

**Ocena składu zanieczyszczeń gleb skażonych TPH i WWA
pod kątem opracowania technologii ich bioremediacji**

*Assessment of the composition of pollution of soil contaminated
with TPH and PAHs for the development of the bioremediation
technology*

Teresa Steliga, Dorota Kluk

**Ocena składu zanieczyszczeń gleb skażonych
TPH i WWA pod kątem opracowania
technologii ich bioremediacji**

*Assessment of the composition of pollution of
soil contaminated with TPH and PAHs for the
development of the bioremediation technology*

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

2017

Recenzenci:

prof. dr hab. Elżbieta J. Bielińska
Instytut Gleboznawstwa, Inżynierii
i Kształtowania Środowiska
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

prof. dr hab. inż. Czesława Rosik-Dulewska,
prof. zw. Członek Korespondent PAN
Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN

DOI: 10.18668/PN2017.215

Wydawca:

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25A
31-503 Kraków

Redaktor wydania: Agnieszka J. Kozak

Korekta językowa: Katarzyna Wróbel

Skład i łamanie, DTP, projekt okładki: Paweł Noszkiewicz

Druk i oprawa:

Drukarnia K&K reklama i poligrafia
ul. Zakopiańska 9, 30-418 Kraków

Nakład: 70 egz.

ISSN 2353-2718

ISBN 978-83-65649-20-1

Copyright © 2017 INiG – PIB Kraków, ul. Lubicz 25A, Poland

Wszelkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej publikacji nie może być, bez uprzedniej pisemnej zgody wydawcy, gromadzona w systemach zbierania informacji, transmitowana lub reprodukowana, włączając w to fotokopie, fotografie, zapis magnetyczny lub inny.

Prenumeratę i wysyłkę prac naukowo-badawczych oraz materiałów informacyjnych prowadzi redakcja.

Publikacja zrealizowana na podstawie pracy pt.: *Ocena składu zanieczyszczeń gleb skażonych TPH i WWA pod kątem opracowania technologii ich bioremediacji*, wykonanej w ramach działalności statutowej.

Nr arch. sprawy: DK-4100-0034/16

Nr arch. sprawozdania: KE-4101-0034/16

Zlec. wew. INiG – PIB: 0034/KE

Spis treści

Streszczenie	10
Abstract	13
Wprowadzenie	16
1. Przepisy techniczne i prawne dotyczące rekultywacji zanieczyszczonych terenów	19
2. Przegląd literatury z zakresu technologii oczyszczania terenów skażonych substancjami ropopochodnymi	31
2.1. Metody rekultywacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi	35
2.1.1 Izolacja substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym	36
2.1.2. Dekontaminacja substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym	38
2.1.2.1. Samooczyszczanie środowiska gruntowo-wodnego zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi	38
2.1.2.2. Samooczyszczanie wspomagane	41
2.1.2.3. Biostymulacja	41
2.1.2.4. Bioaugmentacja	50
2.1.2.5. Fitoremediacja	57
2.1.2.6. Obróbka agrotechniczna (<i>landfarming</i>)	63
2.1.2.7. Pryzmy remediacyjne (kompostowanie)	64
2.1.2.8. Metoda bioreaktorowa	64

2.2. Metody oceny biodegradacji substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym	65
2.2.1. Badania mikrobiologiczne.....	66
2.2.2. Badania enzymatyczne.....	67
2.2.3. Badania toksykologiczne.....	67
2.2.4. Badania respirometryczne.....	69
3. Badanie procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w warunkach <i>ex situ</i>	71
3.1. Materiał badawczy.....	71
3.2. Metodyka badawcza.....	73
3.2.1. Analiza anionów i kationów z wykorzystaniem chromatografii jonowej.....	76
3.2.2. Dostosowanie metodyki chromatograficznej do oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w skażonej glebie.....	77
3.2.2.1. Izolacja ropopochodnych składników z gleby.....	78
3.2.2.2. Metodyka oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w glebie.....	79
3.2.2.3. Metodyka oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie.....	86
3.2.3. Badania toksykologiczne.....	92
3.2.3.1. Test fitotoksyczności Phytotoxkit.....	94
3.2.3.2. Spirodela Duckweed Toxkit.....	95
3.2.3.3. Test bezpośredniego kontaktu (TBK) Ostracodtoxkit F.....	98
3.2.3.4. Microtox Solid Phase.....	100
3.2.3.5. Test ryzyka środowiskowego MARA.....	102
3.2.3.6. Test Ames.....	105
3.2.4. Przygotowanie stanowiska do badań biodegradacji zanieczyszczeń metodą <i>ex situ</i> w skali laboratoryjnej.....	107
4. Charakterystyka składu zanieczyszczeń gleby skażonej substancjami ropopochodnymi (TPH i WWA)	116

4.1. Dobór optymalnych parametrów oczyszczania gleby w warunkach <i>ex situ</i>	126
4.1.1. Charakterystyka materiału badawczego.....	126
4.1.2. Dobór optymalnych parametrów do prowadzenia procesu oczyszczania zanieczyszczonej gleby.....	130
4.2. Przeprowadzenie procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi TPH i WWA w warunkach <i>ex situ</i>	131
4.2.1. Analiza statystyczna i pierwszorzędowy model biodegradacji TPH i WWA.....	131
4.2.2. Bioremediacja podstawowa gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi TPH i WWA.....	132
4.2.3. Bioaugmentacja gleby biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3.....	136
4.2.4. Ocena efektywności procesu biodegradacji na podstawie chromatograficznych analiz zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w oczyszczanej glebie.....	141
4.2.5. Ocena efektywności procesu biodegradacji na podstawie chromatograficznych analiz zanieczyszczeń WWA w oczyszczanej glebie.....	147
5. Ocena właściwości toksycznych gleby oczyszczanej w warunkach laboratoryjnych	161
5.1. Testy fitotoksyczności gleby z wykorzystaniem testu Phytotoxkit.....	162
5.2. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Spirodela Duckweed Toxkit.....	166
5.3. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Ostracodtoxkit F.....	171
5.4. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Microtox SPT.....	172
5.5. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu MARA.....	174
5.6. Ocena genotoksyczności gleby z wykorzystaniem testu Ames.....	177

Podsumowanie	180
Akty prawne i normatywne.....	184
Literatura.....	185
Spis fotografii, rysunków, wykresów i tabel.....	205

Streszczenie

Realizowaną pracę rozpoczęto od dokonania przeglądu literaturowego osiągnięć w zakresie oczyszczania gruntów skażonych substancjami ropopochodnymi oraz produktami ubocznymi pirolizy, jako źródłami zanieczyszczenia gleby węglowodorami TPH i WWA. Na podstawie danych literaturowych dotyczących technologii oczyszczania terenów skażonych substancjami ropopochodnymi wytypowano etapy postępowania zmierzające do redukcji zawartości TPH i WWA w skażonych glebach.

W ramach realizacji pracy wykonano analizy fizykochemiczne gleb pobranych z terenów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, a mianowicie z:

- gazowni klasycznej, wyłączonej z eksploatacji, położonej na północy Polski. Próbki do badań pobrano w pobliżu starych (częściowo zlikwidowanych) dołów ze smołą pogazową, z głębokości 0–0,5 m p.p.t. (gleba GK-1);
- dołu urobkowego, w którym składowano odpady wiertnicze zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi – gleba zaklasyfikowana do odpadów o kodzie ex 17 05 03* (gleba i ziemia zawierająca substancje ropopochodne). Próbki do badań pobrano z głębokości 0–0,5 m p.p.t. (gleba DU-1).

Analiza fizykochemiczna wykazała, że gleba z terenu gazowni klasycznej charakteryzowała się dużą zawartością WWA i stosunkowo niewielką TPH. Natomiast gleba z terenu dołu urobkowego zawierała duże ilości TPH i stosunkowo niewielkie WWA. Jako że fundamentalnym celem realizowanej pracy było badanie procesów biodegradacji TPH i WWA w glebie, dlatego wskazane było uzyskanie gleby o istotnych zawartościach TPH oraz WWA. Nadmiernie wysokie zawartości w glebie jednocześnie WWA i TPH mogą hamować przebieg jej oczyszczania, dlatego do badań procesu biodegradacji węglowodorów,

prowadzonych w warunkach *ex situ*, jako materiał badawczy stosowano mieszaninę gleb: GK-1:DU-1 w stosunku 2:1.

Z uwagi na ukierunkowanie badań na oznaczenie zawartości węglowodorów TPH oraz WWA w glebie – w ramach realizacji pracy dostosowano metodykę chromatograficznego oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych ze szczególnym uwzględnieniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA).

W kolejnym etapie utworzono stanowisko do badań biodegradacji zanieczyszczeń prowadzonych w skali półtechnicznej, w warunkach *ex situ*, metodą pryzmowania. Omówiono wyniki prac dotyczących badań optymalizacyjnych prowadzenia procesu biodegradacji, obejmujących: modyfikację struktury gleby w celu zwiększenia biodostępności mikroorganizmów i substancji odżywczych do węglowodorów ropopochodnych, bioremediację podstawową stymulowaną poprzez biowentylację i wzbogacanie środowiska odpadu w składniki biogenne wspomagające rozwój mikroflory autochtonicznej oraz bioaugmentację, polegającą na inokulacji wstępnie oczyszczonej gleby biopreparatami, których skład został opracowany w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego.

Doboru substancji biogennych do oczyszczanej gleby dokonano na podstawie wyników badań respirometrycznych (przeprowadzonych za pomocą zestawu OxiTop® Control) mierzących postęp samoistnej i wspomaganą biodegradacji tlenowej substancji ropopochodnych zawartych w badanym gruncie o różnej zawartości substancji biogennych.

Etapowy proces oczyszczania gleby na drodze bioremediacji podstawowej stymulowanej substancjami biogennymi oraz bioaugmentacji w warunkach *ex situ* prowadzono przez 300 dni. Przebieg procesu kontrolowano za pomocą rozbudowanego monitoringu obejmującego fizykochemiczne oraz toksykologiczne badania gleby, które wykonano, opierając się na mikrobiotestach typu ToxKit (Phytotoxkit, Ostracodtoxkit, Spirodela Duckweed ToxKit), Microtox, oceny ryzyka środowiskowego MARA oraz oceny genotoksyczności Ames.

Równie istotnym elementem pozwalającym na szersze spojrzenie na przebieg procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych i określenie efektywności kolejnych etapów oczyszczania była analiza chromatograficzna, pozwalająca na ilościowe i jakościowe oznaczenie poszczególnych węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych. Umożliwiała ona zaobserwowanie w glebie zmian zawartości poszczególnych n-alkanów i WWA w trakcie realizowanych etapów oczyszczania. Ponadto wprowadzane wskaźniki stopnia biodegradacji n-alkanów w postaci stosunków zawartości n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F w sposób bardzo widoczny obrazowały efektywność realizowanych kolejnych etapów opracowanej technologii oczyszczania odpadów z zanieczyszczeń ropopochodnych.

W celu opracowania modelu matematycznego biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadach wiertniczych zastosowano normalizację stężenia analitów za pomocą wprowadzonego biomarkera – C₃₀-17β(H),21β(H)-hopanu, który umożliwił pełną ocenę stopnia biodegradacji węglowodorów ropopochodnych.

Obliczone stałe biodegradacji pierwszego rzędu (k) pozwoliły na prześledzenie i porównanie kinetyki przebiegu biodegradacji poszczególnych grup zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH, Σ n-C₈-n-C₂₂, Σ n-C₂₃-n-C₃₆) oraz WWA (3-, 4-, 5- i 6-pierścieniowych WWA) w kolejnych etapach oczyszczania odpadów. Ponadto na podstawie przedstawionych stałych biodegradacji przeprowadzono porównanie efektywności działania wykorzystywanych biopreparatów.

Opracowana technologia oczyszczania gleb należy do pewnych i bezpiecznych dla środowiska naturalnego oraz uzasadnionych ekonomicznie do zastosowania w warunkach przemysłowych metod likwidacji substancji ropopochodnych na zanieczyszczonych terenach.

Abstract

The executed work was started by performing a review of literature regarding the achievements in the field of remediation of lands contaminated with petroleum derivative substances and by-products of pyrolysis as sources of contamination of the soil with TPH and PAH hydrocarbons. On the basis of literature data regarding technologies for remediation of lands contaminated with petroleum derivative substances, one selected process stages aimed at reducing the content of TPH and PAH in the contaminated soils.

As a part of the execution of the work, one performed physico-chemical analyses of soil collected from areas contaminated with petroleum derivative substances, namely from the area of:

- a decommissioned conventional gas plant, located in the north of Poland. Test samples were collected near old (partially eliminated) gas pitch pits, from a depth of 0–0.5 m below terrain level (GK-1 soil),
- a mining spoil pit, wherein drill waste contaminated with petroleum derivative substances were kept – soil classified for waste, with an ex code of 17 05 03*. The test samples were collected from a depth of 0 – 0.5 m below terrain level (DU-1 soil).

A physico-chemical analysis indicated that the soil from the area of the conventional gas plant was characterized by a high content of PAH and a relatively small content of TPH. Whereas the soil from the area of the mining spoil pit contained large amounts of TPH and relatively small amounts of PAH. Since the fundamental goal for the executed work was to study the processes of TPH and PAH degradation in soil, it was recommended to obtain soil with significant amounts of both TPH and PAH. Excessively high amounts of both PAH and TPH in the soil may hamper its remediation process. That is why the following

distribution of soils was used as test material for examining the process of biodegradation of hydrocarbons, performed in ex-situ conditions: GK-1:DU-1 in a ratio of 2:1.

Due to the orientation of the studies towards determining the content of TPH and PAH hydrocarbons in the soil, as a part of the execution of the work, one adapted the method of chromatographic determination of petroleum derivative contaminations with a particular focus on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

In the subsequent stage, one created a station for testing the biodegradation of contaminations, conducted on a semi-technical scale in ex-situ conditions using the compost heap method. One discussed the results of works pertaining to optimization tests for the conduct of the process, including: modification of the structure of the soil in order to increase the bioavailability of petroleum derivative hydrocarbons to microorganisms and nutrients, basic bioremediation stimulated by bioventilation and saturating the waste surroundings with biogenic ingredients supporting the development of indigenous microflora, and bioaugmentation, involving the inoculation of the initially remediated soil with biopreparations developed in Zakład Mikrobiologii INiG – PIB (Microbiology Department of the Oil and Gas Institute – National Research Institute).

The selection of biogenic substances for the remediated soil was made on the basis of the results of respirometric tests, measuring the progress of spontaneous and assisted aerobic biodegradation of the petroleum substances contained in the tested soil with varying content of biogenic substances. These tests were performed using the OxiTop® Control kit.

The staged process of soil remediation through basic bioremediation, stimulated by biogenic substances and bioaugmentation in ex situ conditions, was carried out for a period of 300 days. The course of the process was controlled using a comprehensive monitoring system, covering soil tests, both physico-chemical and toxicological, performed using ToxKit (Phytotoxkit, Ostracodtoxkit, Spirodela Duckweed ToxKit) and Microtox type tests, the MARA environmental risk assessment test and the Ames genotoxicity test.

An equally relevant element, allowing for a broader approach to the course of the process of biodegradation of petroleum derivative contaminations, and determination of the effectiveness of subsequent stages of remediation, was the chromatographic analysis, allowing for a quantitative and qualitative determination of individual hydrocarbons contained in petroleum derivative contaminations. It allowed to observe changes in the content of individual n-alkanes and PAHs during the remediation stages. Furthermore, the introduced n-alkane biodegradation degree indexes in the form of n-C₁₇/Pr and n-C₁₈/F content ratios very visibly illustrate the effectiveness of subsequently executed stages of the developed technology for removal of petroleum derivatives from waste.

In order to develop a mathematical model for the biodegradation of petroleum derivative contaminations in drill waste, one utilized normalization of the concentration of analytes using the introduced biomarker – C₃₀-17β(H), 21β(H)-hopan, which allowed for a complete assessment of the degree of biodegradation of petroleum derivative hydrocarbons.

The calculated constants for first-order biodegradation (k) allowed to monitor and compare the kinetics of the course of the biodegradation of individual groups of petroleum derivative contaminations (TPH, Σ n-C₈-n-C₂₂, Σ n-C₂₃-n-C₃₆) and PAH (3-, 4-, 5- and 6-cyclic PAHs) in subsequent stages of waste treatment. Furthermore, on the basis of the presented biodegradation constants, one can compare the effectiveness of operation of the biopreparations used.

The presented technology is one of the methods of treatment of petroleum derivative contaminants in areas contaminated with petroleum derivative substances, that are tried and environmentally safe, and economically justifiable for use under industrial conditions.

Wprowadzenie

Jeszcze kilka wieków temu w środowisku dominowały zanieczyszczenia naturalnego, których źródłami były wybuchy wulkanów, erozja skał, pożary lasów itp. Z upływem czasu coraz większy wpływ na degradację środowiska zaczęła wywierać działalność człowieka. Urbanizacja oraz uprzemysłowienie spowodowały silne zanieczyszczenie środowiska gruntowo-wodnego na skutek przedostania się do niego różnorodnych ksenobiotyków. Górnicza eksploatacja, transport ropy oraz dystrybucja ropopochodnych produktów bywają źródłem punktowego i obszarowego zanieczyszczenia ziemi. Ponadto przyczynami antropogenicznej emisji zanieczyszczeń organicznych do środowiska naturalnego mogą być m.in. procesy związane z niecałkowitym spalaniem paliw lub pirolizą.

W Polsce, kraju posiadającym jedno z największych zasobów węgla w Europie, wszelkie technologie mające na celu pełniejsze wykorzystanie potencjału tego surowca spotykają się z dużym zainteresowaniem. Należy jednak zauważyć, że wytwarzanie gazu na drodze suchej destylacji węgla, będące synonimem wielkiego postępu cywilizacyjnego na przełomie XIX i XX wieku, obarczone jest uzyskiwaniem smoły podestylacyjnej zawierającej znaczne ilości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Część tych substancji może przedostawać się do gruntu wskutek awarii w czasie produkcji czy też z powodu niewłaściwego składowania produktów odpadowych. Obecnie istnieją jeszcze zanieczyszczone tereny po instalacjach suchej destylacji węgla w zlikwidowanych gazowniach klasycznych.

Duże nagromadzenie zanieczyszczeń w glebie negatywnie wpływa na kondycję ekosystemów, co stanowi bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia ludzi. Konieczne staje się więc poszukiwanie metod usuwania zanieczyszczeń ze środowiska naturalnego umożliwiających przywrócenie właściwości użytkowych poszczególnym elementom biosfery.

Jednym z głównych źródeł skażenia gleby są substancje ropopochodne TPH oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne WWA, które należą do trwałych zanie-

czyszczeń organicznych, charakteryzujących się w większości przypadków wysokimi właściwościami mutagennymi i kancerogennymi.

Od wielu lat prowadzone są badania nad technologiami remediacyjnymi mogącymi minimalizować skutki zanieczyszczeń. Obecnie w centrum uwagi znajduje się bioremediacja: technologia oparta na naturalnych zdolnościach organizmów żywych do rozkładu substancji ropopochodnych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Istnieje szereg mikroorganizmów degradujących substancje ropopochodne, należących do różnych grup systematycznych, wśród których najbardziej rozpowszechnione są bakterie i grzyby. Jest to powód, dla którego są one najczęściej wykorzystywane w procesie biodegradacji zanieczyszczeń organicznych. Biorąc pod uwagę fakt, że zanieczyszczenia naftowe zwykle stanowią złożony układ, do ich skutecznej neutralizacji potrzebne jest współdziałanie wielu drobnoustrojów zdolnych do degradacji różnych związków. Niejednokrotnie zdarza się, że kompetentne mikroorganizmy działają w sposób antagonistyczny, co spowalnia, a nawet hamuje przebieg procesu oczyszczania. W Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB opracowano biopreparaty, w których skład wchodziły mikroorganizmy posiadające szlaki metaboliczne jednocześnie wykorzystujące obie grupy węglowodorów: alifatycznych i aromatycznych jako źródła węgla i energii, czego skutkiem jest degradacja węglowodorów.

Biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych w skażonym środowisku jest uzależniona zarówno od czynników abiotycznych (stężenie i rodzaj zanieczyszczenia, właściwości fizykochemiczne zanieczyszczonego gruntu, zawartość związków organicznych i biogennych m.in. azotu i fosforu, temperatura, zawartość tlenu, wilgotność, odczyn), jak i biotycznych, takich jak skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów obecnych w glebie. Gleba jest bowiem dynamicznym elementem przyrody, stwarzającym warunki do egzystencji organizmów, zaś naruszenie jej dynamiki powoduje degradację i prowadzi do zmiany jej właściwości biochemicznych.

Wykonywanie szerokiego zakresu analiz fizykochemicznych gleby podczas procesu jej oczyszczania pozwala na kontrolowanie postępu usuwania zanieczyszczeń i umożliwia podejmowanie działań w momencie obniżenia się skuteczności prowadzonego procesu.

W ramach niniejszej pracy przedstawiono wyniki prac autorskich umożliwiających oczyszczanie gleb skażonych substancjami ropopochodnymi oraz wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi do poziomu akceptowanego przepisami prawa.

Proces oczyszczania gleb skażonych TPH i WWA jest skomplikowanym zagadnieniem nie tylko ze względu na chemiczny charakter zanieczyszczeń, ale również z powodu złożoności samego środowiska glebowego. Prowadzenie procesu oczyszczania gleby wymagało określenia jej fizycznych i chemicznych właściwości, ze szczególnym uwzględnieniem wyznaczenia zawartości składników biogennych, węglowodorów ropopochodnych oraz

kancerogennych WWA. Znajomość składu substancji ropopochodnych zanieczyszczających glebę stanowi podstawę prowadzenia prac zmierzających do ich usunięcia ze skażonego środowiska.

Obecnie nie ma jednej całościowo znormalizowanej metodyki umożliwiającej identyfikację i ilościowe oznaczenie WWA i TPH w glebie, a przegląd prac literaturowych opublikowanych na przełomie ostatnich lat wykazuje dużą rozbieżność w tym zakresie. Dlatego usystematyzowanie badań analityki WWA i TPH umożliwi zaprezentowanie wiarygodnej metody ich oznaczania.

Wobec powyższego obok podstawowego celu niniejszego opracowania, którym było oczyszczenie skażonego substancjami TPH i WWA gruntu, znalazła się również potrzeba opracowania wiarygodnej oceny składu zanieczyszczeń.

Podczas oczyszczania zdegradowanych terenów zasadne jest także prowadzenie badań mających na celu ocenę stopnia ryzyka kontaktu skażonego terenu z poszczególnymi elementami środowiska naturalnego. Do obserwacji niepożądanego działania ksenobiotyków i ich metabolitów na organizmy żywe wykorzystano bioindykatory w postaci testów toksykologicznych opartych na żywych organizmach. Stosowano mikrobiotesty typu ToxKit (Phytotoxkit, Ostracodtoxkit, Spirodela Duckweed ToxKit), Microtox, test oceny ryzyka środowiskowego MARA oraz test oceny genotoksyczności Ames.

W wyniku prowadzonych prac została zaproponowana etapowa technologia oczyszczania gleb skażonych TPH i WWA, której główne etapy przeprowadzono w skali półtechnicznej metodą *ex situ*. Otrzymane wyniki mają duże znaczenie w kontekście opracowywania właściwych strategii prowadzenia procesów bioremediacji gleb metodą *in situ*.

1. Przepisy techniczne i prawne dotyczące rekultywacji zanieczyszczonych terenów

Działalność człowieka od wieków wywołuje zmiany w środowisku, zmniejsza jego zasoby, modyfikuje naturalne cechy i powoduje wprowadzenie do środowiska obcych, niewystępujących naturalnie substancji. Zmiany te, początkowo niewielkie, a w miarę rozwoju techniki i przemysłu coraz bardziej widoczne i dotkliwe, wywołały w latach 70. ubiegłego wieku niepokój wśród przedstawicieli nauki. W 1989 roku w raporcie opracowanym przez Komisję Środowiska i Rozwoju wyartykułowane zostały obawy o bezpieczeństwo ekologiczne świata i o los przyszłych pokoleń. W dokumencie zawarto również rekomendację wskazującą drogę zrównoważonego rozwoju, której wyznacznikiem jest dbałość o człowieka i całą planetę. Na straży bezpieczeństwa ekologicznego muszą stać zobowiązania i umowy prawne uwzględniające zapobieganie globalnym, regionalnym, krajowym i lokalnym zagrożeniom [164].

W trosce o środowisko prowadzony jest monitoring stopnia skażenia terenów potencjalnie będących pod wpływem źródeł antropogenicznych. Badania skoncentrowane na zmianie jakości gleby i ziemi umożliwiają:

- określenie obszarów lokalnych zanieczyszczeń gleb i ziemi;
- wybranie obszarów, w stosunku do których należy podjąć działania zmierzające do obniżenia zawartości zanieczyszczeń poniżej wartości określonych w standardach jakości gleby i ziemi.

Po ustaleniu rodzaju i koncentracji zanieczyszczeń na zdegradowanym terenie – należy podjąć decyzję o sposobie jego rekultywacji w celu przywrócenia właściwości użytkowych. Decyzja ta powinna zależeć od uwarunkowań lokalnych oraz przewidywanego sposobu wykorzystania terenu.

Sposób badania, oceny i działania naprawcze środowiska są określone przez akty prawne – ustawy i wynikające z nich akty wykonawcze, które m.in. zawierają wykazy substancji zagrażających środowisku i ich dopuszczalne stężenia w poszczególnych jego elementach. Ochronę środowiska przed zanieczyszczeniem regulują i dostosowują w Polsce do ustawodawstwa Unii Europejskiej: ustawa o odpadach z dnia 14 grudnia 2012 r. (Dz.U. z 2013 r. poz. 21 z późn. zm.) oraz rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. (Dz.U. z 2016 r. poz. 1395) w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi.

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska (Dz.U. z 2015 r. poz. 796) z dnia 11 maja 2015 r. w sprawie odzysku odpadów poza instalacjami i urządzeniami – glebę zanieczyszczoną substancjami ropopochodnymi można uznać za odpad o kodzie ex 17 05 03* – gleba i ziemia zawierająca substancje ropopochodne. Zgodnie z polskim ustawodawstwem prawnym zanieczyszczoną glebę można poddać procesowi rekultywacji po uprzednim uzyskaniu zezwolenia na prowadzenie działalności na danym obiekcie. Dopuszczalny poziom zanieczyszczeń określa rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi (Dz.U. z 2016 r. poz. 1395), z uwzględnieniem ich funkcji aktualnej i planowanej dla terenów: szczególnie chronionych, gruntów rolnych i leśnych, terenów przemysłowych (tab. 1.1).

Glebę lub ziemię uznaje się za zanieczyszczoną, gdy stężenie jednej substancji przekracza dopuszczalną wartość – z zastrzeżeniem, że jeżeli przekroczenie wartości dopuszczalnej stężenia substancji w glebie lub ziemi wynika z jej naturalnej wysokiej zawartości w środowisku, za dopuszczalną uznaje się wartość $R < 1 \times 10^{-5}$, oszacowaną na podstawie dostępnych danych ryzyka zdrowotnego (R) (§ 4 z rozp. poz. 1395).

Tereny zanieczyszczone, zgodnie z rozporządzeniem, identyfikuje się w pięciu etapach:

- etap pierwszy – ustalenie działalności mogącej być przyczyną zanieczyszczenia na danym terenie, obecnie lub w przeszłości;
- etap drugi – ustalenie listy substancji powodujących ryzyko, których występowanie w glebie lub w ziemi jest spodziewane ze względu na działalność prowadzoną na danej nieruchomości lub też w jej sąsiedztwie;
- etap trzeci – zebranie oraz analiza dostępnych i aktualnych źródeł informacji istotnych dla oceny zagrożenia zanieczyszczeniem gleby lub ziemi na danym terenie oraz dostępnych i aktualnych badań zanieczyszczenia gleby i ziemi substancjami powodującymi ryzyko z listy ustalonej w etapie drugim;

- etap czwarty – zebranie informacji koniecznych do wykonania badań wstępnych (ustalenie grupy gruntów występujących na danym terenie i lokalizacji źródeł zanieczyszczeń substancjami powodującymi ryzyko, określenie schematu pobierania próbek gleby) oraz ich wykonanie. Porównanie otrzymanych wyników analiz z dopuszczalnymi zawartościami oraz – jeżeli istnieją do tego podstawy – stwierdzenie, czy substancje występujące na danym terenie są pochodzenia naturalnego;
- etap piąty – badania szczegółowe w celu określenia zasięgu występowania oraz stężenia substancji powodujących ryzyko zanieczyszczenia gleby.

W przypadku wykluczenia występowania zanieczyszczenia na którymkolwiek z etapów – identyfikację terenu zanieczyszczonego uznaje się za zakończoną.

W wytycznych dotyczących sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi (Dz.U. z 2016 r. poz. 1395) dokonano następującego podziału gruntów:

grupa I:

- tereny mieszkaniowe, inne tereny zabudowane, zurbanizowane tereny niezabudowane lub w trakcie zabudowy, grunty rolne zabudowane, tereny rekreacyjno-wypoczynkowe;

grupa II:

- grunty orne oraz tereny rodzinnych ogrodów działkowych, sady, łąki trwałe, pastwiska trwałe, grunty pod stawami, grunty pod rowami.

W przypadku gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t. wyróżniono podgrupy wydzielone na podstawie właściwości gleby:

podgrupa II-1:

- gleby mineralne bardzo lekkie, o zawartości frakcji FG02 mniejszej niż 10%, niezależnie od wartości pH_{KCl} ,
- gleby mineralne lekkie, o zawartości frakcji FG02 wynoszącej 10–20%, o wartości pH_{KCl} mniejszej lub równej 6,5,

podgrupa gruntów II-2:

- gleby mineralne lekkie, o zawartości frakcji FG02 wynoszącej 10–20%, o wartości pH_{KCl} wyższej niż 6,5,

- gleby mineralne średnie, o zawartości frakcji FG02 wynoszącej 20–35%, o wartości pH_{KCl} mniejszej lub równej 5,5,
- gleby mineralne ciężkie, o zawartości frakcji FG02 większej niż 35%, o wartości pH_{KCl} mniejszej lub równej 5,5,
- gleby mineralno-organiczne, o zawartości węgla organicznego wynoszącej 3,5–6%, niezależnie od wartości pH_{KCl} ,

podgrupa gruntów II-3:

- gleby mineralne średnie, o zawartości frakcji FG02 wynoszącej 20–35%, o wartości pH_{KCl} wyższej niż 5,5,
- gleby mineralne ciężkie, o zawartości frakcji FG02 większej niż 35%, o wartości pH_{KCl} wyższej niż 5,5,
- gleby mineralno-organiczne i organiczne, o zawartości węgla organicznego ponad 6%, niezależnie od wartości pH_{KCl} ;

grupa III:

- lasy, grunty zadrzewione i zakrzewione, nieużytki, tereny rekreacyjno-wypoczynkowe z wyłączeniem terenów o charakterze zabytkowym oraz terenów zieleni nieurządzonej niezaliczone do lasów oraz gruntów zadrzewionych i zakrzewionych, użytki ekologiczne;

grupa IV:

- tereny przemysłowe, użytki kopalne, tereny komunikacyjne, grunty przeznaczone pod budowę dróg publicznych lub linii kolejowych.

Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko szczególnie istotne dla ochrony powierzchni ziemi, o których mowa w załączniku nr 1 do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. (poz. 1395), dla wszystkich grup gruntów na głębokości przekraczającej 0,25 m p.p.t. określa się z uwzględnieniem wodoprzepuszczalności gleby i ziemi.

Tabela 1.1. Wartości dopuszczalne stężeń substancji powodujących ryzyko w gruncie [mg/kg suchej masy]
Załącznik do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. (poz. 1395)

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko										
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.					
		I	II		III	IV	I, II, III		IV			
		podgrupa gruntów		podgrupa gruntów		podgrupa gruntów		podgrupa gruntów		$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]
II-1		II-2	II-3									
I. METALE I METALOID												
1.	Arsen (As)	25	10	20	50	50	100	50	20	50	25	100
2.	Bar (Ba)	400	200	400	600	1000	1500	600	300	600	300	3000
3.	Chrom (Cr)	200	150	300	500	500	1000	500	300	500	300	800
4.	Cyna (Sn)	20	10	20	40	100	350	50	30	50	40	300
5.	Cynk (Zn)	500	300	500	1000	1000	2000	500	300	500	300	3000
6.	Kadm (Cd)	2	2	3	5	10	15	5	3	5	6	20
7.	Kobalt (Co)	50	20	30	50	100	200	60	30	60	50	300
8.	Miedź (Cu)	200	100	150	300	300	600	300	150	300	200	1000
9.	Molibden (Mo)	50	10	25	50	100	250	50	25	50	30	200
10.	Nikiel (Ni)	150	100	150	300	300	500	200	100	200	100	500
11.	Ołów (Pb)	200	100	250	500	500	600	300	100	300	200	1000
12.	Rtęć (Hg)	5	2	4	5	10	30	5	3	5	4	50

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko									
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.				
		I	II	III	IV	I, II, III	IV	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]
		podgrupa gruntów		II-1		II-2		II-3			
II. ZANIECZYSZCZENIA NIEORGANICZNE											
1.	Cyjanki wolne	1	1	5	20	5	5	10	5	5	100
2.	Cyjanki – związki kompleksowe	5	5	20	50	5	5	10	5	5	500
III. WĘGLOWODORY											
III.A. BENZYNY I OLEJE											
1.	Suma węglowodorów C ₆ –C ₁₂ , składników frakcji benzyn ²⁾	1	1	50	500	50	50	500	50	50	750
2.	Suma węglowodorów C ₁₂ –C ₃₅ , składników frakcji oleju ³⁾	30	50	300	3000	1000	1000	3000	1000	1000	3000

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko									
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.				
		I	II		III	IV	I, II, III		IV		
			podgrupa gruntów				$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	
	II-1	II-2	II-3								
III.B. WĘGLOWODORY AROMATYCZNE											
1.	Benzen	0,1	0,1		10	100	1	25	3	150	
2.	Etylobenzen	0,1	0,1		10	100	1	75	10	250	
3.	Toluen	0,1	0,1		10	100	1	75	5	230	
4.	Ksyleny ⁴⁾	0,1	0,1		10	100	1	35	5	150	
5.	Styren	0,1	0,1		6	60	1	5	2	100	

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko												
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.							
		I	II		III	IV	I, II, III		IV		1×10^{-7} [m/s]	<math>< 1 \times 10^{-7}</math> [m/s]		
		podgrupa gruntów					$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	<math>< 1 \times 10^{-7}</math> [m/s]	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	<math>< 1 \times 10^{-7}</math> [m/s]				
					II-1	II-2	II-3							
III.C. WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE														
1.	Naftalen	0,1	0,1						1	20	5	20	10	40
2.	Antracen	0,2	0,2						1	20	5	20	10	40
3.	Chryzen	0,2	0,2						1	20	5	20	10	40
4.	Benzo(a)antracen	0,1	0,1						1	20	5	20	10	40
5.	Dibenzo(a,h)antracen	0,1	0,1						1	20	5	20	5	20
6.	Benzo(a)piren	0,1	0,1						1	20	5	20	5	40
7.	Benzo(b)fluoranten	0,1	0,1						1	20	5	20	5	20
8.	Benzo(k)fluoranten	0,1	0,1						1	20	5	20	5	20
9.	Benzo(ghi)perylene	0,2	0,2						1	20	5	20	5	100
10.	Indeno(1,2,3-c,d)piren	0,2	0,2						1	20	5	20	5	20

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko										
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.					
		I	II		III	IV	I, II, III	IV	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]		$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	
			II-1	II-2					II-3	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	
IV. WĘGLOWODORY CHLOROWANE												
1.	Alifatyczne chlorowane ⁵⁾	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	5	0,1	0,1	5	1	20
2.	Dichloroeten	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	5	0,1	0,1	5	0,1	5
3.	Trichloroeten	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	5	0,1	0,1	5	0,1	5
4.	Tetrachloroeten	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	5	0,1	0,1	5	0,1	5
5.	Chlorobenzeny pojedyncze ⁶⁾	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	15	0,1	0,1	2	0,5	10
6.	Chlorofenole pojedyncze ⁷⁾	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	1	0,1	0,1	1	0,2	5
7.	Chloronaftalen	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	1	0,1	0,1	1	0,1	1
8.	PCB ⁸⁾	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	2	0,1	0,1	2	0,5	5

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko																			
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.														
		I	II	III	IV	I, II, III	IV	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]										
		podgrupa gruntów																			
		II-1	II-2	II-3																	
V. ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN																					
V.A. PESTYCYDY CHLOROORGANICZNE																					
1.	DDT/DDE/DDD ⁽⁹⁾	0,0025	0,12		0,025	0,25	0,025	0,25	0,025	4	0,025	4	0,025	4							
2.	Aldryna	0,0025	0,025		0,025	0,25	0,025	0,25	0,025	4	0,025	4	0,025	4							
3.	Dieldryna	0,0005	0,005		0,005	0,50	0,005	0,50	0,005	4	0,005	4	0,005	4							
4.	Endryna	0,001	0,01		0,01	0,50	0,01	0,50	0,01	2	0,01	2	0,01	4							
5.	α -HCH ⁽¹⁰⁾	0,0025	0,025		0,025	1	0,025	1	0,025	4	0,025	4	0,025	4							
6.	β -HCH ⁽¹⁰⁾	0,001	0,01		0,01	0,5	0,01	0,5	0,01	2	0,01	2	0,01	2							
7.	γ -HCH ⁽¹⁰⁾	0,0001	0,01		0,001	0,05	0,001	0,05	0,001	0,5	0,001	0,5	0,001	0,5							

Lp.	Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko												
		grupy i podgrupy gruntów na głębokości 0–0,25 m p.p.t.					grupy i wodoprzepuszczalność gruntów na głębokości >0,25 m p.p.t.							
		I	II		III	IV	I, II, III		IV		IV			
			II-1	II-2	II-3		$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$\geq 1 \times 10^{-7}$ [m/s]	$< 1 \times 10^{-7}$ [m/s]				
V.B. PESTYCYDY – ZWIĄZKI NIECHLOROWE														
1.	Carbaryl	0,05	0,2		0,2	0,2	0,1	0,1	5	0,1	0,1	5	0,1	5
2.	Carbofuran	0,05	0,2		0,2	0,2	0,1	0,1	2	0,1	0,1	2	0,1	2
3.	Maneb	0,05	0,2		0,2	0,2	0,1	0,1	35	0,1	0,1	35	0,1	35
4.	Atrazyna	0,005	0,05		0,05	0,05	0,005	0,005	5	0,005	0,005	5	0,005	6
VI. POZOSTAŁE ZANIECZYSZCZENIA														
1.	Tetrahydrofuran	0,1	0,1		2	50	0,1	0,1	1	0,1	0,1	1	2	40
2.	Pirydyna	0,1	0,1		2	30	0,1	0,1	1	0,1	0,1	1	1	20
3.	Tetrahydrotiofen	0,1	0,1		2	60	0,1	0,1	1	0,1	0,1	1	2	50
4.	Cykloheksan	0,1	0,1		5	80	0,1	0,1	1	0,1	0,1	1	5	80
5.	Fenol	0,1	0,1		3	50	0,1	0,1	1	0,1	0,1	1	3	100
6.	Krezole ⁽¹⁾	0,1	0,1		3	50	0,1	0,1	1	0,1	0,1	1	3	100
7.	Ftalany ⁽²⁾	0,1	0,1		10	60	0,1	0,1	5	0,1	0,1	5	10	60

Objaśnienia:

- 1) Sucha masa części ziemistych gleby (<2 mm) – masa wysuszona w temperaturze 105°C zgodnie z normą PN-ISO 11465 „Jakość gleby – Oznaczenie zawartości suchej masy gleby i wody w glebie w przeliczeniu na suchą masę gleby – Metoda wagowa”. Oznaczenie właściwości fizykochemicznych gleby i ziemi oraz zawartości zanieczyszczeń wykonuje się w frakcjach ziemistych (o średnicach <2 mm), po oddzieleniu na sicie frakcji gruboziarnistych (>2 mm). W uzasadnionych przypadkach, gdy istnieje przypuszczenie, że frakcje gruboziarniste mogą być źródłem zanieczyszczenia, należy oddzielnie poddać je analizie.
- 2) Suma wszystkich węglowodorów stanowiących frakcję benzyn: alifatycznych, naftenowych i aromatycznych zawierających w cząsteczce od 6 do 12 atomów węgla, z uwzględnieniem węglowodorów monoaromatycznych BTEX (benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksylenów).
- 3) Suma wszystkich węglowodorów stanowiących frakcję oleju: alifatycznych, naftenowych i aromatycznych zawierających w cząsteczce od 12 do 35 atomów węgla i powyżej, z uwzględnieniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych WWA.
- 4) Ortoksylen, metaksylen, paraksylen.
- 5) Indywidualne związki: dichlorometan, trichlorometan, tetrachlorometan, chloroetan, 1,2-dichloroetan, 1,1,2-trichloroetan, 1,1,2,2-tetrachloroetan.
- 6) Monochlorobenzen, dichlorobenzeny, trichlorobenzeny, tetrachlorobenzeny, pentachlorobenzen i heksachlorobenzen.
- 7) Monochlorofenole (suma), dichlorofenole (suma), trichlorofenole (suma), tetrachlorofenole (suma) i penta-chlorofenol.
- 8) Podane wartości progowe dotyczą każdego ze związków z grupy PCB, a w szczególności: PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180.
- 9) W znaczeniu DDT i jego metabolity, to jest: DDT[1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorofenyl)etan], DDD[1,1-dichloro-2,2-bis(chlorofenyl)etylen] i DDE[1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorofenyl)etan].
- 10) HCH odpowiednio alfa, beta, gamma, w znaczeniu – 1,2,3,4,5,6-heksachlorocykloheksan.
- 11) Indywidualne izomery krezolu: ortokrezolu, metakrezolu, parakrezolu.
- 12) Indywidualne związki: ftalan dietylu, ftalan di-2-etyloheksylu, ftalan butylu-benzylu, ftalan di-izo-butylu, ftalan di-n-butylu.

2. Przegląd literatury z zakresu technologii oczyszczania terenów skażonych substancjami ropopochodnymi

Postępujący rozwój cywilizacji i towarzyszące mu szerokie uprzemysłowienie spowodowały poważne zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego na olbrzymich obszarach w wielu krajach. Cała biosfera jest nieustannie degradowana w wyniku niszczącej działalności człowieka. Niejednokrotnie dochodzi do przedostawania się nadmiernych ilości szkodliwych substancji do środowiska gruntowo-wodnego, co znacznie spowalnia lub całkowicie zatrzymuje naturalne procesy oczyszczania [51, 86, 210].

Górnicza eksploatacja, transport ropy oraz dystrybucja ropopochodnych produktów bywają źródłem punktowego i obszarowego zanieczyszczenia ziemi. Zanieczyszczenia takie stanowią również odpady wiertnicze, powstałe w wyniku głębień otworów wydobywczych, składające się ze zużytej płuczki oraz zwiercin zanieczyszczonych płynem złożowym. W początkowych latach XX wieku ich znaczne ilości gromadzono w dołach urobkowych. Pod względem chemicznym odpady te stanowią zróżnicowane, wieloskładnikowe układy, które podczas deponowania i prowadzenia podstawowych procesów oczyszczania uległy zmianom. Odpady te zawierają zanieczyszczenia ropopochodne, w tym wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), których skład jest zmienny w czasie wskutek zachodzących procesów, m.in.: odparowania, rozpuszczania, transportu substancji rozpuszczalnych w wodzie czy biodegradacji [30, 43, 145].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne należą do trwałych zanieczyszczeń organicznych, charakteryzujących się w większości przypadków wysokimi właściwościami mutagennymi i kancerogennymi. W środowisku występują one w materii organicznej

(ropa naftowa, węgiel kamienny itp.), natomiast źródłem ich antropogenicznej emisji do poszczególnych elementów środowiska mogą być procesy związane z niecałkowitym spalaniem paliw lub pirolizą [10, 48].

W Polsce, kraju posiadającym jedno z największych zasobów węgla w Europie, wszelkie technologie mające na celu pełniejsze wykorzystanie potencjału tego surowca spotykają się z dużym zainteresowaniem i są przedmiotem szerszej dyskusji naukowców i polityków. Proces zgazowania węgla jest koncepcją analizowaną zarówno na szczeblach rządowych, jak i przez departamenty inwestycyjno-rozwojowe wiodących zakładów przemysłowych z branży chemicznej i energetycznej [67].

Należy jednak zauważyć, że wytwarzanie gazu na drodze suchej destylacji węgla, będące synonimem wielkiego postępu cywilizacyjnego na przełomie XIX i XX wieku, obarczone jest uzyskiwaniem smoły podestylacyjnej, zawierającej znaczne ilości WWA. Część tych substancji może przedostawać się do gruntu – wskutek awarii w czasie produkcji czy też z powodu niewłaściwego składowania produktów odpadowych. W niektórych zakładach po zakończeniu eksploatacji dokonano wstępnego usunięcia substancji szkodliwych, zaś w innych, ze względu na niewielką w tym okresie znajomość problemów ochrony środowiska, nie poczyniono żadnych kroków w tym kierunku [138]. Obecnie istnieją jeszcze zanieczyszczone tereny po starych instalacjach suchej destylacji węgla.

Duże, przekraczające dopuszczalne normy nagromadzenie się w glebach węglowodorów ropopochodnych, a w szczególności WWA, negatywnie wpływa na rozwój i wegetację roślin oraz na pozostałe organizmy żywe obecne w takim ekosystemie [66]. Dlatego też konieczne jest prowadzenie prac zmierzających do usunięcia tych substancji ze środowiska.

Zawartość WWA w glebach kształtuje się w bardzo szerokich granicach, w zależności od miejsca, rodzaju oraz od sposobu ich użytkowania. W glebach z okolic dużych miast lub położonych wzdłuż szlaków komunikacyjnych czy też znajdujących się w sąsiedztwie zakładów przemysłowych skala tych zanieczyszczeń bywa wysoka, na poziomie 20 mg/kg, natomiast w glebach wykorzystywanych rolniczo (np. pola uprawne, łąki) nie przekracza zwykle 100–400 µg/kg [14].

Bardzo wysokie zawartości WWA odnotowano w glebach z terenów dawnych gazowni klasycznych – na poziomie 1069–6100 mg/kg s.m., przy zawartości TPH na poziomie 6268,5–25168 mg/kg s.m. [156, 157, 172].

Wykonane badania gruntów z terenów dawnych niemieckich gazowni klasycznych wykazały, że ich głównymi zanieczyszczeniami są: węglowodory alifatyczne, olefinowe, monopierścieniowe węglowodory aromatyczne BTEX, a przede wszystkim wielopierście-

niowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz fenole, krezole, metale ciężkie, siarczki i cyjanki. Spośród zidentyfikowanych WWA wysoką zawartość stanowią węglowodory o liczbie pierścieni 4–6 w cząsteczce [155].

Węglowodory w zanieczyszczonej warstwie wodonośnej mogą występować jako:

- substancje o gęstości większej od gęstości wody (*Dense Non-Aqueous Phase Liquid* – DNAPL);
- substancje o gęstości mniejszej od gęstości wody (*Light Non-Aqueous Phase Liquid* – LNAPL).

Substancje o gęstości większej od gęstości wody pod wpływem sił grawitacyjnych przemieszczają się do głębszych warstw wodonośnych, co sprawia, że ich rozprzestrzenianie się w kierunkach horyzontalnych jest bardzo ograniczone. Natomiast substancje o gęstości mniejszej od gęstości wody unoszą się na powierzchni wody podziemnej i mogą wraz z nią migrować na znaczne odległości. W praktyce zanieczyszczenia tego typu mają zazwyczaj pochodzenie ropopochodne.

Zanieczyszczenia ropopochodne (w strefie aeracji) mogą ulegać odparowywaniu do powietrza gruntowego, rozpuszczaniu w wodzie zawartej w gruncie, transformacji biologicznej oraz mogą adsorbować na ziarnach gruntu lub przemieszczać się jako odrębna faza [219].

Węglowodory o wysokim powinowactwie względem ośrodka lub występujące w ośrodku o niższej zdolności adsorpcyjnej mogą być wymywane, zanieczyszczając warstwę wodonośną. Szczególnie niebezpieczne są BTEX, gdyż będąc relatywnie dobrze rozpuszczalne, mogą przedostawać się do wód powierzchniowych i migrować wraz z nimi do ujęć wodnych.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne ze względu na niewielką rozpuszczalność nie stwarzają zagrożenia samoistnej migracji w gruncie, natomiast są bardzo niebezpieczne ze względu na swą toksyczność oraz możliwość przedostawania się do wód gruntowych na skażonym terenie. Cięższe węglowodory (powyżej 10 atomów węgla w cząsteczce) mogą ulegać powolnej migracji z uwagi na silną sorpcję przez ośrodek porowaty, zwłaszcza przy dużej pojemności sorpcyjnej [117, 118].

Opracowano wiele metod eliminowania zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntu wykorzystujących procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne:

- **fizyczne**, w których przy użyciu procesów fizycznych wymusza się transport zanieczyszczenia;
- **chemiczne**, w których dochodzi do zmiany struktury chemicznej zanieczyszczenia, a w konsekwencji do zmiany jego zachowania w środowisku

gruntowym, pod wpływem różnego rodzaju reakcji chemicznych. W wyniku tych procesów powstają zazwyczaj substancje mniej toksyczne niż początkowe skażenie (np.: dehalogenacja, procesy redox);

- **biologiczne**, w których dochodzi do zmiany struktury chemicznej składników skażenia na skutek naturalnych procesów biologicznych, przebiegających w żywych organizmach (bakterie, grzyby). Jest to proces biodegradacji, w którego efekcie dochodzi do biotransformacji skażenia do form mniej toksycznych lub całkowicie obojętnych dla środowiska (CO_2 i H_2O).

Rzadko stosuje się pojedyncze procesy oczyszczania skażonego gruntu, zazwyczaj konieczne jest wykorzystanie metod stanowiących połączenie dwóch, a niekiedy nawet trzech z wyżej wymienionych.

Rozpatrując oczyszczanie gruntów pod kątem miejsca prowadzenia prac zmierzających do zmniejszenia zawartości zanieczyszczeń, wyróżnić należy dwie strategie:

- **in situ** – oczyszczanie środowiska gruntowo-wodnego w miejscu występowania zanieczyszczeń (spotyka się także określenie *on site*, dotyczące oczyszczania gruntu w miejscu występowania zanieczyszczeń, ale po jego wydobyciu i/lub spompowaniu wody);
- **ex situ** – oczyszczanie wydobytego gruntu oraz spompowanych wód poza terenem występowania.

Istotnym problemem pojawiającym się w przypadku skażenia gruntów i wód gruntowych różnego rodzaju substancjami pochodzenia zarówno organicznego, jak i nieorganicznego jest duża toksyczność tych substancji w stosunku do wszystkich żywych organizmów. Stanowi to główny powód, dla którego podejmuje się działania zmierzające do oczyszczenia skażonego gruntu.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono problemowi zanieczyszczenia środowiska substancjami ropopochodnymi. Głównymi strategiami, jakie można wyróżnić w walce z zanieczyszczeniem środowiska wodno-gruntowego, są:

- usunięcie (dekontaminacja) lub izolacja zanieczyszczeń (odgrodenie i kontrola);
- zmiana właściwości zanieczyszczeń prowadząca do obniżenia ich toksyczności, mobilności lub reaktywności;
- eliminacja źródeł zanieczyszczeń.

Warunkiem koniecznym w technologii oczyszczania gleb jest uwzględnienie zagadnień związanych z geotechniką, hydrogeologią oraz biochemicznym rozkładem substancji ropopochodnych w środowisku wodnym [114, 218].

2.1. Metody rekultywacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi

Rekultywacja zanieczyszczonej gleby lub gruntu polega na przywróceniu stanu odpowiadającego standardom jakości określającym taką zawartość niektórych substancji w glebie lub gruncie, poniżej której żadna z funkcji pełnionych przez powierzchnię ziemi nie jest naruszona.

Celem zabiegów rekultywacyjnych jest przywrócenie zanieczyszczonego gruntu do stanu właściwego, zgodnego ze standardami jakości gleby i ziemi.

Wybór metody bioremediacji uzależniony jest od:

- rodzaju i budowy podłoża gruntowego;
- rodzaju zanieczyszczeń, ich stężenia, stanu skupienia, właściwości chemicznych i fizycznych oraz podatności na biodegradację;
- czasu trwania i wielkości zanieczyszczenia podłoża gruntowego (powierzchnia, głębokość);
- sposobów wykorzystania oczyszczonego podłoża w przyszłości.

Schemat postępowania mającego na celu określenie zakresu bioremediacji gleby przygotowuje się na podstawie wstępnej oceny informacji dotyczących rodzaju, miejsca pochodzenia, drogi przemieszczania oraz receptorów zanieczyszczeń (ludzie, zwierzęta, rośliny itp.). Przede wszystkim należy określić potencjalne źródło i rodzaj zanieczyszczenia oraz mechanizmy możliwego przemieszczania się zanieczyszczeń. Etap ten zapewnia rozpoznanie obecnych warunków panujących na miejscu zanieczyszczonego gruntu.

Remediacja terenów ma zastosowanie w przypadku przekroczenia stężeń zanieczyszczeń w gruncie ponad wartości dopuszczalne, określone w przepisach prawa. Zabiegi remediacyjne zanieczyszczonej gleby/gruntu niwelują zatem istniejące zagrożenia środowiska lub też obniżają ryzyko z poziomu nieakceptowanego do poziomu akceptowalnego.

2.1.1. Izolacja substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym

Techniki izolacji i immobilizacji zanieczyszczeń mają na celu ograniczenie ich migracji w środowisku gruntowo-wodnym. Jest to rozwiązanie o charakterze doraźnym, mające na celu opóźnienie lub czasowe zatrzymanie migrującej plamy zanieczyszczeń. Nie jest to metoda oczyszczania, lecz jedynie sposób kontroli rozprzestrzeniającego się zanieczyszczenia. Izolację i kontrolę stosuje się w przypadkach, gdy likwidacja zanieczyszczenia nie jest uzasadniona z przyczyn ekologicznych lub techniczno-ekonomicznych. Unieruchamianie zanieczyszczeń realizowane jest za pomocą barier fizycznych, hydraulicznych lub technik solidyfikacji plamy zanieczyszczeń.

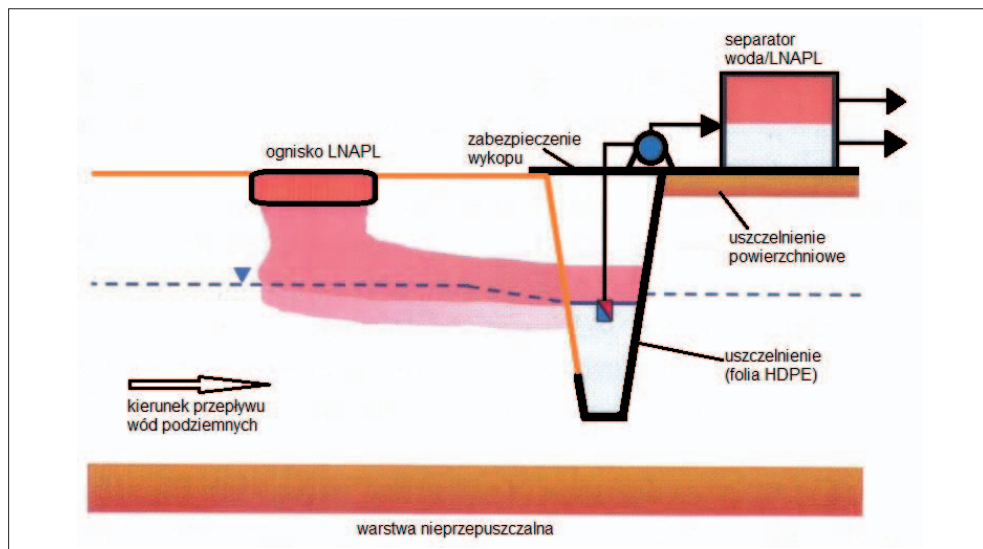
W celu ograniczenia migracji zanieczyszczenia w środowisku gruntowo-wodnym stosuje się różnego rodzaju bariery fizyczne. Są to przegrody z materiałów o niskiej przepuszczalności, których grubość zależy od metody wykonania, głębokości, ciśnienia wody i rodzaju składnika uszczelniającego. Przegrody mogą być wykonywane na dwa sposoby:

- bez wybierania gruntu:
 - » metodą wibracyjną, jako cienkie ściany stalowe lub zasłony palowe,
 - » metodą wiertniczą z wtlaczaniem pod ciśnieniem zaczynów uszczelniających cementowych lub syntetycznych;
- z wybieraniem gruntu:
 - » w formie ścian betonowych,
 - » w formie przegród wykonywanych metodą jednofazową,
 - » w formie przegród wykonywanych metodą dwufazową.

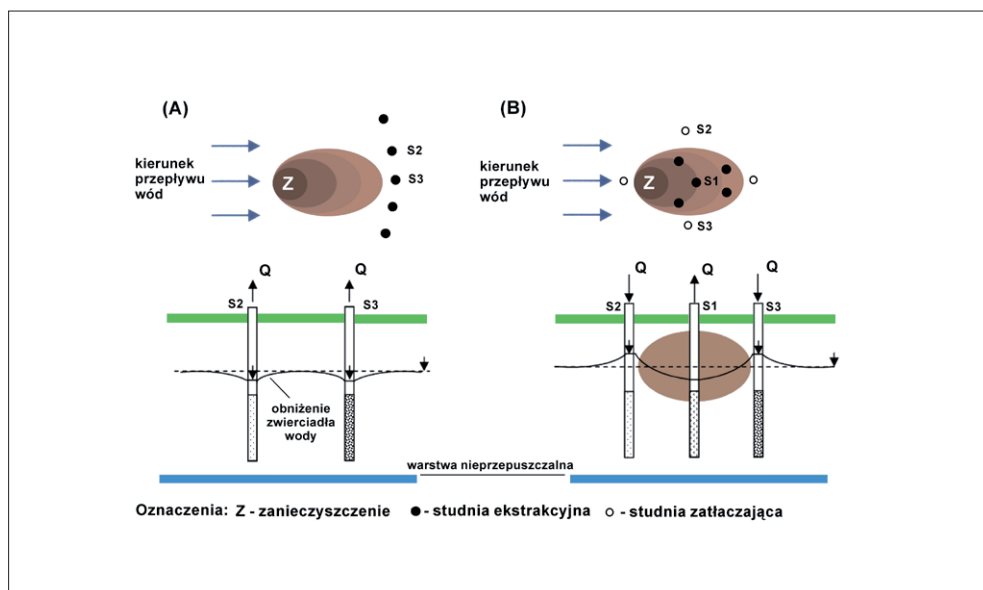
Uszczelniającymi składnikami mineralnymi mogą być: bentonit, substancje wiążące czy też wypełniacze mineralne. Jako wypełniacze ścian odcinających stosowano z powodzeniem mieszaniny mułu i szlamu z bentonitem wapiennym, cementem oraz składnikami specjalnymi.

Na rysunku 2.1 przedstawiono przykładowy schemat rowu opaskowego do szczyptywania lekkich zanieczyszczeń.

Do kontroli ruchu plamy zanieczyszczeń wykorzystywane są bariery hydrauliczne w postaci zespołu studni pionowych, drenów lub rowów opaskowych. W tym przypadku stosuje się pompowanie i oczyszczanie wody podziemnej, co znacznie podnosi skuteczność oczyszczania. Bariery hydraulicznych używa się często w kombinacji z barierami fizycznymi, co zwiększa efektywność dekontaminacji. Przykładem tego mogą być bariery przedstawione na rysunku 2.2 [134].



Rys. 2.1. Schemat rowu opaskowego do szczypty lekkiej cieczy [218]



Rys. 2.2. Schemat bariery hydraulicznej: (A) bariera studni, (B) układ z wykorzystaniem studni ekstrakcyjnych i zatłaczających [134]

Oznaczenia: Z - ognisko zanieczyszczenia, S1-S3 - numery studni, Q - wydajność pompowania/zatłaczania

2.1.2. Dekontaminacja substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym

2.1.2.1. Samooczyszczanie środowiska gruntowo-wodnego zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi

Ostatnie tendencje światowe wskazują, że do najbardziej efektywnych dostępnych technologii remediacji *in situ* środowiska gruntowo-wodnego należą rekomendowane przez US EPA (United States Environmental Protection Agency) metody oparte na procesach samooczyszczania, które mogą być realizowane jako kontrolowane samooczyszczenie, a w niezbędnych przypadkach jako wspomagane samooczyszczenie [161].

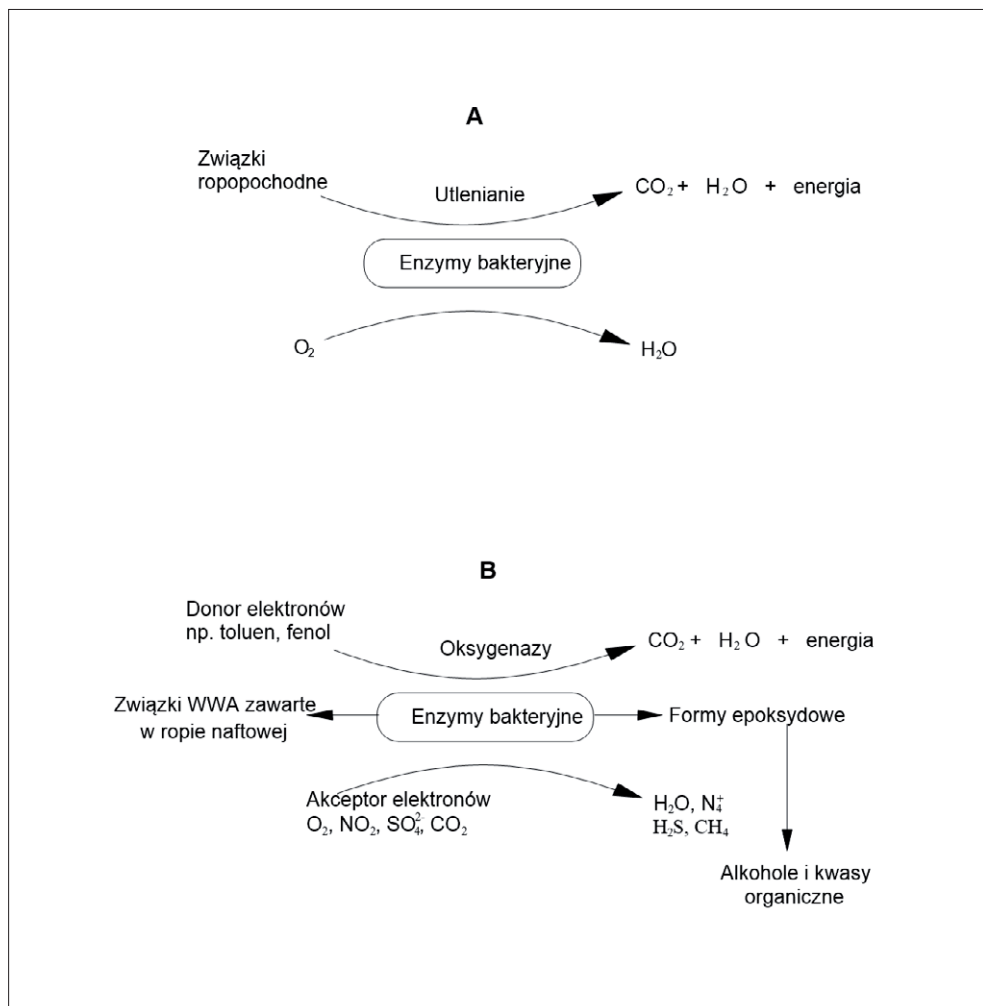
Samooczyszczanie jest naturalnym procesem usuwania związków organicznych i nieorganicznych, polegającym na kompleksowym współdziałaniu czynników o charakterze fizycznym, chemicznym i biologicznym. Najważniejszą rolę w procesie samooczyszczania środowiska gruntowo-wodnego zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi odgrywa naturalna biodegradacja [64, 76, 95]. Polega ona na destrukcji lub transformacji substancji ropopochodnych do form mniej szkodliwych przez mikroorganizmy autochtoniczne. Końcowymi produktami biodegradacji są: dwutlenek węgla, woda, substancje nieorganiczne oraz biomasa, które nie są toksyczne, a tym samym nie stanowią zagrożenia dla środowiska. Mikroorganizmy zasiedlające skażony grunt mogą wykorzystać do reprodukcji substancje ropopochodne jako główne źródło węgla i energii [118, 119, 129].

Biodegradacja może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych (biodegradacja aerobowa), jak i beztlenowych (biodegradacja anaerobowa), pod warunkiem obecności akceptorów i donorów elektronów (rys. 2.3) [95, 112, 117, 127].

Biodegradacja aerobowa polega na wykorzystaniu tlenu cząsteczkowego do utleniania części węgla organicznego do CO₂, podczas gdy pozostała część służy do budowy nowej biomasy. Tlen, jako akceptor elektronów, ulega redukcji wraz z wytworzeniem wody. Biodegradacja anaerobowa ma miejsce wtedy, gdy związki nieorganiczne są wykorzystywane jako akceptory elektronów (respiracja anaerobowa), albo wówczas, gdy substancje ropopochodne służą zarówno jako donory, jak i akceptory elektronów (fermentacja). Efektem procesów anaerobowych może być powstanie N₂, H₂, węglowodorów, CH₄, zredukowanych metali (respiracja anaerobowa) albo CH₄, CO₂ i H₂O (fermentacja) [118].

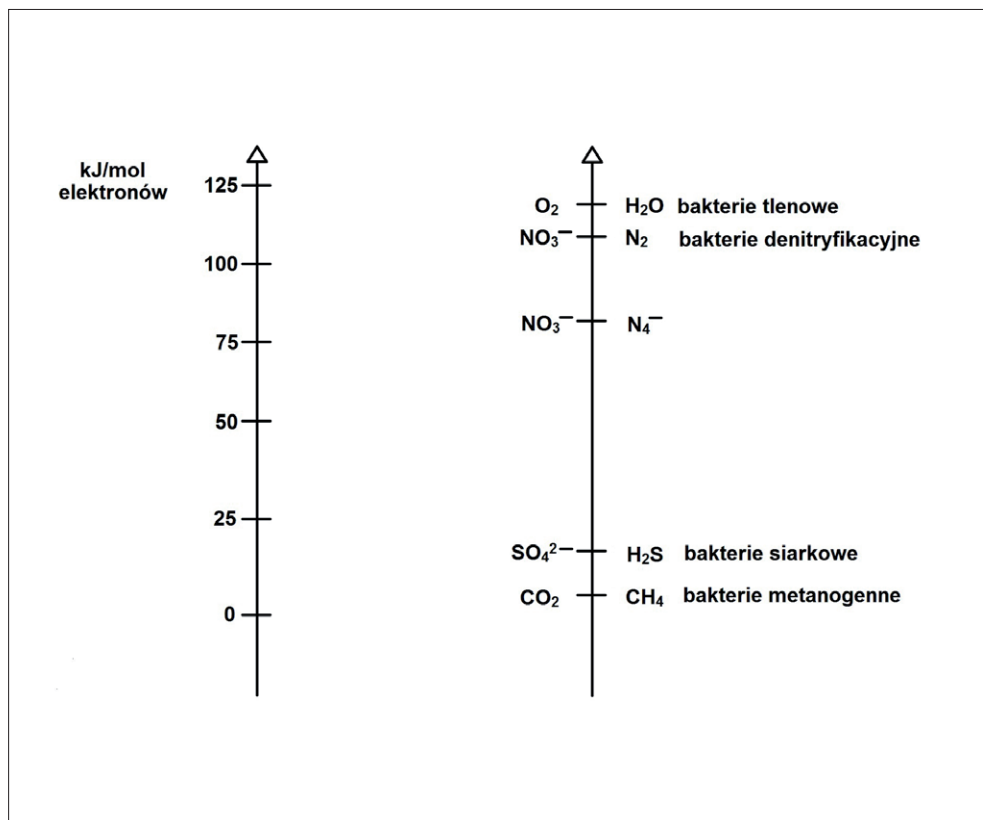
Szlaki i strategia transformacji substancji ropopochodnych zależą od struktury substancji, dostępności akceptora elektronów i od mikroorganizmów biorących udział

w procesie biodegradacji [16]. W warunkach tlenowych, gdy akceptorem elektronów jest tlen cząsteczkowy, stosunkowo szybciej biodegradacji podlegają zawarte w ropie naftowej n-alkany. Produktami przemian są alkohole i kwasy tłuszczowe, włączane następnie w szlaki metaboliczne mikroorganizmów, a końcowymi produktami są CO_2 i H_2O [16, 130, 148].



Rys. 2.3. Schemat biodegradacji substancji ropopochodnych w warunkach tlenowych (A) i beztlenowych (B) [95]

W warunkach utrudnionego dostępu tlenu efektywność procesu biodegradacji zależy od możliwości wykorzystania innych akceptorów elektronów, tj.: azotanów, siarczanów, żelaza i CO_2 [70]. Energię uzyskaną przez mikroorganizmy utleniające substancje ropopochodne, w zależności od dostępnego akceptora elektronów, przedstawia schemat zaprezentowany na wykresie 2.1.



Wykres 2.1. Energia dostępna dla mikroorganizmów wykorzystujących różne akceptory elektronów w procesie biodegradacji SR [127]

Mikroorganizmy największy zysk energetyczny uzyskują w wyniku utleniania substancji ropopochodnych, gdy akceptorem jest tlen cząsteczkowy (około $120 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ elektronów), a najniższy w warunkach beztlenowych, gdy akceptorem jest CO_2 . Brak tlenu powoduje,

że proces degradacji podejmują bakterie beztlenowe korzystające z dostępnego akceptora elektronów dającego najwyższy zysk energetyczny, a po jego wyczerpaniu następną grupą mikroorganizmów prowadzi biodegradację z udziałem kolejnego dostępnego akceptora [8, 137]. Dane literaturowe wskazują, że procesy anaerobowe są na ogół od 10 do 100 razy wolniejsze od procesów tlenowych [118, 129].

W przypadku gdy stosuje się samooczyszczanie jako podstawę remediacji, wymagany jest monitoring procesów fizykochemicznych i biologicznych zachodzących w środowisku gruntowo-wodnym. Istnieje bowiem ryzyko powstawania metabolitów bardziej toksycznych niż zanieczyszczenie wyjściowe [148], co może powodować nie tylko spadek szybkości biodegradacji, ale i jej całkowite zahamowanie. Monitoring realizowany jest poprzez ciągłą i systematyczną kontrolę zanieczyszczonego obszaru pod kątem szybkości biodegradacji substancji ropopochodnych [49].

2.1.2.2. Samooczyszczanie wspomagane

Jak już wcześniej wspomniano w podrozdziale 2.1.2.1, biodegradacja samoistna opiera się na przyrodzonych zdolnościach mikroorganizmów do rozkładu węglowodórów ropopochodnych bez jakiegokolwiek stymulacji procesu, a jej efektywność zależy od aktywności mikroorganizmów autochtonicznych. W celu przyspieszenia biodegradacji można zastosować wspomaganie samooczyszczania poprzez [12, 38, 162, 167, 211]:

- biostymulację – wprowadzenie do środowiska gruntowo-wodnego tlenu, wody, substancji biogennych i powierzchniowo czynnych w celu zwiększenia aktywności mikroorganizmów autochtonicznych;
- bioaugmentację – zaszczerpienie (inokulacja) zanieczyszczonego środowiska gruntowo-wodnego mikroorganizmami charakteryzującymi się wysoką skutecznością biodegradacji substancji ropopochodnych (autochtonicznymi, allochtonicznymi lub zmodyfikowanymi genetycznie).

2.1.2.3. Biostymulacja

Biostymulację zanieczyszczonego gruntu można zastosować w przypadku, gdy szybkość biodegradacji substancji ropopochodnych jest niewystarczająca. Metody wspomaganie biodegradacji substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym opierają się przede wszystkim na wprowadzeniu optymalnej dawki substancji biogennych oraz na korekcie czynników środowiskowych, takich jak: temperatura, odczyn, zawartość wody czy tlenu [23, 54, 165].

Wilgotność gruntu

Obecność wody w gruncie jest niezbędna dla aktywności mikrobiologicznej, a mikroorganizmy nietworzące form przetrwalnikowych giną w środowisku o bardzo niskiej zawartości wody. W procesie biodegradacji woda służy jako medium pozwalające na ruch mikroorganizmów w gruncie, a także na dyfuzję substratu i materiałów do wnętrza komórek bakteryjnych oraz usunięcie z ich wnętrza produktów metabolizmu. Zawartość wody w gruncie może być wyrażona jako procent wagowy lub objętościowy suchej masy gruntu albo jako procent tzw. zdolności gruntu do zatrzymywania wody. Stopień wilgotności gleby jest zawartością w niej wody w stosunku do całkowitej objętości wolnych przestrzeni w glebie. Wilgotność gruntu waha się przeciętnie od 15% do 85%.

Tlenowa degradacja substancji ropopochodnych w gruncie przebiega najskuteczniej, gdy wilgotność wynosi 50–70% całkowitej pojemności wodnej gruntu. Mniejsze wartości powodują obniżenie aktywności mikroorganizmów, większe natomiast ograniczają stopień natlenienia gruntu [46]. Wrażliwość biodegradacji na zawartość wody w gruncie rośnie ze wzrostem temperatury – i odwrotnie.

Obecność wody w zanieczyszczonym substancjami ropopochodnymi środowisku glebowym umożliwia – oprócz wzrostu jego aktywności biologicznej – desorpcję substancji ropopochodnych poprzez ich wymywanie (wzrost biodostępności). Dlatego czasami stosuje się proces płukania gruntu (ang. *soil flushing*), polegający na nawadnianiu zanieczyszczonego rejonu w celu wyługowania i ekstrakcji (desorpcji) substancji ropopochodnych. Proces ten jest możliwy i skuteczny w glebach lekkich, zanieczyszczonych substancjami organicznymi łatwo rozpuszczalnymi w wodzie. Wykorzystuje się zwykle infiltrację przez drenaż pod warstwą zanieczyszczoną i czerpanie powyżej warstwy zanieczyszczonej albo poziomy przepływ wody przez warstwę zanieczyszczoną. Jako roztwory płuczące można stosować wodę, roztwory kwaśne i zasadowe lub rozpuszczalniki. Przemywanie wodą z dodatkiem środków powierzchniowo-czynnych może dodatkowo stymulować desorpcję i rozpuszczanie substancji ropopochodnych w wodzie, wspomagając następnie ich biodegradację [44, 119].

Temperatura

Temperatura ma bezpośredni wpływ na wzrost oraz metabolizm mikroorganizmów; zbyt wysoka lub zbyt niska może doprowadzić do zahamowania procesów metabolicznych, a nawet spowodować obumarcie populacji. Najkorzystniejsze warunki do życia bakterii spełnione są w warunkach mezofilnych, tzn. w temperaturze 25–40°C. Jednak aktywność

metaboliczną niektórych kultur bakterii obserwuje się w przedziale temperatur od -12°C do $+100^{\circ}\text{C}$, a biodegradację substancji ropopochodnych w zakresie od -1°C do $+70^{\circ}\text{C}$. Niska temperatura nie musi być koniecznie śmiertelna dla mikroorganizmów, ale kolejno następujące zamrażanie i odmrażanie gruntu może spowodować wyginiecie niektórych gatunków. Temperatry zarówno znacznie wyższe, jak i te niższe od występujących w gruncie w warunkach naturalnych powodują bardzo szybki spadek tempa wzrostu mikroorganizmów i aktywności metabolicznej [118].

Napowietrzanie

Podczas biodegradacji aerobowej węglowodory ropopochodne są donorami, tlen zaś jest akceptorem elektronów. Ponieważ mikroorganizmy wykorzystują tlen przekazywany wodzie porowej z atmosfery, jego dostępność jest funkcją objętości porów i porowatości powietrznej, ciśnienia cząsteczkowego tlenu w powietrzu porowym, szybkości transportu tlenu z powietrza porowego do wody porowej, szybkości zużywania tlenu przez mikroorganizmy, geometrii rozkładu tlenu w gruncie.

Transfer tlenu z powietrza do wody nie jest zbyt szybki nawet w warunkach idealnych, a wzmożona aktywność mikrobiologiczna może w krótkim czasie doprowadzić do jego wyczerpania. Przyjmuje się, że dla zapewnienia biodegradacji aerobowej substancji ropopochodnych stężenie tlenu w wodzie porowej powinno być wyższe niż $0,2\text{ mg/dm}^3$ przy minimalnej porowatości powietrznej wynoszącej 10%. Jako wartość graniczną niezbędną do życia bakterii tlenowych przyjmuje się jednak $0,05\text{ mg/dm}^3$ [118].

Powszechnie stosowane sposoby wprowadzania tlenu do zanieczyszczonego gruntu to: bronowanie (spulchnianie gruntu przez mechaniczną uprawę), natlenianie i wykorzystywanie metod chemicznych [23]. Bronowanie jest rekomendowane jako metoda wspomagania biodegradacji w obróbce agrotechnicznej (ang. *landfarming*), jednak może być ono stosowane jedynie w przypadku powierzchniowych warstw zanieczyszczonego gruntu. Natlenianie (wentylacja) może być realizowane poprzez iniekcję, czyli zatłaczanie nośnika tlenu (napowietrzanej wody lub powietrza) przez układ przewodów i drenów (tzw. studnie iniekcyjne). Jest to metoda znajdująca zastosowanie w przypadku zanieczyszczenia głębszych warstw gruntu i wody podziemnej. Metody chemiczne, w tym chemiczne utlenianie, obejmują dostarczanie do zanieczyszczonego gruntu alternatywnych źródeł tlenu – substancji wolno oddających tlen (np. CaO) lub silnych utleniaczy (np. KMnO_4). Można również stosować nadtlenek wodoru lub ozon, jednakże praktyczne wykorzystanie tych związków jest ograniczone z uwagi na możliwość toksycznego oddziaływania na mikroorganizmy [99, 107, 118, 183].

Biowentylacja

Biowentylacja (bioaeracja) polega na użyciu powietrza w celu usunięcia z gruntu lotnych frakcji węglowodorów oraz przyspieszenia naturalnych procesów biologicznego rozkładu frakcji ciężkich i pozostałych frakcji lotnych. Jest to ekonomiczna metoda *in situ*, niewymagająca ani skomplikowanego wyposażenia, ani dokładnego okonturowania zanieczyszczeń. Ograniczenia szerszego stosowania biowentylacji związane są z:

- zbyt niską przepuszczalnością ośrodka porowatego dla wody i powietrza;
- trudną dostępnością zanieczyszczeń dla mikroorganizmów, zwłaszcza w końcowej fazie procesu;
- niepełną biodegradacją zanieczyszczeń, tworzeniem się toksycznych, nieulegających biodegradacji metabolitów;
- efektywnym monitoringiem i modelowaniem procesu, zwłaszcza aktywności biologicznej;
- możliwością rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń przy niedostatecznej izolacji;
- długim czasem remediacji (1–4 lata).

W porównaniu z innymi metodami remediacji biowentylacja jest korzystna pod względem wpływu na środowisko, zużycia energii, kosztów, a mniej opłacalna z uwagi na ograniczenia stosowania: stężenia rezydualne, czas remediacji oraz możliwość kontroli procesu.

Parametry fizykochemiczne zanieczyszczeń wpływające na biowentylację to m.in.: ciężar cząsteczkowy, rozpuszczalność w wodzie, stała Henry'ego, prężność par, gęstość i lepkość, stała podziału charakteryzująca zdolność adsorpcyjną i desorpcyjną oraz współczynnik dyfuzji [118].

Biowentylacja jest często stosowana w przypadku zanieczyszczeń lotnych i półlotnych podlegających biodegradacji aerobowej, a jej głównym parametrem jest stosunek biodegradacji do parowania. Węglowodory o prężności par <1 mm Hg nie podlegają odparowaniu, zaś te o prężności >760 mm Hg parują zbyt szybko, aby mogły ulec biodegradacji. Węglowodory o prężności par pomiędzy 1 a 760 mm Hg mogą zatem być usuwane w procesach biowentylacji. Ich rozkład ilościowy zależy od charakterystyki zanieczyszczeń oraz lokalnych warunków hydrogeologicznych. Większość węglowodorów stanowią na ogół frakcje lotne, zaadsorbowane lub występujące jako wolny produkt, a ich ruchliwość jest zależna od zdolności faz do przemieszczania oraz zdolności przemian fazowych.

Chemiczne utlenianie

Chemiczne utlenianie stanowi alternatywną metodę wspomaganą biodegradacji w środowisku gruntowo-wodnym zanieczyszczonym substancjami ropopochodnymi. Stanowi kombinację płukania gruntu z chemicznym utlenianiem zanieczyszczeń w warunkach *on site*. Polega na zatłaczaniu utleniaczy chemicznych (nadmanganianu potasu, nadtlenku wodoru lub ozonu) do strefy aeracji i/lub warstwy wodonośnej. W trakcie chemicznego utleniania substancje ropopochodne ulegają przekształceniu w formy bardziej podatne na biodegradację, a tym samym wzrasta ich biodostępność dla mikroorganizmów. Efektywność procesu zależy od chemizmu zanieczyszczeń oraz od rodzaju zastosowanego utleniacza. Sterowanie procesem polega na doborze odpowiedniego utleniacza, pH i temperatury reakcji. Potencjalne problemy wykorzystania utleniania chemicznego mogą być związane z toksycznością utleniaczy [119, 217].

Odczyn

Optymalny wzrost bakterii występuje, gdy wartość pH utrzymuje się w zakresie 6,5–8,0, choć dopuszczalny jest zakres od 5,5 do 8,5. Większość grzybów natomiast rozwija się lepiej w środowisku kwaśnym. Proces biodegradacji przebiega najszybciej i najskuteczniej w warunkach lekko alkalicznych przy pH 7,5–7,8. W czasie biodegradacji pH może nieraz znacznie się zmieniać zależnie od charakteru metabolizmu i fizjologii drobnoustrojów, a także od stopnia zbuforowania środowiska [181].

Wprowadzanie substancji biogennych i surfaktantów

Bioremediacja zanieczyszczeń ropopochodnych może być stymulowana poprzez dostarczanie do zanieczyszczonego środowiska substancji biogennych, będących składnikami pokarmowymi dla mikroorganizmów zawartych w glebie. Niedobór substancji odżywczych dla mikroorganizmów glebowych stanowi czynnik ograniczający ich metabolizm. Zatem wzbogacenie o nie gleby powoduje przyspieszenie biodegradacji substancji ropopochodnych zawartych w glebie.

Substancje biogenne (związki azotu, fosforu, potasu itp.) mogą być dozowane do gleb jako:

- rozpuszczalne w wodzie minerały: KNO_3 , NaNO_3 , $\text{NH}_4(\text{PO}_4)_3$, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , MgNH_4PO_4 ;

- nawozy oleofilowe, dostarczane do zanieczyszczonego środowiska w postaci granulek pokrytych substancją hydrofobową (parafina, olej roślinny), co pozwala na bezpośrednie przeniesienie substancji biogenych na granicę faz węglowodory–woda;
- nawozy nieorganiczne z powolnym uwalnianiem azotu i fosforu, które umożliwiają ciągle dozowanie substancji biogenych. Zazwyczaj występują w formie tabletkowej, a szybkość uwalniania substancji biogenych jest zależna od powierzchni tabletki. Na uwagę zasługują nawozy, w których substancje biogenne są uwalniane przez błonę na zasadzie osmozy [151, 177, 199, 203].

Doniesienia literaturowe wskazują, że zastosowanie optymalnej dawki substancji biogenych (N:P) w zakresie 5:1–10:1, w postaci nawozów zawierających rozpuszczalne w wodzie minerały, umożliwi znaczne obniżenie zawartości węglowodorów ropopochodnych, w granicach 62–73%, ale nie pozwala na osiągnięcie zadowalającego poziomu zanieczyszczeń (TPH). W celu dalszego obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych wskazane jest wzbogacenie populacji mikroorganizmów zdolnych do degradacji węglowodorów poprzez inokulację gruntu biopreparatami [12, 113, 169].

Badania procesu bioremediacji zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi gruntów metodą *ex situ* (w pryzmach) prowadzone przez Chaîneau umożliwiły obniżenie zawartości TPH o 85–89% z wyjściowego poziomu 18 000 mg/kg, przy dawce substancji biogenych N:P=10:1 i wzroście liczebności mikroorganizmów degradujących węglowodory ropopochodne z $9,5 \times 10^5$ do $1,7 \times 10^7$ jtk/g s.m. [31].

Wyniki badań prowadzonych pod kątem zastosowania nawozów oleofilowych (EAP Inipol-22) i nawozów z powolnym uwalnianiem N i P (Osmocote SRIF) do bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w piasku z plaży przyniosły bardzo pozytywne efekty, gdyż uzyskano obniżenie w granicach: TPH (52–63%), n-C₁₀–n-C₃₅ (78–85%), WWA (38–49%) [217].

Röling w swoich badaniach nad biodegradacją zanieczyszczeń ropopochodnych w procesie bioremediacji stymulowanej dodatkiem nawozu Osmocote, wykorzystując technikę molekularną (PCR–DGGE), oszacował zmiany w bakteryjnej populacji podczas drastycznego zmniejszania różnorodności bakteryjnej poprzez wypieranie gatunków słabszych gatunkami dominującymi. Stymulował również wzrost bakterii degradują-

cych węglowodory ropopochodne poprzez zwiększenie dostępności do azotu i fosforu [149, 150].

Istotnym czynnikiem mogącym ograniczyć biodegradację samoistną może być hydrofobowa natura większości zanieczyszczeń. Proces pobierania substratu przez komórkę bakteryjną zachodzi przez błonę komórkową, zatem dodatek surfaktantu może ułatwić biodegradację, wytwarzając emulsję i pozwalając na zwiększenie powierzchni międzyfazowej faza wodna–substrat, co powoduje wzrost biodostępności i zwiększa tempo biodegradacji [4, 74].

Zadawalające efekty emulgacji można uzyskać poprzez:

- wprowadzenie syntetycznego emulgatora (np. Arkopal N-060, Arkopal N-100, Hosaf-541-KS, Tween-80) – wzrost biodegradacji TPH o 35–46% w stosunku do próbki kontrolnej [7, 98, 219];
- wprowadzenie biosurfaktantów wytworzonych przez mikroorganizmy, które ze względu na budowę chemiczną dzielą się na: glikolipidy, liposacharydy, lipopeptydy, fosfolipidy, kwasy tłuszczowe [140].

Z analizy doniesień literaturowych w zakresie biodegradacji i bioremediacji wynika, że nawożenie zanieczyszczonego gruntu (TPH i WWA) nawozami bogatymi w składniki odżywcze, np. Osmocote o składzie 7,5% N-NO₃, 10,5% N-NH₄, 11% P₂O₅, 10% K₂O, umożliwiło osiągnięcie zawartości C:N:P na poziomie 100:10:1. Badano różne kombinacje nawozów mineralnych o zbliżonym składzie przy jednoczesnej korekcie pH na poziomie 7,6. Spowodowało to uaktywnienie naturalnej flory bakteryjnej i obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych TPH (w tym n-C₁₂–n-C₃₂) w granicach 68–79% w okresie 100 dni. Odpowiednia kombinacja nawozów umożliwia również obniżenie zawartości WWA (2–4-pierścieniowych) o 40–58% [203, 204, 205, 206].

W wyniku prowadzonych monitorowanych badań procesu biodegradacji TPH w glebie o zawartości 18 000 mg/kg zanieczyszczeń ropopochodnych metodą *ex situ* (w przyzmię) przy odpowiednim nawożeniu (N-NO₃ – 2,23 mg/kg, N-NH₄ – 1,12 mg/kg, K–K₂O – 0,2 mg/kg, P–P₂O₅ – 0,02 mg/kg) uzyskano obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) w okresie 480 dni do poziomu 38–524 mg/kg [31].

Realizowane przez wielu autorów badania potwierdziły występowanie problemów związanych z trudnym i skomplikowanym procesem bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych dotyczących: kolejności biodegradacji poszczególnych węglowodorów, wpływu biodostępności węglowodorów na uzyskany efekt oczyszczenia gruntu, toksyczności węglowodorów ropopochodnych na przebieg procesu biodegradacji [31, 35, 145, 192].

W osiągnięciach biotechnologii obiecujące wydaje się zwłaszcza włączenie procesów biologicznego oczyszczania w celu przyspieszenia rozkładu WWA przy użyciu wyselekcjonowanych mikroorganizmów. Do szczególnie aktywnych kultur bakteryjnych zdolnych do biodegradacji WWA należą mikroorganizmy z grupy *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Nocardioides sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Rhodococcus sp.* [59, 69, 168, 170].

Biodegradację zanieczyszczonego gruntu gazowni klasycznej (Bovisa Gasometro, pow. 440 m² – Włochy), którą wyłączono z eksploatacji po 1960 roku, o wysokiej zawartości WWA, prowadzono z wykorzystaniem autochtonicznej flory bakteryjnej [156]. W celu uzyskania wyższej efektywności oczyszczenia gruntu metodą *ex situ* – proces prowadzono w fazie półpłynnej w reaktorach szlamowych, dzięki czemu kontakt pomiędzy mikroorganizmami, zanieczyszczeniami (TPH, WWA), nutrientami i tlenem był łatwiejszy, a ich ciągłe mieszanie przyspieszyło ujednoczenie ziaren w szlamie, zwiększając biodostępność WWA w wyniku rozbijania agregatów glebowych [33, 37, 128, 156].

Po stworzeniu optymalnych warunków (C:N:P = 100:10:1, t = 22°C, pH = 7,6) przeprowadzono bioaugmentację biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych płynnego szlamu w reaktorze i uzyskano obniżenie WWA do poziomu 40–45% w okresie 24 dni.

W celu zwiększenia efektywności biodegradacji WWA, a szczególnie WWA o wyższej liczbie pierścieni (5–6), najbardziej kancerogennych, sporządzono biopreparat na bazie mikroorganizmów autochtonicznych, który wzbogacono o grzyby rodzaju *Pleurotus ostreatus* i *Dichomitus squalens*. Prowadzone badania z udziałem powyższych grzybów wykazały, że posiadają one zdolność wytwarzania enzymów ligninolinowych, odpowiedzialnych za biodegradację WWA w glebie [3, 190, 196].

Wzbogacenie mikroorganizmów autochtonicznych o grzyby rodzaju *Pleurotus ostreatus* powoduje zwiększenie efektywności biodegradacji pięciopierścieniowych WWA (benzo(a)piren (BaP), benzo(a)antracen (BaA) i dibenzo(a,h)antracen (DaA)) w porównaniu z działaniem biopreparatu opartego tylko na bazie mikroorganizmów autochtonicznych [196].

Podobne badania biodegradacji WWA w glebie pochodzącej z terenu gazowni prowadził Sašek ze współpracownikami, stosując do bioaugmentacji biopreparat zawierający kultury bakteryjne *Pseudomonas putida* wzbogacony o grzyby rodzaju *Pleurotus ostreatus* i *Irpex lacteus*. Uzyskał on obniżenie zawartości poszczególnych WWA o 66% w okresie 10 tygodni, szczególnie widoczne dla WWA o wyższej liczbie pierścieni (5-pierścieniowych). Natomiast zawartość benzo(a)pirenu (BaP) obniżyła się o 15% więcej w porównaniu do procesu, w którym zastosowano biopreparat oparty tylko na kulturach bakteryjnych [157].

Zastosowanie w procesach biodegradacji WWA (w zesterzanych glebach) biosurfaktantów – niejonowych środków powierzchniowo czynnych SPCz: Arkopal N-060, Arkopal N-080, Hosaf-541 oraz Tween-80 – ma na celu desorpcję węglowodorów zaadsorbowanych na cząsteczkach materiałów stałych do fazy wodnej, dzięki czemu zwiększa się ich biodostępność dla mikroorganizmów i grzybów zdolnych do biodegradacji [7, 62].

Prowadzone badania biodegradacji WWA w glebie z wykorzystaniem niejonowego środka powierzchniowo czynnego Tween-80, który wzbogacono o grzyby rodzaju *Phanerochaete chrysosporium*, przyniosły zadowalające wyniki. W okresie 26 dni biodegradacji WWA w glebie (proces prowadzono w reaktorze w fazie wodnej przy stosunku gleba:woda 1:10, wzbogaconej o 5 g/dm³ środka Tween-80 i wyżej wymienione grzyby o koncentracji 2×10^7 jkt/cm³ w temp. 37°C) osiągnięto obniżenie zawartości WWA o 86%, w tym: pirenu (Pir) o 76%, chryzenu (CH) o 78%, benzo(a)pirenu (BaP) o 90%, dibenzo(a,h)antracenu (DaA) o 87% i benzo(g,h,i)peryleny (BghiP) o 94%. Na szczególną uwagę zasługuje wysoki stopień biodegradacji zawartości 5–6-pierścieniowych WWA [215]. Na podstawie danych literaturowych w tabeli 2.1 zestawiono optymalny poziom czynników warunkujących proces biodegradacji substancji ropopochodnych.

Tabela 2.1. Czynniki warunkujące biodegradację substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym [72, 190, 192]

Czynniki fizyczne i chemiczne	Poziom optymalny
Budowa chemiczna związku podlegającego biodegradacji	Podatne na rozkład biologiczny są alkanany, natomiast węglowodory aromatyczne i alicykliczne trudno się rozkładają – polichlorobifenyle, polichlorowane dibenzodioksyny, dibenzofurany ulegają biodegradacji tylko w niewielkim stopniu
Stężenie związku	Zależy od rodzaju związku – smary i oleje obecne w gruncie lub wodzie w stężeniu powyżej 10% działają toksycznie
Temperatura	15–45°C
Natlenienie	Większe od 0,2 mg/dm ³ tlenu rozpuszczonego w wodzie oraz minimalna porowatość powietrzna 10%
pH	6,5–8,0

Czynniki fizyczne i chemiczne	Poziom optymalny
Pierwiastki biogenne	C:N:P = 100:10:1
Wilgotność	60–80% całkowitej pojemności wodnej gruntu
Zawartość substancji organicznej	Jak najniższa
Obecność związków toksycznych	Niepożądana jest obecność metali ciężkich, pestycydów i innych związków toksycznych w dużych stężeniach
Czynniki biologiczne	Poziom optymalny
Skład jakościowy i ilościowy mikroflory glebowej	Długie zaleganie substancji ropopochodnych w gruncie powoduje selekcję mikroflory i umożliwia rozwój jedynie gatunków opornych na ich toksyczne oddziaływanie oraz zdolnych do rozkładu węglowodorów
Stopień adaptacji do wykorzystywania węglowodorów	Stopniowe zwiększanie stężenia węglowodorów, z jakimi kontaktuje się mikroflora, umożliwia jej adaptację
Obecność mikroorganizmów zdolnych do aktywnego rozkładu substancji ropopochodnych	Metodami inżynierii genetycznej można uzyskać mikroorganizmy zdolne do rozkładu związków należących do trudno biodegradowalnych

2.1.2.4. Bioaugmentacja

Bioaugmentacja, polegająca na zwiększeniu populacji mikroorganizmów w środowisku gruntowo-wodnym zanieczyszczonym substancjami ropopochodnymi, jest stosunkowo najtańszym sposobem wspomagania samoistnej biodegradacji. Wedle doniesień literaturowych wiele procesów remediacji uwzględnia wykorzystanie kultur obecnych w danym środowisku (mikroorganizmów autochtonicznych), które po wyizolowaniu, wyselekcjonowaniu i namnożeniu służą do opracowania biopreparatu na bazie niepato-

genny mikroorganizmów zdolnych do rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych [109, 153, 167, 181].

Efektywność procesu bioaugmentacji zależy od biodostępności zanieczyszczenia, aktywności wprowadzanych mikroorganizmów oraz fizykochemicznych parametrów zanieczyszczonego gruntu [175, 176].

Mikroorganizmy zdolne do degradacji substancji ropopochodnych

Za przebieg procesu biodegradacji substancji ropopochodnych występujących w gruncie odpowiadają głównie bakterie oraz grzyby. Spośród mikrobiologicznej populacji autochtonicznej, liczącej w strefie aeracji przeciętnie 10^7 – 10^9 komórek w gramie gruntu, ok. 10^5 – 10^6 wykazuje cechy umożliwiające biodegradację, a w sprzyjających warunkach całkowitą mineralizację większości substancji ropopochodnych. Przewodnią rolę odgrywają bakterie należące do rodzaju: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium sp.*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* oraz *Rhodococcus*. Wśród grzybów degradujących substancje ropopochodne w środowisku wodnym należy wymienić: *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*, a w środowisku gruntowym *Trichoderma* i *Mortierella*. W środowisku wodnym bakterie są dominującym elementem populacji drobnoustrojów biorących udział w procesie rozkładu substancji ropopochodnych. Grzyby natomiast odgrywają nieco mniejszą rolę. W gruncie zarówno bakterie, jak i grzyby występują licznie i biorą aktywny udział w biodegradacji substancji ropopochodnych. Znanych jest ponad 30 klas i ponad 100 gatunków mikroorganizmów posiadających zdolność biodegradacji węglowodorów [119, 181].

W tabeli 2.2 przedstawiono listę najczęściej opisywanych w literaturze mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów ropopochodnych (alifatycznych i aromatycznych) [111, 165, 188].

Bakterie, które rozwijają się w warunkach wysokiego stężenia zanieczyszczeń, potrafią przekształcać się w inne formy, takie jak artrobakterie i mikrobakterie, które rozkładając hydrofobowe substancje, powodują obniżenie ich stężenia do wielkości nietoksycznych dla innych mikroorganizmów.

Na przebieg procesu biodegradacji substancji ropopochodnych ma także wpływ wielkość oraz rozkład przestrzenny populacji mikroorganizmów. Mikroorganizmy zdolne do rozkładu substancji ropopochodnych skupiają się w większych ilościach w miejscach skażenia. W korzystnych warunkach mogą one funkcjonować nawet na głębokości 200–300 m pod powierzchnią terenu.

Tabela 2.2. Zestawienie bakterii i grzybów rozkładających poszczególne grupy węglowodorów ropopochodnych – na podstawie doniesień literaturowych

Rodzaj skażenia	Bakterie (rodzaj/gatunek)
Alkany C ₂ –C ₈	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudonocardia sp.</i> [97], <i>Pseudomonas butanovora</i> [101], <i>Desulfosarcina sp.</i> [75]
TPH (alkany C ₁₀ –C ₃₆), oleje, asfalteny	<i>Nocardioides albus</i> , <i>Collimonas sp.</i> , <i>Rhodococcus coprophilus</i> [68], <i>Mycobacterium sp.</i> [36], <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [1, 5, 85, 214], <i>Rhodococcus sp.</i> [195], <i>Pseudomonas stutzeri</i> [104], <i>Pseudomonas spp. Alphaproteobacteria i Betaproteobacteria</i> [141], <i>Flavobacterium i Pseudomonas</i> [83], <i>Acinetobacter baumannii</i> [123], <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> [149], <i>Pseudomonas citronellolis</i> [18], <i>Alcanivorax borkumensis</i> [152], <i>Mycobacterium frederiksbergense</i> IN53 (<i>Actinobacteria, K-strategia</i>) i <i>Acinetobacter sp. IN47 (Gammaproteobacteria, R-strategia)</i> [24], <i>Ochrobactrum sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i> [187]
Węglowodory monoaromatyczne (BTEX) Fenol	<i>Pseudomonas putida</i> F1 [146], <i>Rhodococcus sp. szczep DK17</i> [34, 45, 89], <i>Pseudomonas putida</i> [102, 122], <i>Archaeoglobus fulgidus</i> [198], <i>Bacillus cereus</i> , <i>Achromobacter insolitus</i> [77], <i>Sphingobacterium sp.</i> , <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus cibi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> [28]
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Agmenellum quadruplicatum</i> PR-6 [27], <i>Pseudomonas putida</i> NICB 9816 [209], <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1 [220], <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Gordona sputi</i> [81, 82], <i>Nocardioides sp. szczep KP7</i> [154], <i>Sphingomonas sp.</i> [159], <i>Mycobacterium sp. szczep KR20</i> [147], <i>Mycobacterium sp. szczep PYR-1</i> [124], <i>Pseudomonas putida strain G7</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Sphingomonas sp. szczep R1</i> [184, 186], grupa α -Proteobacteria (<i>Sphingomonas</i> i <i>Azospirillum</i>), grupa γ -Proteobacteria (<i>Xanthomonas</i>), grupa <i>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (Bacteroidetes)</i> [191], <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 [91, 92, 103], <i>Burkholderia sp. szczep RP007</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacteria</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Nocardioide</i> [29, 80], <i>Bacillus thuringiensis</i> FQ1, <i>Pleurotus cornucopiae</i> [79], <i>Micrococcus sp. PHE9</i> , <i>Mycobacterium sp. NJS-P</i> [212], <i>Pseudomonas sp.</i> [58], <i>Pseudomonas stutzeri</i> GQ-4 szczep KF453954, <i>Pseudomonas SZ-2</i> szczep KF453956, <i>Bacillus SQe2</i> szczep KF453961 [200], <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> [32], <i>Stenotrophomonas sp.</i> [182], konsorcjum bakterii: <i>Achromobacter sp. BAB239</i> , <i>Pseudomonas sp. DV-AL2</i> , <i>Enterobacter sp. BAB240</i> , <i>Pseudomonas sp. BAB241</i> [133], <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Brevundimonas sp.</i> [202], <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> [22], <i>Streptomyces sp.</i> [11], <i>Staphylococcus warneri</i> i <i>Bacillus pumilus</i> [126], <i>Pseudomonas aeruginosa</i> szczep RS1 [58], <i>Mycobacterium sp. i Sphingomonas sp.</i> [216], <i>Fusarium solani</i> [201]

Podatność substancji ropopochodnych na rozkład mikrobiologiczny zależy głównie od ich budowy chemicznej. Węglowodory alifatyczne są zwykle łatwiej degradowane niż aromatyczne, długołańcuchowe parafiny łatwiej niż krótkołańcuchowe, związki nasycone łatwiej niż nienasycone, a nierozgałęzione szybciej od rozgałęzionych. Cykloalkany, węglowodory wielopierścieniowe, związki o strukturach nafteno-aromatycznych, asfalteny i inne ciężkie frakcje są słabo biodegradowalne [55, 106].

Substancje organiczne można podzielić ze względu na ich podatność na biodegradację, dla danego typu mikroorganizmów, na grupy:

- użyteczne natychmiast jako źródło węgla lub energii;
- użyteczne po okresie aklimatyzacji;
- słabo lub niepodatne na biodegradację (ksenobiotyki).

Węglowodory ropopochodne są podatne na biodegradację w stopniu zależnym od ich właściwości fizycznych i chemicznych, np. budowy i ciężaru cząsteczkowego, rozpuszczalności w wodzie, prężności par, powinowactwa względem gleby, stałej podziału oktanol-woda. Podczas jednoczesnego rozkładu różnych rodzajów węglodorów każdy z nich może wpływać na szybkość biodegradacji pozostałych (efekt synergiczny). Obecność substancji toksycznych może obniżać tempo biodegradacji lub efektywnie wpływać na aktywność populacji mikroorganizmów [178].

Kolejnym ważnym parametrem decydującym o przebiegu i powodzeniu procesów biologicznego oczyszczania wód i gruntów jest biodostępność substratu będącego źródłem węgla dla mikroorganizmów.

Substancje ropopochodne, które przedostały się do gruntu, często są trudno dostępne dla mikroorganizmów. Biodostępność ograniczona jest niską rozpuszczalnością substancji ropopochodnych w wodzie oraz tendencją do wiązania się ich z materią organiczną gleby. Sorpcja w glebie lub parowanie substancji ropopochodnych redukują poziom ich stężenia w środowisku gruntowo-wodnym i szybkość biodegradacji. Przy niskich stężeniach substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym może nawet dojść do obumarcia populacji, czego następstwem jest zatrzymanie się procesu biodegradacji. Nadmiar substancji ropopochodnych w wodzie może być z kolei toksyczny dla mikroorganizmów i może doprowadzić do zahamowania biodegradacji. W tym przypadku sorpcja, obniżając stężenie substancji ropopochodnych, wspomaga ich biodegradację [117].

Obecnie coraz częściej prowadzi się badania nad przyspieszeniem biodegradacji węglodorów ropopochodnych na drodze procesów biotechnologicznych przy wykorzystaniu efektywnych kultur bakteryjnych uprzednio wyizolowanych z silnie skażonych

środowisk. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz wysoką skuteczność metody biologiczne znajdują praktyczne zastosowanie na skalę techniczną [50, 156, 174].

W literaturze przedstawiono szereg badań procesów biodegradacyjnych BTEX i WWA z wykorzystaniem grzybów. Prenafeta-Boldu i jego współpracownicy [142, 143] prowadzili badania nad wykorzystaniem grzyba *Cladophialophoria sp.* do mineralizacji węglowodorów monoaromatycznych (BTEX), które wykazały, że rozkład taki przebiega z wyższą dynamiką dla toluenu, etylobenzenu i m-ksylenu niż dla benzenu. Dopiero wprowadzenie bakterii rodzaju *Rhodococcus sp.* znacznie przyspieszyło przebieg procesu mineralizacji benzenu. Metaboliczne profile i inhibitory wzajemnego współdziałania natury wskazują, że toluen, etylobenzen, m-ksylen zostały zdegradowane w bocznym łańcuchu przez ten sam enzym monoooksygenazy.

Biodegradacja WWA znacznie efektywniej przebiega po wzbogaceniu biopreparatu zawierającego bakterie *Pseudomonas putida* o grzyby *Pleurotus ostreatus* i *Irpex lacteus*. Szczególnie widoczne jest zwiększenie biodegradacji dla 5–6-pierścieniowych węglowodorów aromatycznych, w przypadku których zaobserwowano wzrost obniżenia ich zawartości o 16–19% [63, 120, 157].

Prowadzone były także badania procesu biodegradacji WWA biopreparatami sporządzonymi na bazie mikroorganizmów autochtonicznych wzbogaconych o grzyby rodzajów *Dichomitus squalens* i *Pleurotus ostreatus*. Osiągnięto zadowalające efekty mineralizacji WWA, szczególnie widoczne dla 5- i 6-pierścieniowych WWA, stosując biopreparat na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i powyższych grzybów [166, 196].

Do znanych grzybów posiadających zdolności biodegradacji związków aromatycznych (BTEX, WWA) należy zaliczyć *Phanerochaete chrysosporium* [208, 215]. Współdziałanie pomiędzy grzybami a bakteriami jest korzystne dla przebiegu procesu mineralizacji węglowodorów ropopochodnych. Wymienione grzyby posiadają metaboliczną pojemność biodegradacji BTEX i WWA, podobną w wielu aspektach do bakterii. Z tego względu grzyby nie powinny zostać zignorowane w rozwoju skutecznych strategii bioremediacji.

Połączenie technik molekularnych w badaniach środowiskowych z technikami tradycyjnymi (metody hodowlane i mikroskopowe) pozwala nie tylko na zebranie informacji na temat różnorodności populacji mikroorganizmów, ich składu oraz na identyfikację dominujących zespołów mikroorganizmów, ale również na uchwycenie zmian w ich składzie ilościowym i jakościowym podczas biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w różnych elementach środowiska [135].

Metody identyfikacji oparte na badaniu homologii kwasów nukleinowych należą do najnowocześniejszych i stają się coraz bardziej powszechne. Sekwencja nukleotydów w łańcuchu kwasu nukleinowego jest charakterystyczna dla danego gatunku organizmu, określenie stopnia podobieństwa fragmentu DNA lub RNA badanego mikroorganizmu w odniesieniu do wzorca wiadomego pochodzenia umożliwia identyfikację [110].

W analizie homologii DNA stosuje się technikę PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), polegającą na enzymatycznej amplifikacji (zwiększeniu) *in vitro* sekwencji nukleotydów specyficznej dla danego organizmu. Łańcuchowa reakcja polimerazy może być stosowana do zwiększenia ilości DNA identyfikowanego mikroorganizmu w konkurencyjnie krótkim czasie w stosunku do metod namnażania biomasy drobnoustrojów. Wyizolowany DNA identyfikowanego mikroorganizmu poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych, a następnie dokonuje się amplifikacji wybranej sekwencji za pomocą syntetycznych nukleotydów (primerów – starterów reakcji). Wielokrotne powtarzanie procesu pozwala na otrzymanie wielu kopii DNA komplementarnych do fragmentu wyselekcjonowanego za pomocą primera i na identyfikację gatunku drobnoustroju.

Do nowoczesnych technik biologii molekularnej należą: elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w gradiencie denaturującym (DGGE) lub gradiencie temperatury (TTGE), analiza polimorfizmu konformacyjnego DNA jednoniciowego (SSCP), analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (T-RELP), analiza sekwencji fragmentu DNA zlokalizowanego pomiędzy bakteryjnymi genami 16S rRNA i 23S rRNA (ARISA), analiza restrykcyjna r-DNA amplifikowanego techniką PCR (ARDRA), hybrydyzacja *in situ* sond fluorescencyjnych z RNA (FISH).

Badania pod kątem zmian ilościowych i jakościowych mikroorganizmów podczas biodegradacji stymulowanej nutrietami (PCR-DGE) prowadzono z wykorzystaniem technik biologii molekularnej [26, 149]. Bordenave i współpracownicy [19] wykorzystali technikę T-RELP do badań nad obecnością i zmianami mikroorganizmów w zestarzałych matach biologicznych zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. W aspekcie zmian populacji mikroorganizmów w trakcie bioremediacji gleby zanieczyszczonej ciężkim olejem i WWA – techniką ARDRA wykorzystali również Röling i Chadhain [29, 150]. W innych badaniach przedmiotem rozważań była społeczność mikroorganizmów beztlenowych występująca w asfaltach i dołach smołowych (pH 3–5), oznaczona techniką PCR-DGGE [90, 184].

Badania molekularne w połączeniu z tradycyjnymi metodami biologicznymi są pomocne przy doborze właściwych mikroorganizmów będących podstawą konsorcjum bakteryjnego [6].

Liczba bakterii rozkładających węglowodory ropopochodne w środowisku glebowym jest znacząca, jednakże poszczególne mikroorganizmy mogą metabolizować ograniczony zakres węglowodorów. Z tego względu do rozkładu wieloskładnikowego układu, jakim jest ropa naftowa, zdolne są mieszaniny kultur mikroorganizmów o rozbudowanym wyposażeniu enzymatycznym. W celu uniknięcia antagonistycznego oddziaływania mikroflory autochtonicznej gleby na obce kultury drobnoustrojów nieprzystosowanych do danego środowiska preferuje się sporządzanie konsorcjów bakteryjnych – biopreparatów na bazie uprzednio wyizolowanych z gleby mikroorganizmów autochtonicznych.

O biodegradacji węglowodorów ropopochodnych decydują mechanizmy ich transportu z ośrodka porowego na powierzchnię komórki oraz ich dalszej penetracji przez błonę cytoplazmatyczną, która stanowi półprzepuszczalną przegrodę i odpowiada za wymianę substancji między komórką a środowiskiem. Węglowodory ropopochodne należą do substratów trudno przyswajalnych ze względu na swój lipidowy charakter i ograniczoną rozpuszczalność w wodzie, jednakże mikroorganizmy wykształciły kilka podstawowych mechanizmów, dzięki którym są zdolne do wykorzystywania węglowodorów w charakterze substratu pokarmowego [9].

Biodegradacji mogą ulegać węglowodory ropopochodne rozpuszczone w wodzie, z szybkością zależną od tempa ich przechodzenia z innych faz do fazy rozpuszczonej. Pozostałe mechanizmy umożliwiają mikroorganizmom rozkład węglowodorów zawieszonych w postaci drobnych kropeł miceli w roztworach wodnych. Krople większe od komórek są rozkładane przez bezpośredni kontakt bakterii z zawieszonymi w wodzie cząstkami niepolarnych związków organicznych. Na ich powierzchni rozwija się populacja mikroorganizmów i w miejscu kontaktu dochodzi do przechodzenia węglowodorów przez błonę cytoplazmatyczną (pseudosolubilizacja). Wytworzone przez mikroorganizmy metabolity zewnątrzkomórkowe o charakterze surfaktantów zmniejszają wymiary cząstek węglowodorów ropopochodnych poniżej 1 μm dla umożliwienia ich penetracji do wnętrza komórki. W przypadku węglowodorów słabo rozpuszczalnych w wodzie – następuje rozwój kolonii na ich powierzchni i formowanie się aglomeratów zawierających klastry mikroorganizmów i węglowodorów, co ułatwia przenikanie substratu przez błonę komórkową [118].

Transport substratów i metabolitów przez błonę komórkową może odbywać się na drodze dyfuzji prostej (biernej), uwarunkowanej różnicą stężeń lub potencjału wewnątrz i na zewnątrz komórki, bez potrzeby pobudzenia membrany komórkowej i zużycia zasobów energetycznych komórki, oraz przy udziale permeaz – swoistych przenośników (białka transportujące) dla różnych substratów – tzw. transport aktywny. Transport aktywny następuje wbrew gradientowi stężeń przenoszonych substancji i przebiega z wy-

datkowaniem energii (na 1 cząsteczkę przypada 1 mol ATP) [159]. Ponadto występuje tzw. dyfuzja ułatwiona, która też zachodzi przy udziale białek transportowych, ale z zachowaniem gradientu stężeń i bez użycia energii przez komórkę. W zależności od danego rodzaju mikroorganizmów transport węglowodorów może przebiegać zgodnie z jednym z powyżej przedstawionych mechanizmów lub może być ich kombinacją. Wytwarzane przez komórki mikroorganizmów biosurfaktanty mają wpływ na ich hydrofobowość oraz odgrywają znaczącą rolę w ich adhezji do węglowodorów. Do mikroorganizmów wytwarzających biosurfaktanty przykładowo można zaliczyć: *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter paraffineus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium spp.*, *Bacillus brevis*, *Serratia marcescens*, *Penicillium spiculisporum*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Sphingomonas paucimobilis* [17, 186].

2.1.2.5. Fitoremediacja

W przywracaniu wartości użytkowych terenów coraz większe znaczenie odgrywają metody fitoremediacyjne, wykorzystujące naturalną aktywność roślin przy wzroście do pobierania składników, w tym też zanieczyszczających środowisko przyrodnicze. Metody fitoremediacyjne są wolniejsze, ale bezpieczne, skuteczne, a ponadto ekonomicznie uzasadnione w porównaniu z innymi technologiami [65].

Istnieje wiele publikacji, w których autorzy próbują dogłębnie poznać proces fitoremediacji, głównie poprzez zrozumienie złożonych interakcji w oddziaływaniu ryzosfery i części nadziemnej rośliny, które pozwalają na akumulację zanieczyszczeń (m.in. metali ciężkich, substancji ropopochodnych) w roślinach (fitoakumulacja) [131].

Zawartość w glebach metali ciężkich, substancji ropopochodnych czy WWA w nadmiernych ilościach jest toksyczna dla poszczególnych gatunków roślin. Związki te ograniczają ich wzrost (zarówno części nadziemnych, jak i korzeni), prowadzą do różnego rodzaju nekroz, a w konsekwencji do obumierania poszczególnych tkanek. Są jednak gatunki, które tolerują, a czasem wręcz lepiej rozwijają się w obecności znacznych ilości substancji uznawanych za niebezpieczne. Znane są gatunki gromadzące 1–5% metali w tkankach (tzw. hiperakumulatory), nierzadko jednak ich praktyczna przydatność jest ograniczona ze względu na niewielkie plony biomasy, co w efekcie uniemożliwia efektywne użycie ich w procesach bioremediacji.

Technologie fitoremediacji opierają się na wykorzystaniu roślinnych mechanizmów tolerancji na wybrane zanieczyszczenia zawarte w glebie. Do procesów oczyszczania gleb z zanieczyszczeń przez rośliny i związane z nimi mikroorganizmy ryzosferyczne zaliczyć należy fitostabilizację i fitoakumulację (fitoekstrakcja). Fitostabilizacja polega na uniknięciu

przenikania toksyn do wnętrza rośliny i ograniczeniu ich transportu do pędów. Natomiast w procesie fitoakumulacji toksyna jest akumulowana w dużych ilościach w tkankach roślin [60, 73, 94]. Nieco mniej rozpowszechnionymi technologiami fitoremediacyjnymi są:

- fitostymulacja – wspomaganie przez rośliny naturalnie występujących procesów degradacji mikrobiologicznej w ryzosferze;
- fitodegradacja – rozkład substancji organicznych przez rośliny i związane z nimi mikroorganizmy;
- fitowolatyżacja – przeprowadzenie zanieczyszczeń w stan lotny (w ten sposób mogą być odparowywane rtęć, selen, arsen oraz lotne węglowodory).

Fitostabilizacja może być stosowana na silnie zanieczyszczonych obszarach. Technologia ta wykorzystuje mechanizmy roślinne prowadzące do zmniejszenia biodostępności toksycznych składników gleby, a więc zmniejsza zdolność migracji zanieczyszczeń, co z kolei minimalizuje ryzyko przedostania się ich do wód gruntowych.

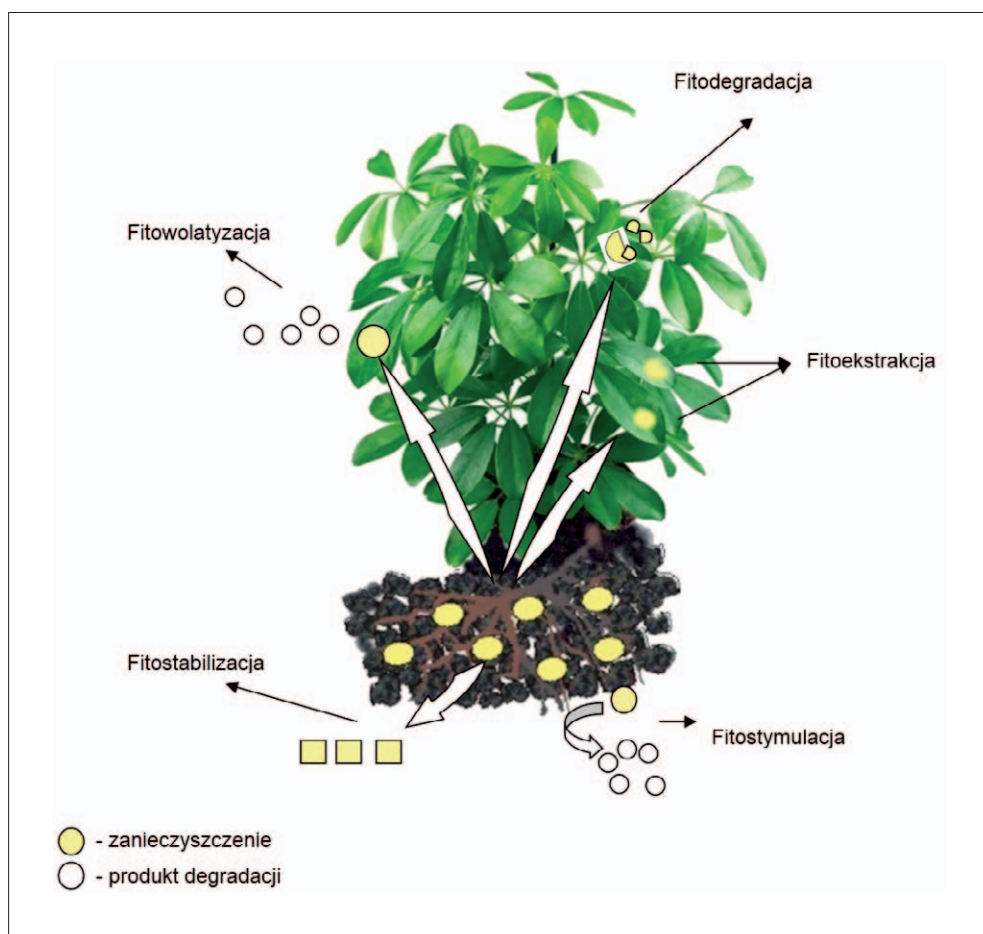
Fitoekstrakcja natomiast oparta jest na roślinach zdolnych do pobierania, akumulacji lub degradacji zanieczyszczeń zarówno nieorganicznych, jak i organicznych, w konsekwencji czego następuje oczyszczenie skażonej gleby, a pierwiastki śladowe zostają skoncentrowane w roślinach. Stopień bioakumulacji szkodliwych substancji w roślinie zależy od wielu czynników, jak np. rodzaju i ilości zanieczyszczeń w glebie, zawartość materii organicznej, wilgotności gleby, jej pH oraz gatunku rośliny. Na rysunku 2.4 przedstawiono schemat rodzajów fitoremediacji.

Rośliny najczęściej wykorzystywane w procesie bioakumulacji należą do wielu rodzin, z których na szczególną uwagę zasługują: krzyżowe (*Cruciferae*), trawy (*Poaceae*), motylkowate (*Papilionaceae*), złożone (*Asteraceae*), wierzbowate (*Salicaceae*) oraz goździkowate (*Caryophyllaceae*).

Spośród technik fitoremediacji najbardziej rozpowszechnioną i opłacalną jest fitoekstrakcja. Stosuje się ją nie tylko do przywracania wartości użytkowych gleb skażonych metalami ciężkimi czy substancjami ropopochodnymi, ale również do usuwania z gleb zanieczyszczeń pierwiastków radioaktywnych. Efektywność tego procesu zależy od wyboru rośliny, a do najbardziej wydajnych należą: gorczyca, tobołki, wiele gatunków traw i roślin motylkowatych. Wadą niektórych gatunków (np. tobołków) jest bardzo niski plon biomasy.

Z uwagi na wielostronne zastosowanie tzw. gatunków alternatywnych (rekułtywacja i stabilizacja terenów skażonych, bioakumulacja metali ciężkich oraz wykorzystanie do produkcji bioenergii) na szczególną uwagę zasługują: wierzba wiciowa (*Salix viminalis*),

z rodziny traw – kostrzewa trzcinowa (*Festuca arundinacea* Schreb.), mozga trzcinowata (*Phalaris arundinacea* L.), rajgras wyniosły (*Arrhenatherum elatius* (L.) P.B. ex J. et C. Presl), perz wydłużony (*Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey), proso różgowe (*Panicum virgatum* L.), palczatka Gerarda (*Andropogon gerardii* Vitm.), miskant cukrowy (*Miscanthus sacchariflorus* Hack.) oraz z rodziny złożonych: sałata kompasowa (*Lactuca serriola* L.), bylica zwyczajna (*Artemisia vulgaris* L.), nawłocie: kanadyjska (*Solidago canadensis* L.) i późna (*S. serotina* Aiton), psianka czarna (*Solanum nigrum* L.), nostryk żółty (*Melilotus officinalis*) [15, 94, 125].



Rys. 2.4. Rodzaje fitoremediacji

W przypadku zanieczyszczenia gleb substancjami ropopochodnymi z powodzeniem stosuje się tzw. naftofity, które tolerują duże ich zawartości. Rośliny te absorbują, kumulują i metabolizują węglowodory wchodzące w skład ropy naftowej. Właściwościami takimi charakteryzują się rośliny z gatunku traw, m.in. *Festuca arundinacea*, *Panicum sp.*, *Medicago sativa* czy *Eleusine indica*.

Wielkie zagęszczenie komórek bakteryjnych w warstwie przylegającej do korzenia tworzy pewnego rodzaju filtr, przez który przechodzą do rośliny związki chemiczne w postaci niezmienionej lub zmetabolizowanej mikrobiologicznie. Zdolność drobnoustrojów do transformowania związków niedostępnych dla rośliny na skutek złożonej struktury chemicznej oraz związków o charakterze toksycznym nadaje drobnoustrojom rolę ochronną w stosunku do rośliny. Z drugiej zaś strony bakterie wytwarzające różnego rodzaju antybiotyki chronią roślinę przed fitopatogenami. Obok przeważnie korzystnych elementów we współżyciu roślin z drobnoustrojami istnieje problem nadmiernej aktywności w tym systemie, kiedy to drobnoustroje stają się konkurentami roślin w wykorzystaniu substancji pokarmowych.

Do procesów fitostabilizacji wykorzystywane są gatunki roślin mające zdolność do obniżania bioprzyswajalności substancji toksycznych w glebie poprzez wydzielanie związków do ryzosfery. Eksudaty korzeniowe (np. związki fenolowe, kwasy organiczne) reagują z jonami metali i wytrącają je w postaci nierozpuszczalnych soli. Następnie wiążą je w ścianie komórkowej i gromadzą w apoplacie oraz w wakuolach.

Spośród danych literaturowych opisujących możliwość zastosowania procesów fitoremediacyjnych do oczyszczania skażonych gleb na szczególną uwagę zasługują te, które przedstawiają pozytywne efekty ich oczyszczania zarówno z substancji ropopochodnych, jak i metali ciężkich.

Doni oraz jego współpracownicy badali możliwości oczyszczania gleb zanieczyszczonych metalami, takimi jak: Pb, Cr, Cd, Zn, Cu i Ni, związkami organicznymi: polichlorobifenylami oraz węglowodorami ropopochodnymi, opierając się na procesie fitoremediacji wykorzystującej topolę czarną (*Populus nigra Italica*). W wyniku prowadzonego przez 1 rok eksperymentu uzyskano redukcję 80% całkowitej masy węglodorów naftowych (TPH) oraz 60% polichlorobifenyli i metali ciężkich [49].

Fitoremediację testowano też w celu usunięcia kancerogennych WWA z zestarzałej gleby. W wyniku procesu trwającego 18 miesięcy znacznie obniżono zawartości 3–4-pierścieniowych WWA, których stopień redukcji w glebie zależny był od ich koncentracji, a ta zmieniała się wraz z głębokością [163].

Zastosowanie w procesach fitoremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi rośliny z grupy *Bermuda grass* umożliwiło obniżenie zawartości TPH

po 6 miesiącach o 49%, zaś po 1 roku o 68%. Podobny efekt obniżenia zawartości TPH w glebie (62%) uzyskano przy wykorzystaniu rośliny z grupy *Tall fescue* [73].

Najkorzystniejsze rezultaty oczyszczania gleb w procesach remediacji wynikają z połączenia procesów nawożenia i fitoremediacji przy ciągłej kontroli przebiegu procesów [132]. Sukces procesów fitoremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi odnotowano m.in. w redukcji [13, 39, 60, 73, 108, 193]:

- bituminów – po 27 miesiącach ich zawartość (79 700 mg/kg gleby) zredukowano o 82% (*Medicago sativa*, *Phragmites australis*), a dla kontrolnej gleby o 74%;
- WWA – po 24 miesiącach ich zawartość (79,8 mg/kg gleby) zredukowano o 74,5% (*Medicago sativa*), 68,7% (*Phragmites australis*), a dla kontrolnej gleby o 44,5%;
- substancji ropopochodnych – po dwóch okresach wegetacyjnych ich zawartość (7000 mg/kg gleby) zredukowano o: 56% (*Elymus angustus*), 50% (*Agropyron elongatum*), 43,5% (*Medicago sativa*) i 31% dla gleby kontrolnej;
- substancji ropopochodnych – po 150 dniach ich zawartość (5000 mg/kg gleby) zredukowano o 60% (*Festuca arundinacea*), natomiast w próbie kontrolnej o 20%;
- substancji ropopochodnych – po 90 dniach zredukowano o 40% (z 7900–17 900 mg/kg do 1400–3700 mg/kg) (*Seepweed*);
- oleju napędowego – po 12 miesiącach jego zawartość (40 000 mg/kg osadu) zredukowano o 89,7% (n-alkany) i 97% (WWA) (*Juncus roemerianus*), natomiast w próbie kontrolnej o 20,3% (n-alkany) oraz 15,2% (WWA).

Ponadto w artykule [163] wykazano wymierną szybkość degradacji bądź biotransformacji WWA podczas wzrostu na zanieczyszczonych glebach: czarnej wierzby (*Salix nigra* Marshall), topoli (*Populus deltoides* x *P. nigra* DN 34) oraz jesionu (*Fraxinus pennsylvanica* Marshall) w porównaniu z glebą kontrolną. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że wiele roślin może wzmacniać rozkład węglowodorów w glebie. Z kolei w procesie fitoekstrakcji, podczas badań prowadzonych na glebach zanieczyszczonych WWA, odnotowano przedostawanie się tych węglowodorów do systemu korzeniowego rośliny [52, 60].

W warunkach zanieczyszczenia gleby rośliny mogą działać jako czynniki utrzymujące i/lub stymulujące zwiększenie ilości mikroorganizmów glebowych, powodując intensyfikację procesów jej samooczyszczania. Gleba porośnięta roślinnością ma wyższy wskaźnik redukcji zanieczyszczeń niż gleba bez roślin.

Wymierne efekty procesu fitoremediacji, przy zastosowaniu wzrostu trzciny pospolitej (*Phragmites communis*) oraz amarantusa, odnotowano również podczas oczyszczania gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi oraz metalami ciężkimi (Pb, Cu, Cd, Ni) [88, 179, 180].

Obecność wydzielin korzeniowych (eksudatów) zawierających cukry, aminokwasy, kwasy organiczne, humusy, witaminy oraz związki o dużej masie cząsteczkowej, takie jak białka i spolimeryzowane węglowodory, sprawia, że strefa korzeniowa (ryzosfera) roślin jest dogodnym środowiskiem do rozwoju mikroorganizmów. Z ryzosfery wyizolowano bakterie charakteryzujące się zdolnością rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych: *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas yanoikuyae*, *Comamonas testosteroni* [41]. Ponadto penetracja systemu korzeniowego poprawia stosunki powietrzno-wodne. Uwalniane przez rośliny wydzieliny korzeniowe działają sprzyjająco na cząstki glebowe, w wyniku czego tworzą się agregaty istotne dla utrzymania prawidłowej struktury gleby. W ryzosferze zmienia się również pH, stężenie substancji mineralnych, koncentracja tlenu, potencjał redox, wilgotność. Roślina stwarza korzystne warunki stymulujące bioremediację. Biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) podczas procesu bioremediacji można stymulować poprzez kontrolę poziomu zawartości azotu i fosforu w ryzosferze traw i koniczyn [47, 108].

W wielu pracach dotyczących fitoremediacji stwierdzano, że w ryzosferze szczególnie intensywnie zachodzą także procesy kometaboliczne rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH i WWA). Prowadzone badania roli ryzosfery roślin jedno- i dwuliściennych wykazały, że stopień usunięcia węglowodorów alifatycznych niepolarnych (TPH) wynosił 64%, natomiast WWA (trójpierścieniowych) 60,2% [116].

Zadowolające wyniki osiągnięto również podczas 9-miesięcznej fitoremediacji przy zastosowaniu koniczyny (*Festuca arundinacea* Schreb.) i nostrzyka (*Melilotus officinalis* Lam.), gdyż w zanieczyszczonych glebach obniżono zawartość WWA: 2-pierścieniowych o 41,5–83,5%; 3-pierścieniowych o 53,2–66,3%; 4-pierścieniowych o 28,4–45,2%; 5-6-pierścieniowych o 7,9–26,3%. Zbieżne wyniki badań z wykorzystaniem koniczyny (*Lolium perenne*) w swoich pracach przedstawił Olson [128].

Doniesienia literaturowe wskazują na dużą skuteczność fitoremediacji w przypadku zestarzałych gruntów z klasycznych gazowni, skażonych zanieczyszczeniami ropopochodnymi, szczególnie WWA, charakteryzującymi się właściwościami rakotwórczymi, niską

rozpuszczalnością w wodzie i silnymi cechami sorpcyjnymi w stosunku do matrycy glebowej. Przy wykorzystaniu do fitoremediacji hybrydowych topoli (*Populus deltoides x nigra DN*) oraz wierzby (*Salix nigra Marshall*) w strefie ryzosfery redukcja zanieczyszczeń wynosiła odpowiednio dla: pirenu – 45,2%; fluorantenu – 39,3%; benzo(a)pirenu – 28,3%; fenantrenu – 32,3%; antracenu – 45,2% [128].

Fitoremediacja zachodzi najintensywniej w strefie korzeniowej, a więc głębokość wrastania korzeni stanowi jeden z najważniejszych czynników ograniczających jej zasięg. Ponadto ważne są warunki środowiskowe w skażonej glebie, a dotyczy to w szczególności toksyczności wynikającej ze stężenia zanieczyszczeń. Do tej pory brakuje konkretnych danych na temat maksymalnego dopuszczalnego stężenia produktów ropopochodnych, gdyż doświadczenie fitoremediacyjne prowadzono na glebach zawierających stosunkowo niskie stężenia tych związków.

2.1.2.6. Obróbka agrotechniczna (*landfarming*)

Obróbka agrotechniczna należy do najczęściej stosowanych metod usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntów, które utraciły agrotechniczną sprawność. W warunkach *in situ* może być wykorzystywana w ograniczonym zakresie, tj. w przypadku występowania zanieczyszczenia do głębokości 0,5 m. Polega ona na stymulacji biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych poprzez stosowanie zabiegów agronomicznych, do których należą: orka, bronowanie, wapnowanie, nawożenie (dodatek substancji biogennej), nawadnianie w okresie suszy. Czasami wprowadza się modyfikację wykonywanych zabiegów poprzez inokulację biopreparatami na bazie mikroorganizmów degradujących węglowodory ropopochodne, które zostały wyizolowane i namnożone z oczyszczanych gruntów i osadów dennych [7, 105].

Metoda ta może być prowadzona także w warunkach *ex situ*. Stałe zanieczyszczone odpady umieszcza się na podłożu z przepuszczalnego piasku, z drenażem przyjmującym i odprowadzającym odcieki. Optymalna grubość warstwy nakładanych odpadów wynosi 30–40 cm. Zależnie od chemicznych właściwości odpadów reguluje się zawartość mineralnych składników pokarmowych (nawozowych) i odczynu środowiska. Nadmierna kwasowość gleb neutralizowana jest poprzez dodatek wapna nawozowego, które w zaolejonych glebach poprawia odczyn (pH 6,5–7,0), wpływając na uaktywnienie mikroflory bakteryjnej gleby oraz przyspieszenie rozkładu substancji organicznych. W tym celu nakłada się warstwę wapna nawozowego o grubości 10–20 dm³ na 1 m³ zaolejonego gruntu. W celu przyspieszenia biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych można także przeprowadzić modyfikację metody poprzez wprowadzenie biopreparatów bakteryjnych [162].

2.1.2.7. Pryzmy remediacyjne (kompostowanie)

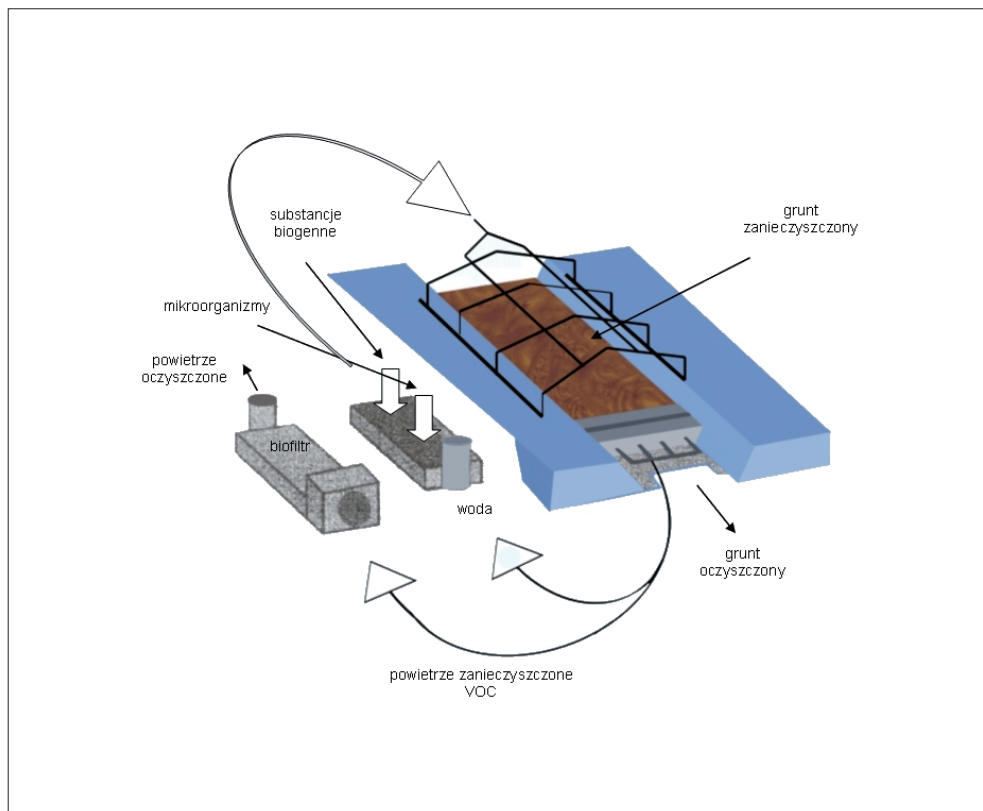
Metoda *ex situ* oczyszczania zanieczyszczonego gruntu w drodze kompostowania polega na przetransportowaniu i ułożeniu go w pryzmie, która zostaje technicznie uzbrojona w system drenaży do napowietrzania i odprowadzania odcieków, spryskiwacze dozujące substancje biogenne oraz bioreaktory do namnażania bakterii. Odebrane odcieki są biologicznie oczyszczane i zwracane na pryzmę.

Oczyszczony grunt jest stopniowo usuwany z pryzmy i umieszczany na miejscu składowania [31, 96, 140]. Kompostowanie to proces zbliżony, lecz prowadzone jest w warunkach stałego mieszania wszystkich składników. Ponadto wykorzystuje się materiały poprawiające strukturę (np. wióry, słoma) w celu poprawy stosunków powietrzno-wodnych. Na rysunku 2.5 przedstawiono schemat instalacji pryzmy do prowadzenia procesu remediacji zanieczyszczonej gleby w systemie Cum-Bac [2].

2.1.2.8. Metoda bioreaktorowa

Bioremediacja gruntów w warunkach *ex situ* może polegać na ich wydobyciu i unieszkodliwianiu w bioreaktorach szlamowych, gdzie zachodzi proces biodegradacji zanieczyszczeń. Oczyszczanie w bioreaktorach odbywa się w wyniku reakcji biochemicznych zachodzących w zmieszonym z wodą gruncie (uwodnienie 60–80%). W bioreaktorze następuje intensywne napowietrzanie i mieszanie zawiesiny z dodatkiem substancji biogennej i biopreparatów bakteryjnych. Często w celu desorpcji węglowodorów ropopochodnych nierozpuszczalnych w wodzie dodawane są środki powierzchniowo czynne. W metodzie tej istnieje możliwość regulacji temperatury i pH oraz pełnej kontroli przebiegu procesu, co pozwala na znaczne skrócenie czasu prowadzenia procesu w porównaniu z metodami *in situ*. Bioreaktory stosuje się najczęściej do oczyszczania mułów, osadów dennych, ściekowych i zawiesin zaolejonych, a także zanieczyszczonych pestycydami, PCB oraz niektórymi węglowodorami chlorowanymi gleb.

Alternatywnym sposobem w stosunku do stosowanych metod biochemicznych w bioreaktorach jest utlenianie chemiczne. Jako utleniacze wykorzystuje się często podchloryn oraz nadtlenek wodoru. Wysoką efektywność chemicznego utleniania można uzyskać w przypadku fenoli, amin, aldehydów, związków siarki. Zastosowanie tej metody w przypadku gruntu ograniczone jest obecnością trudnych do rozdzielania składników oraz olejów i smarów, negatywnie wpływających na efektywność utleniania [23, 156].



Rys. 2.5. Schemat instalacji przyzmy do prowadzenia procesu remediacji gleby w systemie Cum-Bac [2]

2.2. Metody oceny biodegradacji substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym

Do najczęściej stosowanych metod oceny biodegradacji substancji w środowisku gruntowo-wodnym należą: badania mikrobiologiczne, enzymatyczne, badania toksykologiczne oraz respirometryczne.

2.2.1. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne polegają na identyfikacji i pomiarze liczebności bakterii oraz grzybów bytujących w środowisku badanego gruntu. Wstępna analiza ogólnej ilości bakterii heterotroficznych oraz liczby mikroorganizmów zdolnych do rozkładu substancji ropopochodnych dostarcza niezbędnych informacji na temat aktywności biologicznej gruntu. Rezultaty analiz mikrobiologicznych pozwalają stwierdzić, czy ilość mikroorganizmów w zanieczyszczonym gruncie jest odpowiednia do prawidłowego przebiegu biodegradacji. Ponadto stosunek ilości bakterii rozkładających substancje ropopochodne do ogólnej liczby mikroorganizmów heterotroficznych odzwierciedla, w jakim stopniu mikroflora autochtoniczna jest przystosowana do biodegradacji zanieczyszczenia i z jaką efektywnością wykorzystuje substancje ropopochodne jako źródło węgla i energii. Analizy mikrobiologiczne pozwalają na stwierdzenie bądź wykluczenie obecności mikroorganizmów patogennych, jak również mogą stanowić narzędzie monitoringu i kontroli biodegradacji substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym.

Badania mikrobiologiczne najczęściej obejmują:

- ocenę morfologii mikroorganizmów: kształt i barwa kolonii wyrosłych na podłożu agarowym, a także grzybni (plechy) grzybów i pseudogrzybni promieniowców;
- techniki mikroskopowe: kształt komórek, konidioforów i konidiów, ocena ruchliwości, barwienie metodą Grama (fiolet krystaliczny, jodyna Grama, alkohol etylowy 95% i fuksyna karbolowa), Ziehl-Nielsen (bakterie kwasoodporne: fuksyna karbolowa, 3% HCl w alkoholu etylowym, błękit metylenowy 3%), barwienie spor Dornera w modyfikacji Snydera (fuksyna karbolowa, alkohol etylowy 95%, nigrozyna 10%), barwienie otoczek (czerwień Kongo + barwnik Manevala);
- badanie cech biochemicznych: katalaza, oksydaza, arylosulfataza, β -galaktozydaza, hydroliza eskuliny, kazeiny mocznika i żelatyny, redukcja azotanów, tworzenie indolu, siarkowodoru;
- zastosowanie selektywnych podłoży;
- identyfikacja bakterii i grzybów metodami molekularnymi.

Do określenia liczby mikroorganizmów najczęściej wykorzystywana jest metoda płytkowa Kocha. Metoda ta polega na wykonaniu szeregu rozcieńczeń badanej zawiesiny i wysiewaniu stałej objętości z tych rozcieńczeń na podłoża agarowe w płytkach Petriego [105, 165].

2.2.2. Badania enzymatyczne

Aktywność dehydrogenaz

Biologiczne utlenianie substancji organicznych jest generalnie reakcją odwodornienia, katalizowaną przez dehydrogenazy. Enzymy te odgrywają znaczącą rolę w utlenianiu związków organicznych, w tym substancji ropopochodnych, w wyniku transferu wodoru z organicznego substratu do akceptora elektronów. Aktywność dehydrogenaz odzwierciedla stopień aktywności mikroorganizmów w zanieczyszczonym środowisku. Oznaczenie dehydrogenaz może służyć do kontroli przebiegu biodegradacji i określenia ewentualnego hamującego wpływu zanieczyszczenia lub pośrednich produktów jego rozkładu na aktywność mikroorganizmów. Szeroko stosowaną metodą oznaczania dehydrogenaz w gruncie jest metoda testu TTC, która polega na użyciu chlorku trójfenylo-tetrazoliowego (TTC), jako akceptora elektronów. W wyniku reakcji redukcji powstaje trifenyloformazan (TPF), którego czerwoną barwę oznacza się kolorymetrycznie przy długości fali 485 nm. Intensywność czerwonego zabarwienia powstającego z oznaczenia dehydrogenaz jest wskaźnikiem mikrobiologicznej aktywności badanego gruntu [25, 78, 207].

Aktywność celulozowa

Ze względu na to, że celuloza jest najpowszechniej spotykanym wielocukrem roślinnym, jej mikrobiologiczny rozkład jest ważnym procesem zachodzącym w glebie, za którego większą część odpowiedzialne są grzyby. Aktywność celulozowa, pod której pojęciem rozumiana jest suma aktywności trzech enzymów: endo- β -1,4-glukanazy, egzo- β -1,4-glukanazy i β -glukozydazy, jest uznawana za jeden ze wskaźników procesów biologicznych przebiegających w glebie [158, 165].

2.2.3. Badania toksykologiczne

Analiza bioindykacyjna jest częścią rozległej wiedzy określanej mianem ekotoksykologii. Współczesna ekotoksykologia jest interdyscyplinarną, intensywnie rozwijającą się nauką obejmującą zagadnienia z chemii, ekologii i toksykologii, której celem jest między innymi ocena stanu środowiska i pośrednio ochrony zdrowia człowieka.

Bioindykacja jest metodą wykorzystującą jako wskaźnik organizm żywy, którego reakcja może być podstawą oceny ogólnej aktywności biologicznej badanego układu. Reakcja ta obejmuje nie tylko sumaryczne działanie wszystkich substancji pochodzenia antropogenicznego oraz toksyn naturalnych, ale także daje obraz interakcji pomiędzy

substancjami toksycznymi a abiotycznymi i biotycznymi czynnikami środowiska (pH, twardość, zawiesiny itp.).

W procesie oczyszczania skażonych gleb substancjami ropopochodnymi całkowite ich wyeliminowanie jest niezmiernie trudne do osiągnięcia, gdyż nawet niewielkie ilości pozostałych metabolitów mogą być niebezpieczne. Coraz częściej do oceny stopnia skażenia środowiska wykorzystuje się testy biologiczne.

Zastosowanie organizmów żywych jako bioindykatorów należących do różnych grup taksonomicznych: bakterii, pierwotniaków, skorupiaków glonów i roślin wyższych oraz reprezentujących wszystkie poziomy troficzne: producentów, konsumentów i reducentów pozwala na kompleksową ocenę stanu badanego środowiska (tab. 2.3).

Tabela 2.3. Charakterystyka testów oceny toksyczności gleby

Poziom troficzny	Organizm	Nazwa testu	Reakcja testowa	Czas trwania	Typ testu
Producenci	Rośliny wyższe				
	Sorghum saccharatum	Phytotoxkit	Kiełkowanie i wczesny wzrost	3 dni	Chroniczny
	Lepidium sativum				
	Sinapis alba				
Konsumenti	Skorupiaki				
	Heterocypris incongruens	Ostracodtoxkit	Inhibicja wzrostu, śmierć	6 dni	Ostry
Reducenci	Bakterie				
	Vibrio fischeri	Microtox STP	Inhibicja luminescencji	15 min	Ostry
	Pierwotniaki				
	Spirostomum ambiguum	Spirotox-TBK	Śmierć	6 dni	Ostry

Organizm testowy musi odpowiadać surowym wymaganiom, m.in. ciągłej dostępności i jednorodności genetycznej. Obecnie wprowadzane są gotowe testy sprzedawane w postaci pakietów pozwalające na ocenę toksyczności badanych prób w krótkim czasie. Zawierają one formy kryptobiotyczne organizmów (stanowią przyszłość bioindykacji) i w razie potrzeby w krótkim czasie mogą być przygotowane do testu.

Istnieją dwa podstawowe rodzaje testów bioindykacyjnych:

Test skринingowy (przesiewowy). Stosuje się go do badania dużej partii próbek środowiskowych o nieznaney, prawdopodobnie niskiej, toksyczności. Pozwala on na ustalenie, czy próbka jest toksyczna, chociaż nie ma możliwości określenia stopnia toksyczności. W teście skринingowym bioindykatory wprowadza się do próbek nierozcieńczonych. Po inkubacji bioindykatora z próbką ocenia się charakterystyczną reakcję testową (PE). Próbki należy podzielić na trzy kategorie:

- próbki nietoksyczne $PE < 20$;
- próbki niskotoksyczne $20 < PE < 50$;
- próbki toksyczne $PE \geq 50$.

Test główny, wyjaśniający, jaka jest toksyczność próbki. Test ten wykorzystuje się przy zastosowaniu procedury testu podstawowego z rozcieńczeń badanej próbki.

2.2.4. Badania respirometryczne

Badania respirometryczne, obejmujące pomiar zużycia tlenu i/lub ilości wydzielonego dwutlenku węgla, pozwalają na określenie możliwości biodegradacji tlenowej substancji ropopochodnych w zanieczyszczonym gruncie. Mogą mieć zastosowanie w testowaniu zarówno samoistnej biodegradacji substancji ropopochodnych, jak i metod wspomaganych: bioaugmentacji i biostymulacji. Podczas testu respirometrycznego szybkość zużycia tlenu i/lub produkcji CO_2 może być kontrolowana przy użyciu aparatury pomiarowej (np. Oxi-Top, Micro-Oxymax) lub na podstawie testów „batch”, w których mierzy się zawartości O_2 i/lub CO_2 w górnej części naczynia pomiarowego w trakcie trwania eksperymentu [61]. Szybkości konsumpcji O_2 i/lub produkcji CO_2 wyraża się w [mmol/kg gruntu] lub [ml/kg gruntu] w odniesieniu do funkcji czasu. Na podstawie szybkości konsumpcji O_2 i/lub produkcji CO_2 można szacować szybkość biodegradacji tlenowej substancji ropopochodnych, tj. szybkość ubytku substratu w czasie [139]. Ponadto rezultaty testu respirometrycznego obrazują stopień aktywności metabolicznej zanieczyszczonego środowiska. Im wyższe szybkości konsumpcji O_2 i/lub produkcji

CO₂ tym substrat jest łatwiej dostępny dla mikroorganizmów. Z kolei niższe szybkości konsumpcji O₂ i/lub produkcji CO₂ mogą świadczyć o toksyczności lub niewielkiej podatności zanieczyszczenia na biodegradację.

3. Badanie procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w warunkach *ex situ*

3.1. Materiał badawczy

Badanie procesu biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych prowadzono na glebie zanieczyszczonej zarówno węglowodorami TPH, jak i WWA. W celu wytypowania odpowiedniego materiału badawczego pobrano próbki gleby z terenu:

- gazowni klasycznej wyłączonej z eksploatacji, położonej na północy Polski. Próbki do badań pobrano w pobliżu starych (częściowo zlikwidowanych) dołów ze smołą pogazową, z głębokości 0–0,5 m p.p.t. – gleba GK-1;
- dołu urobkowego, w którym składowano odpady wiertnicze zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi – gleba zaklasyfikowana do odpadów o kodzie ex 17 05 03*. Próbki do badań pobrano z warstwy powierzchniowej, z głębokości 0–0,5 m p.p.t. – gleba DU-1,

a następnie wykonano ich analizę fizyczną i chemiczną.

Gleba z terenu gazowni klasycznej charakteryzowała się dużą zawartością WWA i stosunkowo niewielką TPH. Natomiast gleba z dołu urobkowego zawierała duże ilości TPH i stosunkowo niewielkie WWA.

Podstawowym celem realizowanej pracy jest badanie przebiegu procesów biodegradacji TPH i WWA w glebie, dlatego wskazane było uzyskanie gleby o istotnych zawartościach obu grup węglowodorów. Nadmiernie wysokie zawartości w glebie WWA (w glebie GK-1) oraz TPH (w glebie) mogą hamować proces ich oczyszczania. **Dlatego do badań procesu biodegradacji węglowodorów, prowadzonych w warunkach *ex situ*, jako materiał badawczy stosowano układ gleb: GK-1:DU-1 w stosunku 2:1.**

Wobec powyższego w kolejnym etapie badań procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, prowadzonych w warunkach *ex situ*, materiał badawczy stanowiła mieszanina gleby pobranej z terenów gazowni klasycznej oraz dołu urobkowego.

Prowadzony w warunkach *ex situ* proces oczyszczania gleby na drodze bioremediacji podstawowej stymulowano substancjami biogennymi. W kolejnym etapie stosowano inokulację gleby za pomocą trzech konsorcjów bakteryjnych (BA-1, BA-2 oraz BA-3), złożonych z mikroorganizmów wykazujących zdolności rozkładu węglowodorów ropopochodnych. Biokonsorcjum BA-1 opierało się na niepatogennych mikroorganizmach, wykazujących zdolności metabolizowania substancji ropopochodnych, stosowane z powodzeniem w zabiegach bioaugmentacji zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi odpadów, składowanych w dołach urobkowych. W skład biopreparatu BA-1 wchodziły niepatogenne mikroorganizmy wyizolowane z gleby z dołu urobkowego: *Arthrobacter sulfonivorans*, *Burkholderia phenazinium*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Microbacterium oleivorans*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus wratislaviensis*, *Staphylococcus warneri*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Streptomyces aureus* oraz grzybów *Candida keroseneae* i *Pichia galeiformis*.

Biopreparat BA-2 zawierał niepatogenne mikroorganizmy wyizolowane z gleby z gazowni klasycznej: *Rhodococcus opacus CUP11*, *Mycobacterium frederiksbergense*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Dietzia timorensis*, *Rhodococcus opacus*, *Gordonia terrae*, *Paeniglutamicibacter sulfureus*.

Każdy z wymienionych mikroorganizmów przejawiał zdolności wzrostu w obecności zarówno n-alkanów, jak i węglowodorów aromatycznych. Zakres transformowanych związków różnił się w zależności od szczepu. Izolat *Mycobacterium frederiksbergense* cechował się wykorzystaniem n-alkanów i WWA, zaś szczep *Rhodococcus erythropolis* rozkładał dodatkowo węglowodory należące do grupy BTEX.

Biopreparat BA-3 powstał ze zmieszania biopreparatów BA-1 i BA-2. Biopreparaty opracowane zostały przez Zakład Mikrobiologii INiG – PIB.

3.2. Metodyka badawcza

W pierwszym etapie badań wykonano analizę fizyczną i chemiczną badanych próbek glebowych, pobranych z warstwy powierzchniowej, z głębokości 0–0,5 m p.p.t. Oznaczono wilgotność gleb poprzez określenie ubytku masy próbki gleby, będącego efektem odparowania wody podczas suszenia w 105°C.

W kolejnym etapie badań pobrano próbki materiału glebowego, które doprowadzono do stanu powietrznie suchego poprzez kondycjonowanie ich w warunkach otoczenia przez 7 dni. Powietrznie suchą glebę przesiano przez sito o rozmiarze oczek 1 × 1 mm. Tak przygotowaną glebę poddano analizie fizycznej i chemicznej.

Izolację oznaczanych analitów z matrycy glebowej wykonano poprzez:

- sporządzenie ekstraktu gleby:
 - » wydzielenie TPH metodą rozpuszczalnikową, zmodyfikowaną poprzez zastosowanie ultradźwięków (częstotliwość ultradźwięków: 30 kHz, temperatura: 40°C, czas: 30 min) – wspomaganie ekstrakcji rozpuszczalnikowej sonifikacją powoduje zwiększenie stopnia odzysku analitu;
 - » wydzielenie WWA metodą ekstrakcji ciągłej Soxhleta;
- oczyszczenie/rozdzielanie analitu związków organicznych metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) w systemie próżniowym BAKER SPE do przygotowywania próbek (fot. 3.1) – zastosowanie sekwencji rozpuszczalników organicznych i kolumnienek SPE z wypełnieniami: florisil (oczyszczenie analitu ze związków polarnych) oraz CN/SiOH (selektywne wydzielenie WWA);
- sporządzenie ekstraktu wodnego gleby w proporcjach gleby do wody 1:10 (m:m);
- mineralizację gleby w stężonym roztworze HNO₃ w mikrofalowym mineralizatorze Magnum II firmy Ertec.

Wyekstrahowane z gleb związki organiczne (TPH i WWA) i oczyszczone/rozdzielone na kolumnienkach SPE po odparowaniu nadmiaru rozpuszczalnika oznaczono metodą chromatografii gazowej. Na podstawie otrzymanych wyników scharakteryzowano skład zanieczyszczeń gleby skażonej substancjami ropopochodnymi i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

Wodny ekstrakt gleby analizowano pod kątem oznaczenia parametrów fizycznych i chemicznych, takich jak: odczyn pH, przewodność oraz zawartość kationów: K⁺, NH₄⁺

i anionów: F^- , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} oraz SO_4^{2-} . Wyizolowane na drodze mineralizacji składniki gleby analizowano pod kątem oznaczenia zawartości metali ciężkich, wapnia i magnezu. Odczyn roztworu wodnego gleb oznaczono metodą potencjometryczną, natomiast aniony i kationy odpowiednią metodyką chromatograficzną z wykorzystaniem chromatografu jonowego firmy Sycam. Przed uruchomieniem każdej nowej metody analitycznej konfigurowano chromatograf, wykonując odpowiednie połączenia kolumn i detektorów. W tabeli 3.1 przedstawiono parametry pracy chromatografu jonowego firmy Sykam stosowane podczas oznaczania anionów i kationów.

Tabela 3.1. Warunki analityczne podczas analizy chromatograficznego oznaczania anionów i kationów

Warunki analityczne	Oznaczenie anionów: F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	Oznaczenie kationów: NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+	Oznaczenie kationów: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+}
Kolumna	LCA A14 pH pracy kolumny: 1–14	LCA K016 pH pracy kolumny: 1–9	LCA K02 pH pracy kolumny: 1–14
Eluent	5 mM Na_2CO_3 + 0,2% modyfikatora (4-hydroksybenzonitryl)	4 mM $HNO_3:CH_3OH$ (7:3)	0,1 M kwas winowy (pH 2,95)
Reagent	–	–	1 mM PAR, 0,5 mM Zn EDTA w 4% NH_4OH pH 11,1
Natężenie przepływu eluentu	1,5 ml/min	1,0 ml/min	1,2 ml/min
Natężenie przepływu reagenta	–	–	0,3 ml/min
Temperatura	70°C	50°C	30°C
Ciśnienie	3,0 MPa	11,0 MPa	18,0 MPa

Warunki analityczne	Oznaczenie anionów: F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻	Oznaczenie kationów: NH ₄ ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Oznaczenie kationów: Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺
Objętość nastrzyku	50 µl	20 µl	50 µl
Detekcja	konduktometryczna z tłumieniem przewodnictwa	konduktometryczna	UV/Vis
Zakres pomiarowy	100 µS	30 µS (Reverse)	λ = 500 nm
Roztwór regeneracyjny	0,2 M H ₂ SO ₄	okresowo 100 µl 1 N HNO ₃	–
Roztwór płuczący	H ₂ O	H ₂ O	–



Fot. 3.1. System próżniowy BAKER SPE do przygotowania próbek analitów techniką ekstrakcji na złożu sorpcyjnym SPE

Wykonana analiza chromatograficzna wyekstrahowanych z badanych gleb substancji organicznych wykazała konieczność zmieszania ich w celu osiągnięcia gleby zawierającej węglowodory zarówno z grupy TPH, jak i WWA w ilościach umożliwiających obserwację procesu ich biodegradacji podczas oczyszczania gleby. Tak przygotowana gleba, po doprowadzeniu zawartości składników biogennych do wartości optymalnych, posłużyła do badań procesu bioremediacji podstawowej stymulowanej substancjami biogennymi oraz bioaugmentacji pod kątem oczyszczenia jej z węglowodorów TPH i WWA w warunkach *ex situ*. W tym celu przygotowano stanowisko do badań biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych zawartych w glebie. Schemat stanowiska badawczego przedstawiono na rysunku 3.4. Do procesu bioaugmentacji wykorzystano biopreparaty BA-1, BA-2 oraz BA-3.

W trakcie prowadzonego procesu oczyszczania wykonywano badania toksykologiczne oczyszczanej gleby. Do badań toksykologicznych wykorzystano testy: Phytotoxkit, Spirodela Duckweed Toxkit, Ostracodtoxkit F, Microtox SPT, test Amesa oraz mikrobiologiczny test oceny ryzyka MARA.

Na podstawie uzyskanych wyników, zarówno analiz chromatograficznych ekstraktów gleb, jak i testów toksykologicznych, oceniono efektywność procesu biodegradacji węglowodorów zawartych w glebie.

3.2.1. Analiza anionów i kationów z wykorzystaniem chromatografii jonowej

Chromatograf jonowy firmy Sykam został skonstruowany w ten sposób, aby po odpowiednio dokonanej zmianie konfiguracji istniała możliwość wykonywania szerokiego zakresu analiz kationów oraz anionów.

Do badań posłużyły wyizolowane i przeprowadzone do roztworu w odpowiedni sposób składniki gleby. Podczas oznaczeń wykorzystywano poszczególne aplikacje chromatografu jonowego, w których kolejno stosowano kolumny do rozdziału:

- anionów: F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} ;
- kationów jednowartościowych: Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ ;
- kationów wielowartościowych: Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} .

W tabeli 3.1 zestawiono parametry pracy chromatografu stosowane podczas oznaczania poszczególnych grup jonów.

Do oznaczania anionów metodą chromatografii jonowej stosowano supresję chemiczną, gdyż użycie silnych elektrolitów jako eluentów w chromatografii jonowej z bezpośrednią detekcją konduktometryczną wymaga zastosowania dodatkowego procesu, umożliwiającego usunięcie przewodnictwa eluentu bez naruszania badanych składników próbki. Supresory używane są jako specjalne kolumny umieszczone po kolumnie analitycznej.

Metale alkaliczne rozdzielane eluentem o charakterze kwasowym. Przewodnictwo kwasów w porównaniu do ich soli jest dość wysokie, dlatego dodatkowa reakcja supresji nie jest konieczna. Oznaczanie metali alkalicznych realizowane jest z wykorzystaniem pośredniej detekcji przewodności, ponieważ eluent (kwas) posiada wyższą przewodność niż jego sól. Dlatego kationy wykrywane są jako negatywne piki sygnału. Zgodnie z zasadą, że systemy zbierania danych nie mogą ilościowo dobrze oceniać pików negatywnych, kationy oznaczane są z funkcją odwrócenia (*Reverse*) na detektorze konduktometrycznym. Po uruchomieniu funkcji *Reverse* odwracana jest polaryzacja sygnału na wyjściu detektora.

Metale ciężkie oznaczano metodą chromatografii jonowej z detekcją fotometryczną reakcji postkolumnowej oddzielonego jonu z reagentem Zn-PAR.

3.2.2. Dostosowanie metodyki chromatograficznej do oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w skażonej glebie

Produkty ropopochodne stanowią jedno z głównych źródeł skażenia gleby, dlatego analiza tych zanieczyszczeń jest powszechnie prowadzona przez laboratoria. Aktualnie nie ma jednej znormalizowanej, całościowej metodyki umożliwiającej identyfikację i ilościowe oznaczanie wszystkich rodzajów zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie. Różnorodność produktów ropopochodnych, które mogą być źródłem skażeń, skomplikowany skład (wieloskładnikowe mieszaniny, w których tylko nieliczne indywidua występują w stężeniach większych niż 1% wag.) i zróżnicowane właściwości poszczególnych produktów naftowych powodują duże trudności analityczne.

Analiza zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie jest skomplikowaną procedurą, w skład której wchodzi etapy:

- pobieranie i wstępne przygotowanie próbek do analizy;
- izolacja i/lub wzbogacanie analitów;
- identyfikacja i ilościowe oznaczenie analitów;
- kalibracja stosowanych urządzeń pomiarowych i statystyczna obróbka danych.

3.2.2.1. Izolacja ropopochodnych składników z gleby

Zastosowanie metodyki chromatograficznego oznaczania substancji ropopochodnych w glebach wymaga przeprowadzenia oznaczanych składników z gleby do innej matrycy. Najczęściej izolację i wzbogacanie analitów prowadzi się metodami ekstrakcyjnymi. Stosowane są również modyfikacje poprzez wprowadzenie nowych technik w celu: skrócenia czasu ekstrakcji, zmniejszenia ilości rozpuszczalników, wydzielenia różnych grup analitów. Należą do nich:

- ekstrakcja sekwencyjna – wielokrotna ekstrakcja kolejno różnymi rozpuszczalnikami specyficznymi do danej frakcji;
- sonifikacja – wspomaganie ekstrakcji ultradźwiękami (*U.S. EPA Method 3550C, ultrasonic extraction*);
- wspomaganie ekstrakcji promieniowaniem mikrofalowym (*U.S. EPA Method 3546 microwave extraction*);
- ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym;
- ekstrakcja przyspieszona w podwyższonej temperaturze i pod zwiększonym ciśnieniem ($T = 120^{\circ}\text{C}$, $p = 14 \text{ MPa}$) [42, 185, 197].

Wydzielony metodą ekstrakcyjną analit wymaga oczyszczenia z interferentów. Dogodną i dokładną metodę oczyszczania analitu stanowi ekstrakcja na złożu sorpcyjnym SPE (*Solid Phase Extraction*). Podczas ekstrakcji do fazy stałej skład próbki, faza stacjonarna i faza ruchoma muszą być tak dobrane, aby (znając rozpuszczalność i oddziaływania grup funkcyjnych między wymienionymi wyżej elementami układu) zapewnić zatrzymanie bądź wymycie analitu z kolumny. Efekt ten można osiągnąć poprzez [40]:

- selektywne wymywanie – kolumnę (po naniesieniu próbki) przemywa się taką objętością rozpuszczalnika, aby usunąć zanieczyszczenia, pozostawiając na niej anality;
- selektywną elucję – wymycie analitów rozpuszczalnikiem, który nie eluuje silnie zatrzymanych na sorbencie interferentów.

Procedura ekstrakcji do fazy stałej składa się z kilku następujących po sobie etapów:

- Kondycjonowanie złoża w celu aktywacji/dezaktywacji złoża sorbentu przed naniesieniem próbki. Rodzaj i warunki kondycjonowania zależą od stosowanego złoża oraz rodzaju próbki.
- Dozowanie próbki z prędkością przepływu dozowanej próbki $< 5 \text{ ml/min}$.

- Wymywanie złożeń. W przypadku silnego zatrzymywania analitów na złożu następuje usunięcie związków niepożądanych przez wymycie ich ze złoża. Należy tak dobrać rozpuszczalnik, aby nie powodował wymywania analitów.
- Elucja analitów. Przemycanie złoża niewielką objętością rozpuszczalnika (2 ml), powodującego elucję analitów.

Dobór sorbentów i rozpuszczalników do ekstrakcji ciecz–ciało stałe dokonywane jest na podstawie ich polarności, jonizowalności i rozpuszczalności w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych (rys. 3.1).

Mechanizmy separacji:

NPC – chromatografia w normalnym układzie faz

LSC – chromatografia adsorpcyjna

RPC – chromatografia w odwróconym układzie faz

Celem wykonania analiz chromatograficznych analitów zawierających TPH i WWA uprzednio uzyskane odpowiednimi metodami rozpuszczalnikowymi ekstrakty z zanieczyszczonych gleb poddano selektywnemu rozdzielaniu na kolumnkach SPE:

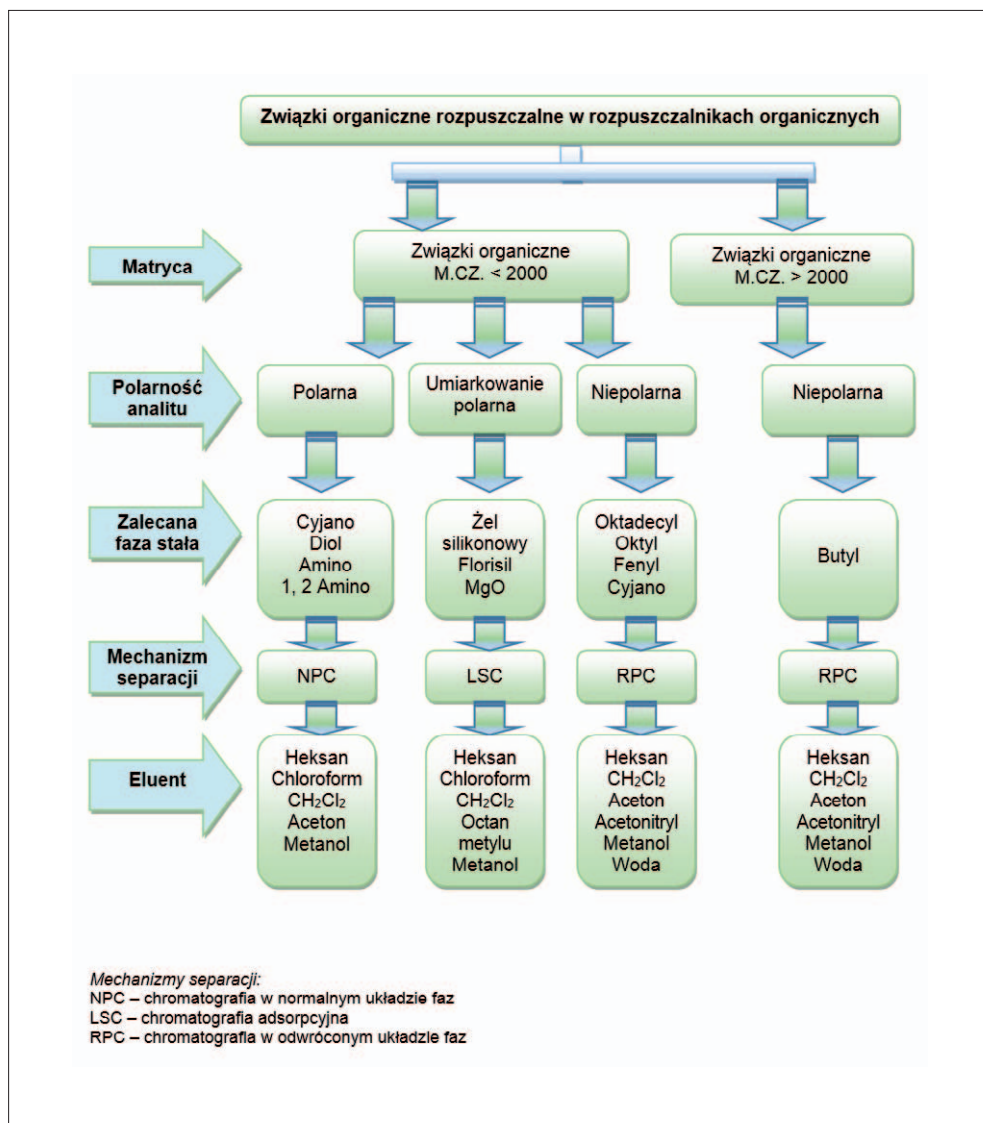
- ze złożem Florisil – oczyszczenie ze związków polarnych wyekstrahowanego z gleby analitu TPH;
- ze złożem w postaci fazy łączonej CN/SiOH – selektywne wydzielenia WWA z wyekstrahowanego z gleby analitu.

Rozdział związków na kolumnkach SPE prowadzono z wykorzystaniem systemu próżniowego BAKER SPE do przygotowania próbek (fot. 3.1).

3.2.2.2. Metodyka oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w glebie

Referencyjne metodyki określania stężeń zanieczyszczeń gleby nie zostały sprecyzowane, zatem obecnie nie ma zawartych w normach prawnych wytycznych odnośnie do metod pomiarowych (zasady pomiaru i wymaganej precyzji metody), to zaś pozostawia wykonawcom badań dużą swobodę, ale też nakłada na nich obowiązek dobrania właściwych warunków cyklu badawczego zaczynającego się od etapu pobrania prób, a kończącego się na interpretacji wyników. Laboratoria wykonujące te badania, do czasu określenia metod

referencyjnych i opracowania norm, muszą stosować sporządzone i zwalidowane przez siebie procedury.



Rys. 3.1. Schemat doboru sorbentów i rozpuszczalników do ekstrakcji substancji organicznych metodą ciecz–ciało stałe [71]

W celu uzyskania pełnej kontroli przebiegu procesu oczyszczania skażonej substancjami ropopochodnymi gleby oraz przygotowania skutecznego biopreparatu z mikroorganizmów opracowano metodykę chromatograficznego jakościowego i ilościowego oznaczania substancji ropopochodnych w glebie (TPH, n-C₆-n-C₄₄, pristan, fitan i C₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopan) [169, 170, 177].

Opierając się na danych literaturowych, przebadano rozpuszczalniki: tetrachlorek węgla, dichlorometan, heksan + chlorek metylenu + chloroform w stosunku 1:1:1, heksan + aceton w stosunku 1:1, heksan + dichlorometan w stosunku 1:1, chlorometan [31, 73, 87, 108, 203, 204]. Jako optymalny rozpuszczalnik wytypowano dichlorometan, dla którego osiągnięto stopień odzysku 85,7%. Stopień odzysku analitów określano za pomocą standardu zastępczego, którym był o-terfenyl.

Izolację analitów prowadzono metodą rozpuszczalnikową zmodyfikowaną poprzez wykorzystanie ultradźwięków. Zastosowanie w procesie ekstrakcji wspomaganą sonifikacją spowodowało zwiększenie stopnia odzysku do 95,9%. Dla uzyskania żądanego odzysku analitów z matrycy glebowej wskazane jest powtórzenie ekstrakcji (2-, 3-krotne) małymi porcjami rozpuszczalnika. W okresie trwania procesu sonifikacji nie stwierdzono artefaktów.

Oczyszczanie analitów z substancji polarnych przeprowadzono przy zastosowaniu kolumnienek sorpcyjnych SPE wypełnionych sorbentem o nazwie florisil. Przed użyciem kolumnienki wykondycjonowano złożę poprzez przemycie 2 ml metanolu, po czym – nie dopuszczając do wyschnięcia złoża – naniesiono na nie wcześniej wyekstrahowane substancje ropopochodne. Analit eluowano gradientowo za pomocą dichlorometanu, po czym zateżono i wykonano analizę chromatograficzną.

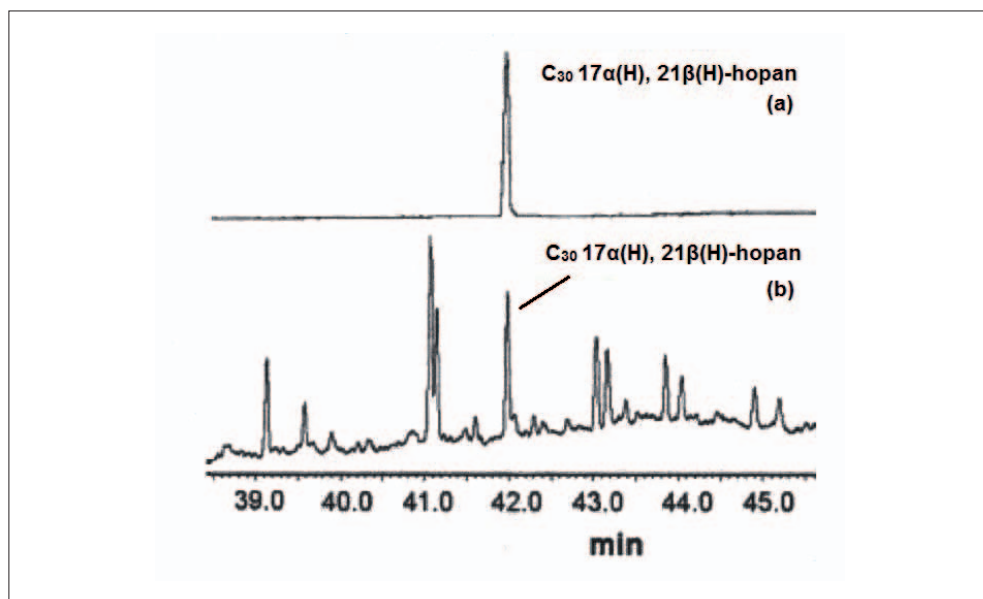
Analizę zanieczyszczeń ropopochodnych w badanej glebie, obejmującą identyfikację oraz ilościowe oznaczenie n-alkanów (n-C₆-n-C₄₄), węglowodorów z grupy izoprenoidów (Pr i F), sumarycznej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) oraz biomarkera C₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopanu, wykonano na chromatografie Clarus 500 GC firmy Perkin Elmer, wyposażonym w kolumnę kapilarną Quadrex 007-1 (30 m × 0,53 mm) firmy Restek, przy przepływie 20 ml/min helu jako gazu nośnego oraz przy zastosowaniu następujących parametrów temperaturowych dla węglowodorów alifatycznych:

- temperatura inżektora 290°C;
- temperatura detektora 320°C;
- programowana temperatura pieca:
 - » 30°C – przebieg izotermiczny 2 min,
 - » 30–105°C – przyrost temperatury 10°C/min,
 - » 105–285°C – przyrost temperatury 5°C/min,
 - » 285°C – przebieg izotermiczny 5 min,

dla biomarkera $C_{30} 17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ -hopanu zmodyfikowano program temperatury:

- » $30^{\circ}C$ – przebieg izotermiczny 2 min,
- » $30-105^{\circ}C$ – przyrost temperatury $10^{\circ}C/min$,
- » $105-320^{\circ}C$ – przyrost temperatury $6^{\circ}C/min$,
- » $320^{\circ}C$ – przebieg izotermiczny 15 min.

Do oznaczania ilościowego sumarycznej zawartości TPH zastosowano zestaw standardów kalibracyjnych firmy Tusnovic Instruments, zaś w przypadku ilościowego oznaczania poszczególnych n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych oparto się na wzorcach certyfikowanych firm Supelco oraz Restek (mieszanka wzorcowa nr D 2807 węglowodorów n-parafinowych: n- C_6 – n- C_{44} oraz certyfikowanej mieszaninie wzorcowej nr A 029668: Fuel Oil Degradation Mix n- C_{17} , pristan, n- C_{18} , fitan). Jako biomarker zastosowano wzorec certyfikowany $C_{30} 17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ -hopan firmy Supelco (wykres 3.1).



Wykres 3.1. Chromatogram rozdzielenia węglowodorów z uwzględnieniem biomarkera $C_{30} 17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ -hopanu (a) – wzorec certyfikowany firmy Supelco Nr 08189, (b) – mieszanina węglowodorów wyizolowanych z gleby wraz z hopenem

W oznaczeniach TPH z gleby z gazowni klasycznej uwzględniono podczas obliczeń stopień odzysku analitów i współczynnik ubytku masy gleby podczas suszenia. Poziom detekcji stężeń dla indywidualnych alkanów wynosił 0,5–1,0 mg/kg s.m., a dla sumy TPH 1,0–10 mg/kg s.m.

Certyfikowany wzorzec (BAM K010) firmy Tusnovic Instruments posłużył do sporządzenia krzywej kalibracyjnej TPH w zakresie stężeń 50–3000 mg/kg s.m. umożliwiając ilościowe oznaczenie sumarycznej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH). Wykonana seria analiz wykazała, że względne odchylenia standardowe kształtują się na poziomie 2,53–16,75%.

Przedstawione wartości niepewności względnej dla węglowodorów mieszaniny wzorcowej w zakresie od n-C₆ do n-C₄₄ kształtują się w granicach: 4,81–28,03%, co świadczy o zadowalającej dokładności stosowanej metodyki analitycznej (tab. 3.2).

Tabela 3.2. Zestawienie względnego odchylenia standardowego i niepewności względnej określonej dla wykonanych chromatograficznych analiz wzorca D2887 Calibration Mix (17 składników) firmy Supelco

Składnik	Wartość z certyfikatu [mg/kg]	Wartość średnia [mg/kg]	Odchylenie standardowe	Względne odchylenie standard. [%]	Niepewność względna [%]
n-C ₆	60	60,112	1,523	2,53	4,90
n-C ₇	60	60,203	1,725	2,87	4,81
n-C ₈	80	80,016	2,957	3,70	5,40
n-C ₉	80	80,126	3,252	4,06	5,62
n-C ₁₀	120	119,758	4,969	4,15	6,81
n-C ₁₁	120	119,855	5,055	4,22	6,87
n-C ₁₂	120	120,369	5,236	4,35	7,29
n-C ₁₄	120	120,052	5,458	4,55	7,79
n-C ₁₆	100	100,112	4,997	4,99	7,20

Składnik	Wartość z certyfikatu [mg/kg]	Wartość średnia [mg/kg]	Odchylenie standardowe	Względne odchylenie stand. [%]	Niepewność względna [%]
n-C ₁₈	50	49,635	2,244	4,52	9,24
n-C ₂₀	20	19,898	1,125	5,65	10,81
n-C ₂₄	20	20,041	1,325	6,61	12,42
n-C ₂₈	10	10,002	0,874	8,74	14,36
n-C ₃₂	10	9,877	1,654	16,75	16,30
n-C ₃₆	10	9,952	1,125	11,30	18,40
n-C ₄₀	10	9,906	1,388	14,01	21,18
n-C ₄₄	10	10,285	1,425	13,86	28,03

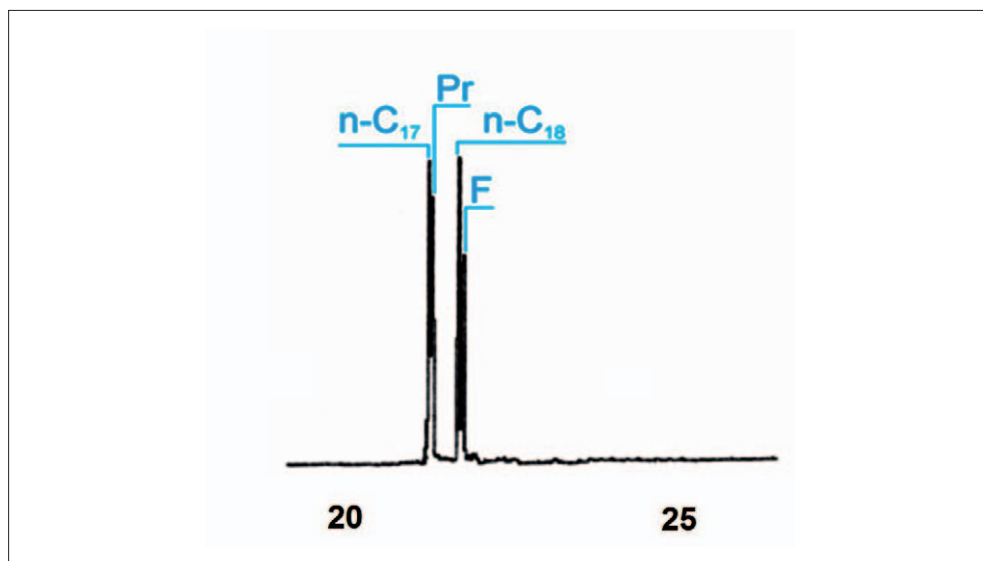
Analiza chromatograficzna umożliwia identyfikację i ilościowe oznaczenie zawartości węglowodorów z grupy izoprenoidów, pristanu (Pr – 2,6,10,14-tetrametylopentadekan) i fitanu (F – 2,6,10,14-tetrametyloheksadekan), które należą do związków trudno ulegających biodegradacji. Zajmują one charakterystyczne miejsca na chromatogramie – pristan eluuje bezpośrednio po n-C₁₇, a fitan po n-C₁₈.

Zmianę wartości stosunków n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F przyjęto jako wskaźnik do oceny stopnia biodegradowalności zanieczyszczeń ropopochodnych podczas prowadzonych procesów oczyszczania gleby.

W celu określenia dokładności i powtarzalności wykonywanych analiz chromatograficznych przeprowadzono serię badań (30 analiz) certyfikowanego wzorca Nr A029668 firmy Restek o składzie:

n-C ₁₇	2000 mg/dm ³ ;
Pr	1998 mg/dm ³ ;
n-C ₁₈	2000 mg/dm ³ ;
F	2000 mg/dm ³ .

Rozdział analizowanych składników przedstawia chromatogram zamieszczony na wykresie 3.2.



Wykres 3.2. Chromatogram rozdziłu mieszaniny węglowodorów Nr A029668 firmy Restek

Na podstawie uzyskanych danych z wykonanych analiz obliczono względne odchylenia standardowe [%] dla poszczególnych związków zawartych w mieszaninie wzorcowej Nr A029668.

Obliczone wartości odchylenia standardowego wyrażone procentowo są miarą precyzji metody i zawierają się w granicach 3,925–4,521. Niepewność względna [%] obliczona z uwzględnieniem niepewności oznaczeń dla mieszaniny certyfikowanej wynosi odpowiednio:

n-C ₁₇	6,22%;
Pr	6,53%;
n-C ₁₈	6,82%;
F	6,67%.

Obliczone wartości niepewności oznaczeń powyższych związków świadczą o wysokiej precyzji zastosowanej metody analitycznej, dzięki czemu może być ona stosowana do określania stopnia biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie z wykorzystaniem wartości wskaźników n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F. W celu określenia dokładności i powtarzalności wykonywanych analiz chromatograficznych przeprowadzono serię badań pozwalających na określenie odchylenia standardowego C₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopanu, które kształtowało się na poziomie 9,26–10,24%.

3.2.2.3. Metodyka oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie

Spośród licznej grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) oznaczeniu podlega 16 WWA, które są zamieszczone na liście amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (EPA). Wśród nich najwyższą rakotwórczością i mutagennością cechują się 5- i 6-pierścieniowe WWA, a szczególnie benzo(a)piren.

Metodyka oznaczania WWA należy do niezmiernie trudnych i skomplikowanych procesów, obejmuje etapy: poboru i przygotowania próbki do analizy, ekstrakcji analitów, zateżania, doboru metod rozdziału, identyfikacji oraz ilościowego oznaczenia poszczególnych WWA. Analiza WWA jest niezmiernie ważna w procesach monitorowania przebiegu ich biodegradacji w skażonej glebie. Stanowi też jedno z podstawowych narzędzi przy sporządzaniu biopreparatów zdolnych do biodegradacji węglowodorów, umożliwia bowiem ocenę efektywności opracowanego biopreparatu.

Analizę chromatograficzną analitu wykonano na chromatografie gazowym z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID) Clarus 500 firmy Perkin Elmer wyposażonym w kolumnę kapilarną RTX-440 (50 m × 0,25 mm) firmy Restek. Obejmowała ona oznaczenie 16 WWA oraz sumy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWAs) i biomarkera -C₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopanu, stosowanego do oceny kinetyki biodegradacji poszczególnych zidentyfikowanych WWA, i została przeprowadzona w następujących warunkach pracy:

- temperatura inżektora PPS 320°C;
- temperatura detektora 320°C;
- programowana temperatura pieca:
 - » 40°C – przebieg izotermiczny,
 - » 40–240°C – przyrost temperatury 30°C/min,
 - » 240–320°C – przyrost temperatury 8°C/min,
 - » 320°C – przebieg izotermiczny 10 min.

Do identyfikacji 16 WWA oraz ich ilościowego oznaczenia zastosowano zestaw standardów kalibracyjnych firmy Restek: mieszaniny certyfikowane zawierające 16 WWA rozpuszczone w dichlorometanie:

- Nr 31011 – każdy WWA – 2 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$;
- Nr 31264 – WWA w zakresie 500 – 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$;
- Nr 31455 – WWA w zakresie 100 – 2 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Wyniki analiz chromatograficznych certyfikowanych mieszanin posłużyły do sporządzenia krzywej kalibracyjnej (w programie TurboChrom 6.1), umożliwiającej ilościowe oznaczenie poszczególnych WWA. Jako wzorzec biomarkera zastosowano certyfikowany biomarker – C₃₀ 17 α (H), 21 β (H)-hopan firmy Supelco.

W celu przetestowania przedstawionej metodyki chromatograficznego oznaczania WWA z wykorzystaniem chromatografu GC Clarus 500 wykonano analizę certyfikowanej mieszaniny wzorcowej (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne WWA w glebie firmy BAM-ERM-CC013), która potwierdziła poprawność doboru opracowanej metodyki. Uzyskane wyniki analizy chromatograficznej i obliczona niepewność ich oznaczeń są zgodne z certyfikatem testowanej mieszaniny wzorcowej. Wyniki analizy chromatograficznej wraz z czasami retencji zidentyfikowanych WWA przedstawiono w tabeli 3.3.

Warunkiem koniecznym do prawidłowego przeprowadzenia procesu analizy WWA jest ich wyizolowanie z badanej próbki gleby. Dane literaturowe wskazują, że WWA z gleb można wyekstrahować za pomocą wielu rozpuszczalników, m.in.: eteru naftowego (w aparacie Soxhleta bądź ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami), cykloheksanu i dichlorometanu (5:1 V/V) (ekstrakcja wspomagana sonifikacją), dichlorometanu (w aparacie Soxhleta, następnie sukcesywny rozdział WWA na kolumnkach z wypełnieniem alumina/silica gel z zastosowaniem n-heksanu, po czym mieszaniny chlorek metylenu:n-heksan (2:1 V/V)) [20, 115, 160, 213].

Na podstawie doniesień literaturowych opisujących procedury ekstrakcji WWA z gleb opracowano optymalną metodykę, dostosowując ją do wyposażenia posiadanego w laboratorium Zakładu Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych INiG – PIB. Obejmuje ona:

- izolację analitu (WWA), poprzez zastosowanie ciągłej ekstrakcji (Soxhlet), za pomocą eteru naftowego (frakcja 40–60°C) i zatężenie próbki do objętości 5 ml;
- wydzielenie frakcji WWA przy zastosowaniu dwufazowych kolumniek Barkarbord SPE PAH Soil zawierających fazy: 500 mg cyjano/100 mg Silica Gel;

- elucję WWA z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników 3 × 3 ml acetonu i toluenu w stosunku 3:1;
- oczyszczenie analitu z wykorzystaniem kolumny SPE z fazą Florisil.

Tabela 3.3. Zestawienie zidentyfikowanych WWA oraz WWA oznaczonych chromatograficznie z certyfikowanej mieszaniny wzorcowej (WWA w glebie firmy BAM-ERM-CCO13)

Lp.	Składnik WWA certyfikowanej mieszaniny wzorcowej	Czas retencji [min]	Zawartość [mg/kg s.m.]	Niepewność oznaczeń $p < 0,05$
1.	Naftalen (N)	5,71	2,73	±0,41
2.	Acenaftalen (AcI)	7,05	1,65	±0,15
3.	Acenaften (Ac)	7,18	2,22	±0,20
4.	Fluoren (Fluo)	7,65	2,68	±0,25
5.	Fenantren (Fen)	8,52	13,51	±0,92
6.	Antracen (A)	8,61	3,73	±0,18
7.	Fluoranten (F)	9,63	15,93	±0,79
8.	Piren (Pir)	9,81	12,92	±1,01
9.	Benzo(a)antracen (BaA)	11,80	7,38	±0,80
10.	Chryzen (CH)	11,92	6,74	±0,75
11.	Benzo(b)fluoranten (BbF)	13,97	7,36	±0,68

Lp.	Składnik WWA certyfikowanej mieszaniny wzorcowej	Czas retencji [min]	Zawartość [mg/kg s.m.]	Niepewność oznaczeń $p < 0,05$
12.	Benzo(k)fluoranten (BkF)	14,25	3,87	$\pm 0,42$
13.	Benzo(a)piren (BaP)	14,74	7,77	$\pm 0,65$
14.	Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	17,15	1,79	$\pm 0,34$
15.	Indeno(1,2,3,cd)piren (IndP)	17,21	5,21	$\pm 0,48$
16.	Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	17,92	5,44	$\pm 0,27$
17.	Suma (WWAs)	–	100,93	$\pm 6,62$

Operacje te przeprowadzono na zestawie do ekstrakcji metodą SPE firmy Baker (fot. 3.1).

Efektywność stosowania opracowanej metodyki izolacji WWA z gleby (metoda A) określono poprzez porównanie jej z innymi (metody: B i C), proponowanymi w literaturze. Wyniki analiz chromatograficznych poszczególne wydzielonych analitów przedstawiono w tabeli 3.4 i na wykresie 3.3. Ponadto na wykresie 3.4 pokazano chromatogram rozdziału zidentyfikowanych WWA oraz biomarkera C30 17 α (H), 21 β (H)-hopanu z badanej próbki gleby.

Metoda Aopracowana metodyka z zastosowaniem jako rozpuszczalnika eteru naftowego.

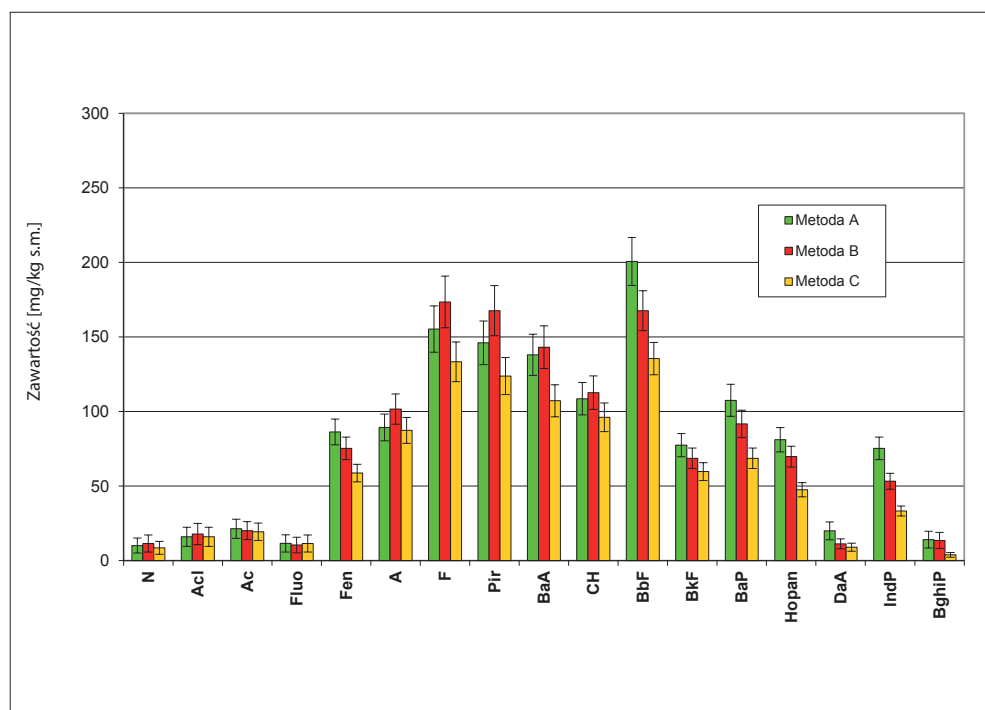
Metoda B.....zastosowanie jako rozpuszczalnika mieszaniny heksan:aceton w stosunku 2:1 i wydzielenie frakcji aromatycznej w kolumniach z fazami Al₂O₃/SiO₂.

Metoda C.....zastosowanie jako rozpuszczalnika mieszaniny heksan:dichlormetan w stosunku 1:1 i oczyszczenie na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu.

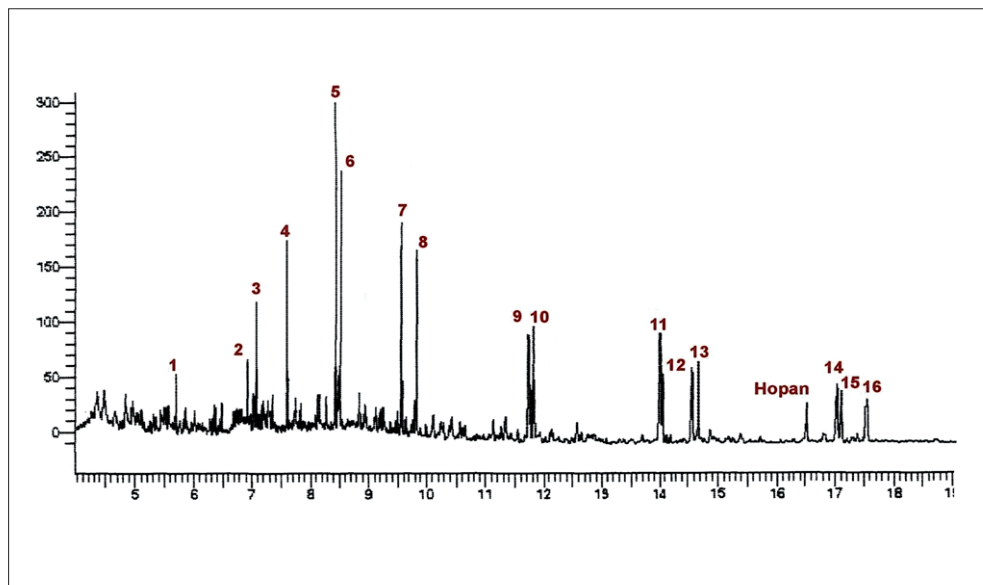
Tabela 3.4. Porównanie zawartości zidentyfikowanych WWA przy zastosowaniu różnych układów ekstrahentów i sposobu izolacji frakcji aromatycznej w glebie

Lp.	Składnik WWA	Zawartość WWA [mg/kg s.m.]	Zawartość WWA [mg/kg s.m.]	Zawartość WWA [mg/kg s.m.]
		Metoda A	Metoda B	Metoda C
1.	Naftalen (N)	10,13	11,47	8,61
2.	Acenaftalen (AcI)	15,97	17,86	15,99
3.	Acenaften (Ac)	21,37	20,14	19,39
4.	Fluoren (Fluo)	11,57	10,47	11,45
5.	Fenantren (Fen)	86,34	75,32	58,75
6.	Antracen (A)	89,33	101,66	87,35
7.	Fluoranten (F)	155,33	173,49	133,36
8.	Piren (Pir)	146,11	167,67	123,78
9.	Benzo(a)antracen (BaA)	138,02	143,13	107,22
10.	Chryzen (CH)	108,58	112,67	96,15
11.	Benzo(b)fluoranten (BbF)	200,67	167,65	135,52
12.	Benzo(k)fluoranten (BkF)	77,46	68,65	59,73
13.	Benzo(a)piren (BaP)	107,50	91,76	68,65
14.	Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	81,09	69,75	47,51
15.	Indeno(1,2,3,cd)piren (IndP)	19,97	11,26	9,02
16.	Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	75,32	53,25	33,33
17.	Suma (WWAs)	1 711,47	1 581,26	1 398,10
Stopień odzysku		93,1%	86,0%	76,1%

W wyniku zastosowania różnych układów rozpuszczalników i sposobów izolacji WWA uzyskano nieznacznie różniące się wyniki (tab. 3.4, wykres 3.3). Porównując izolację WWA za pomocą metod A i B, należy stwierdzić, że izolacja frakcji organicznej uzyskana w wyniku zastosowania metody B była bardziej skuteczna w przypadku: naftalenu (N) o 13,2%, acenaftalenu (Acl) o 11,8%, antracenu (A) o 13,8%, fluorantenu (Fen) o 11,7%, pirenu (Pir) o 14,8%, benzo(a)antracenu (BaA) o 3,7%, chryzenu (CH) o 3,8%. Natomiast w przypadku węglowodorów o wyższej liczbie pierścieni w cząsteczce wyizolowano znacznie niższe ich zawartości. W przypadku zastosowania do ekstrakcji układu rozpuszczalników: heksan:dichlorometan w stosunku 1:1 (metoda C) wyizolowano znacznie niższe ilości poszczególnych WWA w porównaniu z metodami A i B. Porównując wyniki analiz chromatograficznych wyizolowanych WWA, należy stwierdzić, że najwyższy stopień odzysku frakcji aromatycznej uzyskano dla metody A. W związku z powyższym została ona wytypowana jako optymalna do izolacji WWA z gleb.



Wykres 3.3. Porównanie zawartości zidentyfikowanych WWA przy zastosowaniu różnych układów ekstrahentów i sposobu izolacji frakcji aromatycznej z gleby



Wykres 3.4. Chromatogram rozdziału zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (16 WWA) oraz biomarkera C30 17 α (H), 21 β (H)-hopanu z badanej próbki gleby

W celu przetestowania opracowanej metodyki chromatograficznego oznaczania WWA w glebie wykonano serię 10 analiz i obliczono względne odchylenie standardowe [%], których wyniki przedstawiono w tabeli 3.5.

Względne odchylenie standardowe [%] dla poszczególnych zidentyfikowanych WWA kształtowało się na poziomie 6,68–24,36%, co świadczy o zadowalającej dokładności i precyzji opracowanej metodyki.

3.2.3. Badania toksykologiczne

Ocenę skuteczności stosowanych zabiegów remediacyjnych w procesie oczyszczania gleby, obok określania stężenia toksykantu, prowadzono na podstawie wyników testów toksykologicznych. Próbkę gleby analizowano, stosując pięć mikrobiotestów z organizmami należącymi do trzech poziomów troficznych: producentów (Phytotoxkit i Spirodela Duckweed Toxkit), konsumentów (Ostracodtoxkit) oraz reducentów (Microtox STP)

(tab. 2.3). Wykonano również test oceny ryzyka środowiskowego MARA oraz test genotoksyczności Ames. Badania prowadzono zgodnie ze standardowymi procedurami.

Tabela 3.5. Zestawienie wartości względnego odchylenia standardowego RSD [%] dla serii analiz (10) WWA wyizolowanych z próbki gleby

Lp.	Oznaczany składnik	RSD Względne odchylenie standardowe [%]
1.	Naftalen (N)	6,68
2.	Acenaftalen (AcI)	7,02
3.	Acenaften (Ac)	7,82
4.	Fluoren (Fluo)	8,07
5.	Fenantren (Fen)	7,39
6.	Antracen (A)	9,33
7.	Fluoranten (F)	11,28
8.	Piren (Pir)	13,85
9.	Benzo(a)antracen (BaA)	15,64
10.	Chryzen (CH)	14,82
11.	Benzo(b)fluoranten (BbF)	17,57
12.	Benzo(k)fluoranten (BkF)	16,88
13.	Benzo(a)piren (BaP)	17,15
14.	Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	16,25
15.	Hopan	9,18
16.	Indeno(1,2,3,cd)piren (IndP)	22,54
17.	Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	24,36

Materiał do badań stanowiła gleba zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi, stosowana w prowadzonym procesie jej oczyszczenia w warunkach *ex situ*. Badania wykonano w początkowej fazie testu oraz po jego zakończeniu (po 300 dniach). Test Ostracodtoxkit prowadzono na próbkach gleb, natomiast do przeprowadzenia pozostałych testów stosowano ekstrakty wodne sporządzone z poszczególnych gleb w proporcjach gleby do wody 1:10 (m:m). Otrzymane wyniki toksyczności podano jako procent reakcji testowej. Wyniki przeprowadzonych testów zostały przedstawione jako wartości toksyczności EC50, które można również wyrazić w postaci jednostek toksyczności $TU = 100/EC50$.

3.2.3.1. Test fitotoksyczności Phytotoxkit

Phytotoxkit należy do testów oceny toksyczności chronicznej i jest oparty na ocenie kiełkowania oraz wczesnego wzrostu roślin metodą analizy obrazu. W badaniu tym wykorzystywane są trzy rodzaje roślin wyselekcjonowane ze względu na szybkość kiełkowania i szybkość wzrostu korzeni, co umożliwia wykonanie pełnego oznaczenia toksyczności w ciągu trzech dni inkubacji:

- jednoliścienne sorgo (*Sorghum saccharatum*);
- dwuliścienna rzeżucha (*Lepidium sativum*);
- dwuliścienna gorczyca (*Sinapis alba*).

Oznaczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej rośliny testowej. Badania wykonywano w polistyrenowych, przezroczystych płytkach testowych.

Warunki inkubacji: temperatura $T = 25^{\circ}\text{C}$ w ciemności, czas inkubacji $t = 72$ h.

Reakcja testowa: zahamowanie kiełkowania oraz wczesnego wzrostu korzenia.

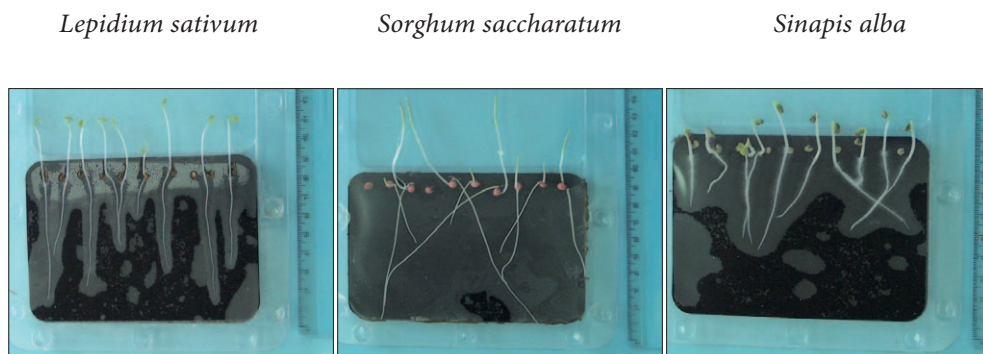
Wykonanie testu

- Przygotowanie płytki w liczbie $n = (\text{liczba badanych próbek} + 1) \cdot \text{liczba testowanych roślin}$.
- Nawodnienie próbki gleby oraz gleby kontrolnej.
- Naniesienie około 90 ml gleby na dolną część płytki; umieszczenie papierowego filtra na wierzchu nasączonej gleby.
- Umieszczenie 10 nasion w jednej linii (około 1 cm od środka płytki) w równych odstępach i przykrycie płytki.
- Umieszczenie płytek pionowo w stojaku i inkubowanie ich w temperaturze 25°C przez 72 h.

- Po 72 h wykonanie zdjęcia płytek z wykiełkowanymi roślinami.
- Wykonanie równoległe trzech powtórzeń.

Odczyt wyników

Rejestracja wyglądu płytki testowej na końcu trwania testu może być wykonana przy użyciu aparatu cyfrowego lub płaskiego skanera (fot. 3.2). Do niniejszej analizy obrazu użyto programu ImageJ. W pierwszym jej etapie policzono liczbę wykiełkowanych nasion i obliczono procent kiełkowania. Następnie zmierzono długość korzenia każdej rośliny, po czym obliczono procentowe zahamowanie wzrostu korzenia w stosunku do próbki kontrolnej.



Fot. 3.2. Przykładowy obraz wzrostu testowanych roślin w teście Phytotoxkit na próbce gleby kontrolnej

Standardowy test Phytotoxkit analizuje dwa efekty w glebie badanej w odniesieniu do gleby kontrolnej, analogicznie do normy ISI 11269-1 „Określenie efektów skażenia gleby – Część I: Metoda pomiaru zahamowania wzrostu korzeni”.

3.2.3.2. Spirodela Duckweed Toxkit

Mikrobiotest oceny toksyczności Spirodela Duckweed Toxkit jest testem zahamowania (lub braku) wzrostu wodnych roślin wyższych *Spirodela polyrrhiza*. Pozwala on ocenić hamowanie wzrostu kiełkujących turionów po trzech dniach ekspozycji na substancje toksyczne lub próbki skażonej wody, w odniesieniu do próbki kontrolnej, która przebiega

w nietoksycznej pożywce. Wzrost roślin określany jest poprzez pomiar powierzchni pierwszych liści w czasach $t = 0h$ i $t = 72h$, przy użyciu programu do analizy obrazu. Na podstawie otrzymanych wyników oblicza się zahamowanie wzrostu roślin (72 h EC50). Badania przeprowadzane są w 48-dółkowej mikroplątce, w pięciu stężeniach badanego toksykantu, każde w ośmiu powtórzeniach. Organizmy testowe dostarczane w postaci pąków przetrwanych (turionów) mogą być przechowywane przez kilkanaście miesięcy, a na żądanie ożywiane w celu gotowości do przeprowadzenia testu. Wysokiej jakości turiony są produkowane w ściśle określonych warunkach wykluczających zróżnicowanie związane z hodowlą żywych organizmów w konwencjonalnych biotestach. Jednorodne, wysokiej jakości medium wzrostowe, wykorzystywane jako kontrola oraz do wykonania rozcieńczeń, jest uzyskane przez proste rozcieńczenie stężonych roztworów „Steinberg medium” wodą dejonizowaną. Ponadto badanie prowadzi się w standaryzowanych mikroplątkach testowych wykonanych z obojętnego biologicznie materiału, zapewniającego jednorodne warunki naświetlania.

Precyzja standaryzowanego testu opartego na rzęsie *Spirodela polyrhiza* została określona w międzynarodowym porównaniu laboratoryjnym, w którym wzięło udział ponad 50 laboratoriów z 20 krajów.

Wykonanie testu

- 1) Przygotowanie organizmów i pożywki do rozcieńczeń:
 - » sporządzenie pożywki wzrostowej Steinberg (wg ISO 20079);
 - » przeniesienie przetrwalnych pąków (turionów) rzęsy *Spirodela polyrhiza* na płytkę Petriego, w której nastąpi ich kiełkowanie w pożywce wzrostowej.
- 2) Kiełkowanie turionów.
 - » Inkubowanie płytki z turionami w pożywce wzrostowej Steinberg przez okres trzech dni w temperaturze 25°C przy ciągłym oświetleniu 6000 lx.
- 3) Przygotowanie serii pięciu toksycznych rozcieńczeń zgodnie ze standardową procedurą.
 - » Materiał badawczy stanowiły ekstrakty wodne uzyskane przez jednodobowy kontakt badanych próbek gleb z wodą w stosunku 1:10.
- 4) Napełnienie płytki testowej toksycznymi rozcieńczeniami.
 - » przeniesienie po 1 ml pożywki wzrostowej Stainberg do każdego z ośmiu dołków rzędu kontrolnego płytki testowej (rząd A);
 - » przeniesienie po 1 ml roztworów toksycznych do każdego z ośmiu dołków rzędu płytki testowej – jeden rząd płytki testowej dla jednego

rozcieńczenia toksycznego roztworu (rzędy B–F). Kolejne rzędy płytki testowej należy napełniać wzrastającymi stężeniami toksycznych rozcieńczeń badanego roztworu – rząd F płytki testowej zawiera najwyższe stężenie toksykantu.

- 5) Przeniesienie kiełkujących turionów do dołków testowych:
 - » kiełkujące turiony należy przenieść (używając specjalnej szpatułki) po jednym do każdego z dołków testowych w 48-dołkowej płytce, zawierającej toksyczne rozcieńczenia;
 - » wykonywanie cyfrowego zdjęcia płytki oraz jego transfer do komputera – obraz płytki w czasie t_{0h}.
- 6) Inkubacja płytki testowej:
 - » inkubowanie przykrytej płytki testowej trwa 3 dni w temperaturze 25°C, przy ciągłym oświetleniu 6000 lx;
 - » wykonywanie cyfrowego zdjęcia płytki i jego transfer do komputera – obraz płytki w czasie t_{72h}. Przykładowy obraz płytki z badanymi roślinami po zakończeniu testu przedstawiono na fot. 3.3.



Fot. 3.3. Przykładowy obraz wzrostu testowanych roślin *Spirodela polyrhiza* w teście

7) Pomiar powierzchni listków.

- » Rozmiar pierwszych listków (powierzchnia) rzęsy w dołkach testowych jest określany bezpośrednio na podstawie zdjęć wykonanych na początku testu i po 3 dniach inkubacji, przy użyciu programu do analizy obrazu (np. ImageJ).

8) Opracowanie danych.

- » Wzrost rzęsy jest obliczany przez odjęcie średniej „początkowej” wielkości pierwszych listków od średniej „końcowej” wielkości listków w próbie kontrolnej i toksycznych rozcieńczeniach. Na podstawie otrzymanych wyników oblicza się procentowe zahamowanie wzrostu roślin w odpowiednich rozcieńczeniach toksykantu oraz wyliczana jest wartość 72h EC50 z 95-proc. poziomem ufności.

Kryterium uznania testu za ważny jest wartość średniego wzrostu pierwszych listków w dołkach w rzędzie kontroli po trzech dniach inkubacji w temperaturze 25°C przy oświetleniu 6000 lx (średnia t72h–t0h) wyższa lub równa wartości 10 mm².

3.2.3.3. Test bezpośredniego kontaktu (TBK) Ostracodtoxit F

Test **Ostracodtoxit F** należy do testów bezpośredniego kontaktu (TBK) oceny toksyczności chronicznej z wykorzystaniem skorupiaka (*Heterocypris incongruens*) (fot. 3.4).

Biotest „pierwszego kontaktu” jest przeprowadzany przy użyciu młodych dennych skorupiaków *Heterocypris incongruens* (małżoraczki) wylęgłych z cyst przetrwalnikowych w ciągu 52 godzin (zgodnie z procedurą producenta). Po sześciu dniach przechowywania w osadzie procentowo określa się ich śmiertelność oraz zahamowanie wzrostu w odniesieniu do rezultatów uzyskanych w kontakcie z nietoksycznym osadem kontrolnym. Test przeprowadzany jest na płytkach z sześcioma dołkami (3 × 2), czas inkubacji: sześć dni w temperaturze 25°C.

Wykonanie testu

- Przygotowanie standardowej pożywki; rozpoczęcie na 52 godz. przed realizacją testu wylęgu organizmów. Inkubację należy prowadzić w temp. 25°C przez 48 godz., w ciągłym oświetleniu (źródło światła 4000 lx).
- Przygotowanie zawiesiny glonów o stężeniu ok. 1,5·10⁷ komórek/cm³ (wg dostarczonej procedury).

- Wprowadzenie do wszystkich cel płytki testowej po 2 cm³ standardowej pożywki, 1 cm³ gleby, 2 cm³ zawiesiny glonów oraz po 10 szt. małżoraczków. Procedurę zastosować również do płytki testowej z glebą kontrolną.
- Inkubowanie przygotowanych zgodnie z powyższymi wytycznymi płytek testowych w temperaturze 25°C, w ciemni, przez okres sześciu dni.



Fot. 3.4. Obraz skorupiaka (*Heterocypris incongruens*)

Interpretacja wyniku

- Obliczenie uśmierconych organizmów w każdym kubku płytki testowej z osadem kontrolnym i osadem testowym. Liczba ta jest określana przez

- selekcję żywych organizmów znalezionych w każdym kubku, rozpoczynając od początkowej liczby 10 organizmów.
- Obliczenie średniej śmiertelności dla wszystkich powtórzeń z osadem kontrolnym i osadem testowym z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności.
 - Obliczenie średniej długości 10 (nowo wylęgłych) organizmów zmierzonych na początku testu (L_0).
 - Obliczenie średniej długości żywych organizmów zmierzonych po sześciu dniach w każdym kubku z osadem kontrolnym (L_6) i osadem testowym (L_6).
 - Obliczenie średniej wartości przyrostu długości bioindykatorów
 $\Delta L = L_6 - L_0$.
 - Obliczenie zahamowania procentowego wzrostu bioindykatorów w osadzie testowanym wg wzoru (1):

$$\% \text{ zahamowania wzrostu} = 100 - (\Delta L_{\text{bad.}} / \Delta L_{\text{kontr.}}) * 100 \quad (1)$$

- Jeśli śmiertelność bioindykatorów przekracza 50%, efekt przeżyciowy (obniżenie przyrostu małżoraczków) nie jest brany pod uwagę i w tabeli wstawia się znak „X”.

Kryteria przeprowadzanego testu

- Średni % śmiertelności w próbce kontrolnej nie może przekraczać 20%.
- Średni przyrost długości testowanych organizmów (*Heterocypris incongruens*) w próbce kontrolnej musi wynosić przynajmniej 400 μm .

3.2.3.4. Microtox Solid Phase

Microtox Solid Phase (test do fazy stałej) to test bezpośredniego kontaktu oceny ostrej z wykorzystaniem bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri*, które w normalnych warunkach zużywają około 10% metabolizmu na wytworzenie światła. Test jest produkowany przez firmę SDI Strategic Diagnostics Incorporated (USA) i rozprowadzany w Polsce przez firmę Tigret. Zakupione liofilizowane bakterie mogą być przechowywane przez rok w temperaturze -20°C i użyte do testu w każdej chwili po zawieszeniu ich w wodzie

dejonizowanej. Bakterie umieszczone w płynie do rozcieńczeń (2% NaCl) świecą ze stałą intensywnością przez okres 1–1,5 godz. Wrażliwość testu, oceniona na ponad 1300 związków chemicznych, w większości przypadków jest zbliżona do wrażliwości organizmów wyższych (skorupiaki, ryby). W chwili obecnej jest on prawdopodobnie najczęściej stosowanym testem bioindykacyjnym, a jednocześnie najlepiej poznanym.

Reakcją testową na obecność substancji toksycznych jest obniżenie się poziomu luminescencji (świecenia próbki). Test ten wykonuje się według standardowej procedury przy użyciu **analyzera Delta TOX**, umożliwiającemu w trybie **TOX** badanie toksyczności: **Q-TOX** – pomiar szybkiej toksyczności – test skriningowy pozwalający na uzyskanie orientacyjnej informacji o poziomie toksyczności próbki oraz **B-TOX** – standardowa procedura przesiewowa z rozcieńczeniami dla próbek toksycznych:

2% B-TOX	próbki silnie toksyczne;
45% B-TOX	próbki średnio toksyczne;
81,9% B-TOX	próbki słabo toksyczne.

Czas inkubacji: 15 minut.

Przygotowanie próbki do badań

Ekstrakty wodne z gleb przeznaczonych do badań toksykologicznych testem Microtox Solid Phase przygotowuje się poprzez zmieszanie 7 g gleby w zlewce plastikowej i dodanie odczynnika Microtox SPT Diluent (3,5% NaCl) w ilości 35 ml. Próbkę należy homogenizować w sonifikatorze przez 1 minutę, a następnie mieszać na mieszadle magnetycznym 20 minut. Po przesączeniu przez filtr będący w zestawie (filtr membranowy 0,22 µm) należy przeprowadzić test z bakteriami *Vibro fischeri*.

Wynikiem testu jest wartość EC50, czyli stężenie próbki powodujące obniżenie luminescencji o 50%. Następnie EC50 jest przeliczane według wzoru (2) na jednostki toksyczności TU.

$$TU = 100 / EC50 \quad (2)$$

Test Microtox Solid Phase umożliwia bezpośredni kontakt bakterii luminescencyjnych z próbką gleby, co pozwala na wykrycie nie tylko substancji toksycznych rozpuszczonych w wodzie, ale także związków lipofilnych i słabo rozpuszczalnych w wodzie.

3.2.3.5. Test ryzyka środowiskowego MARA

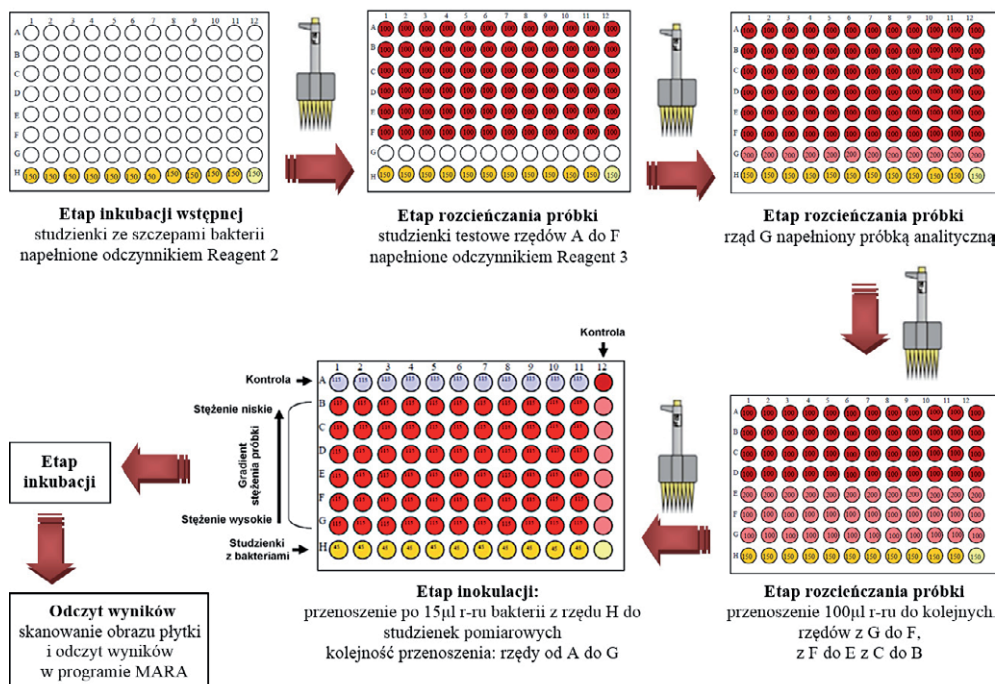
Test MARA (*Microbial Assay for Risk Assessment* – test oceny ryzyka środowiskowego) to innowacyjny system oceny toksyczności chronicznej próbek, wykorzystujący jako bioindykatory 10 organizmów prokariotycznych – bakterii o różnej taksonomii i jeden eukariotyczny – drożdże. W teście MARA wykorzystywane są szczepy bakterii: *Microbacterium species Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosteroni*, *Enterococcus casseliflavus*, *Delftia acidovorans*, *Kurthia gibsoni*, *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas aurantiaca*, *Serratia rubidaea* oraz *Pichia anomala*.

Liofilizowane bioindykatory umieszczone są przez producenta w celkach polistyrenowej, 96-dółkowej płytki, która jest następnie pakowana hermetycznie w warunkach aseptycznych. Dzięki temu, w przypadku testu MARA nie jest konieczne prowadzenie hodowli organizmów testowych wymagającej odpowiedniego zaplecza mikrobiologicznego, co generowałoby dodatkowe koszty. Wykonanie testu wymaga jedynie zastosowania 4-godzinnego etapu wstępnej inkubacji (temp. 30°C) mającego na celu ożywienie mikroorganizmów ze stanu wymrożenia oraz 18-godzinnej inkubacji w celu wykonania testu (zapewnienie warunków wilgotności i temperatury optymalnych do rozwoju mikroorganizmów).

Zastosowanie do oceny toksyczności próbki mikroorganizmów, których niewielkie rozmiary umożliwiają przeprowadzenie testu jednocześnie na milionach organizmów testowych zebranych na niewielkiej powierzchni, znacząco usprawnia proces oceny toksyczności, obniża jego koszty, a także zwiększa wiarygodność uzyskiwanych wyników poprzez wyeliminowanie wpływu uwarunkowań osobniczych (np. wad rozwojowych czy uszkodzeń), co w przypadku stosowania pojedynczych organizmów może zniekształcać uzyskiwane rezultaty. Dodatkowo zastosowanie w jednym teście 11 rodzajów organizmów, różnych pod względem taksonomicznym i genetycznym (12. kolumna kontrolna nie zawiera mikroorganizmów), pozwala na przetestowanie działania badanej substancji (próbki) na mikroorganizmy o zróżnicowanej czułości dla różnego rodzaju toksykantów. Wykonanie testu MARA zwiększa prawdopodobieństwo, że przynajmniej jeden rodzaj organizmów testowych okaże się wrażliwy na działanie szkodliwych substancji obecnych w próbce. Dodatkowym, pozytywnym aspektem przeprowadzenia takiego testu jest bezpośredni kontakt organizmów bioindykacyjnych z badaną próbką. Umożliwia to określenie rzeczywistej toksyczności próbki, a nie jedynie wybranych jej składników, oraz określenie wzajemnych, niekorzystnych interakcji składników próbki, substancji odżywczych i stosowanych mikroorganizmów.

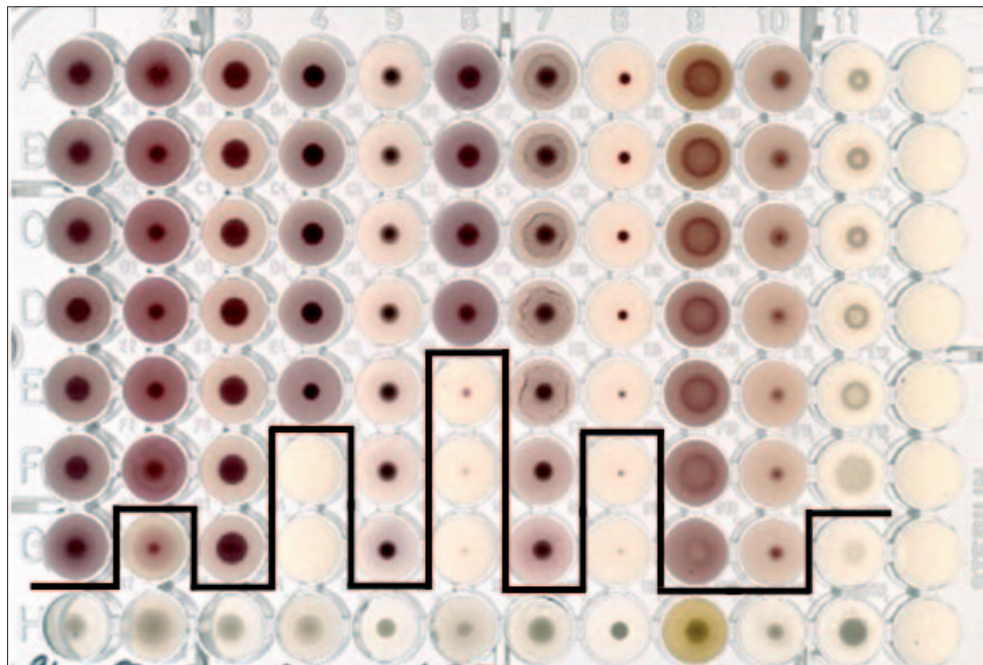
Procedurę wykonania testu MARA zilustrowano na rysunku 3.2.

W systemie MARA toksyczność próbki oceniana jest na podstawie stopnia zahamowania wzrostu organizmów testowych po 18 godzinach inkubacji. Czerwień tetrazolinowa dodawana do pożywki jest redukowana przez zdrowe bakterie do nierozpuszczalnego w wodzie czerwonego barwnika. Płytkę jest następnie skanowana, a jej obraz analizowany przez służący do tego celu specjalny program (fot. 3.5).



Rys. 3.2. Schemat przeprowadzenia procedury testu MARA w wersji testu z rozcieńczeniami

Płytki testowe można zastosować zarówno do testów przesiewowych, jak i dokładniejszych testów z rozcieńczeniami. W przypadku przesiewowych istnieje możliwość jednoczesnego oznaczenia toksyczności od 1 do 6 próbek. Zalecane jest wykonanie badań przesiewowych dwóch próbek w trzech powtórzeniach lub ewentualnie trzech próbek w dwóch powtórzeniach na każdej płytce. Po etapie inkubacji, w którym zachodzi barwna reakcja odczynników, płytki testowe są skanowane i tworzony jest ich elektroniczny obraz, który jest następnie analizowany za pomocą oprogramowania MARA pozwalającego na ilościową ocenę zahamowania wzrostu organizmów testowych.



Fot. 3.5. Obraz uzyskany po skanowaniu płytki testowej MARA – czarną linią zaznaczono tzw. fingerprint uzyskany dla analizowanej próbki

Dla potrzeb prowadzenia badań z zastosowaniem wieloparametrowych testów MARA opracowana została nowa metoda obliczania i prezentowania wyników. Wprowadzono wartość MTC (*Microbial Toxic Concentration* – toksyczne stężenie mikrobiologiczne) obliczaną na podstawie wzoru (3) [53]:

$$MTC = c_{\min} d^{(P_{\text{tot}} / P_0) - 0,5} \quad (3)$$

gdzie:

c_{\min} – najniższe stężenie w gradiencie stężeń badanej substancji;

d – współczynnik rozcieńczenia;

P_0 – rozmiar (średnica) granulki w studzience kontrolnej;

P_{tot} – suma rozmiarów granulek we wszystkich studzienek eksponowanych na kontakt z badaną próbką.

Otrzymane dane są oceniane jako:

- minimalna wartość MTC – koncentracja, która jest toksyczna dla najczulszego organizmu;
- maksymalna wartość MTC – koncentracja, która jest toksyczna dla najmniej czułego organizmu;
- średnia wartość MTC – średnia wartość koncentracji, które są toksyczne dla wszystkich organizmów;
- informacja o toksycznym działaniu substancji (*fingerprint*) – unikalna tablica wartości toksycznych stężeń danej substancji (próbki) dla poszczególnych organizmów testowych, która może być porównywana z unikalnymi informacjami (*fingerprint*) oznaczonymi dla innych substancji.

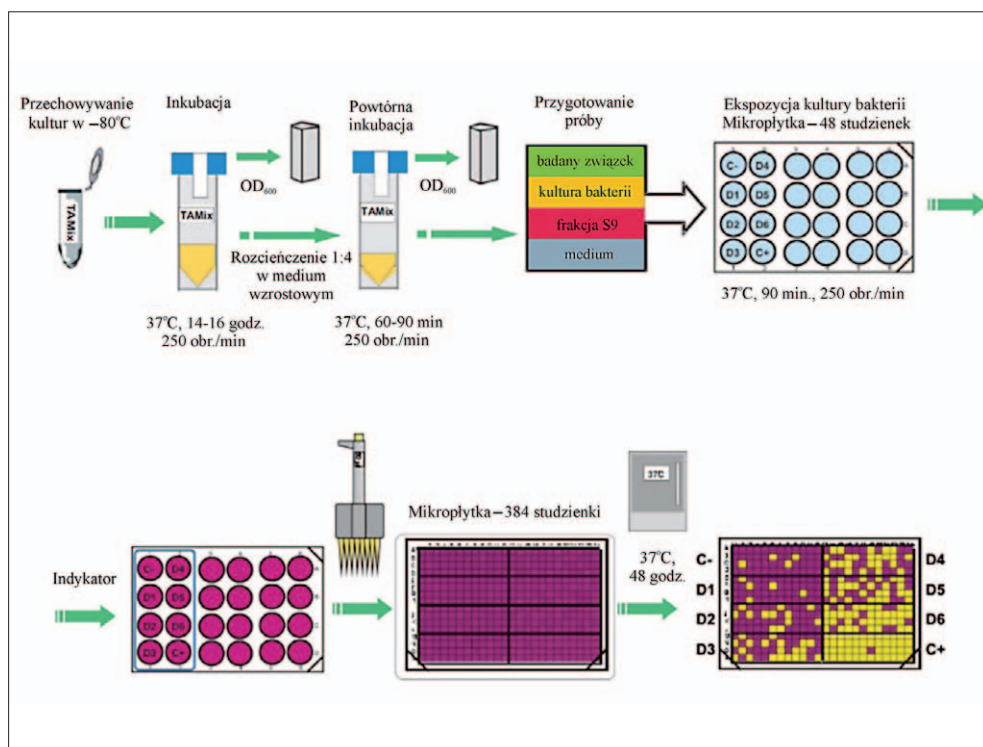
Wartości MTC obliczone dla poszczególnych szczepów mikroorganizmów stosowanych w teście odpowiadają parametrowi EC50 (stężenie powodujące 50-proc. efekt testowy).

3.2.3.6. Test Ames

W celu zbadania, czy oczyszczona gleba nie zawiera związków mutagennych, wykonano test bazujący na powszechnie znanej metodzie Ames, która polega na wykrywaniu mutacji powrotnych z histydynowej auktotrofii do prototrofii w wielu szczepach *Salmonella typhimurium*. Szczepy testowe tej bakterii charakteryzują się różnymi typami mutacji w genach odpowiedzialnych za syntezę histydyny, w związku z czym wymagają jej obecności w podłożu do wzrostu. Standardowo wykorzystuje się dwa szczepy: TA98 i TA100, posiadające odpowiednie mutacje polegające na tzw. przesunięciu ramki odczytu i substytucji pary zasad, oraz dwa mutageny, tj. 2-nitro-fluoren i azydek sodu. W obecności substancji o właściwościach mutagennych dochodzi do pierwszej mutacji (poprzez rewersję) i przywrócona zostaje zdolność syntezy histydyny, której objawem jest pojawienie się rewertantów na podłożu bez histydyny. Liczba rewertantów jest miarą aktywności mutagennej badanej próbki.

Standardowy test Ames wykorzystuje płytki agarowe. W obecnym teście wykorzystano modyfikację metody w postaci testu Muta-Chromoplate Kit dostarczanego przez firmę Environmental Bio-Detection Products Inc. (Ontario, Canada). Istotna różnica polega na tym, że test wykonuje się w podłożu płynnym, stosując płytki 48-studzienkowe (tzw. test fluktuacji) [21]. Jego przewagę nad klasycznym testem stanowi większa czułość oraz możliwość wykonywania go – ze względu na gotową procedurę – także przez mniej

wyspecjalizowane laboratoria. Rezultatem testu jest reakcja barwna; kolor żółty oznacza wystąpienie mutacji powrotnej, a purpurowy – jej brak. Porównanie liczby studzienek, w których nastąpiła mutacja pod wpływem badanego czynnika w stosunku do liczby studzienek, gdzie nastąpiła mutacja spontaniczna, pozwala za pomocą programu komputerowego dostarczonego przez producenta na statystyczną ocenę mutagenności badanych próbek.



Rys. 3.3. Schemat testu Amesa

Przed wykonaniem testu należy uaktywnić mikroorganizmy, które dostarczane są w postaci liofilizowanej, przez dodanie podłoża wzrostowego i inkubację w temperaturze 37°C przez 16–18 godzin. Mieszaninę reakcyjną przygotowuje się przez zmieszanie gotowych roztworów: 43,24 ml soli Davis-Mingioli, 9,5 ml D-glukozy, 4,76 ml purpury bromokrezolowej, 2,38 ml D-biotyny i 0,12 ml L-histydyny. Jako rozpuszczalnika bada-

nych ekstraktów zanieczyszczeń ropopochodnych, zawartych w analizowanych próbkach, używa się DMSO, przy czym jego ilość dodana do mieszaniny reakcyjnej zgodnie z zaleceniami producenta nie może przekraczać 0,5 ml. Badane próbki przesącza się przez filtr o wielkości porów 0,22 μm . Następnie przenosi się aseptycznie po 2,5 ml mieszaniny reakcyjnej do probówek testowych, które dopełnia się do 17,5 ml roztworem (próbka badana, bezpośrednio działający mutagen lub sama woda). Do wszystkich probówek dodaje się po 5 μl szczepu testowego i po dokładnym wymieszaniu porcuje się po 200 μl do każdej studzienki. Na rysunku 3.3 przedstawiono schematyczny tok postępowania podczas testu Ames. W teście zastosowano aktywator – frakcję mikrosomalną S9 z wątroby szczura. Rola ekstraktu polega na enzymatycznym przekształceniu badanej substancji, co prowadzi do ujawnienia jej ewentualnych właściwości mutagennych.

3.2.4. Przygotowanie stanowiska do badań biodegradacji zanieczyszczeń metodą *ex situ* w skali laboratoryjnej

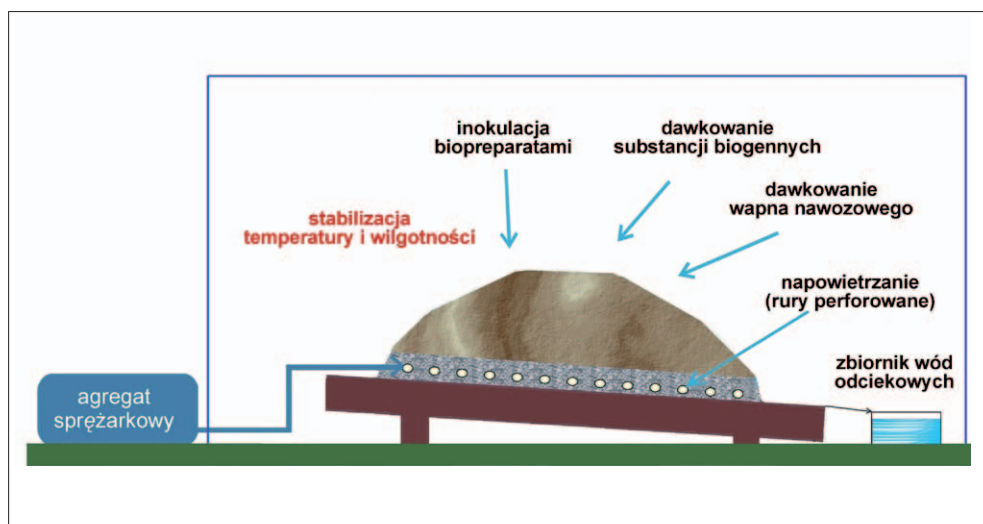
Przyjęto, że przeprowadzenie badań laboratoryjnych w skali półtechnicznej (metoda *ex situ*) jest niezbędne, gdyż umożliwia opracowanie wytycznych do prowadzenia procesów oczyszczania dołów urobkowych, realizowanych w warunkach terenowych metodą *in situ*, pomimo że przetransponowanie wyników badań laboratoryjnych na warunki przemysłowe jest trudne.

Badania laboratoryjne pozwalają na:

- dobór optymalnych dawek wapna nawozowego i substancji biogennych do oczyszczanego gruntu;
- zapoznanie się z efektywnością działania opracowanych biopreparatów, dozowanych w kolejnych etapach oczyszczania gruntu;
- określenie efektywności kolejnych etapów kompleksowej technologii oczyszczania gruntu z zanieczyszczeń TPH i WWA;
- opracowanie modelu matematycznego biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

Badania laboratoryjne w skali półtechnicznej, metodą *ex situ*, prowadzono na specjalnie skonstruowanym stanowisku badawczym. Bezpośrednio na posadzce została ułożona folia służąca do ochrony przed rozprzestrzenianiem się zanieczyszczeń ropopochodnych i skażeniem pomieszczenia. Na folii posadowiono postument również zabezpieczony folią, którego konstrukcja pozwalała na odprowadzanie wód i ciekłych zanieczyszczeń

spluwających z pryzmy. Na postumentie ułożono warstwę podsypki ze żwiru. Wewnątrz warstwy podsypki umieszczono system perforowanych rur, przez które wtłaczano powietrze z dwóch agregatów sprężarkowych w celu właściwego natlenienia gruntu. Następnie uformowano pryzmę z badanego gruntu (około 150 kg), pobranego z terenów gazowni klasycznej oraz dołu urobkowego. W trakcie prowadzenia procesów oczyszczania gleba w pryzmie zasilona była substancjami biogennymi (związki azotu i fosforu) oraz prowadzono inokulację odpadu biopreparatami mikrobiologicznymi. Wilgotność gleby utrzymywano na poziomie 20–25% poprzez zraszanie wodą, natomiast odczyn stabilizowano na poziomie pH 7,5–7,8 dawkując wapno nawozowe. Pryzmy zostały przykryte tunelem foliowym, który pozwalał na utrzymanie wewnątrz pryzm stałej temperatury w granicach 17–25°C, możliwej do osiągnięcia w warunkach terenowych. Odciek z pryzm zbierano w zbiorniku odcieków zainstalowanym poniżej poziomu postumentu. Przykładowy schemat stanowiska badawczego, wykorzystywanego podczas prowadzenia procesu oczyszczania gleby w skali półtechnicznej (metoda *ex situ*), przedstawiono na rysunku 3.4.

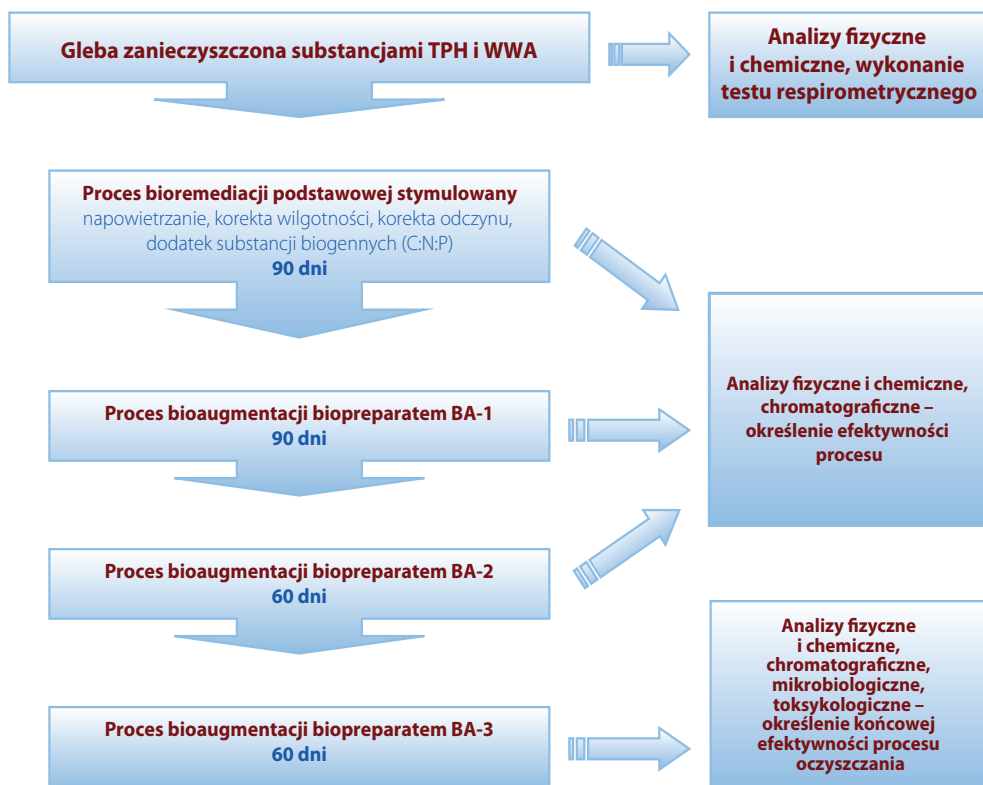


Rys. 3.4. Schemat stanowiska badawczego do prowadzenia procesu oczyszczania gruntu z zanieczyszczeń ropopochodnych w warunkach półtechnicznych (metoda *ex situ*)

Dobór optymalnych proporcji substancji biogennych N:P dla badanej gleby, umieszczonej w formie pryzmy na stanowisku badawczym, wykonano poprzez dozowanie nawozu

mineralnego „Azofoska”. Nawóz ten wprowadzano porcjami w taki sposób, aby osiągnąć zakładany stosunek azotu i fosforu. Optymalny stosunek C:N:P dla oczyszczanej gleby wytypowano na podstawie wyników testu respirometrycznego, monitorującego tempo obniżenia się zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych [93, 121].

Schemat przebiegu badań laboratoryjnych prowadzonych w skali półtechnicznej metodą *ex situ* przedstawiono na rysunku 3.5.



Rys. 3.5. Schemat przebiegu badań laboratoryjnych oczyszczania odpadów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi (metoda przymowania *ex situ*)

Przebieg procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych kontrolowano, prowadząc monitoring wyznaczonych parametrów fizycznych i chemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości TPH i WWA.

Wyznaczenie optymalnych proporcji azotu i fosforu w oczyszczanej glebie na podstawie wyników testu respirometrycznego

Życie i funkcjonowanie organizmów opiera się na obecności w przyrodzie związków chemicznych, których elementami są pierwiastki. W procesach bioremediacji, w których jedynie naturalna mikroflora skażonego gruntu wykorzystywana jest do obniżenia w nim koncentracji zanieczyszczeń, ważna jest obecność składników odżywczych (głównie związków azotu i fosforu) mających wpływ na namnażanie się mikroorganizmów, a tym samym na tempo procesu biodegradacji zanieczyszczeń.

Obecność fosforu w środowisku glebowym w sposób odmienny do azotu wpływa na wykorzystywanie składników pokarmowych przez mikroorganizmy zawarte w glebie. Odpowiednia zawartość fosforu w glebie pobudza do rozwoju jej mikroflorę, tym samym zwiększając żyzność gleby. Fosfor to pierwiastek poprawiający strukturę glebową. Ważne jest dostosowanie odpowiednich dawek każdego ze składników pokarmowych. Nadmiar jednego pierwiastka w glebie może niekorzystnie wpłynąć na przyswajalność innego, i odwrotnie. Wskazują na to dwa prawa: pierwszym z nich jest prawo minimum (Lebiega), z którego wynika, że niedobór któregośkolwiek ze składników pokarmowych ogranicza działanie pozostałych. Prawo maksimum natomiast informuje o tym, że nadmiar jednego składnika ogranicza skuteczność działania innych. Istnieją wartości graniczne dla ilości składników dostarczanych w postaci nawozów, których nie można przekroczyć.

W procesach oczyszczania gleb, gdy tempo naturalnego procesu bioremediacji jest niewystarczające, stosuje się stymulację rodzimej mikroflory w celu przyspieszenia procesu bioremediacji. W warunkach, w których deficyt azotu i fosforu limituje efektywność procesu bioremediacji, stosowane jest sztuczne wzbogacanie rekultywowanego terenu, najczęściej poprzez zastosowanie nawozów zawierających azot i fosfor, co daje dobre efekty w postaci znacznego przyspieszenia bioremediacji.

Praktyka i doświadczenie uczą, że nie ma idealnego zestawienia N:P, które przynosi doskonałe rezultaty w każdych warunkach, ponieważ różne rodzaje gleby charakteryzują się odmienną żyznością i przepuszczalnością. Przyjęty jest uniwersalny stosunek tych składników jako 10:1. Jednak zupełnie inaczej mogą kształtować się dawki nawozów w przypadku każdego z rodzajów gleb. Dlatego tak ważne jest wcześniejsze rozpoznanie właściwości fizycznych i chemicznych badanych gleb. W niniejszym rozdziale został przeanalizowany wpływ różnych proporcji azotu do fosforu na szybkość biodegradacji celem wytypowania wartości, przy których następuje maksymalnie szybki proces bioremediacji oczyszczanego gruntu.

Opis laboratoryjnego stanowiska badawczego

Szybkość samoistnej i wspomaganey biodegradacji substancji ropopochodnych w warunkach tlenowych analizowano, wykorzystując test respirometryczny, pozwalający na pomiar zużycia tlenu i ilość wydzielanego dwutlenku węgla przez organizmy aerobowe zawarte w zanieczyszczonym gruncie. Badania kontrolowano przy użyciu zestawu respirometrycznego OxiTop Control firmy WTW (fot. 3.6).



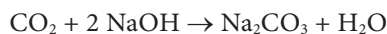
Fot. 3.6. Zestaw OxiTop z podstawą mieszającą i inkubator OxiTop

Zasada manometrycznego oznaczania tlenu opiera się na zużywaniu tlenu przez organizmy przy jednoczesnym wydzielaniu dwutlenku węgla, który jest wiązany przez czynnik absorbujący i dlatego nie pojawia się w postaci wolnego gazu. W konsekwencji następuje zmiana ciśnienia, która jest przypisywana tylko zużyciu tlenu w zamkniętym

naczyniu pomiarowym. Aby zużycie tlenu mogło być mierzone manometrycznie, spełnione muszą zostać następujące warunki:

- biologicznie aktywna próbka musi być umieszczona w naczyniu, które jest nieprzenikalne dla gazu;
- nad próbką musi być zachowana odpowiednio duża przestrzeń powietrzna, zapewniająca nieograniczoną ilość tlenu potrzebną do zajścia procesów biologicznego rozkładu;
- reaktor pomiarowy musi zawierać czynnik absorbujący dwutlenek węgla, ale próbka nie może zetknąć się z tym czynnikiem;
- w reaktorze musi być zainstalowane odpowiednie urządzenie do pomiaru ciśnienia;
- reaktor musi w czasie pomiaru znajdować się w miejscu o stałej temperaturze. Zmiany temperatury prowadzą do zmian ciśnienia, które powodują błędny odczyt zużycia tlenu.

Procesy biologiczne powodują zużycie tlenu przy jednoczesnym wytwarzaniu w przybliżeniu równomolowych ilości dwutlenku węgla, który jest wiązany przez zasadowy czynnik absorbujący, np. wodorotlenku sodu:



Należy zwrócić uwagę, aby co najmniej wielokrotna ilość czynnika absorbującego (wynikającego ze stechiometrycznej ilości) była obecna w środowisku reakcji celem optymalnej absorpcji CO_2 .

Pomiar zużycia tlenu oraz zapamiętywanie mierzonych wartości wykonywane jest przez główkę pomiarową zestawu OxiTop Control. Dane są następnie przekazywane poprzez podczerwień do kontrolera, gdzie mogą być poddawane obróbce graficznej i statystycznej. Można też przesłać je poprzez interfejs IR lub RS232 do drukarki lub komputera w celu dalszego opracowywania za pomocą programu Achat OC.

By dokonać pomiaru samoistnej i wspomaganej aktywności biologicznej w warunkach tlenowych, analizowane próbki gleb o wadze 50 g umieszczano w reaktorach pomiarowych, gdzie zroszono je wodą w objętości połowy chłonności gruntu, tj. 25 cm^3 , po czym każdy z reaktorów szczelnie zamykano główką pomiarową OxiTop Control zgodnie z procedurą

pomiarową. Analizowane próbki termostatowano w inkubatorze w temperaturze 20°C przez okres 30 dni. W tym czasie główki pomiarowe zestawu OxiTop Control odczytywały wartość ciśnienia panującego w reaktorze w dwugodzinnych odstępach. Za pomocą kontrolera OxiTop OC 110 zbierano zmierzone przez główki pomiarowe wartości ciśnienia, które automatycznie zostały przekonwertowane na wartości zużytego tlenu.

Przetwarzanie mierzonego ciśnienia na wartość zużytego tlenu (m_{O_2}) odbywa się według wzoru (4) [139] [mg/dm^3]:

$$m_{O_2} = \frac{M(O_2)}{RT_m} \cdot (V_g + \alpha \frac{T_m}{T_o}) \cdot \Delta p \quad (4)$$

gdzie:

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

V_g – objętość wolnego gazu [m^3];

R – stała gazowa [$J^*mol^{-1}K^{-1}$];

T_m – wartość pomiarowa temperatury [K];

T_o – temperatura odniesienia (273,15 K);

α – współczynnik absorpcji (0,03103);

Δp – spadek ciśnienia w próbie [Pa].

Badania laboratoryjne przeprowadzone za pomocą testu respirometrycznego posłużyły do określenia możliwości samoistnej i wspomaganej biodegradacji substancji ropopochodnych w gruncie, o różnej zawartości substancji biogenych, przebiegającej w warunkach tlenowych.

Zdolność samoistnej i wspomaganej substancjami biogennymi biodegradacji substancji ropopochodnych w warunkach tlenowych oszacowano poprzez zestawienie i porównanie zużycia tlenu w analizowanych próbkach gleby. Dostarczanie azotu i fosforu do zanieczyszczonego gruntu jest standardową techniką prowadzoną w celu zwiększenia szybkości biodegradacji substancji ropopochodnych. Poprzez dodatek tych składników stosunki C:N i C:P w gruncie są bardziej zbliżone do wymaganych przez bakterie, przez co zwiększa się aktywność mikroorganizmów. Dlatego w warunkach deficytu azotu i fosforu koniecznością staje się sztuczne wzbogacanie oczyszczanych gruntów biogenami, co daje wymierne efekty w postaci wzrostu szybkości biodegradacji.

Pomiar aktywności biologicznej zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi TPH i WWA gruntu wykonano dla próbek gleby:

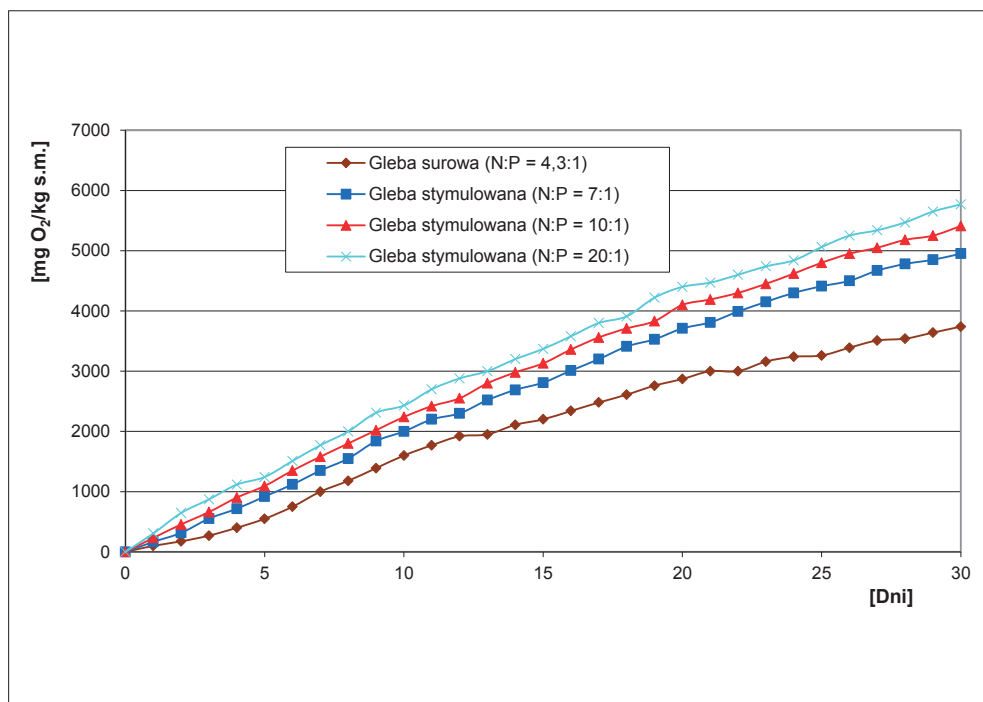
- surowej N:P = 4,3:1;
- po modyfikacji gleby surowej przez dodatek substancji biogenych, stymulujących proces biodegradacji. Substancje te wprowadzono tak, aby stosunek N:P wynosił: 20:1, 10:1 oraz 7:1.

Odczyn analizowanych prób glebowych doprowadzono do optymalnego poziomu pH 7,5–7,8 poprzez dawkowanie wapna nawozowego. Wapń pochodzący z węglanu wapnia sprzyja tworzeniu się struktury gruzełkowej, powodując koagulację koloidów glebowych, dzięki czemu poprawiają się warunki powietrzno-wodne w glebie. Wpływa on także na zwiększenie przeżywalności mikroorganizmów poprzez ochronę ich błon komórkowych przed dezintegrującym wpływem węglowodorów [100].

Stymulację procesu biodegradacji wykonano poprzez korektę stężenia azotu i fosforu, dozując w odpowiednich dawkach substancje biogenne (nawozy mineralne). Zastosowano nawóz mineralny „Azofoska” o składzie: 13,6% N całkowitego (5,5% azotu azotanowego, 8,1% azotu amonowego), 6,4% P₂O₅, 19,1% K₂O w postaci rozpuszczalnego K₂SO₄, 4,5% MgO w postaci rozpuszczalnego MgSO₄ oraz mikroelementy (0,17% Fe, 0,27% Mn, 0,18% Cu, 0,045% Zn, 0,045% B, 0,09% Mo). W przypadku deficytu azotu bądź fosforu potrzebnych do sporządzenia próbek gleby o pożądanej ich zawartości stosowano siarczan amonu bądź wodorofosforan potasu. Dla celów niniejszej dokumentacji oznaczoną ilość zużytego tlenu w jednostce objętości przeliczono na masę suchej gleby. Do sporządzenia wykresów zużycia tlenu w czasie stosowano uśrednioną wartość z całodobowego pomiaru. Na wykresie 3.5 przedstawiono wyniki pomiarów zużycia tlenu w analizowanych próbach glebowych.

Z danych przedstawionych na wykresie 3.5 wynika, że tlenowa biodegradacja węglowodorów, zarówno samoistna, jak i stymulowana składnikami biogennymi, zachodzi we wszystkich badanych próbach glebowych. Dodanie do gleby surowej substancji biogenych spowodowało zwiększenie aktywności biologicznej gleby, wspomagającej proces biodegradacji węglowodorów w analizowanym środowisku gruntowo-wodnym.

Najwolniejszą biodegradacją węglowodorów, wyznaczoną na podstawie szybkości zużycia tlenu w funkcji czasu pomiaru, charakteryzowała się próbka gleby surowej. Zwiększenie zawartości substancji biogenych (N i P) w glebie do proporcji 7:1, 10:1 oraz 20:1 powodowało wzrost szybkości zużycia tlenu w naczyniach reakcyjnych. Z uwagi na jedynie nieznacznie wyższy wzrost szybkości biodegradacji gleby stymulowanej substancjami biogennymi w proporcji N:P = 10:1 oraz N:P = 20:1 w porównaniu do gleby, w której stosunek N:P wynosił 7:1, do badań prowadzenia procesu biodegradacji węglowodorów TPH i WWA w warunkach *ex situ* wytypowano glebę z proporcją N:P na poziomie 7:1.



Wykres 3.5. Porównanie zużycia tlenu podczas samoistnej i stymulowanej substancjami biogennymi biodegradacji gleby zanieczyszczonej TPH i WWA

4. Charakterystyka składu zanieczyszczeń gleby skażonej substancjami ropopochodnymi (TPH i WWA)

Glebę pobraną z zanieczyszczonych terenów gazowni klasycznej wyłączzonej z eksploatacji, w pobliżu dołów ze smołą pogazową GK-1 oraz dołu urobkowego DU-1, poddano analizie fizycznej i chemicznej uwzględniającej oznaczenie zawartości: metali, składników biogennych oraz substancji ropopochodnych (TPH i WWA). Wyniki przedstawiono w tabeli 4.1. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że gleba pobrana z terenu dołu urobkowego DU-1 charakteryzuje się obojętnym odczynem, natomiast odczyn gleby z terenu gazowni klasycznej GK-1 jest lekko kwaśny (pH 4,85). Obydwie próby glebowe zawierają znaczne ilości substancji ropopochodnych:

- gleba DU-1: TPH = 33 984 mg/kg s.m., WWA = 4,98 mg/kg s.m.;
- gleba GK-1: TPH = 7 103 mg/kg s.m., WWA = 5 022,06 mg/kg s.m.

Wartości te przekraczają dopuszczalny poziom określony w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi (Dz.U. 2016, poz. 1395).

W badanych próbkach gleby zawartości BTEX kształtują się na poziomie 28,6–6,3 mg/kg s.m., co dowodzi, że tylko nieznacznie przekraczają dopuszczalne standardy glebowe. Natomiast fenole oznaczono na poziomie 4,8–31,5 mg/kg s.m., krezole 0,3–9,8 mg/kg s.m. oraz cyjanki w zakresie 0,25–55,4 mg/kg s.m. Zawartość PCB (polichlorowane bifenyly) nie przekraczała dopuszczalnych wartości (Dz.U. 2016, poz. 1395), gdyż wahała się w zakresie 0,05–1,4 mg/kg s.m. Nieznacznie wyższą zawartość określono

dla bifenyli, w granicach 0,38–3,40 mg/kg s.m. Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że badane gleby pochodzą z terenów mocno zdegradowanych i wskazana jest ich rekultywacja.

Wykonane analizy próbek gleby pod kątem zawartości metali ciężkich nie wykazały przekroczenia dopuszczalnych wartości określonych w Dz.U. 2016, poz. 1395). Odnotowano jedynie wysoką zawartość arsenu w glebie GK-1 (228 mg/kg s.m.). W próbkach stwierdzono ponadto nieznacznie podwyższony poziom żelaza i manganu. Analiza wykazała również, że gleba nie jest zasolona, gdyż zawartość w niej chlorków wahała się w zakresie 152,3–354,0 mg/kg s.m. Zawartość substancji organicznych mierzonych wskaźnikiem $ChZT_{(Cr)}$ kształtowała się na wysokim poziomie w granicach 52 485–109 265 mg O_2 /kg s.m. (tab. 4.1).

Tabela 4.1. Zestawienie wyników analiz fizykochemicznych próbek gleby pobranej z warstwy powierzchniowej z terenów dawnej gazowni klasycznej oraz dołu urobkowego

Oznaczenie	Jednostka	Miejsce poboru próbki	
		Próbka GK-1 0–0,5 m p.p.t.	Próbka DU-1 0–0,5 m p.p.t.
pH ekstraktu wodnego gleby 1:10	pH	4,85	6,68
Ubytek masy w 105°C	mg/kg	51 300	66 050
$ChZT_{(Cr)}$ gleby	mg O_2 /kg	52 485	109 265
BTEX (p-, m-ksylen)	mg/kg s.m.	28,6	6,3
Sumaryczna zawartość TPH	mg/kg s.m.	7 103,2	33 984
Sumaryczna zawartość WWA	mg/kg s.m.	5 022,06	4,98
Krezole	mg/kg s.m.	9,8	0,3
Fenole	mg/kg s.m.	31,5	4,8

Oznaczenie	Jednostka	Miejsce poboru próbki	
		Próbka GK-1 0–0,5 m p.p.t.	Próbka DU-1 0–0,5 m p.p.t.
2,4-dimetylofenol	mg/kg s.m.	2,5	0,6
3,4-dimetylofenol	mg/kg s.m.	4,6	1,5
Cyjanki	mg/kg s.m.	55,4	0,25
Bifenyle	mg/kg s.m.	3,4	0,38
PCB	mg/kg s.m.	1,4	0,05
Zawartość jonów Cl ⁻	mg/kg s.m.	152,3	354
Zawartość jonów SO ₄ ²⁻	mg/kg s.m.	6 550	673
Zawartość jonów NH ₄ ⁺	mg/kg s.m.	165,2	4,3
Zawartość jonów NO ₃ ⁻	mg/kg s.m.	15,4	62
Zawartość jonów PO ₄ ³⁻	mg/kg s.m.	78,9	49
Zawartość jonów S ²⁻	mg/kg s.m.	57,1	2,6
Zawartość SiO ₂	mg/kg s.m.	604 200	593 100
Zawartość Al ₂ O ₃	mg/kg s.m.	158,6	13 953
Zawartość Fe ₂ O ₃	mg/kg s.m.	19 620	8 969
Zawartość CaO	mg/kg s.m.	9 112	5 063
Zawartość MgO	mg/kg s.m.	5 330	2 053
Zawartość Mn	mg/kg s.m.	245,5	305

Oznaczenie	Jednostka	Miejsce poboru próbki		
		Próbka GK-1 0–0,5 m p.p.t.	Próbka DU-1 0–0,5 m p.p.t.	
Zawartość metali ciężkich	As	mg/kg s.m.	228	5,2
	Ba	mg/kg s.m.	58	240
	Cd	mg/kg s.m.	2,5	1,9
	Cr	mg/kg s.m.	7,8	9,2
	Co	mg/kg s.m.	5,4	7,7
	Cu	mg/kg s.m.	9,1	52,8
	Hg	mg/kg s.m.	2,2	1,8
	Pb	mg/kg s.m.	12,5	10,2
	Mo	mg/kg s.m.	25,2	7,5
	Sn	mg/kg s.m.	15,2	7,9
	Zn	mg/kg s.m.	45,9	25,5
Ni	mg/kg s.m.	4,5	14,8	

Analiza gleb z obu miejsc wykonana pod kątem zawartości azotu i fosforu wykazała, że w żadnej z nich nie ma sprzyjających warunków dla rozwoju flory mikrobiologicznej, gdyż proporcje N:P odbiegają od optymalnych. Dla poszczególnych próbek stosunek zawartości azotu do fosforu kształtuje się następująco:

- próbka GK-1 – N:P = 5,1:1;
- próbka DU-1 – N:P = 1,1:1.

Z przedstawionych danych wynika, że im wyższa zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych, tym bardziej proporcje azotu do fosforu odbiegają od wartości optymalnej.

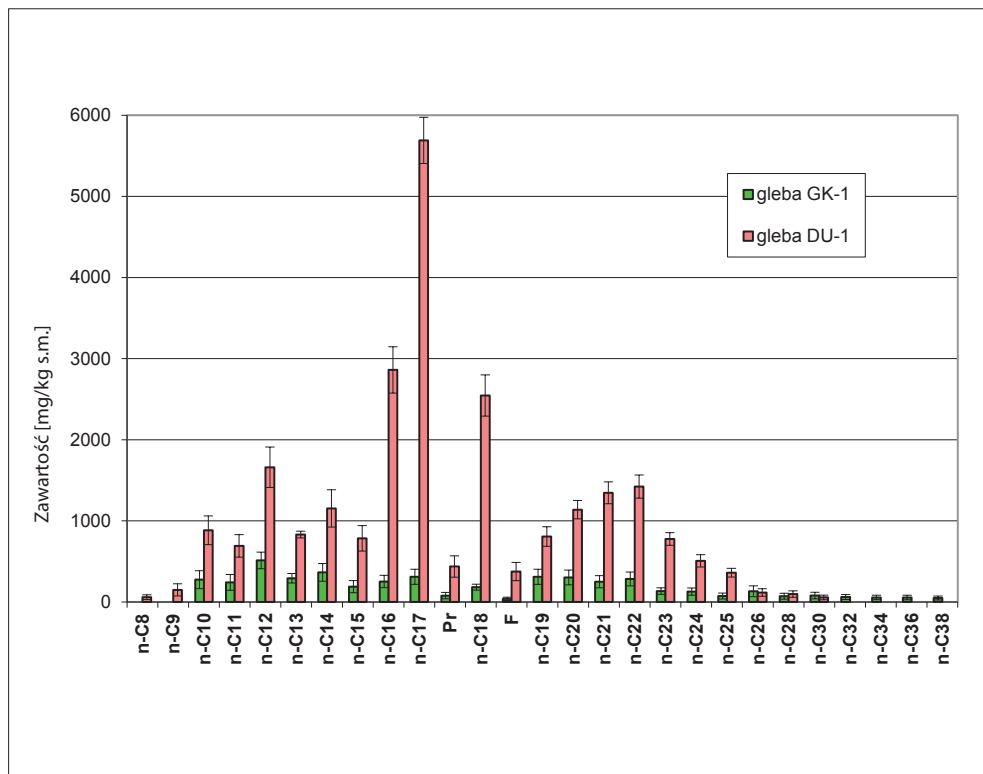
Wykonane według opracowanej metodyki (rozdział 3.2.2) analizy chromatograficzne pozwoliły na identyfikację oraz ilościowe oznaczenie zawartości węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH). W glebie z gazowni klasycznej GK-1 stwierdzono występowanie węglowodorów z zakresu n-C₁₀–n-C₃₈, natomiast w glebie z dołu urobkowego DU-1 z zakresu n-C₈–n-C₃₀. Rozdział zawartości węglowodorów w analizowanych próbkach gleby jest zróżnicowany, co przedstawiono w tabeli 4.2 i na wykresie 4.1.

Tabela 4.2. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodorów alifatycznych i izoprenoidów wchodzących w skład zanieczyszczeń (TPH) w badanych próbkach gleby

Oznaczany składnik	Próbka gleby GK-1 [mg/kg s.m.]	Próbka gleby DU-1 [mg/kg s.m.]
n-C ₈	n.s.	59,1
n-C ₉	n.s.	149,2
n-C ₁₀	275,3	884,4
n-C ₁₁	241,5	692,2
n-C ₁₂	512,6	1 661,0
n-C ₁₃	292,3	830,7
n-C ₁₄	364,5	1 153,7
n-C ₁₅	189,2	784,5

Oznaczany składnik	Próbka gleby GK-1 [mg/kg s.m.]	Próbka gleby DU-1 [mg/kg s.m.]
n-C ₁₆	252,3	2 861,1
n-C ₁₇	310,2	5 691,1
pristan (Pr)	78,2	438,0
n-C ₁₈	182,8	2 545,7
fitan (F)	39,8	375,0
n-C ₁₉	310,2	807,5
n-C ₂₀	302,4	1 138,2
n-C ₂₁	250,0	1 345,6
n-C ₂₂	284,2	1 422,8
n-C ₂₃	135,1	776,8
n-C ₂₄	128,2	507,6
n-C ₂₅	72,8	361,2
n-C ₂₆	132,4	116,6
n-C ₂₈	72,3	98,9
n-C ₃₀	80,2	56,8
n-C ₃₂	61,2	n.s.
n-C ₃₄	56,3	n.s.
n-C ₃₆	55,8	n.s.
n-C ₃₈	49,2	n.s.
niezidentyfikowane	2374,2	9226,3
Suma (TPH)	7 103,2	33 984,0

n.s. – nie stwierdzono



Wykres 4.1. Wyniki analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodorów alifatycznych i izoprenoidów wchodzących w skład zanieczyszczeń TPH w badanych próbkach gleby

W próbce GK-1 w przeważającej ilości występują węglowodory alifatyczne o długości łańcucha węglowego z zakresu n-C₁₂–n-C₂₂. Szczególnie wysoką zawartość odnotowano dla n-C₁₂, który występuje w ilości 512,6 mg/kg s.m. Zawartość pozostałych węglowodorów z tej grupy kształtuje się na niższym poziomie: 182,8–364,5 mg/kg s.m. Natomiast węglowodory cięższe o długości łańcucha n-C₂₃–n-C₃₈ występują na znacznie niższym poziomie: 49,2–135,1 mg/kg s.m. Zawartość węglowodorów TPH w próbce gleby DU-1 jest znacznie wyższa, gdyż ich sumaryczna zawartość wynosi 33 984 mg/kg s.m. Największą grupę spośród zidentyfikowanych n-alkanów stanowią węglowodory z zakresu n-C₁₂–n-C₂₂ (w granicach 784,5–5 691,1 mg/kg s.m.). W analizowanych próbkach stwierdzono obecność węglowodorów z grupy izoprenoidów, tj. pristan (Pr) i fitan (F), których zawartość w poszczególnych glebach utrzymuje się na podobnym poziomie:

- gleba GK-1: Pr = 78,2 mg/kg s.m., F = 39,8 mg/kg s.m.;
- gleba DU-1: Pr = 438,0 mg/kg s.m., F = 375,0 mg/kg s.m.

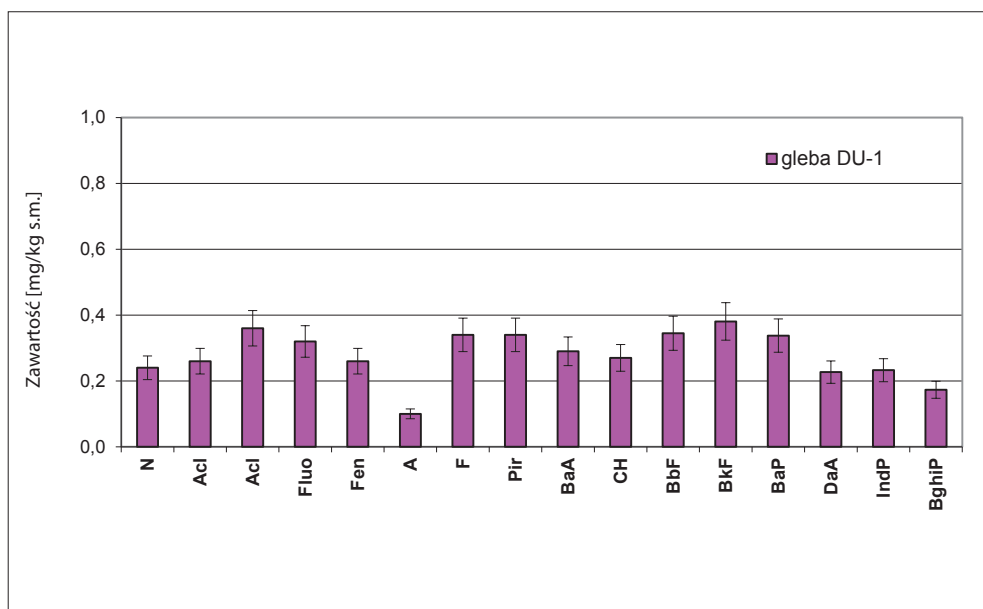
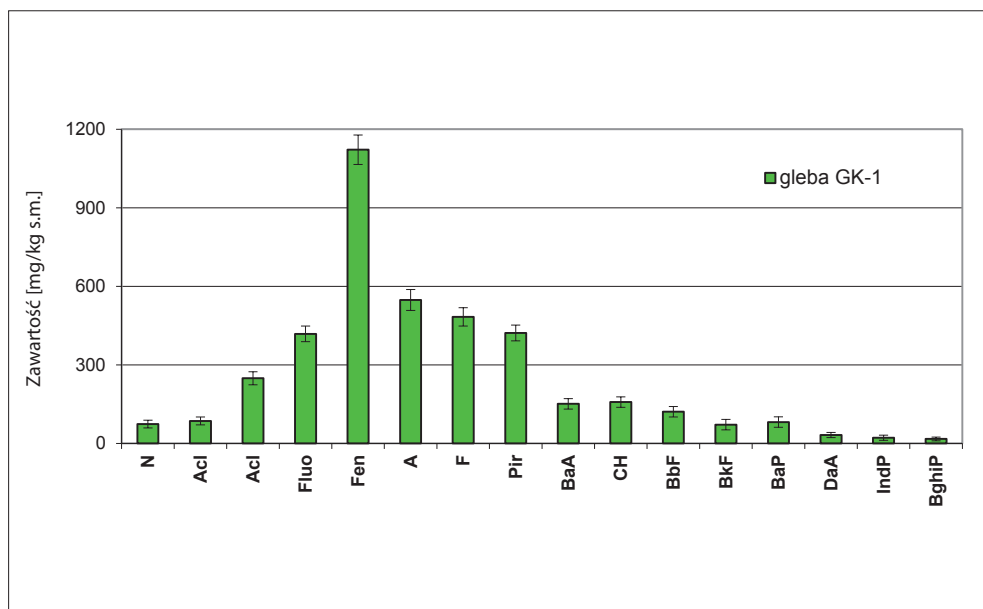
Opracowana metodyka chromatograficznego oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych umożliwiła zwrócenie szczególnej uwagi na ich znaczną zawartość w glebie pobranej z gazowni klasycznej GK-1 (tab. 4.3, wykres 4.2), w której w przeważającej ilości występują WWA zawierające w cząsteczce 3–4 pierścienie. Zawartość WWA 3-pierścieniowych wynosi 2 422,97 mg/kg s.m., z czego niemal połowę stanowi fenantren (Fen), który oznaczono w ilości 1 121,98 mg/kg s.m. Spośród 4-pierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWAs = 1 214,54 mg/kg s.m.) najwyższą wartość oznaczono dla fluorantenu (F) = 483,20 mg/kg s.m. i pirenu (Pir) = 422,06 mg/kg s.m. Natomiast suma 5-pierścieniowych WWA kształtuje się na poziomie 306,63 mg/kg s.m., przy przeważającej ilości benzo(b)fluorantenu (BbF) = 121,2 mg/kg s.m., który należy do jednych z najbardziej kancerogennych WWA. Zawartość 6-pierścieniowych WWA, tj. indeno(1,2,3,cd)piren (IndP) oraz benzo(g,h,i)perylene (BgHiP) jest również znacząca, gdyż wynosi 38,84 mg/kg s.m.

Znacznie mniejszą zawartość WWA oznaczono w glebie pobranej z dołu urobkowego DU-1, gdyż ich sumaryczna wartość wynosiła 4,96 mg/kg s.m. Zawartość poszczególnych węglowodorów przedstawiono w tabeli 4.3, a rozkład zawartości zobrazowano na wykresie 4.2.

Tabela 4.3. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gleby

Oznaczany składnik	Gleba GK-1 [mg/kg s.m.]	Gleba DU-1 [mg/kg s.m.]
Naftalen (N)	73,98	0,24
Acenaftalen (AcI)	85,87	0,26
Acenaften (Ac)	248,89	0,36
Fluoren (Fluo)	418,52	0,32

Oznaczany składnik	Gleba GK-1 [mg/kg s.m.]	Gleba DU-1 [mg/kg s.m.]
Fenantren (Fen)	1121,98	0,26
Antracen (A)	547,71	0,10
WWAs 3-pierścieniowe	2422,97	1,30
Fluoranten (F)	483,20	0,34
Piren (Pir)	422,06	0,34
Benzo(a)antracen (BaA)	151,20	0,29
Chryzen (CH)	158,08	0,27
WWAs 4-pierścieniowe	1214,54	1,24
Benzo(b)fluoranten (BbF)	121,20	0,34
Benzo(k)fluoranten (BkF)	71,77	0,38
Benzo(a)piren (BaP)	81,55	0,34
Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	32,11	0,23
WWAs 5-pierścieniowe	306,63	1,29
Indeno(1,2,3,cd)piren (IndP)	21,60	0,23
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	17,24	0,17
WWAs 6-pierścieniowe	38,84	0,40
WWA niezidentyfikowane	965,10	0,48
Suma (WWAs):	5022,06	4,96



Wykres 4.2. Wyniki analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych WWA w badanych próbkach gleby

Badana gleba DU-1 w przeważającej ilości zawierała WWA posiadające w cząsteczce 3–5 pierścieni, których wartości mieściły się w zakresie od 1,29 do 1,30 mg/kg s.m. 6-pierścieniowe węglowodory aromatyczne oznaczono w ilości 0,40 mg/kg s.m.

Z przedstawionych badań wynika, że gleba pobrana z terenu gazowni klasycznej zawiera wysokie zawartości TPH i WWA, które przekraczają dopuszczalne wartości określone w załączniku do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. (poz. 1395). Gleba pobrana z dołu urobkowego zawiera z kolei bardzo wysoką zawartość węglowodorów TPH, natomiast węglowodory z grupy WWA nie przekraczają dopuszczalnych wartości określonych w obowiązujących przepisach prawnych. Wysokie zawartości WWA w glebie skłaniają do opracowania efektywnej technologii oczyszczania skażonego gruntu.

Z uwagi na bardzo wysoką zawartość WWA w glebie GK-1, mogącej hamować proces jej oczyszczania, do badań procesu biodegradacji węglowodorów, prowadzonych w warunkach *ex situ*, jako materiał badawczy stosowano układ gleb: GK-1:DU-1 w stosunku 2:1. Przedstawione w niniejszej pracy badania pozwolą na opracowanie optymalnych wytycznych prowadzenia procesu rekultywacji terenu zanieczyszczonego wysokimi stężeniami WWA oraz TPH.

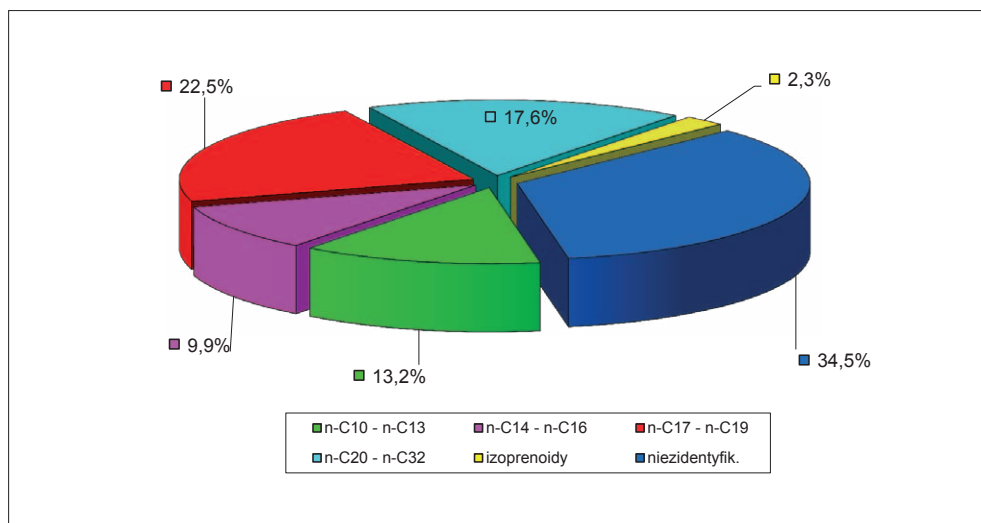
4.1. Dobór optymalnych parametrów oczyszczania gleby w warunkach *ex situ*

4.1.1. Charakterystyka materiału badawczego

Materiał badawczy stanowiła mieszanina próbek gleb pobranych z terenu gazowni klasycznej GK-1 oraz dołu urobkowego DU-1, które zmieszano w proporcjach GK-1:DU-1 = 2:1, po czym ujednolicono. Następnie wykonano analizę chromatograficzną materiału badawczego pod kątem oznaczenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Wyniki analiz chromatograficznych przedstawiono w tabelach 4.4 i 4.5 oraz zilustrowano na wykresach 4.3 i 4.4. Sumaryczna zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w próbce gleby przeznaczonej do badań procesu bioremediacji podstawowej wynosi 16 092 mg/kg s.m.

Tabela 4.4. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń (TPH) w próbce gleby po zmieszaniu, przeznaczonej do badań procesu bioremediacji (G)

Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]	Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]	Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]
n-C ₁₀	461,5	n-C ₁₇	2 230,5	n-C ₂₄	707,6
n-C ₁₁	230,7	pristan (Pr)	246,1	n-C ₂₆	492,2
n-C ₁₂	1 153,7	n-C ₁₈	1 015,2	n-C ₂₈	169,2
n-C ₁₃	276,9	fitan (F)	123,1	n-C ₃₀	153,8
n-C ₁₄	384,6	n-C ₁₉	369,2	hopan	5,0
n-C ₁₅	261,5	n-C ₂₀	646,1	n-C ₃₂	46,2
n-C ₁₆	953,7	n-C ₂₂	615,3	niezidentyfikowane	5 550,0
				Suma (TPH)	16 092,0



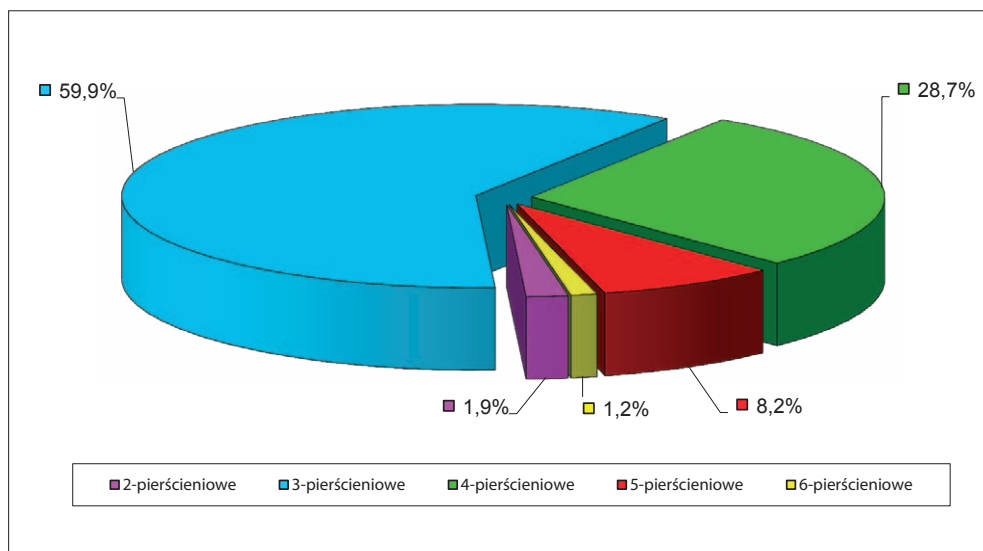
Wykres 4.3. Procentowy udział zidentyfikowanych węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń TPH

Procentowy udział zidentyfikowanych węglowodorów zobrazowany na wykresie 4.3 kształtuje się następująco:

- węglowodory z grupy n-C₁₀-n-C₁₃ – 13,2%;
- węglowodory z grupy n-C₁₄-n-C₁₆ – 9,9%;
- węglowodory z grupy n-C₁₇-n-C₁₉ – 22,5%;
- węglowodory z grupy n-C₂₀-n-C₃₂ – 17,6%;
- izoprenoidy (Pr i F) – 2,3%;
- niezidentyfikowane – 34,5%.

Tabela 4.5. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbce gleby po zmieszaniu, przeznaczonej do badań procesu bioremediacji (G)

Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]	Oznaczany składnik	Zawartość [mg/kg s.m.]
Naftalen (N)	51,52	WWAs 4-pierścieniowe	766,86
Acenaftalen (AcI)	56,21	Benzo(b)fluoranten (BbF)	84,30
Acenaften (Ac)	149,86	Benzo(k)fluoranten (BkF)	51,52
Fluoren (Fluo)	281,01	Benzo(a)piren (BaP)	56,20
Fenantren (Fen)	749,32	Hopan C3017α(H), 21 β (H)	5,00
Antracen (A)	365,31	Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	23,41
WWAs 3-pierścieniowe	1 601,71	WWAs 5-pierścieniowe	220,43
Fluoranten (F)	271,63	Indeno(1,2,3,cd)piren (IndP)	18,73
Piren (Pir)	284,21	Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	14,06
Benzo(a)antracen (BaA)	103,3	WWAs 6-pierścieniowe	32,79
Chryzen (CH)	107,72	Suma (WWAs):	3 256,51



Wykres 4.4. Procentowy udział zidentyfikowanych węglowodorów WWA wchodzących w skład zanieczyszczeń gleby

Sumaryczna zawartość WWA w badanej próbce gleby wynosi 3 256,51 mg/kg s.m. (tab. 4.5). Procentowy udział poszczególnych 16 WWA, zidentyfikowanych w wyniku wykonanej analizy chromatograficznej, przedstawiony na wykresie 4.4, kształtuje się na poziomie: WWA 2-pierścieniowe – 1,9%, WWA 3-pierścieniowe – 59,9%, WWA 4-pierścieniowe – 28,7%, WWA 5-pierścieniowe – 8,2%, WWA 6-pierścieniowe – 1,2%. Jak wynika z przedstawionych danych analitycznych, proces bioremediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi nie będzie łatwy, gdyż w skład zanieczyszczeń wchodzi duża ilość WWA, w tym również trudno ulegających biodegradacji.

Badaną glebę poddano analizie sitowej w celu ustalenia, jaka będzie biodostępność mikroorganizmów i substancji odżywczych do zanieczyszczeń ropopochodnych.

Rozmiar cząsteczek [mm]:

2,1	15,0%;
1–0,6	22,1%;
0,6–0,216	43,3%;
0,216–0,106	7,6%;
0,106–0,063	6,2%;
< 0,063	5,8%.

Podczas wykonywania analiz chemicznych zwrócono uwagę na parametry mające wpływ na przebieg procesu bioremediacji. Stwierdzono, że w próbce przeznaczony do procesu oczyszczania nie ma sprzyjających warunków do rozwoju flory bakteryjnej, gdyż stosunek N:P kształtuje się na poziomie 4,3:1 i odbiega od optymalnego, zaś pH wynosi 6,1 i również wymaga korekty.

4.1.2. Dobór optymalnych parametrów do prowadzenia procesu oczyszczania zanieczyszczonej gleby

Zanieczyszczona gleba, przeznaczona do prowadzenia procesu jej oczyszczania w warunkach *ex situ*, charakteryzowała się parametrami fizycznymi i chemicznymi odbiegającymi od optymalnych dla procesu bioremediacji. Z tego powodu przeznaczoną do badań glebę (próbka G), zgromadzoną w przyrodzie (ok. 150 kg), wzbogacono przede wszystkim w składniki biogenne.

Jako optymalny stosunek N:P przyjęto 7:1, który uzyskano dozując w odpowiednich dawkach (1,5–2,0 g/kg) nawóz mineralny „Azofoskę” o składzie: 13,6% N całkowitego 5,5% azotu azotanowego 8,1% azotu amonowego 6,4% P₂O₅ rozpuszczalnego, 19,1% K₂O w postaci K₂SO₄, 4,4% MgO w postaci rozpuszczalnego MgSO₄ oraz mikroelementy (0,17% Fe, 0,27% Mn, 0,18% Cu, 0,045% Zn, 0,09% Mo). Dobór substancji biogennych jest niezwykle ważnym elementem w procesie bioremediacji, lecz nie jest jednak wskazane wprowadzanie zbyt wysokiej ich ilości, gdyż mogłoby to doprowadzić do wzrostu ciśnienia osmotycznego na zewnątrz komórki bakteryjnej. Zjawisko to może hamować pobieranie wody przez bakterie, a w skrajnych warunkach powodować nawet ich odwodnienie [96, 204, 121].

W celu korekty odczynu gleby do uzyskania optymalnego pH 7,5–7,8 dozowano wapno nawozowe w ilości 1,0–1,5 g/kg gleby. Wapń pochodzący z węglanu wapnia sprzyja tworzeniu się struktury granulkowatej powodując koagulację koloidów glebowych, dzięki czemu poprawiają się warunki powietrzno-wodne w glebie. Ponadto wpływa na zwiększenie przeżywalności mikroorganizmów poprzez ochronę ich błon komórkowych przed dezintegrującym wpływem węglowodorów zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych [100].

Tak przygotowaną glebę poddano procesowi bioremediacji podstawowej, ukierunkowanej na zmniejszenie zawartości substancji ropopochodnych TPH i WWA w zanieczyszczonej glebie.

4.2. Przeprowadzenie procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi TPH i WWA w warunkach *ex situ*

4.2.1. Analiza statystyczna i pierwszorzędowy model biodegradacji TPH i WWA

W celu opracowania uproszczonego matematycznego modelu biodegradacji TPH i WWA podczas prowadzenia badań w skali laboratoryjnej do oceny stopnia biodegradacji zastosowano biomarker $C_{30} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopan, który stanowi wyizolowaną frakcję z rop pochodzących ze złóż kalifornijskich. Wykorzystanie tego biomarkera w badaniach procesu biodegradacji TPH i WWA w glebie pozwoliło na wyeliminowanie błędów analitycznych w oznaczeniach ilościowych ww. substancji ropopochodnych. Znormalizowane hopanem wyniki oznaczeń chromatograficznych TPH i WWA wykonanych w trakcie prowadzenia biodegradacji posłużyły do opracowania matematycznego pierwszorzędowego modelu opisującego przebieg biodegradacji TPH i WWA [144, 189, 204, 205]. Został on opisany równaniem (5):

$$C/C_H = (C/C_H)_o \exp(-kt) \quad (5)$$

gdzie:

C – koncentracja analitu;

C_H – koncentracja hopan;

k – stała biodegradacji pierwszego rzędu [d^{-1}];

C/C_H – znormalizowane stężenie analitu w czasie;

$(C/C_H)_o$ – znormalizowane stężenie analitu w punkcie wyjściowym;

t – czas trwania procesu [dni].

Analiza regresji nieliniowej z zastosowaniem równania (5) umożliwiła wyznaczenie stałej biodegradacji pierwszego rzędu (k) oraz współczynnika korelacji (r^2) określającego

dopasowanie punktów pomiarowych do krzywych teoretycznych procesu biodegradacji TPH oraz WWA. Przeprowadzenie nieliniowej wariancji (ANOVA) metodą Tukeya na poziomie ufności $p < 0,05$ umożliwia eliminację danych analitycznych (chemicznych i biologicznych) statystycznie nieistotnych. Do statystycznego przetwarzania otrzymanych danych analitycznych zastosowano program Statistica w wersji 7.1.

4.2.2. Bioremediacja podstawowa gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi TPH i WWA

Bioremediacja podstawowa jest procesem, podczas którego jedynie naturalna mikroflora bakteryjna jest wykorzystywana do obniżania zawartości zanieczyszczeń w glebie do jak najniższego poziomu w określonych ramach czasowych. Aby proces ten mógł być skutecznie przeprowadzony, musi być spełnionych kilka określonych warunków:

- obecność odpowiedniej liczby mikroorganizmów zdolnych do rozkładu i mineralizacji substancji ropopochodnych;
- odpowiednia zawartość nieorganicznych składników pokarmowych niezbędnych do wzrostu mikroorganizmów (przede wszystkim związków azotu i fosforu);
- odpowiednia wilgotność środowiska;
- odpowiednia temperatura (istnieją mikroorganizmy psychrofilne zdolne do degradacji węglowodorów w niskich temperaturach, lecz wydajność tego procesu jest niska);
- odpowiedni odczyn środowiska;
- stężenie związków ropopochodnych nie może przekraczać biologicznej tolerancji mikroorganizmów rozkładających te związki.

W ramach procesu bioremediacji prowadzono napowietrzanie gruntu przy użyciu powietrza z agregatu sprężarkowego. Zapotrzebowanie na tlen w przypadku gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi jest wielokrotnie większe niż w przypadku wolnej od zanieczyszczeń ropopochodnych, natomiast jego niedostatek jest istotnym czynnikiem ograniczającym efektywność bioremediacji.

Temperaturę wewnątrz pryzmy utrzymywano na poziomie 17–25°C, gdyż taką wartość przyjęto za możliwą do osiągnięcia w warunkach terenowych w sezonie letnim

w umiarkowanej strefie klimatycznej. Temperatura jest czynnikiem, od którego zależy aktywność drobnoustrojów, a tym samym intensywność rozkładu węglowodorów. Podczas przebiegu procesów biodegradacyjnych optymalny zakres temperatury dla większości bakterii wynosi 20–38°C [217].

Wilgotność gleby utrzymywano na poziomie zbliżonym do optymalnego, tj. 20–25%, stosując zraszanie wodą.

W wyniku przeprowadzonego w warunkach laboratoryjnych (metodą *ex situ*) procesu bioremediacji podstawowej, stymulowanej poprzez dobór optymalnych parametrów gleby, osiągnięto obniżenie zawartości TPH z 16 092,0 mg/kg s.m. do 10 416 mg/kg s.m. w okresie 90 dni trwania procesu (tab. 4.6, wykres 4.5). Stopień obniżenia TPH kształtował się następująco:

- po 30 dniach – 15,6%;
- po 60 dniach – 28,1%;
- po 90 dniach – 35,3%.

Przeprowadzony proces bioremediacji podstawowej przyczynił się do widocznego obniżenia zawartości WWAs – z 3256,51 do 2491 mg/kg s.m. (tab. 4.6, wykres 4.6). Na podstawie uzyskanych wyników analiz chromatograficznych można stwierdzić, że stopień redukcji WWAs wynosił odpowiednio:

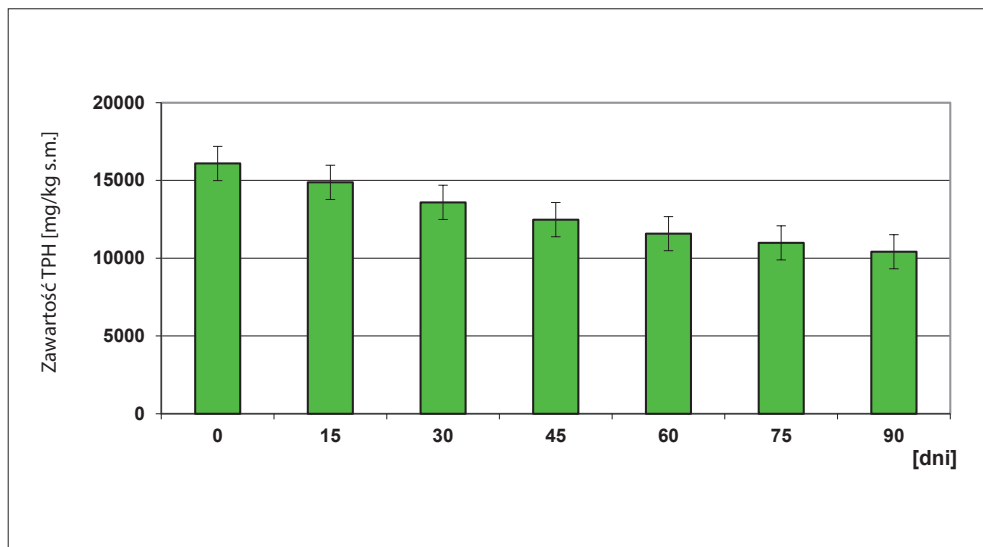
- po 30 dniach – 13,1%;
- po 60 dniach – 20,7%;
- po 90 dniach – 23,5%.

W wyniku przeprowadzonego procesu oczyszczania gleby uzyskano również obniżenie zawartości fenoli z 21,8 do 17,3 mg/kg s.m. oraz cyjanków z 36,4 do 29,2 mg/kg s.m. Wzrost aktywności dehydrogenazowej z 9,8 do 31,2 mg TF/g s.m./24 h w trakcie procesu bioremediacji podstawowej korelował z obniżaniem się zawartości zanieczyszczeń TPH i WWA (tab. 4.6).

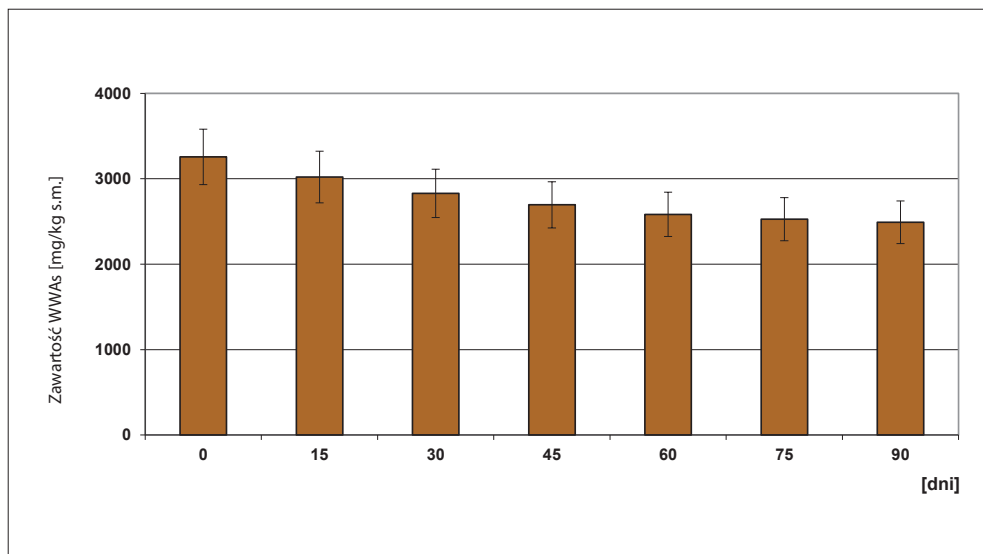
W wyniku prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej uaktywniono naturalną mikroflorę skażonego terenu, co przyczyniło się do zwiększenia efektywności następnych etapów procesu oczyszczania, jakimi były kolejne inokulacje oczyszczanej gleby za pomocą trzech konsorcjów bakteryjnych (BA-1, BA-2 i BA-3), złożonych z mikroorganizmów wykazujących zdolności rozkładu węglowodorów ropopochodnych TPH i WWA. Do dalszych badań użyto gleby po procesie bioremediacji podstawowej.

Tabela 4.6. Zestawienie wyników analiz fizycznych i chemicznych podczas prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda *ex situ*)

Oznaczenie	Jednostka	Gleba G	Czas trwania procesu bioremediacji podstawowej oczyszczonej gleby					
			15 dni	30 dni	45 dni	60 dni	75 dni	90 dni
Odczyn	pH	6,1	7,2	7,3	7,4	7,5	7,5	7,6
Wilgotność	%	15,3	18,2	19,3	21,1	22,2	21,3	21,3
ChZT _(Cr)	mg O ₂ /kg s.m.	38 741	35 226	32 169	29 612	26 576	25 317	24 278
TPH	mg/kg s.m.	16 092	14 876	13 587	12 478	11 578	10 987	10 416
WWAs	mg/kg s.m.	3 256,5	3 020	2 830	2 695	2 583	2 528	2 491
Jon amonowy NH ₄ ⁺	mg/kg s.m.	302,1	299	301	282	275	273	265
Azotany (V) NO ₃ ⁻	mg/kg s.m.	95,1	88,2	87,8	83,8	82,4	80,5	78,8
Fosforany (V) PO ₄ ³⁻	mg/kg s.m.	76,2	75,2	74,8	74	73,7	71,1	70,8
Fenole	mg/kg s.m.	21,8	20,1	19,5	18,9	18,1	17,8	17,3
Cyjanki	mg/kg s.m.	36,4	35,0	34,2	32,8	31,1	29,8	29,2
Aktywność dehydrogenazowa	mg TF/g s.m./24 h	9,8	11,5	18,3	24,3	28,3	29,9	31,2



Wykres 4.5. Zmiany obniżania zawartości TPH w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej



Wykres 4.6. Zmiany obniżania zawartości WWA w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej

4.2.3. Bioaugmentacja gleby biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3

Badania procesu bioaugmentacji prowadzono przez okres 210 dni w trzech kolejno następujących po sobie etapach:

- przez okres 90 dni biopreparatem BA-1;
- przez okres 60 dni biopreparatem BA-2;
- przez okres 60 dni biopreparatem BA-3.

Biopreparaty BA-1, BA-2 oraz BA-3 opracowano w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB na podstawie wyników uzyskanych z mikrobiologicznego badania gleby w połączeniu z rezultatami analiz chromatograficznych zanieczyszczeń węglowodorowych zawartych w glebie.

W badaniach zastosowano inokulację za pomocą trzech konsorcjów bakteryjnych (BA-1, BA-2, BA-3), złożonych z niepatogennych mikroorganizmów wykazujących zdolności rozkładu węglowodorów ropopochodnych. Każdy z mikroorganizmów zawartych w biopreparatach przejawiał zdolności wzrostu w obecności zarówno n-alkanów, jak i węglowodorów aromatycznych.

Przy opracowywaniu biopreparatu badania mikrobiologiczne ukierunkowano pod kątem [84, 165]:

- ruchliwości mikroorganizmów;
- zdolności wzrostu w warunkach tlenowych i beztlenowych;
- zdolności wzrostu w szerokim przedziale temperaturowym (4–40°C);
- zdolności wykorzystania węglowodorów jako jedyne źródła węgla w procesach życiowych.

Proces bioaugmentacji gleby (po przeprowadzonym zabiegu bioremediacji podstawowej: gleba G-BP) biopreparatem BA-1 metodą *ex situ* prowadzono przez okres 90 dni (tab. 4.7, wykresy 4.7–4.8). Umożliwił on obniżenie zawartości:

- TPH do poziomu 4797 mg/kg s.m., co stanowi 34,9% redukcji zanieczyszczeń;
- WWA do poziomu 1199 mg/kg s.m., co stanowi 51,9% redukcji zanieczyszczeń.

Po przeprowadzonym zabiegu inokulacji gleby (po zabiegu bioaugmentacji biopreparatem BA-1: gleba G-BA1) biopreparatem BA-2 i prowadzeniu przez okres 60 dni procesu bioaugmentacji uzyskano znaczne obniżenie zarówno TPH (z 4797 do 2095 mg/kg s.m.),

jak i WWA (z 1199 do 482 mg/kg s.m.) (tab. 4.8, wykresy 4.7–4.8). Podczas procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-2 gleby G-BA1, prowadzonego w warunkach *ex situ*, odnotowano obniżenie:

- po 30 dniach: TPH (9,6%), WWA (31,5%);
- po 60 dniach: TPH (16,8%), WWA (59,8%)

w odniesieniu do pierwotnej zawartości zanieczyszczeń węglowodorowych.

Ponadto zanotowano zmniejszenie zawartości fenoli do poziomu 7,8 mg/kg s.m. i cyjanków do wartości 15,3 mg/kg s.m.

Tabela 4.7. Zestawienie wyników analiz fizycznych i chemicznych podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-1 gleby G-BP, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda *ex situ*)

Oznaczenie	Jednostka	Gleba G-BP	Czas trwania procesu oczyszczania gleby G-BP biopreparatem BA-1					
			15 dni	30 dni	45 dni	60 dni	75 dni	90 dni
Odczyn	pH	7,6	7,4	7,5	7,6	7,6	7,7	7,7
Wilgotność	%	21,3	20,5	21,1	22,0	19,5	18,7	21,8
ChZT _(G)	mg O ₂ /kg s.m.	24 278	23 056	20 987	19 999	19 175	18 624	18 206
TPH	mg/kg s.m.	10 416	8 974	7 048	6 153	5 574	5 214	4 797
WWAs	mg/kg s.m.	2 491	2 090	1 804	1 547	1 354	1 247	1 199
Jon amonowy NH ₄ ⁺	mg/kg s.m.	265	337	310	299	287	275	272
Azotany (V) NO ₃ ⁻	mg/kg s.m.	78,8	72,5	71,3	71,3	68,4	67,4	63,4
Fosforany (V) PO ₄ ³⁻	mg/kg s.m.	70,8	87,6	81,6	76,5	75,2	71,1	70,7
Fenole	mg/kg s.m.	17,3	16,8	15,2	13,7	12,0	11,4	11,1
Cyjanki	mg/kg s.m.	29,2	28,3	26,2	24,9	23,7	23,1	22,8
Aktywność dehydrogenazowa	mg TF/g s.m./24 h	31,2	35,5	38,4	43,5	48,5	52,3	55,8

Tabela 4.8. Zestawienie wyników analiz fizykochemicznych podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-2 gleby G-BA1, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda *ex situ*)

Oznaczenie	Jednostka	Gleba G-BA1	Czas trwania procesu oczyszczania gleby G-BA1 biopreparatem BA-2			
			15 dni	30 dni	45 dni	60 dni
Odczyn	pH	7,7	7,3	7,4	7,5	7,5
Wilgotność	%	21,8	20,5	19,6	20,4	22,6
ChZT _(Cr)	mg O ₂ /kg s.m.	18 206	16 252	13 778	11 466	10 024
TPH	mg/kg s.m.	4 797	4 021	3 254	2 478	2 095
WWAs	mg/kg s.m.	1 199	987	821	601	482
Jon amonowy NH ₄ ⁺	mg/kg s.m.	272	305	298	285	280
Azotany (V) NO ₃ ⁻	mg/kg s.m.	63,4	59,9	58,2	55,6	55,6
Fosforany (V) PO ₄ ³⁻	mg/kg s.m.	70,7	75,3	74	73,7	71,1
Fenole	mg/kg s.m.	11,1	10,8	9,5	8,2	7,8
Cyjanki	mg/kg s.m.	22,8	20,5	18,3	16,9	15,3
Aktywność dehydrogenazowa	mg TF/g s.m./ 24 h	55,8	59,8	64,5	69,7	72,3

W tabeli 4.9 oraz na wykresach 4.7–4.8 przedstawiono wyniki prowadzenia przez okres 60 dni w warunkach *ex situ* procesu bioaugmentacji gleby (po wykonanym zabiegu bioaugmentacji gleby G-BA1 biopreparatem BA-2: gleba G-BA2) biopreparatem BA-3. Przeprowadzony proces bioaugmentacji poskutkowało obniżeniem zawartości:

- TPH do poziomu 992 mg/kg s.m., co stanowi 6,9% redukcji zanieczyszczeń;
- WWA do poziomu 181 mg/kg s.m., co stanowi 62,4% redukcji zanieczyszczeń.

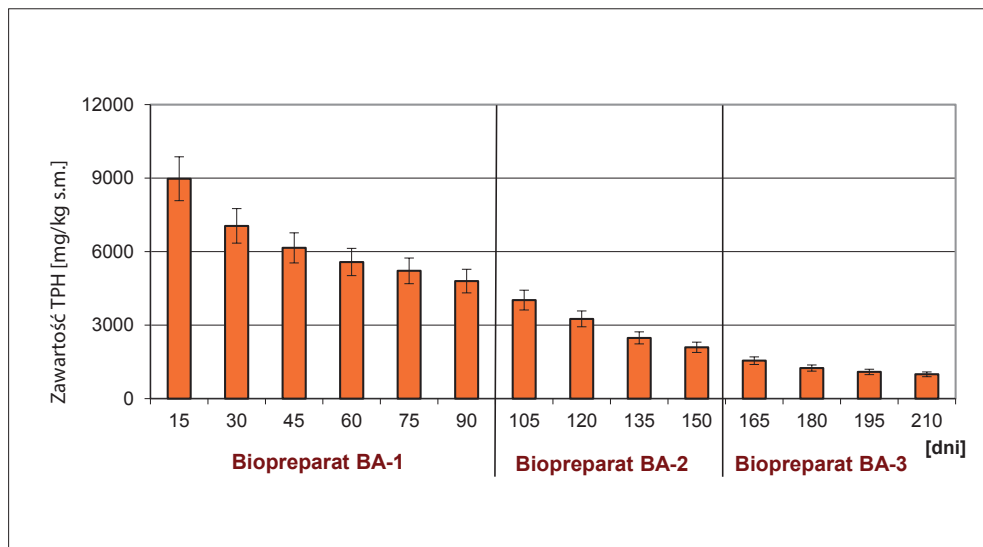
Ponadto po zakończonym procesie bioaugmentacji odnotowano wzrost aktywności dehydrogenazowej do wartości 103,4 mg TF/g s.m./24 h, korelujący z obniżaniem się zawartości zanieczyszczeń TPH i WWA. Prowadzony proces przyczynił się również

do zmniejszenia zawartości fenoli (z 7,8 do 2,5 mg/kg s.m.) oraz cyjanków (z 15,3 do 13,1 mg/kg s.m.) (tab. 4.9).

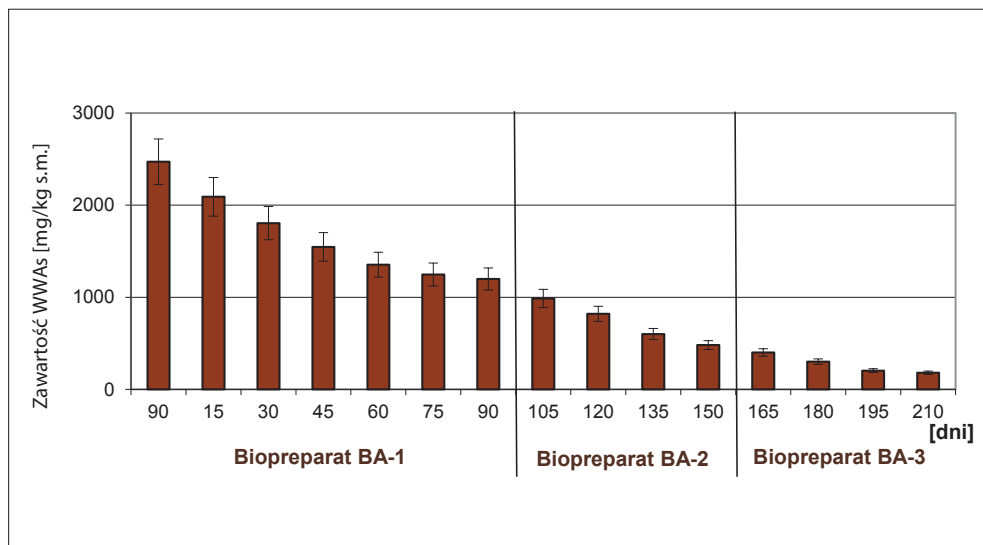
Tabela 4.9. Zestawienie wyników analiz fizykochemicznych podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-3 gleby G-BA2, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda *ex situ*)

Oznaczenie	Jednostka	Gleba G-BA2	Czas trwania procesu oczyszczania gleby G-BA2 biopreparatem BA-3			
			15 dni	30 dni	45 dni	60 dni
Odczyn	pH	7,5	7,4	7,3	7,2	7,1
Wilgotność	%	22,6	21,5	18,4	19,6	20,3
ChZT _(Cr)	mg O ₂ /kg s.m.	10 024	8 475	5 298	3 243	2 874
TPH	mg/kg s.m.	2 095	1 548	1 248	1 089	992
WWAs	mg/kg s.m.	482	401	301	204	181
Jon amonowy NH ₄ ⁺	mg/kg s.m.	280	274	245	256	270
Azotany (V) NO ₃ ⁻	mg/kg s.m.	55,6	61,2	63,2	59,3	55,2
Fosforany (V) PO ₄ ³⁻	mg/kg s.m.	71,1	73,2	70,3	68,3	68,3
Fenole	mg/kg s.m.	7,8	6,4	5,2	3,1	2,5
Cyjanki	mg/kg s.m.	153	16,3	14,2	13,4	13,1
Aktywność dehydrogenazowa	mg TF/g s.m./ 24 h	74,3	80,1	87,3	92,3	103,4

Przedstawione wyniki badań procesu bioaugmentacji metodą *ex situ* prowadzonego przez okres 210 dni wskazują na znaczne obniżenie zawartości TPH i WWA w oczyszczanej glebie. Ich stężenie obniżyło się do wartości, która – zgodnie z załącznikiem do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. – poz. 1395 – umożliwia zakwalifikowanie oczyszczonej gleby do IV grupy gruntów zalegających na głębokości 0–0,5 m p.p.t.



Wykres 4.7. Efekt obniżania zawartości TPH w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3



Wykres 4.8. Efekt obniżania zawartości WWA w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3

4.2.4. Ocena efektywności procesu biodegradacji na podstawie chromatograficznych analiz zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w oczyszczanej glebie

Prowadzenie procesu oczyszczania gleby w warunkach *ex situ* pozwala na: kontrolę przebiegu procesów biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych, dobór optymalnych dawek wapna nawozowego i nawozów mineralnych, wstępne określenie ram czasowych trwania poszczególnych etapów oczyszczania oraz zapoznanie się z efektywnością biopreparatu opracowanego na bazie mikroorganizmów.

W wyniku przeprowadzonego etapu bioremediacji podstawowej w warunkach laboratoryjnych po okresie 90 dni nastąpił znaczny stopień redukcji zanieczyszczeń TPH – z 16 092,0 do 10 416,4 mg/kg s.m., czyli o 35,3%. Wykonane analizy chromatograficzne pozwoliły na ocenę stopnia biodegradacji poszczególnych węglowodorów ropopochodnych (n-alkanów) wchodzących w skład zanieczyszczeń TPH (tab. 4.10, wykresy 4.9–4.10).

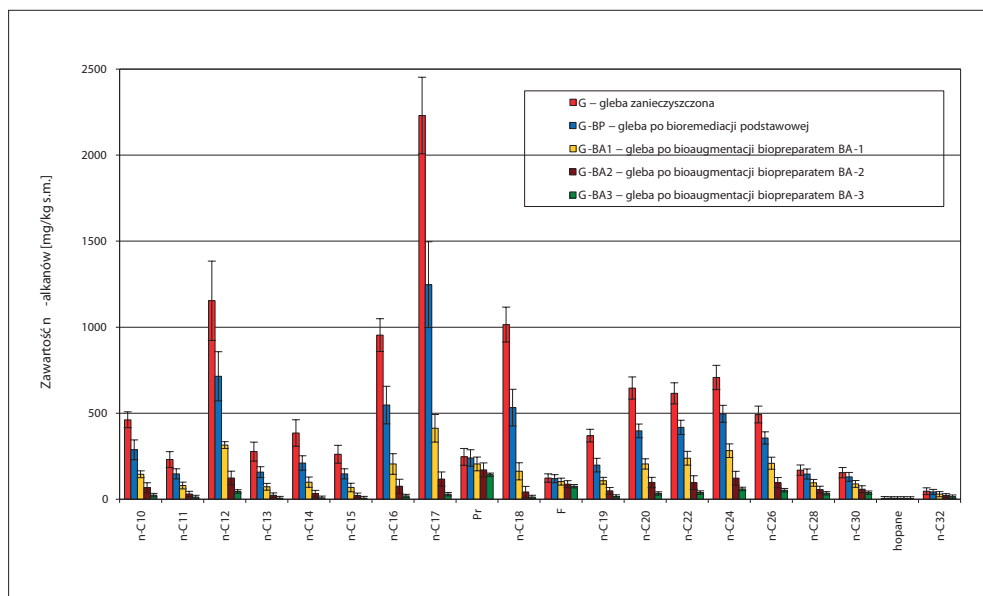
Przedstawione wyniki analiz chromatograficznych pozwalają na stwierdzenie, że podczas bioremediacji podstawowej najwyższy stopień obniżenia zanotowano dla węglowodorów szeregu alifatycznego n-C₁₀–n-C₂₀ – w granicach 37,7–47,5%, zaś w przypadku węglowodorów z zakresu n-C₂₂–n-C₃₂ jest nieznacznie niższy, gdyż waha się w granicach 8,7–32,1% (tab. 4.10, wykres 4.9).

Etap inokulacji biopreparatem BA-1 prowadzony w warunkach laboratoryjnych metodą *ex situ* przez okres 90 dni umożliwił obniżenie zawartości TPH z 10 416,4 do 4797,1 mg/kg s.m., co stanowi 53,9% redukcji. Analiza chromatograficzna wykazała, że najszybciej zachodzi biodegradacja węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C₁₀–n-C₂₀ – na poziomie 46,0–69,6%. Węglowodory z zakresu n-C₂₂–n-C₃₂ ulegają biodegradacji również w zadowalającym stopniu – w granicach 30,4–43,0%. Przedstawione wyniki dowodzą, że zastosowany biopreparat BA-1 był skuteczny (tab. 4.10, wykres 4.9). Z uwagi na spowolnienie procesu biodegradacji n-alkanów w końcowym etapie procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-1 – badania kontynuowano po inokulacji gleby biopreparatem BA-2, opracowanym w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB.

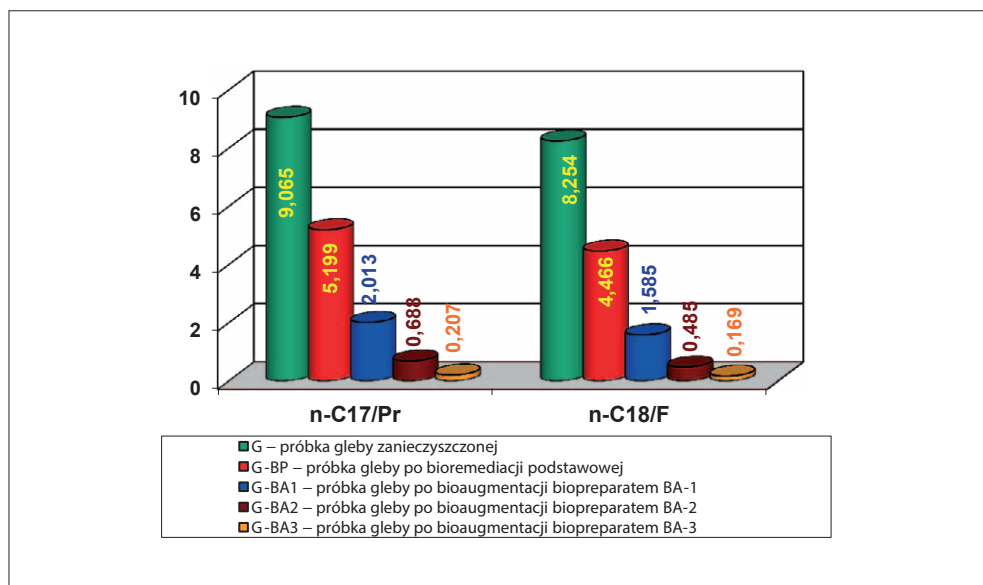
Drugi etap inokulacji prowadzony w warunkach *ex situ* (60 dni) z zastosowaniem biopreparatu BA-2 umożliwił obniżenie TPH z poziomu 4797,1 do 2095,4 mg/kg s.m., co stanowi 56,3% redukcji zanieczyszczenia. Najwyższe obniżenie zawartości węglowodorów alifatycznych odnotowano dla n-alkanów o długości łańcucha węglowego n-C₁₀–n-C₂₆ – na poziomie 52,4–73,9%. Niższym stopniem biodegradacji charaktery-

zowały się węglowodory z zakresu n-C₂₈–n-C₃₂, których zawartość w glebie zmniejszyła się o 29,4–41,3% (tab. 4.10, wykres 4.9).

Zmniejszenie szybkości biodegradacji w końcowym etapie przebiegu procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-2, przy jednoczesnym niedostatecznym stopniu obniżenia się zawartości węglowodorów ropopochodnych w oczyszczanej glebie, poskutkowało decyzją przeprowadzenia trzeciego etapu procesu oczyszczania, który polegał na inokulacji badanej gleby biopreparatem BA-3 i prowadzeniu procesu bioaugmentacji przez kolejne 60 dni. Po zakończeniu procesu oczyszczania gleby pobrano próbki oczyszczonej gleby i wykonano ich analizę fizykochemiczną i toksykologiczną. Wyniki analizy wykazały, że poziom zawartości substancji ropopochodnych obniżył się do wartości 992,1 mg/kg s.m., co świadczy o 52,7% redukcji zanieczyszczenia. Największe obniżenie zawartości węglowodorów alifatycznych odnotowano dla n-alkanów o długości łańcucha węglowego n-C₁₀–n-C₂₄ – na poziomie 51,4–75,19%. Niższym stopniem biodegradacji charakteryzowały się węglowodory z zakresu n-C₂₆–n-C₃₂, których zawartość w glebie zmniejszyła się w zadowalającym stopniu (od 30,9% do 45,6%) (tab. 4.10, wykresy 4.9 i 4.10).



Wykres 4.9. Porównanie zmian zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania gleby metodą *ex situ* (liczba powtórzeń pomiarów n = 8–10, p < 0,05)



Wykres 4.10. Wartości stosunków n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F w glebie po kolejnych etapach jej oczyszczania metodą *ex situ*

Na podstawie wykonanych badań można stwierdzić, że stosowane biopreparaty BA-1, BA-2 i BA-3 charakteryzują się wysoką efektywnością oraz szerokim spektrum działania, gdyż obniżenie zawartości jest widoczne prawie dla wszystkich n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych występujących w oczyszczanej glebie.

Zastosowany proces oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi przebiegał w zadowalającym tempie. Świadczą o tym obliczone na podstawie analiz chromatograficznych n-alkanów wskaźniki stopnia biodegradacji n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F, które w kolejnych etapach oczyszczania ulegają odpowiednio zmniejszeniu (wykres 4.10):

dla etapu bioremediacji podstawowej:

- n-C₁₇/Pr z 9,065 do 5,201;
- n-C₁₈/F z 8,250 do 4,466;

dla bioaugmentacji biopreparatem BA-2:

- n-C₁₇/Pr z 2,013 do 0,688;
- n-C₁₈/F z 1,585 do 0,485;

dla bioaugmentacji biopreparatem BA-1:

- n-C₁₇/Pr z 5,201 do 2,013;
- n-C₁₈/F z 4,466 do 1,585;

dla bioaugmentacji biopreparatem BA-3:

- n-C₁₇/Pr z 0,688 do 0,207;
- n-C₁₈/F z 0,485 do 0,169.

Tabela 4.10. Porównanie zmian zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania gleby metodą *ex situ* (liczba powtórzeń pomiarów n = 7-10, p < 0,05)

Oznaczany składnik	G – gleba zanieczyszczona	G-BF – gleba po bioremediacji podstawowej	Obniżenie zawartości	G-BA1 – gleba po biopreparatem BA-1	Obniżenie zawartości	G-BA2 – gleba po biopreparatem BA-2	Obniżenie zawartości	G-BA3 – gleba po biopreparatem BA-3	Obniżenie zawartości
	[mg/kg s.m.]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]
n-C ₁₀	461,4	287,3	37,7	145,3	49,4	67,0	53,9	23,6	64,8
n-C ₁₁	230,7	147,1	36,2	79,3	46,1	30,0	62,2	12,7	57,7
n-C ₁₂	1 153,6	714,5	38,1	314,5	56,0	123,4	60,7	44,7	63,8
n-C ₁₃	276,8	157,4	43,2	72,0	54,3	22,6	68,6	6,4	71,7
n-C ₁₄	384,5	210,3	45,3	98,7	53,1	31,7	67,9	8,1	74,4
n-C ₁₅	261,5	147,2	43,7	68,2	53,7	21,8	68,0	6,4	70,6
n-C ₁₆	953,7	547,3	42,6	204,7	62,6	75,1	63,3	18,7	75,1
n-C ₁₇	2 230,3	1 246,7	44,1	412,1	67,0	117,2	71,6	29,4	74,9
pristan (Pr)	246,1	239,8	2,6	204,7	14,6	170,3	16,8	142,3	16,4
n-C ₁₈	1 015,2	532,8	47,5	162,1	69,6	42,3	73,9	12,7	70,0

Oznaczone składniki	G – gleba zanieczyszczona	G-BP – gleba po bioremediacji podstawowej	Obniżenie zawartości	G-BA1 – gleba po bioremediacji biopreparatem BA-1	Obniżenie zawartości	G-BA2 – gleba po bioremediacji biopreparatem BA-2	Obniżenie zawartości	G-BA3 – gleba po bioremediacji biopreparatem BA-3	Obniżenie zawartości
	[mg/kg s.m.]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]
fitan (F)	123,0	119,3	3,1	102,3	14,2	87,2	14,8	75,1	13,9
n-C ₁₉	369,1	198,3	46,3	107,0	46,0	48,3	54,9	15,4	68,1
n-C ₂₀	646,0	397,2	38,5	204,7	48,5	97,4	52,4	33,5	65,6
n-C ₂₂	615,3	417,6	32,1	238,0	43,0	96,0	59,7	38,4	60,0
n-C ₂₄	707,5	496,3	29,9	282,0	43,2	122,3	56,6	59,4	51,4
n-C ₂₆	492,2	356,0	27,7	209,0	41,3	96,1	54,0	52,3	45,6
n-C ₂₈	169,2	146,6	13,4	95,0	35,2	55,8	41,3	34,4	38,4
n-C ₃₀	153,8	129,6	15,7	89,0	31,3	58,1	34,7	38,1	34,4
hopan	5,0	4,9	2,0	4,9	0,0	4,8	2,0	4,7	2,1
n-C ₃₂	46,1	42,1	8,7	29,3	30,4	20,7	29,4	14,3	30,9
niezident.	5 550,0	3 878,1	30,1	1 674,3	56,8	707,3	57,8	321,5	54,5
Suma (TPH)	16 091,0	10 416,4	35,3	4 797,1	53,9	2 095,4	56,3	992,1	52,7

Pierwszorzędowy model biodegradacji substancji TPH w oczyszczanej glebie

W celu opracowania matematycznego modelu przebiegu procesu biodegradacji w kolejnych etapach oczyszczania w badaniach laboratoryjnych zastosowano biomarker $C_{30} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopan, względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji TPH oznaczanej w trakcie przebiegu poszczególnych etapów procesu oczyszczania gleby. Przebieg procesu biodegradacji TPH, obejmującego bioremediację podstawową i kolejne inokulacje biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3, opisano równaniem postaci (5). Poszczególne współczynniki tego równania (wykres 4.11) (k , $(C/C_H)_0$) oraz współczynnik korelacji (r^2) dla kolejnych etapów oczyszczania zestawiono w tabeli 4.11.

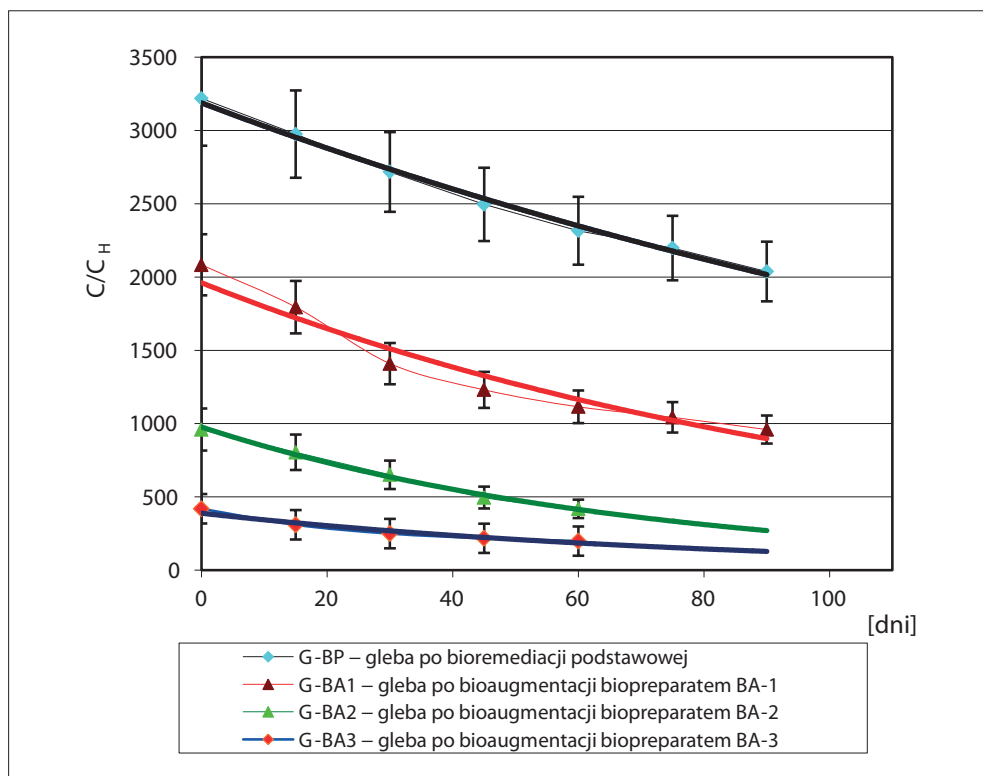
Tabela 4.11. Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji TPH w kolejnych etapach procesu oczyszczania gleby

Etap oczyszczania	$k [d^{-1}]$	$(C/C_H)_0$	Współczynnik korelacji (r^2)
Bioremediacja podstawowa	$0,0051 \pm 0,008$	3187 ± 325	0,9948
Bioaugmentacja biopreparatem BA-1	$0,0087 \pm 0,010$	$1960,9 \pm 98$	0,9545
Bioaugmentacja biopreparatem BA-2	$0,0143 \pm 0,014$	$976,3 \pm 9,2$	0,9943
Bioaugmentacja biopreparatem BA-3	$0,0123 \pm 0,016$	$388,7 \pm 4,2$	0,9501

Stała biodegradacji pierwszego rzędu (k) podczas etapu bioremediacji podstawowej wynosi $0,0051 [dni^{-1}]$. Przy inokulacji biopreparatami na bazie mikroorganizmów stałe k wynoszą:

- dla biopreparatu BA-1, $k = 0,0087 \text{ dni}^{-1}$;
- dla biopreparatu BA-2, $k = 0,0143 \text{ dni}^{-1}$;
- dla biopreparatu BA-3, $k = 0,0123 \text{ dni}^{-1}$.

Z powyższego wynika, że stała biodegradacji pierwszego rzędu (k) jest wyższa dla etapu bioaugmentacji biopreparatem BA-2, co świadczy o większej dynamice przebiegu tego procesu. Współczynniki korelacji, wynoszące odpowiednio: 0,9948, 0,9545, 0,9943 i 0,9501 (tab. 4.11), świadczą o zadowalającym dopasowaniu punktów pomiarowych, wyznaczonych w poszczególnych etapach biodegradacji TPH, do krzywych opisanych równaniem (5) (wykres 4.11). Prawidłowość postępowania podczas próby opracowania modelu matematycznego biodegradacji TPH potwierdzają doniesienia literaturowe [50, 142, 144, 189].



Wykres 4.11. Obniżenie zawartości TPH (C/CH) po normalizacji hopanem w kolejnych etapach biodegradacji oczyszczanej gleby (liczba powtórzeń $n = 8-10$, przy $p < 0,05$)

4.2.5. Ocena efektywności procesu biodegradacji na podstawie chromatograficznych analiz zanieczyszczeń WWA w oczyszczanej glebie

Gleba używana w procesie oczyszczania skażona była w znacznym stopniu wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, których sumaryczna zawartość WWA przekracza dopuszczalne wartości.

Opracowana metodyka chromatograficznego oznaczania zawartości poszczególnych WWA umożliwiła identyfikację 16 WWA i ich ilościowe oznaczenie w glebie. Zmiany

zawartości poszczególnych WWA podczas kolejnych etapów oczyszczania stanowią podstawę do określenia efektywności oczyszczania gleby. Ilościowe obliczenia zmian i rozkład zawartości poszczególnych 16 WWA w kolejnych etapach oczyszczania zestawiono w tabeli 4.12 i zobrazowano na wykresie 4.12. Przeprowadzone badania laboratoryjne procesu bioremediacji podstawowej metodą *ex situ* wykazały, że osiągnięto znaczne obniżenie zawartości WWA – z 3256,51 do 2491,70 mg/kg s.m. w okresie 90 dni.

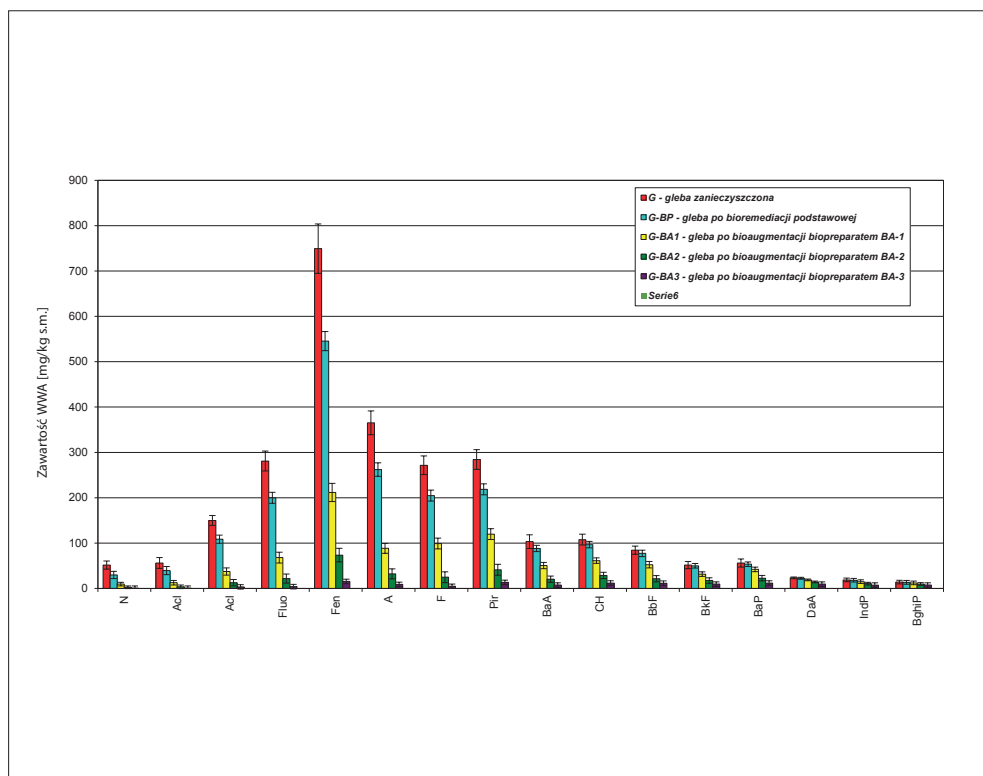
Analiza chromatograficzna pozwoliła na określenie stopnia redukcji poszczególnych zidentyfikowanych WWA. Najwyższy stopień obniżenia zawartości, który wyniósł 42,1%, zanotowano dla 2-pierścieniowego naftalenu. Nieco mniejszy stopień biodegradacji uzyskano dla WWA 3-pierścieniowych (Acl, Ac, Fluo, Fen, A) i kształtował się on na poziomie 27,2–29,6%. W przypadku 4-pierścieniowych WWA (F, Pir, BaA, CH) stopień zmniejszenia ich zawartości był znacznie niższy i zawierał się w granicach: 10,3–24,6%. WWA 5-pierścieniowe (BbF, BkF, BaP, IndP, DaA) były zdecydowanie trudniej biodegradowalne, gdyż efektywność procesu bioremediacji podstawowej określono na poziomie 3,2–8,3%. Obniżenie intensywności biodegradacji jest szczególnie widoczne dla benzo(k)fluorantenu (BkF) – z 51,52 do 49,87 mg/kg s.m. – oraz dibenzo(a,h)antracenu (DaA) – z 23,41 do 22,57 mg/kg s.m. Natomiast WWA zawierające 6 pierścieni w cząsteczce (IndP i BghiP) ulegają biodegradacji na bardzo niskim poziomie: 3,1–3,9%.

W celu uzyskania wyższego obniżenia zawartości WWA w zanieczyszczonej glebie zastosowano inokulację biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3. Biopreparaty te cechowały się zdolnościami biodegradacji WWA (tab. 4.12, wykres 4.12).

Przeprowadzenie etapu inokulacji biopreparatem BA-1 przyczyniło się do obniżenia zawartości WWA w ciągu 90 dni z poziomu 2491,70 do 1199,82 mg/kg s.m. Analizy chromatograficzne upoważniają do stwierdzenia, że najwyższy stopień redukcji zanotowano w przypadku dwupierścieniowego naftalenu (N), gdyż jego zawartość w glebie zmniejszyła się z 29,81 do 9,57 mg/kg s.m., czyli o 67,9%. Równie wysoki stopień obniżenia zanotowano w przypadku WWA 3-pierścieniowych (Acl, Ac, Fluo, Fen, A) na poziomie 61,2–67,8%. Nieznacznie niższy stopień obniżenia, w granicach 36,5–51,6%, uzyskano dla WWA 4-pierścieniowych (F, Pir, BaA, CH), co jest szczególnie widoczne dla:

- fluorantenu (F) – obniżenie zawartości z 204,77 do 99,08 mg/kg s.m. oraz
- pirenu (Pir) – obniżenie zawartości z 218,62 do 119,79 mg/kg s.m.

W przypadku WWA zawierających pięć pierścieni w cząsteczce (BbF, BkF, BaP, DaA) osiągnięte obniżenie zawartości było już mniejsze, gdyż kształtowało się w zakresie 16,5–36,8%. Stopień redukcji zawartości 6-pierścieniowych WWA był najniższy spośród wszystkich WWA (9,2–17,5%).



Wykres 4.12. Porównanie zmian zawartości zidentyfikowanych WWA po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania zanieczyszczonej gleby metodą *ex situ* (liczba powtórzeń pomiarów $n = 8-10$, $p < 0,05$)

W wyniku prowadzenia procesu bioaugmentacji z wykorzystaniem biopreparatu BA-2 przez okres 60 dni uzyskano zmniejszenie zawartości WWA z 1199,82 do 482,82 mg/kg s.m.

Podobnie jak we wcześniejszych etapach oczyszczania gleby najwyższy stopień biodegradacji odnotowano w przypadku naftalenu (72,9%). Nieco niższym stopniem biodegradacji charakteryzowały się WWA 3-pierścieniowe (Acl, Ac, Fluo, Fen, A) – na poziomie 63,6–71,0%. Natomiast poziom obniżenia zawartości WWA 4-pierścieniowych (F, Pir, BaA, CH) zawierał się w granicach 53,0–68,3%. WWA 5-pierścieniowe (BbF, BkF, BaP, DaA) w wyniku biodegradacji uległy redukcji o 23,9–53,3%. Stopień zmniejszenia zawartości 6-pierścieniowych WWA był najniższy spośród wszystkich WWA, gdyż wynosił 16,8–29,4%.

Tabela 4.12. Porównanie zmian zawartości zidentyfikowanych WWA po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania zanieczyszczonej gleby metodą *ex situ* (liczba powtórzeń pomiarów n = 7-10, p < 0,05)

Oznaczany składnik	G – gleba zanieczyszczona		G-BP – gleba po bioremediacji podstawowej		Obniżenie zawartości		G-B1 – gleba po biopreparatem BA-1		Obniżenie zawartości		G-B2 – gleba po biopreparatem BA-2		Obniżenie zawartości		G-B3 – gleba po biopreparatem BA-3		Obniżenie zawartości		
	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	
Naftalen (N)	51,52	42,1	29,81	67,9	9,57	67,9	2,59	67,9	0,59	67,9	2,59	67,9	0,59	67,9	2,59	67,9	0,59	67,9	77,2
Acenaftalen (Ac)	56,21	29,6	39,58	67,8	12,74	67,8	3,69	67,8	0,86	67,8	3,69	67,8	0,86	67,8	3,69	67,8	0,86	67,8	76,7
Acenaften (Ac)	149,86	27,6	108,46	65,5	37,41	65,5	12,78	65,5	3,47	65,5	12,78	65,5	3,47	65,5	12,78	65,5	3,47	65,5	72,8
Fluoren (Fluo)	281,01	28,8	199,98	66,0	68,03	66,0	21,74	66,0	4,56	66,0	21,74	66,0	4,56	66,0	21,74	66,0	4,56	66,0	79,0
Fenantren (Fen)	749,32	27,2	545,37	61,2	211,71	61,2	73,43	61,2	15,54	61,2	73,43	61,2	15,54	61,2	73,43	61,2	15,54	61,2	78,8
Antracen (A)	365,31	28,2	262,18	66,3	88,44	66,3	32,15	66,3	8,87	66,3	32,15	66,3	8,87	66,3	32,15	66,3	8,87	66,3	72,4
Fluoranten (F)	271,63	24,6	204,77	51,6	99,08	51,6	31,45	51,6	9,24	51,6	31,45	51,6	9,24	51,6	31,45	51,6	9,24	51,6	70,6
Piren (Pir)	284,21	23,1	218,62	45,2	119,79	45,2	41,22	45,2	13,48	45,2	41,22	45,2	13,48	45,2	41,22	45,2	13,48	45,2	67,3
Benzo(a)antracen (BaA)	103,30	14,5	88,29	42,8	50,49	42,8	21,84	42,8	8,72	42,8	21,84	42,8	8,72	42,8	21,84	42,8	8,72	42,8	60,1
Chryzen (CH)	107,72	10,3	96,65	36,5	61,35	36,5	28,81	36,5	11,87	36,5	28,81	36,5	11,87	36,5	28,81	36,5	11,87	36,5	58,8

Oznaczany składnik	G – gleba zanieczyszczona	G-BP – gleba po bioremediacji podstawowej	Obniżenie zawartości	G-B1 – gleba po bioagmencie BA-1	Obniżenie zawartości	G-B2 – gleba po bioagmencie BA-2	Obniżenie zawartości	G-B3 – gleba po bioagmencie BA-3	Obniżenie zawartości
	[mg/kg s.m.]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]	[mg/kg s.m.]	[%]
Benzo(b)fluoranten (BbF)	84,30	77,32	8,3	52,41	32,2	24,5	53,3	11,54	52,9
Benzo(k)fluoranten (BkF)	51,52	49,87	3,2	31,51	36,8	17,57	44,2	10,94	37,7
Benzo(a)piren (BaP)	56,20	53,60	4,6	42,15	21,4	22,65	46,3	13,89	38,7
Hopan C ₃₀ 17 α (H), 21 β (H)	5,00	4,97	0,2	4,96	0,2	4,94	0,3	4,93	0,4
Dibenzo(a,h)antracen (DaA)	23,41	22,57	3,6	18,84	16,5	14,33	23,9	11,42	20,3
Indeno(1,2,3-cd)piren (IndP)	18,73	18,15	3,1	14,98	17,5	10,57	29,4	8,24	22,0
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	14,06	13,51	3,9	12,27	9,2	10,21	16,8	8,59	15,9
Niezidentyfikowane	583,20	458,00	21,5	264,09	42,3	108,35	59,0	40,1	63,0
Suma (WWAs):	3 256,51	2 491,70	23,5	1 199,82	51,8	482,82	59,8	186,85	62,3

Zastosowanie ostatniego etapu procesu oczyszczania, jakim była inokulacja gleby biopreparatem BA-3, a następnie prowadzenie procesu bioaugmentacji przez okres 60 dni, spowodowało obniżenie zawartości WWA w glebie z 482,82 do 181,92 mg/kg s.m. W tym etapie procesu oczyszczania gleby osiągnięto zmniejszenie zawartości WWA: naftalenu o 77,2%, 3-pierścieniowych o 72,4–79,0%, 4-pierścieniowych o 58,8–70,6%, 5-pierścieniowych o 20,3–52,9% oraz 6-pierścieniowych o 15,9–22,0%.

Z przeprowadzonych badań procesu oczyszczania gleby metodą *ex situ* wynika, że stosowane biopreparaty BA-2 i BA-3 charakteryzowały się szerszym spektrum biodegradacji WWA w porównaniu z biopreparatem BA-1. Odnotowano istotną biodegradację nawet węglowodorów o większej ilości pierścieni aromatycznych w cząsteczce, należących do najbardziej rakotwórczych i trudno biodegradowalnych związków aromatycznych (tabela 4.12, wykres 4.12).

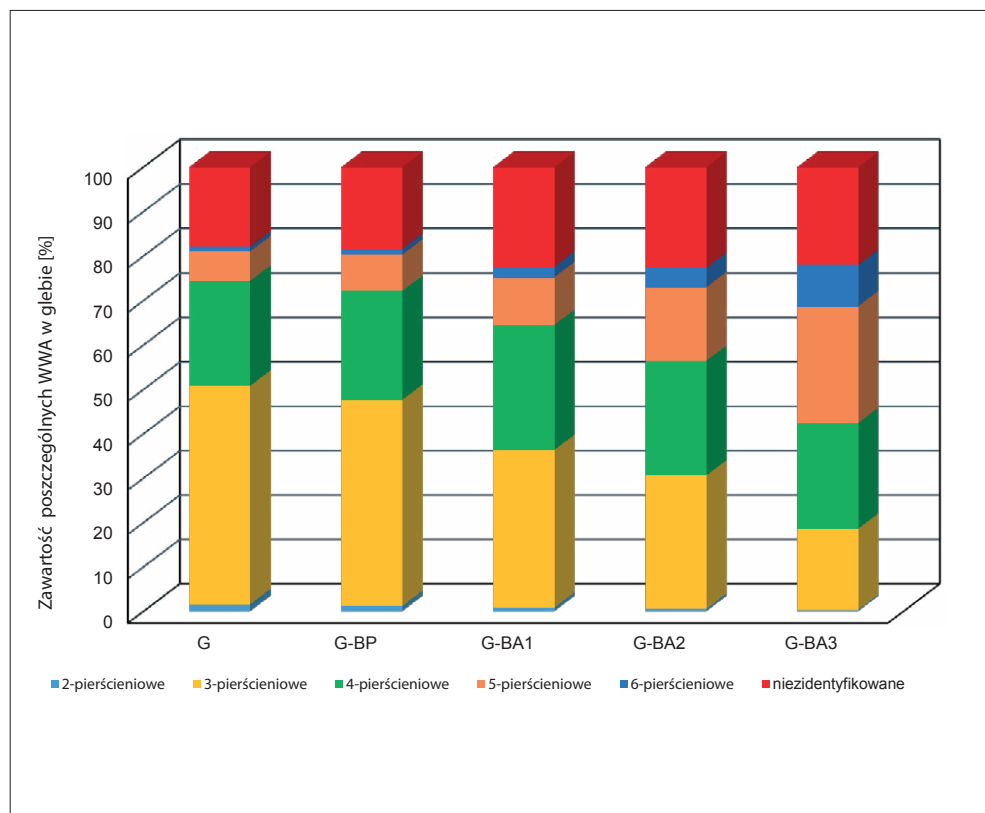
Przeprowadzone badania laboratoryjne procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi przyniosły pozytywny efekt, gdyż w kolejnych etapach oczyszczania osiągnięto obniżenie zawartości WWA z 3256,51 do 181,92 mg/kg s.m., czyli o 94,4%. Poszczególne grupy WWA uległy redukcji (tabela 4.12, wykres 4.12):

- 2-pierścieniowe: G-BP o 42,1%, G-BA1 o 81,4%, G-BA2 o 95,0%, G-BA3 o 98,9%;
- 3-pierścieniowe: G-BP o 27,9%, G-BA1 o 73,9%, G-BA2 o 91,0%, G-BA3 o 97,9%;
- 4-pierścieniowe: G-BP o 20,7%, G-BA1 o 56,9%, G-BA2 o 83,9%, G-BA3 o 94,4%;
- 5-pierścieniowe: G-BP o 5,6%, G-BA1 o 41,5%, G-BA2 o 63,3%, G-BA3 o 77,8%;
- 6-pierścieniowe: G-BP o 3,4%, G-BA1 o 16,9%, G-BA2 o 36,6%, G-BA3 o 48,7%.

Z wykresu 4.13, na którym przedstawiono procentowy udział poszczególnych WWA w glebie podczas kolejnych etapów jej oczyszczania, wynika, że w składzie zanieczyszczeń gleby poddawanej procesowi oczyszczania największy udział mają WWA 3-pierścieniowe (49,3%), mniejsze grupy stanowią WWA: 4-pierścieniowe (23,6%), 5-pierścieniowe (6,6%) oraz 2- i 6-pierścieniowe (1,0–1,6%).

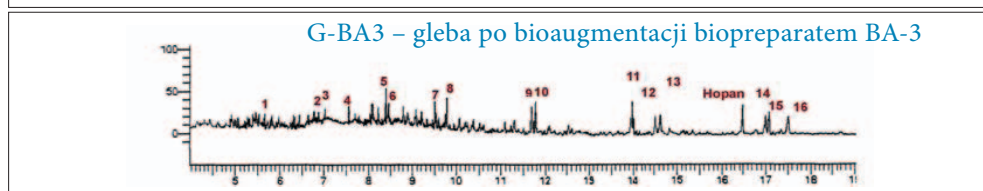
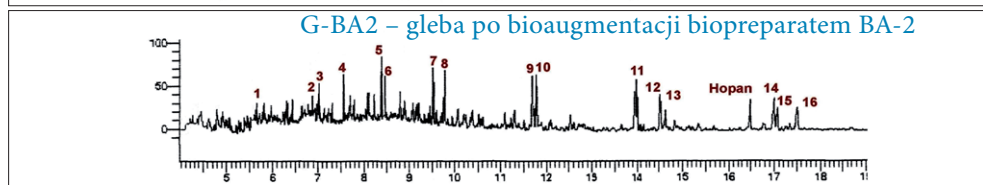
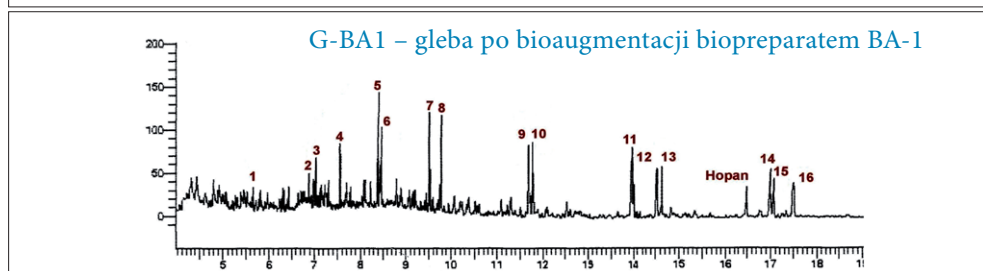
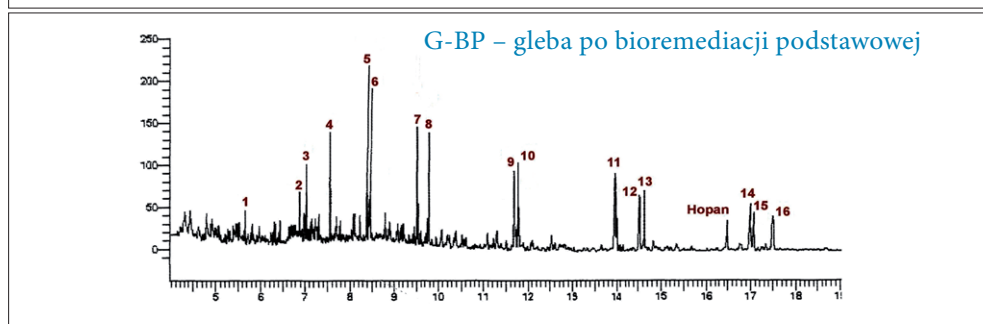
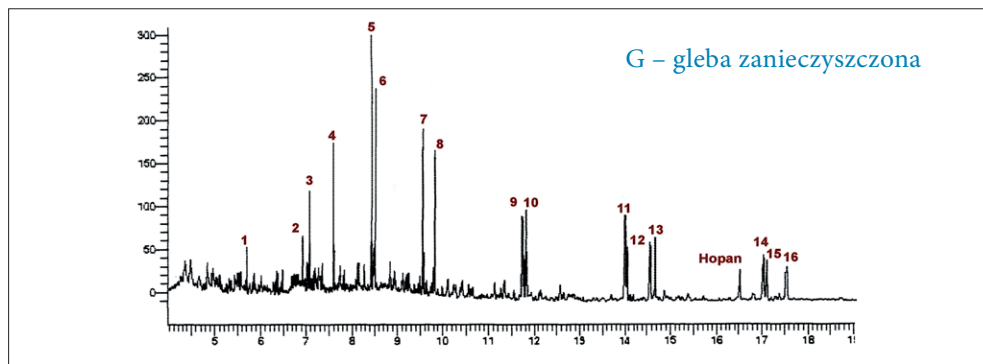
W kolejnych etapach oczyszczania gleby, w miarę zmniejszania się w niej ogólnej zawartości zanieczyszczeń, analiza specjacyjna WWA wykazała tendencję zmniejszania się procentowego udziału WWA zawierających mniejszą liczbę pierścieni w cząsteczce na korzyść węglowodorów o większej liczbie pierścieni. I tak po przeprowadzonym zabiegu bioaugmentacji gleby biopreparatem BA-3 – w składzie zanieczyszczeń WWA największy

udział poszczególnych grup WWA miały węglowodory 3-, 4- oraz 5-pierścieniowe (18,3–26,3%), a pozostałe węglowodory stanowiły 0,3–9,2% (tab. 4.12, wykresy 4.12–4.13).



Wykres 4.13. Rozkład zawartości WWA w glebie podczas poszczególnych etapów jej oczyszczania
G – gleba zanieczyszczona, G-BP – gleba po bioremediacji podstawowej, G-BA1 – gleba po bioaugmentacji biopreparatem BA-1, G-BA2 – gleba po bioaugmentacji biopreparatem BA-2, G-BA3 – gleba po bioaugmentacji biopreparatem BA-3

Podsumowując, zmiany zawartości poszczególnych WWA podczas kolejnych etapów oczyszczania stanowią podstawę do określenia efektywności ich przebiegu. Na chromatogramie (wykres 4.14) przedstawiono rozdział poszczególnych zidentyfikowanych WWA w kolejnych etapach oczyszczania gleby.



◀ Wykres 4.14. Porównanie chromatogramów rozdziału WWA z próbek gleby po kolejnych etapach procesu biodegradacji

1 – naftalen, 2 – acenaftalen, 3 – acenaften, 4 – fluoren, 5 – fenantren, 6 – antracen, 7 – fluoranten, 8 – piren, 9 – benzo(a)antracen, 10 – chryzen, 11 – benzo(b)fluoranten, 12 – benzo(k)fluoranten, 13 – benzo(a)piren, 14 – dibenzo(a,h)antracen, 15 – indeno(1,2,3,cd)piren, 16 – benzo(g,h,i)perylene

Pierwszorzędowy model biodegradacji WWA podczas oczyszczania gleby

W celu określenia kinetyki biodegradacji WWA w badaniach laboratoryjnych zastosowano biomarker $C_{30} 17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ -hopan, względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji sumarycznej zawartości WWA (wykres 4.15) oraz sumarycznej zawartości: WWA 3-pierścieniowych (wykres 4.16), WWA 4-pierścieniowych (wykres 4.17), WWA 5-pierścieniowych (wykres 4.18), WWA 6-pierścieniowych (wykres 4.19), zmieniającej się w trakcie prowadzenia kolejnych etapów procesu oczyszczania: bioremediacji podstawowej i kolejnych inokulacji biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3.

Przebieg procesu biodegradacji WWA opisano równaniem (5), do którego współczynniki, wyznaczone na podstawie efektywności kolejnych etapów oczyszczania gleby, zestawiono w tabeli 4.13.

Dla wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych WWA stała biodegradacji pierwszego rzędu (k) dla etapu bioremediacji podstawowej jest znacznie niższa niż dla bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3. Porównując stałe biodegradacji pierwszego rzędu (k) dla TPH i WWA, można stwierdzić, że tempo biodegradacji TPH jest znacznie wyższe, szczególnie podczas etapu bioremediacji podstawowej (tab. 4.11 i 4.13).

Analizując stałe szybkości biodegradacji WWA podczas procesu oczyszczania gleby, należy zauważyć, że proces biodegradacji węglowodorów w czasie bioremediacji podstawowej gleby zachodzi znacznie wolniej od procesów bioaugmentacji, w których zastosowano biopreparaty. W wyniku prowadzenia procesu bioaugmentacji biodegradacja WWA przebiega szybciej w przypadku inokulacji gleby biopreparatami BA-2 i BA-3. Efektywne działanie tych biopreparatów objawia się również szerokim spektrum działania.

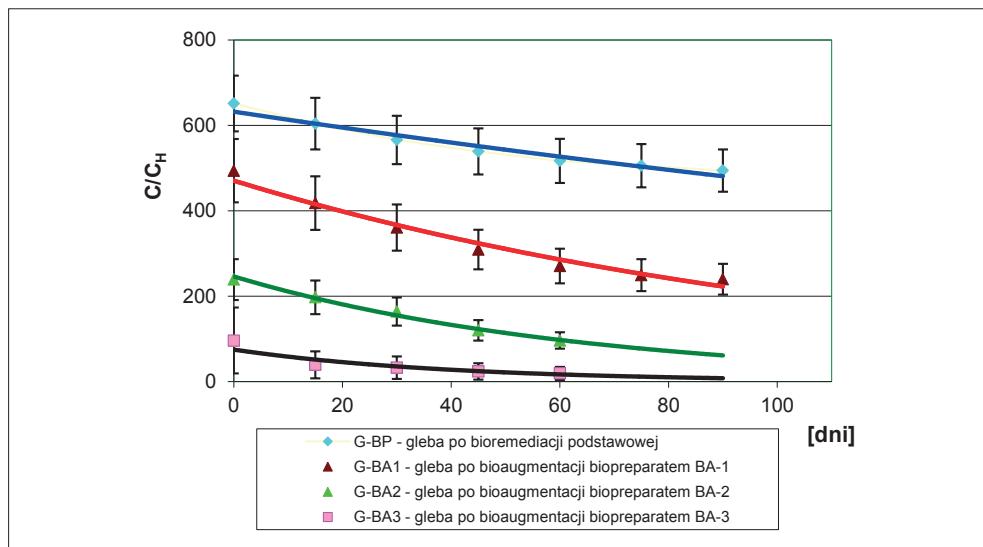
Porównując stałe biodegradacji pierwszego rzędu (k), oznaczone dla każdej z grup WWA (o jednakowej liczbie pierścieni aromatycznych w cząsteczce) po poszczególnych procesach oczyszczania gleby, można stwierdzić, że wielkość stałych jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości biodegradowanych cząsteczek WWA. Wyższe wartości stałych biodegradacji odpowiadają węglowodorom aromatycznym o mniejszej liczbie pierścieni w cząsteczce. Zależność ta jest stwierdzona zarówno podczas etapu bioremediacji podstawowej, jak i bioaugmentacji gleby z wykorzystaniem biopreparatów BA-1, BA-2 i BA-3.

Współczynniki korelacji (r^2) kształtują się na zadowalającym poziomie (0,8945–0,9999) (tab. 4.13), co świadczy o dobrym dopasowaniu krzywych pierwszorzędowego równania biodegradacji WWA do punktów pomiarowych (wykresy 4.15–4.19).

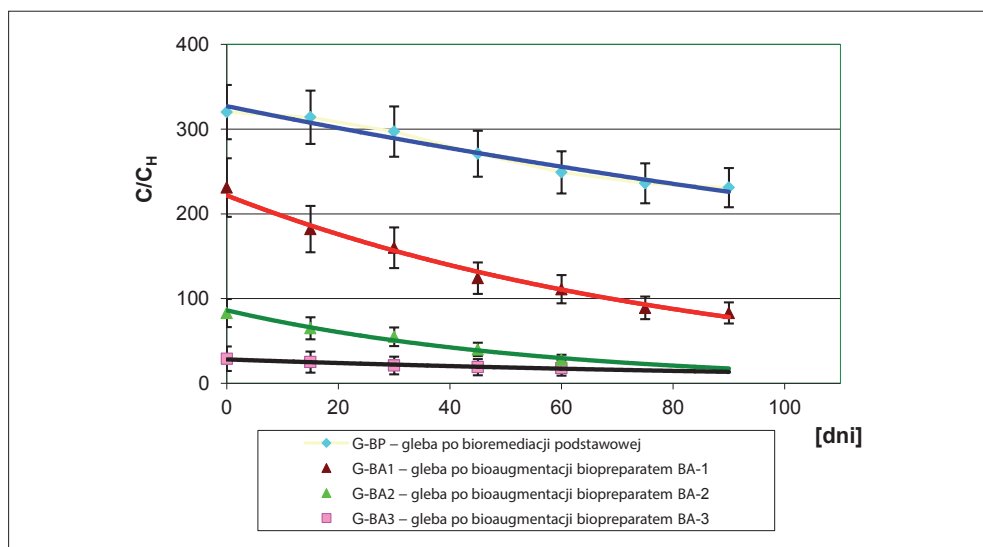
Tabela 4.13. Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji WWA oraz 3-, 4-, 5- i 6-pięścieniowych WWA w kolejnych etapach procesu oczyszczania zanieczyszczonej gleby (metoda *ex situ*)

WWA			
Etap oczyszczania	$k [d^{-1}]$	$(C/C_0)_0$	Współ. korelacji (r^2)
Bioremediacja podstawowa	$0,0030 \pm 0,002$	632 ± 52	0,9523
Bioaugmentacja biopreparatem BA-1	$0,0083 \pm 0,004$	470 ± 37	0,9705
Bioaugmentacja biopreparatem BA-2	$0,0145 \pm 0,010$	246 ± 20	0,9875
Bioaugmentacja biopreparatem BA-3	$0,0248 \pm 0,007$	75 ± 5	0,8945
WWA 3-pięścieniowe			
Etap oczyszczania	$k [d^{-1}]$	$(C/C_0)_0$	Współ. korelacji (r^2)
Bioremediacja podstawowa	$0,0041 \pm 0,004$	327 ± 30	0,9714
Bioaugmentacja biopreparatem BA-1	$0,0116 \pm 0,009$	221 ± 18	0,9862
Bioaugmentacja biopreparatem BA-2	$0,0177 \pm 0,012$	$86,7 \pm 4$	0,9818
Bioaugmentacja biopreparatem BA-3	$0,0089 \pm 0,007$	28 ± 2	0,9638

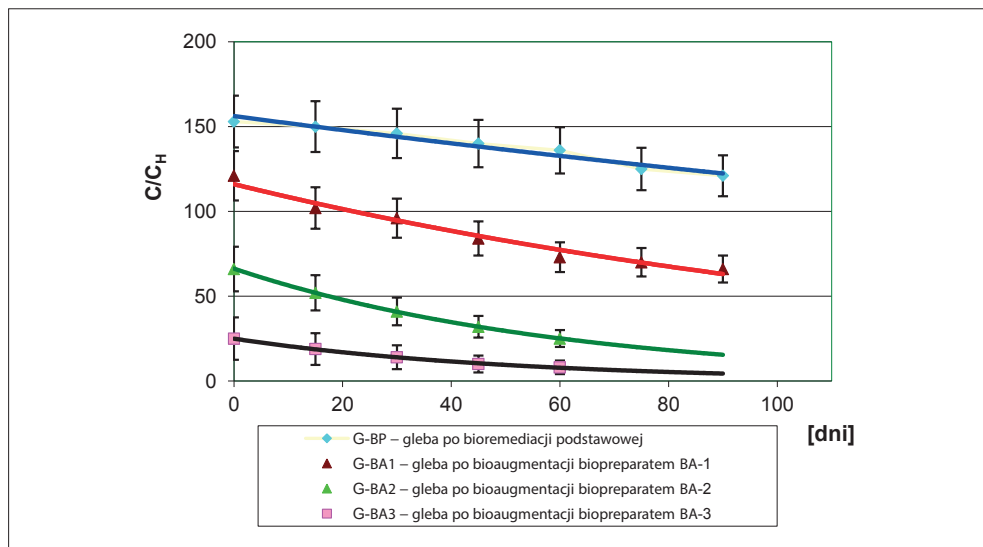
WWA 4-pierścieniowe			
Etap oczyszczania	k [d ⁻¹]	(C/C _H) ₀	Współ. korelacji (r ²)
Bioremediacja podstawowa	0,0027 ±0,002	151 ±11	0,9614
Bioaugmentacja biopreparatem BA-1	0,0068 ±0,004	116 ±8	0,9972
Bioaugmentacja biopreparatem BA-2	0,0162 ±0,010	66 ±4	0,9999
Bioaugmentacja biopreparatem BA-3	0,0194 ±0,006	24,9 ±2	0,9971
WWA 5-pierścieniowe			
Etap oczyszczania	k [d ⁻¹]	(C/C _H) ₀	Współ. korelacji (r ²)
Bioremediacja podstawowa	0,0007 ±0,001	43 ±2,5	0,9823
Bioaugmentacja biopreparatem BA-1	0,0039±0,007	40,1 ±2	0,9968
Bioaugmentacja biopreparatem BA-2	0,0105 ±0,010	29,8 ±1,5	0,9878
Bioaugmentacja biopreparatem BA-3	0,0090 ±0,006	15,9 ±1,1	0,9960
WWA 6-pierścieniowe			
Etap oczyszczania	k [d ⁻¹]	(C/C _H) ₀	Współ. korelacji (r ²)
Bioremediacja podstawowa	0,0004 ±0,001	6,58 ±1,3	0,9324
Bioaugmentacja biopreparatem BA-1	0,0018±0,002	5,632 ±0,9	0,9785
Bioaugmentacja biopreparatem BA-2	0,0050±0,005	5,65 ±0,5	0,9790
Bioaugmentacja biopreparatem BA-3	0,0043 ±0,002	4,10 ±0,3	0,9894



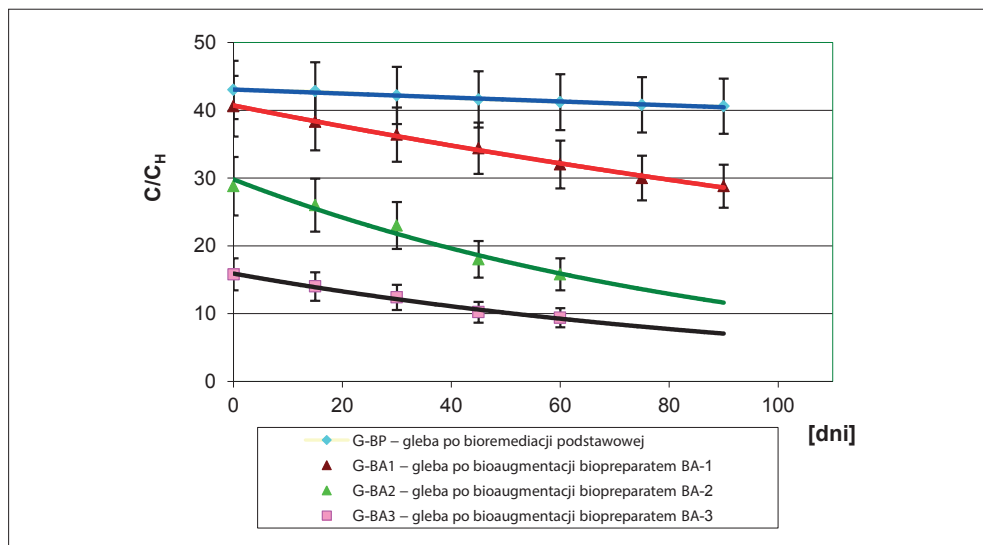
Wykres 4.15. Obniżenie zawartości WWA (C/C_H) po normalizacji hopenem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 7-9$, przy $p < 0,05$)



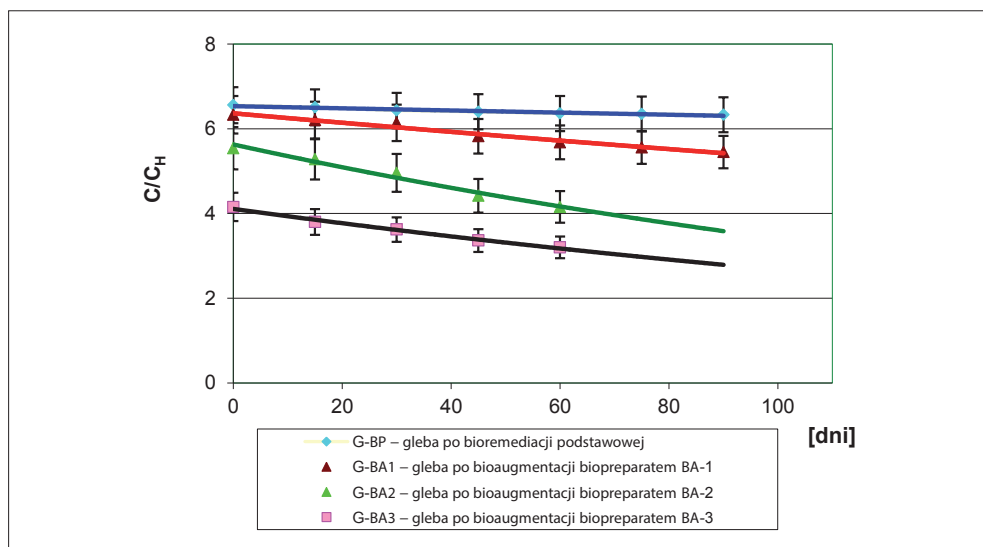
Wykres 4.16. Obniżenie zawartości WWA 3-pięścieniowych (C/C_H) po normalizacji hopenem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 9-10$, przy $p < 0,05$)



Wykres 4.17. Obniżenie zawartości WWA 4-pierścieniowych (C/C_H) po normalizacji hopenem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 9-10$, przy $p < 0,05$)



Wykres 4.18. Obniżenie zawartości WWA 5-pierścieniowych (C/C_H) po normalizacji hopenem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 9-10$, przy $p < 0,05$)



Wykres 4.19. Obniżenie zawartości WWA 6-pierścieniowych (C/C_H) po normalizacji hopenem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 9-10$, przy $p < 0,05$)

Reasumując, przeprowadzone w warunkach *ex situ* badania procesu oczyszczania gleby z zanieczyszczeń węglowodorowych (TPH i WWA) dowodzą wysokiej efektywności opracowanej etapowej technologii. W wyniku jej zastosowania osiągnięto bowiem znaczne obniżenie zawartości zarówno TPH, jak i WWA w oczyszczanej glebie. Oczyszczenie gleby uzyskane w wyniku prowadzonych przez okres 300 dni procesów bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji okazało się wystarczające do zmniejszenia zawartości TPH i WWA poniżej poziomu określonego w standardach glebowych wymaganych przez przepisy prawne.

Przedstawione wyniki badań przebiegu biodegradacji WWA i TPH w glebie mogą być podstawą do opracowania wytycznych prowadzenia rekultywacji terenu zanieczyszczonego tego typu substancjami.

5. Ocena właściwości toksycznych gleby oczyszczanej w warunkach laboratoryjnych

Badania toksykologiczne prowadzono na próbkach gleby pobranych przed procesem oczyszczania oraz po jego zakończeniu. próbki pobierano z przyzmy stanowiska badawczego (rys. 3.4), po czym doprowadzano je do stanu powietrznie suchego i wykonywano na ich analizy toksykologiczne, postępując zgodnie z procedurą analityczną danego testu.

Kompleksowa ocena jakości gleby powinna być oparta nie tylko na podstawie określenia wartości wybranych parametrów fizycznych i chemicznych, ale również na analizie bioindykacyjnej, oceniającej toksyczność gleby w stosunku do organizmów żywych. Określanie wpływu elementów środowiska przyrodniczego na ekosystemy, zwane ekotoksykologią, stanowi połączenie chemii, ekologii i toksykologii. Współczesna ekotoksykologia jest więc interdyscyplinarną, intensywnie rozwijającą się nauką, której celem jest między innymi ocena stanu środowiska i pośrednio ochrony zdrowia człowieka [171, 173, 194].

Analiza ekotoksykologiczna wykorzystuje żywy organizm, tzw. bioindykator, jako swoisty wskaźnik, wewnątrz którego zachodzą procesy biochemiczne, a ich rezultatem są obserwowane symptomy: zmiany morfologiczne ciała, choroby, a w końcu śmierć. Reakcja bioindykatora na testowany czynnik może być podstawą oceny ogólnej aktywności biologicznej badanego układu. Reakcja ta obejmuje nie tylko sumaryczne działanie wszystkich substancji pochodzenia antropogenicznego oraz toksyn naturalnych, ale także daje obraz interakcji pomiędzy substancjami toksycznymi a czynnikami środowiska – abiotycznymi (skład chemiczny, właściwości fizyczne itp.) i biotycznymi (organizmy glebowe).

Na podstawie prowadzonych wieloletnich doświadczeń autorzy [136] zaproponowali skalę toksyczności próbek środowiskowych:

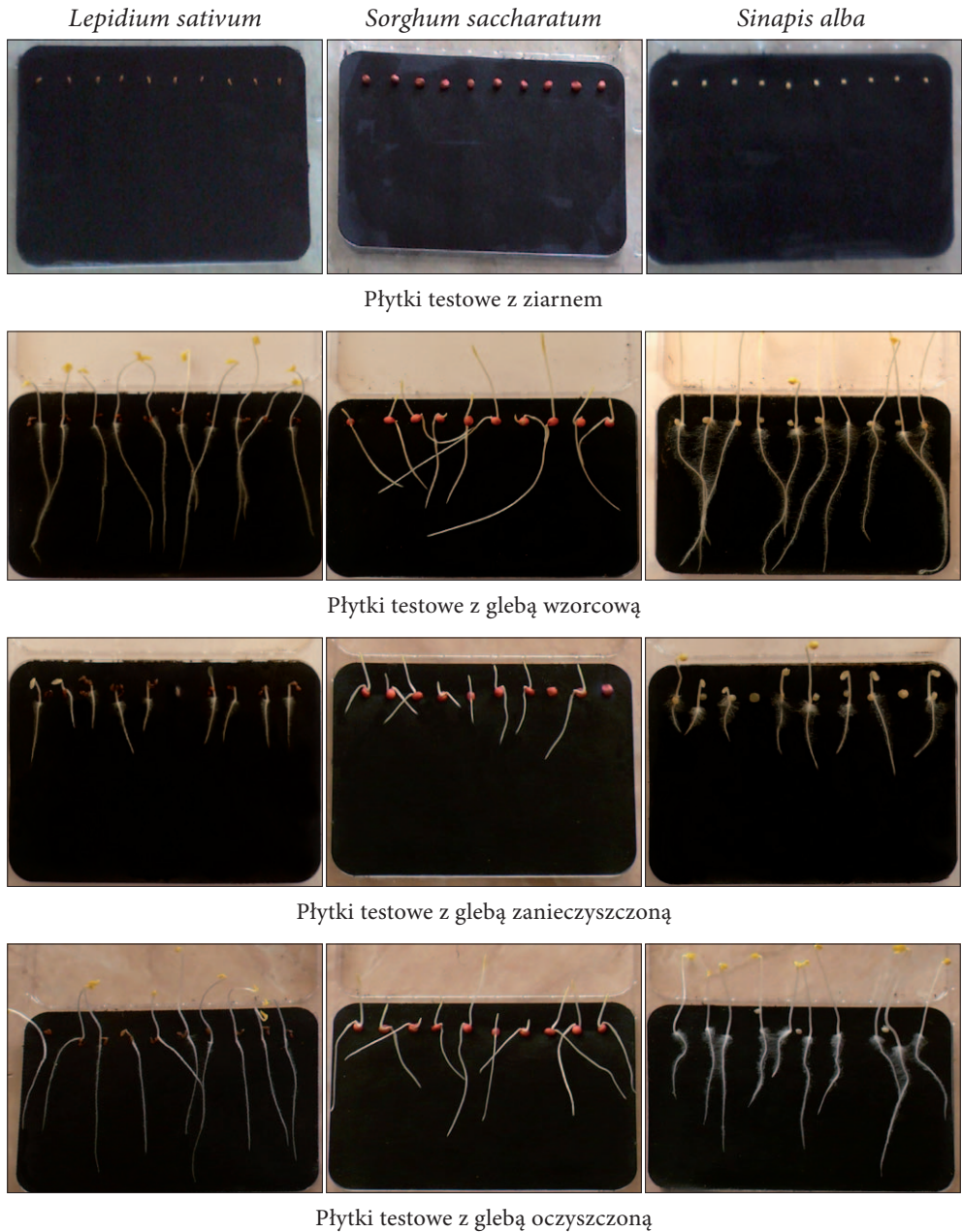
TU	< 1	próbka nietoksyczna;
1	\leq TU < 10	próbka toksyczna;
10	\leq TU < 100	ostra toksyczność próbki;
100	\leq TU	próbka bardzo toksyczna.

5.1. Testy fitotoksyczności gleby z wykorzystaniem testu Phytotoxkit

Testy fitotoksyczności z wykorzystaniem testu Phytotoxkit przeprowadzono na próbkach gleby kontrolnej oraz gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, w tym TPH i WWA, stosowanej do badań efektywności procesu oczyszczania w warunkach *ex situ*. W pierwszym etapie przeprowadzono test wzrostu ziaren rekomendowanych przez producenta testu, takich jak: *Lepidium sativum*, *Sinapis alba*, *Sorghum saccharatum*. Badania wykonano na glebie kontrolnej (dostarczonej przez producenta testu Phytotoxkit). Równolegle przeprowadzono test na ujednoliconej glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi. Po 300 dniach trwającego w warunkach *ex situ* procesu oczyszczania gleby w drodze bioremediacji podstawowej wspomaganej substancjami biogennymi oraz bioaugmentacji ponownie wykonano test Phytotoxkit dla ujednoliczonych próbek oczyszczonej gleby. Obraz poszczególnych płytek tego testu sporządzonych z użyciem badanych próbek gleby przedstawiono na fotografii 5.1, a wyniki badań zebrano w tabeli 5.1.

Przeprowadzone testy fitotoksyczności dla ujednoliczonych próbek gleb, zarówno bez dodatku zanieczyszczeń (gleba dostarczona przez producenta testu Phytotoxkit), jak i zanieczyszczonej węglowodorami TPH i WWA oraz gleby oczyszczonej w drodze bioremediacji, wykazały znaczne różnice pomiędzy badanymi próbkami.

Wykonany test Phytotoxkit wykazał, że gleba zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi charakteryzuje się toksycznymi właściwościami dla testowanych roślin: *Lepidium sativum*, *Sorghum saccharatum* oraz *Sinapis alba*. Gleba ta, poprzez niekorzystne warunki do wzrostu korzeni testowanych roślin, spowodowała spadek ich wykiełkowania do poziomu 80–90%. Po 72 godzinach trwania testu odnotowano zahamowanie wzrostu korzeni na poziomie 67,7–76,8%. Najwyższą odporność co do wzrostu korzeni wykazało sorgo (zahamowanie wzrostu korzeni: 67,7%).



Fot. 5.1. Wyniki testu Phytotoxkit przeprowadzonego w trakcie oczyszczania w warunkach *ex situ* gleby zanieczyszczonej węglowodorami TPH i WWA

Tabela 5.1. Zestawienie wyników testu Phytotoxkit wykonanego na próbkach gleby kontrolnej oraz gleby zanieczyszczonej węglowodorami TPH i WWA przed i po przeprowadzonym procesie jej oczyszczania

Parametr	Gleba kontrolna	Ujednolicona gleba zanieczyszczona (3 powtórzenia)	Ujednolicona gleba po bioremediacji (3 powtórzenia)
Testowany organizm	Rzeżucha (<i>Lepidium sativum</i>)		
Kiełkowanie [%]	100	90	100
Średnia długość korzenia [mm]	68	18	63
Min. długość korzenia [mm]	48	0	45
Maks. długość korzenia [mm]	78	27	83
Zahamowanie wzrostu [%]	–	72,9	7,3
Testowany organizm	Sorgo (<i>Sorghum saccharatum</i>)		
Kiełkowanie [%]	100	80	100
Średnia długość korzenia [mm]	48	16	46
Min. długość korzenia [mm]	20	0	31
Maks. długość korzenia [mm]	92	35	64
Zahamowanie wzrostu [%]	–	67,7	5,7
Testowany organizm	Gorzyczka (<i>Sinapis alba</i>)		
Kiełkowanie [%]	100	80	100
Średnia długość korzenia [mm]	81	19	62
Min. długość korzenia [mm]	59	0	29
Maks. długość korzenia [mm]	98	37	72
Zahamowanie wzrostu [%]	–	76,8	23,2

Prowadzony proces oczyszczania gleby w warunkach *ex situ* w drodze bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3 spowodował spadek zawartości zanieczyszczeń w badanych glebach, czego potwierdzeniem są wyniki ponownie wykonanego testu fitotoksyczności (tab. 3.12, fot. 3.1). Z przedstawionych danych wynika, że testowane rośliny po 72 godzinach trwania testu wykiełkowały w 100%. Ponadto wartości drugiego testowanego parametru, jakim była długość korzenia, uległy zwiększeniu, gdyż w przypadku testowanych roślin odnotowano średni ich wzrost:

- z 18 do 63 mm dla *Lepidium sativum*;
- z 16 do 46 mm dla *Sorghum saccharatum*;
- z 19 do 62 mm dla *Sinapis alba*.

Przeprowadzenie procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi spowodowało spadek zahamowania wzrostu korzeni *Lepidium sativum* oraz *Sorghum saccharatum* na poziomie 5,7–7,3% w odniesieniu do gleby kontrolnej, natomiast *Sinapis alba* o 23,2% (tab. 5.1, fot. 5.1).

W glebie węglowodorowe składniki ropy naftowej pokrywają powierzchnię cząstek glebowych cienką warstwą izolacyjną. Węglowodory za pomocą wiązań chemicznych łączą się z organicznymi składnikami próchnicy, dlatego też zalegają głównie w górnych poziomach glebowych, gdzie humusu jest najwięcej. Przyłączanie zanieczyszczeń naftowych do nieorganicznych frakcji glebowych ma jedynie charakter fizyczny. Ropa naftowa i jej pochodne produkty niszczą strukturę koloidalną gleby, zaburzając właściwości fizyczne pierwotne (zwięzłość, plastyczność, lepkość) i wtórne (właściwości wodne, powietrzne i cieplne) gleby; ograniczają zdolności sorpcyjne gleby, niszcząc przez to życie biologiczne środowiska glebowego [56, 60, 179].

W przypadku zanieczyszczenia gleby substancjami ropopochodnymi testowane rośliny miały utrudnione pobieranie wody i soli mineralnych z podłoża; ponadto nastąpiło upośledzenie oddychania korzeniowego, czego skutkiem było znaczne zahamowanie wzrostu zarówno systemu korzeniowego, jak i części naziemnej.

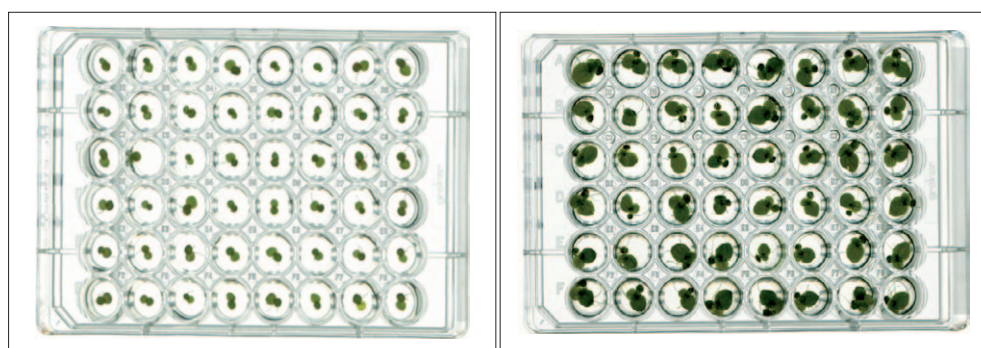
5.2. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu *Spirodela Duckweed Toxkit*

Mikrobiotest oceny toksyczności *Spirodela Duckweed Toxkit* wykorzystano do zmierzenia spadku (lub braku) wzrostu wodnych roślin wyższych *Spirodela polyrhiza* po 72 godzinach ekspozycji na substancje toksyczne w odniesieniu do kontroli, która przebiegała w nietoksycznej pożywce. Badania przeprowadzono w 48-dółkowej mikro-płytkę w pięciu stężeniach badanego toksykantu, każde w ośmiu powtórzeniach. Materiał badawczy stanowiły ekstrakty wodne gleb (gleba:H₂O = 1:10 m/m):

- kontrolnej – gleby niezanieczyszczonej;
- zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, przeznaczonej do oczyszczenia w warunkach *ex situ*;
- oczyszczonej gleby, po 300-dniowym procesie bioremediacji podstawowej oraz bioaugmentacji z zastosowaniem biopreparatów BA-1 i BA-2.

Wzrost roślin określono poprzez pomiar powierzchni pierwszych liści w czasach $t = 0h$ i $t = 72h$, przy użyciu programu do analizy obrazu. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono zahamowanie wzrostu roślin (72h EC₅₀).

Wyniki testów przeprowadzonych dla ekstraktów wodnych poszczególnych próbek gleby przedstawiono w tabelach 5.2–5.4, natomiast obrazy płytek wraz z testowanymi roślinami zobrazowano na fotografiach 5.2–5.4.



Płytkę testowa t0h

Płytkę testowa t72h

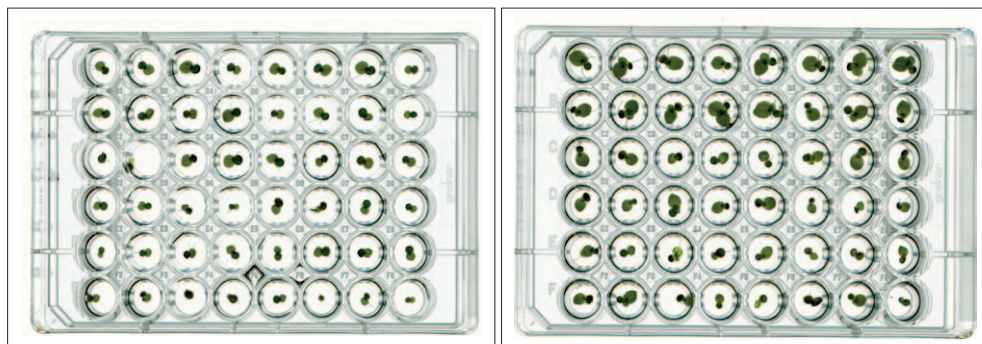
Fot. 5.2. Obraz płytek testowych wraz z pierwszymi liśćmi *Spirodela polyrhiza* w ekstrakcie wodnym gleby kontrolnej w fazie początkowej testu (t0h) oraz końcowej (t72h)

Tabela 5.2. Wyniki pomiarów wzrostu powierzchni liści *Spirodela polyrhiza* w 72-godzinnym teście dla gleby kontrolnej

Lp.	Stężenie badanego roztworu [%obj.]					
	0	5,86	11,72	23,45	46,9	93,8
	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]
1.	29,7	16,4	17,7	15,7	9,6	14,5
2.	9,0	12,6	13,5	13,4	11,7	15,7
3.	12,5	14,1	12,3	14,5	22,2	14,1
4.	15,7	14,9	10,6	10,9	16,2	20,9
5.	17,7	23,3	14,3	16,3	4,5	13,4
6.	17,5	11,4	9,6	12,3	13,0	13,4
7.	12,2	16,3	19,7	11,7	22,0	9,3
8.	10,9	11,9	13,2	24,8	19,2	16,0
Średnia	15,7	15,1	13,9	15,0	14,8	14,7
Odchylenie stand.	6,469	3,819	3,413	4,407	6,246	3,275
Względne odchylenie stand. [%]	41,33	25,25	24,62	29,47	42,20	22,34
% inhibicji	–	3,36	11,42	4,44	5,43	6,34

72h EC50 = nie oznaczono – próbka nietoksyczna

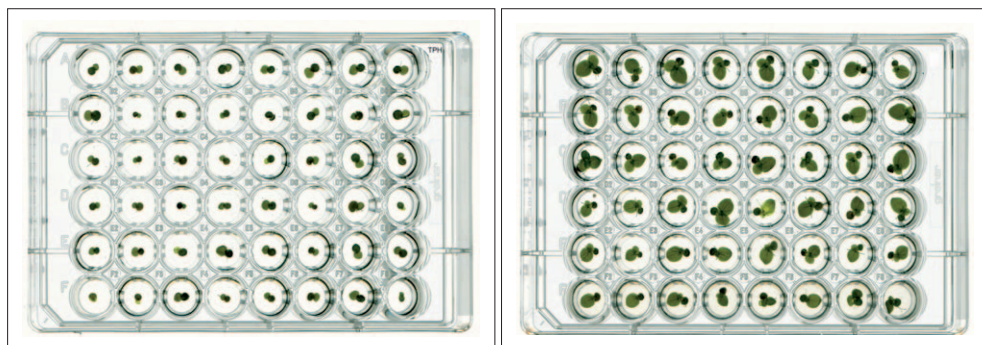
Z danych przedstawionych w tabeli 5.2 wynika, że ekstrakt wodny gleby kontrolnej nie jest toksyczny, o czym świadczy brak możliwości wyznaczenia dla niego wartości 72h EC50. Wartość ta określa połowę reakcji testowej, którą jest zahamowanie wzrostu liścia *Spirodela polyrhiza*.



Płytki testowa t0h

Płytki testowa t72h

Fot. 5.3. Obraz płytek testowych wraz z pierwszymi liśćmi *Spirodela polyrhiza* w ekstrakcie wodnym gleby zanieczyszczonej w fazie początkowej testu (t0h) oraz końcowej (t72h)



Płytki testowa t0h

Płytki testowa t72h

Fot. 5.4. Obraz płytek testowych wraz z pierwszymi liśćmi *Spirodela polyrhiza* w ekstrakcie wodnym gleby po procesie oczyszczania w warunkach *ex situ* w fazie początkowej testu (t0h) oraz końcowej (t72h)

Tabela 5.3. Wyniki pomiarów wzrostu powierzchni liści *Spirodela polyrhiza* w 72-godzinnym teście dla gleby zanieczyszczonej

Lp.	Stężenie badanego roztworu [%obj.]					
	0	5,86	11,72	23,45	46,9	93,8
	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]
1.	33,4	24,1	18,9	11,3	6,6	7,5
2.	24,0	17,3	13,5	9,4	6,7	7,7
3.	12,6	17,6	0,9	17,5	6,2	3,1
4.	10,9	22,5	1,3	15,9	3,8	2,9
5.	17,6	16,0	1,4	14,3	4,5	1,4
6.	13,6	11,4	9,9	2,3	2,2	4,4
7.	14,1	16,3	10,7	5,7	2,0	5,3
8.	21,2	13,8	10,0	4,8	3,2	1,8
Średnia	18,4	17,4	8,3	10,2	4,4	4,3
Odchylenie stand..	7,510	4,204	6,570	5,552	1,921	2,412
Względne odchylenie stand. [%]	40,74	24,18	78,90	54,67	43,67	56,65
% inhibicji	–	5,66	54,83	44,90	76,13	76,90

72h EC50 = 21,8

Tabela 5.4. Wyniki pomiarów wzrostu powierzchni liści *Spirodela polyrhiza* w 72-godzinym teście dla gleby w procesie oczyszczania w warunkach *ex situ*

Lp.	Stężenie badanego roztworu [%obj.]					
	0	5,86	11,72	23,45	46,9	93,8
	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]	Powierzchnia [mm ²]
1.	33,4	18,1	24,9	11,3	11,7	11,5
2.	24,0	17,3	17,5	9,6	13,4	13,6
3.	33,6	19,0	14,0	15,8	14,4	13,1
4.	20,9	16,6	15,3	18,9	13,0	11,9
5.	23,6	17,0	16,4	11,3	14,0	7,2
6.	14,7	17,4	12,0	12,3	15,2	7,5
7.	14,1	14,4	13,4	11,7	10,4	6,9
8.	12,4	15,8	15,2	14,8	10,0	5,8
Średnia	22,1	17,0	16,1	13,2	12,8	9,7
Odchylenie stand..	8,277	1,416	3,949	3,067	1,886	3,144
Względne odchylenie stand. [%]	37,46	8,35	24,55	23,20	14,78	32,47
Średnia	–	23,23	27,18	40,17	42,24	56,17

72h EC50 = 66,7

Współczynnik 72h EC50, obliczony dla ekstraktu wodnego gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, wynoszący 21,8 świadczy o wysokiej toksyczności badanej próby glebowej. Wartość ta wskazuje, że już takie stężenie toksykantu powoduje połowiczne zahamowanie wzrostu liścia *Spirodela polyrhiza* w porównaniu z warunkami wzrostu w środowisku pozbawionym jego zawartości.

Przeprowadzone testy zahamowania wzrostu *Spirodela polyrhiza* wykonane po zakończeniu procesu oczyszczania gleby w drodze bioremediacji podstawowej oraz bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3 w warunkach *ex situ* – wykazały skuteczność działania stosowanych metod. Świadczy o tym wzrost stężenia ekstraktu wodnego sporządzonego z oczyszczonej gleby, dla którego osiągnięto połowę reakcji testowej od wartości 72h EC50 = 21,8 do 72h EC50 = 66,7 (fot. 5.2–5.4, tab. 5.2–5.4).

5.3. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Ostracodtoxit F

Do badań toksyczności gleby stosowanej w procesach bioremediacji (gleby kontrolnej i skażonej substancjami ropopochodnymi) w charakterze biowskaźników użyto przedstawicieli poziomu troficznego konsumentów, którymi były skorupiaki *Heterocypris incongruens*, wykorzystywane w teście **Ostracodtoxit F**, służącym do oceny toksyczności chronicznej, określanej na podstawie śmiertelności i hamowania wzrostu organizmów testowych po 6-dniowym kontakcie z czynnikiem środowiskowym. Test ten wykorzystano do określenia toksyczności gleby poddawanej procesowi oczyszczania w drodze bioremediacji podstawowej oraz bioaugmentacji. Oceny dokonano na podstawie wpływu badanej gleby na skorupiaki *Heterocypris incongruens*.

Badania toksyczności gleby wykonano na początku i po zakończeniu procesu jej oczyszczania. Test Ostracodtoxit F prowadzono na ujednoczonych próbkach gleby w sześciu powtórzeniach, a wyniki przedstawiono w tabeli 5.5.

Wstępne badania prób glebowych stosowanych do przeprowadzenia procesu bioremediacji dotyczące ich wpływu na skorupiaki *Heterocypris incongruens* wykazały, że gleba kontrolna, niezanieczyszczona, nie wykazywała właściwości toksycznych. Średnia długość skorupiaków po 6 dniach trwania testu wynosiła 983 μm . Ponadto w kontakcie gleby kontrolnej z testowanymi skorupiakami odnotowano jedynie dwa przypadki śmiertelne spośród 60 testowanych, co stanowi 3,3% śmiertelności skorupiaków. W przypadku próbki gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi stwierdzono wysoką toksyczność na testowane organizmy, ponieważ ich średnia śmiertelność wynosiła 48,3%, a średnia długość skorupiaków (żywych po sześciu dniach testu) zawierała się w zakresie 310–370 μm . Proces oczyszczania gleby w drodze bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji z wykorzystaniem biopreparatów BA-1, BA-2 oraz BA-3 spowodował znaczne zmniejszenie

toksyczności badanej gleby wobec skorupiaków *Heterocypris incongruens*, gdyż po sześciu dniach wzajemnego kontaktu osiągnięto 80,0-procentowy efekt przeżyciowy małżoraczków. Średnia długość testowanych organizmów po zakończonym teście wynosiła 640 μm , czyli zahamowanie wzrostu było równe 36,2% (tab. 5.5).

Tabela 5.5. Zestawienie wyników testu Ostracodtoxkit F przeprowadzonego na próbkach gleby kontrolnej i poddawanej procesowi oczyszczania w drodze bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji

Parametr	Gleba kontrolna	Gleba zanieczyszczona węglowodorami TPH i WWA	Gleba oczyszczona (po 240 dniach)
Śmiertelność			
Średnia śmiertelność [%]	3,3	48,3	20,0
Współczynnik zmienności średniej śmiertelności [%]	4,5	22,7	41,4
Wzrost organizmów testowych			
Średnia długość organizmów [μm]	983	355	410
Średni przyrost organizmów [%]	831	205	640
Średnia hamowania wzrostu [%]	–	73,0	36,2

5.4. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Microtox SPT

Do badań toksyczności gleby na poziomie troficznym reducentów zastosowano mikrobiologiczny test fazy stałej Microtox SPT, wykorzystujący bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*. Umożliwia on bezpośredni kontakt bakterii luminescencyjnych z testowaną próbką

gleby, a reakcją testową jest obniżenie (inhibicja) luminescencji na skutek zmniejszenia metabolizmu bakterii. Test wykonano według standardowej procedury producenta (SDI) z użyciem analizatora Delta TOX i liofilizowanych bakterii. Wyniki obliczono za pomocą programu producenta, podając EC50, czyli stężenie badanej próbki, które powoduje zajście 50% reakcji testowej. Wartość toksyczności wyrażono w stopniach toksyczności TU.

Mikrobiologiczny test fazy stałej Microtox SPT zastosowano do oceny toksyczności gleby oczyszczanej w procesie bioremediacji podstawowej stymulowanej substancjami biogennymi. Badania prowadzono na ujednoliconych próbkach gleby:

- kontrolnej – niezanieczyszczonej;
- zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, przeznaczonej do oczyszczenia w warunkach *ex situ*;
- oczyszczonej, po procesie bioremediacji podstawowej oraz bioaugmentacji z zastosowaniem biopreparatów BA-1, BA-2 oraz BA-3.

W początkowej fazie testu wykonano badania przesiewowe, które pozwoliły na stwierdzenie, czy badana gleba charakteryzuje się istotnym efektem toksyczności (poziom obniżenia luminescencji powyżej 50%). Testy powtórzono po zakończeniu etapowego procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (tab. 5.6).

Ponadto dla gleb charakteryzujących się istotnym efektem inhibicji (>50%) bakterii *Vibrio fischeri* wykonano badania podstawowe z rozcieńczeniami, które pozwoliły na określenie EC50. Rezultatem testów było uzyskanie wartości EC50, które przeliczano na jednostki toksyczności (TU) – wyniki zestawiono w tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Zestawienie wyników testu skringowego oraz stężenia efektywnego powodującego hamowanie luminescencji uzyskanych według testu Microtox SPT przeprowadzonego na próbkach oczyszczanej gleby

Parametr	Gleba kontrolna	Gleba zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi	Gleba oczyszczona (po 240 dniach)
Inhibicja luminescencji [%]	14,5	72,8	43,5
EC50 [%]	N	21,1	N
TU	–	4,7	–

N – gleba nietoksyczna

W wyniku przeprowadzenia testów przesiewowych, pozwalających na uzyskanie orientacyjnej informacji o poziomie toksyczności, stwierdzono, że gleba kontrolna nie wykazuje właściwości toksycznych dla bakterii *Vibrio fischeri*, gdyż osiągnięty poziom inhibicji luminescencji wynosił 14,5%. Natomiast gleba zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi (TPH i WWA) jest wysoce toksyczna, gdyż powoduje zahamowanie luminescencji w 72,8%.

Etapowy proces oczyszczania gleby prowadzony w drodze bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3 w warunkach *ex situ* – umożliwił obniżenie zawartości zanieczyszczeń do poziomu, który spowodował w wykonanym teście Microtox SPT istotne zmniejszenie inhibicji luminescencji *Vibrio fischeri*. Odnotowano zmniejszenie inhibicji luminescencji z 72,8% do 43,5%. Osiągnięta wartość inhibicji luminescencji testowanych bioindykatorów w ekstrakcie badanym gleby oczyszczonej do poziomu poniżej 50% uniemożliwiła obliczenie wartości EC50, a więc osiągnięto poziom oczyszczenia gleby wskazujący na to, że nie wykazuje ona własności toksycznych. Przeprowadzone testy z rozcieńczeniami wykazały, że stężenie efektywne (w okresie 15 min), powodujące spadek luminescencji o 50%, uzyskane dla ekstraktu gleby zanieczyszczonej TPH i WWA w początkowej fazie badań wynosiło EC50 = 21,1% (współczynnik toksyczności TU = 4,7).

Gleba po zakończonym procesie oczyszczania nie wykazywała inhibicji luminescencji bioindykatorów w stopniu wskazującym na obecność związków toksycznych (czyli nie było możliwości wyznaczenia dla nich wartości EC50). W związku z tym można stwierdzić, że oczyszczona w procesie remediacji gleba nie wykazuje istotnej toksyczności (TU < 10).

5.5. Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu MARA

Testy oceny skażenia oczyszczonej w warunkach *ex situ* gleby wykonano z wykorzystaniem testu MARA. Materiał badawczy stanowiły ekstrakty wodne gleb (gleba: H₂O = 1:10 m/m):

- kontrolnej – niezanieczyszczonej;
- zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, przeznaczonej do oczyszczenia w warunkach *ex situ*;

- oczyszczonej w etapowym procesie bioremediacji podstawowej oraz bioaugmentacji z zastosowaniem biopreparatów BA-1, BA-2 i BA-3.

Test MARA ekstraktów gleby wykonano na początku i po zakończeniu procesu jej oczyszczania, prowadzonego etapowo w warunkach *ex situ*.

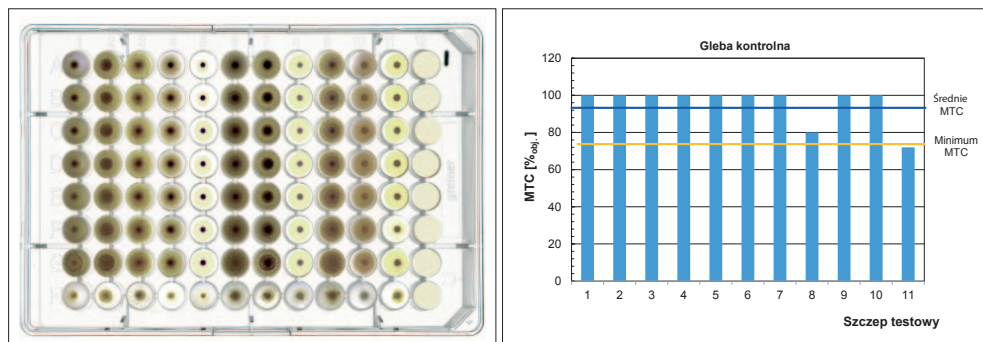
Obraz zeskanowanych płytek testu MARA, sporządzonych dla gleb przed rozpoczęciem procesu oczyszczania oraz po jego zakończeniu, zilustrowano na rysunkach 5.1–5.3, natomiast w tabeli 5.7 przedstawiono dane wynikające z przeprowadzonego testu, tj.: minimalną wartość MTC (*Microbial Toxic Concentration*) (koncentracja, która jest toksyczna dla najczulszego organizmu), maksymalną wartość MTC (koncentracja, która jest toksyczna dla najmniej czułego organizmu) oraz średnią wartość MTC (stężenie toksyczne dla testowanych mikroorganizmów).

Wyniki uzyskane w teście MARA są powiązane z rozmiarem powierzchni osadu, który odpowiada ilościowemu wzrostowi bakterii. Wartości MTC są obliczane jako koncentracje hamujące wzrost dla każdego z 11 mikroorganizmów. Wartości MTC dla wszystkich 11 bakterii zebrane razem stanowią mikrobiologiczną informację o toksyczności (*fingerprint*) badanej substancji.

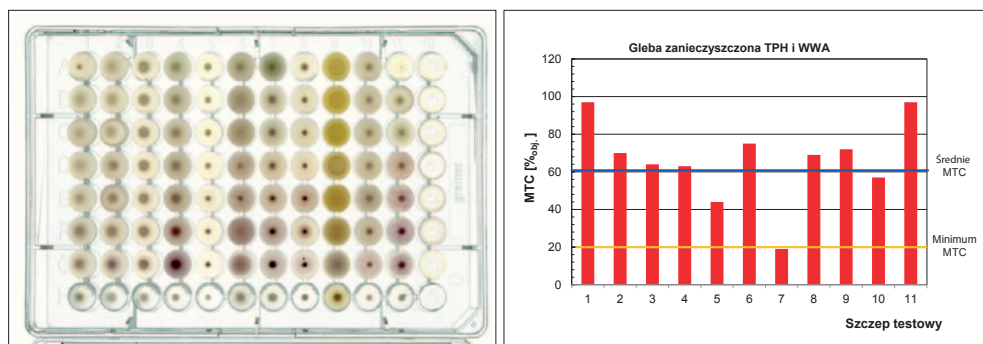
Tabela 5.7. Wyniki uzyskane w oznaczeniu MARA w ekstraktach wodnych gleb stosowanych w procesie bioremediacji

Parametr	Gleba kontrolna	Gleba zanieczyszczona TPH i WWA	Gleba oczyszczona (po 240 dniach)
MTC _{min.} [%obj.]	72	19	69
MTC _{max.} [%obj.]	100	97	100
MTC [%obj.]	96	62	81

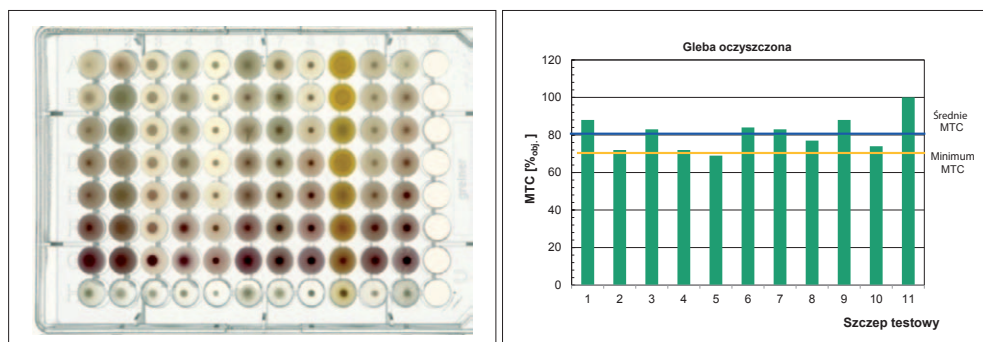
Na podstawie wyników przeprowadzonego testu MARA należy stwierdzić, że gleba kontrolna nie jest toksyczna (MTC = 96%). W przypadku tej gleby najbardziej wrażliwy jest organizm nr 11, dla którego oznaczono MTC_{min.} = 72% (tab. 5.7, rys. 5.1). Gleba zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi charakteryzowała się znaczną toksycznością, dla której średnia wartość MTC wynosiła 62%. Najbardziej wrażliwymi testowanymi organizmami okazały się szczepy nr 7, 5 i 10 (tab. 5.7, rys. 5.2).



Rys. 5.1. Ocena ryzyka środowiskowego ekstraktu wodnego gleby kontrolnej



Rys. 5.2. Ocena ryzyka środowiskowego ekstraktu wodnego gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi



Rys. 5.3. Ocena ryzyka środowiskowego ekstraktu wodnego gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi po przeprowadzonym procesie jej oczyszczenia

Etapowy proces oczyszczania gleby w drodze bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3, prowadzony w warunkach *ex situ*, spowodował obniżenie toksyczności gleby, czego skutkiem było zwiększenie średnich stężeń toksycznych dla zestawu testowych mikroorganizmów w teście MARA (MTC) w ekstraktach poszczególnych gleb. Oznaczona średnia wartość MTC wyniosła 81%, zaś wartość MTC_{min} – minimalne stężenie toksyczne dla najczulszego mikroorganizmu (nr 5) oznaczono na poziomie 69% (tab. 5.7, rys. 5.3).

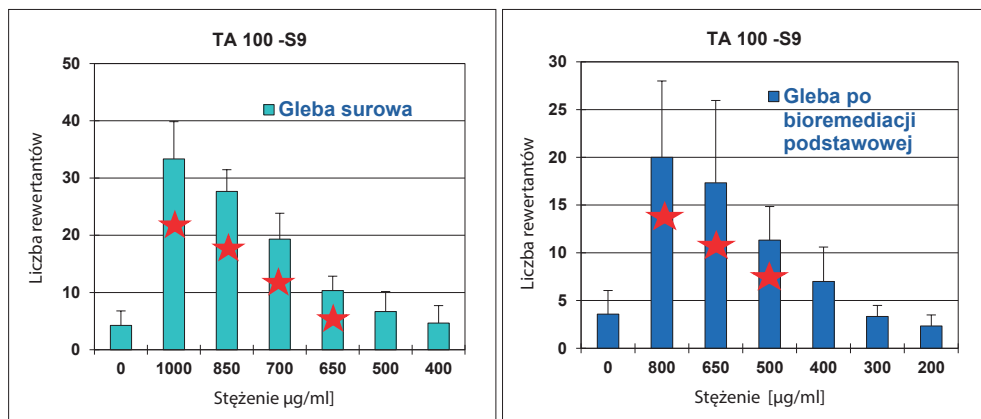
Podsumowując, na podstawie rezultatów testu MARA można stwierdzić, że w wyniku prowadzenia procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi w drodze bioremediacji podstawowej stymulowanej substancjami biogennymi oraz bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3 uzyskano obniżenie stopnia zanieczyszczenia gleby do poziomu, który nie stanowi zagrożenia dla środowiska przyrodniczego.

5.6. Ocena genotoksyczności gleby z wykorzystaniem testu Ames

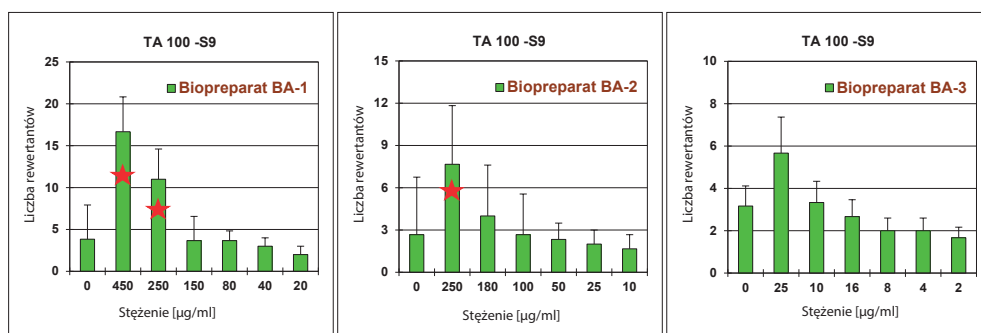
W celu stwierdzenia obecności związków o własnościach mutagennych i rakotwórczych w surowej i oczyszczonej glebie – wykonano serię testów Ames, wykorzystując standardowe szczepy TA-98 i TA-100 (*Salmonella typhimurium*), które mają mutacje w operonie histydynowym, co czyni je niezdolnymi do syntezy aminokwasów. Pod wpływem badanego czynnika (zanieczyszczeń ropopochodnych) dochodzi do rewersji powrotnych. Powstałe rewertanty są zdolne do wzrostu na podłożu bez histydyny. Liczba rewertantów jest miarą aktywności mutagennej badanej próbki odpadu.

Testowana gleba zawiera zanieczyszczenia ropopochodne w ilościach: TPH = 16 092 mg/kg s.m. oraz WWA = 3256 mg/kg s.m., natomiast po zakończonym procesie oczyszczania zawartości poszczególnych grup związków ulegają obniżeniu do poziomu: TPH = 992 mg/kg s.m. i WWA = 181 mg/kg s.m. Zanieczyszczenia ropopochodne z analizowanych próbek zostały wyekstrahowane za pomocą dichlorometanu, który następnie odparowano, a osad rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO). Badania przeprowadzono, wykorzystując test mikropłytkowy (Muta-Chromoplate) bazujący na teście Ames. Wyniki badań gleby surowej oraz po procesie bioremediacji podstawowej przedstawiono na wykresie 5.4, natomiast gleby po inokulacji biopreparatami BA-1, BA-2 i BA-3 zilustrowano na wykresie 5.5 w postaci zmian liczby rewertantów induko-

wanych w zależności od koncentracji zanieczyszczeń ropopochodnych. Do obliczeń wykorzystano program komputerowy producenta testu. W przypadku próbek gleby surowej stwierdzono statystycznie istotne zwiększenie liczby mutacji powrotnych ($p < 0,05$) dla szczepu TA-100. Natomiast w przypadku szczepu TA-98 podobnie jak podczas badania gleby nie wystąpił wzrost rewersji.



Wykres 5.1. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na liczbę rewertantów indukowanych – testowana gleba surowa i gleba po bioremediacji podstawowej (liczba powtórzeń $n = 3$, $p < 0,05$)



Wykres 5.2. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na liczbę rewertantów indukowanych – gleba po inokulacji biopreparatami BA-1, BA-2, BA-3 (liczba powtórzeń $n = 3$, $p < 0,05$)

Wskaźnik mutagenności, czyli stosunek liczby rewertantów szczepów testowych, które pojawiły się na podłożu bez histydyny w wyniku kontaktu tych szczepów z zanieczyszczeniami pochodzącymi z ekstraktów testowanej gleby, do liczby rewertantów spontanicznych, przy którym próbkę gleby uznawano za mutageną, wynosił 15,4. Po przeprowadzeniu bioremediacji podstawowej w warunkach laboratoryjnych *ex situ* – w próbkach gleby odnotowano nieznaczne zmniejszenie wskaźnika mutagenności, który obniżył się do poziomu 11,9. Przeprowadzenie inokulacji biopreparatem BA-1 spowodowało uzyskanie widocznego zmniejszenia obecności związków o potencjalnie mutagennych i rakotwórczych własnościach do poziomu 7,8. Kontynuacja procesu inokulacji biopreparatem BA-2 przyczyniła się do dalszego obniżenia wskaźnika mutagenności do poziomu 4,1. Po przeprowadzeniu inokulacji biopreparatem BA-3 wskaźnik mutagenności kształtował się na poziomie 1,12, nieznacznie przekraczając wskaźnik mutagenności, przy którym próbkę uznaje się za mutageną.

Podsumowanie

1.

Zagrożenia dla środowiska przyrodniczego wynikające z działalności przemysłu górnictwa ropy i gazu związane są z punktowym lub obszarowym zanieczyszczeniem ziemi substancjami ropopochodnymi, które mogą przedostawać się do gleby na etapie eksploatacji, transportu ropy lub dystrybucji ropopochodnych produktów. Ponadto źródłem antropogenicznej emisji zanieczyszczeń organicznych do środowiska mogą być procesy związane z niecałkowitym spalaniem paliw lub pirolizą. Takie zanieczyszczenie gleb spotyka się na terenach gazowni klasycznych wyłączonych z eksploatacji, gdzie występują gleby zanieczyszczone przede wszystkim wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA), węglowodorami ropopochodnymi (alifatyczne i olefinowe) – TPH oraz BETX, fenolami, krezolami, cyjankami i metalami ciężkimi. Duże nagromadzenie zanieczyszczeń w glebie negatywnie wpływa na kondycję ekosystemów, co stanowi bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia ludzi.

2.

W ramach realizacji pracy wykonano analizy fizyczne i chemiczne gleb pobranych z terenów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, a mianowicie z terenu:

- gazowni klasycznej wyłączonej z eksploatacji, położonej na północy Polski. Próbki do badań pobrano w pobliżu starych (częściowo zlikwidowanych) dołów ze smołą pogazową, z głębokości 0–0,5 m p.p.t. (gleba GK-1);
- dołu urobkowego, w którym składowano odpady wiertnicze zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi – gleba zaklasyfikowa-

na do odpadów o kodzie ex 17 05 03*. Próbki do badań pobrano z głębokości 0–0,5 m p.p.t. (gleba DU-1).

Analizy fizyczne i chemiczne wykazały, że gleba z terenu gazowni klasycznej charakteryzowała się dużą zawartością WWA (5022,06 mg/kg s.m.) i stosunkowo niewielką TPH (7103 mg/kg s.m.). Gleba z terenu dołu urobkowego zawierała natomiast duże ilości TPH (33 984 mg/kg s.m.) i stosunkowo niewielkie WWA (4,98 mg/kg s.m.). Jako że fundamentalnym celem realizowanej pracy było badanie procesów biodegradacji TPH i WWA w glebie, dlatego wskazane było uzyskanie gleby o istotnych zawartościach TPH i WWA. Ponieważ nadmiernie wysokie zawartości w glebie zarówno WWA, jak i TPH mogą hamować proces jej oczyszczania, dlatego do badań procesu biodegradacji węglowodorów, prowadzonych w warunkach *ex situ*, jako materiał badawczy zastosowano układ gleb: GK-1:DU-1 w stosunku 2:1.

3.

Doboru substancji biogennych do oczyszczanej gleby dokonano, opierając się na wynikach badań respirometrycznych, mierzących postęp samoistnej i wspomaganą biodegradacji (tlenowej) substancji ropopochodnych zawartych w badanej glebie. Badania te wykonano za pomocą zestawu OxiTopControl, umożliwiającego określenie szybkości ubytku substratu w funkcji czasu, obliczanej na podstawie średnich szybkości konsumpcji O_2 i produkcji CO_2 .

Na podstawie wykonanego pomiaru aktywności biologicznej badanej gleby (N:P = 4,3:1) oraz gleby poddanej stymulacji substancjami biogennymi, tak aby stosunek N:P wynosił: 20:1, 10:1 i 7:1, do badań prowadzenia procesu biodegradacji węglowodorów TPH i WWA w warunkach *ex situ* wytypowano glebę z proporcją N:P na poziomie 7:1

4.

Etapowy proces oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi obejmował:

- bioremediację podstawową, polegającą na uaktywnieniu rodzimej flory mikrobakteryjnej poprzez dobór optymalnych parametrów (N:P = 7:1, pH = 7,5, wilgotność 20–25%, temperatura 17–20°C);
- inokulację konsorcjami bakteryjnymi (BA-1, BA-2 oraz BA-3), złożonymi z mikroorganizmów wykazujących zdolności rozkładu węglowodorów ropopochodnych. Biopreparaty opracowane zostały w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB.

5.

Prowadzenie procesu oczyszczania gleby w warunkach *ex situ* umożliwiło: kontrolę przebiegu procesów biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych, dobór optymalnych dawek wapna nawozowego i nawozów mineralnych, wstępne określenie ram czasowych prowadzenia poszczególnych etapów oczyszczania oraz zapoznanie się z efektywnością biopreparatów opracowanych na bazie niepatogennych mikroorganizmów.

W wyniku trwającego 90 dni procesu bioremediacji podstawowej przeprowadzonego w warunkach laboratoryjnych metodą *ex situ* osiągnięto znaczny stopień redukcji zanieczyszczeń TPH (z 16 092,0 do 10 416,4 mg/kg s.m.) oraz WWA (z 3256,51 do 2491,70 mg/kg s.m.). Etap inokulacji biopreparatem BA-1 prowadzony przez okres 90 dni umożliwił obniżenie zawartości TPH do 4797,1 mg/kg s.m. i WWA do 1199,82 mg/kg s.m. Drugi etap inokulacji, trwający 60 dni, z zastosowaniem biopreparatu BA-2, umożliwił obniżenie TPH (do 2095,4 mg/kg s.m.) i WWA (do 482,82 mg/kg s.m.). W wyniku zastosowania trzeciego etapu inokulacji badanej gleby, biopreparatem BA-3, i prowadzenia procesu bioaugmentacji przez kolejne 60 dni osiągnięto obniżenie zawartości TPH (992,1 mg/kg s.m.) i WWA (186,85 mg/kg s.m.) w oczyszczanej glebie poniżej poziomu określonego w standardach glebowych wymaganych przez przepisy prawne.

6.

Zastosowanie biomarkera $C_{30}17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ hopanu do normalizacji stężeń TPH i WWA w trakcie przebiegu poszczególnych etapów biodegradacji pozwoliło na przedstawienie modelu matematycznego opisującego kinetykę biodegradacji TPH i WWA.

7.

Prace prowadzone pod kątem poszukiwania metod efektywnego usuwania zanieczyszczeń (TPH i WWA) z gleby, umożliwiających przywrócenie jej właściwości użytkowych, pozwoliły na opracowanie koncepcji etapowego procesu oczyszczania zdegradowanych terenów. Poszczególne etapy rekultywacji zanieczyszczonych terenów zależne są przede wszystkim od wyników oceny stopnia skażenia gruntu. Wytyczne prowadzenia kolejnych etapów efektywnej bioremediacji zanieczyszczonych gruntów zostały określone na podstawie efektywności badań wykonanych w skali półtechnicznej metodą *ex situ*.

Rezultaty badań zrealizowanych w skali laboratoryjnej (półtechnicznej) metodą *ex situ* stanowią podstawę do opracowania wytycznych prowadzenia rekultywacji terenu metodą *in situ*.

8.

Dzięki opracowanej metodyce chromatograficznego (ilościowego i jakościowego) oznaczania substancji ropopochodnych, istnieje możliwość pełnej kontroli przebiegu procesu biodegradacji zanieczyszczeń (zmiany zawartości węglowodorów alifatycznych i aromatycznych) na poszczególnych etapach oczyszczania.

9.

Kompleksowa ocena jakości gleby powinna opierać się zarówno na jej parametrach fizycznych i chemicznych, jak i na analizie bioindykacyjnej, oceniającej jej toksyczność na organizmy żywe. Reakcja bioindykatora na testowany czynnik może być podstawą oceny ogólnej aktywności biologicznej badanego układu. Oceny skuteczności stosowanych zabiegów remediacyjnych w procesie oczyszczania gleby, obok określania stężenia toksykantu, dokonano na podstawie wyników pięciu mikrobiotestów z organizmami należącymi do trzech poziomów troficznych: producentów (Phytotoxkit i Spirodela Duckweed Toxkit), konsumentów (Ostracodtoxkit) oraz reducentów (Microtox STP), testu Ames oraz mikrobiologicznego testu oceny ryzyka MARA, które w pełni potwierdziły słuszność podejmowanych decyzji dotyczących realizacji procesu oczyszczania gleby.

Akty prawne i normatywne

- 1) Ustawa o odpadach z dnia 14 grudnia 2012 r. (Dz.U. z 2013 r. poz. 21 z późn. zm.).
- 2) Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 maja 2015 r. w sprawie odzysku odpadów poza instalacjami i urządzeniami (Dz.U. z 2015 r. poz. 796).
- 3) Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi (Dz.U. z 2016 r. poz. 1395).

Literatura

- [1] Abalos A., Viñas M., Sabaté J., Manresa M.A., Solanas A.M.: *Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa AT10*. *Biodegradation* 2004, 15, s. 49–260.
- [2] Adamek M., Koślacz R., Zieliński W.: *Wskazówki metodyczne wykonywania rekultywacji gruntów i wód podziemnych zanieczyszczonych produktami naftowymi*. MOSZiNL, Warszawa 1995.
- [3] Ahn D.W., Kim S.S., Han S.J., Kim B.I.: *Characteristics of Electrokinetic Remediation of Unsaturated Soil Contaminated By Heavy Metals-I: Experimental Study*. *The International Society of Offshore and Polar Engineers* 2010, 20 (2), s. 140–146.
- [4] Alexander R.R., Tang J., Alexander M.: *Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment*. *J. Environ. Qual.* 2002, 31, s. 150–154.
- [5] Al-Hadhrani H., Lappin-Scott M., Fisher P.J.: *Studies on the biodegradation of three groups of pure n-alkanes in the presence of molasses and mineral fertilizer by Pseudomonas aeruginosa*. *Mar. Pollut. Bull.* 1997, 11, s. 969–974.
- [6] 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, 30, s. 2105–2110.
- [7] Atagana H.I., Haynes R.J., Wallis F.M.: *The use of surfactants as possible enhancers in bioremediation of creosote contaminated soil*. *Water, Air, and Soil Pollution* 2003, 142, s. 137–149.

- [8] Atlas R.M.: *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. Microbiol. Rev. 1981, 45, s. 180–209.
- [9] Atlas R.M.: *Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation*. Mar. Pollut. Bull. 1995, 31, s. 178–187.
- [10] Bąkowski W., Bodzek D.: *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w naturalnym środowisku człowieka – pochodzenie, występowanie, toksyczność, oszacowanie emisji w Polsce*. Arch. Ochr. Środ. 1988, 3–4, s. 197–215.
- [11] Balachandrana C., Duraipandiyana V., Balakrishna K., Ignacimuthua S.: *Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in Streptomyces sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil*. Bioresource Technology 2012, 112, s. 83–90.
- [12] Bamforth S.M., Singleton I.: *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 2005, 80, s. 723–736.
- [13] Banks M.K., Govindaraju R.S., Schwab A.P., Kulakow P., Finn J.: *Phytoremediation of hydrocarbon contaminated soil*. CRC Press., Boca Raton, FL, 2000.
- [14] Baran S., Oleszczuk P.: *Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie lekkiej w zależności od źródeł emisji*. Roczniki Gleboznawcze 2003, LIV, 3, s. 49–60.
- [15] Batty L.C., Anslow M.: *Effect of a polycyclic aromatic hydrocarbon on the phytoremediation of zinc by two plant species (Brassica juncea and Festuca arundinacea)*. Int. J. Phytoremediation 2008, May–June, 10(3), s. 234–249.
- [16] Bayly R.C., Wigmore G.J.: *Metabolism of phenol and cresols by mutant of Pseudomonasputida*. J. Bacteriol. 1973, 113, s. 1112–1120.
- [17] Bezza F.A., Chirwa E.M.: *Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil*. Chemosphere 2015, 144, s. 635–644.
- [18] Bhattacharya D., Sarma P.M., Krishnam S., Mishra S., Lal B.: *Evaluation of genetic diversity among Pseudomonas citronellolis strains isolated from oily sludge-contaminated sites*. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, s. 1435–1441.
- [19] Bordenave S., Goni-Urriza M., Caumette P., Duran R.: *Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat*. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, s. 6089–6097.

- [20] Bożym M., Poluszyńska J., Sławińska I., Dwojak J.: *Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w stałych próbkach środowiskowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas GC-MS*. Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych 2009, 4, s. 155–164.
- [21] Bridges B.A.: *The Fluctuation Test*. Biomedical and Life Sciences 1980, 46 (1–2), s. 41–44.
- [22] Brito E.M., De la Cruz Barrón M., Caretta C.A., Goñi-Urriza M., Andrade L.H., Cuevas-Rodríguez G., Malm O., Torres J.P., Simon M., Guyoneaud R.: *Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: investigation of hydrocarbon degradation potential*. Sci. Total Environ. 2015, 521, s. 1–10.
- [23] Brown R.A., Crosbie J.R.: *Oxygen sources for in situ bioremediation. Bioremediation – Field Experience*. Lewis Publishers, 1994.
- [24] Brzeszcz J., Steliga T., Kapusta P., Turkiewicz A., Kaszycki P.: *r-strategist versus K-strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils*. International Biodeterioration & Biodegradation 2016, 106, s. 41–52.
- [25] Casida L.E., Klein D.A., Santoro T.: *Soil dehydrogenase activity*. Soil Sci. 1964, 98, s. 371–376.
- [26] Cebon A., Bedrossy L., Stralis-Pavese N., Singer A.C., Thompson I.P., Prosser J.I., Murrell J.C.: *Nutrient amendments in soil DNA stable isotope probing experiments reduce the observed methanotroph diversity*. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, s. 798–807.
- [27] Cerniglia C.E.: *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biodegradation 1992, 3, s. 351–368.
- [28] Cerqueira V.S., Hollenbach E.B., Maboni F., Vainstein M.H., Camargo F.A.O., Peralba M.C.R., Bento F.M.: *Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures*. Bioresource Technology 2011, 102, s. 11003–11010.
- [29] Chadhain N., Sinead M., Norman R.S., Pesce K.V., Kukor J.J., Zylstra G.J.: *Microbial dioxygenase gene population shifts during Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*. Applied and Environm. Microbiol. 2006, 72, s. 4078–4087.
- [30] Chaîneau C.H., Morel J.L., Qudot J.: *Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling*. Environ. Sci. Technol. 1995, 29, s. 1615–1621.

- [31] Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J., Ballerini D.: *Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments*. Water, Air, and Soil Pollution 2003, 144, s. 419–440.
- [32] Chen S., Yin H., Ye J., Peng H., Liu Z., Dang Z., Chang J.: *Influence of coexisted benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of Stenotrophomonas maltophilia during biodegradation and transformation*. Bioresour. Technol. 2014, 158, s. 181–187.
- [33] Child R., Miller C.D., Liang Y., Sims R.C., Anderson A.J.: *Pyrene mineralization by Mycobacterium sp. strain KMS in a barley rhizosphere*. J Environ Qual. 2007, 36, s. 1260–1265.
- [34] Choi Y.K., Zylstra G.J., Kim E.: *Benzoate catabolite repression of the phthalate degradation pathway in Rhodococcus sp. strain DK17*. Applied and Environm. Microbiol. 2007, 73, s. 1370–1374.
- [35] Chung N., Alexander M.: *Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons*. Environ. Sci Technol. 1999, 33, s. 3605–3608.
- [36] Churchill S.A., Harper J.P., Churchill P.F.: *Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons*. Applied and Environm. Microbiol. 1999, 65, s. 549–552.
- [37] Colombano S., Mouve Ch.: *Remediation technologies for PAH contaminated soils*. Review report within the SNOWMAN project PACMAN (SN-03-11), 2012.
- [38] Coulon F., Delille D.: *Effects of Biostimulation on Growth of Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons*. Oil and Gas Science and Technology 2003, 58 (4), s. 469–479.
- [39] Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab A.P., Hsu F.C.: *Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants*. Adv. Agron. 1996, 56, s. 56–114.
- [40] Czerwiński J.: *Zastosowanie technik ekstrakcji do fazy stałej oraz bezpośredniego nastrzyku na kolumnę chromatograficzną do oznaczania związków organicznych w próbkach ciekłych*. Praca doktorska. Politechnika Gdańska, 1996.
- [41] Daane L.L., Harjono I., Zylstra G.J., Hageblom M.M.: *Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants*. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, s. 2683–2691.

- [42] Dąbrowska D., Kot-Wasik A., Namieśnik J.: *Stability Studies of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Different Organic Solvents and Identification of Their Transformation Products*. Polish J. of Environ. Stud. 2008, 17 (1), s. 17–24.
- [43] Das N., Chandran P.: *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview*. Biotechnology Research International 2011, Article ID 941810.
- [44] Das N., Das D.: *Strategies for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil-an overview*. Journal of Critical Reviews 2015, 2 (1), s. 20–25.
- [45] Deeb R.A., Alvarez-Cohen L.: *Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and Rhodococcus*. Biotechnol. Bioeng. 1999, 62, s. 526–536.
- [46] Dibble J.T., Bartha R.: *Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge*. Appl. Environ. Microbiol. 1979, 37 (4), s. 729–739.
- [47] Dickinson S.J., Rutherford P.M.: *Utilization of biosolids during the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil*. J Environ Qual. 2006, 35, s. 982–991.
- [48] Domingo J.L., Nadal M.: *Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature*. Food and Chemical Toxicology 2015, 86, s. 144–153.
- [49] Doni S., Macci C., Peruzzi E., Arenella M., Ceccanti B., Masciandaro G.: *In situ phytoremediation of a soil historically contaminated by metals, hydrocarbons and polychlorobiphenyls*. Journal of Environmental Monitoring 2012, 14, s. 1383–1390.
- [50] Farbiszewska T., Farbiszewska-Bajer J., Szpala K.: *Optymalizacja warunków i polowa próba biodegradacji substancji ropopochodnych*. International Conference „Analysis and utilization at oily wastes”, Auzo, 1996, s. 292–296.
- [51] Filipek-Mazur B., Tabak M., Gorczyca O.: *Content of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils exposed to traffic pollution*. Proceedings of ECOpole, 2014, 8 (1).
- [52] Fismes J., Perrin-Ganier C., Empereur-Bissonnet P., Morel J.L.: *Soil-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils*. J. Environ. Qual. 2002, 31, s. 1649–1656.

- [53] Gabrielson J., Kühna I., Colque-Navarro P., Hart M., Iversen A., Mc Kenzie D., Möllby R.: *Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco) toxic fingerprinting of chemicals*. *Analytica Chimica Acta* 2003, 485, s. 121–130.
- [54] Gaca J.: *Biodegradacja olejów i produktów naftowych i ich wpływ na środowisko. Wpływ zanieczyszczeń naftowych i chemicznych na środowisko przyrodnicze*. VII Międzynarodowe Sympozjum Szkoleniowe, Piła, 2000, s. 1–8.
- [55] Galas E., Kwapisz E. i in.: *Charakterystyka wybranych szczepów bakterii degradujących węglowodory ropy naftowej*. *Biotechnologia* 1997, 36 (1), s. 145–157.
- [56] Gałązka A.: *Przegląd biologicznych metod oczyszczania gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi*. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 2009, 535, s. 103–110.
- [57] Gałązka A., Gałązka R.: *Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and dactylis glomerata as the bioremediation plant*. *Polish J. Microbiol.* 2015, 64, s. 241–252.
- [58] Ghosh I., Jasmine J., Mukherji S.: *Biodegradation of pyrene by a Pseudomonas aeruginosa strain RS1 isolated from refinery sludge*. *Bioresource Technology* 2014, 166, s. 548–558.
- [59] Gibsin J., Harwood C.S.: *Metabolism diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes*. *Ann. Rev. Microbiol.* 2002, 56, s. 345–369.
- [60] Gmitrzuk N.: *Wpływ roślinności na rozkład substancji ropopochodnych – potencjalne możliwości w podczyszczaniu wód opadowych. CZĘŚĆ II. Wyniki badań dotyczących wpływu roślin na mikroorganizmy rozkładające substancje ropopochodne – przegląd literatury*. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 2012, 52.
- [61] Gomez R.B., Lima F.Y., Ferrer A.S.: *The use of respiration indices in the composting process: a review*. *Waste Manage Res.* 2006, 24, s. 37–47.
- [62] González N., Simarro R., Molina M.C., Bautista L.F., Delgado L., Villa J.A.: *Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process*. *Bioresource Technology* 2011, 102, s. 9438–9446.
- [63] Gramss G., Voigt K.D., Krische B.: *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic by higher fungi in sterile and unsterile soils*. *Biodegradation* 1999, 10, s. 653–659.

- [64] Grathwohl P., Totsche K.U.: *Symposium No HAS 8: Natural Attenuation and Intrinsic Bioremediation*. Phys. Chem. Earth (B) 1999, 24 (6), s. 493.
- [65] Grobelek A., Kasprzak M., Fijałkowski K.: *Fitoremediacja – niedoceniony potencjał roślin w oczyszczaniu środowiska*. J. Ecol. Health. 2010, 14 (6), s. 276–280.
- [66] Hajabbasi A.M.: *Importance of soil physical characteristics for petroleum hydrocarbons phytoremediation: A review*. African Journal of Environmental Science and Technology 2016, 10 (11), s. 394–405.
- [67] Hałas J.: *O procesie zgazowania słów kilka...* Wiadomości Naftowe i Gazownicze 2016, 217 (7–9), s. 17–19.
- [68] Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskeep W.P.: *Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils*. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72, s. 6316–6324.
- [69] Hämmerle R.M., Tscherko D.: *Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time*. Microbial Ecology 2007, 53, s. 259–269.
- [70] Holliger C., Zehnder A.J.B.: *Anaerobic biodegradation of hydrocarbon*. Current Opinion in Biotechnology 1996, 7, s. 326–330.
- [71] http://www.witko.com.pl/attach/9afda348f09dc6953ac56dc2c22add1b/przygotowanie_probek_SPE.pdf, (dostęp: luty 2017 r.).
- [72] 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*. World J. Microbiol. Biotechnol. 2008, 24, s. 2789–2797.
- [73] Hutchinson S.L., Banks M.K., Schwab A.P.: *Phytoremediation of Aged Petroleum Sludge. Effect of Inorganic Fertilizer*. J. Environ. Qual. 2001, 30, s. 395–403.
- [74] Ivshina I., Kostina L., Krivoruchko A., Kuyukina M., Peshkur T., Anderson P., Cunningham C.: *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from Rhodococcus ruber IEGM 231*. Journal of Hazardous Materials 2016, 312, s. 8–17.
- [75] Jaekel U., Musat N., Adam B., Kuypers M., Grundmann O., Musat F.: *Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps*. ISME J. 2013, 7, s. 885–895.

- [76] Jamroz T.: *Charakterystyka metod biologicznej degradacji związków ropopochodnych w glebie*. III Sympozjum Naukowo-Techniczne, Biotechnologia Środowiska, Ustroń-Jaszowiec, 1995, s. 205–210.
- [77] Janbandhu A., Fulekar M.H.: *Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment*. J. Hazard. Mater. 2011, 187 (1–3), s. 333–340.
- [78] Januszek K., Błońska E., Stanik P.: *Uwagi dotyczące oznaczania aktywności dehydrogenaz w glebach testem TTC – FORMAZAN*. Acta Agrophysica 2007, 9 (3), s. 635–644.
- [79] Jiang J., Liu H., Li Q., Gao N., Yao Y., Xu H.: *Combined remediation of Cd-phenanthrene co-contaminated soil by Pleurotus cornucopiae and Bacillus thuringiensis FQ1 and the antioxidant responses in Pleurotus cornucopiae*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2015, 120, s. 386–393.
- [80] Johnsen A.R., Schmidt S., Hybholt T.K., Henriksen S., Jacobsen C.S., Andersen O.: *Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) – degrading community of PAH polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by Mycobacteria*. Applied and Environm. Microbiol. 2007, 5, s.1474–1480.
- [81] Juhasz A.L., Naidu R.: *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial of benzo(a)pyrene*. International Biodeterioration & Biodegradation 2000, 10, s. 4205–4211.
- [82] Kanaly A.R., Harayama S.: *Biodegradation of high-molecular weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by bacteria*. Journal Bacteriology 2000, 182, s. 2059–2067.
- [83] Kaplan C.W., Kitts C.L.: *Bacterial succession in a petroleum land treatment unit*. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, s. 1777–1786.
- [84] Kapusta P., Steliga T.: *Biologiczne podstawy remediacji gruntów skażonych substancjami ropopochodnymi*. Prace INiG 2004, 130, s. 904–908.
- [85] Karamalidis A.K., Evangelou A.C., Karabika E., Koukkou A.I., Drainas C., Voudrias E.A.: *Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added Pseudomonas aeruginosa strain*. Spet. Bioresource Technol. 2010, 101 (16), s. 6545–6552.
- [86] Kaszubkiewicz J., Kawałko D., Perlak Z.: *Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Horizons of Soils in Immediate Neighbourhood of Illegal Waste Dumps*. Polish J. of Environ. Stud. 2010, 19 (1), s. 73–82.

- [87] Katsivela E., Moore E.R.D., Kalogerakis N.: *Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons: Specificity among bacteria isolated from refinery waste sludge*. Water, Air, and Soil Pollut. 2003, 3, s. 103–115.
- [88] Khoramnejadian S., Khoramnejadian S.: *Phytoremediation of Heavy Metals and Total Petroleum Hydrocarbons by Amaranth*. Journal of Biology and Today's. World 2013, 2 (12), s. 514–516.
- [89] Kim D., Chae J.Ch., Zylstra G.J., Kim Y.S., Kim S.K., Nam M.H., Kim Y.M., Kim E.: *Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of o-xylene, toluene, and ethylbenzene by Rhodococcus sp. strain DK17*. Applied Environ. Microbiol. 2004, 73, s. 6089–6097.
- [90] Kim J.S., Crowley D.E.: *Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar pits*. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73 (14), s. 4579–4591.
- [91] Kim S.J., Kweon O., Freeman P.J., Jones R.C., Adjei M.D., Jhoo J.W., Edmondson R.D., Cerniglia C.E.: *Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in Mycobacterium vanbaalenii PYR-1*. Applied and Environm. Microbiol. 2006, 72, s. 1045–1054.
- [92] Kim S.J., Kweon O., Freeman P.J., Jones R.C., Edmondson R.D., Cerniglia C.E.: *Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in Mycobacterium vanbaalenii PYR-1 Based on Systems Biology*. Applied Environ. Microbiol. 2007, 182, s. 464–472.
- [93] Kluk D.: *Badanie szybkości biodegradacji substancji ropopochodnych w odpadach wiertniczych*. Nafta-Gaz 2010, 1, s. 27–33.
- [94] Kluk D., Steliga T.: *Ocena zmian toksyczności gleby skażonej niklem i substancjami ropopochodnymi w procesach fitoremediacji*. Nafta-Gaz 2016, 4, s. 230–241.
- [95] Kołoczek H., Koszycki P.: *Biologiczne mechanizmy oczyszczania skażeń organicznych w glebie*. www.fundacja.ogr.ar.krakow.pl/pdf/Koloczek%20Kaszycki%20str%2028-40.pdf, 2004.
- [96] Kołwzan B.: *Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną*. Oficyna Politechniki Wrocławskiej, 2005.
- [97] Kotani T., Kawashima Y., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y.: *Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing Mycobacterium sp. TY-6 and Pseudonocardia sp. TY-7*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2006, 102, s. 184–192.

- [98] Kumar A.G., Vijayakumar L., Joshi G., Peter D.M., Dharani G., Kirubakaran R.: *Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment*. *Bioresource Technology* 2014, 170, s. 556–564.
- [99] Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y.B., Naidu R., Megharaj M.: *Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions*. *Chemosphere* 2016, s. 1–25.
- [100] Kurek E., Stec A., Staniak D.: *Biodegradacja ex-situ gleby skażonej produktami ropopochodnymi*. *Ekonżynieria* 1998, 9, s. 5–11.
- [101] Kurth E.G., Doughty D.M., Bottomley J.P., Arp J.D., Sayavedra-Soto L.A.: *Involvement of BmoR and BmoG in n-alkane metabolism in 'Pseudomonas butanovora'*. *Microbiology* 2008, 154, s. 139–147.
- [102] Kutturi G., Robinson C.W., Inniss W.E.: *Phenol degradation by a psychrotrophic strain of Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 34, s. 539–543.
- [103] Kweon O., Kim S.J., Jones R.C., Freeman J.P., Adejei M.D., Edmondson R.D., Cerniglia C.E.: *A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in Mycobacterium vanbaalenii PYR-1*. *Journal Bacteriology* 2007, 189, s. 4635–4657.
- [104] Lalucat J., Bennisar A., Bosch R., Garcia-Valdes E., Palleroni N.J.: *Biology of Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006, 70, s. 510–547.
- [105] Łebkowska M.: *Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym*. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 1996, 3, s. 117–118.
- [106] Lee K., Tremblay G.H., Gauthier J., Cobanli S.E., Griffin M.: *Bioaugmentation and biostimulation: A paradox between laboratory and field results*. *Proceedings of International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, DC, 1997, s. 697–705.
- [107] Lemaire J., Buès M., Kabechea T., Hannad K., Simonnot M.O.: *Oxidant selection to treat an aged PAH contaminated soil by in situ chemical oxidation*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2013, 1 (4), s. 1261–1268.
- [108] Li H., Zhang Y., Zhang C.G., Chen G.X.: *Effect of petroleum-containing wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in a Paddy soil irrigation area*. *J. Environ. Qual.* 2005, 34, s. 1073–1080.

- [109] Li X., Li P., Lin X., Zhang C., Li. Q., Gong Z.: *Biodegradation of Aged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Microbial Consortia in Soil and Slurry Phases*. Journal of Hazardous Materials 2007, 150 (1), s. 21–26.
- [110] Libudzisz Z., Kowal K., Żukowska Z.: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. PWN, Warszawa 2007, t. 1.
- [111] Liu S.H., Zeng G.M., Niu Q.Y., Liu Y., Zhou L., Jiang L.H., Tan X.F., Xu P., Zhang C., Cheng M.: *Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review*. Bioresour. Technol. Jan. 2017, 224, s. 25–33.
- [112] Lorch H.J., Benckieser G., Ottow J.C.G.: *Basic methods for counting microorganisms in soil and water*. W: Alef K., Nainipieri P. (eds.): *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, New York, s. 146–161, 1995.
- [113] Lors C., Damidot D., Ponge J.F., Périé F.: *Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales*. Environmental Pollution 2012, 165, s. 11–17.
- [114] Luke N. Ukiwe L.N., Egereonu U.U., Njoku P.C., Nwoko C.I.A., Allinor J.I.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation Techniques: A Review*. International Journal of Chemistry 2013, 5 (4), s. 43–55.
- [115] Macherzyński B., Włodarczyk-Makuła M.: *Ekstrakcja WWA z osadów wydzielonych za ścieków koksowniczych*. Inżynieria i Ochrona Środowiska 2011, 14 (4), s. 333–343.
- [116] Małachowska–Jutz A., Miksch K.: *Rola ryzosfery roślin jedno- i dwuliściennych w usuwaniu TPH i WWA oraz frakcji ciężkich ze środowiska*. Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej. Inżynieria Środowiska 2000, 45, s. 74–88.
- [117] Malina G.: *Biodegradacja węglowodorów ropopochodnych w gruncie w strefie aeracji przez mikroorganizmy autochtoniczne*. Gospodarka Surowcami Mineralnymi 1996, 12, s. 535–536.
- [118] Malina G.: *Biowentylacja strefy aeracji zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi*. Monografia 69. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa, 1999.
- [119] Malina G.: *Likwidacja zagrożenia środowiska gruntowo-wodnego na terenach zanieczyszczonych*. Monografia 132. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa, 2007.

- [120] 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, 128, s. 313–320.
- [121] Matthew M., Obbard J.P., Ting T.P., Gin Y.H., Tan H.M.: *Bioremediation of oil contaminated beach sediments using indigenous microorganisms in Singapore*. Acta Biotechnol. 1999, 19, s. 225–233.
- [122] Meckenstock R.U., Boll M., Mouttaki H., Koelschbach J.S., Tarouco P.C., Weyrauch P., Dong X., Himmelberg A.M.: *Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2016, 26, s. 92–118.
- [123] Mishra S., Jyot J., Ramesh C., Kuhad R., Lal B.: *Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oil-sludge-contaminated soil*. Applied and Environmental Microbiology 2001, 67, s. 1675–1681.
- [124] Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E.: *Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of Mycobacterium sp. strain PYR-1*. Applied Environ. Microbiol. 2001, 4, s. 1476–1483.
- [125] Morariu F., Mâsu S., Lixandru B., Dumitru Popescu D.: *Restoration of Ecosystems Destroyed by the Fly Ash Dump Using Different Plant Species*. Animal Science and Biotechnologies 2013, 46 (2), s. 180–184.
- [126] Moscoso F., Teijiz I., Deive F.J., Sanromán M.A.: *Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale*. Bioresource Technology 2012, 119, s. 270–276.
- [127] Mulligan C.N., Yong R.N.: *Natural attenuation of contaminated soils*. Environment International 2004, 30, s. 587–601.
- [128] Olson P.E., Castro A., Joern M., Du Teau N.M., Pilon-Smits E., Reardon K.F.: *Effects of agronomic practices on phytoremediation of an aged PAH-contaminated soil*. J. Environ. Qual. 2008, 37, s. 1439–1446.
- [129] Olszanowski A., Sozański M., Urbaniak A., Voelkel A.: *Remediacja i bioremediacja zanieczyszczonych wód i gruntów oraz wykorzystanie modelowania i technik informatycznych w inżynierii środowiska*. Wydaw. Politechniki Poznańskiej, 2001.
- [130] Ottow J.C.G., Fabig W.: *Influence of oxygen aeration on denitrification and redox level in different batch cultures*. W: Caldwell D.E., Brierly J.A. (eds.): *Planetary Ecology*. New York, Van Nostrad Reinhold, 1985, s. 427–440.

- [131] Padmavathiamma P.K., Li L.Y.: *Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants*. Water, Air, and Soil Pollution 2007, 184, s. 105–126.
- [132] Parrish Z.D., Banks M.K., Schab A.P.: *Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue*. J. Environ. Qual. 2005, 34, s. 207–216.
- [133] Patel V., Jain S., Madamwar D.: *Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India*. Bioresource Technology 2012, 107, s. 122–130.
- [134] Pawluk K.: *Konstrukcje inżynierskie wspomagające procesy oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego*. Prz. Nauk. Inż. Kszt. Środ. 2011, 53, s. 258–271.
- [135] 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 ^{13}C content of bacterial rRNA*. Applied Environ. Microbiol. 2008, 74, s. 1157–1166.
- [136] Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Torokne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nałęcz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B.: *A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters*. Environ. Toxicol. 2003, 18 (6), 395–402.
- [137] Phelps C.D., Young L.Y.: *Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review*. Adv. Agron. 2001, 70, s. 329–357.
- [138] Piskowska-Wasiak J.: *Metody rekultywacji terenów wyłączonych z eksploatacji gazowni klasycznych*. Gaz, Woda i Technika Sanitarna 2005, 3, s. 4–11.
- [139] Platen H., Wirtz A.: *Pomiary aktywności biologicznej gleb. Aplikacja analityczna nr 1 WTW/OxiTop**, 1999.
- [140] Płaza G.A.: *Bioremediacja gruntów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi z terenu rafinerii metodą biopryzmy*. Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, 2006.
- [141] Popp N., Schlomann M., Mau M.: *Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils*. Microbiology 2006, 152, s. 3291–3304.
- [142] Prenafeta-Boldu F.X., Luykx D.M.A., Vervoort J., de Bont J.A.M.: *Fungal metabolism of toluene: monitoring of fluorinated analogs by ^{18}F nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, s. 1030–1034.

- [143] Prenafeta-Boldu F.X., Vervoort J., Grotenhuis J.T.C., van Groenestijn J.W.: *Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus Cladophialophora sp. strain T1*. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, s. 2660–2665.
- [144] Prince R.C., Elmendorf D.L., Lute J.R., Hsu C.S., Haith C.E., Senius J.D., Dechert G.J., Douglas G.S., Butler E.L.: *17-alpha(H), 21-beta(H)-Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude-oil*. Environ. Sci. Technol. 1994, 28, s. 142–145.
- [145] Qudot J., Dutrieux E.: *Hydrocarbon weathering and biodegradation in tropical estuarine ecosystem*. Mar. Environ. Res. 1989, 27, s. 195–213.
- [146] Reardon K.F., Mosteller D.C., Rogers B.D.: *Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for Pseudomonas putida F1*. Biotechnology and Bioengineering 2000, 69, s. 386–400.
- [147] Rehmann K., Hertkorn N., Kettrup A.: *Fluoranthene metabolism in Mycobacterium sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth*. Microbiology 2001, 147, s. 2783–2794.
- [148] Reineke W.: *Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly*. Ann. Rev. Microbiol. 1998, 52, s. 287–331.
- [149] Röling W.F.M., Milner M.G., Jones D.M., Fratepietro F., Swannell R.P.J., Daniel F., Head I.M.: *Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil*. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, s. 2603–2613.
- [150] Röling W.F.M., Milner M.G., Jones D.M., Lee K., Daniel F., Swannell R.J.P., Head I.M.: *Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation*. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, s. 5537–5548.
- [151] Rosa A.P., Triguís J.A.: *Bioremediation process on Brazil shoreline*. Environmental Science and Pollution Research, 2007, 14, s. 470–476.
- [152] Sabirova J.S., Ferrer M., Regenhardt D., Timmis K.N., Golyshin P.N.: *Proteomic Insights into Metabolic Adaptations in Alcanivorax borkumensis Induced by Alkane Utilization*. J. Bacteriol. 2006, 188, s. 3763–3773.
- [153] Sadighbayan K., Assadi M.M., Farazmand A., Monadi A.R., Aliasgharzad N.: *Biodegradation of naphthalene, phenanthrene and anthracene (PAHs) with*

- bacteria in the oily soil of Tabriz*. Biosci. Biotech. Res. Comm. 2016, 9 (3), s. 399–405.
- [154] Saito A., Iwaabuchi T., Harayama S.: *A novel phenanthrene dioxygenase from Nocardioides sp. strain KP7: expression in Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2000, 182, s. 2134–2141.
- [155] Sanierung chemaliger Gaserksngelände. Durchführung der Sanierung DVGW-Merkblatt G-2666/II. 1994, Teil 2, s. 1-30.
- [156] Saponaro S., Bonomo L., Petruzzelli G., Romele L., Barbaferi M.: *Polycyclic aromatic hydrocarbons slurry phase bioremediation of a manufacturing gas (MGP) aged soil*. Water, Air, and Soil Pollut. 2002, 135, s. 219–235.
- [157] Sašek W., Cajthaml T., Bhatt M.: *Use of fungal technology in soil remediation: A case study*. Water, Air, and Soil Pollution. 2003, 3, s. 5–14.
- [158] Schinner F., Von Mersi W.: *Xylanase-, CM-cellulase- and invertase activity in soil: an improved method*. Soil. Biol. Biochem. 1990, 22, s. 511–515.
- [159] Shuttleworth K.L., Sung J.H., Kim E., Cerniglia C.E.: *Physiological and genetic comparison of two aromatic hydrocarbon – degrading Sphingomonas strains*. Mol. Cells 10. Applied Environm. Microbiol. 2000, 4, s. 199–205.
- [160] Siebielska I.: *Analiza porównawcza metod ekstrakcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z osadów ściekowych*. Ochrona Środowiska 2008, 30 (1), s. 51–54.
- [161] Sims J.L., Sims R.C., Dupont R.R., Matthews J.E., Russel H.H.: *In situ bioremediation of contaminated unsaturated surface soils*. US EPA Technical Report. EPA /540/5-93/501. Utah State University, 1993.
- [162] Siuta J.: *Podstawy degradacji ropopochodnych składników w glebie i odpadach*. Materiały konferencyjne „Technologie odolejania gruntów, odpadów i ścieków”. Konferencja N-T PTIE, Inżynieria Ekologiczna 2000, 2.
- [163] Spriggs T., Banks K., Schwab A.P.: *Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Manufactured Gas Plant-Impacted soil*. J. Environ. Qual. 2005, 34, s. 1755–1762.
- [164] Steczko K., Kadzikiewicz-Schoeneich M.: *Dawno powstałe szkody, jako współczesne wyzwanie dla przemysłu naftowego i gazowniczego w dziedzinie ochrony środowiska*. Materiały 2008.
- [165] Steliga T.: *Bioremediacja odpadów wiertniczych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi ze starych dołów urobkowych*. Prace INiG 2009, 163, s. 39–66.

- [166] Steliga T.: *Optimisation research on biodegradation of hydrocarbon pollutions in weathering soil samples from manufactured gas plant (MGP)*. Archives of Environmental Protection 2008, 34, s. 75–94.
- [167] Steliga T.: *Optymalizacja procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w zestarzałych odpadach z dołów urobkowych*. Gospodarka Surowcami Mineralnymi 2008, 24, s. 87–111.
- [168] Steliga T.: *Role of Fungi in Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Drill Waste*. Pol. J. Environ. Stud., 2012, 21 (2), s. 471–479.
- [169] Steliga T.: *Technologia oczyszczania gruntów z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą in situ*. Prace INiG 2006, 133, s. 1–78.
- [170] Steliga T.: *The effectiveness of soil purification from petroleum hydrocarbons verify by usage ultrasound extraction combined with gas chromatography*. The XXVII Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Katowice, 2003, s. 34–36.
- [171] Steliga T.: *The use of biotests in estimation of bioremediation processes in weathered drilling wastes*. Archives Environmental Protection 2011, 2, s. 61–70.
- [172] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Biodegradacja ex situ gruntu z klasycznych gazowni skażonego węglowodorami ropopochodnymi*. Zeszyty AGH, Wiertnictwo Nafta Gaz 2007, 24 (1), s. 475–486.
- [173] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons*. Bioresource Technology 2012, 125, s. 1–10.
- [174] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Effectiveness of bioremediation processes of hydrocarbon pollutants in weathered drill wastes*. Water, Air, Soil and Pollut. 2009, 1–4, s. 211–228.
- [175] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P., Turkiewicz A.: *Modelowanie procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w zestarzałych odpadach wiertniczych z dołów urobkowych*. Zeszyty AGH, Wiertnictwo Nafta Gaz 2008, 25 (2), s. 667–677.
- [176] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P., Turkiewicz A.: *Optymalizacja biodegradacji in situ odpadów wiertniczych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi*. Zeszyty AGH, Wiertnictwo Nafta Gaz 2006, 23, s. 409–421.
- [177] Steliga T., Kapusta P., Żak H.: *Biodegradacja substancji ropopochodnych w odpadach kopalnianych z zastosowaniem bakterii autochtonicznych*. Inżynieria Ekologiczna 2003, 8, s. 34–42.

- [178] Steliga T., Kluk D.: *Analiza przebiegu procesu bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych w gruncie z wykorzystaniem chromatografii gazowej*. Zeszyty AGH, Wiertnictwo Nafta Gaz 2004, 21, s. 349–356.
- [179] Sun M., Fu D., Teng Y., Shen Y., Luo Y., Li Z., Christie P.: *In situ phytoremediation of PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (Medicago sativa L.) with tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) and associated soil microbial activity*. J. Soils Sediments 2011, 11, s. 980–989.
- [180] Sung K., Kim K.S., Park S.: *Enhancing degradation of total petroleum hydrocarbons and uptake of heavy metals in a wetland microcosm planted with Phragmites communis by humic acids addition*. Int. J. Phytoremediation 2013, 15 (6), s. 536–459.
- [181] Surygała J. (red.): *Zanieczyszczenia naftowe w gruncie*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2000.
- [182] Tiwari B., Manickam N., Kumari S., Tiwari A.: *Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by Stenotrophomonas sp.* Bioresource Technology 2016, 216, s. 1102–1105.
- [183] Usman M., Faure P., Ruby C., Hanna K.: *Remediation of PAH-contaminated soils by magnetite catalyzed Fenton-like oxidation*. Applied Catalysis B: Environmental 2012, 117–118, s. 10–17.
- [184] Uyttebroek 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, 36, s. 1403–1411.
- [185] Van de Wiele T.R., Verstraete W., Siciliano S.D.: *Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the in vitro gastrointestinal tract*. J. Environ. Qual. 2004, 33, s. 1343–1353.
- [186] Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P.: *Recent Advances in Petroleum Microbiology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2003, 67, s. 503–549.
- [187] Varjani S.J., Rana D.P., Jain A.K., Bateja S., Upasani V.N.: *Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India*. International Biodeterioration & Biodegradation 2015, 103, s. 116–124.
- [188] Varjani S.J.: *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons*. Bioresource Technology 2017, 223, s. 277–286.

- [189] Venosa A.D., Suidan M.T., Wremm B.A., Stromeier K.L., Haines J.R., Eberhart B.L., King D., Holder E.: *Bioremediation of an experimental oil on the shoreline of Delaware bay*. Environmental Science & Technology 1996, 30, s. 1764–1775.
- [190] Vidali M.: *Bioremediation. An overview*. Pure Appl. Chem. 2001, 73 (7), s. 1163–1172.
- [191] Viñas M., Sabate J., Espuny M.J., Solanas A.M.: *Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil*. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, s. 7008–7018.
- [192] Vogel T.M.: *Bioaugmentation as a soil bioremediation approach*. Current Opinion in Biotechnology 1996, 7 (3), s. 311–316.
- [193] Wang Z., Xu Y., Zhao J., Li F., Gao D., Xing B.: *Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation*. Journal of Hazardous Materials 2011, 190 (1–3), s. 677–685.
- [194] Wei H., Le Z., Shuxian L., Dan W., Xiaojun L., Lan J., Xiping M.: *Health risk assessment of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil at coke oven gas plants*. Environmental Engineering and Management Journal 2015, 14 (2), s. 487–496.
- [195] Whyte L.G., Slagman S.J., Pietrantonio F., Bourbonnière L., Koval S.F., Lawrence J.R., Inniss W.E., Greer C.W.: *Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by Rhodococcus sp. Strain Q15*. Applied and Environmental Microbiology 1999, 65, s. 2961–2968.
- [196] 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, 3, s. 73–79.
- [197] Wilcke W., Krauss M., Lilienfein J., Amelung W.: *Polycyclic aromatic hydrocarbon storage in a typical Cerrado of the Brazilian savanna*. J. Environ. Qual. 2004, 33, s. 946–955.
- [198] Wilkes H., Buckel W., Golding B.T., Rabus R.: *Metabolism of hydrocarbons in n-alkane utilizing anaerobic bacteria*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2016, 26, s. 138–151.
- [199] Wright A.L., Weaver R.W.: *Fertilization and bioaugmentation for oil biodegradation in salt march Mesocosms*. Water, Air, and Soil Pollut. 2004, 156, s. 229–240.

- [200] Wu M., Dick W.A., Ye X., Chen K., Kost D.: *Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum contaminated soil and microbial population and activity determination*. Chemosphere 2017, 169, s. 124–130.
- [201] Wu Y.R., Luo Z.H., Vrijmoed L.L.P.: *Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two Fusarium solani strains isolated from mangrove sediments*. Bioresource Technology 2010, 101, s. 9666–9672.
- [202] Xiao J., Guo L., Wang S., Lu Y.: *Comparative impact of cadmium on two phenanthrene – degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in China*. J. Hazard. Mater. 2010, 174, s. 818–823.
- [203] 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, 33, s. 1210–1216.
- [204] Xu R., Obbard J.P.: *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments*. J. Environ. Qual. 2004, 33, s. 861–867.
- [205] Xu R., Obbard J.P.: *Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments*. J. Environ. Qual. 2003, 32, s. 1243–1243.
- [206] Xu R., Obbard J.P., Tay E.T.C.: *Optimization of slow–release fertilizer dosage for bioremediation of oil-contaminated beach sediment in a tropical environment*. World. J. Microbiol. Biotechnol. 2003, 19, s. 719–725.
- [207] Xu Y., Lu M.: *Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments*. Journal of Hazardous Materials 2010, 183 (1–3), s. 395–401.
- [208] Yadav J.S., Reddy C.A.: *Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin – degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. Applied Environ. Microbiol. 1993, 53, s. 756–762.
- [209] Yang Y., Chen R.F., Shiaris M.P.: *Metabolis of naphtahalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary chracterization of a cloned gene cluster from Pseudomonas putida NICIB 9816*. J. Bacteriol. 1994, 178, s. 2158–2164.
- [210] Yu Y., Wang Q., Li L., Sun P., Zhang Y., Lin H., Chen J., Lin B., Xiang M.: *The Variations of Concentrations, Profiles and Possible Sources of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in PM10 from Lanzhou, China*. Pol. J. Environ. Stud. 2016, 25 (3), s. 1323–1330.

- [211] Zafraa G., Absalóna Á.E., Anducho-Reyesb M.Á., Fernandezc F.J., Cortés-Espinosaa D.V.: *Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil*. Chemosphere 2017, 172, s. 120–126.
- [212] Zhang Y., Wang F., Zhu X., Zeng J., Zhao Q., Jiang X.: *Extracellular polymeric substances govern the development of biofilm and mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons for improved biodegradation*. Bioresource Technology 2015, 193, s. 274–280.
- [213] Zhang Z., Fan S.: *Influence of PAH speciation in soils on vegetative uptake of PAHs using successive extraction*. Journal of Hazardous Materials 2016, 320, s. 114–122.
- [214] Zhang Z., Hou Z., Yang C., Ma C., Tao F., Xu P.: *Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8*. Bioresource Technol. 2011, 102 (5), s. 4111–4116.
- [215] Zheng Z., Obbard J.P.: *Sorption of surfactant solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) from contaminated soil*. Water Res. 2002, 36, s. 2668–2673.
- [216] Zhong Y., Luan T., Lin L., Liu H., Tam N.F.Y.: *Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of Mycobacterium sp. and Sphingomonas sp.* Bioresour Technol. 2011, 102 (3), s. 2965–2972.
- [217] Zhou E., Crawford R.L.: *Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil*. Biodegradation 1995, 6, s. 127–140.
- [218] Zieńko J.: *Technologie wykorzystujące metody fizyczne oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego*. Ekologia i Technika 1999, 3, s. 89–94.
- [219] Zoller U., Rubin H.: *Feasibility of in situ NAPL-contaminated aquifer bioremediation by biodegradable nutrient-surfactant mix*. Journal of Environmental Science 2001, 8, s. 365–385.
- [220] Zylstra G.J., Kim E.: *Aromatic hydrocarbon degradation by Sphingomonas yanoikuyae B1*. Ind. Microbial. Biotechnol. 1997, 19, s. 408–414.

Spis fotografii, rysunków, wykresów i tabel

fotografie

Fot. 3.1. System próżniowy BAKER SPE do przygotowania próbek analitów techniką ekstrakcji na złożu sorpcyjnym SPE.....	75
Fot. 3.2. Przykładowy obraz wzrostu testowanych roślin w teście Phytotoxkit na próbce gleby kontrolnej.....	95
Fot. 3.3. Przykładowy obraz wzrostu testowanych roślin <i>Spirodela polyrhiza</i> w teście.....	97
Fot. 3.4. Obraz skorupiaka (<i>Heterocypris incongruens</i>).....	99
Fot. 3.5. Obraz uzyskany po skanowaniu płytki testowej MARA – czarną linią zaznaczono tzw. fingerprint uzyskany dla analizowanej próbki.....	104
Fot. 3.6. Zestaw OxiTop z podstawą mieszającą i inkubator OxiTop.....	111
Fot. 5.1. Wyniki testu Phytotoxkit przeprowadzonego w trakcie oczyszczania w warunkach <i>ex situ</i> gleby zanieczyszczonej węglowodorami TPH i WWA.....	163
Fot. 5.2. Obraz płytek testowych wraz z pierwszymi liśćmi <i>Spirodela polyrhiza</i> w ekstrakcie wodnym gleby kontrolnej w fazie początkowej testu (t0h) oraz końcowej (t72h).....	166
Fot. 5.3. Obraz płytek testowych wraz z pierwszymi liśćmi <i>Spirodela polyrhiza</i> w ekstrakcie wodnym gleby zanieczyszczonej w fazie początkowej testu (t0h) oraz końcowej (t72h).....	168
Fot. 5.4. Obraz płytek testowych wraz z pierwszymi liśćmi <i>Spirodela polyrhiza</i> w ekstrakcie wodnym gleby po procesie oczyszczania w warunkach <i>ex situ</i> w fazie początkowej testu (t0h) oraz końcowej (t72h).....	168

rysunki

Rys. 2.1. Schemat rowu opaskowego do szczywania lekkiej cieczy [218].....	37
Rys. 2.2. Schemat bariery hydraulicznej: (A) bariera studni, (B) układ z wykorzystaniem studni ekstrakcyjnych i zatłaczających [134].....	37
Rys. 2.3. Schemat biodegradacji substancji ropopochodnych w warunkach tlenowych (A) i beztlenowych (B) [95].....	39
Rys. 2.4. Rodzaje fitoremediacji.....	59
Rys. 2.5. Schemat instalacji przyzmy do prowadzenia procesu remediacji gleby w systemie Cum-Bac [2].....	65
Rys. 3.1. Schemat doboru sorbentów i rozpuszczalników do ekstrakcji substancji organicznych metodą ciecz-ciało stałe [71].....	80
Rys. 3.2. Schemat przeprowadzenia procedury testu MARA w wersji testu z rozcieńczeniami.....	103
Rys. 3.3. Schemat testu Ames.....	106
Rys. 3.4. Schemat stanowiska badawczego do prowadzenia procesu oczyszczania gruntu z zanieczyszczeń ropopochodnych w warunkach póltechnicznych (metoda <i>ex situ</i>).....	108
Rys. 3.5. Schemat przebiegu badań laboratoryjnych oczyszczania odpadów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi (metoda przyzmywania <i>ex situ</i>).....	109
Rys. 5.1. Ocena ryzyka środowiskowego ekstraktu wodnego gleby kontrolnej.....	176
Rys. 5.2. Ocena ryzyka środowiskowego ekstraktu wodnego gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi.....	176
Rys. 5.3. Ocena ryzyka środowiskowego ekstraktu wodnego gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi po przeprowadzonym procesie jej oczyszczania.....	176

tabele

Tabela 1.1. Wartości dopuszczalne stężeń substancji powodujących ryzyko w gruncie [mg/kg suchej masy] Załącznik do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. (poz. 1395).....	23
Tabela 2.1. Czynniki warunkujące biodegradację substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym [72, 190, 192].....	49

Tabela 2.2. Zestawienie bakterii i grzybów rozkładających poszczególne grupy węglowodorów ropopochodnych – na podstawie doniesień literaturowych.....	52
Tabela 2.3. Charakterystyka testów oceny toksyczności gleby.....	68
Tabela 3.1. Warunki analityczne podczas analizy chromatograficznego oznaczania anionów i kationów.....	74
Tabela 3.2. Zestawienie względnego odchylenia standardowego i niepewności względnej określonej dla wykonanych chromatograficznych analiz wzorca D2887 Calibration Mix (17 składników) firmy Supelco.....	83
Tabela 3.3. Zestawienie zidentyfikowanych WWA oraz WWA oznaczonych chromatograficznie z certyfikowanej mieszaniny wzorcowej (WWA w glebie firmy BAM-ERM-CCO13).....	88
Tabela 3.4. Porównanie zawartości zidentyfikowanych WWA przy zastosowaniu różnych układów ekstrahentów i sposobu izolacji frakcji aromatycznej w glebie.....	90
Tabela 3.5. Zestawienie wartości względnego odchylenia standardowego RSD [%] dla serii analiz (10) WWA wyizolowanych z próbki gleby.....	93
Tabela 4.1. Zestawienie wyników analiz fizykochemicznych próbek gleby pobranej z warstwy powierzchniowej z terenów dawnej gazowni klasycznej oraz dołu urobkowego.....	117
Tabela 4.2. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodorów alifatycznych i izoprenoidów wchodzących w skład zanieczyszczeń (TPH) w badanych próbkach gleby.....	120
Tabela 4.3. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gleby.....	123
Tabela 4.4. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń (TPH) w próbce gleby po zmieszaniu, przeznaczonej do badań procesu bioremediacji (G).....	127
Tabela 4.5. Zestawienie wyników analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbce gleby po zmieszaniu, przeznaczonej do badań procesu bioremediacji (G).....	128
Tabela 4.6. Zestawienie wyników analiz fizycznych i chemicznych podczas prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda <i>ex situ</i>).....	134

Tabela 4.7. Zestawienie wyników analiz fizycznych i chemicznych podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-1 gleby G-BP, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda <i>ex situ</i>).....	137
Tabela 4.8. Zestawienie wyników analiz fizykochemicznych podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-2 gleby G-BA1, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda <i>ex situ</i>).....	138
Tabela 4.9. Zestawienie wyników analiz fizykochemicznych podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatem BA-3 gleby G-BA2, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (metoda <i>ex situ</i>).....	139
Tabela 4.10. Porównanie zmian zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania gleby metodą <i>ex situ</i> (liczba powtórzeń pomiarów n = 7–10, p < 0,05).....	144
Tabela 4.11. Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji TPH w kolejnych etapach procesu oczyszczania gleby.....	146
Tabela 4.12. Porównanie zmian zawartości zidentyfikowanych WWA po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania zanieczyszczonej gleby metodą <i>ex situ</i> (liczba powtórzeń pomiarów n = 7–10, p < 0,05).....	150
Tabela 4.13. Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji WWA oraz 3-, 4-, 5- i 6-pierścieniowych WWA w kolejnych etapach procesu oczyszczania zanieczyszczonej gleby (metoda <i>ex situ</i>)	156
Tabela 5.1. Zestawienie wyników testu Phytotoxkit wykonanego na próbkach gleby kontrolnej oraz gleby zanieczyszczonej węglowodorami TPH i WWA przed i po przeprowadzonym procesie jej oczyszczania.....	164
Tabela 5.2. Wyniki pomiarów wzrostu powierzchni liści <i>Spirodela polyrhiza</i> w 72-godzinnym teście dla gleby kontrolnej.....	167
Tabela 5.3. Wyniki pomiarów wzrostu powierzchni liści <i>Spirodela polyrhiza</i> w 72-godzinnym teście dla gleby zanieczyszczonej.....	169
Tabela 5.4. Wyniki pomiarów wzrostu powierzchni liści <i>Spirodela polyrhiza</i> w 72-godzinnym teście dla gleby po procesie oczyszczania w warunkach <i>ex situ</i>	170

Tabela 5.5. Zestawienie wyników testu Ostracodtoxkit F przeprowadzonego na próbkach gleby kontrolnej i poddawanej procesowi oczyszczania w drodze bioremediacji podstawowej i bioaugmentacji.....	172
Tabela 5.6. Zestawienie wyników testu skринingowego oraz stężenia efektywnego powodującego hamowanie luminescencji uzyskanych według testu Microtox SPT przeprowadzonego na próbkach oczyszczanej gleby.....	173
Tabela 5.7. Wyniki uzyskane w oznaczeniu MARA w ekstraktach wodnych gleb stosowanych w procesie bioremediacji.....	175

wykresy

Wykres 2.1. Energia dostępna dla mikroorganizmów wykorzystujących różne akceptory elektronów w procesie biodegradacji SR [127].....	40
Wykres 3.1. Chromatogram rozdziału węglowodorów z uwzględnieniem biomarkera C ₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopanu (a) – wzorzec certyfikowany firmy Supelco Nr 08189, (b) – mieszanina węglowodorów wyizolowanych z gleby wraz z hopanem.....	82
Wykres 3.2. Chromatogram rozdziału mieszaniny węglowodorów Nr A029668 firmy Restek.....	85
Wykres 3.3. Porównanie zawartości zidentyfikowanych WWA przy zastosowaniu różnych układów ekstrahentów i sposobu izolacji frakcji aromatycznej z gleby.....	91
Wykres 3.4. Chromatogram rozdziału zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (16 WWA) oraz biomarkera C ₃₀ 17α(H), 21β(H)-hopanu z badanej próbki gleby.....	92
Wykres 3.5. Porównanie zużycia tlenu podczas samoistnej i stymulowanej substancjami biogennymi biodegradacji gleby zanieczyszczonej TPH i WWA.....	115
Wykres 4.1. Wyniki analiz chromatograficznych zidentyfikowanych węglowodorów alifatycznych i izoprenoidów wchodzących w skład zanieczyszczeń TPH w badanych próbkach gleby.....	122
Wykres 4.2. Wyniki analiz chromatograficznych zidentyfikowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych WWA w badanych próbkach gleby.....	125

Wykres 4.3. Procentowy udział zidentyfikowanych węglowodorów wchodzących w skład zanieczyszczeń TPH.....	127
Wykres 4.4. Procentowy udział zidentyfikowanych węglowodorów WWA wchodzących w skład zanieczyszczeń gleby.....	129
Wykres 4.5. Zmiany obniżania zawartości TPH w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej.....	135
Wykres 4.6. Zmiany obniżania zawartości WWA w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioremediacji podstawowej.....	135
Wykres 4.7. Efekt obniżania zawartości TPH w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3.....	140
Wykres 4.8. Efekt obniżania zawartości WWA w zanieczyszczonej glebie podczas prowadzenia procesu bioaugmentacji biopreparatami BA-1, BA-2 oraz BA-3.....	140
Wykres 4.9. Porównanie zmian zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania gleby metodą <i>ex situ</i> (liczba powtórzeń pomiarów $n = 8-10$, $p < 0,05$).....	142
Wykres 4.10. Wartości stosunków $n-C_{17}/Pr$ i $n-C_{18}/F$ w glebie po kolejnych etapach jej oczyszczania metodą <i>ex situ</i>	143
Wykres 4.11. Obniżenie zawartości TPH (C/CH) po normalizacji hopanem w kolejnych etapach biodegradacji oczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 8-10$, przy $p < 0,05$).....	147
Wykres 4.12. Porównanie zmian zawartości zidentyfikowanych WWA po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania zanieczyszczonej gleby metodą <i>ex situ</i> (liczba powtórzeń pomiarów $n = 8-10$, $p < 0,05$).....	149
Wykres 4.13. Rozkład zawartości WWA w glebie podczas poszczególnych etapów jej oczyszczania.....	153
Wykres 4.14. Porównanie chromatogramów rozdziału WWA z próbek gleby po kolejnych etapach procesu biodegradacji.....	155
Wykres 4.15. Obniżenie zawartości WWA (C/C_H) po normalizacji hopanem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 7-9$, przy $p < 0,05$).....	158
Wykres 4.16. Obniżenie zawartości WWA 3-pierścieniowych (C/C_H) po normalizacji hopanem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń $n = 9-10$, przy $p < 0,05$).....	158

Wykres 4.17. Obniżenie zawartości WWA _s 4-pierścieniowych (C/C _H) po normalizacji hopanem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń n = 9–10, przy p < 0,05).....	159
Wykres 4.18. Obniżenie zawartości WWA _s 5-pierścieniowych (C/C _H) po normalizacji hopanem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń n = 9–10, przy p < 0,05).....	159
Wykres 4.19. Obniżenie zawartości WWA _s 6-pierścieniowych (C/C _H) po normalizacji hopanem po kolejnych etapach biodegradacji zanieczyszczonej gleby (liczba powtórzeń n = 9–10, przy p < 0,05).....	160
Wykres 5.1. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na liczbę rewertantów indukowanych – testowana gleba surowa i gleba po bioremediacji podstawowej (liczba powtórzeń n = 3, p < 0,05).....	178
Wykres 5.2. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na liczbę rewertantów indukowanych – gleba po inokulacji biopreparatami BA-1, BA-2, BA-3 (liczba powtórzeń n = 3, p < 0,05).....	178

