

Katarzyna PIEKARSKA, Barbara KOŁWZAN, Teodora M. TRACZEWSKA

Politechnika Wroclawska  
Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska  
50-370 Wrocław, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27

## ZASTOSOWANIE METOD BIOLOGICZNYCH DO PROGNOZOWANIA BIODEGRADACJI SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH W GRUNTACH

**Streszczenie.** Praca zawiera ocenę możliwości zastosowania metod biologicznych w prognozowaniu biodegradacji substancji ropopochodnych w gruntach. Badania przeprowadzono na dużej liczbie prób gruntów pochodzących z terenu całej Polski, zawierających różne stężenia węglowodorów. Metodami statystycznymi starano się wyznaczyć korelacje pomiędzy badanymi parametrami. Badania wykazały, iż prognozowanie przebiegu procesu biodegradacji wymaga analizy wielu parametrów skażonego gruntu, które powinny być brane pod uwagę w toku przeprowadzanego procesu oczyszczania.

## APPLICATION OF BIOLOGICAL METHODS IN ESTIMATION OF THE BIODEGRADATION PROCESS OF PETROLEUM PRODUCTS IN SOIL

**Summary.** This paper presents the results of studies on the applications of biological methods to estimate petroleum products biodegradation in soil. Research was carried out on soil samples containing different concentrations of hydrocarbons. Statistics methods were used to calculate the correlation between the investigated parameters. It was found that prognosis of the biodegradation process of petroleum products in soil requires analysis of a lot of parameters of contaminated soil.

### WSTĘP

Zanieczyszczenie środowiska wodno-gruntowego substancjami ropopochodnymi związane jest z rosnącym zapotrzebowaniem na produkty przemysłu naftowego. Przedostawanie się tych substancji do otwartych zbiorników wodnych, wód gruntowych i ziemi uprawnej może spowodować poważne następstwa wynikające z silnie toksycznego i mutagennego ich charakteru. Substancje ropopochodne są bowiem mieszaniną węglowodorów (ciekłych, stałych i gazowych), głównie parafinowych, naftenowych i aromatycznych [10,11,13].

Zagadnienie oczyszczania środowiska gruntowego z substancji ropopochodnych jest wciąż nie rozwiązane w sposób zadowalający. Usunięcie tych substancji jest zwykle przedsięwzięciem trudnym i kosztownym, ponieważ wymaga często zastosowania nie jednej, lecz wielu metod po sobie następujących. Najczęściej polega ono na oczyszczaniu skażonego gruntu metodami fizycznymi bądź chemicznymi. W procesach rozkładu produktów naftowych na dużą uwagę zasługują metody biologiczne. Wprowadzie mikroorganizmy są zdolne do degradacji tego typu związków, jednakże proces samooczyszczania zachodzi bardzo wolno i trzeba dziesiątek, a nawet setek lat, aby uporały się z tym problemem. Dlatego też konieczne jest przyspieszenie tego procesu poprzez celowe działanie człowieka [4,6,16].

Coraz częściej prowadzi się więc badania nad przyspieszeniem biodegradacji węglowodorów na drodze procesów biotechnologicznych, przy wykorzystaniu aktywnych, czystych kultur drobnoustrojów uprzednio wyizolowanych z silnie skażonych środowisk naturalnych. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz dużą skuteczność metody biologiczne znajdują praktyczne zastosowanie na skalę techniczną [1,5].

Biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych w skażonym środowisku uzależniona jest od wielu czynników fizyczno-chemiczno-biologicznych. Najbardziej istotne to: właściwości fizykochemiczne gleby, stężenie i struktura chemiczna zanieczyszczeń, stężenie związków biogennych (azotu i fosforu), temperatura, zawartość tlenu, wilgotność, ciśnienie, odczyn (pH) gleby, zawartość związków organicznych, obecność związków toksycznych, skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów oraz ich aktywność metaboliczna [17].

W Polsce istnieje dużo terenów zniszczonych rozlewami substancji ropopochodnych [12]. Skażenie środowiska na tych terenach stało się przedmiotem licznych badań i prac rekultywacyjnych. Wiele firm opracowuje metody likwidacji skażeń ropopochodnych z zastosowaniem metod biologicznych oraz zajmuje się prognozowaniem możliwości bioremediacji skażonych węglowodorami terenów [3,9]. Istnieje więc potrzeba wskazania standardowych metod pozwalających na kontrolę zachodzących procesów biodegradacji.

*Celem pracy była ocena możliwości zastosowania wybranych metod biologicznych w prognozowaniu biodegradacji substancji ropopochodnych w gruntach.*

## MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiły próby gruntu zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi pobierane z terenów całej Polski przez firmę „Ekokonrem” oraz próby gruntu pobierane na terenie rejonowej stacji PKP Wrocław-Brochów, w trakcie jego oczyszczania na płycie do bioremediacji, przez firmę „EKO-MED”.

W toku badań laboratoryjnych wyznaczono następujące parametry dla badanych prób gruntu:

1. Liczbę bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów metodą najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii NPL wg Mc Crady'ego na płynnym podłożu mineralnym Siskinej-Trocenka z dodatkiem substancji ropopochodnych skażających daną próbę jako jedyne źródło węgla i energii.
2. Miano bakterii rozkładających produkty ropopochodne na płynnym podłożu mineralnym Siskinej-Trocenka z dodatkiem substancji ropopochodnych skażających daną próbę jako jedyne źródło węgla i energii.

3. Liczbę bakterii heterotroficznych metodą najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii NPL wg Mc Crady'ego na podłożu bulionowym.
4. Intensywność pobierania tlenu przez mikroorganizmy zasiedlające badane gleby metodą manometryczną Warburga lub zmodyfikowaną metodą miareczkową Winklera.
5. Ilość dwutlenku węgla wydzielaną przez mikroorganizmy zasiedlające badane gleby metodą miareczkową, po uprzednim związaniu przez NaOH.
6. Postęp procesu biodegradacji substancji ropopochodnych metodą chromatograficzną po 7 i 14 dniach. Próby inkubowano w warunkach tlenowych przy maksymalnym ograniczeniu dyfuzji tlenu z powietrza. Uzyskano to poprzez umieszczenie prób w bioreaktorach o ograniczonym dostępie tlenu. Temperatura inkubacji wynosiła 20<sup>0</sup>C. Próby umieszczano w termostatach pozbawionych dostępu światła. Ubytek węglowodorów w próbach oznaczono metodą SPE z detekcją GC-MS. W próbach pochodzących z płyty bioremediacyjnej oznaczano stężenie węglowodorów bezpośrednio po pobraniu.
7. Dla danych uzyskanych we wszystkich badaniach określono współczynniki korelacji. Obliczenia zostały wykonane za pomocą programu komputerowego Microsoft Excel 97 na komputerze PC z procesorem Pentium 2.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Przeprowadzone analizy wykazały bardzo duże zróżnicowane wartości parametrów biologicznych badanych gruntów, co znalazło odzwierciedlenie we współczynnikach korelacji wyznaczonych pomiędzy nimi (tabele 1, 2). Przebadano bowiem grunty pochodzące z wielu regionów kraju, różniące się rodzajem zanieczyszczeń ropopochodnych i właściwościami fizykochemicznymi.

Zawartość substancji ropopochodnych w gruntach wahała się od ilości śladowej do 1538,2 mg/kg (próba 32). W większości przypadkach nie przekraczała jednak poziomu 146 mg/kg. Samooczyszczanie badanych gruntów przebiegało z różną intensywnością. Po 14 dniach obserwacji osiągało ono od 15,4% (próba 28) do 98% (próba 16). Postęp biodegradacji nie był uzależniony od początkowego stężenia substancji ropopochodnych w badanym materiale. Współczynniki korelacji wyznaczone pomiędzy początkowym ich stężeniem a ubytkiem węglowodorów po 7 i 14 dniach inkubacji wynosiły 0,206 i 0,232. Te niskie korelacje były spowodowane zapewne tym, iż obserwowany ubytek produktów naftowych jest wypadkową wielu procesów. W przypadku świeżego rozlewu mamy do czynienia początkowo z procesem parowania lekkich frakcji węglowodorowych, co przekłada się na duży postęp rozkładu. Z drugiej strony struktura gruntu decyduje o tzw. biodostępności, czyli szybkości wykorzystywania przez drobnoustroje poszczególnych frakcji jako źródła węgla i energii. W gruncie ścisłym i gliniastym procesy rozkładu będą zachodziły wolniej niż w piaszczystym. Duża korelacja wynosząca 0,681 istniała jedynie pomiędzy ubytkiem węglowodorów po 7 i 14 dniach. Oznacza to, że wystarczy zbadać tylko jeden z przedstawionych parametrów, aby poznać postęp procesu samooczyszczania w gruncie.

Tabela 1

Wybrane parametry gruntów pobranych w różnych rejonach kraju

Lp.	Pochodzenie próby	Głębokość poboru próby [m]	NPL bakterii heterotroficznych [kom./g]	NPL bakterii rozkładających węglowodory [kom./g]	Ilość pobieranego tlenu [ $\mu$ l/h/100g]	Zawartość ropopochodnych w gruncie [mg/kg]	Ubytek węglowodorów po 7 dniach [%]	Ubytek węglowodorów po 14 dniach [%]
1	Łęka	1,0	n.b.	62 000	224,0	65,4	6,6	89,9
2		1,0	n.b.	700 000	217,0	72,7	15,6	78,5
3		1,5	n.b.	2 400 000	15,2	46,3	6,0	87,0
4	Żagań	1,0	n.b.	6 200 000	42,6	8,42	32,9	63,2
5		2,0	n.b.	240 000	12,9	0,31	50,3	51,3
6	Poznań	1,5	n.b.	62 000 000	579,6	10,5	62,9	62,0
7		1,5	n.b.	62 000 000	596,4	9,9	57,4	55,1
8		1,5	n.b.	62 000 000	582,1	11,5	51,9	63,0
9	Piaski	1,0	n.b.	700 000 000	397,3	4,9	28,6	56,1
10		3,0	n.b.	700 000 000	46,3	0,15	76,7	97,3
11	Człuchów	1,0-1,2	n.b.	70 000 000 000	681,5	12,45	1,0	31,5
12		0,9-1,1	n.b.	240 000 000	33,22	0,2	1,0	55,0
13	Łeba	1,0	n.b.	24 000 000 000	407,0	12,2	12,6	19,1
14	Nieporęt	0,2-0,3	n.b.	2 300 000	15,2	207	20,8	23,7
15		0,6-0,7	n.b.	24 000 000	50,2	102	23,5	26,5
16	Ustka	1,0-2,0	n.b.	70 000 000	141,1	0,49	67,3	98,0
17		2,0-3,0	n.b.	70 000 000	187,4	2,9	47,9	68,6
18	Uchań	3,0	n.b.	6 200 000	865,0	83,7	60,0	79,0
19		3,0	n.b.	210 000	627,0	17,1	25,0	37,0
20		3,0	n.b.	70 000	690,0	12,7	36,0	49,0
21	Nieznane	0,0	n.b.	13 000 000	465,0	146,0	22,0	84,9
22		1,5	n.b.	24 000 000	399,0	93,8	12,2	87,0
23	Ugoszcz	0,5	n.b.	2 400 000	90,6(-) 80,4(+)	śląd	n.b.	n.b.
24		1,0	n.b.	7 000 000	99,8(-) 50,2(+)	Śład	n.b.	n.b.
25	Pila	1,1	n.b.	70 000	429,2(-) 12,5(+)	Śład	n.b.	n.b.
26		2,3	n.b.	1 300 000	196,2(-) 120,4(+)	Śład	n.b.	n.b.
27	Świnoujście	0,4	70 000 000 000	2 400 000 000	328,7	21,4	9,4	23,0
28		0,8	7 000 000 000	7 000 000 000	165,1	8,2	12,2	15,4
29	Kołuszki	2,7	700 000 000	90 000 000	111,28	67,7	65,73	73,26
30		3,0	2 400 000 000	24 000 000	89,1	15,8	79,1	93,67
31		3,0	240 000 000	62 000 000	218,43	41,4	39,6	47,58
32	Brzeg	1,0	2 400 000 000	2 400 000 000	226,9	1538,2	58,4	84,5
33	Kalisz Pomorski	2,5-3,0	62 000 000	24 000	19,86(-) 18,33(+)	Śład	n.b.	n.b.
34		2,8-3,0	70 000 000 000	2 400 000	112,83(-) 29,03(+)	Śład	n.b.	n.b.
35	Nowa Sól	1,0	6 200 000 000	62 000 000	41,63(-) 19,5(+)	Śład	n.b.	n.b.
36	Kęszycza Leśna	0,5	7 000 000 000	7 000 000	145,7	0,51	19,5	24,4
37		1,0	700 000 000	13 000 000	12,5(-) 21,4(+)	śląd	n.b.	n.b.

Legenda: n.b. - nie badano, procesy oddechowe badane w (-) nieobecności i w (+) obecności substancji ropopochodnych wprowadzanych dodatkowo do próby

Tabela 2

Współczynniki korelacji dla wybranych parametrów gruntów pobranych w różnych rejonach kraju (m=2, n=37)

Współczynnik korelacji (r)	Głębokość poboru próby [m]	NPL bakterii heterotroficznych	NPL bakterii rozkładających węglowodory	Ilość pobieranego tlenu [ $\mu\text{l/h}/100\text{g}$ ]	Zawartość ropopochodnych w gruncie [mg/kg]	Ubytek węglowodorów po 7 dniach [%]	Ubytek węglowodorów po 14 dniach [%]
Głębokość poboru próby [m]	-	-0,097	-0,108	-0,040	-0,125	0,299	0,189
NPL bakterii heterotroficznych	-0,097	-	-0,099	0,452*	-0,162	-0,375*	-0,316
NPL bakterii rozkładających węglowodory	-0,108	-0,099	-	-0,063	-0,042	-0,099	-0,157
Ilość pobieranego tlenu [ $\mu\text{l/h}/100\text{g}$ ]	-0,040	0,452*	-0,063	-	-0,013	0,188	0,163
Zawartość ropopochodnych w gruncie [mg/kg]	-0,125	-0,162	-0,042	-0,013	-	0,206	0,236
Ubytek węglowodorów po 7 dniach [%]	0,299	-0,375*	-0,099	0,188	0,206	-	0,681*
Ubytek węglowodorów po 14 dniach [%]	0,189	-0,316	-0,157	0,163	0,236	0,681*	-

\* statystycznie istotne przy  $\alpha=0,05$ ;  $r>0,323$

NPL bakterii rozkładających węglowodory ropopochodne wahała się od  $24 \times 10^3$  (próba 33) do  $70 \times 10^9$  komórek/gram (próba 11). Zwykle liczebność ta kształtowała się na poziomie od kilku do kilkuset milionów komórek/gram. Taka ilość bakterii była wystarczająca do przebiegu prawidłowego procesu bioremediacji. Przyjmuje się bowiem, że liczba bakterii zużywających produkty ropopochodne jako jedyne źródło węgla i energii nie powinna być mniejsza niż  $10^5$  komórek/gram gleby [2]. Bardzo znaczne ilości bakterii metabolizujących węglowodory wskazują na ich selekcję i adaptację pod wpływem zanieczyszczenia, które dostało się do gruntu już jakiś czas temu. W tych przypadkach obserwowano także podobny poziom bakterii heterotroficznych (próby 27,28,29,31,32). Może to świadczyć o zachwianiu naturalnej proporcji pomiędzy tymi bakteriami, a co za tym idzie, o wysokim potencjale biodegradacyjnym. Jeżeli w takich przypadkach postęp biodegradacji był niewielki, to w gruncie mogły być obecne trudniej dostępne lub trudnorozkładalne węglowodory (próba 28). Małe ilości tych drobnoustrojów obserwowano w glebach o niewielkim lub śladowym poziomie zanieczyszczeń, co w porównaniu z dużo większym poziomem bakterii heterotroficznych świadczy o zakończeniu procesów rozkładu i ewentualnie pozostaniu w gruncie pewnej puli opornych na biodegradację węglowodorów (próby 20,25,33). Współczynniki korelacji wyznaczone pomiędzy liczebnością drobnoustrojów rozkładających węglowodory a ich początkowym stężeniem w glebie i ubytkiem po 7 dniach oraz liczbą bakterii heterotroficznych były praktycznie bliskie zeru. Współczynnik korelacji pomiędzy tymi bakteriami a ubytkiem substancji ropopochodnych po 14 dniach był ujemny i wyniósł około -0,2.

Liczne występowanie bakterii zdolnych do biodegradacji węglowodorów nie musi świadczyć o ich dużej aktywności metabolicznej. Aby się o tym przekonać, wyznaczono

intensywność pobierania tlenu przez drobnoustroje w badanych próbach gruntu. Proces respiracji prowadzono metodą manometryczną Warburga. Na podstawie 12-godzinnej obserwacji poboru tlenu przez 100-gramowe próbki gleb obliczano średnie jego zużycie w mikrolitrach na godzinę. Ilość pobieranego tlenu wahała się od 12,5  $\mu\text{l/h}$  (próba 37) do 865  $\mu\text{l/h}$  (próba 18). Nie wszędzie jednak tam, gdzie zużycie tlenu było duże mieliśmy do czynienia ze znaczącą ilością bakterii rozkładających węglowodory oraz ze znacznym postępem biodegradacji (próby 19,20). Dowodzić to może przebiegu naturalnych procesów rozkładu materii organicznej nie związanej z rozkładem węglowodorów. Ponadto obserwowano też obniżenie aktywności oddechowej, mimo licznie reprezentowanych specyficznych drobnoustrojów wraz z głębokością warstwy, co jest naturalnym zjawiskiem (próby 3,10,28,37). W niektórych próbach obecność bakterii posiadających zdolność do biodegradacji ropopochodnych nie miała wpływu na procesy oddechowe badanej gleby z uwagi na brak w niej tego substratu. W takich przypadkach badania manometryczne prowadzono także dodając dodatkowo produktu naftowego do gruntu (próby 23-26, 33-35,37). W wyniku takiego postępowania, w większości prób, obserwowano zahamowanie procesów oddechowych świadczące o toksycznym oddziaływaniu węglowodorów, a co za tym idzie - o zakończeniu procesów rozkładu jakiś czas temu. Jednak obecność aktywnych bakterii w tych próbach gwarantuje ich dobry potencjał biodegradacyjny. Ilość pobieranego tlenu przez badane grunty najlepiej korelowała z NPL bakterii heterotroficznych ( $r=0,452$ ), natomiast jej korelacja z ubytkiem węglowodorów po 7 i 14 dniach inkubacji była statystycznie nieistotna ( $r=0,188$  i  $0,163$ ). Współczynnik korelacji z NPL bakterii rozkładających substancje ropopochodne był ujemny i bliski zeru.

Wyniki badań dla prób pobieranych na Wrocławskim Brochowie przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3

Wybrane parametry gruntów pobranych na Wrocławskim Brochowie

Numer próby	Głębokość pobrania próby [m]	Zawartość ropopochodnych w gruncie [mg/kg s.m.]	Ubytek węglowodorów po dwóch miesiącach [%]	Realny ubytek po dwóch miesiącach [mg/kg s.m.]	Miano bakterii rozkładających węglowodory	Ilość CO <sub>2</sub> wydalana przez grunt [mg/g/24h]	Ilość pobieranego tlenu [mgO <sub>2</sub> /g/120h]
I-1	0,5	1866,4	73,6	1373,8	10 <sup>-6</sup>	0,39	0,69
I-2	1	422,7	60,7	256,6	10 <sup>-6</sup>	0,28	0,69
I-3	1,5	921,1	84,6	779,4	10 <sup>-6</sup>	0,32	0,69
II-1	0,5	3010,6	85,8	2583,8	10 <sup>-6</sup>	0,73	0,619
II-2	1	5044,4	82,9	4181,2	10 <sup>-6</sup>	0,5	0,51
II-3	1,5	3152,7	79,9	2520,4	10 <sup>-6</sup>	0,57	0,66
III-1	0,5	1025,5	67	687,4	10 <sup>-6</sup>	0,43	0,637
III-2	1	4255,9	93,8	3991	10 <sup>-6</sup>	0,3	0,477
III-3	1,5	4416,3	98,3	4341,3	10 <sup>-6</sup>	0,27	0,61
IV-1	0,5	3523,5	97	3416,3	10 <sup>-6</sup>	0,41	0,653
IV-2	1	2292,2	91,9	2105,9	10 <sup>-7</sup>	0,35	0,685
IV-3	1,5	1197,2	81,3	973,7	10 <sup>-7</sup>	0,33	0,66
V-1	0,5	1904,3	72,7	1383,7	10 <sup>-7</sup>	0,3	0,662
V-2	1	2430,9	93,9	2282,4	10 <sup>-7</sup>	0,31	0,687
V-3	1,5	5997,7	98,3	5895,8	10 <sup>-7</sup>	0,26	0,66

Tabela 4

Współczynniki korelacji dla wybranych parametrów gruntów pobranych na Wrocławskim Brochowie (m=2, n=15)

Współczynnik korelacji (r)	Głębokość pobrania próby [m]	Zawartość ropopochodnych w gruncie [mg/kg s.m.]	Ubytek węglowodorów po dwóch miesiącach [%]	Realny ubytek [mg/kg s.m.]	Miano bakterii rozkładających węglowodory	Ilość CO <sub>2</sub> wydalana przez grunt [mg/g/24h]	Ilość pobieranego tlenu [mgO <sub>2</sub> /g/120h]
Głębokość pobrania próby [m]	-	0,224	0,333	0,263	-0,173	-0,331	0,025
Zawartość ropopochodnych w gruncie [mg/kg s.m.]	0,224	-	0,705*	0,990*	-0,00016	0,067	-0,572
Ubytek węglowodorów po dwóch miesiącach [%]	0,333	0,705*	-	0,766*	-0,219	-0,118	-0,248
Realny ubytek [mg/kg s.m.]	0,263	0,990*	0,766*	-	-0,035	-0,016	-0,524
Miano bakterii rozkładających węglowodory	-0,173	-0,00016	-0,219	-0,035	-	0,412	-0,357
Ilość CO <sub>2</sub> wydalana przez grunt [mg/g/24h]	-0,331	0,067	-0,118	-0,016	0,412	-	-0,168
Ilość pobieranego tlenu [mgO <sub>2</sub> /g/120h]	0,025	-0,572	-0,248	-0,524	-0,357	-0,168	-

\* statystycznie istotne przy  $\alpha=0,05$ ;  $r>0,513$ 

W tabelach tych umieszczono wyniki średnie z trzykrotnych badań, przeprowadzonych w odstępach dwutygodniowych, gruntu poddanego bioremediacji na specjalnie skonstruowanej do tego celu płycie. Próby pobierano na pięciu stanowiskach z trzech poziomów głębokości. Tego typu proces oczyszczania prowadzony był dla gruntów silnie skażonych produktami naftowymi z zastosowaniem inokulantu zawierającego autochtoniczne, aktywne drobnoustroje. Zawartość ropopochodnych na poszczególnych stanowiskach poboru wahała się od 422,7 (I-2) do 5997,7 (V-3) mg/kgsm. We wszystkich próbach po przeprowadzeniu oczyszczania stwierdzony ubytek węglowodorów wahał się w zakresie od 60%-98%. Stopień ich redukcji, obliczony po dwóch miesiącach, dobrze korelował z ich początkową koncentracją w gruncie ( $r=0,766$  i  $r=0,99$  dla realnego ubytku mierzonego w mg/kgsm). W toku prowadzenia procesu oczyszczania zanotowano obecność w gruncie licznych bakterii mających zdolność do wykorzystywania węglowodorów w charakterze jedyne go źródła węgla i energii. Miano tych bakterii kształtowało się na poziomie  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ . Aktywność oddechowa drobnoustrojów glebowych mierzona ilością wydzielanego dwutlenku węgla była zróżnicowana i wahała się od 0,26 (V-3) do 0,73 (II-1) mg/gsm w ciągu 24-godzinnej obserwacji. Zanotowano jej statystycznie nieistotną korelację,  $r=0,412$ , z ilością bakterii wykorzystujących węglowodory. Współczynnik korelacji pomiędzy tym parametrem a ubytkiem węglowodorów po dwóch miesiącach był bardzo niski i ujemny,  $r=-0,118$ .

Natomiast ilość pobieranego tlenu przez drobnoustroje była mniej zróżnicowana i wahała się w granicach od 0,477 (III-2) do 0,69 (I) mg/gsm w ciągu 120-godzinnej obserwacji. Współczynniki korelacji pomiędzy zużywaniem tlenu przez mikroorganizmy a innymi parametrami były ujemne (dla zawartości ropopochodnych  $r=-0,572$ , a dla ubytku ropopochodnych  $r=-0,524$ ).

## PODSUMOWANIE

Warunkiem stosowania metod biotechnologicznych jest określenie stężenia oraz rodzaju węglowodorów występujących w skażonym gruncie. Oczyszczanie gruntów z ropopochodnych przy zastosowaniu drobnoustrojów jest bowiem możliwe, gdy ich stężenie nie przekracza 10% [17]. Z drugiej strony podatność węglowodorów na rozkład mikrobiologiczny zależy od ich budowy chemicznej. Najłatwiej są rozkładane węglowodory alifatyczne o prostych łańcuchach. Cykloalkany i węglowodory wielopierścieniowe należą do związków słabo biodegradowalnych, a struktury naftenowo-aromatyczne, asfalteny i inne ciężkie frakcje są odporne na mikrobiologiczny rozkład [8,10,13]. Budowa chemiczna zanieczyszczeń, obok warunków fizykochemicznych panujących w zanieczyszczonym gruncie i jego struktury, ma wpływ na wielkość sorpcji produktów naftowych, a tym samym na ich biodostępność [18]. Należy także wspomnieć o zjawisku zahamowania wzrostu drobnoustrojów, a tym samym spadku ich aktywności metabolicznej, na skutek obecności związków toksycznych. Właściwości toksyczne posiadają zarówno niektóre węglowodory, jak i inne substancje chemiczne mogące występować na badanym terenie. Często obok zanieczyszczeń naftowych możemy spotkać np. metale ciężkie. Chemiczna analiza zanieczyszczeń stanowi więc podstawę do prognozowania procesu bioremediacji gruntów i przebiegu ich oczyszczania [10].

Jednym z parametrów pozwalających na ocenę intensywności przebiegu procesów rozkładu oraz potencjalnych zdolności do biodegradacji substancji ropopochodnych jest liczebność bakterii rozkładających węglowodory i wykorzystujących je jako jedyne źródło węgla i energii. Bakterie o takich właściwościach występują w środowisku naturalnym. Ocenia się ich ilość na około 0,1%-1% wszystkich bakterii występujących w powierzchniowej warstwie gleby. Po zanieczyszczeniu gruntu węglowodorami ich ilość może wzrosnąć 1000-krotnie [7]. Jednakże obecność tych bakterii w gruncie, na wysokim poziomie, może być także dowodem na wcześniejszy ich kontakt z zanieczyszczeniem węglowodorowym. Analiza tych mikroorganizmów pozwala więc także na wnioskowanie o selekcji i adaptacji bakterii spowodowanej już zbiodegradowanym skażeniem. Dlatego też, stwierdzenie dużej ilości bakterii zdolnych do rozkładu ropopochodnych nie gwarantuje, że są one metabolicznie aktywne.

Następnym parametrem mogącym być przydatnym w ocenie potencjału biodegradacyjnego gleby jest liczebność bakterii heterotroficznych. Zachwianie bowiem naturalnej proporcji pomiędzy liczebnością bakterii heterotroficznych a liczebnością bakterii aktywnych wobec węglowodorów ropopochodnych jest dowodem selekcji mikroflory, a co za tym idzie - jej zdolności do rozkładu tego specyficznego substratu.

Aktywność biologiczna gleby jest odbiciem ogólnego stanu fizjologicznego drobnoustrojów i ich możliwości biodegradacyjnych. Dobrym wskaźnikiem aktywności metabolicznej drobnoustrojów zasiedlających skażone gleby może być badanie ich aktywności oddechowej. Wysokie zapotrzebowanie mikroorganizmów na tlen, w obecności węglowodorów ropopochodnych, informuje nas o intensywnym przebiegu procesów



rozkładu, a tym samym o wysokim potencjale biodegradacyjnym badanej gleby oraz o braku w niej substancji toksycznych. Nie zawsze jednak wnioski z tego typu badań są tak oczywiste. Wysoka aktywność oddechowa drobnoustrojów glebowych może być wynikiem rozkładu innych substancji organicznych występujących w badanej glebie. Często jednak możemy mieć do czynienia ze zjawiskiem tzw. kooksydacji [2], kiedy to mikroorganizmy potrafią utleniać węglowodory występujące jako dodatkowe, a nie podstawowe źródło węgla. Natomiast w przypadku świeżego skażenia możemy mieć do czynienia z procesem parowania związków o dużej lotności, co w przypadku badań prowadzonych metodami manometrycznymi przyczynia się do otrzymania fałszywych wyników.

Dlatego uzupełnieniem tych badań powinna być analiza ilości wydzielanego dwutlenku węgla. Procesy biodegradacji prowadzone są najczęściej przez wyspecjalizowane zespoły mikroorganizmów należących do różnych grup taksonomicznych przeprowadzających kolejne etapy degradacji [2]. W wyniku takiego współdziałania dochodzi do całkowitego rozkładu zanieczyszczeń z wydzieleniem dwutlenku węgla i wody.

Podsumowując, należy stwierdzić, iż analiza poziomu przedstawionych w pracy parametrów biologicznych może być niezwykle pomocna zarówno w prognozowaniu procesów biodegradacji substancji ropopochodnych, jak i w toku prowadzonych prac bioremediacyjnych. Znajomość aktywności biologicznej gruntu wraz z jego fizyczno-chemiczną charakterystyką oraz strukturą i stężeniem zanieczyszczeń węglowodorowych pozwala także wybrać odpowiednią, indywidualną dla danego terenu, metodę oczyszczania. Bardzo często w gruncie świeżo zanieczyszczonym o nie wykształconym jeszcze aktywnym zespole drobnoustrojów lub silnie skażonym o małej zdolności biodegradacyjnej istnieje konieczność wprowadzenia inokulantów. Inokulanty takie powinny zawierać, namnożone uprzednio, mikroorganizmy autochtoniczne pochodzące z zanieczyszczonego środowiska [14,15]. Tylko one bowiem nie spowodują zachwiania naturalnej równowagi biologicznej, będą miały szansę przeżyć w zanieczyszczonej biocenozie, a tym samym zagwarantują odpowiednio wysoki potencjał biodegradacyjny. W takim przypadku konieczna jest kontrola parametrów biologicznych oczyszczanego gruntu w trakcie prowadzonych prac bioremediacyjnych. Obserwacja tych parametrów, obok niezaprzeczalnych korzyści wynikających ze śledzenia postępu oczyszczania, pozwoli także na uruchomienie środków zaradczych w momencie obniżenia jego skuteczności. Jednocześnie należy zwrócić uwagę na to, że proces biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w gruncie jest wypadkową wielu procesów zależnych od warunków fizyczno-chemiczno-biologicznych toteż nie zawsze metody statystyczne mogą być pomocne w jego prognozowaniu.

## LITERATURA

1. Morgan P., Watkinson R.J.: *Assessment of the potential for in situ biotreatment of hydrocarbon-contaminated soils*. Wat.Sci.Tech. vol.22, 63, 1990.
2. Block R., Stroh H., Swett G.H.: *Bioremediation- why doesn't it work sometimes*. Chem.Eng Prog., August, 26-31, 1993.
3. Olańczuk-Neyman K., Prejzner J., Topolnicki M.: *Chemiczna i bakteriologiczna ocena skażenia gruntów stacji przeladunku paliw produktami ropopochodnymi*. Biotechnologia, 2(25), 1994.
4. Leahy G., Colwell R.R.: *Microbial degradation hydrocarbon in the environment*. Microbiol.Rev., 54, 305-315, 1990.

5. Bossert I., Bartha R.: *The fate of petroleum in soil ecosystems. Petroleum Microbiology.* New York 1984.
6. Morgan P., Watkinson R.: *Hydrocarbons degradation in soils and method for soil biotreatment.* Critical Rev. Biotechnol. 8, 305-333, 1989.
7. Frankenberger Jr. W.T., Dick W.A.: *Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil.* Soil Science of America Journal, 47, 55, 945-951, 1983.
8. Galas E., Kwapisz E., Torabasz-Szymańska Ł. i inni: *Charakterystyka wybranych szczepów bakterii degradujących węglowodory ropy naftowej.* Biotechnologia 1, 36, 145-157, 1997.
9. Kościelniak S., Adamski A., Bil J., Hac B., Sobczyk W., Ultman-Bortnowska M.: *Wskazówki metodyczne do oceny zanieczyszczenia gruntów i wód podziemnych produktami ropopochodnymi i innymi substancjami chemicznymi w procesach rekultywacji.* Wydawnictwo TRIO Warszawa 1994.
10. Łebkowska M., Muszyński A., Sztompka E., Karwowska E., Miałkiewicz E.: *Mikrobiologiczne oczyszczanie gruntów ze składników ropopochodnych.* I Konferencja Naukowo-Techniczna nt. Technologie odolejania gruntów, odpadów i ścieków. Gorlice-Wysowa Zdrój 115-118, 1997.
11. Malicka M., Ślusarczyk J.: *Biologiczna sanacja zanieczyszczeń ropopochodnych w Polsce.* Materiały Konferencyjne Międzynarodowego Sympozjum Polsko-Niemieckiego „Zanieczyszczenia cywilizacyjne”. 155-185, Poznań 1997.
12. Praca zbiorowa: *Identyfikacja i wycena szkód ekologicznych spowodowanych przez stacjonujące w Polsce wojska Federacji Rosyjskiej.* Raport końcowy. Wyd. ELWOS-TRIO, Warszawa 1994.
13. Kołwzan B.: *Biodegradacja produktów naftowych. W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie.* Praca pod redakcją J. Surygały. Oficyna Wydawnicza Pol. Wroc. (monografia w druku).
14. Kołwzan B., Piekarska K., Kiernicka J., Śliwka E.: *Enhanced bioremediation of diesel oil contaminated soil and wastewaters by hydrocarbons-degrading bacteria.* Kalmar ECO-TECH'99, Ecological Technology and Management. Kalmar, 100-115, Sweden 1999.
15. Czajkowski A., Czajkowski J., Kołwzan B., Piekarska K., Pawlik M.: *Dekontaminacja gruntów i wód gruntowych zanieczyszczonych produktami naftowymi i innymi produktami organicznymi.* Zanieczyszczenia cywilizacyjne. Wymiana doświadczeń i poglądów. Międzynarodowe Polsko-Niemieckie Sympozjum. Materiały konferencyjne. Poznań, 23-26 listopada 1997.
16. Piekarska K., Moskal J.M.: *Isolacja i charakterystyka mikroorganizmów zdolnych do rozkładu składników oleju napędowego.* Materiały Sympozjum Naukowego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 1995.
17. van den Berg R., Verheul J.H., Eikeboom D.H.: *In situ bioremediation of an oil contaminated soil.* Wat.Sci.Tech. Vol.20, 3, 255-256, 1988.
18. Malina G.: *Badania sorpcji węglowodorów ropopochodnych w gruncie piaszczystym strefy aeracji. Stałe podziału dla liniowych izoterm i kinetyka sorpcji.* Gospodarka Surowcami Mineralnymi, Tom 12, zeszyt 3, 1996.

**Abstract**

The purification of petroleum contaminated soil is one of the most important and current problems. Today, years of biological methods of soil remediation of contaminated with petroleum products find more and more applications used on a large scale. Although the indigenous microorganisms are able to use these compounds as food substrates, the natural biodegradation process is very slow and it may take many years in case of heavy pollution. Therefore, the biodegradation process should be accelerated by a man intervention.

This paper presents the results of studies on the applications of biological methods to estimate petroleum products biodegradation in soil. Research was carried out on soil samples containing different concentrations of hydrocarbons. Statistics methods were used to calculate the correlation between the investigated parameters.

It was found that prognosis of the biodegradation process of petroleum products in soil requires analysis of a lot of parameters of contaminated soil, for example: number of petroleum products degrading bacteria, intensity of microorganisms' respiration and concentration of petroleum products in soil.

Recenzent: Prof. dr hab. Barbara Maliszewska-Kordybach