

Wykorzystanie testów respirometrycznych do oceny efektywności biodegradacji osadów z instalacji kopalnianych

The use of respirometric tests to assess the effectiveness of biodegradation methods for deposits from mining installations

Teresa Steliga, Katarzyna Wojtowicz

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

STRESZCZENIE: W artykule przedstawiono zagadnienia związane z biodegradacją osadów zdeponowanych w instalacjach wydobywczych i transportujących ropę naftową. Materiał badawczy stanowiły osady zdeponowane w różnych częściach instalacji. Zbadano skład osadów pod kątem zawartości substancji nieorganicznych i organicznych, grupowego składu węglowodorów ropopochodnych (węglowodory alifatyczne, aromatyczne, żywice, asfalteny) oraz zawartości węglowodorów ropopochodnych TPH. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badane osady składają się głównie z substancji organicznych, z czego zdecydowaną większość stanowią węglowodory alifatyczne. Wyjątkiem jest osad pobrany po tłokowaniu, w którym odnotowano stosunkowo duże zawartości węglowodorów aromatycznych, żywicy i asfaltenów. Dla wszystkich osadów obliczono zawartość n-alkanów o długości łańcucha węglowego od n-C₈ do n-C₄₄. Szczególną uwagę zwrócono na podatność osadów na biodegradację pod wpływem biopreparatów opracowanych na bazie mikroorganizmów allochtonicznych. Szybkość biodegradacji substancji ropopochodnych analizowano wykorzystując zestaw OxiTop Control. Wzrost aktywności mikrobiologicznej w środowisku reakcyjnym pod wpływem dodatku biopreparatów świadczył o biodegradacji substancji organicznych zawartych w osadach. Na podstawie uzyskanych wyników testu respirometrycznego wytypowano biopreparat, pod wpływem którego biodegradacja zachodziła najbardziej efektywnie. Najbardziej skuteczny okazał się biopreparat IV, w wyniku działania którego uzyskano obniżenie zawartości węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C₈ do n-C₁₈ dla osadu najłatwiej biodegradowalnego (osad nr 5) o 59–37%. Natomiast w osadzie najtrudniej biodegradowalnym (osad nr 5) zanotowano spadek o 27–11%. Węglowodory z zakresu n-C₁₉ do n-C₃₀ również uległy biodegradacji w zadowalającym stopniu, tj. 35–14% w osadzie nr 5 oraz 11–6% w osadzie nr 4. Węglowodory zawierające powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce uległy redukcji w granicach 13–3% w osadzie nr 5 i 6–2% w osadzie nr 4. Dla osadów surowych i osadów po przeprowadzeniu testu biodegradacji z wybranym biopreparatem, sporządzono wykresy ilustrujące zmianę zawartości n-alkanów w badanych próbkach.

Słowa kluczowe: osady, testy respirometryczne, OxiTop, substancje ropopochodne, biodegradacja.

ABSTRACT: The article presents issues related to the biodegradation of sediments deposited in extraction and transporting crude oil installations. The research material were sediments deposited in various parts of the installation. The composition of sediments in terms of the content of inorganic and organic substances, group composition (aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, resins, asphaltenes) and the content of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) were examined. On the basis of the results obtained, it was concluded that the sediments studied consist mainly of organic substances, of which the vast majority are aliphatic hydrocarbons. The exception is the post-piston sediment, in which relatively high amounts of aromatic hydrocarbons, resins and asphaltenes were noted. The content of n-alkanes with carbon chain length from n-C₈ to n-C₄₄ was calculated for all sediments. Particular attention was paid to the susceptibility of sediments to biodegradation under the influence of biopreparations prepared on the basis of allochthonic microorganisms. The rate of biodegradation of petroleum derivatives was analyzed using the OxiTop Control set. The increase in microbial activity in the reaction environment under the addition of biopreparations attested to the biodegradation of organic substances contained in the sediments. On the basis of the results of the respirometric test, a biopreparation was selected, under which biodegradation took place most effectively. The most effective was biopreparation IV, as a result of which the reduction of aliphatic hydrocarbons with a carbon chain length of n-C₈ to n-C₁₈ for the most biodegradable sediment (sediment No. 5) by 59–37% was achieved, whereas the most difficult to biodegrade sediment (sediment No. 5) by 27–11%. Hydrocarbons from the range of n-C₁₉ to n-C₃₀ were also biodegradable to a satisfactory degree, i.e. 35–14% in the sediment No. 5 and 11–6% in the sediment No. 4. Hydrocarbons containing more than 30 carbon atoms in the molecule were reduced within the

limits of 13–3% in sediment No. 5 and 6–2% in sediment No. 4. For raw sediments and sediments after biodegradation test using the selected biopreparation, charts illustrating the change in the content of n-alkanes in the samples were made.

Key words: sediments, respirometric tests, OxiTop, petroleum compounds, biodegradation.

Wprowadzenie

Eksploracja płynów złożowych niesie ze sobą zmianę warunków panujących wewnątrz złoża, takich jak ciśnienie, objętość i temperatura. Sprzyja to destabilizacji wydobywanej ropy naftowej, co w konsekwencji prowadzi do powstawania osadów asfaltenowo-parafinowych i osadzania się ich na powierzchni ścian instalacji (Haji-Akbari et al., 2014). Depozycja osadów w instalacjach transportujących płyny złożowe jest jednym z ważniejszych problemów przemysłu wydobywczego. Głównymi składnikami nagromadzonych w instalacjach osadów są wydzielone z ropy naftowej węglowodory parafinowe, żywice i asfalteny (Lubaś et al., 2012; Jublee i Suparna, 2015). Osady mogą zawierać również związki nieorganiczne pochodzenia złożowego, do których należą części skały zbiornikowej transportowane wraz z wydobywanymi płynami złożowymi czy też składniki będące efektem reakcji redoks, z których mogą wytrącać się osady solne. Ponadto osady solne powodują korozję armatury odwiertów, rurociągów i instalacji przygotowania ropy naftowej. Nagromadzone w instalacjach osady mają negatywny wpływ na proces eksploatacji płynów złożowych związany ze zmniejszeniem się światła rurociągu transportującego płyny złożowe, zwiększenia ciśnienia w instalacji, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia, a niekiedy całkowitego zatrzymania wydobywania płynów złożowych (Haji-Akbari, 2013; Kluk, 2018).

Obecne technologie pozwalają na wykorzystanie różnych metod usuwania osadów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Należą do nich: działanie odczynnikami chemicznymi, tłokowanie, ogrzewanie, czy działanie ultradźwiękami. Większość z nich jest jednak uznawana za zbyt kosztowne i mało efektywne ze względu na złożoność powstałych osadów (Gasumov, 2016). Inną metodą usuwania niektórych typów osadów może być wykorzystanie procesów biologicznych, które oferują połączenie niskich kosztów i wysokiej efektywności (Prakash et al., 2015; Wu et al., 2017; Xia et al., 2017). Jednym z głównych czynników decydujących o podatności zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w osadach zdeponowanych w instalacjach kopalnianych na biodegradację, jest budowa chemiczna węglowodorów ropopochodnych (długość łańcucha, jego rozgałęzienia, obecność tlenu w cząsteczce węglowodorów, obecność i położenie podstawników, struktura i liczba pierścieni). O podatności węglowodorów alifatycznych decyduje długość łańcucha. Alkany o długości łańcucha n-C₁₀–n-C₂₂ są substancjami najchętniej wykorzystywanymi przez bakterie, natomiast alkany gazowe n-C₂–n-C₄ są rozkładane tylko przez niektóre grupy mikroor-

ganizmów. Słaba rozpuszczalność w wodzie alkanów o długości łańcucha węglowego od n-C₅ do n-C₉ oraz powyżej n-C₂₃ powoduje obniżenie podatności na biodegradację (Wang et al., 2016). Węglowodory ciężkie, o długości łańcucha powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce, ulegają biodegradacji bardzo powoli. Izalkany (rozgałęzione węglowodory alifatyczne) charakteryzują się znacznie mniejszą zdolnością do biodegradacji w stosunku do alkanów, gdyż grupa metylowa podstawiona w pozycji 2 lub 3 utrudnia β-oksydację. Często zbyt duża liczba podstawników może spowodować, że na przykład pristan i fitan są bardzo odporne na biodegradację. Podstawienie węglodorów grupą „-OH” lub „-COOH” zwiększa ich podatność na biodegradację. Natomiast podstawienie grupami „-Cl”, „-NO₂”, „-SO₃H” zmniejsza szybkość biodegradacji. Cykloalkany o małych masach cząsteczkowych (np. cykloheksan) są rozkładane w warunkach aerobowych z mniejszą skutecznością niż węglowodory monoaromatyczne, gdyż uszkadzają błony komórkowe i wykazują znaczną toksyczność w stosunku do mikroorganizmów. Węglowodory monoaromatyczne cechują się znaczną toksycznością. Jednakże w przypadku występowania w niewielkich stężeniach są szybko rozkładane przez wiele rodzajów bakterii i grzybów (Varjani, 2017). Związki wielopierścieniowe o 2–4 pierścieniach w cząsteczce, podlegają biodegradacji z szybkością odwrotnie proporcjonalną do stopnia kondensacji pierścieni. Związki o 5 lub więcej skondensowanych pierścieniach należą do trudno rozkładalnych na drodze biologicznej. Wymagane jest w takich przypadkach zastosowanie konsorcjum mikroorganizmów na bazie bakterii i grzybów (Safdari et al., 2018; Wang et al., 2016). Asfalteny i inne ciężkie frakcje ropy naftowej są odporne na rozkład mikrobiologiczny ze względu na dużą masę cząsteczkową, niską rozpuszczalność oraz tendencję wiązania się z matrycą glebową (Tahhan et al., 2011; Tao K. et al., 2017).

Równie ważnym czynnikiem jest biodostępność mikroorganizmów do węglodorów ropopochodnych, która zależy od struktury odpadu, jego pochodzenia oraz od właściwości fizjologicznych mikroorganizmów (Wang et al., 2016; Wu et al., 2017; Safdari et al., 2018).

Zanieczyszczenia ropopochodne zawarte w badanych osadach stanowią skomplikowany, wieloskładnikowy układ i z tego względu do ich rozkładu wskazane jest zastosowanie mieszaniny kultur bakteryjnych o rozbudowanym aparacie enzymatycznym. W celu uniknięcia antagonistycznego oddziaływania mikroflory autochtonicznej osadu na obce kultury drobnoustrojów nieprzystosowane do danego środowiska, preferuje się sporządzenie konsorcjów bakteryjnych na bazie uprzednio

wyzolowanych z osadu mikroorganizmów autochtonicznych. Prowadzone powszechnie badania nad przyspieszeniem biodegradacji węglowodorów na drodze procesów biotechnologicznych, przy wykorzystaniu aktywnych kultur bakteryjnych dowodzą o ich efektywności (Lamy et al., 2013; Saikia i Deka, 2013; Sarkar et al., 2016, Sarkar et al., 2017; Roy et al., 2018; Safdari et al., 2018).

W celu określenia podatności na biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w osadach zdeponowanych w instalacjach kopalnianych przeprowadzono badania respirometryczne z wykorzystaniem systemu Oxi-Top Cotrol (Binner et al., 2012; Steliga et al., 2014). Osady poddano procesowi inokulacji biopreparatami opracowanymi na bazie mikroorganizmów allochtonicznych w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB. Następnie przeprowadzono analizy chromatograficzne zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w osadach surowych i po procesie biodegradacji. Połączenie wyników badań respirometrycznych i analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropopochodnych w analizowanych osadach pozwoli na określenie zdolności do biodegradacji osadów powstałych w instalacjach wydobywczych i napowierzchniowych.

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiło 5 próbek osadów (tabela 1) pobranych z różnych części instalacji kopalni ropy naftowej zlokalizowanej na terenie północno-zachodniej Polski oraz 5 biopreparatów sporządzonych w Zakładzie Mikrobiologii (SM) INiG – PIB. Osady nr 1, 2 i 3 charakteryzowały się ciemno-brunatną barwą i mazistą konsystencją. Osad nr 4 miał brunatną barwę i zwartą konsystencję. Natomiast osad nr 5 miał ciemno brunatną barwę i postać mniej mazistą, co ułatwiało rozdzielanie go na drobniejsze fragmenty. Biopreparaty zostały przygotowane na bazie mikroorganizmów allochtonicznych należących do typu *Actinobacteria* i *Proteobacteria*, wyzolo-

lowanych z terenów kopalń ropy naftowej i gazu ziemnego zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Mikroorganizmy występujące w biopreparatach charakteryzowały się zdolnością metabolizowania zanieczyszczeń ropopochodnych.

Metodyka badawcza

Analiza osadów pod kątem oznaczania substancji nieorganicznych i organicznych oraz składu grupowego z wykorzystaniem aplikacji SARA

W pierwszym etapie osady analizowano pod kątem określenia zawartości substancji nieorganicznych i organicznych. W tym celu z badanych osadów wydzielono frakcję organiczną, poprzez rozpuszczenie w rozpuszczalniku o szerokim spektrum działania. Po przefiltrowaniu i odparowaniu rozpuszczalnika oznaczono zawartość substancji organicznych w badanym osadzie metodą wagową.

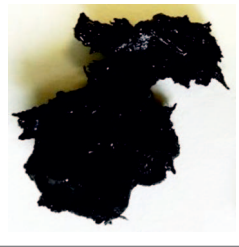

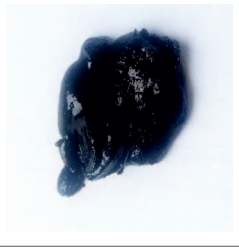


Analizie frakcyjnej poddano organiczne części osadów, które uprzednio wyekstrahowano za pomocą toluenu. Rozdział związków organicznych polegał na oddestylowaniu frakcji niskowrzących, a następnie rozpuszczenie uzyskanej frakcji wrzącej powyżej 260°C w n-heptanie (Anooshe et al., 2012). Dzięki temu nierozpuszczalne w n-heptanie asfalteny oznaczono ilościowo metodą wagową. Z przesącza (roztworu związków organicznych pozbawionego asfaltenów) usunięto metodą destylacji n-heptan, po czym przystąpiono do wydzielenia z niego kolejnych grup związków. Podczas tego etapu analizy stosowano technikę kolumnowej chromatografii elucyjno-adsorpcyjnej, dzięki czemu sukcesywnie rozdzielono węglowodory nasycone, aromatyczne oraz żywice, które następnie oznaczono ilościowo metodą wagową (Kluk, 2018).

Badania respirometryczne

Metodykę badawczą ukierunkowano na określenie zdolności do biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w osadach,

Tabela 1. Osady wykorzystane w badaniach

Table 1. Sediments used in research

Nr osadu	Osad nr 1	Osad nr 2	Osad nr 3	Osad nr 4	Osad nr 5
Zdjęcie					
Miejsce poboru	pobrane z rurociągów wodnych na terenie kopalni	wpadający do kolumny	pobrane z odolejacza	pobrane po tłokowaniu	pobrane z instalacji wydobywczej

pod wpływem biopreparatów. W tym celu wykorzystano testy respirometryczne przy użyciu systemu Oxi-Top Control, umożliwiające pomiar zużycia tlenu przez mikroorganizmy znajdujące się w próbce (Lamy et al., 2013; Malińska, 2016; Wu et al., 2017). W celu wykonania pomiaru aktywności biologicznej analizowanych osadów w warunkach tlenowych, analizowano próbki wszystkich osadów o masie 10 g. Próbki umieszczono w naczyniach reakcyjnych, do których dodawano biopreparaty przygotowane przez Zakład Mikrobiologii INiG – PIB. Wykonywano identyczne testy dla wszystkich układów osad-biopreparat. Równolegle przygotowano próbki odniesienia, w których oddzielnie umieszczono analizowane osady oraz biopreparaty wykorzystywane w badaniach. Wszystkie naczynia szczelnie zamknięto główkami pomiarowymi, po czym umieszczono w cieplarni i termostатовano w temperaturze 20°C przez 30 dni. Głównki pomiarowe systemu Oxi-Top Control co dwie godziny odczytywały wartości ciśnienia panującego w układzie zamkniętym. Przetwarzanie mierzonego ciśnienia na wartość zużytego tlenu (m_{O_2}) odbywa się według wzoru (1) [mg/dm^3] (Steliga i Uliasz, 2014). Zebrane dane były odczytywane za pomocą kontrolera Oxi-Top OC 110, a następnie za pomocą programu Achat OC zostały transponowane do komputera, gdzie za pomocą programu Excel sporządzono krzywe zależności ilości zużytego tlenu [mg/dm^3] od czasu trwania eksperymentu [dni].

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

gdzie:

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

V_g – objętość wolnego gazu [m^3],

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

T_m – wartość pomiarowa temperatury [K],

T_0 – temperatura odniesienia (273,15 K),

A – współczynnik absorpcji (0,03103),

Δp – spadek ciśnienia w próbce [Pa].

Analiza chromatograficzna zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych TPH

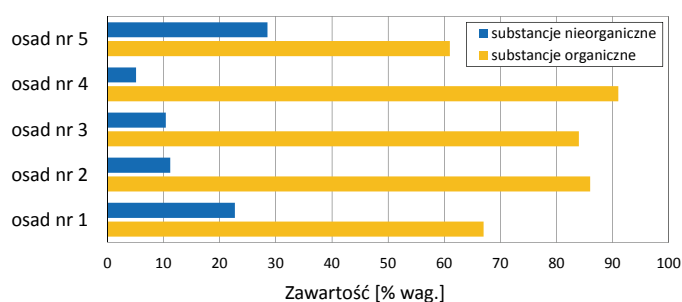
Do oznaczeń węglowodorów ropopochodnych występujących w osadach obejmujących identyfikację analitów, ilościowe oznaczanie n-alkanów (n-C₆–n-C₄₄) oraz węglowodorów z grupy izoprenoidów (Pr i F) zastosowano metodę chromatografii gazowej. Analizę chromatograficzną wykonano na chromatografie Clarus 500 GC firmy Perkin Elmer, wyposażonym w kolumnę kapilarną RTX®-1 (30 m × 0,53 mm) firmy Restek, przy zastosowaniu następujących parametrów temperaturowych: temperatura iniektora = 290°C, temperatura detektora FID = 320°C, program temperaturowy pieca: 30°C – przebieg izotermiczny przez 2 min, 30–105°C – przyrost tempe-

ratury z szybkością 10°C/min, 105–285°C – przyrost temperatury z szybkością 5 C/min, 285°C – przebieg izotermiczny przez 5 min. Do oznaczenia ilościowego sumarycznej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) zastosowano zestaw standardów kalibracyjnych firmy Tusnovic Instruments (certyfikowany wzorzec: BAM K010). Do ilościowego oznaczenia poszczególnych n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych użyto natomiast wzorców certyfikowanych firmy Supelco i Restek (mieszanina wzorcowa nr D2807 węglowodorów parafinowych: n-C₆–n-C₄₄ oraz certyfikowanej mieszaniny wzorcowej nr A029668: Fuel Oil Degradation Mix n-C₁₇, pristan, n-C₁₈, fitan) (Steliga et. al 2014; Suja et al., 2014; Steliga i Kluk, 2017).

Omówienie wyników

Zawartość substancji nieorganicznych i organicznych oraz ich skład grupowy na podstawie analizy SARA

W celu analizy zdeponowanych osadów, pod kątem zawartości substancji nieorganicznych i organicznych, przeprowadzono rozpuszczania frakcji węglowodorowej w dichlormetanie (rys. 1).

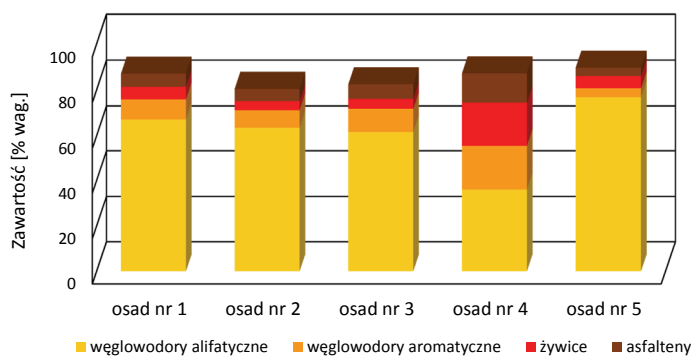


Rys. 1. Zawartość substancji organicznych i nieorganicznych w badanych osadach

Fig. 1. The content of organic and inorganic substances in the tested sediments

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że w skład badanych osadów wchodzi głównie substancje organiczne, gdyż oznaczono je w ilościach od 61% (osad nr 5) – 91% (osad nr 4). Spośród badanych osadów najwięcej substancji nieorganicznych zawierał osad nr 5 (28,5% wag.) oraz osad nr 1 (22,7% wag.). Natomiast najmniej – nr 4 (5,1% wag.).

Analiza składu frakcyjnego wykazała, że osady nr 1, 2, 3 i 5 zbudowane są w największym stopniu z węglowodorów alifatycznych. Zawartość węglowodorów aromatycznych, żywic i asfaltenów w tych osadach jest niewielka. Inny jest skład osadu nr 4, w którym odnotowano stosunkowo duże zawartości węglowodorów aromatycznych, żywic i asfaltenów (rys. 2).



Rys. 2. Zawartość frakcji organicznych w osadach

Fig. 2. The content of organic fraction in sediments

Analiza wyników testów respirometrycznych oraz analiz chromatograficznych

Wzrost aktywności mikrobiologicznej w środowisku reakcyjnym świadczy o wykorzystywaniu przez mikroorganizmy węgla zawartego w organicznej części osadu jako źródła pokarmu. Wynikiem zwiększonej aktywności biologicznej jest wzrost zużycia tlenu przez mikroorganizmy w czasie, czego konsekwencją jest biodegradacja substancji organicznych zawartych w osadzie. Do sporządzenia wykresów zależności zużycia tlenu przez mikroorganizmy w trakcie trwania eksperymentu zastosowano uśrednioną wartość z całodobowego pomiaru (Binner et al., 2012; Ozimek i Kopeć, 2012). Na podstawie uzyskanych wyników testu respirometrycznego określono wpływ inokulacji osadów wybranymi biopreparatami na przebieg procesu biodegradacji. Zakres pomiarowy testów respirometrycznych zawiera się w granicach 0–4000 mg/dm³ wydzielonego tlenu. Dokładność otrzymanych wyników kształtuje się natomiast na poziomie $\pm 1\%$ mierzonej wartości ± 1 hPa. Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie najbardziej efektywnego biopreparatu umożliwiającego rozkład węglowodórów ropopochodnych w analizowanych próbkach osadów (Varjani, 2017).

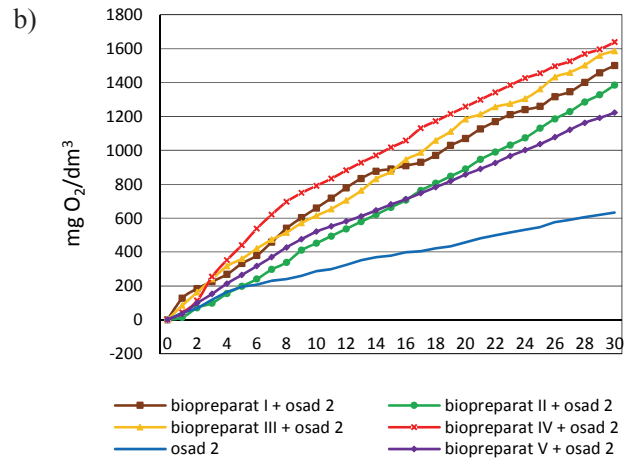
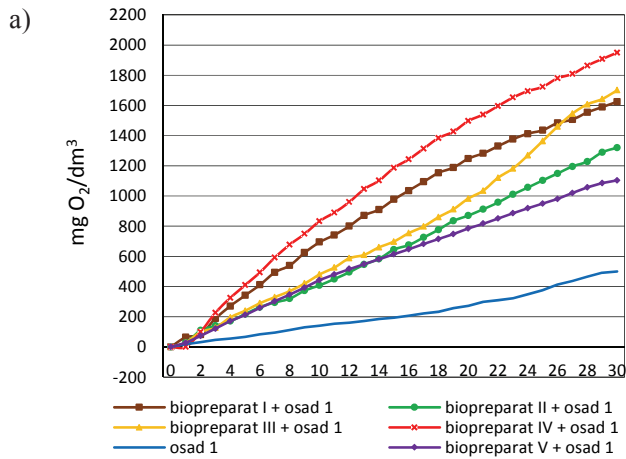
Istotnym elementem umożliwiającym ocenę efektywności procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych jest wykorzystanie metod chromatograficznych. Analizy chromatograficzne umożliwiły zidentyfikowanie i określenie zawartości poszczególnych n-alkanów w osadach surowych oraz po przeprowadzeniu testu biodegradacji, z zastosowaniem najbardziej skutecznego biopreparatu, co pozwoliło na określenie stopnia biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych (Tao et al., 2017).

Po 30 dniach testu przeprowadzonego dla osadu nr 1 (rys. 3a) największe zużycie tlenu odnotowano dla próbki inokulowanej biopreparatem IV (1949 mg O₂/dm³). Najmniej skuteczny okazał się biopreparat V (1103 mg O₂/dm³). Aktywność mikrobiologiczna próbek osadu nr 1 inokulowanych biopreparatem I i III kształtowała się na podobnym poziomie i wynosiła odpowiednio: 1624 mg O₂/dm³ i 1700 mg O₂/dm³. W celu zobrazowania skuteczności przebiegu biodegradacji osadu nr 1 (za pomocą

bakterii autochtonicznych) zamieszczono chromatogram obrazujący zmianę zawartości n-alkanów spowodowany inokulacją najbardziej skutecznym biopreparatem nr IV (rys. 6). Analiza chromatograficzna wykazała, że podczas inokulacji osadu nr 1, prowadzonej przez 30 dni biopreparatem IV, najszybciej zachodzi biodegradacja węglowodórów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C₈ do n-C₁₈ (31–48%). Węglowodory n-C₁₉ do n-C₃₀ również ulegają biodegradacji w zadowalającym stopniu (33–14%), jednak mniejszym aniżeli węglowodory od n-C₈ do n-C₁₈. Węglowodory zawierające powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce, które należą do związków trudno biodegradowalnych, ulegają rozkładowi w znacznie niższym stopniu (3–13%), podobnie jak węglowodory z grupy izoprenoidów (pristan – 10% i fitan – 9%). Natomiast stopień redukcji węglowodórów niezidentyfikowanych wyniósł 28%. Ponadto wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że pod wpływem inokulacji osadu nr 1 biopreparatem IV, uzyskano obniżenie zawartości TPH w próbce o 27,12%.

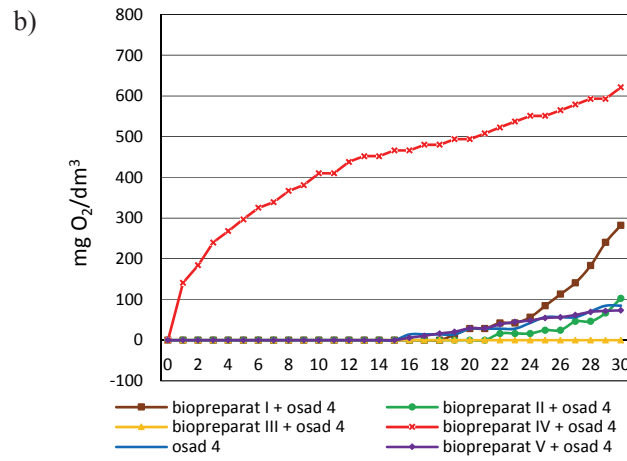
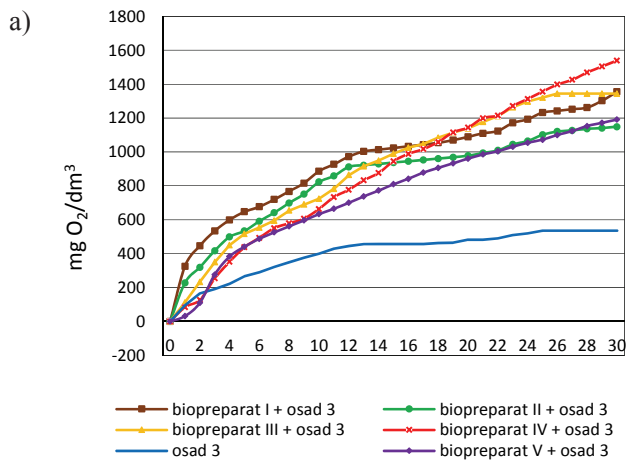
Osady nr 2 i 3 charakteryzowały się podobnym rozkładem zawartości n-alkanów (rys. 7, 8) i podobną aktywnością mikrobiologiczną pod wpływem biopreparatów (rys. 3b, 4a). Zarówno dla osadu nr 2 jak i osadu nr 3 największe zużycie tlenu w trakcie trwania eksperymentu odnotowano dla próbek inokulowanych biopreparatem IV i wynosiło ono odpowiednio: 1638 mg O₂/dm³ i 1539 mg O₂/dm³. Najmniej skuteczny dla osadu nr 2 okazał się biopreparat V (1221 mg O₂/dm³), a dla osadu nr 3 – biopreparat III (1149 mg O₂/dm³). Przeprowadzona analiza chromatograficzna wykazała, że przebieg rozkładu n-alkanów w osadzie nr 2 i 3 jest porównywalny. Stopień biodegradacji węglowodórów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C₈ do n-C₁₈ przy użyciu biopreparatu IV wynosi od 29 do 40% w osadzie nr 2 i od 26 do 35% w osadzie nr 3. Obniżenie zawartości węglowodórów n-C₁₉ do n-C₃₀ kształtuje się na poziomie od 25 do 14% w osadzie nr 2 oraz 23 do 14% w osadzie nr 3. Trudno biodegradowalne węglowodory, to jest zawierające powyżej 30 atomów węgla oraz węglowodory z grupy izoprenoidów ulegały rozkładowi w znacznie mniejszym stopniu odpowiednio: dla osadu nr 2 n-C₃₁ do n-C₄₄ = 13–5%, P = 8%, F = 7% dla osadu nr 3 n-C₃₁ do n-C₄₄ = 13–5%, P = 6%, F = 5%. Stopień biodegradacji TPH w osadzie nr 2 i 3 wyniósł 23 i 21%. Obniżenie zawartości węglowodórów niezidentyfikowanych kształtowało się natomiast na poziomie 25 i 21%.

Osad nr 4 był trudno biodegradowalny ze względu na dużą zawartość węglowodórów aromatycznych, żywic, asfaltenów i ciężkich węglowodórów o długości łańcucha węglowego n-C₃₁ do n-C₄₄ (Tahhan et al., 2011; Sarkar et al., 2017). Wyniki testów respirometrycznych przeprowadzonych dla osadu nr 4 (rys. 4b) wykazały, że zużycie tlenu po 30 dniach eksperymentu jest najwyższe w próbce inokulowanej biopreparatem IV (621 mg O₂/dm³), mimo iż było ono niskie w porównaniu



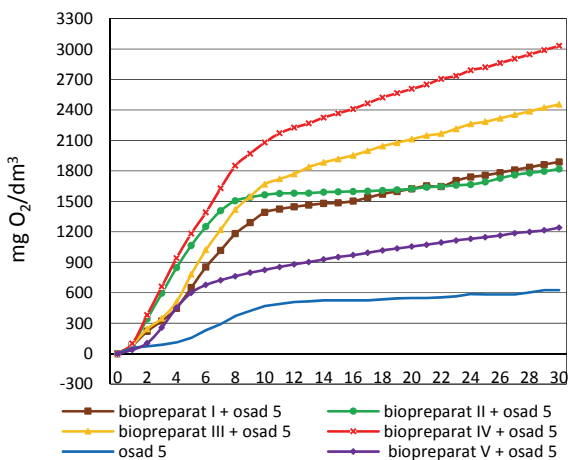
Rys. 3. Zależność ilości zużytego tlenu [mg/dm³] od czasu a) osadu nr 1 i osadu nr 1 z biopreparatami; b) osadu nr 2 i osadu nr 2 z biopreparatami

Fig. 3. The dependence of the amount of oxygen consumed [mg/dm³] from time for; a) sediment No. 1 and sediment No. 1 with biopreparations, b) sediment No. 2 and sediment No. 2 with biopreparations



Rys. 4. Zależność ilości zużytego tlenu [mg/dm³] od czasu a) osadu nr 3 i osadu nr 3 z biopreparatami; b) osadu nr 4 i osadu nr 4 z biopreparatami

Fig. 4. The dependence of the amount of oxygen consumed [mg/dm³] from time for; a) sediment No. 3 and sediment No. 3 with biopreparations, b) sediment No. 4 and sediment No. 4 with biopreparations



Rys. 5. Zależność ilości zużytego tlenu [mg/dm³] od czasu a osadu nr 5 i osadu nr 5 z biopreparatami

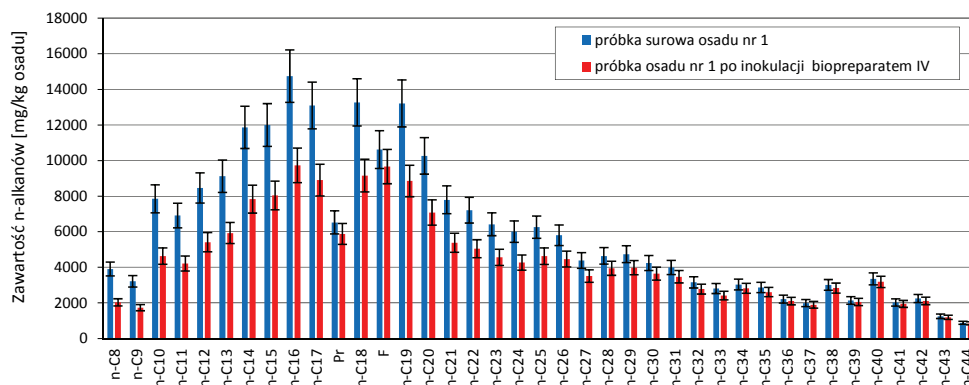
Fig. 5. The dependence of the amount of oxygen consumed [mg/dm³] from time for; sediment No. 5 and sediment No. 5 with biopreparations

do zużycia przez pozostałe osady. Specyficzna budowa analizowanego osadu sprawia, że proces biodegradacji zachodzi w niewielkim stopniu. Na podstawie analizy chromatograficznej przeprowadzonej dla osadu nr 4 przed i po inokulacji biopreparatem IV (rys. 9) obliczony stopień biodegradacji TPH wyniósł 6,5%. Węglowodory niezidentyfikowane udało się zredukować o 6%. Podobnie jak w pozostałych przypadkach najłatwiej biodegradowalne okazały się węglowodory alifatyczne o długości łańcucha węglowego n-C₈ do n-C₁₈ (27–11%), n-C₁₉ do n-C₃₀ (11–6%) i n-C₃₁ do n-C₄₄ (6–2%).

Największe zużycie tlenu (w trakcie trwania eksperymentu) odnotowano dla osadu nr 5 z dodatkiem biopreparatu IV i wynosiło po 30 dniach 3031 mg/dm³ (rys. 5). Najmniejszy wzrost aktywności mikrobiologicznej w środowisku reakcyjnym stwierdzono dla próbki inokulowanej biopreparatem V (zużycie tlenu 1240 mg O₂/dm³). Ilość zużytego tlenu po 30 dniach

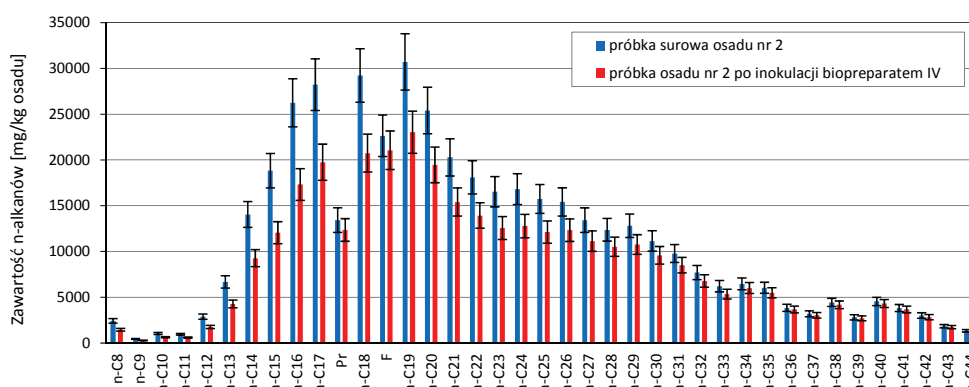
eksperymentu w próbkach osadu nr 5 inokulowanych biopreparatem I, II, i III wynosiła odpowiednio: 1889 mg O₂/dm³, 1818 mg O₂/dm³ i 2455 mg O₂/dm³. Skuteczność przebiegu biodegradacji osadu nr 5 ilustruje chromatogram przedstawiający zmiany zawartości n-alkanów w osadzie przed i po inokulacji biopreparatem IV (rys. 10). Analiza chromatograficzna wykazała, że zawartość węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C₈ do n-C₁₈ w osadzie nr 5 po inokulacji biopreparatem IV zmalała o 59–37%. Węglo-

wodory z zakresu n-C₁₉ do n-C₃₀ również uległy biodegradacji w zadowalającym stopniu, to jest 35–14%. Węglowodory ciężkie (n-C₃₁–n-C₄₄) uległy natomiast redukcji w granicach 13–3%. Ponadto analiza chromatograficzna wykazała, że zawartość węglowodorów z grupy izoprenoidów: pristanu i fitanu zmalała o odpowiednio 12 i 11%. Stopień biodegradacji TPH w próbce osadu nr 5 pod wpływem biopreparatu IV wyniósł 38,8%, a zawartość węglowodorów niezidentyfikowanych zmalała o 28%.



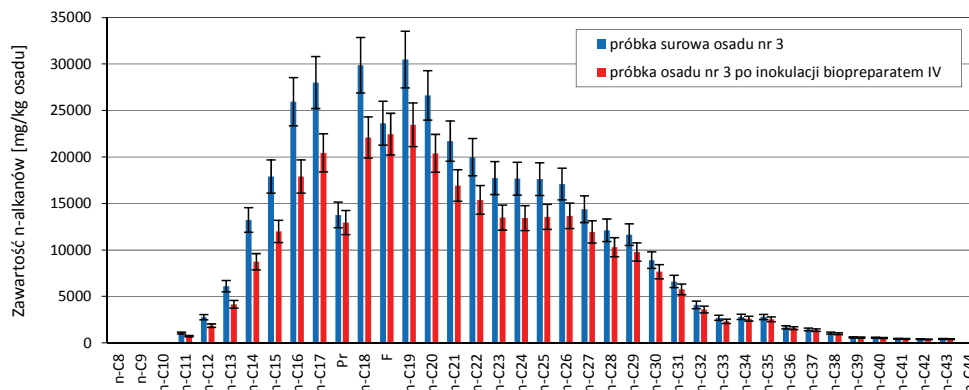
Rys. 6. Analiza chromatograficzna osadu nr 1 przed i po inokulacji biopreparatem IV

Fig. 6. Chromatographic analysis of sediment No. 1 before and after inoculation with IV biopreparation



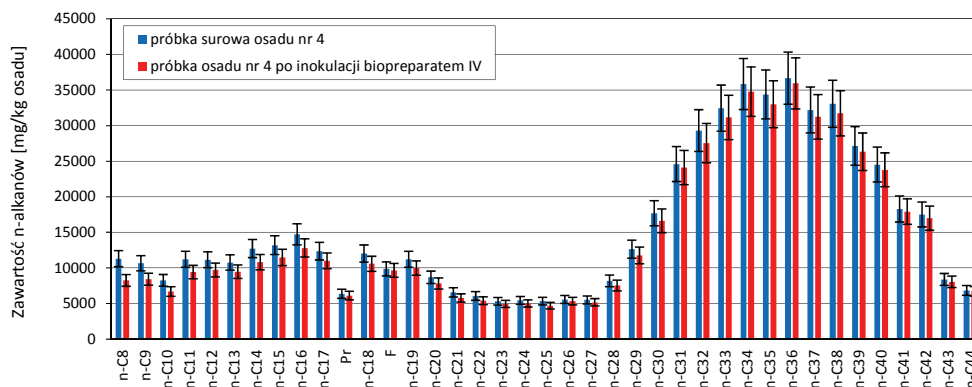
Rys. 7. Analiza chromatograficzna osadu nr 2 przed i po inokulacji biopreparatem IV

Fig. 7. Chromatographic analysis of sediment No. 2 before and after inoculation with IV biopreparation



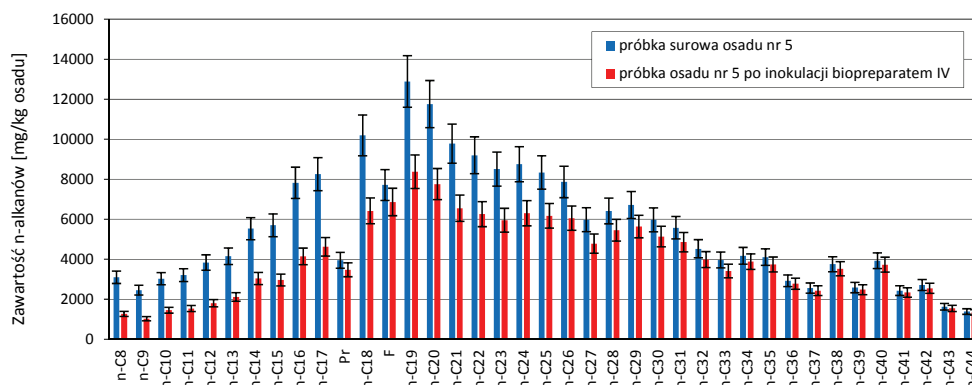
Rys. 8. Analiza chromatograficzna osadu nr 3 przed i po inokulacji biopreparatem IV

Fig. 8. Chromatographic analysis of sediment No. 3 before and after inoculation with IV biopreparation



Rys. 9. Analiza chromatograficzna osadu nr 4 przed i po inokulacji biopreparatem IV

Fig. 9. Chromatographic analysis of sediment No. 4 before and after inoculation with IV biopreparation



Rys. 10. Analiza chromatograficzna osadu nr 5 przed i po inokulacji biopreparatem IV

Fig. 10. Chromatographic analysis of sediment No. 5 before and after inoculation with IV biopreparation

Wnioski

Po analizie składu badanych osadów oraz zależności zużytego tlenu od czasu trwania reakcji można wysunąć następujące wnioski:

1. Osady pobrane z różnych części instalacji kopalni ropy naftowej znacznie różnią się między sobą zawartością substancji nieorganicznych i organicznych, składem frakcyjnym oraz rozkładem zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH).
2. Aktywność biologiczna osadu zależy od jego składu. Osady, w których skład wchodzi w znacznej części węglowodory alifatyczne, łatwiej ulegają biodegradacji aniżeli osady dla których odnotowano znaczne zawartości trudno biodegradowalnych węglowodorów aromatycznych, żywic czy asfaltenów (Wang et al., 2016; Tao et al., 2017).
3. Dodatek biopreparatów do badanych osadów zwiększał ich aktywność biologiczną. Wyniki testów wskazują, że biodegradacja organicznej części analizowanych osadów najszybciej zachodzi pod wpływem inokulacji biopreparatem IV, o czym świadczy wzrost zużycia tlenu w trakcie trwania eksperymentu do poziomu: osad nr 1 – 1949 mg O₂/dm³, osad nr 2 – 1638 mg O₂/dm³, osad nr 3 – 1539 mg O₂/dm³, osad nr 4 – 621 mg O₂/dm³ oraz osad nr 5 – 3031 mg O₂/dm³.

4. Spośród wszystkich osadów najłatwiej biodegradowalny okazał się osad nr 5 (38,8%), z kolei najniższy stopień biodegradacji odnotowano dla osadu nr 4 (6,5%).
5. Biodegradacja najbardziej intensywnie zachodzi dla węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha n-C₈ do n-C₁₈. Węglowodory z zakresu n-C₁₉ do n-C₃₀ również ulegają biodegradacji w zadowalającym stopniu, jednak mniejszym aniżeli węglowodory z zakresu n-C₈ do n-C₁₈. Węglowodory zawierające powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce, które należą do związków trudno biodegradowalnych, ulegają rozkładowi w znacznie niższym stopniu, podobnie jak węglowodory z grupy izoprenoidów (pristan i fitan) (Tahhan et al., 2011; Wang et al., 2016; Tao et al., 2017).

Literatura

- Anooshe A., Hassanvad M., Shahsavani B., 2012. Study of temperature effect on asphaltene precipitation by visual and quantitative methods. *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels*, 3: 8–18. DOI: 10.5897/JPTAF11.035.
- Binner E., Böhm K., Lechner P., 2012. Large scale study on measurement of respiration activity (AT₄) by Sapromat and Oxi-Top. *Waste Management*, 32: 1752–1759. DOI: 10.1016/j.wasman.2012.05.024.
- Gasumov R.A., 2016. The specifics of operating minor deposits (as given by the examples of gas condensate deposits of the Northern

- Caucasus. *Journal of Mining Institute*, 220: 556–563. DOI: 10.18454/PMI.2016.4.556.
- Haji-Abkari N., Teeraphakul P., Fogler G.S., 2014. Effect of asphaltene concentration on the aggregation and precipitation tendency of asphaltene. *Energy & Fuels*, 28: 909–919. DOI: 10.1021/ef4021125.
- Haji-Akbari N., Masirisuk P., Hoepfner M. P., Fogler H.S., 2013. A unified model for aggregation of asphaltenes. *Energy & Fuels*, 27: 2497–2505. DOI: 10.1021/ef4001665.
- Jublee J., Suparna M., 2015. Characterization of oily sludge from a refinery and biodegradability assessment using various hydrocarbon degrading strains and reconstituted consortia. *Journal of Environmental Management*, 149: 118–125. DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.10.007.
- Kluk D., 2014. Oznaczanie składu ropy naftowej z wykorzystaniem aplikacji SARA. *Nafta-Gaz*, 10: 684–689.
- Kluk D., 2018. Klasyfikacja osadów deponowanych w instalacjach kopalnianych pod kątem doboru metod ich usuwania. *Nafta-Gaz*, 3: 193–200, DOI: 10.18668/NG.2018.03.03.
- Lamy E., Chi Tran T., Mottelet S., Panss A., Schoefs O. 2013. Relationships of respiratory quotient to microbial biomass and hydrocarbon contaminant degradation during soil bioremediation. *International biodeterioration & biodegradation*, 83: 85–91. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.04.015.
- Lubaś J., Biały S., Warnecki M., 2012. Asfalteny w problematyce wydobywania ropy naftowej. *Prace Naukowe Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego*, 179: 1–121.
- Malińska K., 2016. Application of a modified OxiTop® respirometer for laboratory composting studies. *Archives of Environmental Protection*, 42(1): 56–62. DOI: 10.1515/aep-2016-0007.
- Ozimek A., Kopeć M., 2012. Ocena aktywności biologicznej biomasy na różnych etapach procesu kompostowania przy użyciu systemu pomiarowego OxiTop Control. *Acta Agrophysica*, 19(2): 379–390.
- Prakash V., Saxena S., Sharma A., Singh S., Singh S.K., 2015. Treatment of Oil Sludge Contamination by Composting. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6(3): 1-6. DOI: 10.4172/2155-6199.1000284.
- Roy A., Dutta A., Pal S., Gupta A., Sarkar J., Chatterjee A., Saha A., Sarkar P., Sar, Kazy S.K., 2018. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresour. Technol.*, 253: 22–32. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.01.004.
- Safdari M-S., Kariminia H-R., Rahmati M., Fazlollahi F., Polasko A., Mahendra S., Wilding, W.V., Fletcher T.H. 2018. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 342: 270–278. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.08.044.
- Saikia R.R., Deka S., 2013. Removal of hydrocarbon from refinery tank bottom sludge employing microbial culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 9026–3033. DOI: 10.1007/s11356-013-1888-2.
- Sarkar J., Kazy S.K., Gupta A., Dutta A., Mohapatra B., Roy A., Bera P., Mitra A., Sar P., 2016. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Front. Microbiol.*, 7: 1–20. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01407.
- Sarkar P., Roy A., Mohapatra B., Pal S., Kazy S.K., Maiti M.K., Sar P., 2017. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresour. Technol.*, 242: 11–27. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.010.
- Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P., 2012. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.*, 125: 1–10. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.092.
- Steliga T., Kluk D., 2017. Ocena składu zanieczyszczeń gleb skażonych TPH i WWA pod kątem opracowania Technologii ich bioremediacji, *Prace Naukowe Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego*, 215: 1–211. DOI: 10.18668/PN2017.215.
- Steliga T., Uliasz M., 2014. Spent drilling muds management and natural environment protection. *Mineral Resources Management*, 30(2): 135–155. DOI: 10.2478/gospo-2014-0011.
- Suja F., Rahim F., Taha M.R., Hambali N., Razali M.R., Khalid A., Hamzah A., 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 90: 115–122. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.03.006.
- Tahhan R.A. Ammari T.G., Goussous S.J., Al-Shdaifat H.I., 2011. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65: 130–134. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.09.007.
- Tao K., Liu X., Chen X., Hu X., Cao L., Yuan X., 2017. Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresour. Technol.*, 224: 327–332. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.073.
- Varjani S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.*, 223: 277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Wang S.Y., Kuo Y.Ch., Hong A., Chang Y.M., Kao M., 2016. Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. *Chemosphere*, 164: 558–567. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.128.
- Wu M., Li W., Dick W., Ye X., Chen K., Kost D., Chen L., 2017: Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, 169: 124–130. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.059.
- Xia M., Liu Y., Taylor A., Fu D., Khan A.R., Terry N., 2017. Crude oil depletion by bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbon impacted solid waste management site in California. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 123: 70–77. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.06.003.



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



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