Nafta-Gaz 2025, nr 6, s. 381–388, DOI: 10.18668/NG.2025.06.02

Ocena skuteczności biodegradacji wspomaganej inokulacją biopreparatem z dodatkiem surfaktantu w procesie oczyszczania gleby historycznie zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi

Assessment of the effectiveness of biodegradation enhanced by inoculation with a biopreparation and surfactant addition in the remediation of historically petroleum hydrocarbon-contaminated soil

Katarzyna Wojtowicz, Teresa Steliga

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

STRESZCZENIE: W artykule przedstawiono zagadnienia związane z wykorzystaniem techniki biodegradacji wspomaganej środkami powierzchniowo-czynnymi w celu oczyszczania gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. W badaniach wykorzystano glebę pobraną z terenu historycznie zanieczyszczonego ropą naftową (gleba G6), którą zaszczepiono mieszaniną biopreparatu opracowanego na bazie autochtonicznych bakterii i grzybów z roztworem środka powierzchniowo-czynnego NanoSurf EOR. Test biodegradacji prowadzono w skali półtechnicznej metodą pryzmowania *ex situ* z comiesięcznym monitoringiem poziomu stężeń węglowodorów alifatycznych i wielopierścieniowych węglowodorów ropopochodnych oraz stopnia toksyczności gleby. W wyniku sześciomiesięcznego procesu oczyszczania uzyskano obniżenie stężenia TPH (ang. *total petroleum hydrocarbons* – całkowite węglowodory ropopochodne) z 6062,59 mg/kg s.m. gleby do 768,11 mg/kg s.m. gleby (87,34%) oraz WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) z 12,05 mg/kg s.m. gleby do 1,60 mg/kg s.m. gleby (86,73%). Przeprowadzone analizy toksykologiczne z wykorzystaniem testów Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®SPT potwierdziły zależność pomiędzy poziomem zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie a stopniem jej toksyczności. Ponadto, w trakcie procesu oczyszczania nie stwierdzono powstawania toksycznych produktów ubocznych, o czym świadczy sukcesywne obniżanie poziomu toksyczności badanej gleby względem organizmów testowych należących do różnych grup troficznych (bakterie, pierwotniaki, rośliny wyższe). Badania prowadzone w warunkach półtechnicznych pozwoliły na ocenę skuteczności biodegradacji wspomaganej inokulacją biopreparatem i środkiem powierzchniowo-czynnym NanoSurf EOR w rekultywacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi.

Słowa kluczowe: biopreparat, biodegradacja, surfaktanty, węglowodory ropopochodne.

ABSTRACT: This article addresses the use of biodegradation technique supported by surfactants to remediate soils contaminated with petroleum hydrocarbons. The study was conducted using soil collected from an area historically polluted with crude oil (G6 soil). The soil was inoculated with a mixture comprising a biopreparation based on autochthonous bacteria and fungi, along with a solution of NanoSurf EOR surfactant. The biodegradation test was carried out on a semi-technical scale using the *ex situ* pile method, with monthly monitoring of aliphatic hydrocarbons and polycyclic petroleum hydrocarbon concentrations, as well as soil toxicity levels. Over the six-month remediation process, the TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) concentration decreased from 6062.59 mg/kg d.m. soil to 768.11mg/kg d.m. soil (87.34%), while the PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) concentration – from 12.05 mg/kg d.m. soil to 1.60 mg/kg d.m. soil (86.73%). Toxicological analyzes conducted using Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit™ and Microtox®STP tests confirmed a relationship between the level of petroleum contamination and soil toxicity. Furthermore, no toxic by-products were formed during the remediation process, as evidenced by the gradual reduction in soil toxicity towards test organisms from various trophic groups (bacteria, protozoa, and higher plants). The research conducted under semi-technical conditions enabled the assessment of the effectiveness of biodegradation supported by inoculation with a biopreparation and the NanoSurf EOR surfactant in remediating petroleum-contaminated soil.

Key words: biopreparation, biodegradation, surfactants, petroleum hydrocarbons.

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

Artykuł nadesłano do Redakcji: 06.02.2025 r. Zatwierdzono do druku: 27.05.2025 r.

Wprowadzenie

Środowisko glebowe jest szczególne narażone na zanieczyszczenie zarówno substancjami organicznymi, jak i nieorganicznymi, do którego najczęściej dochodzi w wyniku punktowych rozlewów lub wycieków substancji niebezpiecznych bądź na skutek emisji zanieczyszczeń ze źródeł takich jak: środki transportu, zakłady przemysłowe, składowiska odpadów przemysłowych i komunalnych (Karthick i in., 2019). Jednymi z najbardziej niebezpiecznych substancji mogących przedostać się do matrycy glebowej są węglowodory ropopochodne, które stwarzają poważne zagrożenie dla środowiska i zdrowia organizmów żywych ze względu na swoją toksyczność (Venkatraman i in., 2024). Mając na uwadze ryzyko, jakie niesie za sobą obecność zanieczyszczeń ropopochodnych w środowisku glebowym, konieczne jest skuteczne oczyszczenie terenów zanieczyszczonych ropą naftową i przywrócenie im właściwości użytkowych. W celu remediacji miejsc zanieczyszczonych ropą naftową stosuje się wiele fizycznych, chemicznych i biologicznych technologii remediacji prowadzonych w warunkach *in situ* i *ex situ* (Li i in., 2002; Song i in., 2017). Najczęściej stosowaną metodą oczyszczania środowiska glebowego z zanieczyszczeń ropopochodnych jest biodegradacja, która charakteryzuje się wysoką skutecznością, niewielkim wpływem na środowisko i stosunkowo niskimi kosztami prowadzenia procesu (Steliga i in., 2020). Biodegradacja wykorzystuje mikroorganizmy obecne w glebie lub specjalnie wprowadzone do gleby (biopreparat), które przekształcają węglowodory ropopochodne w ditlenek węgla, wodę i biomasę komórkową. Istnieje wiele czynników wpływających na szybkość i stopień degradacji węglowodorów w glebie, takich jak: wilgotność, napowietrzenie, pH, temperatura, stan biologiczny gleby (wiek i rodzaj gleby, żyzność, zawartość składników odżywczych i ich biodostępność) oraz stężenie, struktura molekularna i biodostępność zanieczyszczeń węglowodorowych (Venosa i Zhu, 2003; Huesemann, 2004; Steliga i in., 2020). Optymalizacja tych czynników środowiskowych ma kluczowe znaczenie dla powodzenia procesu oczyszczania. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na hydrofobowy charakter zanieczyszczeń olejowych, ich niską rozpuszczalność w wodzie, zdolność do tworzenia cieczy fazy niewodnej (NAPL) oraz silne adsorbowanie się na cząstkach gleby i osadów wodonośnych, usunięcie węglowodorów ropopochodnych z matrycy glebowej jest zazwyczaj trudne oraz długotrwałe (Steliga i in., 2020; Nikolova i Gutierrez, 2021; Leharne, 2022; St. Germain, 2024). Obecnie w celu usunięcia substancji ropopochodnych ze środowiska gruntowo-wodnego coraz częściej wykorzystuje się bioremediację gruntów wspomaganą dodatkiem środków powierzchniowo-czynnych, których zadaniem jest zmniejszenie napięcia powierzchniowego (powietrze–woda) i napięcia międzyfazowego (olej–woda) (Alcántara i in., 2009; Lai i in., 2009; Pei i in., 2017; Davin i in., 2018; Liu i in., 2021). Zastosowanie surfaktantów w procesie oczyszczania gruntów skażonych węglowodorami ropopochodnymi pozwala na zwiększenie rozpuszczalności NAPL, dzięki czemu dochodzi do migracji zanieczyszczeń z gleby do fazy wodnej. Umożliwia to lepszy kontakt substancji ropopochodnych ze środkami do remediacji fazy wodnej lub mikroorganizmami obecnymi w biopreparacie wykorzystywanym w zabiegu inokulacji (Liu i in., 2021). Należy jednak mieć na uwadze, że nie wszystkie surfaktanty wspomagają proces biodegradacji w równym stopniu, a niektóre mogą wręcz negatywnie oddziaływać na jego przebieg. Dlatego jednym z głównych czynników wpływających na skuteczność prowadzenia procesu bioremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi metodą biodegradacji wspomaganej surfaktantami jest dobór odpowiednich środków powierzchniowo-czynnych. Wybierając surfaktanty do badań, należy wziąć pod uwagę ich rodzaj (anionowy, kationowy, amfoteryczny, niejonowy) (Mohanty i in., 2013; Di Trapani i in., 2023; Wu i in., 2024), stężenie (Mulligan i in., 2001; Wu i in., 2024), wpływ na aktywność drobnoustrojów obecnych w glebie (Chowdhury i in., 2021; Wu i in., 2024), siłę emulgowania (Bognolo, 1999; Han i in., 2023), biodegradowalność (Scott i Jones, 2000; Danial, 2023) oraz interakcje, w jakie mogą wchodzić z węglowodorami ropopochodnymi (Mohanty i in., 2013). Przyjmuje się, że do bioremediacji gleb zanieczyszczonych ropą naftową najkorzystniejsze jest stosowanie niejonowych lub anionowych środków powierzchniowo-czynnych ze względu na ich biokompatybilność. Udowodniono, że surfaktanty te wpływają na zwiększenie aktywności drobnoustrojów bez hamowania biodegradacji oraz zwiększają rozpuszczalność węglowodorów ropopochodnych w wodzie. Ponadto, niejonowe środki powierzchniowo-czynne są zazwyczaj łagodne i nietoksyczne dla środowiska.

Materiał badawczy

W badaniach biodegradacji węglowodorów ropopochodnych wykorzystano glebę, którą pobrano z głębokości 0–0,25 m na terenie historycznie zanieczyszczonym ropą naftową, zlokalizowanym w południowo-wschodniej Polsce. Przed przystąpieniem do inokulacji skorygowano stosunek N : P oraz pH gleby poprzez suplementację nawozem mineralnym „Azofoska" oraz wapnem nawozowym, zapewniając optymalne warunki do rozwoju drobnoustrojów glebowych. Tak przygotowana do bioremediacji gleba wyjściowa G6 (stosowana we wcześniejszych badaniach bioremediacji (Wojtowicz i Steliga, 2024)) charakteryzowała się stosunkiem N : P = 10 : 1, pH = 7,5, średnią przepuszczalnością oraz podwyższonym stężeniem

TPH (6062,59 mg/kg s.m.) i WWA (12,05 mg/kg s.m.). Stężenia metali ciężkich nie przekraczały dopuszczalnych norm według obowiązujących regulacji krajowych.

Do inokulacji gleby wykorzystano biopreparat 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* z dodatkiem związku powierzchniowo-czynnego NanoSurf EOR. Wykorzystany w tych badaniach biopreparat charakteryzował się wysoką skutecznością degradacji węglowodorów ropopochodnych TPH i WWA, co potwierdziły wcześniejsze badania biodegradacji prowadzone przy jego użyciu (Wojtowicz i in., 2023, Wojtowicz i Steliga, 2024). Zastosowanie modyfikacji zawiesiny przeznaczonej do inokulacji gleby poprzez dodatek surfaktantu NanoSurf EOR miało za zadanie wpłynąć na zwiększenie biodostępności zanieczyszczeń oraz rozpuszczalności hydrofobowych węglowodorów w wodzie, co w konsekwencji zwiększyło skuteczność prowadzonego procesu oczyszczania.

Metodyka badawcza

W badaniach bioremediacji gleby G6 zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi wykorzystano metodę pryzmowania *ex situ*. Badania prowadzono przez 6 miesięcy w ściśle określonych warunkach temperaturowych (około 20°C), kontrolując wilgotności gleby (25%), pH (około 7,5) i stosunek substancji biogennych (N : P = 10 : 1). W trakcie procesu oczyszczania prowadzono comiesięczny monitoring gleby, który obejmował:

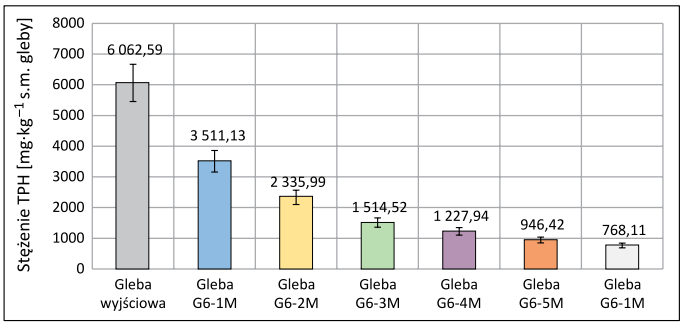
- oznaczenie stężeń węglowodorów ropopochodnych z grupy TPH i WWA;
- określenie zmian poziomu toksyczności gleby z wykorzystaniem pakietu testów toksykologicznych.

Identyfikację i ilościowe oznaczenia węglowodorów ropopochodnych w glebie prowadzono metodą chromatografii gazowej (analiza TPH) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (analiza WWA) zgodnie z procedurami opracowanymi w Zakładzie Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych INiG – PIB. Opis procedur analizy węglowodorów w próbkach środowiskowych, obejmujący ekstrakcję analitów, oczyszczanie ekstraktów oraz analizę chromatograficzną, omówiono we wcześniejszej pracy (Wojtowicz i in., 2023). Monitoring poziomu toksyczności gleby w trakcie oczyszczania wykonano za pomocą standardowych testów toksykologicznych Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®SPT, zgodnie z instrukcją producenta.

Omówienie wyników

Biodegradacja TPH i WWA w glebie

Na podstawie przeprowadzonych analiz chromatograficznych zidentyfikowano oraz ilościowo oznaczono węglowodory ropopochodne obecne w analizowanych próbkach gleby. Sumaryczna zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych TPH w próbce gleby wyjściowej przeznaczonej do badań bioremediacji wynosiła 6062,59 mg/kg s.m. gleby. W wyniku inokulacji gleby biopreparatem z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego NanoSurf EOR uzyskano znaczne obniżenie stężenia TPH, które po 6 miesiącach badań spadło do poziomu 768,11 mg/kg s.m. gleby .Stopnie biodegradacji TPH w kolejnych miesiącach oczyszczania kształtowały się następująco: 42,09% (po 1 miesiącu), 61,47% (po 2 miesiącach), 75,02% (po 3 miesiącach), 79,75% (po 4 miesiącach), 84,39% (po 5 miesiącach) i 87,34% (po 6 miesiącach). Na rysunku 1 przedstawiono zmianę stężeń TPH w glebie G6 w trakcie bioremediacji gleby na drodze bioaugmentacji biopreparatem wzbogaconym surfaktantem NanoSurf EOR w kolejnych odstępach czasu pomiarowego (gleba G6-1M – gleba po 1 miesiącu bioremediacji, gleba G6-2M – gleba po 2 miesiącach bioremediacji itd.).



Rysunek 1. Porównanie zmian zawartości TPH w trakcie bioremediacji gleby na drodze inokulacji biopreparatem z dodatkiem środka powierzchniowo-czynnego NanoSurf EOR (metodą *ex situ*)

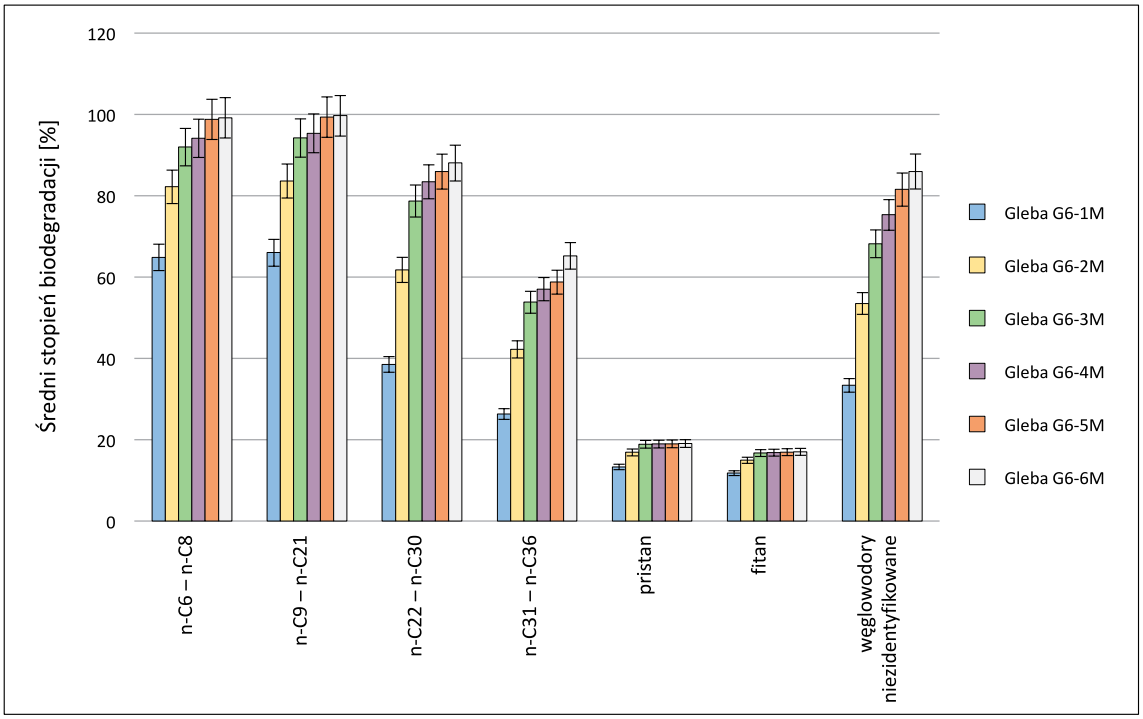
Figure 1. Comparison of changes in TPH content during soil bioremediation by inoculation with a mixture of biopreparation and NanoSurf EOR surfactant (*ex situ* method)

Wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że podczas inokulacji gleby biopreparatem z dodatkiem surfaktantu NanoSurf EOR najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego n-C9–n-C21. W kolejnych miesiącach pomiarowych odnotowano spadek ich stężenia w zakresach: 59,72–67,69% (gleba G6-1M), 75,69–85,79% (gleba G6-2M), 90,89–95,99% (gleba G6-3M), 93,87–96,85% (gleba G6-4M), 98,93–99,84% (gleba G6-5M) oraz 99,31–99,94% (gleba G6-6M). Stężenie węglowodorów lekkich o długości łańcucha węglowego n-C6–n-C8 w kolejnych miesiącach procesu oczyszczania zmalało o: 62,78–66,78% (po 1 miesiącu), 79,57–84,64% (po 2 miesiącach),

89,02–94,69% (po 3 miesiącach), 93,68–95,55% (po 4 miesiącach), 98,69–98,98% (po 5 miesiącach) i 99,08–99,37% (po 6 miesiącach). Węglowodory z zakresu n-C22–n-C30 również ulegały biodegradacji w zadowalającym stopniu, czego potwierdzeniem są obliczone wartości stopni biodegradacji wynoszące: 34,71–42,38% (gleba G6-1M), 55,64–67,94% (gleba G6-2M), 70,90–85,73% (gleba G6-3M), 75,15–91,76% (gleba G6-4M), 77,40–94,51% (gleba G6-5M) oraz 78,95–96,40% (gleba G6-6M). Węglowodory zawierające powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce, które należą do związków trudno biodegradowalnych, ulegały rozkładowi w niższym stopniu. Wartości stopni biodegradacji węglowodorów ciężkich w kolejnych miesiącach zawierały się w granicach: 22,01–32,20% (1 miesiąc), 35,29–51,61% (2 miesiąc), 44,97–65,77% (3 miesiąc), 47,66–69,71% (4 miesiąc), 49,09–71,80% (5 miesiąc) oraz 56,68–75,24% (6 miesiąc). W wyniku prowadzonych badań bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi odnotowano również spadek niezidentyfikowanych węglowodorów alifatycznych, których wydajność biodegradacji wynosiła: 33,39% (po 1 miesiącu), 53,53% (po 2 miesiącach), 68,24% (po 3 miesiącach), 75,30% (po 4 miesiącach), 81,53% (po 5 miesiącach) i 85,97% (po 6 miesiącach). Wartości średnich stopni biodegradacji dla poszczególnych grup węglowodorów alifatycznych w badanych próbkach gleby przedstawiono na rysunku 2.

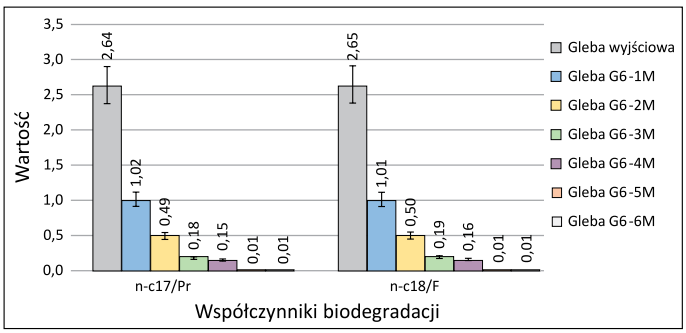
Przeprowadzone analizy chromatograficzne wykazały ponadto spadek stężenia trudno biodegradowalnych związków – pristanu i fitanu – w badanej glebie. W kolejnych miesiącach prowadzenia procesu oczyszczania w skali półtechnicznej odnotowano następujące wartości stopni biodegradacji pristanu: 13,34% (gleba G6-1M), 16,90% (gleba G6-2M), 18,91% (gleba G6-3M), 18,96% (gleba G6-4M), 19,02% (gleba G6-5M) i 19,10% (gleba G6-6M) oraz fitanu: 11,81% (gleba G6-1M), 14,97% (gleba G6-2M), 16,75% (gleba G6-3M), 16,85% (gleba G6-4M), 16,98% (gleba G6-5M) i 17,05% (gleba G6-6M). Miarą efektywności procesu bioremediacji gleb zanieczyszczonych TPH są również wskaźniki oceny stopnia biodegradacji n-C17/Pr oraz n-C18/F. Na przestrzeni kolejnych miesięcy badań uległy one znacznemu obniżeniu, co potwierdza skuteczność prowadzonych zabiegów remediacji. Na rysunku 3 zobrazowano zmiany wartości wskaźników oceny stopnia biodegradacji TPH w glebie poddanej inokulacji biopreparatem z dodatkiem NanoSurf EOR.

Ponadto na skutek przeprowadzonego w warunkach półtechnicznych procesu oczyszczania gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi z wykorzystaniem techniki inokulacji biopreparatem z dodatkiem środka powierzchniowo-czynnego NanoSurf EOR po 6 miesiącach osiągnięto obniżenie zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z 12,05 mg/kg s.m. gleby do 1,60 mg/kg s.m. gleby. Stopnie biodegradacji WWA w kolejnych miesiącach oczyszczania kształtowały się następująco: 34,22% (po 1 miesiącu), 56,38% (po 2 miesiącach), 70,23% (po 3 miesiącach), 76,59% (po 4 miesiącach), 82,59% (po 5 miesiącach), 86,73%



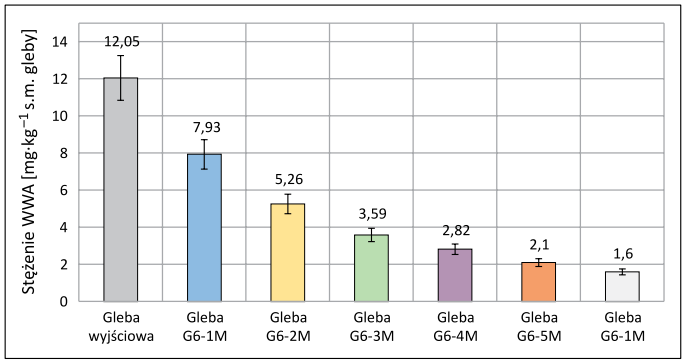
Rysunek 2. Średnie wartości stopni biodegradacji wybranych grup węglowodorów alifatycznych w trakcie prowadzenia procesu bioremediacji gleby G6

Figure 2. Average biodegradation rates of selected groups of aliphatic hydrocarbons during the G6 soil bioremediation process



Rysunek 3. Wartości stosunków n-C17/Pr i n-C18/F w glebie inokulowanej mieszaniną biopreparatu i surfaktantu NanoSurf EOR (metoda *ex situ*) w kolejnych miesiącach prowadzenia procesu

Figure 3. Values of the n-C17/Pr and n-C18/F ratios in soil inoculated with a mixture of the biopreparation and NanoSurf EOR surfactant (*ex situ* method)

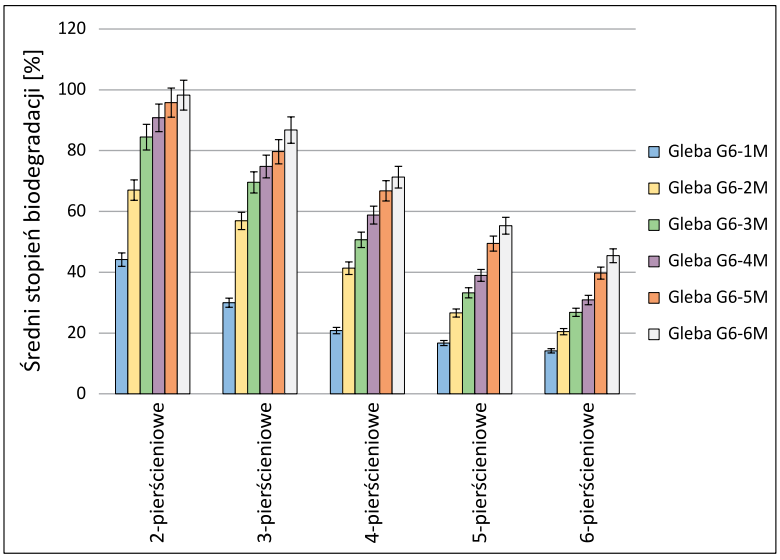


Rysunek 4. Porównanie zmian zawartości WWA w trakcie bioremediacji gleby na drodze inokulacji biopreparatem z dodatkiem surfaktantu NanoSurf EOR (metodą *ex situ*)

Figure 4. Comparison of changes in PAH content during soil bioremediation by inoculation with a mixture of biopreparation and NanoSurf EOR surfactant (*ex situ* method)

(po 6 miesiącach). Przebieg zmian zawartości wielopierścieniowych węglowodorów ropopochodnych w glebie zaszczepionej biopreparatem z dodatkiem surfaktantu NanoSurf EOR zobrazowano na rysunku 4.

Przeprowadzona analiza chromatograficzna pozwoliła na określenie efektywności rozkładu biologicznego poszczególnych zidentyfikowanych WWA. W glebie pobranej z terenu skażonego historycznie, którą poddano zabiegom inokulacji biopreparatem z dodatkiem wytypowanego na etapie badań laboratoryjnych surfaktantu, zaobserwowano wysokie wartości stopni biodegradacji dla naftalenu. W kolejnych odstępach czasu pomiarowego stężenie naftalenu w glebie malało o odpowiednio: 44,17% (po 1 miesiącu), 67,04% (po 2 miesiącach), 84,44% (po 3 miesiącach), 90,79% (po 4 miesiącach), 95,80% (po 5 miesiącach) oraz 98,25% (po 6 miesiącach). Trójpierścieniowe węglowodory aromatyczne, do których należą acenaften, fluoren, fenantren, antracen, uległy rozkładowi na poziomach: 28,22–32,28% (gleba G6-1M), 55,60–59,12% (gleba G6-2M), 68,16–71,40% (gleba G6-3M), 73,29–76,77% (gleba G6-4M), 78,25–81,48% (gleba G6-5M) oraz 84,90–89,06% (gleba G6-6M). Fluoranten, piren, benzo(a)antracen oraz chryzen, zaliczane do 4-pierścieniowych WWA, również ulegały biodegradacji w zadowalającym stopniu. Obliczone wartości stopni biodegradacji 4-pierścieniowych WWA na przestrzeni sześciomiesięcznego procesu oczyszczania gleby wynosiły odpowiednio: 19,95–22,41% (po 1 miesiącu), 38,69–45,04% (po 2 miesiącach), 49,69–51,77% (po 3 miesiącach), 58,23–59,51% (po 4 miesiącach), 65,72–68,24% (po 5 miesiącach) oraz 69,09–72,94% (po 6 miesiącach). Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań wykazały, że najtrudniej biodegradacji ulegały 5-pierścieniowe oraz 6-pierścieniowe WWA. W badanych próbkach gleby wartości stopni biodegradacji węglowodorów zawierających 5 i 6 pierścieni aromatycznych w cząsteczce wynosiły: 13,87–17,11% (gleba G6-1M), 20,69–27,00% (gleba G6-2M), 26,71–33,64% (gleba G6-3M), 30,72–39,43% (gleba G6-4M), 38,59–49,51% (gleba G6-5M) oraz 43,78–56,35% (gleba G6-6M). Uzyskane wyniki analiz chromatograficznych WWA w próbkach gleby pobieranych w miesięcznych odstępach czasowych potwierdziły, że efektywność biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zależy od liczby pierścieni aromatycznych w cząsteczce i maleje w kolejności: WWA 2-pierścieniowe → WWA 3-pierścieniowe → WWA 4-pierścieniowe → WWA



Rysunek 5. Średnie wartości stopni biodegradacji wybranych grup wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w trakcie prowadzenia procesu bioremediacji gleby G6

Figure 5. Average biodegradation rates of selected groups of polycyclic aromatic hydrocarbons during the G6 soil bioremediation process

5-pierścieniowe → WWA 6-pierścieniowe. Zmiany średniego stopnia biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w zależności od liczby pierścieni aromatycznych w cząsteczce zamieszczono na rysunku 5.

Monitoring toksykologiczny

W celu określenia zmian toksyczności gleby G6 w trakcie oczyszczania metodą biodegradacji wspomaganej inokulacją biopreparatem z dodatkiem środka powierzchniowo-czynnego NanoSurf EOR przeprowadzono testy toksykologiczne z wykorzystaniem organizmów testowych należących do roślin wyższych (test Phytotoxkit™), pierwotniaków (test Ostracodtoxkit F™) i bakterii (test Microtox®SPT). Zestawienie szczegółowych wyników uzyskanych w wyniku monitoringu toksykologicznego gleby G6 oczyszczanej techniką biodegradacji wspomaganej inokulacją biopreparatem z dodatkiem surfaktantu NanoSurf EOR zamieszczono w tabeli 1.

Wyniki testu fitotoksyczności wykazały, że próbka gleby G6 charakteryzowała się średnim stopniem toksyczności względem testowanych roślin: *Sorghum saccharatum* (sorgo cukrowe), *Lepidium sativum* (pieprzyca siewna) oraz *Sinapis alba* (gorczyca biała). Najbardziej wrażliwa na zanieczyszczenia z grupy TPH i WWA okazała się pieprzyca siewna, dla której po 72 h testu odnotowano zahamowanie wzrostu korzeni na poziomie 18,68%. Nieznacznie wyższą odporność na zanieczyszczenia wykazało sorgo cukrowe (15,00%) oraz gorczyca biała (18,55%). Przeprowadzony zabieg bioremediacji spowodował obniżenie toksyczności badanej gleby, czego dowodem są wyniki testu Phytotoxkit™ przeprowadzone na próbkach pobieranych w kolejnych miesiącach pomiarowych. Dla gleby G6-6M (po 6 miesiącach bioremediacji) odnotowano wzrost średniej długości korzeni z: 42,9 mm do 49,8 mm dla *Sorghum saccharatum*, 55,9 mm do 67,4 mm dla *Lepidium sativum* oraz 69,3 mm do 82,3 mm dla *Sinapis alba*, natomiast wartości zahamowania wzrostu korzeni wynosiły 0,40% (sorgo cukrowe), 0,88% (pieprzyca siewna) i 0,84% (gorczyca biała). Drugim ocenianym parametrem w teście fitotoksyczności Phytotoxkit™ był procent wykiełkowanych nasion zastosowanych bioindykatorów. W próbce gleby wyjściowej parametr ten kształtował się na poziomie 80% dla *Sorghum saccharatum* i *Sinapis alba* oraz 70% dla *Lepidium sativum*. Oczyszczanie gleby pozwoliło na uzyskanie 100% kiełkowania gorczycy białej na próbce gleby pobranej po 2 miesiącach bioremediacji. Sorgo cukrowe i pieprzyca siewna uzyskały 100% kiełkowania na próbkach gleby pobranych po 4 miesiącach oczyszczania. Drugim przeprowadzonym testem toksykologicznym był test toksyczności chronicznej Ostracodtoxkit F™, w którym wykorzystano bioindykatory z poziomu troficznego

Tabela 1. Zestawienie wyników przeprowadzonych testów toksykologicznych w trakcie bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi

Table 1. Summary of the results of toxicological tests performed during bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil

Testowany organizm	Mierzony parametr	Gleba							
		kontrolna (niezanieczyszczona)	wyjściowa G6	G6-1M	G6-2M	G6-3M	G6-4M	G6-5M	G6-6M
Phytotoxkit™									
Sorghum saccharatum	kiełkowanie [%]	100	80	80	90	90	100	100	100
	średnia długość korzenia [mm]	50	42,9	44,6	46,4	47,8	48,5	49,2	49,8
	zahamowanie wzrostu [%]	0	14,20	10,80	7,20	4,40	3,00	1,60	0,40
Lepidium sativum	kiełkowanie [%]	100	70	80	90	90	100	100	100
	średnia długość korzenia [mm]	68	55,9	58,4	61,5	63,3	65	66,8	67,4
	zahamowanie wzrostu [%]	0	17,79	14,12	9,56	6,91	4,41	1,76	0,88
Sinapis alba	kiełkowanie [%]	100	80	90	100	100	100	100	100
	średnia długość korzenia [mm]	83	69,3	73,5	76,1	78,4	80,4	81,5	82,3
	zahamowanie wzrostu [%]	0	16,51	11,45	8,31	5,54	3,13	1,81	0,84
Ostracodtoxkit F™									
Heterocypris incongruens	średnia śmiertelność [%]	2	15,00	13,33	10,00	6,67	5,00	3,33	3,33
	średnia długość *Heterocypris incongruens* [µm]	776	710	727	736	745	756	762	765
	średnia hamowania wzrostu [%]	–	8,51	6,31	5,15	3,99	2,58	1,80	1,42
Microtox®SPT									
Vibrio fischeri	wartość współczynnika TU	0	4,8	3,7	2,7	2	1,2	0,8	0,4

konsumentów. W teście tym dla próbki gleby wyjściowej G6 odnotowano średnią śmiertelność małżoraczków z gatunku *Heterocypris incongruens* na poziomie 15,00% oraz zahamowanie ich wzrostu o 8,51% w odniesieniu do gleby kontrolnej. Sukcesywne obniżanie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie spowodowało obniżanie jej toksyczności względem organizmów testowych, czego dowodem jest wzrost efektu przeżyciowego *Heterocypris incongruens* do 96,67% w glebie G6-6M. Średnia hamowania wzrostu małżoraczków w wyniku prowadzonych zabiegów remediacyjnych po zakończeniu procesu oczyszczania spadła do wartości 1,42%. Ostatnim omawianym biotestem wykorzystywanym podczas monitoringu gleby pod kątem zmian jej toksyczności był test Microtox®SPT. W teście tym bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri* mają bezpośredni kontakt z testowaną próbką gleby, dzięki czemu istnieje możliwość wykrycia nie tylko substancji rozpuszczalnych w wodzie, ale również związków hydrofobowych i lipidowych (Kluk i Steliga, 2017). Badania toksyczności próbek glebowych na poziomie troficznym reducentów wykazały, że próbka gleby wyjściowej G6 była słabo toksyczna (klasa 2 wg Persoone'a), o czym świadczy wartość współczynnika toksyczności TU = 4,8. Spadek stężenia TPH i WWA w glebie w wyniku prowadzonego procesu oczyszczania wpłynął na obniżenie wartości współczynnika TU do 0,4. Tak niska wartość współczynnika toksyczności dla próbki gleby G6-6M wskazuje na brak istotnej toksyczności oczyszczonej gleby wg klasyfikacji Persoone'a (klasa 1 – TU < 1 – brak istotnej toksyczności).

Podsumowanie

Badania bioremediacji prowadzone metodą pryzmowania *ex situ* wykazały, że technika biodegradacji wspomaganej bioaugmentacją z dodatkiem środka powierzchniowo-czynnego może być wykorzystywana do oczyszczania gleb historycznie zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. Skuteczność stosowanych zabiegów remediacyjnych potwierdziły wyniki przeprowadzonych analiz chromatograficznych dla próbek glebowych pobieranych z układu badawczego w kolejnych miesiącach oczyszczania. W wyniku inokulacji gleby po sześciu miesiącach bioremediacji uzyskano znaczne obniżenie stężenia węglowodorów ropopochodnych w glebie, kształtujące się na poziomie 87,34% (TPH) oraz 86,73% (WWA). Analizując skuteczność techniki biodegradacji wspomaganej inokulacją biopreparatem z dodatkiem surfaktantu NanoSurf EOR, nie sposób nie odnieść się do wcześniejszych badań bioremediacji prowadzonych w analogicznych warunkach. Wykazano, że inokulacja gleby samym biopreparatem pozwala na obniżenie stężenia TPH i WWA odpowiednio o 70,73% i 64,60%, natomiast zaszczepienie gleby biopreparatem z dodatkiem mieszaniny biosurfaktantów – o 87,32% (TPH) i 81,77% (WWA) (Wojtowicz i Steliga, 2024). Poza tym warto zauważyć, że w przypadku gleb historycznie zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi proces samooczyszczania jest mało skuteczny, co wynika z silnej adsorpcji zanieczyszczeń na powierzchni i w przestrzeniach porowatych matrycy glebowej. Wcześniejsze wyniki badań bioremediacji wskazywały, że biodegradacja samoistna umożliwiła spadek stężenia TPH i WWA w glebie o 11,51% i 9,21% (Wojtowicz i Jakubowicz, 2024). Kolejnym aspektem oceny skuteczności biodegradacji wspomaganej inokulacją biopreparatem z dodatkiem surfaktantu NanoSurf EOR są wyniki uzyskane w testach toksykologicznych Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®SPT, które potwierdziły, że w efekcie zastosowania tej techniki oczyszczania nastąpiła poprawa jakości gleby. Ponadto, przedstawiona w niniejszym artykule metoda bioremediacji w porównaniu z wcześniej opisanymi podejściami badawczymi realizowanymi w porównywalnych warunkach eksperymentalnych (Wojtowicz i Jakubowicz, 2024; Wojtowicz i Steliga, 2024) wykazała najniższy poziom toksyczności gleby, oceniany na podstawie odpowiedzi zastosowanych bioindykatorów.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Ocena możliwości wykorzystania surfaktantów syntetycznych w procesie remediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi*, praca INiG – PIB; nr zlecenia: 0029/KE/2024, nr archiwalny: DK-4100-0015/2024.

Literatura

Alcántara M.T., Gómez J., Pazos M., Sanromán M.A., 2009. PAHs soil decontamination in two steps: Desorption and electrochemical treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 166: 462–468. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.11.050.

Bognolo G., 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152: 41–52. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00684-0.

Chowdhury S., Rakshit A., Acharjee A., Saha B., 2021. Biodegradability and biocompatibility: Advancements in synthetic surfactants. *Journal of Molecular Liquids*, 324: 115105. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.115105.

Danial W.H., 2023. Surfactant Biodegradation. [W:] Ali G.A.M., Makhlouf A.S.H. (eds.), Handbook of Biodegradable Materials. *Springer International Publishing, Cham*, 1621–1649. DOI: 10.1007/978-3-031-09710-2_26.

Davin M., Starren A., Deleu M., Lognay G., Colinet G., Fauconnier M.-L., 2018. Could saponins be used to enhance bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged-contaminated soils? *Chemosphere*, 194: 414–421. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.174.

Di Trapani D., De Marines F., Lucchina P.G., Viviani G., 2023. Surfactant-enhanced mobilization of hydrocarbons from soil: Comparison between anionic and nonionic surfactants in terms of remediation efficiency and residual phytotoxicity. *Process Safety*

and Environmental Protection, 180: 1–9. DOI: 10.1016/j.psep.2023.09.071.

Han D., Mao J., Zhao J., Zhang H., Yang X., Lin C., 2023. Effect of surfactant hydrophobic chain equivalence on the oil-water interface and emulsion stability: A dissipative particle dynamics and experimental study. *Journal of Molecular Liquids*, 382: 121781. DOI: 10.1016/j.molliq.2023.121781.

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.

Karthick A., Roy B., Chattopadhyay P., 2019. A review on the application of chemical surfactant and surfactant foam for remediation of petroleum oil contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 243: 187–205. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.04.092.

Kluk D., Steliga T., 2017. Efektywna metoda identyfikacji zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w glebach. *Nafta-Gaz*, 73(7): 488–495. DOI: 10.18668/NG.2017.07.06.

Lai C.-C., Huang Y.-C., Wei Y.-H., Chang J.-S., 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 609–614. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.01.017.

Leharne S., 2022. Risk assessment and remediation of NAPL contaminated soil and groundwater. *ChemTexts*, 8, 5. DOI: 10.1007/s40828-021-00156-9.

Li P., Sun T., Stagnitti F., Zhang C., Zhang H., Xiong X., Allinson G., Ma X., Allinson M., 2002. Field-Scale Bioremediation of Soil Contaminated with Crude Oil. *Environmental Engineering Science*, 19: 277–289. DOI: 10.1089/10928750260418926.

Liu J.-W., Wei K.-H., Xu S.-W., Cui J., Ma J., Xiao X.-L., Xi B.-D., He X.-S., 2021. Surfactant-enhanced remediation of oil-contaminated soil and groundwater: A review. *Science of the Total Environment*, 756: 144142. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144142.

Mohanty S., Jasmine J., Mukherji S., 2013. Practical Considerations and Challenges Involved in Surfactant Enhanced Bioremediation of Oil. *BioMed Research International*, 1–16. DOI: 10.1155/2013/328608.

Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60: 371–380. DOI: 10.1016/S0013-7952(00)00117-4.

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.

Pei G., Zhu Y., Cai X., Shi W., Li H., 2017. Surfactant flushing remediation of o-dichlorobenzene and p-dichlorobenzene contaminated soil. *Chemosphere*, 185: 1112–1121. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.098.

Scott M.J., Jones M.N., 2000. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1508: 235–251. DOI: 10.1016/S0304-4157(00)00013-7.

Song B., Zeng G., Gong J., Liang J., Xu P., Liu Z., Zhang Y., Zhang C., Cheng M., Liu Y., Ye S., Yi H., Ren X., 2017. Evaluation methods for assessing effectiveness of *in situ* remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. *Environment International*, 105: 43–55. DOI: 10.1016/j.envint.2017.05.001.

St. Germain R., 2024. High-Resolution Delineation of Petroleum NAPLs. [W:] García-Rincón J., Gatsios E., Lenhard R.J., Atekwana E.A., Naidu R. (eds.), Advances in the Characterisation and Remediation of Sites Contaminated with Petroleum Hydrocarbons. *Springer International Publishing, Cham*, 213–286. DOI: 10.1007/978-3-031-34447-3_8.

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.

Venkatraman G., Giribabu N., Mohan P.S., Muttiah B., Govindarajan V.K., Alagiri M., Abdul Rahman P.S., Karsani S.A., 2024. Environmental impact and human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and remedial strategies: A detailed review. *Chemosphere*, 351: 141227. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2024.141227.

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.

Wojtowicz K., Jakubowicz P., 2024. Badania fitoremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi z zastosowaniem Glechoma hederacea. *Nafta-Gaz*. 80(6): 352–360. DOI: 10.18668/NG.2024.06.04.

Wojtowicz K., Steliga T., 2024. Wpływ mieszaniny biosurfaktantów na efektywność bioremediacji gruntu zanieczyszczonego węglowodorami ropopochodnymi. *Nafta-Gaz*, 80(5): 269–278. DOI: 10.18668/NG.2024.05.02.

Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., 2023. Evaluation of the Effectiveness of Bioaugmentation-Assisted Phytoremediation of Soils Contaminated with Petroleum Hydrocarbons Using Echinacea purpurea. *Applied Sciences*, 13: 13077. DOI: 10.3390/app132413077.

Wu L., Zhang J., Chen F., Li J., Wang W., Li S., Hu L., 2024. Mechanisms, Applications, and Risk Analysis of Surfactant-Enhanced Remediation of Hydrophobic Organic Contaminated Soil. *Water*, 16: 2093. DOI: 10.3390/w16152093.



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*