

Wpływ mieszaniny biosurfaktantów na efektywność bioremediacji gruntu zanieczyszczonego węglowodorami ropopochodnymi

The impact of a mixture of biosurfactants on the efficiency of the bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons

Katarzyna Wojtowicz, Teresa Steliga

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

STRESZCZENIE: W artykule przedstawiono zagadnienia związane z wykorzystaniem biosurfaktantów (związki powierzchniowo czynne pochodzenia naturalnego) w procesie bioremediacji gleb skażonych węglowodorami ropopochodnymi. Badania bioremediacji gleby zanieczyszczonej TPH (suma węglowodorów ropopochodnych) i WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) prowadzono metodą przymowania *ex situ* (skala półtechniczna) w dwóch układach badawczych (układ 1 – badania biodegradacji węglowodorów ropopochodnych na drodze inokulacji biopreparatem, układ 2 – badania biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach na drodze inokulacji biopreparatem zawierającym domieszkę biosurfaktantów). Wykorzystany w badaniach biopreparat opracowano na bazie autochtonicznych bakterii i grzybów, zdolnych do rozkładu węglowodorów ropopochodnych, natomiast roztwór biosurfaktantów składał się z mieszaniny γ -PGA (kwasu γ -poliglutaminowego), ramnolipidów i surfaktyny. Badania bioremediacji prowadzono przez okres 6 miesięcy, monitorując zmiany stężenia TPH i WWA w glebie oraz jej toksyczność co 2 miesiące. W wyniku sześciomiesięcznego procesu oczyszczania uzyskano obniżenie stężenia TPH z 6062,59 mg/kg s.m. do 1774,72 mg/kg s.m. (w układzie 1) i do 768,92 mg/kg s.m. (w układzie 2) oraz WWA z 12,05 mg/kg s.m. do 4,27 mg/kg s.m. (w układzie 1) i do 2,20 mg/kg s.m. (w układzie 2). Zastosowanie domieszki biosurfaktantów w biopreparacie pozwoliło na zwiększenie efektywności biodegradacji TPH o 16,59% oraz WWA o 17,17%. Przeprowadzone analizy toksykologiczne z wykorzystaniem testów Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit™ oraz Microtox®STP wykazały poprawę jakości gleby w wyniku prowadzonej bioremediacji oraz potwierdziły, że wraz ze spadkiem stężenia węglowodorów ropopochodnych maleje negatywny wpływ gleby poddanej biooczyszczaniu na organizmy testowe. Badania prowadzone w dwóch układach pozwoliły na ocenę wpływu biosurfaktantu na efektywność procesu bioremediacji gleby zanieczyszczonej TPH i WWA oraz umożliwiły udoskonalenie stosowanych metod rekultywacji gruntów skażonych ropą naftową.

Słowa kluczowe: biopreparat, bioremediacja, biosurfaktanty, węglowodory ropopochodne.

ABSTRACT: The article presents issues related to the use of biosurfactants (surfactants of natural origin) in the bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. Bioremediation studies were carried out on soil contaminated with TPH (total petroleum hydrocarbons) and PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) using the *ex-situ* pile method (semi-technical scale) in two test systems (system 1 – biodegradation of petroleum hydrocarbons by inoculation with a biopreparation, system 2 – biodegradation of petroleum hydrocarbons by inoculation with a biopreparation containing an admixture of biosurfactants). The biopreparation used in the study was developed on the basis of indigenous bacteria and fungi capable of decomposing petroleum hydrocarbons, while the biosurfactant solution consisted of a mixture of γ -PGA, rhamnolipids, and surfactin. Bioremediation studies were carried out over a period of 6 months, with changes in TPH and PAH concentrations in the soil and its toxicity being monitored every 2 months. As a result of the six-month purification process, the TPH concentration was reduced from 6062.59 mg/kg dry matter (d.m.) to 1774.72 mg/kg d.m. (in system 1) and to 768.92 mg/kg d.m. (in system 2), while PAHs from 12.05 mg/kg d.m. to 4.27 mg/kg d.m. (in system 1) and to 2.20 mg/kg d.m. (in system 2). The addition of biosurfactants to the inoculant allowed to increase the biodegradation effectiveness of TPH by 16.59% and PAH by 17.17% compared to inoculation with the biopreparation alone. Toxicological analyzes carried out using the Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit™ and Microtox®STP tests showed an improvement in soil quality as a result of the bioremediation and confirmed that a reduction in the petroleum hydrocarbons concentration decreased the negative impact of the biotreated soil on the test organisms. Research conducted in the two systems allowed for the assessment of the impact of the biosurfactants on the effectiveness of bioremediation process of soil contaminated with TPH and PAHs and enabled improvement of methods used for the reclamation of crude oil-contaminated soil.

Key words: biopreparation, bioremediation, biosurfactants, petroleum hydrocarbons.

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

Artykuł nadesłano do Redakcji: 12.01.2024 r. Zatwierdzono do druku: 24.04.2024 r.

Wprowadzenie

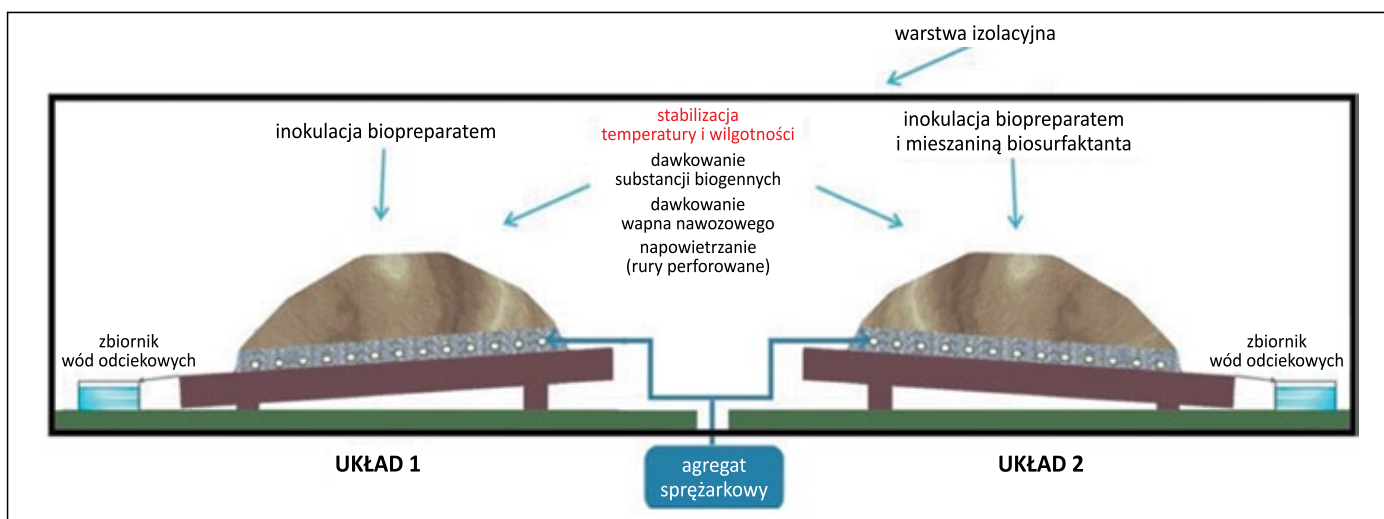
Zanieczyszczenie gleby węglowodorami ropopochodnymi, na przykład w wyniku nieszczelności rurociągów, zbiorników magazynowych, transportu czy skażenia historycznego (obecność dołów urobkowych), jest powszechnym problemem powodującym długotrwałe skutki dla środowiska (Kluk i Steliga, 2017). Rekultywacja gleb skażonych ropą naftową, np. starych dołów urobkowych, należy do kluczowych problemów ekologicznych, przed którymi stoi obecnie przemysł górniczy. Usunięcie zaadsorbowanych zanieczyszczeń ropopochodnych z matrycy glebowej jest zazwyczaj trudne oraz długotrwałe (Steliga et al., 2020; Nikolova i Gutierrez, 2021; Wojtowicz et al., 2022). W przeszłości stosowano różnorodne metody obróbki fizycznej i chemicznej, takie jak spalanie (Gan et al., 2009; Kuppusamy et al., 2017), solidyfikacja (Heidarzadeh et al., 2021), płukanie gleby (Karthika et al., 2016; Janiszewska et al., 2017) czy utlenianie chemiczne (Patel et al., 2020), jednak techniki te wykazują negatywny wpływ na strukturę gleby, autochtoniczną różnorodność biologiczną, a także generują wysokie koszty procesu oczyszczania (Steliga et al., 2020). W związku z powyższym obecnie najczęściej stosowanymi metodami remediacji gruntów są metody biologiczne (Mrozik i Piotrowska-Seget, 2010; Oliver, 2010; Varjani, 2017). Bioremediacja w przeciwieństwie do metod fizycznych i chemicznych charakteryzuje się wysoką skutecznością oczyszczania, brakiem negatywnego wpływu na środowisko oraz stosunkowo niskimi kosztami prowadzenia procesu (Steliga, 2009). Istnieje wiele czynników wpływających na szybkość i stopień degradacji węglowodorów w glebie, takich jak temperatura, wilgotność, napowietrzenie, pH, właściwości gleby (wiek gleby, żyzność, zawartość składników odżywczych) oraz stężenie ksenobiotyku, struktura molekularna zanieczyszczenia i jego biodostępność (Huesemann, 2004; Venosa i Zhu, 2003; Xu et al., 2018; Steliga et al., 2020; Hossain et al., 2022). Optymalizacja tych czynników ma kluczowe znaczenie dla powodzenia bioremediacji. W ostatnich latach w celu zwiększenia efektywności biologicznego oczyszczania gruntów skażonych węglowodorami ropopochodnymi zaczęto stosować tzw. metody kombinowane, łącząc kilka technik remediacyjnych. Wydaje się, że jedną z obiecujących metod kombinowanych jest połączenie inokulacji gleby biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów ropopochodnych z suplementacją biosurfaktantami.

Biosurfaktanty to środki powierzchniowo czynne wytwarzane przez układy biologiczne, głównie mikroorganizmy, takie jak bakterie, grzyby i drożdże. Powstają one jako metabolity wtórne, które są wydzielane przez mikroorganizmy zewnątrzkomórkowo albo przylegają do powierzchni komórek.

Biologiczne środki powierzchniowo czynne zawierają w swojej cząsteczce zarówno ugrupowania hydrofilowe, jak i hydrofobowe (Ward, 2010; Badmus et al., 2021). Amfifilowy charakter biosurfaktantów powoduje ich podział na powierzchniach międzyfazowych, zmianę składu i reologii międzyfazowej, a także zmniejszenie napięć międzyfazowych i zwiększenie powierzchni międzyfazowej (Zajic et al., 1983; Kapellos, 2017). W procesie biodegradacji węglowodorów ropopochodnych suplementacja gleby roztworem biosurfaktantów wpływa głównie na zwiększenie oddziaływań w układzie mikroorganizmy–zanieczyszczenia ropopochodne (Hua i Wang, 2014). Przyjmuje się, że zastosowanie biosurfaktantów w procesie bioremediacji może usprawnić oczyszczanie gleby na dwa sposoby: poprzez zwiększenie biodostępności substratu dla mikroorganizmów lub oddziaływania z powierzchnią komórki, co wpływa na zwiększenie hydrofobowości tej powierzchni. Dzięki temu hydrofobowe związki, do których należą węglowodory ropopochodne, łatwiej adsorbują się na komórkach bakterii, przez co łatwiej mogą ulec rozkładowi (Mulligan, 2009; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Souza et al., 2014). Poza tym zmniejszając napięcia powierzchniowe i międzyfazowe, biosurfaktanty zwiększają powierzchnię nierozpuszczalnych związków, co prowadzi do zwiększenia mobilności i biodostępności węglowodorów. Można oczekiwać zatem, że zastosowanie biosurfaktantów w procesie bioremediacji znacząco wpłynie na efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

Materiał badawczy

W badaniach biodegradacji substancji ropopochodnych wykorzystano glebę, którą pobrano z terenu dołu urobkowego. Oznaczona zawartość TPH w badanej glebie kształtowała się na poziomie 6062,59 mg/kg s.m., z kolei zawartość WWA wynosiła 12,05 mg/kg s.m. Wykonane analizy próbek gleby pod kątem zawartości metali ciężkich nie wykazały przekroczenia dopuszczalnych wartości. Przed przystąpieniem do bioaugmentacji gleba została poddana suplementacji nawozem mineralnym (Azofoska) oraz wapnem nawozowym w celu uzyskania optymalnych warunków rozwoju mikroorganizmów. W zabiegu inokulacji gleby zastosowano biopreparat opracowany w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB składający się ze szczepów bakterii *Dietzia* sp. IN118, *Gordonia* sp. IN101, *Mycolicibacterium frederiksbergense* IN53, *Rhodococcus erythropolis* IN119, *Rhodococcus globerulus* IN113 i *Raoultella* sp. IN109 oraz grzybów *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Candida* sp., *Cladosporium halotolerans*, *Penicillium chrysogenum*. Wszystkie szczepy bakterii i grzybów zostały wyizolowane z gleby (lub dołu urobkowego) skażonej



Rysunek 1. Schemat stanowiska testowego do prowadzenia badań biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach metodą pryzmowania (*ex situ*)

Figure 1. Schematic diagram of the test stand for investigating the biodegradation of petroleum hydrocarbons in soils using the prism method (*ex situ*)

substancjami ropopochodnymi (Wojtowicz et al., 2023). Poza tym w celu zbadania wpływu biosurfaktantów na efektywność biodegradacji TPH i WWA wykorzystano mieszaninę biologicznych środków powierzchniowo czynnych (γ -PGA – kwasu γ -poliglutaminowego, ramnolipidów (95% di-ramnolipid, 5% mono-ramnolipid), surfaktyny) o stężeniu 5 g/dm³.

Metodyka badawcza

Badania biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach skażonych ropą naftową z wykorzystaniem techniki inokulacji biopreparatem lub biopreparatem z domieszką biosurfaktantów prowadzono metodą pryzmowania *ex situ*. Na stanowisku badawczym, składającym się z warstwy izolacyjnej oraz podsypki żwirowej, w której umieszczono perforowane rury doprowadzające sprężone powietrze do stanowiska, zgromadzono skażoną glebę w postaci dwóch pryzm o masie 30 kg. Następnie jedną z pryzm zwilżono wodą (1L) i zainokulowano biopreparatem (2L), natomiast drugą zaszczerpiono biopreparatem (2L) z dodatkiem mieszaniny biosurfaktantów (1L). Pozwoliło to na prowadzenie równoległe badań biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w dwóch układach:

- układ 1 – badania biodegradacji węglowodorów ropopochodnych na drodze inokulacji biopreparatem;
- układ 2 – badania biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach na drodze inokulacji biopreparatem zawierającym domieszkę biosurfaktantów.

Pryzmy przykryto tunelem foliowym, dzięki czemu w układach badawczych utrzymywano temperaturę na poziomie około 17–25°C. Podczas trwającego 6 miesięcy testu bioremediacji

prowadzono monitoring przebiegu biodegradacji TPH i WWA za pomocą analiz chromatograficznych i toksykologicznych. Schemat stanowiska badawczego bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi zamieszczono na rysunku 1.

Monitoring przebiegu bioremediacji

Głównym elementem umożliwiającym określenie efektywności procesu bioremediacji gruntu zanieczyszczonego węglowodorami ropopochodnymi było zbadanie zmian stężenia węglowodorów ropopochodnych (TPH, WWA) w kolejnych miesiącach testu za pomocą analiz chromatograficznych. Analizy TPH wykonywano z wykorzystaniem chromatografu gazowego Clarus 500 firmy PerkinElmer, natomiast analizy chromatograficzne WWA przeprowadzono na wysokociśnieniowym chromatografie cieczowym (HPLC) serii Vanquish Core firmy Thermo Scientific. Analizy chromatograficzne prowadzono zgodnie z procedurami oznaczania TPH i WWA opracowanymi w Zakładzie Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych INiG – PIB (Steliga et al., 2020; Wojtowicz, 2022; Wojtowicz et al., 2022). Ocenę efektywności zabiegów bioremediacyjnych uzupełniono o analizy toksykologiczne. Badania toksyczności gleby prowadzono z wykorzystaniem pakietu trzech testów toksykologicznych: Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit™ oraz Microtox®STP, zgodnie z procedurą producenta. Monitoring przebiegu bioremediacji gleby w badanych układach, obejmujący analizy chromatograficzne i toksykologiczne, prowadzono na próbkach gleb pobieranych z omawianych układów badawczych co 2 miesiące.

Omówienie wyników

Ocena wpływu mieszaniny biosurfaktantów na efektywność biodegradacji TPH i WWA w glebie

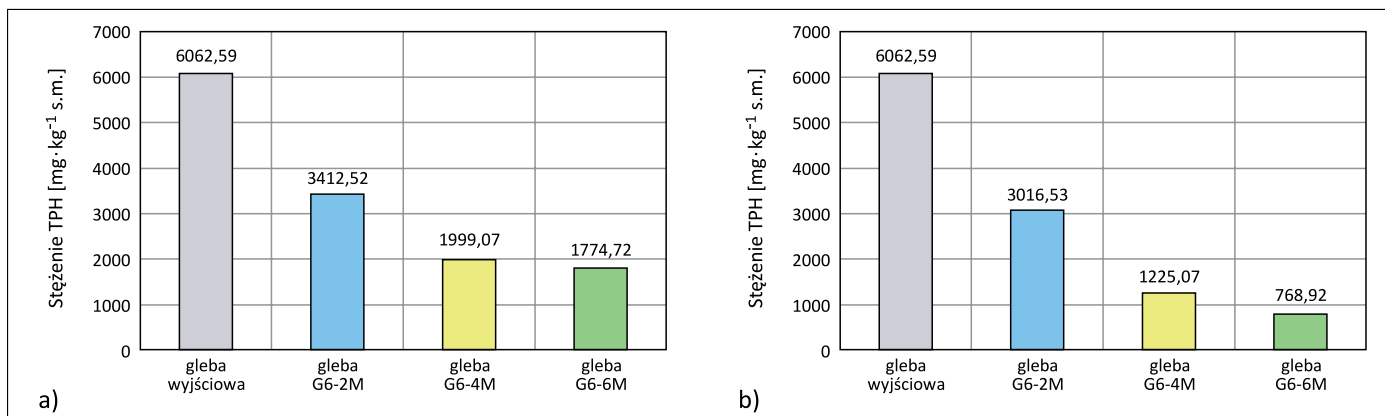
Opracowane metodyki chromatograficznego oznaczania TPH i WWA w glebach umożliwiły zidentyfikowanie poszczególnych n-alkanów oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych. Na podstawie uzyskanych wyników analiz chromatograficznych zbadano efektywność biodegradacji TPH i WWA w skażonej glebie, poddanej zabiegowi inokulacji biopreparatem (układ 1) lub biopreparatem z domieszką biosurfaktantów (układ 2). Pomiarzy prowadzone w dwóch układach badawczych umożliwiły ocenę wpływu mieszaniny biosurfaktantów na szybkość biodegradacji TPH i WWA.

Sumaryczna zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w próbce gleby wyjściowej przeznaczonej do badań bioremediacji wynosiła 6062,59 mg/kg s.m. W wyniku zaszczepienia gleby biopreparatem po 6 miesiącach prowadzenia procesu oczyszczania uzyskano obniżenie stężenia TPH do poziomu 1774,72 mg/kg s.m. (70,73%), natomiast bioaugmentacja biopreparatem z dodatkiem mieszaniny biosurfaktantów spowodowała spadek stężenia TPH w glebie do 768,92 mg/kg s.m. (87,32%). Na rysunku 2 przedstawiono zmianę stężeń TPH w glebie poddanej procesowi bioremediacji w dwóch układach badawczych (pomiar stężenia TPH w glebie prowadzono co 2 miesiące).

12,76% (po 4 miesiącach) oraz 16,59% (po 6 miesiącach) na korzyść inokulacji biopreparatem z dodatkiem biosurfaktantów.

Wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że na skutek inokulacji gleby zarówno samym biopreparatem, jak i biopreparatem z domieszką mieszaniny biosurfaktantów najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C9–n-C21. Zadowalające wyniki biodegradacji uzyskano również dla węglowodorów lekkich (n-C6–n-C9) oraz węglowodorów o długości łańcucha węglowego n-C22–n-C30. Zdecydowanie najgorzej biodegradacji ulegały węglowodory ciężkie zawierające w cząsteczce powyżej 30 atomów węgla. Na rysunkach przedstawiono szczegółowy przebieg biodegradacji węglowodorów alifatycznych w glebie zaszczepionej biopreparatem (rysunek 3) oraz biopreparatem z domieszką biosurfaktantów (rysunek 4).

Analizując przebieg biodegradacji n-alkanów w układach 1 i 2, można zauważyć, że obecność biosurfaktantów w inokulacie najbardziej wpływa na rozkład węglowodorów o długości łańcucha węglowego n-C9–n-C21 oraz węglowodorów lekkich (n-C6–n-C9). Efektywność biodegradacji węglowodorów n-C9–n-C21 i n-C6–n-C9 po zakończeniu procesu oczyszczania była średnio o 18,31% większa w układzie zaszczepionym biopreparatem z dodatkiem biosurfaktantów aniżeli tylko biopreparatem. Stopnie biodegradacji węglowodorów z zakresu n-C22–n-C30 w glebie G6-B6M były wyższe niż w glebie G6-6M o 15,15–18,41%. Zdecydowanie najmniejszy wpływ mieszaniny biosurfaktantów na skuteczność biodegradacji



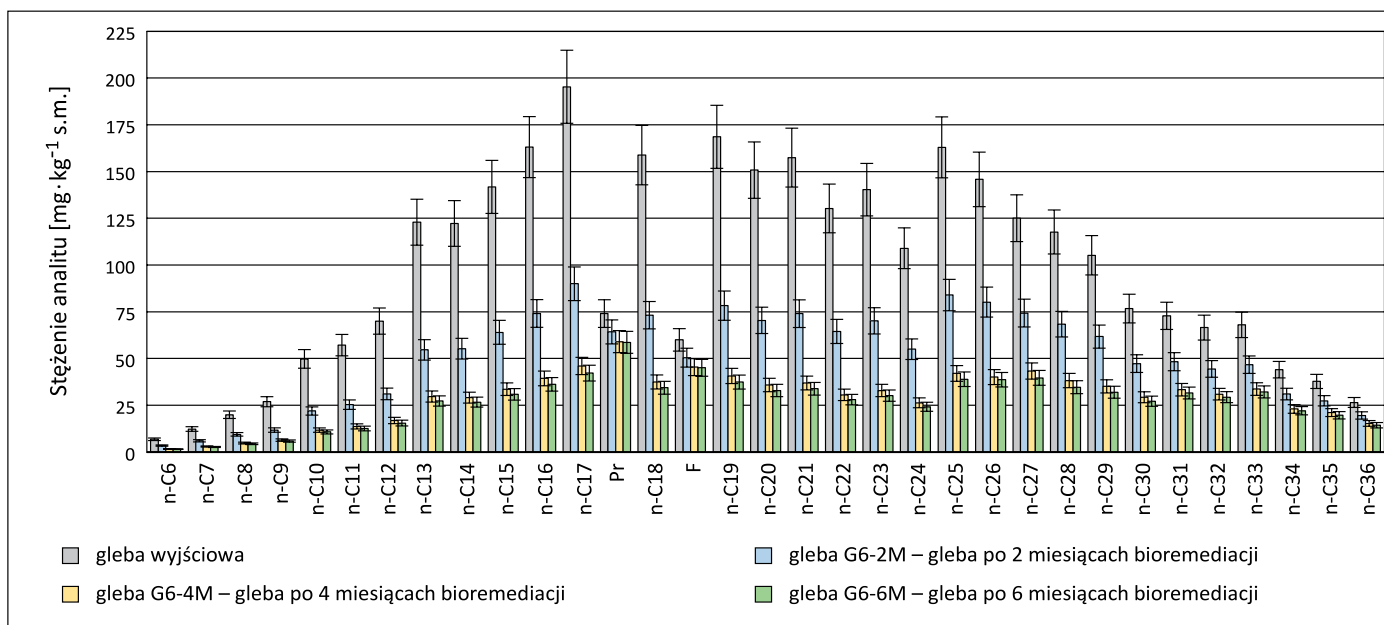
Rysunek 2. Porównanie zmian zawartości TPH w trakcie bioremediacji gleby na drodze a) inokulacji biopreparatem (układ 1), b) inokulacji biopreparatem z domieszką biosurfaktantów (układ 2)

Figure 2. Comparison of changes in TPH content during soil bioremediation by a) inoculation with a biopreparation (system 1), b) inoculation with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant (system 2)

Przeprowadzone badania biodegradacji wykazały, że obecność biosurfaktantów w inokulacie wpływa na wzrost efektywności biodegradacji TPH. Po dwóch miesiącach oczyszczania stopień redukcji TPH w układzie 2 był o 7,00% wyższy aniżeli w układzie 1. W kolejnych miesiącach różnica efektywności biodegradacji TPH w glebie była jeszcze większa i wynosiła

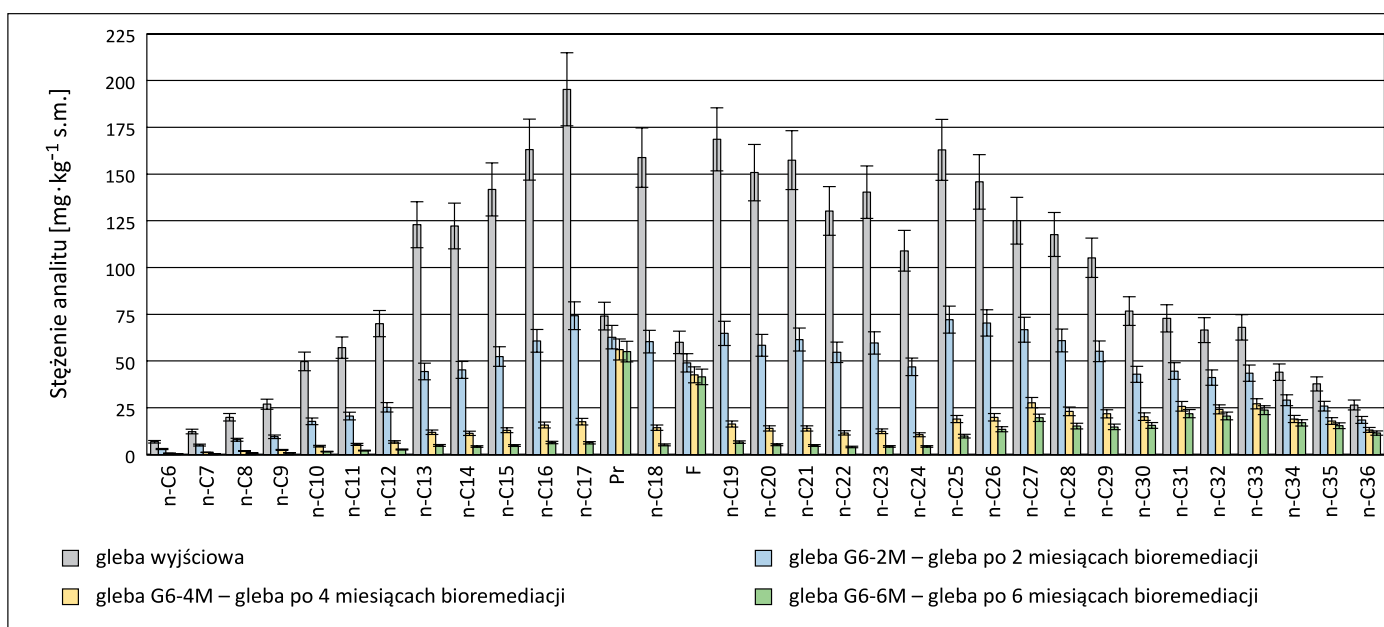
zaobserwowano w przypadku węglowodorów n-C31–n-C36. Obliczone różnice stopni biodegradacji węglowodorów ciężkich w układach 1 i 2 wynosiły średnio 11,84%.

Analogicznie do biodegradacji węglowodorów alifatycznych przebiegała biodegradacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W wyniku przeprowadzonych



Rysunek 3. Zestawienie stężeń n-alkanów w glebie inokulowanej biopreparatem (układ 1)

Figure 3. List of n-alkane concentrations in the soil inoculated with the biopreparation (system 1)

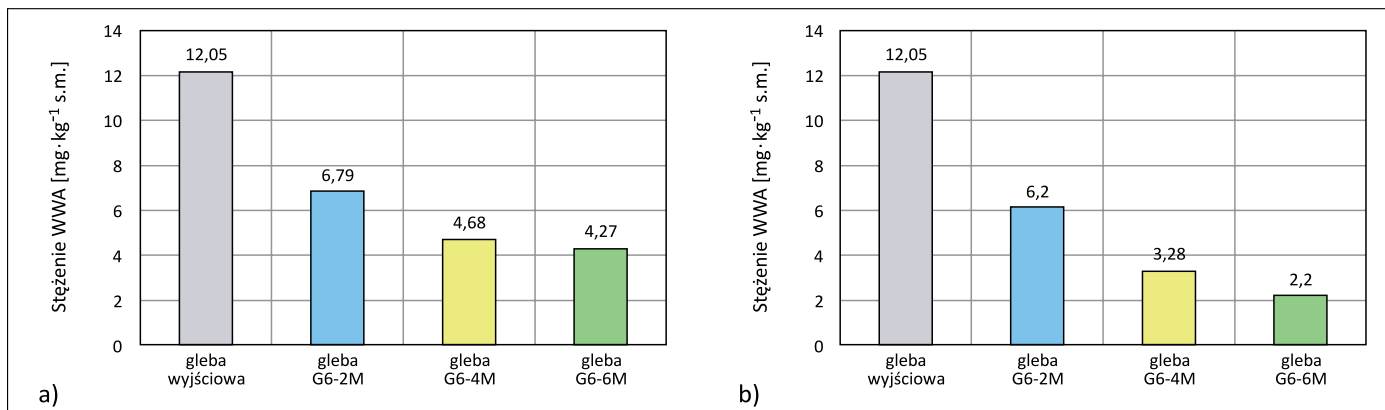


Rysunek 4. Zestawienie stężeń n-alkanów w glebie inokulowanej biopreparatem z domieszką biosurfaktantów (układ 2)

Figure 4. List of n-alkane concentrations in the soil inoculated with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant (system 2)

zabiegów bioremediacji gleby po 6 miesiącach eksperymentu osiągnięto obniżenie stężenia WWA z 12,05 mg/kg s.m. do 4,27 mg/kg s.m. (układ 1) lub do 2,2 mg/kg s.m. (układ 2). Wydajność biodegradacji WWA w glebie G6-6M wynosiła 64,60%, natomiast w glebie G6-B6M: 81,77%. Wynika z tego, że wzbogacenie biopreparatu roztworem biosurfaktantów pozwala na zwiększenie efektywności biodegradacji WWA o 17,17%. Przebieg biodegradacji WWA w glebie inokulowanej biopreparatem oraz biopreparatem z dodatkiem biosurfaktantów przedstawiono na rysunku 5.

Analizy chromatograficzne pod kątem oznaczania WWA w próbkach gleby wykazały, że efektywność biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zależy od liczby pierścieni aromatycznych w cząsteczce. W obydwu układach badawczych najskuteczniej zachodziła biodegradacja naftalenu. Stopnie biodegradacji naftalenu w układzie 1 wynosiły 54,85% (gleba G6-2M), 75,08% (G6-4M) oraz 77,08% (gleba G6-6M), natomiast w układzie 2: 60,94% (gleba G6-B2M), 89,39% (G6-B4M) oraz 97,57% (gleba G6-B6M). Stopnie biodegradacji 3-pierścieniowych WWA i 4-pierścieniowych



Rysunek 5. Porównanie zmian zawartości WWA w trakcie bioremediacji gleby na drodze a) inokulacji biopreparatem (układ 1), b) inokulacji biopreparatem z domieszką biosurfaktantów (układ 2)

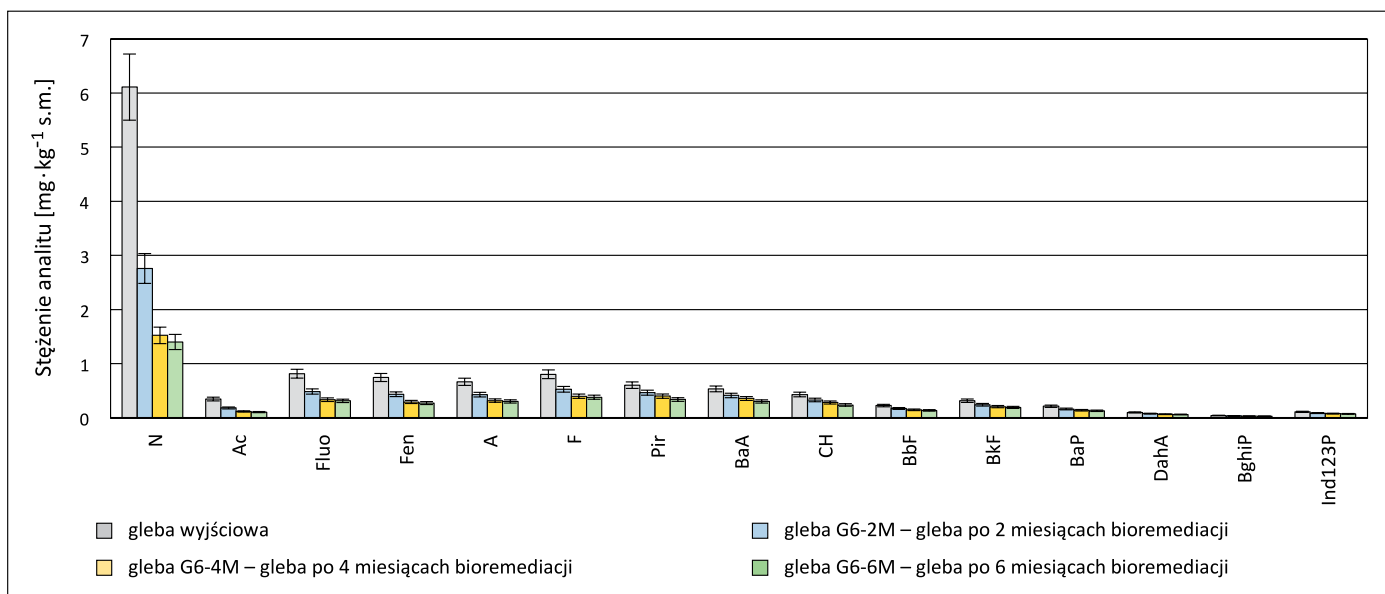
Figure 5. Comparison of changes in PAH content during soil bioremediation by a) inoculation with a biopreparation (system 1), b) inoculation with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant (system 2)

WWA w układzie 1 po zakończeniu eksperymentu zawierały się w granicach odpowiednio 54,54–69,68% i 43,48–52,72%, natomiast w układzie 2 w przedziale 69,04–88,20% (3-pierścieniowe WWA) i 55,04–66,73% (4-pierścieniowe WWA). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zawierające powyżej 4 pierścieni aromatycznych w cząsteczce po 6 miesiącach procesu oczyszczania metodą pryzmowania *ex situ* uległy rozkładowi w 33,83–39,30% (w układzie 1) lub w 42,83–49,75% (w układzie 2). Przeprowadzone analizy chromatograficzne WWA wykazały, że zastosowanie biosurfaktantów w zabiegu inokulacji gleby pozwoliło na zwiększenie efektywności biodegradacji naftalenu o 20,49%, 3-pierścieniowych WWA o 14,50–18,52%, 4-pierścieniowych WWA o 11,93–14,01%, 5-pierścieniowych WWA o 10,42–10,45% oraz 6-pierścieniowych WWA o 9,00–10,14% (po 6 miesiącach). Szczegółowy

przebieg biodegradacji WWA w glebie zaszczerpionej biopreparatem oraz biopreparatem z domieszką biosurfaktantów zamieszczono na rysunkach 6 i 7.

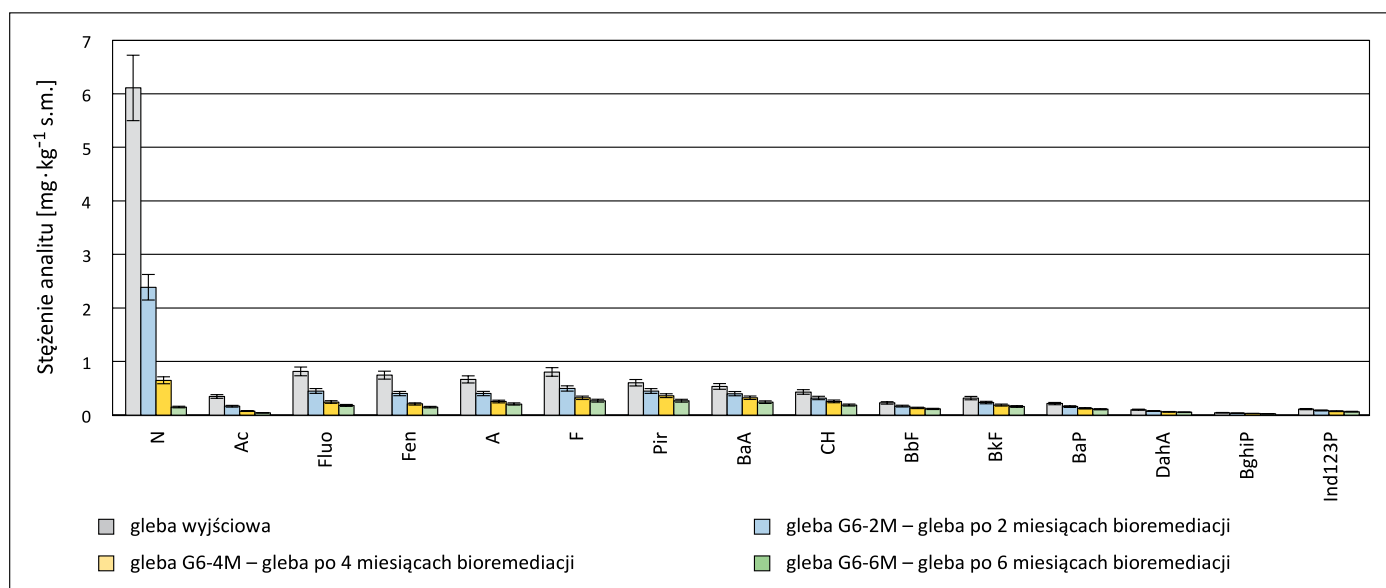
Monitoring toksykologiczny przebiegu bioremediacji w badanych układach

Ocenę skuteczności stosowanych zabiegów bioremediacyjnych uzupełniono o monitoring toksykologiczny, którego celem było określenie wpływu zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH, WWA) oraz pośrednich metabolitów powstających podczas zabiegów remediacyjnych na biocenozę glebową na podstawie przeprowadzonych testów toksykologicznych. Analogicznie do analiz chromatograficznych badania toksykologiczne prowadzono na próbkach gleby pobranych przed procesem oczyszczania – gleba wyjściowa G6, w trakcie oczyszczania



Rysunek 6. Zestawienie stężeń WWA w glebie inokulowanej biopreparatem (układ 1)

Figure 6. List of PAH concentrations in the soil inoculated with the biopreparation (system 1)



Rysunek 7. Zestawienie stężeń WWA w glebie inokulowanej biopreparatem z domieszką biosurfaktantów (układ 2)

Figure 7. List of PAH concentrations in soil inoculated with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant (system 2)

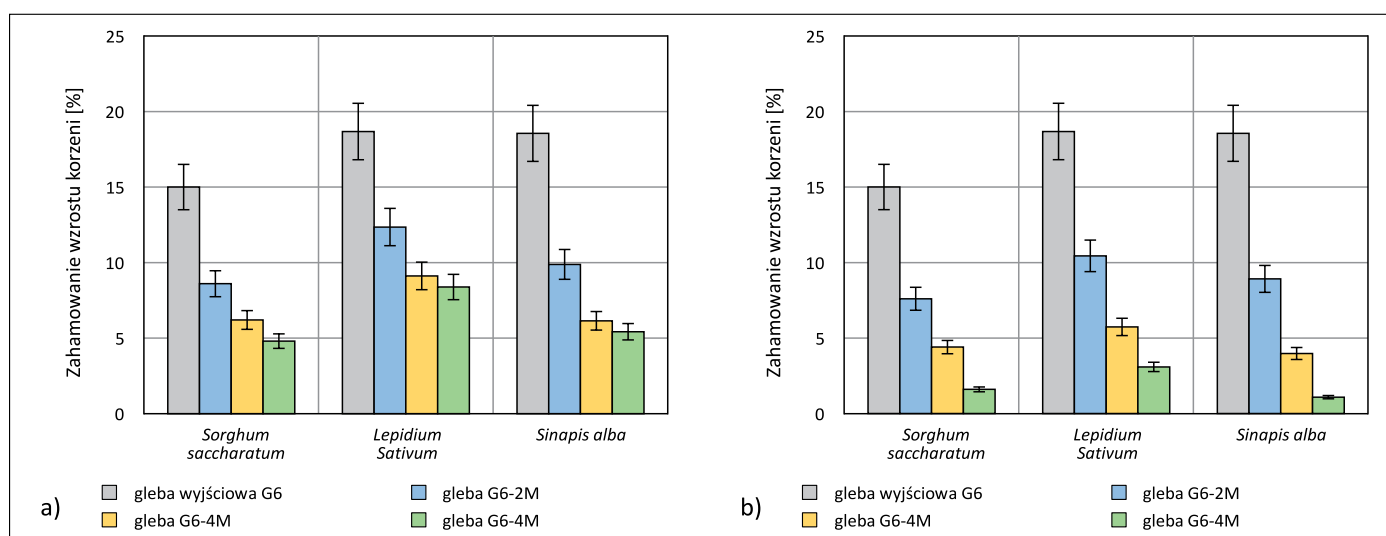
na drodze inokulacji biopreparatem lub biopreparatem z dodatkiem mieszaniny biosurfaktantów (po 2 miesiącach – gleba G6-2M, gleba G6-B2M, po 4 miesiącach – gleba G6-4M, gleba G6-B4M) oraz po zakończeniu eksperymentu – gleba G6-6M, gleba G6-B6M.

Badania fitotoksyczności gleby z wykorzystaniem testu Phytotoxkit™

Badania fitotoksyczności próbek gleby pobranych po 2, 4 i 6 miesiącach bioremediacji metodą bioaugmentacji biopreparatem lub biopreparatem z domieszką biosurfaktantów potwierdziły, że obecność środków powierzchniowo czynnych

pochodzenia biologicznego w inokulacji korzystnie wpływa na poprawę jakości gleby. Sukcesywne obniżanie stężenia węglowodorów ropopochodnych w glebach wpłynęło na spadek zahamowania wzrostu korzeni *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* i *Sinapis alba* w pobranych próbkach gleb (rysunek 8) oraz na wzrost procentowej wartości skielkowania bioindykatorów z 80% (*Sorghum saccharatum*, *Sinapis alba*) i 70% (*Lepidium Sativum*) do 100% (gleby G6-4M, G6-4BM, G6-6M, G6-6BM).

Analiza toksykologiczna z wykorzystaniem testu Phytotoxkit™ wykazała, że w próbkach gleb pobranych z układu 2 korzenie *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* i *Sinapis*



Rysunek 8. Zahamowanie wzrostu korzeni *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* oraz *Sinapis alba* w teście Phytotoxkit™ dla gleby: a) inokulowanej biopreparatem, b) inokulowanej biopreparatem z domieszką biosurfaktantów

Figure 8. Inhibition of root growth of *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* and *Sinapis alba* in the Phytotoxkit™ test for soil a) inoculated with a biopreparation, b) inoculated with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant

alba osiągały większe rozmiary niż w próbkach gleb pobranych z układu 1. W próbce gleby wyjściowej korzenie sorgo, rzeżuchy i gorczycy osiągały długość odpowiednio: 42,5 mm, 55,3 mm i 67,6 mm. W próbce gleby G6-6M długość korzeni sorgo wynosiła 47,6 mm, rzeżuchy 62,3 mm, a gorczycy 78,5 mm. Oznaczone długości korzeni *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* i *Sinapis alba* były większe w próbce gleby pobranej po zakończeniu bioremediacji na drodze bioaugmentacji biopreparatem z dodatkiem biosurfaktantów (gleba G6-B6M) i wynosiły odpowiednio: 49,2 mm, 65,9 mm i 82,1 mm.

Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Ostracodtoxkit F™

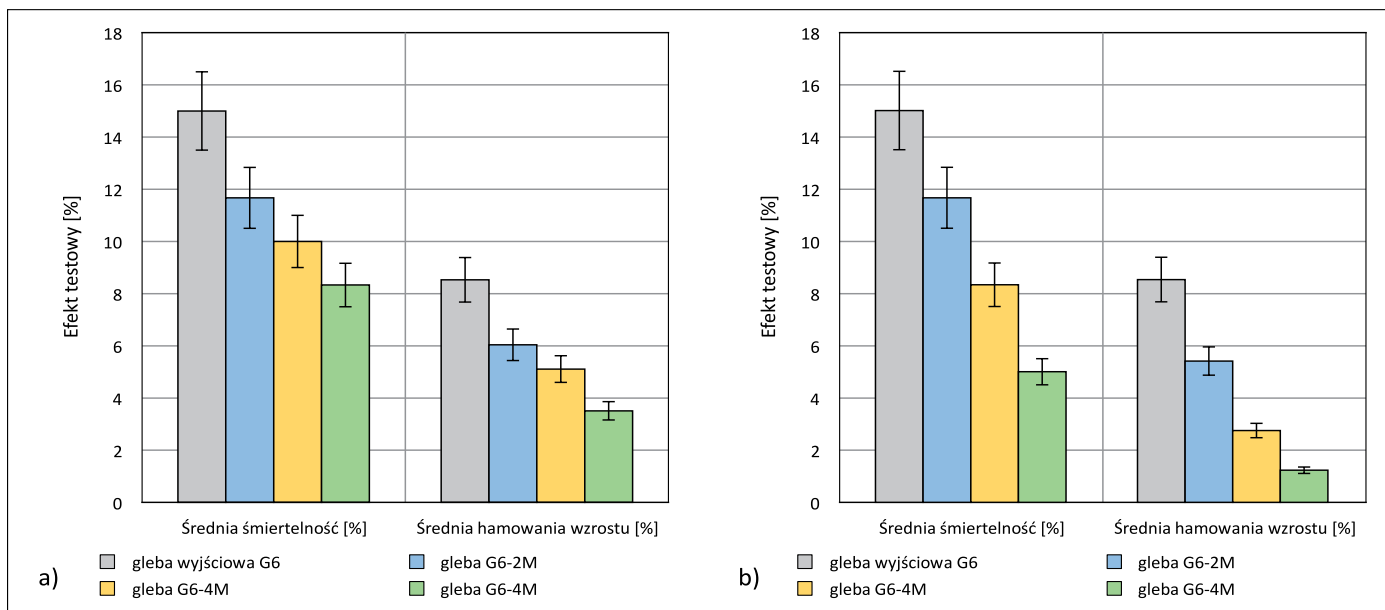
Badania toksyczności gleby z zastosowaniem testu Ostracodtoxkit F™ wykazały średnią śmiertelność *Heterocypris incongruens* w glebie wyjściowej na poziomie 15% oraz średnią hamowania wzrostu małżoraczków 8,53%. Zastosowanie inokulacji biopreparatem spowodowało spadek śmiertelności bioindykatorów w glebie do 8,33%, natomiast bioaugmentacji biopreparatem z domieszką środków powierzchniowo czynnych pochodzenia biologicznego – do 5,00%. Świadczy to o korzystnym wpływie biosurfaktantów na efektywność oczyszczania gleb skażonych węglowodorami ropopochodnymi. Drugi testowany parametr, jakim była średnia hamowania wzrostu *Heterocypris incongruens*, w glebie G6-6M wynosił 3,51%, natomiast w glebie G6-B6M spadł do 1,23%. Wyniki testu Ostracodtoxkit F™ wykonane w trakcie prowadzenia bioremediacji gleby G6 w układach 1 i 2 zamieszczono na rysunku 9.

Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Microtox®SPT

Badania toksyczności gleby na poziomie troficznym reducentów przeprowadzono z wykorzystaniem testu Microtox®SPT (do fazy stałej), pozwalającego na bezpośredni kontakt bakterii luminescencyjnych (*Vibrio fischeri*) z testowaną próbką gleby. Wynikiem testu Microtox®SPT jest wartość współczynnika toksyczności TU, który dla próbki gleby wyjściowej wynosił 4,8. Bioremediacja gleby z wykorzystaniem techniki inokulacji biopreparatem pozwoliła na obniżenie wartości TU do poziomu 2,1, natomiast bioaugmentacja gleby biopreparatem z domieszką biosurfaktantów do wartości 0,6 (po 6 miesiącach prowadzenia procesu). Zmiany współczynnika TU w glebie wyjściowej zaszczipionej biopreparatem lub biopreparatem z dodatkiem biosurfaktantów zamieszczono na rysunku 10.

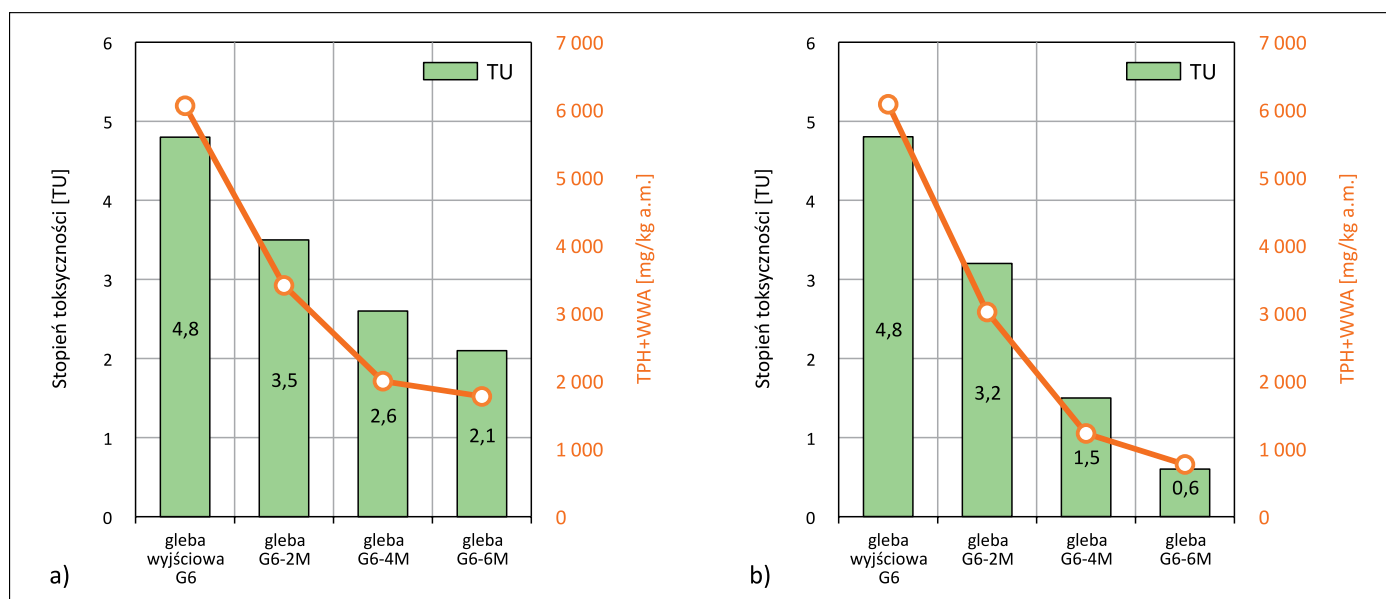
Wnioski

- 1 Biodegradacja jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych metod oczyszczania gruntów skażonych węglowodorami ropopochodnymi. Coraz częściej prowadzone są badania nad udoskonaleniem procesu biodegradacji węglowodorów ropopochodnych poprzez zastosowanie tzw. metod kombinowanych, łączących kilka zabiegów remediacyjnych. Jedną z najbardziej obiecujących metod kombinowanych wydaje się inokulacja gleby biopreparatem z dodatkiem biosurfaktantów.



Rysunek 9. Wartości średniej śmiertelności oraz średniej hamowania wzrostu małżoraczków *Heterocypris incongruens* w teście Ostracodtoxkit F™ dla gleby: a) inokulowanej biopreparatem, b) inokulowanej biopreparatem z domieszką biosurfaktantów

Figure 9. Values of average mortality and average growth inhibition of ostracods *Heterocypris incongruens* in the Ostracodtoxkit F™ test for soil a) inoculated with a biopreparation, b) inoculated with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant



Rysunek 10. Wartości współczynnika toksyczności TU w teście Microtox®SPT w kolejnych miesiącach prowadzenia procesu bioremediacji gleby wyjściowej: a) inokulowanej biopreparatem, b) inokulowanej biopreparatem z domieszką biosurfaktantów

Figure 10. Values of the TU toxicity coefficient in the Microtox®SPT test in the following months of the bioremediation process of the initial soil a) inoculated with a biopreparation, b) inoculated with a biopreparation containing an admixture of biosurfactant

- 2 Badania bioremediacji prowadzone w dwóch układach badawczych umożliwiły ocenę efektywności stosowanych zabiegów remediacyjnych poprzez określenie wpływu biosurfaktantów na szybkość biodegradacji TPH i WWA w glebach.
- 3 W wyniku inokulacji gleby biopreparatem – po sześciu miesiącach oczyszczania uzyskano obniżenie stężenia TPH w glebie z 6062,59 mg/kg s.m. do 1774,72 mg/kg s.m. (70,73%) oraz WWA z 12,05 mg/kg s.m. 4,27 mg/kg s.m. (64,60%), natomiast zaszczepienie gleby biopreparatem z dodatkiem roztworu biosurfaktantów umożliwiło spadek stężenia TPH do 768,92 mg/kg s.m. (87,32%) i WWA do 2,20 mg/kg s.m. (81,77%).
- 4 Analizy prowadzone w dwóch układach badawczych wykazały, że wzbogacenie biopreparatu o biosurfaktanty wpłynęło na wzrost efektywności biodegradacji TPH o 16,59% oraz WWA o 17,17%.
- 5 Do oceny efektywności procesu bioremediacji gleby zanieczyszczonej TPH i WWA wykorzystano 3 mikrobiotesty: Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®STP. Przeprowadzone analizy toksykologiczne potwierdziły zależność pomiędzy stężeniem węglowodorów ropopochodnych a jakością gleby oraz wykazały skuteczność prowadzonych zabiegów bioremediacyjnych.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Wpływ biosurfaktanta na efektywność procesu bioremediacji gruntu zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi* – praca INiG – PIB na zlecenie MEiN; nr zlecenia: 0036/KE/2023, nr archiwalny: DK-4100-0019/2023.

Literatura

- Badmus S.O., Amusa H.K., Oyehan T.A., Saleh T.A., 2021. Environmental Risks and Toxicity of Surfactants: Overview of Analysis, Assessment, and Remediation Techniques. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 62085–62104. DOI: 10.1007/s11356-021-16483-w.
- Gan S., Lau E.V., Ng H.K., 2009. Remediation of Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172: 532–549. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.118.
- Heidarzadeh N., Jebeli M., Gitipour S., 2021. Cement-Based Solidification/Stabilization of Soil Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Organophilic Clay. DOI: 10.21203/rs.3.rs-974704/v1.
- Hossain M.F., Akter M.A., Sohan M.S.R., Sultana D.N., Reza M.A., Hoque K.M.F., 2022. Bioremediation Potential of Hydrocarbon Degrading Bacteria: Isolation, Characterization, and Assessment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1): 211–216. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.08.069.
- Hua F., Wang H.Q., 2014. Uptake and Trans-Membrane Transport of Petroleum Hydrocarbons by Microorganisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28: 165–175. DOI: 10.1080/13102818.2014.906136.
- Huesemann M.H., 2004. Biodegradation and Bioremediation of Petroleum Pollutants in Soil. [W:] Singh A., Ward O.P. (eds.). *Applied Bioremediation and Phytoremediation*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1: 13–34.
- Janiszewska S., Białobrzeski T., Kruszyńska E., Ciepela K., 2017. Przegląd metod oczyszczania gruntów i wód gruntowych *in situ*. *Przegląd Geologiczny*, 65: 908–915.
- Kapellos G.E., 2017. Microbial Strategies for Oil Biodegradation. [W:] Becker S.M. (ed.). *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes*. Elsevier, 19–39.
- Karthika N., Jananee K., Murugaiyan V., 2016. Remediation of Contaminated Soil Using Soil Washing – a Review. *Journal of Engineering Research and Applications*, 6: 13–18.

- Kluk D., Steliga T., 2017. Efektywna metoda identyfikacji zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) i wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych (WWA) w glebach. *Nafta-Gaz*, 73(7): 488–495. DOI: 10.18668/NG.2017.07.06.
- Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y.B., Naidu R., Megharaj M., 2017. Remediation Approaches for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Contaminated Soils: Technological Constraints, Emerging Trends and Future Directions. *Chemosphere*, 168: 944–968. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.115.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., 2010. Bioaugmentation as a Strategy for Cleaning up of Soils Contaminated with Aromatic Compounds. *Microbiological Research*, 165: 363–375. DOI: 10.1016/j.micres.2009.08.001.
- Mulligan C.N., 2009. Recent Advances in the Environmental Applications of Biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14: 372–378. DOI: 10.1016/j.cocis.2009.06.005.
- Nikolova C., Gutierrez T., 2021. Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 626639. DOI: 10.3389/fbioe.2021.626639.
- Oliver J.D., 2010. Recent Findings on the Viable but Nonculturable State in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiol Reviews*, 34: 415–425. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
- Pacwa-Płociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S., 2011. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 633–654. DOI: 10.3390/ijms12010633.
- Patel A.B., Shaikh S., Jain K.R., Desai C., Madamwar D., 2020. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11: 562813. DOI: 10.3389/fmicb.2020.562813.
- Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., De Souza Oliveira R.P., 2014. Biosurfactant-Enhanced Hydrocarbon Bioremediation: An Overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89: 88–94. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.01.007.
- Steliga T., 2009. Bioremediacja odpadów wiertniczych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi ze starych dołów urobkowych. *Prace Instytutu Nafty i Gazu*, 163: 1–331.
- Steliga T., Wojtowicz K., Kapusta P., Brzeszcz J., 2020. Assessment of Biodegradation Efficiency of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Soil Using Three Individual Bacterial Strains and Their Mixed Culture. *Molecules*, 25: 709. DOI: 10.3390/molecules25030709.
- Varjani S.J., 2017. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223: 277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Venosa A.D., Zhu X., 2003. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8: 163–178. DOI: 10.1016/S1353-2561(03)00019-7.
- Ward O.P., 2010. Microbial Biosurfactants and Biodegradation. [W:] Sen R. (ed.). *Biosurfactants*. Springer, New York, 672: 65–74.
- Wojtowicz K., 2022. Opracowanie metodyki oznaczania WWA w próbkach gleb z wykorzystaniem chromatografii cieczowej HPLC. *Nafta-Gaz*, 78(2): 141–153. DOI: 10.18668/NG.2022.02.06.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., 2023. Oil-Contaminated Soil Remediation with Biodegradation by Autochthonous Microorganisms and Phytoremediation by Maize (*Zea Mays*). *Molecules*, 28: 6104. DOI: 10.3390/molecules28166104.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., Skalski T., 2022. Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer γ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil. *Materials*, 15: 400. DOI: 10.3390/ma15020400.
- Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Gao X., Li F., Li H., Yu H., 2018. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2885. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02885.
- Zajic J.E., Seffens W., Panchal C., 1983. Biosurfactants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1: 87–107. DOI: 10.3109/07388558309082580.



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



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