długości łańcucha węglowego nC₆–nC₃₆ w uśrednionych próbkach odpadu z różnych interwałów głębokościowych stanowiły od 75,2 do 80,41% zanieczyszczeń ropopochodnych.

W odpadzie z dołu urobkowego Graby-59 stwierdzono obecność węglowodorów monaromatycznych (BTEX) na poziomie: 68,5÷161,4 mg/kg s.m., zawartość ta wraz z głębokością ulegała zmniejszeniu. W przeważającej

ilości, przekraczającej dopuszczalne standardy glebowe, występował benzen i toluen. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) pojawiały się w śladowych ilościach (od 2,802 do 3,624 mg/kg s.m.). Najwyższe zawartości spośród zidentyfikowanych WWA wykazywał naftalen (1,659÷2,457 mg/kg s.m.), a pozostałe określono w ilościach śladowych, nieprzekraczających standardów glebowych.

Wartości pH wyciągów wodnych odpadu (10:1) z dołu urobkowego Graby-59 są mało zróżnicowane i dla wszystkich badanych prób mieszczą się w zakresie 6,20÷6,69. Oznaczone wartości są znacznie niższe od występujących w odpadach z wierzeń obrotowo-płuczkowych, gdzie pH często przekracza 9,0 – co jest spowodowane regulowaniem odczynu płuczki przez dawkowanie rozpuszczalnych wodorotlenków lub wodorowęglanów. Zawartość substancji organicznych (oznaczanych wskaźnikiem ChZT_{Cr}) w wyciągach wodnych z badanego odpadu mieści się w zakresie 268÷454 mg O₂/dm³ i nie przekracza wartości oznaczanych w odpadach wiertniczych (wiercenia metodą obrotowo-płuczkową), które przeważnie są wyższe niż 1500 mg O₂/dm³, a w niektórych przypadkach osiągają 9000 mg O₂/dm³. Przedstawione wyniki badań przemawiają za tym, że odpad z dołu



Rys. 1. Rozkład zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) w dole urobkowym Graby-59 w warstwie powierzchniowej (30 cm ppt) z zaznaczonymi punktami poboru próbek analitycznych

Analizy próbek odpadu pobranych w głębszych warstwach dołu urobkowego Graby-59 wykazały, że na głębokości 0,80 m ppt zanieczyszczenie substancjami ropopochodnymi

urobkowego Graby-59 nie zawierał odpadów płuczek stosowanych w wierceniach obrotowo-płuczkowych (np. związków skrobiowych, celulozowych, polimerów i innych substancji organicznych) [33].

Zawartość metali ciężkich w analizowanych próbkach nie przekraczała dopuszczalnych wartości, określonych przez standardy jakości gleby i ziemi, podane w rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. (Dz.U. z 2002 r. nr 165, poz. 1359). Odnotowano jedynie nieznaczne podwyższenie zawartości baru w próbkach z interwału 30÷120 cm ppt na obszarze oczyszczanego dołu urobkowego, co jest związane z zastosowaniem przy pogłębianiu otworu Graby-59 płuczki na bazie bentonitu.

Obliczone na podstawie wykonanych analiz chemicznych proporcje zawartości C:N:P odbiegają od optymalnych (C:N:P = 100:10:1) i kształtują się na poziomie: 100:1:1–100:1,5:1 – co dowodzi, że procesy mikrobiologiczne w środowisku glebowym są zahamowane i bez odpowiedniego wzbogacenia gleby/odpadu w substancje biogenne mikroorganizmy autochtoniczne nie zostaną uaktywnione.

Oznaczona obecność fenoli w warstwach powierzchniowych omawianego dołu urobkowego wahała się w zakresie:

19,5÷25,8 mg/kg s.m., co przekracza dopuszczalne wartości stężeń w glebie i ziemi.

Analiza mineralogiczna pozwala na stwierdzenie, że odpad z dołu urobkowego Graby-59 zawierał znaczne ilości minerałów ilastych (36÷62%). Dyfraktogram rentgenowski frakcji ilastej dokumentuje stan wysokiej delaminacji minerałów o strukturze pęczniającej (mieszano-pakietowy illit/smektyt), o zawartości pakietów smektytowych wynoszącej około 85÷95%.

Ze względu na wysoką zawartość minerałów ilastych o strukturze pęczniającej w badanej glebie/odpadzie pochodzącym z dołu urobkowego Graby-59, konieczne było podjęcie działań mających na celu modyfikację jego struktury, co umożliwiło uzyskanie lepszych efektów w procesach oczyszczania ze skażeń substancjami ropopochodnymi.

Na podstawie przeprowadzonych analiz oraz przeglądu dokumentów archiwalnych wierceń stwierdzono, że odpad z dołu urobkowego Graby-59 zawiera glebę i ziemię bardzo silnie skażoną substancjami ropopochodnymi i można go zakwalifikować do grupy odpadów o kodzie **ex 17 05 03*** „gleba i ziemia zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi”.

Charakterystyka opracowanych biopreparatów

Z zanieczyszczonego odpadu pochodzącego z dołu urobkowego Graby-59 w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB wyizolowano łącznie 20 szczepów bakteryjnych, charakteryzujących się zdolnością wykorzystania ropy naftowej i węglowodorów jako jedyne źródła węgla. Wyodrębniono przedstawicieli następujących rodzajów: *Arthrobacter* (1 szczep), *Agrobacterium* (1 szczep), *Enterobacter* (1 szczep), *Gordonia* (1 szczep), *Micrococcus* (1 szczep), *Mycobacterium* (2 szczepy), *Nocardia* (1 szczep), *Klebsiela* (1 szczep), *Pseudomonas* (2 szczepy), *Rhodococcus* (6 szczepów), *Sphingobacterium* (1 szczep), *Streptomyces* (2 szczepy). Ponadto wyizolowano szczepy grzybów należące do rodzajów: *Trichoderma* (1 szczep), *Aspergillus* (1 szczep), *Penicillium* (1 szczep), *Fusarium* (1 szczep), *Cladosporium* (1 szczep) oraz 2 szczepy drożdży, które zaklasyfikowano do rodzaju *Candida* (1 szczep) i *Pichia* (1 szczep).

Spośród wszystkich wyizolowanych mikroorganizmów zdecydowaną większość stanowili przedstawiciele rzędu *Acetinomycetales* (typ *Acetinobacteria*), co nie było wielkim zaskoczeniem, gdyż są one często spotykanym reprezentantem mikroorganizmów glebowych i charakteryzują się zdolnościami rozkładu węglowodorów ropopochodnych. Szczególnie licznie reprezentowany był rodzaj *Rhodococcus*. Cechą charakterystyczną wyizolowanych szczepów była zdolność wykorzystywania nie tylko węglowodorów

alifatycznych, ale też aromatycznych, wspólne szlaki tych węglowodorów nie są zjawiskiem powszechnym. W celu dokładniejszej identyfikacji mikroorganizmów wchodzących w skład opracowanych biopreparatów została wykonana reakcja łańcuchowej polimerazy PCR i analiza sekwencji kodujących genu 16S rRNA u bakterii i 18S rRNA u grzybów. Otrzymane dane porównano z informacjami dostępnymi w GenBank, przy pomocy programu BLAST. Przeprowadzone badania były podstawą prawidłowej charakterystyki gatunkowej mikroorganizmów wyizolowanych z oczyszczanego terenu dołu urobkowego Graby-59.

W Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB na podstawie niepatogennych gatunków bakterii autochtonicznych opracowano biopreparat GR-59-1, który następnie wzbogacono o niepatogenne gatunki grzybów i drożdży, tworząc GR-59-2. Skład sporządzonych biopreparatów przedstawiono w tabelicy 1. Zostały one przetestowane w badaniach laboratoryjnych (analiza procesu inokulacji) na pryzmach gleby i ziemi po przeprowadzeniu etapu bioremediacji podstawowej.

Inokulacja biopreparatem GR-59-1 realizowana metodą *ex-situ* (skala laboratoryjna) w dwóch seriach umożliwiła obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych TPH z 27 364 do 2952 mg/kg s.m. W wyniku procesu inokulacji biopreparatem GR-59-1 biodegradacji najwidoczniej uległy węglowodory alifatyczne z zakresu nC₇–nC₁₈ w granicach:

Tablica 1. Przynależność gatunkowa szczepów mikroorganizmów wchodzących w skład biopreparatów GR-59-1 i GR-59-2

| Oznaczenie szczepu | Identyfikacja metodami klasycznymi | Identyfikacja metodą sekwencjonowania | Procent identyczności (najbardziej podobna sekwencja w GenBank) | Kategoria bezpieczeństwa według ATCC |
|--|------------------------------------|---|---|--------------------------------------|
| Biopreparat GR-59-1 na bazie bakterii autochtonicznych | | | | |
| GR-59_1 | <i>Arthrobacter sp.</i> | <i>Arthrobacter methylotrophus</i> | 98%/EF204378 | 1 |
| GR-59_3 | <i>Enterobacter sp.</i> | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 99%/EU333873 | 1 |
| GR-59_4 | <i>Gordonia sp.</i> | <i>Gordonia lacunae</i> | 99%/GU727686 | 1 |
| GR-59_5 | <i>Micrococcus sp.</i> | <i>Micrococcus yunnanensis</i> | 98%/AJ409096 | 1 |
| GR-59_6 | <i>Mycobacterium sp.</i> | <i>Mycobacterium fluoranthenivorans</i> | 99%/AF544630 | 1 |
| GR-59_7 | <i>Mycobacterium sp.</i> | <i>Mycobacterium anthracenicum</i> | 98%/Y15709 | 1 |
| GR-59_8 | <i>Nocardia sp.</i> | <i>Rhodococcus corynebacterioides</i> | 99%/FJ200395 | 1 |
| GR-59_9 | <i>Rhodococcus sp.</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 99%/AB546303 | 1 |
| GR-59_10 | <i>Rhodococcus sp.</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 100%/EU070938 | 1 |
| GR-59_11 | <i>Rhodococcus sp.</i> | <i>Rhodococcus qingshengii</i> | 99%/DQ090961 | 1 |
| GR-59_12 | <i>Rhodococcus sp.</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 100%/AY822047 | 1 |
| GR-59_13 | <i>Rhodococcus sp.</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 100%/EU729738 | 1 |
| GR-59_17 | <i>Pseudomonas sp.</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 99%/DQ178230 | 1 |
| GR-59_18 | <i>Sphingobacterium sp.</i> | <i>Sphingobacterium composti</i> | 98%/EF122436 | 1 |
| GR-59_19 | <i>Streptomyces sp.</i> | <i>Streptomyces microflavus</i> | 98%/FJ486342 | 1 |
| Biopreparat GR-59-2 (Biopreparat GR-59-1 wzbogacony o niepatogenne gatunki grzybów i drożdży) | | | | |
| GR-59_21 | <i>Trichoderma sp.</i> | <i>Trichoderma asperellum</i> | 99%/EU077227 | 1 |
| GR-59_22 | <i>Aspergillus sp.</i> | <i>Aspergillus visicolor</i> | 99%/HM776414 | 1 |
| GR-59_24 | <i>Penicillium sp.</i> | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 100%/GU733711 | 1 |
| GR-59_25 | <i>Cladosporium sp.</i> | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 99%/AB456576 | 1 |
| GR-59_26 | <i>Candida sp.</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 99%/GQ376068 | 1 |
| GR-59_27 | <i>Pichia sp.</i> | <i>Pichia galeiformis</i> | 98%/GQ855207 | 1 |

70,6÷79,1%. Natomiast węglowodory cięższe nC₁₉–nC₃₄ również uległy biodegradacji w zadowalającym stopniu: od 61,2 do 68,3%.

Kontynuacja inokulacji biopreparatem GR-59-2, wzbogaconym o wytypowane niepatogenne gatunki grzybów i drożdży, pozwoliła na zwiększenie efektywności i rozszerzyła spektrum działania biopreparatu poprzez zwiększenie biodegradacji węglowodorów aromatycznych (BTEX) o 59,9%, WWA o 37,9%

oraz fenoli o 74,1% – co świadczy o prawidłowo podjętej decyzji o włączeniu zidentyfikowanych niepatogennych gatunków grzybów i drożdży do konsorcjum bakteryjnego.

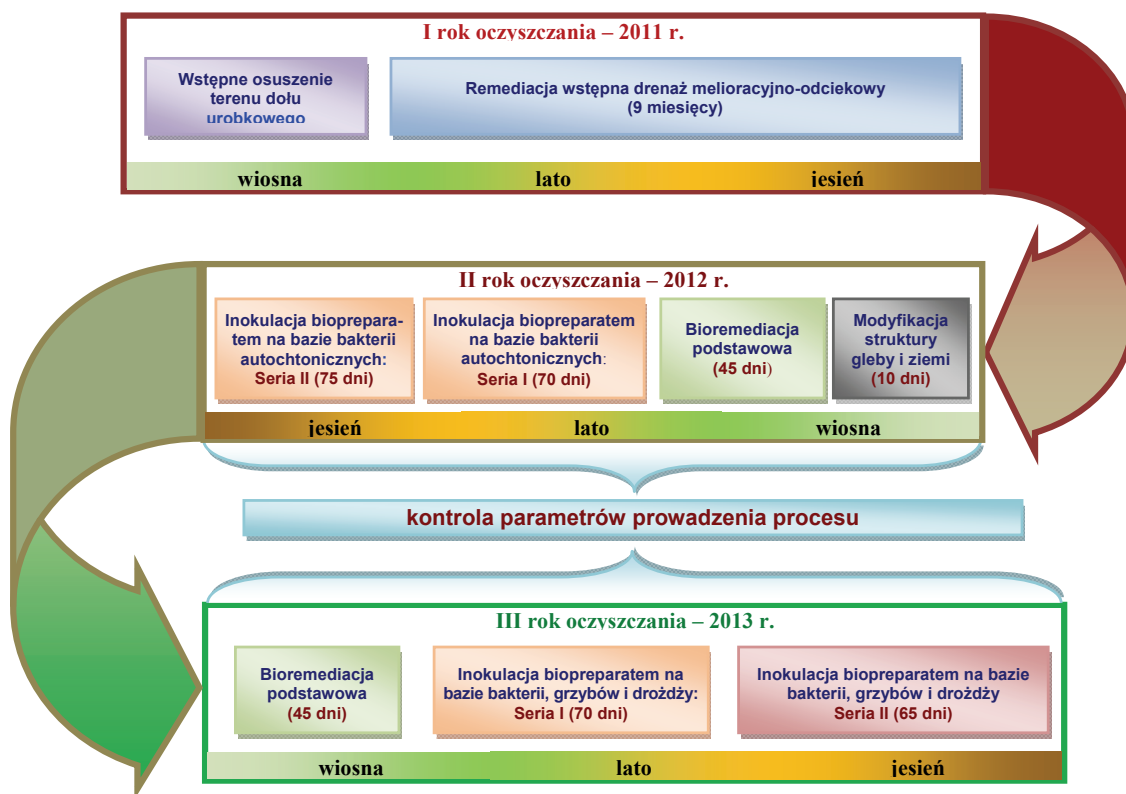
Przeprowadzone badania predestynują opracowane biopreparaty do zastosowania w warunkach przemysłowych. Biopreparaty do celów przemysłowych były wytwarzane w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB z wykorzystaniem fermentora MINIFORMS.

Omówienie wyników biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych (metoda *in-situ*)

Przebieg procesów bioremediacyjnych w dole urobkowym Graby-59 opartych na opracowanej etapowej technologii oczyszczania dołów urobkowych z zanieczyszczeń ropopochodnych, realizowanej metodą *in-situ*, którą w zależności od charakteru skażeń oczyszczanego dołu urobkowego podawano weryfikacji, zobrazowano na rysunkach 2 i 3.

Poszczególne etapy procesu oczyszczania terenu dołu urobkowego Graby-59 były monitorowane poprzez wykonywanie analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropo-

pochodnych i badań parametrów fizyczno-chemicznych oraz mikrobiologicznych (całkowita liczba mikroorganizmów, liczba mikroorganizmów rozkładających węglowodory ropopochodne, liczba grzybów, identyfikacja rodzajowa i gatunkowa mikroorganizmów i grzybów oraz aktywność dehydrogenazowa i celulazowa), co w pełni pozwoliło na optymalizację przebiegu procesów bioremediacyjnych w odpadzie z terenu oczyszczanego dołu urobkowych oraz na ocenę ich efektywności. Wyniki badań monitoringowych zestawiono w tablicy 2.



Rys. 2. Schemat przebiegu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w warunkach przemysłowych (metodą *in-situ*) na terenie dołu urobkowego Graby-59

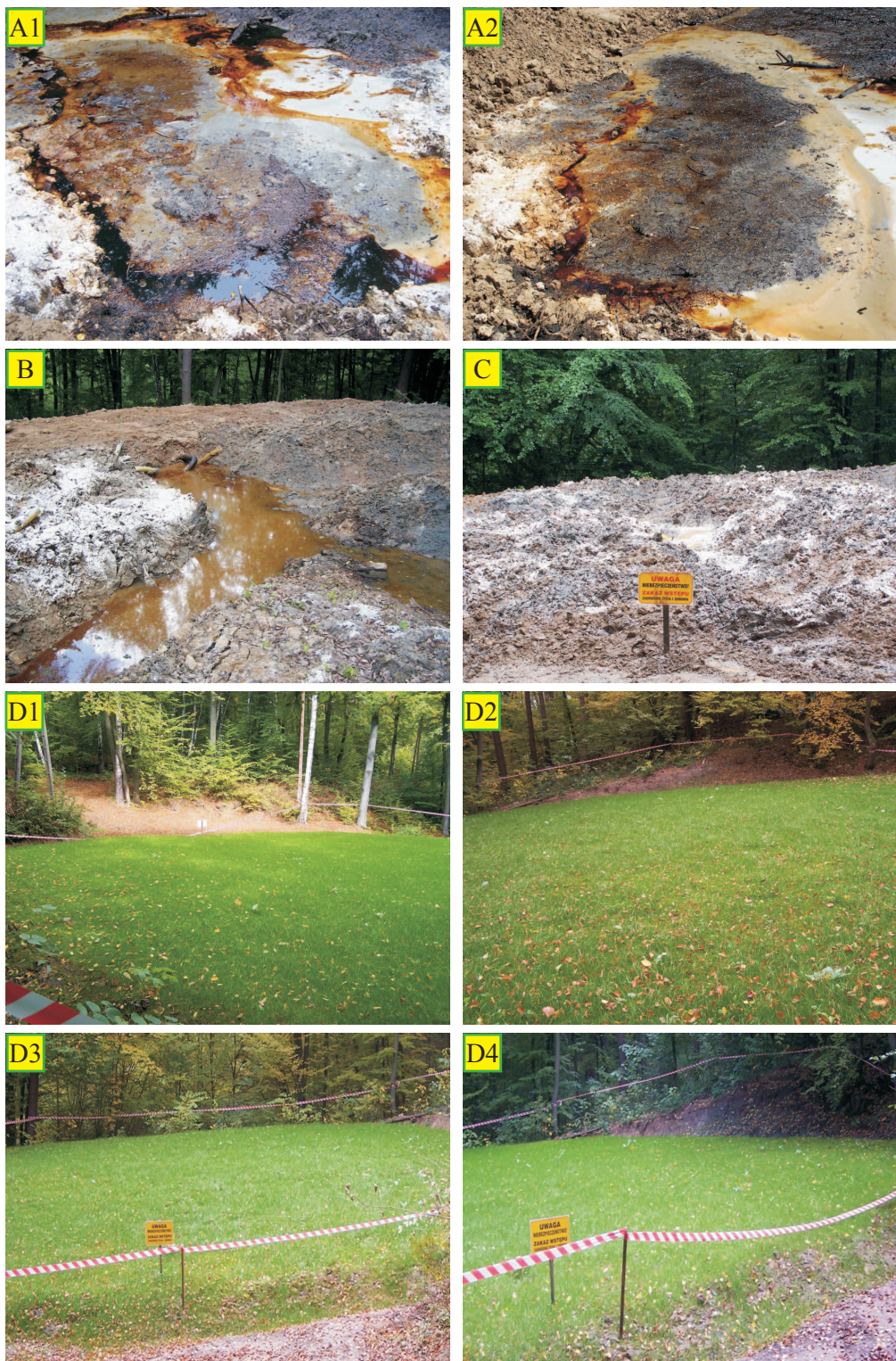
Proces wstępnej remediacji polegającej na drenażu melioracyjno-odciekowym przeprowadzony w pierwszym roku oczyszczania terenu dołu urobkowego Graby-59 przyniósł zadowalające efekty obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych, zarówno w powierzchniowej, jak i w głębszych warstwach odpadu. Odcieki wraz z substancjami ropopochodnymi zbierano w łapaczkach dwukomorowych, następnie przewożono je do separatorów ropy naftowej, a pozostałe odcieki na oczyszczalnię ścieków eksploatacyjnych. Na obszarze A dołu urobkowego Graby-59 uzyskano obniżenie TPH z 158 588 do 46 806 mg/kg s.m. (70,5% redukcji), zaś na obszarze B odnotowano spadek TPH z 92 254 do 37 636 mg/kg s.m. (59,6% redukcji). Pomimo znacznego obniżenia TPH, na obszarze A nadal stwierdzono wysoki poziom skażenia, gdyż w warstwie 0,80 m ppt zawierał się on w granicach: 32 487÷37 588 mg TPH/kg s.m. Na głębokości 1,7 m ppt zawartość TPH zbliżała się do standardów glebowych.

Obniżenie poziomu zanieczyszczeń ropopochodnych było szczególnie widoczne dla węglowodorów nC_6 – nC_{14} w zakresie: 68,2÷78,9%, nieznacznie niższe zanotowano dla nC_{15} – nC_{20} na poziomie: 45,8÷56,7%, natomiast dla cięższych węglowodorów nC_{23} – nC_{36} kształtowało się ono w zakresie: 8,9÷21,6%. Ponadto w wyniku prowadzonego zabiegu remediacji wstępnej na obszarze A dołu urobkowego Graby-59 uzyskano widoczne obniżenie BTEX z 161,4 do 50,9 mg/kg s.m. oraz WWA z 3,624 do 2,324 mg/kg s.m.,

zaś na obszarze B dołu urobkowego Graby-59 odnotowano spadek BTEX z 68,6 do 37,8 mg/kg s.m. oraz WWA z 2,802 do 1,199 mg/kg s.m.

W drugim roku oczyszczania dołu urobkowego Graby-59 po zabiegu remediacji wstępnej przeprowadzono modyfikację struktury odpadu poprzez zmieszanie go z „czystym gruntem”, niezawierającym zanieczyszczeń ropopochodnych, w proporcjach ustalonych w badaniach laboratoryjnych (obszar A – 15:1, obszar B – 30:1). Przyczyniła się ona do rozluźnienia struktury odpadu i zwiększenia biodostępności mikroorganizmów i substancji biogennych do węglowodorów ropopochodnych.

Proces bioremediacji podstawowej, stymulowanej poprzez stopniowe dozowanie substancji biogennych (wapna nawozowego i nawozów mineralnych), aby w swojej końcowej fazie osiągnąć poziom wyznaczony na podstawie badań laboratoryjnych (obszar A – C:N:P = 100:3:1, obszar B – C:N:P = 100:6:1), spowodował obniżenie zawartości substancji ropopochodnych w ciągu 45 dni do poziomu 34 635÷28 028 mg/kg s.m., co stanowi 22,2÷23,4% redukcji. Biodegradacja TPH podczas procesu bioremediacji podstawowej przebiegała początkowo z wysoką wydajnością, a następnie jej dynamika uległa zmniejszeniu i zawartość zanieczyszczeń utrzymywała się na zbliżonym poziomie. W toku prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej odnotowano wzrost liczebności bakterii odpowiedzialnych



Rys. 3. Ilustracja przebiegu prac bioremediacyjnych na terenie dołu urobkowego Graby-59; A1, A2 – skażenie terenu przed rozpoczęciem prac rekultywacyjnych, B – remediacja wstępna, C – bioremediacja podstawowa i inokulacja biopreparatami, D1, D2, D3, D4 – teren dołu urobkowego Graby-59 po zakończeniu prac rekultywacyjnych

za biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych z poziomu $2,2 \times 10^5$ do $5,1 \times 10^5$ jtk/g s.m. Ponadto stwierdzono przyrost ilości grzybów z $1,3 \times 10^2$ do $6,2 \times 10^2$ jtk/g s.m.

Najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego nC_6 – nC_{21} (w granicach: 22,4÷35,8%), zaś węglowodorów cięższych

z zakresu nC_{22} – nC_{36} kształtowała się na niższym poziomie (5,1÷20,8%) – rysunek 4.

W porze letniej przeprowadzono inokulację realizowaną w dwóch seriach (70 i 75 dni) biopreparatem GR-59-1 sporządzonym na bazie autochtonicznych niepatogennych bakterii wyizolowanych z terenu dołu urobkowego Graby-59. Prze-

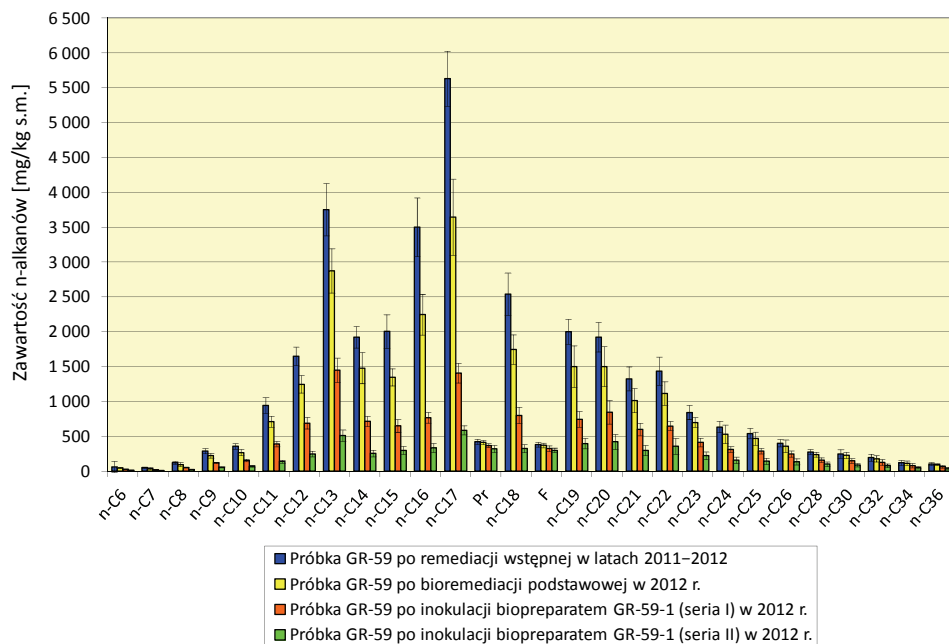
Tablica 2. Zestawienie analiz chemicznych i enzymatycznych podczas etapowego procesu oczyszczania gleby i ziemi z terenu dołu urobkowego Graby-59 (obszar A) z interwału 0–50 cm ppt (liczba próbek ujednoczonych $n = 10 \div 15$)

| Czas trwania procesu [dni] | Odczyn | TPH [mg/kg s.m.] | BTEX [mg/kg s.m.] | WWA [mg/kg s.m.] | Fenole [mg/kg s.m.] | Aktywność dehydrogenazowa [$\mu\text{g TF/g s.m./24h}$] | Aktywność celulazowa [$\mu\text{g Gel/g s.m./24h}$] |
|--|--------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---|---|
| Remediacja wstępna – I rok procesu oczyszczania | | | | | | | |
| | 6,52 | 46 712 \pm 4 214 | 50,9 \pm 5,9 | 1,875 \pm 0,218 | 7,45 \pm 0,61 | 6,9 \pm 0,5 | 4,5 \pm 0,4 |
| Bioremediacja podstawowa – II rok procesu oczyszczania | | | | | | | |
| 10 | 6,89 | 42 258 \pm 4 012 | 48,5 \pm 5,4 | 1,832 \pm 0,210 | 712 \pm 0,52 | 11,2 \pm 0,9 | 5,2 \pm 0,5 |
| 20 | 7,21 | 38 012 \pm 3 685 | 46,8 \pm 5,1 | 1,789 \pm 0,203 | 6,87 \pm 0,45 | 17,5 \pm 1,5 | 5,6 \pm 0,6 |
| 35 | 7,42 | 36 147 \pm 3 458 | 44,8 \pm 4,8 | 1,766 \pm 0,199 | 6,41 \pm 0,41 | 19,7 \pm 1,6 | 5,8 \pm 0,6 |
| 50 | 7,92 | 34 625 \pm 3 210 | 43,5 \pm 4,5 | 1,749 \pm 0,189 | 6,15 \pm 0,39 | 22,3 \pm 1,7 | 6,1 \pm 0,7 |
| Inokulacja biopreparatem GR-59-1 (I seria, II rok procesu oczyszczania) | | | | | | | |
| 65 | 7,78 | 29 147 \pm 2 987 | 39,1 \pm 4,2 | 1,689 \pm 0,177 | 5,21 \pm 0,35 | 29,1 \pm 1,9 | 7,1 \pm 0,7 |
| 85 | 7,64 | 24 498 \pm 2 541 | 36,4 \pm 3,9 | 1,584 \pm 0,149 | 4,84 \pm 0,33 | 30,4 \pm 2,1 | 7,9 \pm 0,9 |
| 95 | 7,61 | 21 014 \pm 1 942 | 33,0 \pm 3,7 | 1,512 \pm 0,143 | 4,51 \pm 0,30 | 36,1 \pm 2,6 | 8,1 \pm 1,0 |
| 120 | 7,52 | 19 219 \pm 1 748 | 31,2 \pm 3,5 | 1,416 \pm 0,139 | 4,40 \pm 0,29 | 40,1 \pm 2,8 | 8,5 \pm 1,1 |
| Inokulacja biopreparatem GR-59-1 (II seria, II rok procesu oczyszczania) | | | | | | | |
| 135 | 7,45 | 16 069 \pm 1 587 | 27,7 \pm 3,1 | 1,301 \pm 0,135 | 4,12 \pm 0,25 | 44,8 \pm 3,0 | 10,5 \pm 1,2 |
| 150 | 7,40 | 13 071 \pm 1 259 | 25,4 \pm 3,0 | 1,211 \pm 0,129 | 3,83 \pm 0,21 | 41,5 \pm 3,5 | 11,2 \pm 1,2 |
| 165 | 7,34 | 11 084 \pm 1 025 | 23,1 \pm 2,8 | 1,145 \pm 0,121 | 3,61 \pm 0,20 | 46,6 \pm 3,9 | 13,4 \pm 1,3 |
| 185 | 7,27 | 10 905 \pm 998 | 21,5 \pm 2,5 | 1,088 \pm 0,119 | 3,43 \pm 0,19 | 51,8 \pm 4,5 | 14,5 \pm 1,4 |
| Bioremediacja podstawowa – III rok procesu oczyszczania | | | | | | | |
| 365 | 7,65 | 9 145 \pm 881 | 20,8 \pm 2,2 | 1,070 \pm 0,158 | 3,28 \pm 0,18 | 53,4 \pm 4,9 | 15,8 \pm 1,5 |
| 380 | 7,78 | 8 243 \pm 754 | 20,1 \pm 2,0 | 1,054 \pm 0,148 | 2,97 \pm 0,16 | 56,1 \pm 4,8 | 17,7 \pm 1,8 |
| 390 | 7,89 | 7 145 \pm 621 | 19,5 \pm 1,9 | 1,045 \pm 0,098 | 2,78 \pm 0,15 | 59,6 \pm 5,1 | 19,4 \pm 2,1 |
| 400 | 7,81 | 6 571 \pm 654 | 19,3 \pm 1,9 | 1,030 \pm 0,088 | 2,54 \pm 0,14 | 62,0 \pm 5,5 | 20,7 \pm 2,3 |
| Inokulacja biopreparatem GR-59-2 (I seria, III rok procesu oczyszczania) | | | | | | | |
| 425 | 7,71 | 5 214 \pm 507 | 16,2 \pm 1,5 | 0,895 \pm 0,087 | 1,68 \pm 0,12 | 70,5 \pm 6,2 | 35,7 \pm 3,1 |
| 435 | 7,67 | 3 987 \pm 358 | 13,5 \pm 1,2 | 0,728 \pm 0,078 | 1,35 \pm 0,11 | 78,1 \pm 6,3 | 39,8 \pm 3,8 |
| 455 | 7,61 | 2 841 \pm 294 | 10,4 \pm 0,9 | 0,685 \pm 0,071 | 1,10 \pm 0,09 | 85,2 \pm 7,9 | 43,5 \pm 4,0 |
| 475 | 7,55 | 2 318 \pm 228 | 9,9 \pm 0,8 | 0,665 \pm 0,072 | 1,02 \pm 0,08 | 87,1 \pm 8,1 | 45,2 \pm 4,1 |
| Inokulacja biopreparatem G-59-2 (II seria, III rok procesu oczyszczania) | | | | | | | |
| 490 | 7,45 | 1 998 \pm 204 | 8,3 \pm 0,7 | 0,589 \pm 0,057 | 0,82 \pm 0,07 | 95,1 \pm 9,2 | 52,4 \pm 4,9 |
| 505 | 7,32 | 1 408 \pm 189 | 6,9 \pm 0,6 | 0,501 \pm 0,048 | 0,65 \pm 0,05 | 103,1 \pm 10,9 | 61,1 \pm 5,2 |
| 525 | 7,24 | 1 071 \pm 101 | 5,4 \pm 0,5 | 0,444 \pm 0,039 | 0,52 \pm 0,04 | 109,2 \pm 11,0 | 69,8 \pm 6,8 |
| 540 | 7,19 | 1 015 \pm 91 | 4,8 \pm 0,5 | 0,379 \pm 0,035 | 0,45 \pm 0,03 | 116,5 \pm 11,6 | 71,2 \pm 7,1 |

prowadzony zabieg bioaugmentacji biopreparatem GR-59-1 pozwolił na znaczne obniżenie zanieczyszczeń ropopochodnych, do poziomu: 28 028 \div 10 850 mg/kg s.m. Najszybciej biodegradacji uległy, przy równoczesnym zastosowaniu powierzchniowego zraszania i iniekcji wgłębnej biopreparatem GR-59-1, zanieczyszczenia ropopochodne w postaci węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha $n\text{C}_{10}$ – $n\text{C}_{20}$ w zakresie: 49,7 \div 78,6%. Natomiast dla węglowodorów cięż-

szych z przedziału $n\text{C}_{21}$ – $n\text{C}_{36}$ stopień obniżenia zawierał się w granicach: 30,8–59,7% (rysunek 4).

O zadowalającym stopniu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych świadczy obniżenie na obszarze A dołu urobkowego Graby-59 zawartości BTEX z 50,9 do 21,5 mg/kg s.m. i WWA z 1,875 do 1,088 mg/kg s.m. oraz wskaźniki oceny stopnia biodegradacji alkanów, które uległy zmniejszeniu: $n\text{-C}_{17}/\text{Pr}$ z 13,261 do 1,824 i $n\text{-C}_{18}/\text{F}$ z 6,663 do 1,083.



Rys. 4. Porównanie zawartości zidentyfikowanych n-alkanów w próbkach ujednoliconych z obszaru A dołu urobkowego Graby-59 po kolejnych etapach oczyszczania w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* (drugi rok prowadzenia procesu oczyszczania) – liczba powtórzeń $n = 9 \div 10$, $p < 0,05$

Odnotowane obniżenie zawartości węglowodorów aromatycznych (BTEX, WWA) dowodzi, że w skład biopreparatu inokulacyjnego wchodzi bakterie posiadające również zdolności biodegradacyjne węglowodorów aromatycznych, co potwierdzają przeprowadzone badania laboratoryjne. Do bakterii wchodzących w skład biopreparatu GR-59-1, które cechują się zdolnościami biodegradacyjnymi węglowodorów aromatycznych, należą: *Gordonia lacunae*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium fluoranthenorans*, *Pseudomonas fluorescens*.

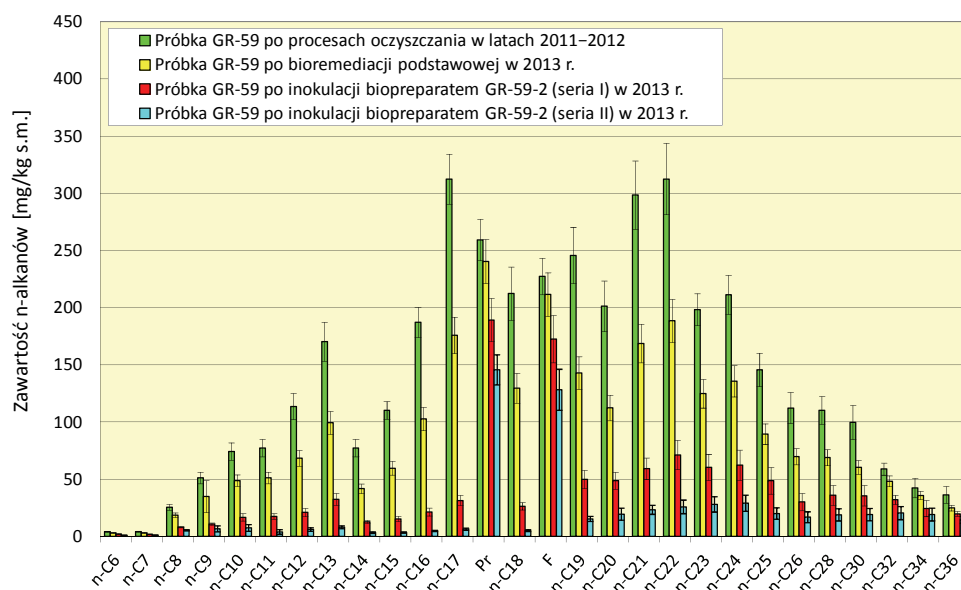
Pomimo wysokiej efektywności i szerokiego spektrum działania biopreparatu, zgodnie z przyjętymi wcześniej założeniami, proces oczyszczania kontynuowano w trzecim roku w celu osiągnięcia poziomu skażenia nieprzekraczającego obowiązujących standardów glebowych. Realizację procesu oczyszczania w trzecim roku rozpoczęto od bioremediacji podstawowej, stymulowanej poprzez stopniowe dozowanie substancji biogennej w proporcjach wyznaczonych na podstawie badań laborato-

ryjnych. Proces bioremediacji podstawowej przyczynił się do obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych do poziomu $6514 \div 5117$ mg TPH/kg s.m., co stanowi $37,9 \div 33,4\%$ redukcji. Przeprowadzenie w porze letniej dwóch serii (70 i 65 dni) zabiegu inokulacji biopreparatem GR-59-2 – sporządzonym na bazie bakterii autochtonicznych, wzbogaconym o wyizolowane gatunki grzybów i drożdży – umożliwiło obniżenie zawartości TPH na obszarze dołu urobkowego Graby-59 do poziomu $1015 \div 1001$ mg TPH/kg s.m.

Najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów o długości łańcucha n-C₉–n-C₂₄ (w zakresie: $62,7 \div 86,7\%$), również alkanany o długości łańcucha n-C₂₅–n-C₃₆ uległy biodegradacji na wysokim

poziomie (w granicach $30,8 \div 65,7\%$) – rysunek 5. Wskaźniki stopnia biodegradacji węglowodorów alifatycznych uległy znacznemu obniżeniu: n-C₁₇/Pr z 1,743 do 0,043 i n-C₁₈/F z 1,404 do 0,039.

W wyniku inokulacji biopreparatem GR-59-2 na obszarze A dołu urobkowego Graby-59 zawartość BTEX uległa obniżeniu do 4,8 mg/kg s.m. (redukcja o 65,7%), natomiast

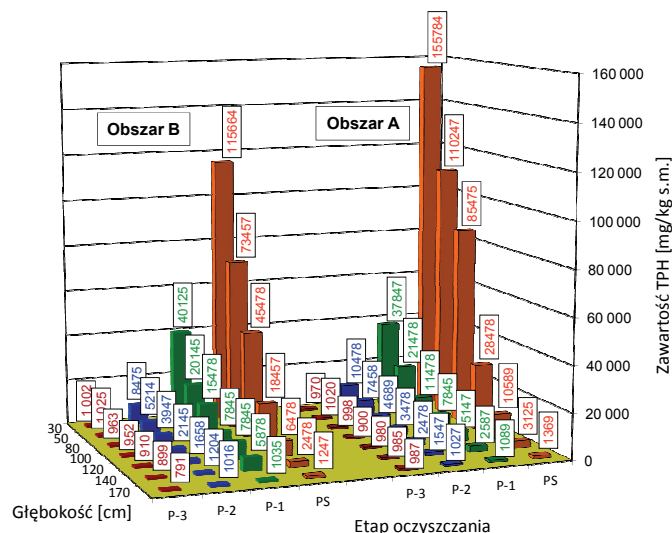


Rys. 5. Porównanie zawartości zidentyfikowanych n-alkanów w próbkach ujednoliconych z obszaru A dołu urobkowego Graby-59 po kolejnych etapach oczyszczania w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* (trzeci rok prowadzenia procesu oczyszczania) – liczba powtórzeń $n = 9 \div 10$, $p < 0,05$

zawartość WWA zmniejszyła się do niskiego pułapu wynoszącego 0,349 mg/kg s.m. (tablica 2). Potwierdza to wcześniejszą koncepcję, że biopreparat GR-59-1 należało uzupełnić o wyizolowane z terenu dołu Graby-59 wytypowane niepatogenne gatunki grzybów (*Trichoderma asperellum*, *Penicillium chrysogenum*) i drożdży (*Yarrowia lipolytica*, *Pichia galeiformis*) zdolne do biodegradacji n-alkanów o dłuższych łańcuchach i węglowodorów niezidentyfikowanych oraz fenoli, BTEX i WWA.

W celu zobrazowania przebiegu procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego Graby-59 dokonano porównania zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w ujednoliconych próbkach gleby, pobranych w trakcie prowadzenia prac bioremediacyjnych na różnych głębokościach. Wyniki analiz chromatograficznych zilustrowano na rysunku 6.

Najefektywniej zachodzą procesy bioremediacyjne w warstwie powierzchniowej 0÷80 cm ppt. Na głębokości poniżej 80 cm ppt skuteczność oczyszczania jest znacznie niższa, a relatywnie niska zawartość TPH na głębokości 140÷170 cm ppt jest trudna do dalszego obniżenia w wyniku prowadzonych zabiegów. Jednak mimo trudności, po 3 latach prowadzenia etapowego procesu oczyszczania gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-59, uzyskano obniżenie zawartości TPH w całej objętości dołu urobkowego do poziomu nieprzekraczającego dopuszczalnych wartości



Rys. 6. Porównanie zawartości TPH w próbkach gleby i ziemi pobranych z różnych głębokości dołu urobkowego Graby-59 po kolejnych etapach oczyszczania; PS – próbka surowa, P-1 – próbka po procesie remediacji wstępnej, P-2 – próbka po inokulacji biopreparatem GR-59-1 w drugim roku oczyszczania, P-3 – próbka po inokulacji biopreparatem GR-59-2 w trzecim roku oczyszczania

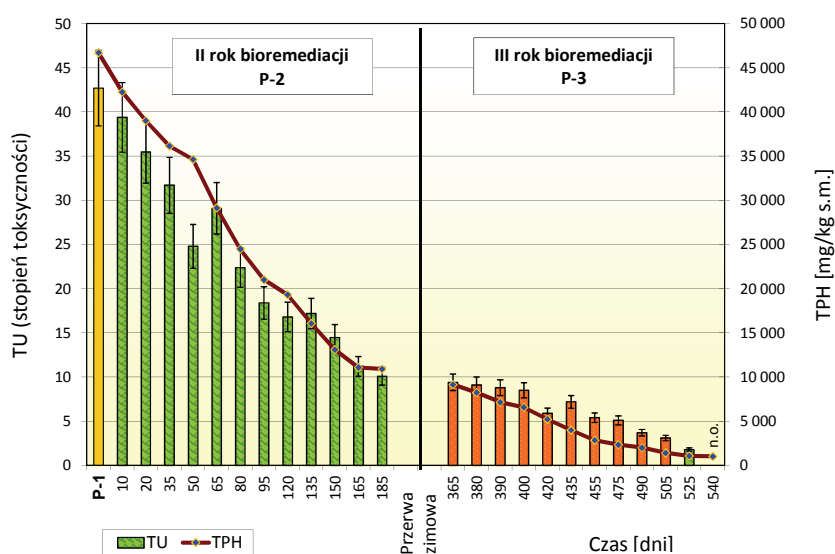
określonych przez standardy jakości gleby i ziemi dla grupy B (zgodnie z wytycznymi projektu rekultywacyjnego dla dołu urobkowego Graby-59).

Ocena toksykologiczna gleby z dołu urobkowego Graby-59 po kolejnych etapach oczyszczania

Do badań toksyczności gleby/odpadu podczas procesów biodegradacyjnych zanieczyszczeń ropopochodnych na terenie dołu urobkowego Graby-59 zastosowano test fazy stałej *Microtox*[®] SPT, w którym wykorzystuje się bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*, posiadające bezpośredni kontakt z badaną glebą. Test wykonywano według standardowej procedury producenta (SDI) z użyciem analizatora DeltaTox. Wyniki uzyskano przy pomocy programu producenta, podając wartość EC₅₀, czyli stężenie badanej próbki, które powoduje powstanie 50-procentowej reakcji testowej – przeżyciowej (E). Wartość toksyczności wyrażono w stopniach toksyczności (TU). Stopień toksyczności próbek gleby surowej z wyodrębnionych obszarów dołu urobkowego Graby-59 zawierał się w zakresie: 61,4÷79,5 – co wskazuje na własności toksyczne badanych próbek gleby surowej.

Zmiany toksyczności gleby z terenu dołu urobkowego Graby-59 podczas procesu bioremediacyjnego przykładowo zilustrowano dla

obszaru A, charakteryzującego się najwyższym poziomem zanieczyszczenia substancjami ropopochodnymi (rysunek 7).



Rys. 7. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na stopień toksyczności (TU) gleby podczas bioremediacji w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* terenu dołu urobkowego Graby-59 (obszar A) – test *Microtox*[®] SPT, liczba powtórzeń $n = 6$

Obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) w wyniku przeprowadzonej remediacji wstępnej umożliwiło zmniejszenie toksyczności do poziomu TU = 42,7.

W drugim roku oczyszczania, po przeprowadzeniu zabiegu bioremediacji podstawowej, stopień toksyczności uległ obniżeniu do poziomu TU = 24,8. W początkowej fazie inokulacji biopreparatem GR-59-1, pomimo znacznego obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH = 29 147 mg/kg s.m.), odnotowano wzrost toksyczności do poziomu TU = 29,1. Stwierdzona toksyczność pochodzi od pośrednich metabolitów powstałych w trakcie prowadzonego procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych. W końcowym okresie zabiegu inokulacji biopreparatem GR-59-1 osiągnięto znaczne obniżenie stopnia toksyczności, gdyż kształtował się on na poziomie TU = 10,1.

W trzecim roku oczyszczania proces bioremediacji podstawowej przyczynił się do obniżenia stopnia toksyczności (TU) do poziomu 8,5 przy TPH = 6571 mg/kg s.m.

Wprowadzenie inokulacji biopreparatem GR-59-2 w początkowej fazie przyczyniło się do nieznacznego wzrostu toksyczności, następnie stwierdzono obniżenie jej poziomu do TU = 5,8. Natomiast po zakończeniu procesu oczyszczania gleby i ziemi na terenie dołu urobkowego Graby-59 w badanych próbkach nie zaobserwowano obecności związków toksycznych, które wpływałyby negatywnie na bakterie testowe – brak więc możliwości wyznaczenia EC₅₀. Wprowadzone do składu biopreparatu GR-59-2 grzyby strzępkowe oraz drożdże odegrały znaczącą rolę w usuwaniu węglowodorów poprzez wytwarzanie produktów pośrednich, często o zmniejszonej toksyczności i zwiększonej podatności na rozkład z udziałem bakterii.

Podsumowanie

W artykule przedstawiono etapowe oczyszczanie odpadu wiertniczego zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi, zdeponowanego w starym dole urobkowym Graby-59. Odpad wiertniczy na podstawie badań fizykochemicznych, analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropopochodnych i analiz mineralogicznych oraz przeglądu archiwalnych danych z wierceń został zakwalifikowany do grupy odpadów o kodzie ex 17 05 03* „gleba i ziemia zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi”. Umożliwiło to uzyskanie decyzji zezwalającej na odzysk i unieszkodliwianie zanieczyszczeń ropopochodnych metodą *in-situ* na danym dole urobkowym.

Wykonane analizy chromatograficzne zanieczyszczeń ropopochodnych w próbkach gleby pobranych z poszczególnych obszarów z różnych głębokości po zakończeniu rekultywacji wykazały, że podczas procesu oczyszczania terenu dołu urobkowego Graby-59 uzyskano obniżenie zawartości zanieczyszczeń węglowodorowych do poziomu określonego obowiązującymi standardami glebowymi (*Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości ziemi*, Dz.U. z 2002 r. nr 165, poz. 1359).

Po przedstawieniu wymaganych dokumentów do Starostwa Brzozowskiego i odbiorze komisyjnym prac rekultywacyjnych uzyskano decyzję (Znak GNN.6122.26.2013 z dnia 19.11.2013 r.) o zakończeniu rekultywacji terenu dołu urob-

kowego Graby-59, wydaną przez Starostę Brzozowskiego.

Weryfikacja opracowanej technologii etapowego oczyszczania odpadów zgromadzonych w starych dołach urobkowych z zanieczyszczeń ropopochodnych w warunkach przemysłowych potwierdziła jej użyteczność i przydatność oraz skuteczność bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych występujących w odpadach wiertniczych/glebie w wysokich stężeniach.

Prezentowana etapowa technologia oczyszczania odpadów wiertniczych z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą *in-situ* została opatentowana (patent nr 205003, udzielony 31.03.2010 r.). Należy ona do nowych, prostych, bezpiecznych i uzasadnionych ekonomicznie do zastosowania w warunkach kopalnianych metod usuwania i ograniczenia ujemnego wpływu zanieczyszczeń ropopochodnych na środowisko.

Istotnym wkładem naukowym opracowanej technologii etapowego oczyszczania odpadów wiertniczych – charakteryzujących się wysokim stopniem skażenia węglowodorami ropopochodnymi, zdeponowanych w starych dołach urobkowych – jest interdyscyplinarne podejście do zagadnienia, które obejmuje problematykę z wielu dziedzin nauki: wiertnictwa, inżynierii środowiska, analityki chemicznej, mikrobiologii, ekotoksykologii oraz obowiązujących przepisów administracyjno-prawnych.

Prosimy cytować jako: Nafta-Gaz 2014, nr 6, s. 351–364

Literatura

- [1] Adams R. H., Kanga-Leyva K., Guzman-Osorio F. J., Escalante-Espinoza E.: *Comparison of moisture management*

methods for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. Afr. J. Biotech. 2011, vol. 10, pp. 394–404.

- [2] Araujo C. V., Oliveira C. A., Strotmann U. J., de Silva E. M.: *The use Microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camacari (BA, Brazil)*. Chemosphere 2005, vol. 58, pp. 1277–1281.
- [3] Arvanitis N., Kitifas E. A., Chalkou K. I., Meintonis Ch., Karagouni A. D.: *A refinery sludge deposition site: presence of nahH and alkJ genes and crude oil biodegradation ability of bacterial isolates*. Biotechnol Lett. 2008, vol. 30, pp. 2105–2110.
- [4] Bacosa H., Suto K., Inoue Ch.: *Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium*. Int. Biodeter. Biodegrad. 2010, vol. 64, pp. 702–710.
- [5] Brito E. M. S., Duran R., Guyoneaud R., Goni-Urriza M., Garcia de Oteyza T., Crapez M. A. C., Aleluia I., Waserman J. C. A.: *A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil)*. Mar. Pollut. Bulletin 2009, vol. 58, pp. 418–423.
- [6] Choi Y. K., Zylstra G. J., Kim E.: *Benzoate catabolite repression of the phthalate degradation pathway in Rhodococcus sp. Strain DK17*. App. Environ. Microbiol. 2007, vol. 73, pp. 1730–1734.
- [7] Cyplik P., Schmidt M., Szulc A., Marecik R., Lisiecki P., Hejpeper H. J., Owsianiak M., Vainshtein M., Chrzanowski L.: *Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions*. Bioresour. Technol. 2001, vol. 102, pp. 4347–4352.
- [8] Desai Ch., Pathak H., Madamwar D.: *Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites*. Bioresour. Technol. 2010, vol. 101, pp. 1558–1569.
- [9] Gallego J. R., Sierra C., Villa R., Pelaez A. I., Sanchez J.: *Weathering processes only partially limit the potential for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils*. Org. Geochem., 2010, vol. 41, pp. 896–900.
- [10] Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M., Kaczorek E.: *Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych*. Nafta-Gaz 2010, nr 11, s. 1049–1027.
- [11] Hamamura N., Olson S. H., Ward D. M., Inskip W. P.: *Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils*. App. Environ. Microbiol. 2006, vol. 72, pp. 6316–6324.
- [12] Husaini A., Roslan H. A., Hii K. S. Y., Ang C. H.: *Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites*. W. J. Microb. Biotechnol. 2008, vol. 24, pp. 2789–2797.
- [13] Jakubowicz P., Steliga T., Kluk D.: *Ocena zmian toksyczności ostrej wod złożowych z wykorzystaniem testów ekotoksykologicznych*. Nafta-Gaz 2013, nr 5, s. 409–417.
- [14] Kao C. M., Chen C. Y., Chen S. C., Chien H. Y., Chen Y. L.: *Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation*. Chemosphere 2008, vol. 70, pp. 1492–1499.
- [15] Komilis D. P., Vrohidou A-E. K., Voudrias E. A.: *Kinetics of aerobic bioremediation of a diesel-contaminated sandy soil: Effect of nitrogen addition*. Water Air Soil Pollut., 2010, vol. 218, pp. 193–208.
- [16] Li X., Lin X., Li P., Liu W., Wang L., Ma F., Chukwuka K. S.: *Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil by microbial consortium during incubation*. J. Hazard. Mater 2009, vol. 172, pp. 601–605.
- [17] Luan T. G., Yu K. S. H., Zhong Y., Zhou H. W., Lan C. Y., Tam N. F. Y.: *Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments*. Chemosphere 2006, vol. 65, pp. 2289–2296.
- [18] Mahanty B., Pakshirajan K., Dasu V. V.: *Batch biodegradation of PAHs in mixture by Mycobacterium frederiksbergense: analysis of main and interaction effects*. Clean Technol. Environ. Policy 2010, vol. 12, pp. 441–447.
- [19] Mao D., Lookman R., van de Weghe H., Weltens, R., Vanermen G., de Brucker N., Diels L.: *Estimation of ecotoxicity of petroleum hydrocarbon mixtures in soil based on HPLC-GC/MS analysis*. Chemosphere 2009, vol. 77, pp. 1508–1513.
- [20] Marquez-Rocha F. J., Hernandez-Rodriguez V., Lamela M. T.: *Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium*. Water, Air and Soil Pollut. 2001, vol. 128, pp. 313–320.
- [21] Mishra S., Jyot J., Kuhad R. C., Lal B.: *In situ bioremediation potential of oily sludge degrading bacterial consortium*. Current Microbiology 2001, vol. 43, pp. 328–315.
- [22] Pearson A., Kraunz K. S., Sessions A. L., Dekas A. E., Leavitt W. D., Edwards K. J.: *Quantifying microbial utilization petroleum hydrocarbons in salt marsh sediments by using the ¹³C content of bacterial rRNA*. App. Environ. Microb. 2008, vol. 74, pp. 1157–1166.
- [23] Phillips T. M., Liu D., Seech A. G., Lee H., Trevors J. T.: *Bioremediation in Field Box Plots of a Soil Contaminated With Wood-Preservatives: A Comparison of Treatment Conditions Using Toxicity Testing as a Monitoring Technique*. Water, Air and Soil Pollut. 2000, vol. 121, pp. 173–187.
- [24] Robak M., Boruckowski T., Drozd W., Lazar Z., Baranowska M., Prządło D., Steininger Z.: *Zastosowanie drożdży Yarrowia lipolytica do bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem krezotowym*. Ochrona Srodowiska 2011, vol. 33, pp. 27–33.
- [25] Roling W. F. M., Couto de Brito I. R., Swannell R. P. J., Head I. M.: *Response of Archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation*. Appl. Environ. Microbiol. 2004, vol. 70, pp. 2614–2620.
- [26] Rosa A. P., Triguís J. A.: *Bioremediation process on Brazil shoreline*. Environ. Sci. Pollut. Res. 2007, vol. 14, pp. 470–476.
- [27] Saponaro S., Bonomo L., Petruzzelli G., Romele L., Barbafieri M.: *Polycyclic aromatic hydrocarbons slurry phase bioremediation of a manufacturing gas (MGP) aged soil*. Water, Air and Soil Pollut. 2002, vol. 135, pp. 219–235.
- [28] Sasek W., Cajtham T., Bhatt M.: *Use of fungal technology in soil remediation: A case study*. Water, Air and Soil Pollut. 2003, vol. 3, pp. 5–14.
- [29] Simarro R., Gonzalez N., Bautisa L. F., Sanz R., Molina M. C.: *Optimisation of key abiotic factors of PAH (Naphthalene, Phenanthrene and Anthracene) biodegradation process by a bacterial consortium*. Water, Air and Soil Pollut. 2011, vol. 217, pp. 365–374.
- [30] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons*. Bioresour. Technol. 2012, vol. 125, pp. 1–10.
- [31] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Effectiveness of bioremediation processes of hydrocarbon pollutants in weathered drill wastes*. Water, Air and Soil. Pollut. 2009, vol. 1–4, pp. 211–228.
- [32] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Optimisation research of Petroleum hydrocarbons biodegradation in weathered drilling wastes from waste pits*. Was. Managem. Res. 2009, vol. 12, pp. 1065–1075.
- [33] Steliga T.: *Bioremediacja odpadów wiertniczych zanieczysz-*

- czonych substancjami ropopochodnymi ze starych dolow urobkowych. Prace INiG nr 163, 2009, s. 1–331.
- [34] Steliga T.: *Optymalizacja procesu biodegradacji zanieczyszczen ropopochodnych w zestarzalych odpadach z dolow urobkowych*. Gospodarka Surowcami Mineralnymi, PAN 2008, vol. 24, s. 87–111.
- [35] Steliga T.: *Role of fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbons in drill wastes from oldwaste pits*. Pol. J. Environ. Stud. 2012, vol. 5, pp. 273–283.
- [36] Steliga T.: *The use of biotests in estimation of bioremediation processes in weathered drilling wastes*. Arch. Environ. Protec. 2011, vol. 2, pp. 61–70.
- [37] Talley J. W., Ghosh U., Tucker S. G., Luthy R. G.: *Particle-scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment*. Environ. Sci. Technol. 2002, vol. 36, pp. 477–483.
- [38] Tang J., Alexander M.: *Mild extractability and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Environ. Toxicol. Chem. 1999, vol. 18, pp. 2711–1714.
- [39] Thorsen W. A., Copo W. G., Shea D.: *Bioavailability of PAHs: effect of soot carbon and PAH source*. Environ. Sci. Technol. 2004, vol. 38, pp. 2029–2037.
- [40] Uytendroek M., Spoden A., Ortega-Calvo J. J., Wouters K., Wattiau P., Bastiaens L., Springael D.: *Differential responses of eubacterial, Mycobacterium and Sphingomonas communities in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) – contaminated soil to Artificially induced changes in PAH profile*. J. Environ. Qual. 2007, vol. 36, pp. 1403–1411.
- [41] 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. 2003, vol. 3, pp. 73–79.
- [42] Wright A. L., Weaver R. W.: *Fertilization and bioaugmentation for oil biodegradation in salt march Mesocosms*. Water, Air and Soil Pollut. 2004, vol. 156, pp. 229–240.
- [43] 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. 2004, vol. 33, pp. 1210–1216.
- [44] Yassin A. F., Schaal K. P.: *Reclassification of Nocardia corynebacterioides Serrano et al., 1972 (Approved Lists 1980) as Rhodococcus corynebacterioides comb. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005, vol. 55, pp. 1345–1348.
- [45] Yerushaimi L., Sarrazin M., Peisajovich A., Leclair G.: *Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil*. Bioremed. J. 2003, vol. 1, pp. 37–51.



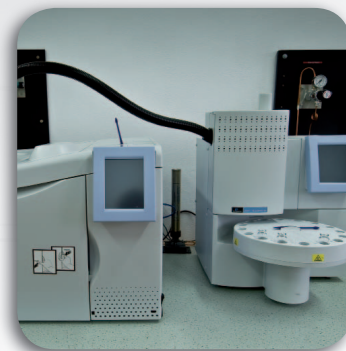
Prof. nzw. dr hab. inż. Teresa STELIGA
Kierownik Zakładu Technologii Eksploatacji
Płynów Złożowych.
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25A
31-503 Kraków
E-mail: teresa.steliga@inig.pl

OFERTA

ZAKŁAD TECHNOLOGII EKSPLOATACJI PŁYNÓW ZŁOŻOWYCH

Zakres działania:

- optymalizacja procesów wydobycia i przygotowania do transportu ropy i gazu;
- bioremediacja gruntów, odpadów wiertniczych i eksploatacyjnych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi;
- rekultywacja terenów skażonych substancjami ropopochodnymi;
- opracowanie technologii oczyszczania ścieków eksploatacyjnych i wód złożowych z zanieczyszczeń ropopochodnych;
- badania i dobór inhibitorów parafinowo-hydratowych oraz deemulgatorów stosowanych w procesach eksploatacji złóż węglowodorów;
- monitorowanie zmian zawartości związków siarki w podziemnych magazynach gazu i opracowanie koncepcji działań zapobiegających powstawaniu siarkowodoru w złożu;
- monitorowanie jakości gazu w sieciach przesyłowych;
- wykonywanie kart katalogowych oraz opracowanie opinii bezpieczeństwa użytkowania środków chemicznych stosowanych podczas zabiegów intensyfikacyjnych i eksploatacyjnych w warunkach otworowych;
- analizy płynów złożowych, zanieczyszczeń gleby i ścieków, odpadów wiertniczych i eksploatacyjnych.



Kierownik: prof. dr hab. inż. Teresa Steliga
Adres: ul. Armii Krajowej 3, 38-400 Krosno
Telefon: 13 436 60 29, 13 436-89-41 w. 5227
Faks: 13 436-79-71
E-mail: teresa.steliga@inig.pl

