

Adam Łuksa, Mariola Mendrycka, Magdalena Stawarz
Politechnika Radomska im. K. Pułaskiego, Radom

Bioremediacja gleb zaolejonych z wykorzystaniem sorbentów

Wprowadzenie

Skażenie środowiska przyrodniczego i jego postępująca dewastacja, będąca wynikiem działalności przemysłowej człowieka, wymaga podjęcia intensywnych zabiegów mających na celu przywrócenie pierwotnego stanu wód, powietrza i gleby.

Gleba skażona substancjami ropopochodnymi, która staje się odpadem zaliczanym do kategorii tzw. odpadów niebezpiecznych, czyli takich, które są szczególnie szkodliwe dla życia biologicznego i prawidłowego funkcjonowania ekosystemu, stanowi dość duży problem [12].

W ciągu ostatnich 50-ciu lat zużycie podstawowego krajowego surowca energetycznego (jakim jest węgiel kamienny) zmniejszyło się o prawie 50%, przy kilkakrotnym wzroście zużycia ropy naftowej i gazu ziemnego [3, 26]. W Polsce, w strukturze zużycia energii pierwotnej w 2006 roku udział gazu ziemnego wyniósł 12,5%, ale był zdecydowanie niższy w porównaniu z innymi krajami UE. Barię ograniczającą rozwój może okazać się relatywnie wysoka cena gazu, uzależniona od ceny ropy naftowej na giełdach światowych [8]. Niestety, szybko wzrastające zużycie ropy naftowej ma swoje negatywne skutki dla środowiska przyrodniczego.

Występowanie tzw. gleby zaolejonej w Polsce dotyczy tysięcy hektarów byłych jednostek i lotnisk wojskowych,

a także instalacji przemysłu rafineryjnego, stacji benzynowych, przepompowni i baz paliwowych, eksploatacji cystern, obszarów pod rurociągami, stacji obsługi maszyn i pojazdów. Skażenia znajdujące się w gruncie osiągają bardzo wysoki poziom, który często przekracza dopuszczalne normy. Ponadto związki organiczne, zawarte w paliwach i olejach, w których rozpuszczone są toksyczne dodatki uszlachetniające, chlorowcopochodne i wielopierścieniowe węglowodory, wykazują tendencję do migracji, zagrażając w ten sposób wodom gruntowym i powierzchniowym [25, 28].

Wnikanie paliwa do gruntu, podczas jego rozlewu, odbywa się pod wpływem działania sił ciężkości, sił kapilarnych oraz adsorpcyjnych. Migracja benzyny w gruncie jest od 6 do 10 razy szybsza niż wody. Sposób, w jaki węglowodory będą migrować w głąb gruntu zależy od jego przepuszczalności. Może ona zachodzić w pionie i/lub w poziomie. W gruncie dobrze przepuszczalnym migracja odbywa się w pionie, a następnie, gdy osiągnie poziom zwierciadła wód podziemnych – w poziomie. Jest to bardzo niebezpieczne, gdyż zagraża rezerwuárom wody pitnej. Dlatego istotnym wydaje się zastosowanie sorbentów w pierwszym etapie rekultywacji gleby [27].

Samorzutne oczyszczanie zaolejonej gleby

Często proces samorzutnego oczyszczania zaolejonej gleby jest długotrwały i wiąże się zarówno z przebiegiem spontanicznych reakcji fizykochemicznych, które prowadzą do rozkładu skażeń, jak również z występowaniem na danym obszarze autochtonicznych organizmów żywych o specyficznej aktywności enzymatycznej. Organizmy te

zdolne są do tzw. bioremediacji zanieczyszczeń, czyli ich unieszkodliwiania, na skutek rozkładu i utlenienia (biodegradacji), przyswojenia (asymilacji), bądź przetworzenia na nietoksyczne związki chemiczne, czyli biotransformacji [1]. Słabo przyswajalne i trudno metabolizowane związki, obce w środowisku naturalnym, są unieczynniane

przez organizmy, które dysponują metabolicznym potencjałem rozkładu ksenobiotyków, wśród których wyróżnić można – naturalnie zasiedlające rejony skażeń – mikroorganizmy prokariotyczne i eukariotyczne (głównie bakterie, promieniowce i drożdże), grzyby oraz niektóre gatunki roślin wykazujące możliwości fitoremediacji [2, 24].

Liczne doświadczenia dowodzą możliwości zastosowania w bioremediacji gleb drobnoustrojów wykorzystujących produkty ropopochodne, jako jedyne źródło węgla i energii. Stanowią one niewielką ilość w ogólnej liczbie bakterii glebowych (0,01–1%). Liczebność jednostek propagacyjnych bakterii powinna być większa od 105/g s.m. gruntu. Należy zapewnić różnorodność gatunkową drobnoustrojów synergistycznie zależnych od siebie, przy wykluczeniu mikroorganizmów chorobotwórczych, tj.: *Pseudomonas aeruginosa* czy *Klebsiella pneumoniae* [33].

Większość reakcji biochemicznych przebiega w granicach odczynu obojętnego pH ~ 7,2. Często zaleca się dodawanie wapna w ilości około 20–30% do gleb kwaśnych, aby zwiększyć ich pH i zneutralizować kwasy powstające podczas biodegradacji (np. próchnica nasycona Ca ztraca

swe właściwości hydrofilowe, co ułatwia proces wiązania WWA i jednocześnie zmniejsza ich podatność na rozkład mikrobiologiczny) [15]. Wpływ temperatury na intensywność biodegradacji jest znany. Wzrost temperatury o 10°C zwiększa szybkość reakcji enzymatycznych 2–3-krotnie. Podkreślić należy, że już w 15°C dużą aktywność metaboliczną wykazują mikroorganizmy psychrofilne. Uznaje się, że bioremediacja zachodzi efektywnie w zakresie temperatury 20–30°C [16].

W niektórych okolicznościach, jak w przypadku degradacji związków chloroorganicznych, stosuje się systemy mieszane: beztlenowo-tlenowe. Pierwszy etap procesu odbywa się w warunkach beztlenowych, celem dechloracji związku, natomiast etap drugi, tlenowy, zapewnia ostateczną degradację związku organicznego.

W warunkach beztlenowych akceptorem elektronów i wodoru oderwanego od substratu organicznego mogą być azotany, siarczany czy węglany. W tym przypadku jednak rozkład mikrobiologiczny zanieczyszczeń jest znacznie wolniejszy, a powstające produkty mogą mieć charakter toksyczny [7].

Zastosowanie sorbentów w procesie bioremediacji

Konsekwencją wystąpienia skażeń o szczególnie wysokiej toksyczności lub zanieczyszczenia gleby na skutek nagłych awarii (wycieki spod rurociągów, wypadki cystern, awarie pomp, itp.) może być całkowity zanik życia biologicznego, który uniemożliwia podjęcie procesu samooczyszczania środowiska glebowego. W takich przypadkach przeprowadzenie bioremediacji zanieczyszczeń możliwe jest przez zastosowanie odpowiedniego sorbentu oraz wprowadzenie do gleby aktywnych drobnoustrojów, tolerujących skażone środowisko zanieczyszczeń [10].

Unieruchamianie biomasy na różnych nośnikach jest czynnikiem wspomagającym biodegradację zanieczyszczeń – szczególnie związków trudno rozkładalnych. Poza tym nośnik stanowi doskonałą barierę dla wszelkich toksycznych związków, zwiększając tym samym przeżywalność mikroorganizmów w środowisku naturalnym. Ponadto, w nośniku, wraz z drobnoustrojami mogą być zatrzymane substancje odżywcze, m.in. sole biogenne i witaminy, mające pozytywny wpływ na efektywność procesu [32].

Zastosowanie sorbentów jest przydatne nie tylko do likwidacji skażeń na powierzchni wód, ale również przy usuwaniu skażeń gruntowych, gdy niemożliwe jest stosowanie zbierania mechanicznego, lub w sytuacjach, kiedy należy usunąć pozostałości toksycznej cieczy i dokładnie oczyścić teren skażony (po uprzednim zastosowaniu zbierania mechanicznego), a także w celu zapobiegania jej dalszemu rozprzestrzenianiu się, poprzez budowanie sorbentowych wałów osłonowych [12].

Wszystkie te przypadki wymagają, by zużyte sorbenty – wraz z zaabsorbowaną substancją – były przygotowane do transportu do miejsca ich neutralizacji lub spalania, poprzez zamknięcie w szczelnych pojemnikach.

Najbardziej skutecznym i dostępnym rodzajem sorbentów są sorbenty naturalne, które mogą być stosowane w postaci: luźnej, snopków, mat, balotów, zapór czy poduszek. Bardzo ważną zaletą użytego sorbentu powinna być możliwość jego utylizacji, na przykład przez rozkład mikrobiologiczny [27].

Wspomaganie procesu bioremediacji mikroorganizmami

Biodegradacja skażeń gruntu ropą naftową – stanowiącą mieszaninę węglowodorów o różnej długości łańcucha, różnym stopniu nasycenia i konfiguracji – wymaga współ-

działania kompleksu mikroorganizmów należących do różnych grup taksonomicznych. Wśród nich występują złożone powiązania ekologiczne i fizjologiczne. Najlepiej

wykorzystywanym źródłem tego typu mikroorganizmów są środowiska naturalne o określonym poziomie skażenia węglowodorami, gdzie warunki temperatury, odczyn, stężenia jonów metali i natleniania są zbliżone do tych, w których mogą być później stosowane [22]. Proces przyswajania węglowodorów słabo rozpuszczanych w wodzie jest najczęściej poprzedzony rozproszeniem ich w fazie wodnej w formie makro- lub mikrokropki. Niektóre drobnoustroje bytujące w skażonych środowiskach wykazują zdolność do wydzielania biosurfaktantów, które powodują wytwarzanie trwałej emulsji. Dzięki hydrofobowemu charakterowi ścian komórkowych drobnoustrojów degradujących ropę następuje łączenie komórek z kropelkami węglowodorów. Proces biodegradacji węglowodorów wymaga między innymi dużej aktywności systemów oksygenaz, dehydrogenaz i hydrolaz. Poziom aktywności tych enzymów jest jednym z podstawowych kryteriów przydatności szczepów [19, 31].

Do podstawowych kryteriów selekcji szczepów stosowanych do biodegradacji substancji ropopochodnych należą [18]:

- zdolność szybkiej adaptacji szczepu do wzrostu w skażonym środowisku,

- szybkość przyswajania substratu,
- nietoksyczne produkty biodegradacji.

Przeprowadzone prace bioremediacyjne potwierdziły przydatność stosowania do tego celu metod biologicznych. Remediacja z wykorzystaniem samych sorbentów nie daje zadowalających wyników, gdyż proces przebiega bardzo powoli i pozostaje problem z likwidacją zużytych sorbentów. Dlatego niezbędne jest wspomaganie procesu biopreparatami, które nie tylko intensyfikują proces, ale są niezbędne przy odzyskiwaniu bądź likwidacji sorbentów, które (jak w przypadku mchów *Spagnum moss*) mogą ulec całkowitemu rozkładowi.

Niezbędnym warunkiem szybkiej i skutecznej likwidacji zużytego sorbentu jest obecność substancji biogenych podczas trwania procesu.

Użyty sorbet może być jednocześnie nośnikiem materiału mikrobiologicznego, dzięki czemu proces bioremediacji może zachodzić również wewnątrz sorbentu. Wykorzystanie cykli metabolicznych mikroorganizmów może więc prowadzić do końcowych produktów przemian, tj. CO₂ i H₂O.

Zalety bioremediacji

Technologia bioremediacji jest metodą polecaną do szerokiego stosowania w walce z coraz powszechniejszym problemem skażeń wód i gruntów związkami ropopochodnymi. Sprawdza się ona w różnych warunkach pogodowych i w zróżnicowanych formacjach geologicznych [9].

Coraz większą swą popularność technologia bioremediacji zawdzięcza posiadanym zaletom [6]:

- jest ekonomiczna (tańsza niż stosowane dotychczas metody oczyszczania wód i gruntów),
- proces likwidacji skażenia może być prowadzony *in situ* (w miejscu skażenia, bez konieczności przemieszczania gruntu),
- grunt nadaje się do użytku bezpośrednio po przeprowadzeniu procesu oczyszczania,
- w procesie likwidacji skażenia nie są wytwarzane szkodliwe związki wydzielane do gruntu, wód i atmosfery (bakterie rozkładają składniki zanieczyszczeń do – obojętnych dla środowiska – dwutlenku węgla i wody),
- technologia ta nie wymaga stosowania kosztownej i skomplikowanej aparatury,

- metoda nie wymaga wprowadzenia do środowiska przyrodniczego żadnych związków chemicznych, które mogłyby wchodzić w reakcje, czy też ulegać akumulacji w glebie; proces jest ekologiczny.

Wymienione zalety technologii bioremediacji sprawiają, że jest to technologia bezkonkurencyjna w porównaniu z tradycyjnymi metodami oczyszczania gruntu, szczególnie w przypadku, gdy mamy do czynienia z dużymi obszarami skażonego terenu, gdzie zastosowanie technik związanych z przemieszczaniem gruntu jest niemożliwe ze względu na skalę zjawiska. Ocena powodzenia prac biodegradacji w terenie jest znacznie trudniejsza niż w badaniach laboratoryjnych. Dostępność węglowodorów naftowych dla komórek mikroorganizmów (biodostępność) zależy od różnych czynników: fizycznych (struktury gleby, rozmiaru porów), chemicznych (adsorpcji, niskiej rozpuszczalności) i mikrobiologicznych (budowy osłon komórkowych). Wpływają one zarówno na transport tych związków, jak i migracje mikroorganizmów w glebie. Problem nadal do końca nie jest rozwiązany, dlatego też wymaga dalszych badań [30].

Otrzymywanie handlowego sorbentu i jego działanie

Mech *Spagnum moss* poddawany jest wielokrotnej obróbce termicznej w zakładzie przetwarzającym. Czyn-

ności te mają na celu zmianę właściwości sorpcyjnych tak, aby mogła zachodzić absorpcja węglowodorów. W czasie

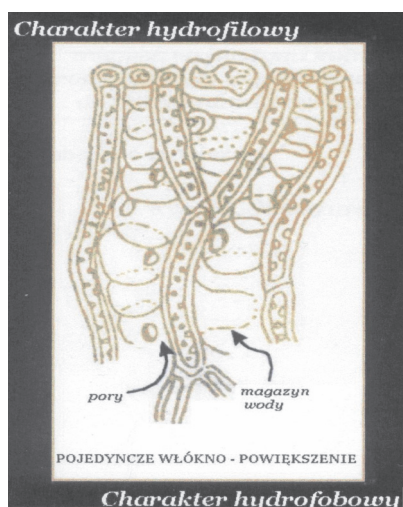
obróbki termicznej komórka mchu zmienia stan z hydrofilowego na hydrofobowy (rysunek 1) i dzięki temu możliwa jest absorpcja węglowodorów. Znajdujące się w komórce mchu kwasy humusowe reagują z węglowodorami, a następnie bakterie, dla których węglowodory stanowią pożywkę, zaczynają ich rozkład. Metabolizm, który węglowodory wykorzystują jako jedyne źródło węgla i energii, pozwala na ich pełną biodegradację. Produktem końcowym tego procesu jest humus [13]. Na rysunkach 2 i 3 zaprezentowano mech *Spagnum moss* po wielokrotnej obróbce termicznej – kolorem czerwonym zaznaczono miejsca pustych komórek, które przed procesem były wypełnione wodą (rysunek 2).

Naturalny sorbent stosuje się m.in. na twardym gruncie – rozsypany na powierzchni rozlewu, po pewnym czasie (około 1–3 miesięcy) przywraca on równowagę biologiczną gruntu.

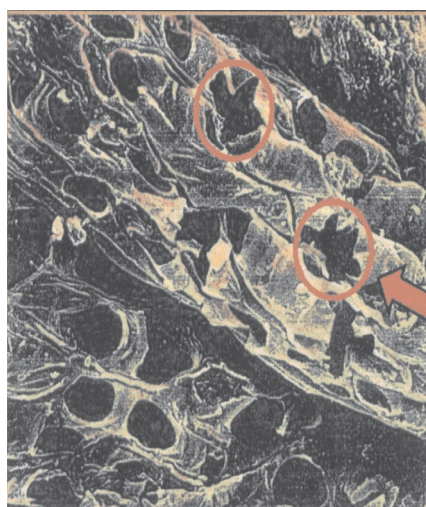
Przywrócenie równowagi biologicznej na skażonym gruncie w czasie trzech miesięcy jest bardzo szybką i skuteczną metodą likwidacji skażeń ropopochodnych.

W związku z powyższym, do badań bioremediacji wykorzystano m.in. naturalny, w 100% organiczny, przetestowany i laboratoryjnie sprawdzony przemysłowy adsorbent *Spagnum moss*. Według informacji podanej przez producenta, jest on ekonomiczny, skuteczny, nietoksyczny, nie ociekający i co najważniejsze – biodegradowalny w środowisku naturalnym. Charakterystyczne zdolności kapilarne tego adsorbenta pozwalają na wnikanie produktu ropopochodnego do jego wnętrza, a jego właściwości sorpcyjne umożliwiają absorpcję benzyn, nafty, olejów napędowych i olejów odpadowych, czyli wszystkich produktów ropopochodnych powodujących najczęstsze skażenia gleby [23].

Wychodząc z powyższych przesłanek postanowiono przeprowadzić badania własne nad zastosowaniem sorbentów do likwidacji skażeń gruntowych produktami ropy naftowej w połączeniu z biopreparatem, w celu intensyfikacji procesu bioremediacji. Celem badań było określenie przydatności sorbentu *Spagnum moss* w procesie biodegradacji wspomaganym biopreparatem.



Rys. 1. Struktura mchów *Spagnum moss* podczas obróbki termicznej (pojedyncze włókno) [23]



Rys. 2. Struktura mchów *Spagnum moss* po wielokrotnej obróbce termicznej [23]



Rys. 3. *Spagnum moss* po wielokrotnej obróbce termicznej – gotowy produkt (zdjęcie własne)

Materiały i metodyka badań

Eksperyment przeprowadzono w dwóch etapach, wykorzystując glebę uniwersalną o składzie: torf wysoki, ziemia próchnicza, kora sosnowa, piasek i glina (pH = 6,5).

Do gleby wprowadzono zużyty olej silnikowy, o charakterystyce fizykochemicznej:

- wskaźnik lepkości: 84,0,
- gęstość: 0,90 g/cm³.

Proces bioremediacji był poprzedzony zastosowaniem sorbentów, co miało na celu zapobieganie migracji oleju

w głąb gleby. Użyte sorbenty zostały losowo wybrane z dostępnej na rynku gamy. Należały do nich: mata sorpcyjna oraz diatomity – czysty i bezpieczny produkt naturalny, obojętny chemicznie wobec wszystkich cieczy (z wyjątkiem kwasu fluorowodorowego). Zastosowano diatomit A-1850 – o drobnym uziarnieniu oraz diatomit B-1030 – granulatu gruboziarnisty.

Dodatkowo do badań został użyty sorbent *Spagnum moss* (mech o charakterystycznych zdolnościach kapilar-

nych, pozwalający na wnikanie produktu ropopochodnego do jego wnętrza). Cały proces był wspomagany biopreparatem służącym do biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, zawierającym enzymy, bakterie, aktywatory biologiczne, nośniki i substancje stabilizujące.

W celu przeprowadzenia doświadczenia sporządzono dziewięć próbek gleby, zawierających odpowiednio 2% i 8% (*m/m*) przepracowanego oleju silnikowego oraz wybrany sorbent. Próbką zawierającą czystą, niezaolejoną glebę stanowiła próba odniesienia. Dla każdego stężenia przepracowanego oleju przygotowano zestaw, który zawierał po cztery próbki różniące się zastosowanym sorbentem i próbkę bez sorbentu. Stosunek sorbentu do badanego gruntu wynosił 1:2. Doświadczenie przebiegało bez dodatku zewnętrznego źródła mikroorganizmów.

Tablica 1. Charakterystyka badanych próbek

Numer próby	Gleba
P1	+ 2% oleju silnikowego
P2	+ 2% oleju silnikowego + sorbent <i>Spagnum moss</i>
P3	+ 2% oleju silnikowego + sorbent A-1850
P4	+ 2% oleju silnikowego + sorbent B-1030
P5	+ 2% oleju silnikowego + mata sorpcyjna
P6	+ 8% oleju silnikowego + sorbent <i>Spagnum moss</i>
P7	+ 8% oleju silnikowego + sorbent, mata sorpcyjna
P8	+ 8% oleju silnikowego + sorbent A-1850
P9	+ 8% oleju silnikowego + sorbent B-1030

Przygotowane próbki przetrzymywano w temperaturze 20–23°C przez 5 tygodni. W celu wzbogacenia gleby skażonej produktami naftowymi w azot i fosfor, czyli pierwiastki niezbędne do produkcji białek i kwasów nukleinowych, dodawano związki chemiczne: K_2HPO_4 , $Ca(NO_3)_2$ oraz $(NH_4)_2SO_4$ – w ilości pozwalającej uzyskać stosunek pierwiastków biogenych C:N:P = 100:10:1, zgodnie ze wskazaniami Zamorskiej i in. [31]. Próbki były napowietrzane za pomocą pompy perystaltycznej, dla utrzymania warunków tlenowych. Zapotrzebowanie na tlen, zgodnie z danymi literaturowymi, wynosiło około 3 kg O_2 /kg węglowodorów [4]. Pomiaru tlenu dokonywano przy użyciu uniwersalnego tlenomierza. W czasie przebiegu badań kontrolowano pH badanych próbek, które utrzymywane było w granicach 7–8,5. Korektę odczynu prowadzono stosując $Ca(OH)_2$. Wilgotność materiału badawczego utrzymywano w granicach 28–40% (zraszanie wodą wodociągową). Pomiar wilgotności gleby był określany jako stosunek masy wody zawartej w glebie do masy fazy

stałej gleby (masy po wysuszeniu w temp. 105°C). Próbkę pobierano w wyznaczonych odstępach czasu (0–35 dni), ekstrahowano gorącą wodą i dokonywano porównywania wielkości plamy oleju.

Przyjęta prosta metoda analityczna miała na celu wyodrębnienie spośród użytych sorbetów tych, o najlepszej skuteczności absorbowania substancji ropopochodnych z gleby.

Drugi etap badań obejmował bioremediację gleb skażonych substancjami ropopochodnymi. Proces był wspomagany biopreparatem.

Do dalszych badań wybrano próbki o wysokim początkowym stężeniu substancji ropopochodnej. Nie uwzględniano w dalszych badaniach działania produktu diatomit B-1030, ponieważ jego skuteczność sorpcyjna nie była na zadowalającym poziomie.

Eksperyment przeprowadzono w trzech układach, w warunkach optymalnego wzrostu mikroorganizmów, według zaleceń Zamorskiej i in. [31]. Parametry: temperatura, pH, wilgotność, zapotrzebowanie na tlen oraz wzbogacenie gleby w pierwiastki biogenne – pozostały takie same jak w części I badań. Badania prowadzono przez 5 tygodni. W tym czasie co 7 dni dodawano, poprzez zraszanie prób, kolejne porcje biopreparatu o stężeniu 0,1 g/dm³. Następnie zbadano ubytek substancji ropopochodnych, w zależności od stężenia przepracowanego oleju silnikowego zawartego w glebie oraz rodzaju użytego sorbentu. Analizę przeprowadzono techniką chromatografii gazowej z ekstraktów (kilkakrotnie przemywając próbkę świeżymi porcjami rozpuszczalnika i wytrząsając je [5, 21]) n-heksanowych i n-pentanowych. Oznaczanie BTEX (benzen, toluen, etylobenzen, ksylene) było wykonane zgodnie z normą PN-89/C-04641. Wyznaczono też sumę substancji ropopochodnych C_7 – C_{30} przez ekstrakcję n-heksanem według PN-C-04643.

W końcowym etapie badań podjęto próby dezaktywacji zaolejonych sorbentów. W tym celu zebrany wcześniej z powierzchni gleby sorbent został wzbogacony przez biopreparat i pozostawiony na 1 miesiąc. W tym czasie sorbenty były przechowywane w temperaturze 20–23°C i okresowo napowietrzane za pomocą pompki perystaltycznej, w celu zapewnienia mikroorganizmom odpowiedniego stopnia natlenienia. Po upływie 30 dni oceniano ubytek masy sorbentu metodą wagową. Zasada oznaczania zawartości suchej masy polegała na wysuszeniu próbki sorbentu w suszarce i jej zważeniu. Sucha masa stanowiła pozostałość po wysuszeniu. Zawartość suchej masy wyznaczono z różnicy masy świeżego sorbentu i zawartości wody. Ponadto określano liczebność mikroorganizmów w poszczególnych

próbkach (tablice 4 i 5), poprzez wykonywanie posiewów ilościowych na płytki Petriego z agarem wzbogaconym i podłożem Sabourauda (Biomed), odpowiednio w celu

zbadania ogólnej liczebności drobnoustrojów oraz pleśni i drożdży. W badaniach mikrobiologicznych zastosowano metodę dziesięciokrotnych rozcieńczeń [17].

Wyniki i omówienie badań

W pierwszym etapie badań, który trwał 35 dni, nastąpiła absorpcja zawartych w glebie węglowodorów przez zastosowane sorbenty. Po tym okresie badaną glebę poddano ekstrakcji gorącą wodą. Wyniki ubytku substancji ropopochodnych – oceniane na podstawie pomiaru wielkości plamy, w zależności od stężenia substancji ropopochodnej, rodzaju użytego sorbentu i czasu ekspozycji prób – przedstawiono na rysunku 4. Z przeprowadzonych wstępnych badań wynika, że najlepsze właściwości sorpcyjne posiadał sorbent naturalny *Spagnum moss* (P2). Rozmiar plamy oleju po upływie 3 dni był najmniejszy dla sorbentu naturalnego *Spagnum moss*, a najmniej skuteczny okazał się sorbent diatomit-1030, dla którego przy 8% stężeniu węglowodorów ropopochodnych zawartych w glebie plama oleju zmniejszyła się o 2% dopiero po upływie tygodnia. Z przedstawionych wyników można wnioskować, że największy ubytek substancji ropopochodnych zachodzi w pierwszych dniach użycia sorbentu. W kolejnych tygodniach analizy wykazywały cały czas obecność substancji ropopochodnych w glebie. Można przypuszczać, że w późniejszym czasie proces przebiega bardzo powoli albo zostaje zatrzymany, gdyż sorbenty są już przesycone substancją ropopochodną.

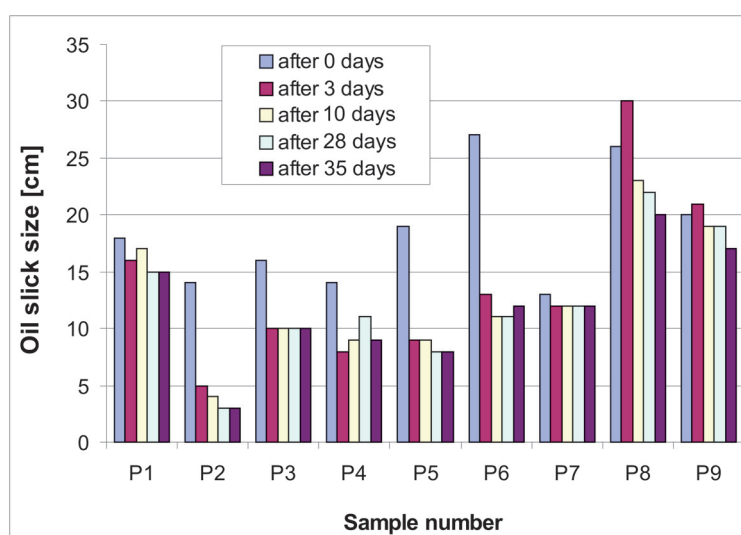
Stwierdzono również, że stosunek sorbentu do zaolejonej gleby był niewystarczający, ponieważ z gleby nie wyeliminowano całkowicie substancji ropopochodnych, co przedstawiono na rysunku 4.

Wyniki bioremediacji gleb skażonych substancjami ropopochodnymi (II etap badań), dokonane poprzez analizę zawartości substancji ropopochodnych C_7-C_{30} mg/kg s.m., przedstawiono na rysunku 5. Współczynnik kierunkowy prostej w równaniu linii regresji określa szybkość zmian zawartości węglowodorów C_7-C_{30} w czasie trwania procesu bioremediacji. Ujemna wartość tego współczynnika oznacza spadek, a dodatnia – wzrost zawartości węglowodorów. Wyznaczając zależność tego współczynnika od ilości sorbentu można określić optymalny stosunek stężenia węglowodorów do minimalnej

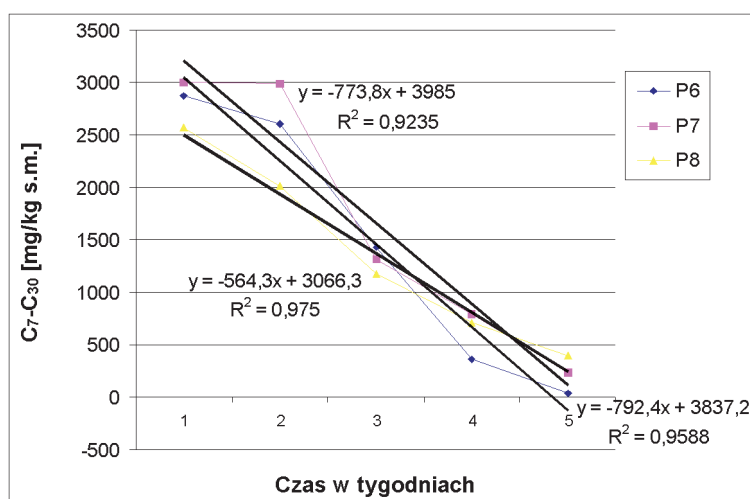
ilości użytego sorbentu, przy której następuje efektywny spadek zawartości węglowodorów.

Uzyskane wyniki świadczą, że największy spadek stężenia węglowodorów C_7-C_{30} otrzymano dla sorbentu *Spagnum moss* i maty sorpcyjnej; odpowiednio o 94% i 78%.

Współczynnik korelacji dla wszystkich trzech funkcji $y_1 = f(x)$ jest za niski (dla $n = 5$, współczynnik $R \geq 0,99$), czyli nie można powiedzieć, że występuje liniowa zależność $y(x)$. Należy więc wykonać dodatkowe pomiary w innych lub w tych samych punktach (zageścić pomiary, powtórzyć wątpliwe lub/i rozszerzyć zakres pomiarowy).

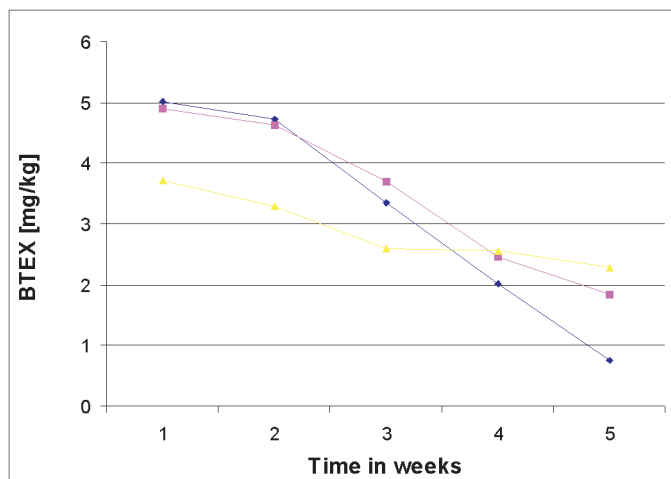


Rys. 4. Rozmiar plamy oleju badanych prób



Rys. 5. Zmiana stężenia substancji ropopochodnych w procesie bioremediacji

Natomiast przedstawione na rysunku 6 wyniki zmian stężenia BTEX [mg/kg s.m.] wskazują, że ubytek stężenia BTEX dla poszczególnych próbek wynosił od 49% do 75%. Największy spadek stężenia węglowodorów aromatycznych uzyskano dla próbki P6, gdzie do remediacji gleby wykorzystano sorbent naturalny *Spagnum moss*.



Rys. 6. Zmiana stężenia węglowodorów aromatycznych w procesie bioremediacji

Ostatni etap badań obejmował wykorzystanie mikrobiologicznych metod dezaktywacji zaolejonych sorbentów. Badania oparte były na intensyfikacji procesu rozkładu zużytych sorbentów, poprzez zastosowanie odpowiednio dobranych i przygotowanych zespołów współdziałających ze sobą mikroorganizmów – biocenozy, w formie biopreparatu. Biocenozy, zwane biopreparatami, są kompozycjami drobnoustrojów o określonym składzie. Do badań użyto 5-proc. nadmiar biopreparatu, który charakteryzował się szybką likwidacją skażeń ropopochodnych w gruncie, wodach gruntowych i na nawierzchniach betonowych.

Analizie poddano zużyte sorbenty z pierwszego etapu badań: mchy *Spagnum moss*, diatomit-1850 i matę sorpcyjną. Masy badanych sorbentów porównano metodą wagową (tablica 2) oraz określano liczebność mikroorganizmów w poszczególnych próbkach (tablice 3 i 4).

Na podstawie przedstawionych wyników (tablica 3) można stwierdzić, że nastąpiła częściowa utylizacja zużytego sorbentu naturalnego *Spagnum moss*, o czym świadczy spadek jego masy. Pozostałe sorbenty nie zmniejszyły swojej masy. Największy rozwój bakterii oraz pleśni i drożdży; uwzględniając początek, jak również 30-dniowy czas trwania procesu bioremediacji, następował przy zastosowaniu mchów. Ponadto, wraz z upływem procesu dezaktywacji liczebność badanych drobnoustrojów zwiększała się. Znacz-

nie niższe namnożenie bakterii, pleśni i drożdży uzyskano dla diatomitu A-1850, w porównaniu ze *Spagnum moss*. Przy wykorzystaniu do badań maty sorpcyjnej, na początku trwania procesu bioremediacji rozwój drobnoustrojów był najmniejszy (w odniesieniu do pozostałych sorbentów). Po upływie 30 dni nie stwierdzono namnażania się bakterii, zaś na powierzchni maty sorpcyjnej pojawiły się kolonie pleśni (głównie *Aspergillus niger*) oraz wyczuwano nieprzyjemny zapach, co mogło świadczyć o zatrzymaniu procesu bioremediacji, a rozwijaniu się procesów gnilnych.

Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że podczas procesu bioremediacji zaszła reakcja rozkładu produktów naftowych, z wydzieleniem wody i ditlenku węgla.

Dane literaturowe wskazują na to, że produkty pośrednie wstępnych reakcji utleniania są włączane do dalszych przemian metabolicznych komórek, co prowadzi do powstawania produktów końcowych: CO₂ i H₂O. Uwolniona przy tym energia może być wykorzystana przez bakterie do prowadzenia podstawowych procesów życiowych – wzrostu, syntezy i podziału komórkowego [17, 18].

Jak wynika z dotychczasowych doświadczeń [10, 13, 28, 30, 32], zastosowanie metod biotechnologicznych sta-

Tablica 2. Ubytek masy sorbentu w procesie dezaktywacji

Czas ekspozycji [doby]	Masa 10 cm ³ sorbentu [mg s.m.]		
	<i>Spagnum moss</i>	diatomit A-1850	mata sorpcyjna
0	4,453	6,121	5,822
30	2,465	5,737	5,839

Tablica 3. Liczebność drobnoustrojów na początku procesu bioremediacji

Badany parametr [cfu/g s.m.]	Próbka		
	<i>Spagnum moss</i>	diatomit A-1850	mata sorpcyjna
Bakterie	1,6 × 10 ⁷	1,1 × 10 ⁵	5,3 × 10 ³
Pleśnie i Drożdże	9,0 × 10 ⁶	9,9 × 10 ⁵	6,4 × 10 ³

Tablica 4. Liczebność drobnoustrojów po 30 dniach trwania procesu bioremediacji

Badany parametr [cfu/g s.m.]	Próbka		
	<i>Spagnum moss</i>	diatomit A-1850	mata sorpcyjna
Bakterie	1,0 × 10 ¹⁰	5,0 × 10 ⁶	0
Pleśnie i Drożdże	8,0 × 10 ⁹	3,0 × 10 ⁶	1,0 × 10 ⁶

nowi najbardziej racjonalny sposób oczyszczania gruntów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi, a w wyniku tego procesu, przy odpowiednich warunkach i dodatku odpowiednich szczepów mikroorganizmów, następuje eliminacja użytego sorbentu.

Z danych literaturowych wynika, że najlepiej i najłatwiej przebiegającym procesem jest biodegradacja prostołańcuchowych alkanów. Decydujące znaczenie ma dostarczenie tlenu cząsteczkowego, który warunkuje w ten sposób szybkość reakcji. Innemu mechanizmowi biodegradacji podlegają związki alicykliczne, które nie posiadają terminalnych grup metylowych. Mechanizm ten podobny jest do utleniania subterminalnego alkanów. Przykładem może być tutaj cykloheksan, który pod wpływem enzymu oksydazy, wytwarzanej między innymi przez bakterie *Pseudomonas* oraz promieniowce z rodzaju *Nocardia*, jest utleniany do alkoholu alicyklicznego (cykloheksanolu), gdzie w wyniku odwodornienia powstaje keton (cykloheksanon). Produktem utleniania tej reakcji jest kwas dwukarboksylowy, metabolizowany następnie w procesie β -oksydacji [29].

Węglowodory aromatyczne zostały szeroko przebadane pod kątem możliwości biodegradacji. Stwierdzono, że około 100 gatunków mikroorganizmów, reprezentujących ich 30 rodzajów, jest zdolnych do rozkładu węglowodorów. Ich liczebność jest różna i charakterystyczna dla poszczególnych ekosystemów wodnych i glebowych [11].

Poszczególne mikroorganizmy są w stanie metaboli-

zować ograniczony rodzaj węglowodorów. Stosunkowo najwięcej z nich zdolnych jest do biodegradacji węglowodorów alifatycznych oraz aromatycznych. Do rozkładu układów takich jak ropa naftowa zdolne są głównie mieszane kultury drobnoustrojów, o złożonym wyposażeniu enzymatycznym [20]. Szlaki ich biochemicznego rozkładu są bardzo różne – dla niektórych typów związków ograniczają się do kilku reakcji, dla innych są bardzo rozbudowane.

Biodegradacja węglowodorów aromatycznych czy pestycydów jest w wielu przypadkach procesem skomplikowanym, przebiegającym z udziałem kilku różnych mikroorganizmów, współpracujących w procesach współmetabolicznych [14].

Prowadzone wstępne badania potwierdziły, że proces bioremediacji gruntów skażonych produktami naftowymi jest wysoce efektywny. Celowym jest stosowanie preparatów mikrobiologicznych do stymulacji procesu bioremediacji. Dobre efekty można uzyskać poprzez wprowadzenie zarówno szczepów autochtonicznych, jak i obcych – odpowiednio przystosowanych. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wykorzystanie szczepów rodzimych (autochtonicznych) jest bezpieczniejsze. Z ekologicznego punktu widzenia stosowanie metod biologicznych jest nie tylko skuteczne i ekonomiczne, ale także daje możliwość szybszego przywrócenia pierwotnej funkcji gleby po zakończeniu procesu remediacji.

Wnioski

Metoda bioremediacji może być konkurencyjna dla innych metod stosowanych przy oczyszczaniu gleby z produktów ropopochodnych. Aby uniknąć przenikania tych substancji do gleby zasadne wydaje się być używanie w pierwszym etapie remediacji sorbentów. Z dostępnych na rynku sorbentów godnym uwagi jest sorbent *Spagnum moss* oraz mata sorpcyjna. Posiadają one dobre właściwości sorpcyjne, co potwierdził pierwszy etap badań. Użycie tych sorbentów umożliwiło efektywny spadek zawartości węglowodorów C_7 – C_{30} w glebie, przy czym największy ubytek stężenia BTEX stwierdzono przy zastosowaniu mchów *Spagnum moss*. Największy ubytek substancji ropopochodnych następuje w pierwszych dniach użycia sorbentów. Dobrze dobrany biopreparat może być skutecznym narzędziem przyspieszającym proces bioremediacji

oraz może być wykorzystywany do procesu utylizacji zużytych sorbentów – co potwierdził kolejny etap badań. Sorbent *Spagnum moss* uległ częściowej utylizacji (w wyniku reakcji: sorbent + PN + biopreparat \rightarrow CO_2 + H_2O + biomasa; zmniejszył swoją masę), a pozostałe sorbenty (mata sorpcyjna, diatomit-1850) nie zmniejszyły swojej masy, co może dowodzić, że w trakcie trwania procesu utylizacji nie powstawały produkty gazowe takie jak CO_2 . Badania wykazały, że najlepsze efekty rekultywacji skażonej gleby uzyskano po zastosowaniu sorbentu naturalnego *Spagnum moss* w połączeniu z biopreparatem. Można zatem stwierdzić, że proces bioremediacji gruntów skażonych produktami naftowymi daje dobre efekty, pozwalające je wykorzystać w badaniach *in situ*, dzięki czemu można ograniczyć koszty procesu.

Artykuł nadesłano do Redakcji 1.04.2010 r. Przyjęto do druku 23.06.2010 r.

Recenzent: doc. dr Michał Krasodomski

Literatura

- [1] Aidberger H., Hasinger M., Braun R., Loibner A.P.: *Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil*. Biodegradation, 16, s. 115–125, 2005.
- [2] Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.: *Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation*. Bioresource Technology, 96, s. 1049–1055, 2005.
- [3] Bocheński C., Bocheński A.: *Ocena zasobów ropy naftowej i perspektywy jej substytucji biopaliwami*. Motrol, 10, s. 23–30, 2008.
- [4] Bogan B.W., Sullivan W.R.: *Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil*. Chemosphere, vol. 52, p. 1717–1726, 2003.
- [5] De Jonie H., Freijer J.I.: *Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils*. Environ. Sci. Technol., 1997.
- [6] Dua M., Singh A., Suthunathan N., Johri A.K.: *Biotechnology and bioremediation: successes and limitations*. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 59, p. 143–152, 2002.
- [7] Feitkenhauer H., Schnicke S., Muller R., Markl H.: *Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile Bacillus themeovorans sp. A2*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 2001.
- [8] Kaliski M., Szurlej A.: *Perspektywiczne segmenty krajowego rynku gazu ziemnego*. Wiertnictwo Nafta Gaz, t. 25, z. 2, s. 349–358, 2008.
- [9] Kasai Y., Takahata Y., Hoaki T., Watanabe K.: *Physiological and molecular characterization of a microbiological community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil*. Environ. Microbiol., vol. 7, p. 806–818, 2005.
- [10] Kaszycki P., Kołozek H.: *Biotechnologie stosowane w odnowie gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi*, s. 41–56, 2004. www.fundacja.org.ar.krakow.pl/pdf/kaszycki%20kolozek%20.pdf
- [11] Kiepuski J.: *Efekty zastosowania kultur bakteryjnych do rozkładu ropopochodnych w istniejących układach środowiskowych*. Inżynieria Ekologiczna, nr 2, Polskie Towarzystwo Inżynierii Ekologicznej, Warszawa, 2000.
- [12] Klimek E., Lebkowska M.: *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [13] Krosowiak K., Śmigielski K., Kwapisz E., Marchut O.: *Remediacja gleby zanieczyszczonej węglowodorami naftowymi*. Scientific Bulletin of the Technical University of Lodz. Food Chemistry and Biotechnology, vol. 72, no. 1029, p. 89–97, 2008.
- [14] Kwapisz E.: *Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej*. Biotechnologia, 2(73), s. 166–168, 2006.
- [15] Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. Wydawnictwo Naukowe PWN, t. 1, Warszawa, 2007.
- [16] Machi R., Abousseoud M., Chaabane T.: *Kinetics of biodegradation of petroleum by Pseudomonas sp.* European Conference on Desalination and the Environment: Water Shortage, Lemesos, Cyprus, 2001.
- [17] Mrozowska J. (praca zbiorowa pod redakcją): *Laboratorium z mikrobiologii ogólnej i środowiskowej*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 1999.
- [18] Nowak A., Hawrot M.: *Izolacja bakterii zdolnych do biodegradacji substancji ropopochodnych ze środowisk naturalnych oraz metodyka oceny ich aktywności*. IV Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-Techniczne I Krajowego Kongresu Biotechnologii: Biotechnologia Środowiskowa, Wrocław, 1999.
- [19] Nowak J.: *Bioremediacja gleb z ropy i jej produktów*. Biotechnologia, 1(80), s. 97–108, 2008.
- [20] Papciak D., Zamorska J.: *Możliwości zastosowania biopreparatu DBC-plus do wspomagania procesów biodegradacji substancji ropopochodnych*. Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska, z. 38, nr 218, s. 95–107, 2004.
- [21] PN-V-04007. *Ochrona gleby przed zanieczyszczeniem. Badanie zawartości ropy naftowej i jej składników*, 1997.
- [22] Prechowiak K., Minta M.: *Biologiczne metody oczyszczania gruntów – bioremediacja (cz. 2)*. Ekopartner, 4, 2000.
- [23] Prezentacja firmy „Spill-Sorb” Pana Roya Long’a. <http://www.spillsorb.com/>
- [24] Różański H.S.: *Oddziaływanie zanieczyszczeń ropopochodnych na gleby*. Ekotoksykologia, medycyna środowiskowa i fitofarmakologia. www.luskiewnik.gower.pl/PRYSZCZE2002.htm
- [25] Siuta J.: *Podstawy biodegradacji ropopochodnych składników w glebach i w odpadach*. I Konferencja Naukowo-Techniczna: Technologie odolejania gruntów, odpadów, ścieków. Wydawnictwo Ekoinżynierii Gorlice – Wysowa Zdrój, 1997.
- [26] Sobczyk E.J.: *Zasoby węgla kamiennego w Polsce a możliwości zaspokojenia potrzeb energetyki*. Polityka energetyczna, t. 11, z. 1, s. 431–449, 2008.
- [27] Surygała J.: *Zanieczyszczenia środowiska człowieka przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, zanieczyszczenia naftowe w gruncie*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2000.
- [28] Szewczyk M., Edel H.G., Schwarz J., Dittmar Ch.: *Remediacja terenów skażonych*. Ekologia przemysłowa, 2, s. 56–58, 2008.
- [29] Sztomka E.: *Biodegradacja oleju napędowego w gruncie*. IV Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-Techniczne I Krajowego Kongresu Biotechnologii: Biotechnologia środowiskowa, Wrocław, 1999.
- [30] Wolicka D., Suszek A.: *Bioremediacja terenów skażonych monopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi*. Gospodarka surowcami mineralnymi, z. 2/3, t. 24, s. 59–66, 2008.
- [31] Zamorska J., Papciak D.: *Usuwanie związków ropopochodnych z gruntu – mikroorganizmy i warunki prowadzenia procesu*. Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska, z. 38, nr 218, s. 159–169, 2004.
- [32] Zborowska E., Kurek M.: *Zastosowanie sorbentów naturalnych i materiałów odpadowych w technologii ochrony środowiska*. Inżynieria i Ochrona Środowiska, t. 11, nr 4, s. 471–490, 2008.
- [33] Zhang Y., Miller R.M.: *Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a Pseudomonas Rhamnolipid Surfactant (Bio-surfactant)*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58, no. 10, p. 3276–3282, 1992.

Dr hab. inż. Adam ŁUKSA – tytuł doktora habilitowanego uzyskał w Moskiewskim Instytucie Przemysłu Naftowego i Gazowego im. I.M. Gubina, na Wydziale Chemiczno-Technologicznym, specjalność: chemiczna przeróbka ropy naftowej i gazu ziemnego. Obecnie profesor Politechniki Radomskiej.

Dr inż. Mariola MENDRYCKA – w roku 1995 ukończyła studia na wydziale Materiałoznawstwa i Technologii Obuwia w Wyższej Szkole Inżynierskiej w Radomiu, a doktorat obroniła w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii w Warszawie w 2001 r. Pracuje na stanowisku adiunkta w Zakładzie Produktów Naftowych Politechniki Radomskiej.

Dr inż. Magdalena STAWARZ – w 1999 roku ukończyła studia na wydziale Materiałoznawstwa i Technologii Obuwia Politechniki Radomskiej, a w 2004 r. obroniła doktorat na Politechnice Warszawskiej. Obecnie pracuje na stanowisku adiunkta w Zakładzie Produktów Naftowych Politechniki Radomskiej.