

Badania laboratoryjne wpływu dodatku γ -PGA na efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych

Laboratory studies of the influence of the γ -PGA additive on the efficiency of biodegradation of petroleum hydrocarbons

Katarzyna Wojtowicz¹, Teresa Steliga¹, Tomasz Skalski²

¹ Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

² Politechnika Śląska, Centrum Biotechnologii

STRESZCZENIE: W artykule przedstawiono zagadnienia związane z biodegradacją węglowodorów ropopochodnych (TPH – suma węglowodorów ropopochodnych, BTEX – węglowodory monoaromatyczne, WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) w glebie na drodze inokulacji biopreparatem opracowanym na bazie autochtonicznych szczepów bakteryjnych oraz mieszaninami biopreparatu z roztworem γ -PGA. Badania biodegradacji prowadzono w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem zestawu Oxi-Top. Materiał badawczy stanowiła gleba pobrana z terenu dołu urobkowego charakteryzująca się wysokim stężeniem węglowodorów ropopochodnych. W badaniach biodegradacji zastosowano cztery sposoby inokulacji: wariant A (biopreparat), wariant B (biopreparat i roztwór γ -PGA w stosunku objętościowym 2 : 1), wariant C (biopreparat i roztwór γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1) oraz wariant D (biopreparat i roztwór γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 2). Efektywność biodegradacji oceniono na podstawie przeprowadzonych badań respirometrycznych oraz analiz chromatograficznych. Wartości aktywności mikrobiologicznej w próbkach gleby inokulowanych biopreparatem oraz roztworem γ -PGA po 60 dniach testu wynosiły 2040 mg O₂/dm³ (wariant B), 3769 mg O₂/dm³ (wariant C) i 5127 mg O₂/dm³ (wariant D), natomiast w próbce inokulowanej samym biopreparatem (wariant A) oznaczono 1582 mg O₂/dm³. Wykonane analizy chromatograficzne wykazały, że stopień biodegradacji TPH po zakończeniu testu wynosił 36,78%, podczas gdy dodanie γ -PGA do biopreparatu spowodowało obniżenie zawartości TPH o 39,73% (wariant B), 42,37% (wariant C) oraz 44,34% (wariant D). Stopień biodegradacji BTEX w glebach inokulowanych biopreparatem z dodatkiem γ -PGA wynosił od 47,11% do 51,00%, natomiast bez dodatku γ -PGA 44,53%. Z kolei inokulacja gleby biopreparatem z dodatkiem γ -PGA spowodowała obniżenie zawartości WWA w badanej glebie o 32,18% (wariant B), 37,40% (wariant C), 39,62% (wariant D), a samym biopreparatem – o 29,40% (wariant A). Przeprowadzone badania laboratoryjne wykazały, że γ -PGA wpływa korzystnie na efektywność procesu biodegradacji substancji ropopochodnych takich jak węglowodory alifatyczne, węglowodory monoaromatyczne oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

Słowa kluczowe: biodegradacja, węglowodory ropopochodne, biopreparat, γ -PGA.

ABSTRACT: The article presents issues related to the biodegradation of petroleum hydrocarbons (TPH – total petroleum hydrocarbons, BTEX – monoaromatic hydrocarbons, PAH – polycyclic aromatic hydrocarbon) in soil by inoculation with a biopreparation based on autochthonous bacterial strains and mixtures of biopreparation with γ -PGA solution. The biodegradation tests were carried out in laboratory conditions with the use of the Oxi-Top kit. The test material was soil collected from the mining pit, characterized by high concentrations of petroleum hydrocarbons. In the biodegradation tests, four inoculation variants were applied: variant A (biopreparation), variant B (biopreparation and γ -PGA solution in a 2 : 1 volume ratio), variant C (biopreparation and γ -PGA solution in a 1 : 1 volume ratio) and variant D (biopreparation and γ -PGA solution in a 1 : 2 volume ratio). The biodegradation efficiency was assessed on the basis of respirometric tests and chromatographic analyzes. The values of microbial activity in soil samples inoculated with the biopreparation and the γ -PGA solution after 60 days of the test were 2,040 mg O₂/dm³ (variant B), 3,769 mg O₂/dm³ (variant C) and 5,127 mg O₂/dm³ (variant D), while in the sample inoculated with the biopreparation alone 1,582 mg O₂/dm³ variant A. The chromatographic analyzes carried out showed that the degree of TPH biodegradation after the end of the test was 36.78%, while the addition of γ -PGA to the biopreparation reduced the TPH content by 39.73% (variant B), 42.37% (variant C) and 44.34% (variant D). The degree of BTEX biodegradation in soils inoculated with the biopreparation with the addition of γ -PGA ranged from 47.11 to 51.00%, while in the variant without the addition of γ -PGA it was 44.53%. In turn, soil inoculation with the biopreparation with the addition of γ -PGA reduced the PAH content in the tested soil by 32.18% (variant B), 37.40% (variant C), 39.62% (variant D), and the biopreparation itself

Autor do korespondencji: K. Wojtowicz, e-mail: katarzyna.wojtowicz@inig.pl

Artykuł nadesłano do Redakcji: 31.01.2022 r. Zatwierdzono do druku: 26.07.2022 r.

by 29.40% (variant A). Laboratory tests have shown that γ -PGA positively affects the efficiency of biodegradation process of petroleum substances such as aliphatic hydrocarbons, monoaromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons.

Key words: biodegradation, petroleum hydrocarbons, biopreparation, γ -PGA.

Wprowadzenie

Środowisko glebowe jest stale narażone na skażenie substancjami organicznymi, do którego najczęściej dochodzi w wyniku punktowych rozlewów lub wycieków substancji niebezpiecznych bądź na skutek emisji zanieczyszczeń z takich źródeł jak: środki transportu, zakłady przemysłowe, składowiska odpadów przemysłowych lub komunalnych. Do najważniejszych zanieczyszczeń gleby zalicza się: węglowodory alifatyczne, węglowodory aromatyczne (BTEX, WWA), polichlorowane bifenyle (PCB), środki ochrony roślin i metale ciężkie. Istotnym problemem pojawiającym się w przypadku skażenia gruntów tego rodzaju ksenobiotykami są ich właściwości toksyczne, mutagenne oraz kancerogenne wobec organizmów żywych. W związku z powyższym niezwykle istotne stało się opracowanie skutecznych metod remediacji gruntów (Kluk i Steliga, 2017). W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem cieszą się metody remediacji gruntów spełniające założenia tzw. zielonej chemii. Jedną z takich metod jest bioremediacja.

Biodegradacja węglowodorów ropopochodnych to złożony proces, który zależy od charakteru i ilości obecnych węglowodorów. Węglowodory ropopochodne można podzielić na cztery klasy: węglowodory nasycone, węglowodory aromatyczne, asfalteny (fenole, kwasy tłuszczowe, ketony, estry i porfiryny) oraz żywice (pirydyny, chinoliny, karbazole, sulfotlenki i amidy) (Cooney et al., 1985; Barathi i Vasudevan, 2001; Das i Chandran, 2011). Węglowodory różnią się podatnością na atak drobnoustrojów. Podatność węglowodorów na degradację mikrobiologiczną można ogólnie uszeregować następująco: alkany liniowe > alkany rozgałęzione > węglowodory monoaromatyczne (BTEX) > alkany cykliczne > wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) (Das i Chandran, 2011). W warunkach naturalnych proces rozkładu związków ropopochodnych (samooczyszczanie) zachodzi stosunkowo powoli, dlatego obecnie coraz częściej prowadzi się badania nad przyspieszeniem procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych na drodze procesów biotechnologicznych przy wykorzystaniu odpowiednio wyselekcjonowanych mikroorganizmów (bioaugmentacja) oraz zapewnieniu optymalnych warunków wzrostu drobnoustrojów (biostymulacja) (Radwan et al., 2012).

Mikroorganizmy używane w procesie biologicznej degradacji zanieczyszczeń ropopochodnych powinny charakteryzować się takimi właściwościami jak: tolerancja na ksenobiotyki,

zdolność do produkcji surfaktantów, która zwiększa biodostępność zanieczyszczeń ropopochodnych, chemotaksja wobec ksenobiotyku, degradacja zanieczyszczeń bez wytwarzania lub z minimalnym wytwarzaniem toksycznych produktów pośrednich oraz możliwością przetrwania do zakończenia procesu oczyszczania (Al-Hawash et al., 2018). Ponadto na metabolizm rozkładu węglowodorów przez mikroorganizmy istotny wpływ mają czynniki związane z zanieczyszczeniem (stężenie ksenobiotyku, wiek zanieczyszczenia, właściwości fizyczno-chemiczne ksenobiotyku, symetria i wielkość cząsteczek) oraz czynniki środowiskowe (temperatura, odczyn, obecność tlenu, natlenianie, wilgotność, obecność nutrientów, właściwości matrycy glebowej) (Chaîneau et al., 2003; Kluk i Steliga, 2017). W celu zwiększenia efektywności procesu biodegradacji substancji ropopochodnych w zabiegu inokulacji stosuje się mieszaniny wieloskładnikowe (konsorcja) zawierające od kilku do kilkudziesięciu szczepów bakterii i grzybów o szerokim spektrum działania (degradacja różnych grup węglowodorów, np. n-alkanów, BTEX, WWA). Wchodzące w skład biopreparatów mikroorganizmy powinny być specjalnie wyselekcjonowane ze środowiska naturalnego, co wpływa na znaczną poprawę skuteczności procesu likwidacji skażeń (Mrozik i Piotrowska-Seget, 2010; Varjani, 2017) oraz pozwala na uniknięcie antagonistycznych oddziaływań autochtonicznej mikrobioty gleby na obce kultury drobnoustrojów.

W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na możliwość doskonalenia procesu biodegradacji poprzez wykorzystanie różnego rodzaju dodatków do biopreparatów. Jednym z takich dodatków może się okazać kwas gamma-poliglutaminowy (γ -PGA). Kwas poli- γ -glutaminowy jest produktem bakterii oraz archeonów, a zdolność do jego wytwarzania mają tylko nieliczne gatunki z rodzaju *Bacillus* (*Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, a także wysoce patogenny organizm – *Bacillus anthracis*) (Chatterjee et al., 2019; Wang et al., 2021). Poszczególne gatunki, a nawet szczepy wytwarzają γ -PGA o różnej masie cząsteczkowej – od 100 kD do 5000 kD (Park et al., 2005; Najar i Das, 2015), co przekłada się na jego właściwości fizyczne. W zależności od środowiska, w jakim się znajduje, γ -PGA może zmieniać swoje właściwości, co przyciągnęło uwagę szeregu badaczy pod kątem przemysłowego zastosowania tego biopolimeru. Udokumentowano korzystne wyniki zastosowania γ -PGA do remediacji gleb skażonych metalami ciężkimi (Pang

et al., 2018; Yang et al., 2018; Peng et al., 2020) oraz udowodniono pozytywny wpływ γ -PGA na usuwanie ropy naftowej z osadów morskich (Zhao et al., 2018) i trichloroetenu (TCE) z warstwy wodonośnej (Luo et al., 2019). Ponadto związek ten ma bardzo wiele zalet: jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, nietoksyczny dla organizmów żywych (nawet w bardzo wysokich stężeniach) oraz biodegradowalny. Dlatego postanowiliśmy sprawdzić doświadczalnie, czy obecność γ -PGA wspomaga rozkład substancji ropopochodnych (TPH, BTEX, WWA) w glebach inokulowanych biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów bakteryjnych.

Materiał badawczy

W badaniach biodegradacji substancji ropopochodnych wykorzystano glebę, która została pobrana z terenu dołu urobkowego na obszarze kopalni ropy naftowej zlokalizowanej w południowo-wschodniej Polsce (Grabownica Starzeńska). Gleba ta charakteryzowała się wysokim stężeniem zanieczyszczeń ropopochodnych, tj. węglowodorów alifatycznych, węglowodorów monoaromatycznych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Skład fizyczno-chemiczny gleby użytej w badaniach biodegradacji przedstawiono w tabeli 1.

Biopreparat zastosowany w badaniach biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych opracowano na bazie szczepów bakteryjnych wyizolowanych ze środowisk

poddanych ekspozycji na węglowodory: *Dietzia* sp. IN133, *Gordonia* sp. IN138, *Mycolicibacterium frederiksbergense* IN53, *Rhodococcus erythropolis* IN119, *Rhodococcus* sp. IN136 i *Pseudomonas* sp. IN132. Mikroorganizmy wykorzystane do sporządzenia biopreparatu pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii INiG – PIB. Użyte w biopreparacie szczepy bakteryjne charakteryzowały się zdolnością do metabolizowania zanieczyszczeń ropopochodnych (Brzeszcz et al., 2020; Steliga et al., 2020).

Jako dodatek γ -PGA zastosowano dostępny na rynku preparat Ambigel® (Ambioteco, Polska) zawierający 10% (w/w) czystego kwasu poli- γ -glutaminowego. W procesie jego produkcji wykorzystano szczep *Bacillus licheniformis* NCBI 1402. Identyfikacja drobnoustrojów wykorzystywanych na etapie produkcji preparatu Ambigel została wykonana metodą spektrometrii masowej z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI TOF MS). Badanie wykonano przy użyciu analizatora MALDI Biotyper firmy Bruker, które potwierdziły, że *Bacillus licheniformis* NCBI 1402 wytwarza kwas poli- γ -glutaminowy (γ -PGA).

Metodyka badawcza

Badania laboratoryjne procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych (TPH, BTEX i WWA) obejmowały

Tabela 1. Skład fizyczno-chemiczny gleby pobranej z terenu dołu urobkowego

Table 1. Physical and chemical composition of the soil collected from the area of the excavated pit

Oznaczenie	Jednostka	Wartość
pH ekstraktu wodnego gleby 1 : 10	[pH]	6,11
Wilgotność	[%]	32,6
BTEX (p-, m-ksylen)	[mg/kg s.m.]	17,45
Sumaryczna zawartość TPH	[mg/kg s.m.]	19 774,23
Sumaryczna zawartość WWA	[mg/kg s.m.]	27,41
Krezole	[mg/kg s.m.]	2,74
Fenole	[mg/kg s.m.]	3,62
2,4-dimetylofenol	[mg/kg s.m.]	0,63
3,4-dimetylofenol	[mg/kg s.m.]	3,01
Cyjanki	[mg/kg s.m.]	0,17
Bifenyle	[mg/kg s.m.]	8 956,26
Zawartość jonów Cl ⁻	[mg/kg s.m.]	119,4
Zawartość jonów SO ₄ ²⁻	[mg/kg s.m.]	916,4
Zawartość jonów NH ₄ ⁺	[mg/kg s.m.]	5,3
Zawartość jonów NO ₃ ⁻	[mg/kg s.m.]	35,9
Zawartość jonów PO ₄ ³⁻	[mg/kg s.m.]	12,4
Zawartość jonów S ₂ ⁻	[mg/kg s.m.]	9,98
Zawartość SiO ₂	[mg/kg s.m.]	575 965

Oznaczenie	Jednostka	Wartość	
Zawartość Al ₂ O ₃	[mg/kg s.m.]	911 023	
Zawartość Fe ₂ O ₃	[mg/kg s.m.]	5 361	
Zawartość CaO	[mg/kg s.m.]	7 024	
Zawartość MgO	[mg/kg s.m.]	3 512	
Zawartość Mn	[mg/kg s.m.]	145,1	
Zawartość metali ciężkich	As	[mg/kg s.m.]	1,3
	Ba	[mg/kg s.m.]	31,9
	Cd	[mg/kg s.m.]	1,6
	Cr	[mg/kg s.m.]	13,1
	Co	[mg/kg s.m.]	3,6
	Cu	[mg/kg s.m.]	19,8
	Hg	[mg/kg s.m.]	0,9
	Pb	[mg/kg s.m.]	19,6
	Mo	[mg/kg s.m.]	2,3
	Sn	[mg/kg s.m.]	4,7
	Zn	[mg/kg s.m.]	45,1
Ni	[mg/kg s.m.]	13,3	

tzw. testy butelkowe, które prowadzono z wykorzystaniem zestawu Oxi-Top (WTW, Polska). Badania te realizowano na identycznych próbkach gleby skażonej TPH, BTEX i WWA w ściśle określonych warunkach prowadzenia procesu. Inokulację gleby wykonano z wykorzystaniem:

- biopreparatu (wariant A);
- biopreparatu (2 cm³) i roztworu PGA (1 cm³) w stosunku objętościowym 2 : 1 (wariant B);
- biopreparatu (2 cm³) i roztworu PGA (2 cm³) w stosunku objętościowym 1 : 1 (wariant C);
- biopreparatu (2 cm³) i roztworu PGA (4 cm³) w stosunku objętościowym 1 : 2 (wariant D).

Testy butelkowe prowadzono przez okres 60 dni w temperaturze 20°C, zapewniając stałą wilgotność gleby 20% i dostęp powietrza. Badania laboratoryjne obejmowały badania respirometryczne oraz analizy chromatograficzne węglowodorów ropopochodnych przed testem oraz po jego zakończeniu. Wykonane badania laboratoryjne miały za zadanie określić wpływ dodatku polimerowego γ -PGA na efektywność procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie oraz wytypować najkorzystniejsze warunki prowadzenia procesu biodegradacji.

Badania respirometryczne

W celu wykonania pomiaru aktywności biologicznej w badanej glebie w warunkach tlenowych – analizowano próbki o masie 30 g, które umieszczono w naczyniach pomiarowych, do których dodawano biopreparat (2 cm³) przygotowany w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB oraz mieszaniny biopreparatu (2 cm³) i roztworu γ -PGA (1 cm³, 2 cm³ lub 4 cm³). Równolegle przygotowano próbki odniesienia, w których oddzielnie umieszczono analizowaną glebę oraz roztwory inokulantów. Następnie wszystkie naczynia pomiarowe szczelnie zamknięto główkami pomiarowymi, po czym umieszczono w ciepłarni i inkubowano w temperaturze 20°C przez 60 dni. Główki pomiarowe systemu Oxi-Top Control co dwie godziny odczytywały wartości ciśnienia panującego w układzie zamkniętym. Zebrane dane za pomocą interfejsu IR trafiały do kontrolera Oxi-Top OC 110, gdzie były poddawane obróbce graficznej i statystycznej za pomocą programu Achat OC (Altschul et al., 1990).

Przetwarzanie mierzonego ciśnienia na wartość zużytego tlenu (m_{O_2}) [mg/dm³] odbywa się według wzoru (1) (Steliga i Uliasz, 2014; Steliga i Wojtowicz, 2019; Wojtowicz et al., 2022). Po zakończeniu pomiaru dane przesyłano do komputera PC, gdzie za pomocą programu Excel sporządzano krzywe zależności ilości zużytego tlenu [mg/dm³] od czasu trwania eksperymentu [dni].

$$m_{O_2} = \frac{M(O_2)}{RT_m} \cdot \left(V_g + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right) \cdot \Delta p \quad (1)$$

gdzie:

$M(O_2)$ – masa molowa tlenu [kg/mol],

V_g – objętość wolnego gazu [m³],

R – stała gazowa [$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$],

T_m – wartość pomiarowa temperatury [K],

T_0 – temperatura odniesienia (273,15 K),

α – współczynnik absorpcji (0,03103),

Δp – spadek ciśnienia w próbce [Pa].

Analizy chromatograficzne

Głównym elementem umożliwiającym określenie efektywności procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w prowadzonych procesach oczyszczania było opracowanie metod chromatograficznego oznaczania badanych ksenobiotyków w glebie. Ze względu na złożony charakter matrycy glebowej konieczne było wykonanie skomplikowanego i czasochłonnego etapu przygotowania próbki do analizy chromatograficznej. Obejmował on następujące kroki:

- pobieranie i wstępne przygotowanie próbki;
- ekstrakcję analitów z matrycy;
- oczyszczanie próbki z substancji przeszkadzających;
- zagęszczanie próbki.

Analiza TPH

10 g powietrznie suchej gleby umieszczono w kolbie Erlenmeyera i ekstrahowano dichlorometanem w trzech seriach (20 ml rozpuszczalnika, 15 minut). Ekstrakcję węglowodorów ropopochodnych przeprowadzono metodą sonikacji w łaźni ultradźwiękowej Sonoswiss SW 6H, z częstotliwością ultradźwięków 30 kHz (Steliga i Uliasz, 2014; Steliga et al., 2020). Substancje polarne usunięto poprzez filtrację z wykorzystaniem kolumnienek Bakerbond z wypełnieniem Florisil nr 7213-03. Rozpuszczalnik odparowano na próżniowej wyparce obrotowej, a ekstrakt rozpuszczono w 1 ml dichlorometanu i analizowano metodą chromatografii gazowej (GC). Do określenia wydajności ekstrakcji z odzyskiem na poziomie 95,9% zastosowano standard zastępczy o-terfenyl (Steliga et al., 2012, 2020; Wojtowicz et al., 2022).

TPH analizowano z wykorzystaniem chromatografu Clarus 500 GC firmy PerkinElmer z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Warunki pracy chromatografu były następujące: kolumna kapilarna ze stopionej krzemionki (RTX-1: 30 m \times 0,53 mm) (Restek, USA), parametry temperaturowe: temperatura inżektora = 290°C, temperatura detektora FID = 320°C, program temperaturowy pieca: 30°C – przebieg izotermiczny przez 2 minuty, 30–105°C – przyrost temperatury z szybkością 10°C/min, 105–285°C – przyrost temperatury z szybkością 5°C/min, 285°C – przebieg izotermiczny przez 5 minut. Gazem nośnym był He o stałym przepływie 20 ml \cdot min⁻¹. Do oznaczenia ilościowego sumarycznej zawartości zanieczyszczeń

ropopochodnych (TPH) zastosowano zestaw standardów kalibracyjnych firmy Tusnovics Instruments (certyfikowany wzorzec: BAM K010). W celu ilościowego oznaczenia poszczególnych n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych użyto natomiast wzorców certyfikowanych firm Supelco i Restek (mieszanina wzorcowa nr D2807 węglowodorów parafinowych: n-C₆–n-C₄₄ oraz certyfikowanej mieszaniny wzorcowej nr A029668: Fuel Oil Degradation Mix n-C₁₇, pristan, n-C₁₈, fitan). Jako biomarker zastosowano wzorzec certyfikowany C₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopan (Supelco, USA) nr 08189 (Steliga et al., 2020; Wojtowicz et al., 2022).

Analiza BTEX

Do oznaczania zawartości węglowodorów monoaromatycznych (BTEX) w glebie wykorzystano metodę chromatografii gazowej do fazy nadpowierzchniowej (Headspace) (Wojtowicz, 2018). Próbkę gleby o masie 6,5 g (w przeliczeniu na suchą masę gleby około 5 g) umieszczano w ampułce, którą szczelnie zamykano za pomocą kapsłownicy i wkładano do autosamplera. Próbkę przed analizą inkubowano przez 10 minut w temperaturze 90°C. Ampułka była napełniana gazem nośnym (hel) przez 3 minuty, a następnie za pomocą igły dozującej podgrzanej do temperatury 95°C była pobierana próbka analitów gazowych zdesorbowanych do fazy nadpowierzchniowej, która przez linię transferową (temperatura 100°C) trafiała do inżektora chromatografu gazowego Clarus 500 z detektorem FID, połączony z przystawką HeadSpace TurboMatrix 16. Czas nasytowania wynosił 0,04 minuty. Warunki pracy chromatografu były następujące: kolumna kapilarna ze stopionej krzemionki (RT-TCEP: 60 m × 0,25 μm), parametry temperaturowe: temperatura inżektora = 200°C, temperatura detektora FID = 280°C, temperatura detektora TCD = 150°C, program temperaturowy pieca: 60°C – przebieg izotermiczny przez 5 minut, 60–100°C – przyrost temperatury z szybkością 5°C/min, 100°C – przebieg izotermiczny przez 10 minut. Do oznaczeń ilościowych sumarycznej zawartości BTEX zastosowano certyfikowane wzorce firm Restek nr 30051 i Supelco nr CRM48026 (Wojtowicz, 2018; Wojtowicz et al., 2022).

Analiza WWA

Izolację analitów z matrycy glebowej przeprowadzono metodą QuEChERS (z ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). W tym celu do fiolki o objętości 50 ml odważono 5 g gleby w stanie powietrznie suchym, po czym dodano do niej 5 cm³ wody destylowanej oraz 10 ml acetonitrylu. Następnie do fiolki dodano zawartość saszetki z mieszaniną ekstrakcyjną MgSO₄ + NaCl nr SST640. Tak przygotowane próbki wytrząsano przez 5 minut, a następnie wirowano przez 10 minut z prędkością 3500 obr/min (Khan, 2014; Wojtowicz et al., 2022).

Oczyszczanie ekstraktu przeprowadzono metodą dSPE z wykorzystaniem fiolek do oczyszczania wypełnionych MgSO₄ i PSA nr JO3937. Ekstrakt glebowy w objętości 1 cm³ przenoszono do fiolki do oczyszczania, którą następnie wytrząsano przez 5 minut oraz wirowano przez 10 minut z prędkością 8000 obr/min.

Otrzymane ekstrakty przesączono przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 25 μm i poddano analizie chromatograficznej (Khan, 2014; Wojtowicz et al., 2022).

Analizę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gruntu wykonano na wysokociśnieniowym chromatografie cieczowym (HPLC) serii Vanquish Core firmy Thermo Scientific przy następujących parametrach urządzenia: kolumna NUCLEODUR C₁₈ PAH, 125 × 4 mm, 3 μm firmy Macherey-Nagel, detektor: UV-VIS i fluorymetryczny (FLD), dozownik: automatyczny, dozowana objętość: 10 μl, eluenty: A-metanol 70%, B-acetonitryl, przepływ: 1,5 ml/min, gradient: 20% B przez 1,5 minuty, 20–50% B w 1,5 minuty, 50–100% B w 1 minutę, 100% B przez 1 minutę, 100–0% B w 3 minuty, 100% A przez 3 minuty. Do ilościowego oznaczenia poszczególnych WWA wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych użyto certyfikowanego roztworu PAH-Mix nr ref. 722393 (Wojtowicz et al., 2022).

Omówienie wyników

Badania respirometryczne

Wzrost aktywności mikrobiologicznej w środowisku reakcyjnym świadczy o wykorzystaniu przez mikroorganizmy węgla zawartego w cząsteczkach węglowodorów alifatycznych, węglowodorów monoaromatycznych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych jako źródła pokarmu. Wynikiem zwiększonej aktywności biologicznej jest wzrost zużycia tlenu przez badane konsorcja bakteryjne w czasie, czego konsekwencją jest biodegradacja substancji ropopochodnych. Po 60 dniach testu największe zużycie tlenu odnotowano w przypadku próbki gleby inokulowanej biopreparatem i roztworem dodatku γ-PGA w stosunku objętościowym 1 : 2 (5127 mg O₂/dm³) oraz biopreparatem i roztworem dodatku γ-PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 (3769 mg O₂/dm³). Niższą aktywność mikrobiologiczną odnotowano w przypadku próbki gleby zaszczipionej biopreparatem i roztworem dodatku γ-PGA w stosunku objętościowym 2 : 1 (2040 mg O₂/dm³). Spośród czterech testowanych wariantów najmniej skuteczny pod względem potencjału biodegradacyjnego zanieczyszczeń ropopochodnych okazał się wariant A, czyli inokulacja biopreparatem bez dodatku PGA, dla którego aktywność mikrobiologiczna po 60 dniach trwania testu wynosiła 1582 mg O₂/dm³ (Wojtowicz et al., 2022).

Wyższa aktywność mikrobiologiczna w próbkach gleby inokulowanej mieszaniną biopreparatu i roztworu dodatku PGA w różnym stosunku objętościowym aniżeli w próbce zaszczerpionej wyłącznie biopreparatem świadczy o wpływie dodatku γ -PGA na efektywność procesu biodegradacji.

Na podstawie przeprowadzonych testów respirometrycznych można wyciągnąć wnioski, że wraz ze wzrostem stężenia γ -PGA w badanych próbkach gleby wzrasta efektywność procesu biodegradacji substancji ropopochodnych. Zależność ilości zużytego tlenu od czasu w glebie rzeczywistej inokulowanej biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów bakteryjnych oraz mieszaniny biopreparatu i roztworu γ -PGA w różnym stosunku objętościowym przedstawiono na rysunku 1.

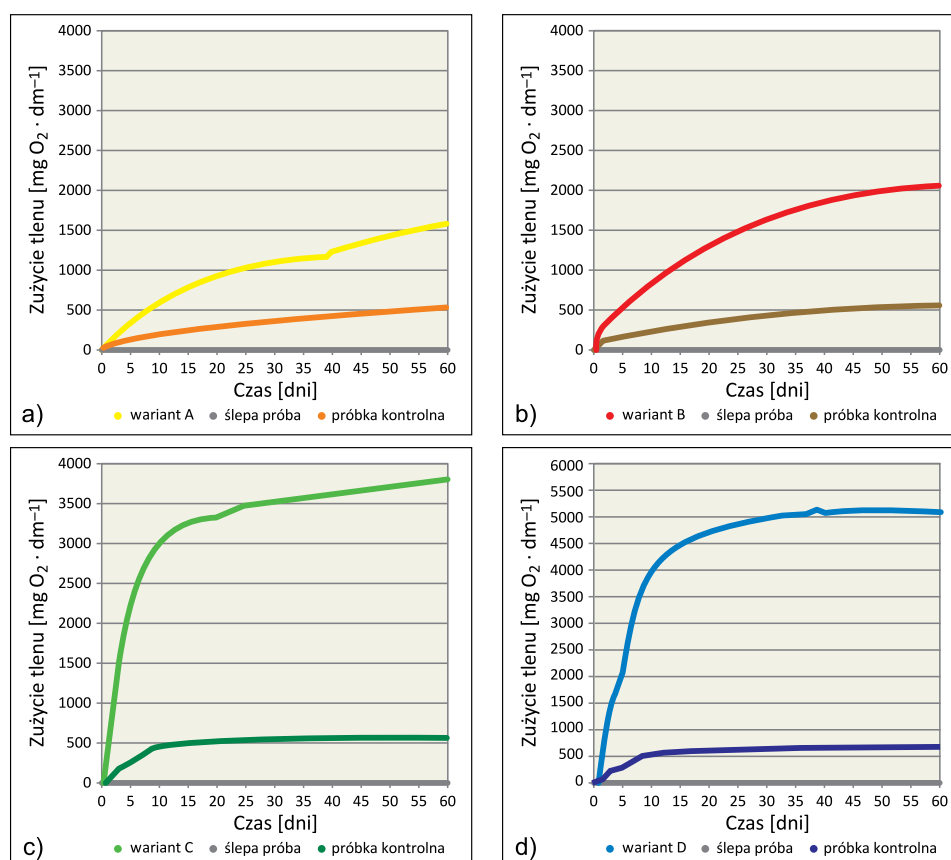
Analizy chromatograficzne

Istotnym elementem umożliwiającym ocenę efektywności procesu biodegradacji substancji ropopochodnych w glebie inokulowanej biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów bakteryjnych oraz mieszaniny biopreparatu i roztworu PGA w różnym stosunku objętościowym jest wykorzystanie

metod chromatograficznych. Analizy chromatograficzne pozwoliły na zidentyfikowanie i określenie zawartości poszczególnych zanieczyszczeń ropopochodnych w badanej glebie przed przeprowadzeniem oraz po przeprowadzeniu 60-dniowego testu biodegradacji. W badanych próbkach gleby przed testem i po jego zakończeniu oznaczono TPH, BTEX i WWA.

Analiza TPH

Oznaczenia TPH pozwoliły wykazać, że bioaugmentacja biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów bakteryjnych powodowała obniżenie zawartości TPH z 19 774,23 mg/kg s.m. do 12 501,35 mg/kg s.m. (stopień biodegradacji = 36,78%). Najwyższy stopień biodegradacji zanotowano dla szeregu alifatycznego n-C₉–n-C₂₁ – w granicach 47,88–78,90%, natomiast w przypadku węglowodorów z zakresu n-C₂₂–n-C₃₀ był on znacznie niższy i mieścił się w przedziale 21,92–41,65%. Węglowodory ciężkie o długości łańcucha węglowego n-C₃₁ do n-C₄₀ ulegały rozkładowi w najniższym stopniu, gdyż obniżenie ich zawartości w wyniku inokulacji biopreparatem wynosiło od 13,29% do 17,21%. Obniżenie zawartości węglowodorów niezidentyfikowanych



Rysunek 1. Zależność ilości zużytego tlenu [mg/dm³] od czasu w glebie rzeczywistej inokulowanej: a) biopreparatem (wariant A), b) biopreparatem i suplementowanej roztworem PGA w stosunku objętościowym 2 : 1 (wariant B), c) biopreparatem i roztworem PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 (wariant C), d) biopreparatem i roztworem PGA w stosunku objętościowym 1 : 2 (wariant D)

Figure 1. Dependence of the amount of oxygen consumed [mg/dm³] on the time in the actual soil inoculated with a) biopreparation (variant A), b) biopreparation and PGA solution in a 2 : 1 volume ratio (variant B), c) biopreparation and PGA solution in volume ratio 1 : 1 (variant C), d) biopreparation and PGA solution in a volume ratio of 1 : 2 (variant D)

(alkeny, izoparafiny, cykloparafiny itp.) kształtowało się na poziomie 31,48%, natomiast w przypadku węglowodorów z grupy izoprenoidów: pristanu i fitanu wynosiło odpowiednio 11,05% i 13,46%.

Nieznacznie wyższy stopień biodegradacji TPH uzyskano dla próbki gleby inokulowanej mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 2 : 1 – wynosił on 39,37% po 60 dniach testu. Analiza chromatograficzna wykazała, że zawartość węglowodorów niezidentyfikowanych zmalała o 33,06%.

Podobnie jak w przypadku biopreparatu najłatwiej biodegradowalne okazały się węglowodory alifatyczne o długości łańcucha węglowego n-C₉ do n-C₂₁ (51,78–84,01%), następnie n-C₂₂ do n-C₃₀ (23,81–45,04%) i n-C₃₁ do n-C₄₀ (15,78–21,62%). Stopień biodegradacji pristanu i fitanu wynosił 11,95% i 14,55%.

Zdecydowanie lepiej biodegradacja zachodziła w próbce zaszczerpionej mieszaniną biopreparatu i roztworu dodatku γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 (wariant C). Analiza chromatograficzna przed testem i po jego zakończeniu w tym przypadku wykazała obniżenie zawartości TPH z 19 774,23 mg/kg s.m. do 11 395,64 mg/kg s.m. (stopień biodegradacji = 42,37%). Stopień biodegradacji węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C₉ do n-C₂₁ w glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi w wyniku inokulacji mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 wynosił od 55,83% do 83,94%. Z kolei obniżenie zawartości węglowodorów n-C₂₂ do n-C₃₀ kształtowało się na poziomie 25,68–48,57%. Trudno biodegradowalne węglowodory, to jest zawierające powyżej 30 atomów węgla oraz węglowodory z grupy izoprenoidów, ulegały rozkładowi w znacznie mniejszym stopniu: n-C₃₁ do n-C₄₀ = 14,95–23,31%, $P = 12,89\%$, $F = 15,69\%$. Obniżenie zawartości węglowodorów niezidentyfikowanych wynosiło 36,23%.

Spośród badanych wariantów najwyższy stopień biodegradacji TPH odnotowano przy zastosowaniu inokulacji mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 2 (44,34%). Wykazano, że zawartość węglowodorów niezidentyfikowanych zmalała o 38,08%. Podobnie jak w przypadku pozostałych wariantów najwyższy stopień biodegradacji stwierdzono dla szeregu alifatycznego n-C₉–n-C₂₁ – w granicach 58,68–85,05%, nieznacznie niższy dla węglowodorów z zakresu n-C₂₂–n-C₃₀, w przypadku których wynosił od 26,99% do 51,04%, a najniższy dla węglowodorów ciężkich o długości łańcucha węglowego n-C₃₁–n-C₄₀ i izoprenoidów, których stopnie biodegradacji wynosiły odpowiednio: n-C₃₁ do n-C₄₀ = 17,88–24,50%, $P = 13,54\%$, $F = 16,49\%$. Zmiany zawartości n-alkanów w glebie inokulowanej biopreparatem oraz mieszaninami biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 2 : 1, 1 : 1 oraz 1 : 2 przedstawiono na rysunku 2.

Analiza BTEX

Analizy BTEX wykazały, że spośród badanych wariantów najwyższy stopień biodegradacji tej grupy związków odnotowano przy zastosowaniu inokulacji mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 2 (51,00%). Zawartość benzenu zmalała o 63,48%, toluenu o 65,77%, a etylobenzenu o 68,09%. Zdecydowanie gorzej biodegradowalne okazały się ksyleny, których stopień biodegradacji po 60 dniach testu kształtował się w zakresie od 43,75% (o-ksylen) do 47,93% (p-ksylen).

Nieznacznie niższy stopień biodegradacji BTEX uzyskano dla próbki gleby inokulowanej mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 – wynosił on 49,34%. Spośród wszystkich węglowodorów monoaromatycznych najłatwiej biodegradowalne okazały się toluen i etylobenzen, których stopnie biodegradacji po zakończeniu testu wynosiły odpowiednio 63,68% i 63,55%. Nieznacznie niższy stopień biodegradacji odnotowano w przypadku benzenu – 61,36%. Słabiej biodegradowalne okazały się ksyleny, dla których stopnie biodegradacji zawierały się w granicach 41,70–46,85%.

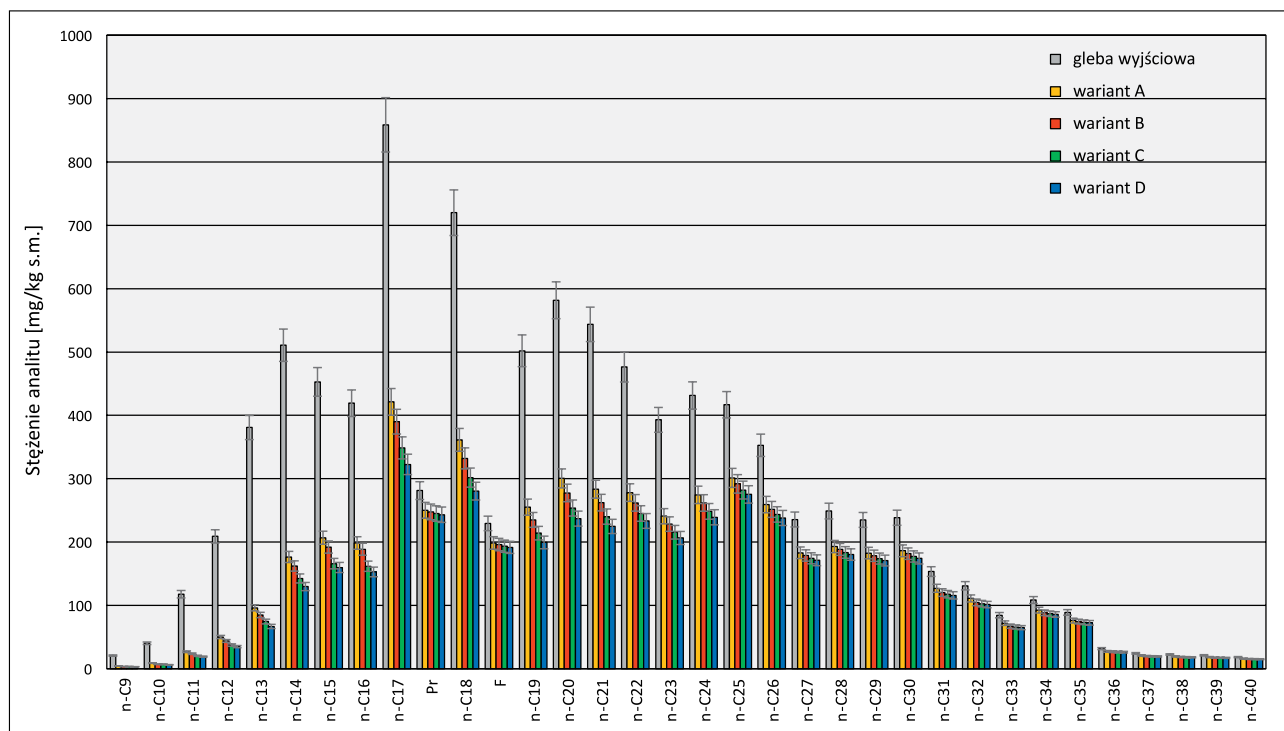
Stopnie biodegradacji benzenu, toluenu i etylobenzenu w glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi w wyniku inokulacji mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 2 : 1 wynosiły odpowiednio: 59,27%, 62,16% i 61,70%. Obniżenie zawartości ksylenów kształtowało się na poziomie 40,00–45,87%.

Otrzymane wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że biodegradacja najmniej intensywnie zachodziła w próbce inokulowanej wyłącznie biopreparatem. Stopień biodegradacji BTEX po zakończeniu testu wynosił 44,53%. Najłatwiej biodegradowalne okazały się toluen i etylobenzen, których stopnie biodegradacji wynosiły odpowiednio 60,65% i 57,70%. Najtrudniej biodegradowalny okazał się o-ksylen, którego stopień biodegradacji po 60 dniach wynosił 35,70%.

Skuteczność przebiegu biodegradacji BTEX w glebie ilustruje rysunek 3, przedstawiający zmiany zawartości BTEX w glebie przed inokulacją i po inokulacji biopreparatem oraz mieszaninami biopreparatu i roztworu γ -PGA.

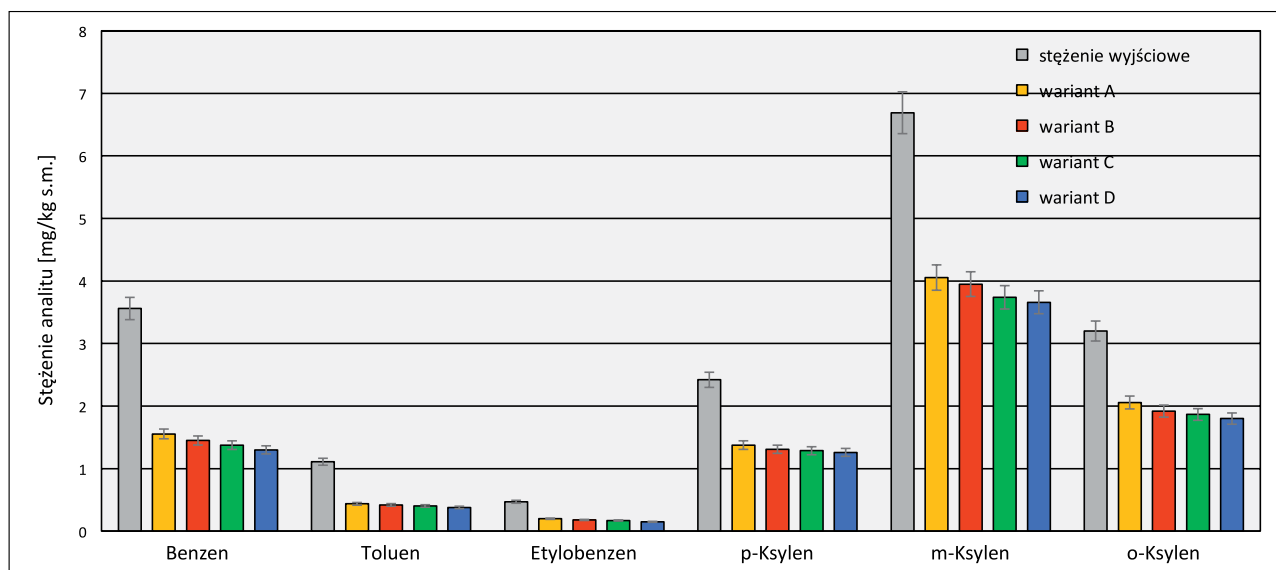
Analiza WWA

Bioaugmentacja biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów bakteryjnych powodowała obniżenie zawartości WWA z 27,37 mg/kg s.m. do 19,32 mg/kg s.m. (stopień biodegradacji = 29,40%). Najwyższy stopień biodegradacji zanotowano dla WWA 2-pierścieniowych i 3-pierścieniowych – w granicach 39,22–82,68%, natomiast w przypadku WWA 4-pierścieniowych był on znacznie niższy i mieścił się w przedziale 23,50–32,34%. 5-pierścieniowe węglowodory aromatyczne ulegały rozkładowi w najniższym stopniu, gdyż



Rysunek 2. Porównanie zawartości n-alkanów przed testami i po zakończeniu testów biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem oraz mieszaninami biopreparatu i roztworu γ -PGA

Figure 2. Comparison of the content of n-alkanes before and after biodegradation tests in the soil inoculated with biopreparation and mixtures of biopreparation and γ -PGA solution



Rysunek 3. Porównanie zawartości BTEX przed testami i po zakończeniu testów biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem oraz mieszaninami biopreparatu i roztworu γ -PGA

Figure 3. Comparison of BTEX content before and after biodegradation tests in the soil inoculated with biopreparation and mixtures of biopreparation and γ -PGA solution

obniżenie ich zawartości w wyniku inokulacji biopreparatem wynosiło od 19,31% do 21,57%. Spadek zawartości 6-pierścieniowych WWA osiągał wartość w przedziale 14,52–17,05%.

Nieznacznie wyższy stopień biodegradacji WWA uzyskano dla próbki gleby inokulowanej mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 2:1 – wynosił

on 32,18% po 60 dniach testu. Podobnie jak w przypadku biopreparatu najłatwiej biodegradowalne okazały się WWA 2-pierścieniowe i WWA 3-pierścieniowe (43,14–82,68%), następnie WWA 4-pierścieniowe (26,50–33,79%) i WWA 5-pierścieniowe (22,84–25,69%). Stopień biodegradacji najslabiej biodegradowalnych, 6-pierścieniowych węglowodorów

aromatycznych kształtował się w granicach od 16,54% do 21,15%.

Zdecydowanie lepiej biodegradacja zachodziła w próbie zaszczipionej mieszaniną biopreparatu i roztworu dodatku γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 (wariant C). W tym przypadku wykazano obniżenie zawartości WWA z 27,37 mg/kg s.m. do 17,13 mg/kg s.m. (stopień biodegradacji = 37,40%). Stopień biodegradacji 2-pierścieniowych WWA (naftalenu) w glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi w wyniku inokulacji mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1 wynosił 73,29%, z kolei obniżenie zawartości 3-pierścieniowych WWA kształtowało się na poziomie 50,55–85,53%. WWA 4-pierścieniowe, 5-pierścieniowe i 6-pierścieniowe ulegały rozkładowi w znacznie mniejszym stopniu, a ich stopnie degradacji wynosiły: od 33,27% do 37,76% (WWA 4-pierścieniowe), od 25,08% do 33,33% (WWA 5-pierścieniowe) i od 21,55% do 26,27% (WWA 6-pierścieniowe).

Spośród badanych wariantów najwyższy stopień biodegradacji WWA odnotowano w przypadku zastosowaniu inokulacji mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 2 (39,62%). Zawartość WWA 2-pierścieniowych zmalała o 75,96%, natomiast stopień biodegradacji 3-pierścieniowych węglowodorów aromatycznych kształtował się w granicach od 53,13% do 84,61%. Podobnie jak w przypadku pozostałych wariantów najniższy stopień biodegradacji

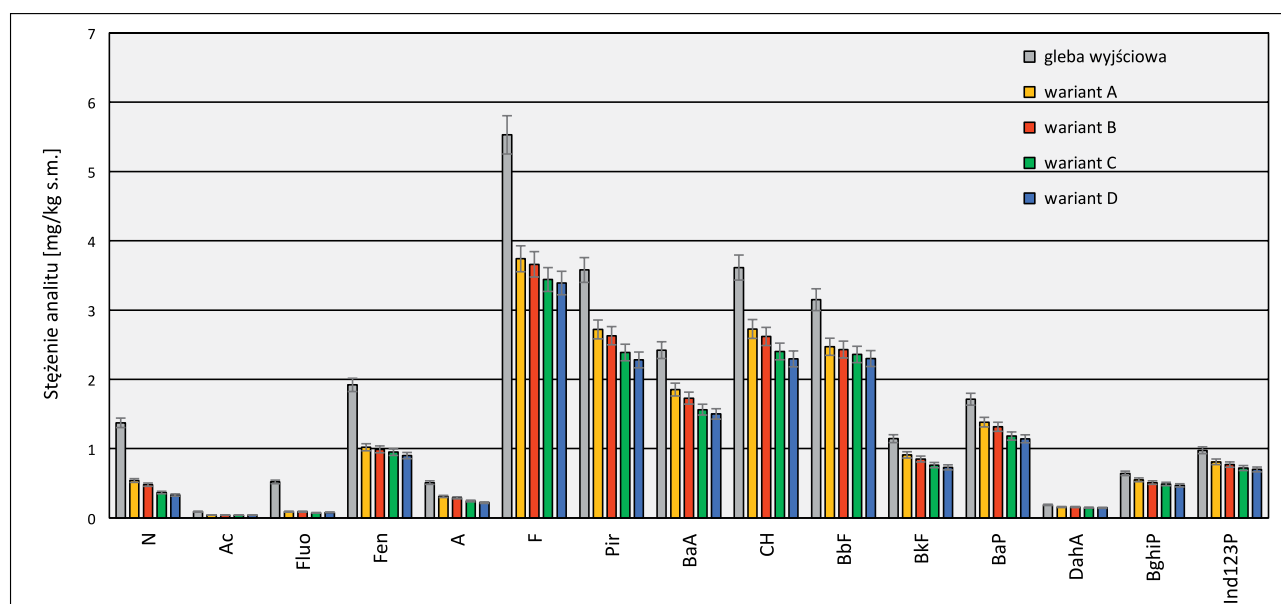
zanotowano dla 6-pierścieniowych WWA – kształtował się on w zakresie 22,96–28,32%.

Zmiany zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie inokulowanej biopreparatem oraz mieszaninami biopreparatu i roztworu γ -PGA przedstawiono na rysunku 4.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania laboratoryjne z zastosowaniem zestawu Oxi-Top wykazały, że γ -PGA wpływa na efektywność procesu biodegradacji substancji ropopochodnych, takich jak węglowodory alifatyczne, węglowodory monoaromatyczne oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Świadczą o tym wyższe wartości aktywności mikrobiologicznej w próbkach gleby inokulowanych biopreparatem oraz roztworem γ -PGA (w różnych stosunkach objętościowych), wynoszące odpowiednio: 2040 mg O₂/dm³ (wariant B), 3769 mg O₂/dm³ (wariant C) i 5127 mg O₂/dm³ (wariant D), aniżeli w próbce inokulowanej samym biopreparatem (1582 mg O₂/dm³ – wariant A).

Potwierdzeniem powyższych obserwacji są analizy chromatograficzne, które wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu γ -PGA w układzie wzrasta stopień biodegradacji TPH, BTEX i WWA. Obniżenie zawartości TPH w próbce gleby inokulowanej biopreparatem po 60 dniach testu wyniosło



Rysunek 4. Porównanie zawartości WWA przed testami i po zakończeniu testów biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem oraz mieszaninami biopreparatu i roztworu γ -PGA: N – naftalen, Ac – acenaften, Fluo – fluoren, Fen – fenantren, A – antracen, F – fluoranten, Pir – piren, BaA – benzo(a)antracen, CH – chryzen, BbF – benzo(b)fluoranten, BkF – benzo(k)fluoranten, BaP – benzo(a)piren, DahA – dibenzo(a,h)antracen, BghiP – benzo(g,h,i)perylene, Ind123P – indeno(1,2,3-c,d)piren

Figure 4. Comparison of PAH content before and after biodegradation tests in the soil inoculated with biopreparation and mixtures of biopreparation and γ -PGA solution: N – naphthalene, Ac – acenaphthene, Fluo – fluorene, Phen – phenanthrene, A – anthracene, F – Fluoranthene, Pir – pyrene, BaA – benzo(a)anthracene, CH – chrysene, BbF – benzo(b)fluoranthene, BkF – benzo(k)fluoranthene, BaP – benzo(a)pyrene, DahA – dibenzo(a,h)anthracene, BghiP – benzo(g,h,i)perylene, Ind123P – indeno(1,2,3-c,d)pyrene

36,78%, podczas gdy dodanie γ -PGA do biopreparatu spowodowało obniżenie zawartości TPH o 39,73% (wariant B), o 42,37% (wariant C) oraz o 44,34% (wariant D). Poza tym stopień biodegradacji BTEX po zakończeniu testu w glebach inokulowanych biopreparatem z dodatkiem γ -PGA wynosił od 47,11% do 51,00%, natomiast bez dodatku PGA – 44,53%. Ponadto inokulacja gleby biopreparatem z dodatkiem PGA spowodowała obniżenie zawartości WWA w badanej glebie z 27,37 mg/kg s.m. do 18,56 mg/kg s.m. (32,18% – wariant B), 17,13 mg/kg s.m. (37,40% – wariant C), 16,52 mg/kg s.m. (39,62% – wariant D), a samym biopreparatem do 19,32 mg/kg s.m. (29,40% – wariant A).

Przeprowadzone badania laboratoryjne z wykorzystaniem analiz respirometrycznych i chromatograficznych potwierdziły przypuszczenie, że dodatek γ -PGA może wpływać na efektywność procesu biodegradacji. Należy jednak zauważyć, że produkcja PGA jest bardzo droga (ponad 600 złotych za 100 mg, według danych z 2015 roku) (Starzyńska-Janiszewska, 2017). Dlatego niezwykle istotne jest, aby zastosować taką ilość dodatku γ -PGA do biopreparatu, która pozwoli na osiągnięcie zadowalającego efektu biodegradacyjnego z jednoczesnym zminimalizowaniem dodatkowych kosztów prowadzenia procesu.

Badania biodegradacji w skali laboratoryjnej wskazały, że najbardziej optymalny – biorąc pod uwagę zarówno efektywność biodegradacji, jak i koszty prowadzenia procesu – jest wariant C, czyli inokulacja gleby mieszaniną biopreparatu i roztworu γ -PGA w stosunku objętościowym 1 : 1. W wariancie tym efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych jest nieznacznie niższa aniżeli w wariancie D (TPH o 1,97 p.p., BTEX o 1,66 p.p., WWA o 2,22 p.p.), natomiast ilość wykorzystanego roztworu dodatku γ -PGA jest dwa razy mniejsza.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Ocena efektywności działania biopreparatu w połączeniu z dodatkiem polimerowym PGA do biodegradacji gleb silnie zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi (TPH, BTEX, WWA)*, praca INiG – PIB; nr zlecenia: 0097/KE/2021, nr archiwalny: DK-4100-0085/2021.

Literatura

- Al-Hawash A.B., Dragh M.A., Li S., Alhujaily A., Abbood H.A., Zhang X., Ma F., 2018. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2): 71–76. DOI: 10.1016/j.ejar.2018.06.001.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Barathi S., Vasudevan N., 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, 26(5–6): 413–416. DOI: 10.1016/S0160-4120(01)00021-6.
- Brzeszcz J., Kapusta P., Steliga T., Turkiewicz A., 2020. Hydrocarbon Removal by Two Differently Developed Microbial Inoculants and Comparing Their Actions with Biostimulation Treatment. *Molecules*, 25(3): 661. DOI: 10.3390/molecules25030661.
- Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J., Ballerini D., 2003. Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 144: 419–440. DOI: 10.1023/A:1022935600698.
- Chatterjee P.M., Tiwari D.P., Raval R., Dubey A.K., 2019. Coherent aspects of multifaceted eco-friendly biopolymer – polyglutamic acid from the microbes. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(2): 741–756. DOI: 10.22207/JPAM.13.2.10.
- Cooney J.J., Silver S.A., Beck E.A., 1985. Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes. *Microbial Ecology*, 11(2): 127–137. DOI: 10.1007/BF02010485.
- Das N., Chandran P., 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011: 1–13. DOI: 10.4061/2011/941810.
- Khan A.I., 2014. Analysis of 18 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Using the QuEChERS Method. Thermo Fisher Scientific, Application Note 20677. <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN20677-analysis-of-18-polycyclic-aromatic-hydrocarbons-in-soil-using-the-quechers-method.pdf>> (dostęp: 15.05.2021).
- Kluk D., Steliga T., 2017. Efektywna metoda identyfikacji zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w glebach. *Nafta-Gaz*, 73(7): 488–495. DOI: 10.18668/NG.2017.07.06.
- Luo S.G., Chen S.C., Cao W.Z., Lin W.H., Sheu Y.T., Kao C.M., 2019. Application of γ -PGA as the primary carbon source to bioremediate a TCE-polluted aquifer: A pilot-scale study. *Chemosphere*, 237, 124449. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124449.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5): 363–375. DOI: 10.1016/j.micres.2009.08.001.
- Najar I.N., Das S., 2015. Poly-glutamic acid (PGA) – structure, synthesis, genomic organization and its application: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(6): 2258–2280. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(6).2258-80.
- Pang X., Lei P., Feng X., Xu Z., Xu H., Liu K., 2018. Poly- γ -glutamic acid, a bio-chelator, alleviates the toxicity of Cd and Pb in the soil and promotes the establishment of healthy *Cucumis sativus* L. seedling. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 19975–19988. DOI: 10.1007/s11356-018-1890-9.
- Park C., Choi J.C., Choi Y.H., Nakamura H., Shimanouchi K., Horiuchi T., Misono H., Sewaki T., Soda K., Ashiuchi M., Sung M.H., 2005. Synthesis of super-high-molecular-weight poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(4–6): 128–133. DOI: 10.1016/j.molcatb.2005.06.007.
- Peng Y.P., Chang Y.C., Chen K.F., Wang C.H., 2020. A field pilot-scale study on heavy metal-contaminated soil washing by using an environmentally friendly agent – poly- γ -glutamic acid (γ -PGA). *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 34760–34769. DOI: 10.1007/s11356-019-07444-5.
- Radwan K., Ślosorz Z., Rakowska J., 2012. Efekty środowiskowe usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych. *Technika i Technologia*, 3: 107–114.
- Starzyńska-Janiszewska A., 2017. Kwas γ -poliglutaminowy – bakteryjny biopolimer z natto. *Biomist.pl, Portal popularnonaukowy*, <<https://biomist.pl/biologia/mikroorganizmy/kwas-%CE%B3-poliglutaminowy-bakteryjny-biopolimer-natto/7657>> (dostęp: 08.05.2021).

- Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P., 2012. Changes in Toxicity during in Situ Bioremediation of Weathered Drill Wastes Contaminated with Petroleum Hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 125: 1–10. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.092.
- Steliga T., Uliasz M., 2014. Spent drilling muds management and natural environment protection. *Mineral Resources Management*, 30(2): 135–156. DOI: 10.2478/gospo-2014-0011.
- Steliga T., Wojtowicz K., 2019. Wykorzystanie testów respirometrycznych do oceny efektywności biodegradacji osadów z instalacji kopalnianych. *Nafta-Gaz*, 75(1): 29–37. DOI: 10.18668/NG.2019.01.05.
- Steliga T., Wojtowicz K., Kapusta P., Brzeszcz J., 2020. Assessment of Biodegradation Efficiency of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Soil Using Three Individual Bacterial Strains and Their Mixed Culture. *Molecules*, 25(3): 709. DOI: 10.3390/molecules25030709.
- Varjani S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223: 277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Wang L., Chen S., Yu B., 2021. Biosynthesis of tailored poly- γ -glutamic acid: Recent achievements, diverse applications and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 119. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.11.009.
- Wojtowicz K., 2018. Opracowanie metodyki oznaczania BTEX w próbkach gleb z wykorzystaniem chromatografii gazowej z przystawką headspace. *Nafta-Gaz*, 74(3): 201–207. DOI: 10.18668/NG.2018.03.03.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., Skalski T., 2022. Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer γ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil. *Materials*, 15(2), 400: 1–26. DOI: 10.3390/ma15020400.
- Yang Z.H., Dong C.D., Chen C.W., Sheu Y.T., Kao C.M., 2018. Using poly-glutamic acid as soil-washing agent to remediate heavy metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 5231–5242. DOI: 10.1007/s11356-017-9235-7.
- Zhao G., Sheng Y., Wang C., Yang J., Wang Q., Chen L., 2018. In situ microbial remediation of crude oil-soaked marine sediments using zeolite carrier with a polymer coating. *Marine Pollution Bulletin*, 129(1): 172–178. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.030.



Dr hab. inż. Teresa Steliga, prof. INiG – PIB
Kierownik Zakładu Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25 A
31-503 Kraków
E-mail: teresa.steliga@inig.pl



Mgr Katarzyna WOJTOWICZ
Asystent w Zakładzie Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25 A
31-503 Kraków
E-mail: katarzyna.wojtowicz@inig.pl



Dr hab. Tomasz SKALSKI
Adiunkt w Centrum Biotechnologii Politechnika Śląska
ul. Akademicka 2A
44-100 Gliwice
E-mail: tomasz.skalski@polsl.pl

OFERTA BADAWCZA ZAKŁADU TECHNOLOGII EKSPLOATACJI PŁYNÓW ZŁOŻOWYCH

Zakład oferuje:

- opracowanie kompleksowej technologii bioremediacji in-situ gruntu zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi;
- rekultywację terenów skażonych substancjami ropopochodnymi;
- opracowanie technologii oczyszczania i utylizacji wód złożowych i odpadów po zabiegach stymulacyjnych z zastosowaniem nowoczesnych rozwiązań technicznych i technologicznych oraz metod biologicznych;
- optymalizacja procesów wydobywania i przygotowania do transportu ropy i gazu;
- monitorowanie zmian zawartości związków siarki w podziemnych magazynach gazu;
- badania i dobór inhibitorów parafinowo-hydratowych oraz deemulgatorów stosowanych w procesach eksploatacji złóż węglowodorów.

Badania i analizy laboratoryjne:

- analizy chromatograficzne:
 - » składu gazu ziemnego ($C_1 - C_8$, N_2 , CO_2 , He, H_2),
 - » związków siarki w gazie ziemnym,
 - » węglowodorów ciężkich ($C_3 - C_{36}$, BTEX),
- analizy toksykologiczne z wykorzystaniem nowoczesnych testów: Microtox, zestawów testów typu „toxkit” i testu MARA;
- analizy zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem HPLC;
- analiza płynów złożowych, zanieczyszczeń gleby i ścieków, odpadów eksploatacyjnych i wiertniczych z wykorzystaniem chromatografii jonowej;
- nieniszczące badania grubości materiałów konstrukcyjnych (certyfikat UT2).



Kierownik: dr hab. inż. Teresa Steliga, prof. INiG – PIB Adres: ul. Armii Krajowej 3, 38-400 Krosno
Telefon: 13 436 60 29, 13 436 89 41 w. 5222 Faks: 13 436 79 71 E-mail: teresa.steliga@inig.pl



INSTYTUT NAFTY I GAZU
– Państwowy Instytut Badawczy