

TERESA STELIGA\*

## **Optimalizacja procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w zastarzałych odpadach z dołów urobkowych**

### **Wprowadzenie**

Pracom prowadzonym w górnictwie nafty i gazu towarzyszy nieuchronna konieczność gromadzenia i zagospodarowania dużych ilości materiałów odpadowych, które w latach 1920–1950 były składowane w dołach urobkowych. Rekultywacja terenów zastarzałych dołów urobkowych zdegradowanych przez skażenie substancjami ropopochodnymi należy do kluczowych problemów ekologicznych, jakie stają przed branżą górnictwa nafty i gazu w Polsce.

Na dołach urobkowych z tego okresu prowadzono wstępne zabiegi zmierzające do ich likwidacji poprzez zmieszanie odpadu z ziemią lub torfem. Pod względem chemicznym odpady te stanowią zróżnicowane, wieloskładnikowe układy, które podczas deponowania i prowadzenia wstępnych procesów oczyszczania ulegały zmianom. Istotnym parametrem określającym zachodzące zmiany w składowanych odpadach jest obecność zanieczyszczeń ropopochodnych, które starzeją się wskutek przebiegu wielu procesów, m.in. odparowania, rozpuszczania czy biodegradacji (Qudot i in. 1989; Chaineau i in. 1995).

Warunkiem wyboru optymalnej metody oczyszczania dołów urobkowych z zanieczyszczeń ropopochodnych jest odpowiednia, interdyscyplinarna analiza wyników uzyskanych z badań laboratoryjnych i terenowych środowiska gruntowo-wodnego. Prawidłowo wykonane badania pozwalają na określenie najodpowiedniejszych technologii likwidacji zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi (Lazar i in. 1999; Riser-Roberts 1998; Zieńko 1999; Steliga 2006).

---

\* Dr inż., Instytut Nafty i Gazu, Kraków Oddział Krosno; e-mail: Teresa.Steliga@inig.pl

Coraz częściej prowadzi się badania nad przyspieszeniem biodegradacji węglowodorów na drodze procesów biotechnologicznych, przy wykorzystaniu aktywnych kultur bakteryjnych uprzednio wyizolowanych z silnie skażonych środowisk naturalnych. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz skuteczność metody biologiczne znajdują praktyczne zastosowanie na skalę techniczną (Morgan i in. 1990; Cunningham i in. 2004).

Biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych w skażonym środowisku uzależniona jest zarówno od czynników abiotycznych, jak i biotycznych. Należą do nich: właściwości fizykochemiczne odpadu wiertniczego/gleby, stężenie i struktura chemiczna zanieczyszczeń ropopochodnych, stężenie związków biogennych (azotu, fosforu), temperatura, zawartość tlenu, wilgotność, odczyn (pH) odpadu, zawartość związków organicznych, obecność związków toksycznych, skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów obecnych w glebie (Li et.al. 2005; Hejazi i in. 2004; Siuta 2003; Xu i in. 2003; Yerushaimi i in. 2003; Hutchinson i in. 2001; Wright i in. 1997; Bragg i in. 1994). Budowa chemiczna zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) obok uwarunkowań fizykochemicznych panujących w zanieczyszczonym odpadzie i jego struktury, ma wpływ na wielkość sorpcji TPH, a tym samym na ich biodostępność (Huesemann i in. 2003; De Jonge i in. 1997).

Istnieją dwie strategie oczyszczania gruntów: *in-situ* (*on site*) i *ex-situ* (*off site*). Porównując wymienione metody należy stwierdzić, że metoda *ex-situ* ma następujące zalety (Canberry i in. 2001; Rubin i in. 2001; Zieńko 1999): zwiększa łatwość nadzoru i kontroli parametrów procesu oczyszczania, zapewnia szybkie tempo rozkładu zanieczyszczeń, ułatwia dostęp do oczyszczanego materiału przy obróbce początkowej, pośredniej i końcowej, zapewnia korzystniejsze warunki rozwoju mikroorganizmów.

Mimo wymienionych zalet, ze względu na ograniczone środki finansowe oraz możliwość uniknięcia deformacji struktury gruntu, rzeźby terenu i nienaruszenia infrastruktury technicznej coraz częściej preferuje się biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych bezpośrednio w terenie (*in-situ*). W zakresie doskonalenia technicznych sposobów napowietrzania i zasilania środowiska składnikami odżywczymi i preparatami biologicznymi oraz zabezpieczania przyległych terenów przed rozprzestrzenieniem się ropopochodnych substancji zauważalne są bardzo duże postępy.

Przekładanie wyników badań laboratoryjnych na potrzeby oczyszczania gleby/odpadów wiertniczych w terenie nie jest jednak łatwe ze względu na dużą złożoność i wymaga zbadania wielu uwarunkowań oraz opracowania sposobów skutecznego sterowania przebiegiem biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych (Siuta 2003; Steliga 2006).

W toku wieloletnich prac badawczych prowadzonych w warunkach laboratoryjnych i przemysłowych w INiG opracowano technologię oczyszczania odpadów wiertniczych/gleby z zanieczyszczeń ropopochodnych, która obejmuje następujące etapy (Steliga 2006; Steliga i in. 2006):

- wstępną rekultywację terenu polegającą na usunięciu substancji ropopochodnych z głębszych warstw poprzez drenaż melioracyjno-odciekowy;
- modyfikację struktury gleby poprzez zmieszanie jej z „czystą ziemią” w proporcjach ustalonych na podstawie badań laboratoryjnych w celu zwiększenia bio-

dostępności mikroorganizmów i substancji odżywczych do węglowodorów ropopochodnych;

- bioremediację podstawową stymulowaną przez biowentylację (dostarczanie tlenu poprzez napowietrzanie terenu) oraz wzbogacanie środowiska gleby w składniki biogenne wspomagające rozwój mikroflory autochtonicznej. W celu doprowadzenia odczynu odpadu do poziomu (pH ~7,4) oraz osiągnięcia optymalnego stosunku C:N:P= 100:10:1 (Chang i in. 1996; Cookson 1995; Wirght i in. 1997; Saponaro i in. 2002; Wirght i in. 2004; Cunningham i in. 2004) do gleby (odpadu) dozowano wapno nawozowe i nawozy mineralne, których dawki określano na podstawie badań laboratoryjnych;
- bioaugmentację polegającą na rozprowadzeniu napowierzchniowym oraz wgłębnej iniekcji w warstwy oczyszczanego terenu biopreparatu sporządzonego na bazie wyizolowanych oraz wyselekcjonowanych i namnożonych mikroorganizmów autochtonicznych.

Cały cykl oczyszczania odpadów wiertniczych z zanieczyszczeń ropopochodnych kontrolowano za pomocą opracowanej metodyki analitycznej wykorzystującej połączenie ekstrakcji rozpuszczalnikowej modyfikowanej ultradźwiękami z chromatografią gazową, która umożliwia określenie sumarycznej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH), jak również identyfikację i ilościowe oznaczenie n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych. Ponadto umożliwia ona chromatograficzną identyfikację jakościową i ilościową węglowodorów trudno biodegradowalnych z grupy izoprenoidów: pristanu (Pr) i fitanu (F) (Brown i in. 1998; Sharma i in. 2002). Wartości stosunków n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F przyjęto jako wskaźniki służące do oceny stopnia biodegradacji n-alkanów (Santas i in. 1999; Steliga 2006a), gdyż umożliwiają porównanie przebiegu procesu biodegradacji w warunkach laboratoryjnych i przemysłowych.

W celu opracowania uproszczonego matematycznego modelu biodegradacji TPH podczas prowadzenia badań w warunkach laboratoryjnych do normalizacji stężeń TPH zastosowano biomarker: C<sub>30</sub>17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-hopan, który umożliwia pełną ocenę stopnia biodegradacji węglowodorów ropopochodnych (Prince i in. 1999; Xu i in. 2003, 2004).

Wyniki analiz chromatograficznych w połączeniu z badaniami mikrobiologicznymi stanowią podstawowe narzędzie przy opracowywaniu biopreparatu na bazie mikroorganizmów autochtonicznych o profilu ściśle dostosowanym do chemicznego charakteru zanieczyszczeń występujących na oczyszczanym terenie.

## 1. Materiały i metodyka badawcza

Na terenie kopalni ropy naftowej Grabownica występuje około 150 zastarzałych dołów urobkowych, które przed laty częściowo poddano wstępnym procesom mającym na celu ich unieszkodliwienie, tj. zestaleniu czy zmieszaniu z glebą, ale nadal ze względu

na wysoką zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych stanowią duże zagrożenie dla środowiska.

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszym artykule były zastarzałe odpady wiertnicze zmieszane z glebą pochodzące z dołów urobkowych G-44 (głębokość – 1,5 m, powierzchnia – 350 m<sup>2</sup>) i G-40 (głębokość – 1,4 m, powierzchnia – 170 m<sup>2</sup>). Charakteryzowały się one zróżnicowaną zawartością zanieczyszczeń ropopochodnych.

### 1.1. Metodyka analityczna

Analiza zanieczyszczeń ropopochodnych należy do trudnych zadań. Wynika to z wielu przyczyn, do których można zaliczyć: dużą liczbę i różnorodność produktów naftowych, które mogą być źródłem skażeń, skomplikowany skład (wieloskładnikowe mieszaniny, w których tylko nieliczne indywidua występują w stężeniach wyższych niż 1% mas.) i zróżnicowane właściwości poszczególnych produktów naftowych, powodujące ich niespecyficzną analityczną, złożoność i niejednorodność matrycy środowiskowej, szczególnie odpadu wiertniczego.

W celu uzyskania pełnej kontroli przebiegu procesu oczyszczania odpadu wiertniczego z zanieczyszczeń ropopochodnych oraz przygotowania skutecznego biopreparatu z mikroorganizmów autochtonicznych opracowano metodykę chromatograficznego jakościowego i ilościowego oznaczania substancji ropopochodnych w glebie/odpadzie wiertniczym (TPH, n-C<sub>6</sub>-n-C<sub>44</sub>, pristan, fitan, C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopan).

Pobrane próbki po uśrednieniu i ujednoczeniu poddano izolacji i wzbogacaniu analitów. Izolację analitów ropopochodnych przeprowadzono metodą ekstrakcji rozpuszczalnikowej modyfikowaną ultradźwiękami (Chaîneau i in. 2003). Jako optymalny rozpuszczalnik wytypowano dichlorometan (Hutchinson i in. 2001; Steliga 2003; Steliga i in. 2004), przy odzysku substancji ropopochodnych (TPH) wynoszącym 75,8%. Zastosowanie w procesie ekstrakcji rozpuszczalnikowej sonifikacji spowodowało zwiększenie stopnia odzysku zanieczyszczeń ropopochodnych do 95,9%. Optymalny czas działania ultradźwięków (30 kHz) wahał się w zakresie od 30 do 45 minut (Roche i in. 1991; Chang i in. 1992; Wang i in. 1994). Dla uzyskaniażądanego odzysku analitów z matrycy glebowej wskazane jest powtórzenie ekstrakcji (2- lub 3-krotnie) nowymi porcjami rozpuszczalnika. W okresie trwania procesu sonifikacji nie stwierdzono artefaktów. Stężenia analitów w ekstraktach rozpuszczalnikowych są niewystarczające i wymagają wzbogacenia (zateżenia) do poziomu powyżej dolnej granicy oznaczalności.

Stopień odzysku analitów określano za pomocą standardu zastępczego, którym był o-terfenyl (Sawyer i in. 1996; Wang i in. 1994).

Oczyszczanie analitów substancji polarnych przeprowadzono przy zastosowaniu kolumniek sorpcyjnych wypełnionych sorbentem o nazwie florisil (Van Delft i in. 1994; Waksmundzka-Hajnos 1998). Analizę zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadzie obejmującą identyfikację oraz ilościowe oznaczenie n-alkanów (n-C<sub>6</sub>-n-C<sub>44</sub>), węglowodorów z grupy izoprenoidów (Pr, F) oraz całkowitej zawartości węglowodorów naftowych (TPH)

wykonano na chromatografie Clarus 500 GC/FID firmy Perkin Elmer, wyposażonym w kolumnę kapilarną QUADREX 007-1 (30 m × 0,53 mm) firmy Panalytica, przy przepływie 20 ml/min helu jako gazu nośnego. Temperatura inżektora PPS i detektora wynosiła odpowiednio: 290°C i 300°C. Program temperaturowy dla węglowodorów alifatycznych przebiegał następująco: 28°C – przebieg izotermiczny przez 2 min, 28–105°C – przyrost temperatury 10°C/min, 105–285°C – przyrost temperatury 5°C/min i przez 10 min przebieg izotermiczny w temperaturze 285°C. Program temperaturowy przy oznaczaniu C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopanu przebiegał następująco: 28°C – przebieg izotermiczny przez 2 min, 28–105°C – przyrost temperatury 10°C/min, 105–320°C – przyrost temperatury 5°C/min i przez 20 min przebieg izotermiczny w temperaturze 320°C. Do oznaczenia ilościowego sumarycznej zawartości węglowodorów naftowych (TPH) zastosowano zestaw standardów kalibracyjnych firmy Tusnovic Instruments, zaś do ilościowego oznaczenia poszczególnych n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych wykorzystano wzorce certyfikowane firmy Supelco oraz Restek (mieszanka wzorcowa n-alkanów o długości łańcucha węglowego n-C<sub>6</sub>–n-C<sub>44</sub> oraz certyfikowana mieszanka wzorcowa zawierająca: n-C<sub>17</sub>, pristan, n-C<sub>18</sub>, fitan). Jako biomarker zastosowano wzorec certyfikowany C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopan firmy Supelco.

W oznaczeniach TPH z odpadu uwzględniano podczas obliczeń stopień odzysku analitytów i współczynnik ubytku masy odpadu podczas suszenia.

Pozostałe parametry charakteryzujące przebieg procesu oczyszczania odpadu wiertniczego zmieszanego z glebą wykonano na spektrofotometrze Perkin-Elmer-Lambda 40.

Oceny frakcji ilastej w zastarzałym odpadzie wiertniczym zmieszonym z glebą z dołów urobkowych dokonano metodą rentgenowskiej analizy fazowej, w której wykorzystuje się zjawisko dyfrakcji (ugięcia) promieni rentgenowskich na elementach strukturalnych ciała krystalicznego. Badania wykonuje się za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego X'Pert MPD firmy Philips (lampa rentgenowska Cu o maksymalnej mocy 2500 W). Przy analizie jakościowej przyjęto następujące warunki pomiarowe: napięcie wzbudzenia 40 kV, prąd anodowy 34 mA, czas naświetlania 1,0 s, krok pomiarowy 0,05°(2 θ), zakres kątowy pomiaru 3–64°(2 θ).

W celu wydzielenia frakcji ilastej próbki zostały poddane odpowiedniej obróbce chemicznej (usuwania węglanów, substancji organicznej i żelaza, wymiany kationowej). Następnie wydzielono z nich frakcję ziarnową < 0,2 μm i wykonano preparaty sedymentowane i zarejestrowano je po glikolowaniu stosując następujące warunki pomiarowe: napięcie wzbudzenia 40 kV, prąd anodowy 34 mA, czas naświetlania 2,5 s, krok pomiarowy 0,02°(2 θ), zakres kątowy pomiaru 2–50°(2 θ).

Interpretacji dyfraktogramów dokonano porównując położenie i względne intensywności zarejestrowanych refleksów z położeniami wzorcowymi, rozpoczynając od refleksów o największej intensywności.

## 1.2. Analizy mikrobiologiczne

Całkowitą liczbę komórek bakteryjnych ustalano poprzez zliczanie metodą wielokrotnych rozcieńczeń, wysiewając 1 ml z każdego rozcieńczenia (po wcześniejszej ekstrakcji mikroorganizmów) na płytkę agarową o średnicy 70 mm (podłoże stałe) i liczono wyrosnięte kolonie. W przypadku mikroorganizmów wykorzystujących węglowodory albo ropę naftową jako jedyne źródło węgla wyrosnięte kolonie poddawano dalszym testom biochemicznym w celu potwierdzenia. Każdy przedstawiony wynik jest średnią z przynajmniej 3 lub 4 oznaczeń.

Drugą metodą polegała na zastosowaniu metody (MPN) – najbardziej prawdopodobnej liczby (Chaîneau i in. 1995; Wrenn i in. 1996). W tym wypadku również dokonywano wielokrotnych rozcieńczeń i wysiewano mikroorganizmy na podłoże płynne, gdzie zmętnienie podłoża oznaczało wynik pozytywny. Liczbę mikroorganizmów obliczano na podstawie wyników uzyskanych z 3–5 powtórzeń.

## 2. Analiza statystyczna i pierwszorzędowy model biodegradacji TPH

Zastosowanie biomarkera –  $C_{30}17\alpha(H),21\beta\alpha(H)$ -hopanu w badaniach laboratoryjnych procesu biodegradacji TPH w odpadzie wiertniczym pozwala na wyeliminowanie błędów analitycznych w oznaczeniach ilościowych węglowodorów ropopochodnych. Znormalizowane hopenem wyniki oznaczeń chromatograficznych TPH wykonane w trakcie prowadzenia procesu ich biodegradacji posłużyły do opracowania matematycznego pierwszorzędowego modelu opisującego przebieg biodegradacji TPH (Venosa i in. 1997; Xu and Obbard 2004; Xu i in. 2004). Został on opisany równaniem:

$$C/C_H = (C/C_H)_0 \exp(-kt) \quad [1]$$

gdzie:

- $C$  — koncentracja analitu,
- $C_H$  — koncentracja hopanu,
- $k$  — stała biodegradacji pierwszego rzędu [dni<sup>-1</sup>],
- $C/C_H$  — znormalizowane stężenie analitu w czasie,
- $(C/C_H)_0$  — znormalizowane stężenie analitu w punkcie wyjściowym procesu biodegradacji,
- $t$  — czas trwania procesu [dni].

Analiza regresji nieliniowej z zastosowaniem przedstawionego powyżej równania umożliwiła wyznaczenie stałej biodegradacji pierwszego rzędu ( $k$ ) oraz współczynnika korelacji ( $r^2$ ) określającego dopasowanie punktów pomiarowych do krzywej teoretycznej procesu biodegradacji TPH.

Przeprowadzenie nieliniowej analizy wariacji (ANOVA) metodą Tukeya na poziomie ufności  $p < 0,05$  umożliwia eliminację danych analitycznych (chemicznych i biologicznych) statystycznie nieistotnych. Do statystycznego przetworzenia otrzymanych danych analitycznych zastosowano program Statistica wersja 7.1.

### 3. Wyniki badań

Analiza chromatograficzna w uśrednionej i w ujednoliconej próbce odpadu z dołu urobkowego G-44 wykazała, że TPH wynosi 82 564 mg/kg s.m. odpadu, przy czym w najwyższych stężeniach występują węglowodory szeregu alifatycznego n-C<sub>16</sub>-n-C<sub>22</sub> w granicach: 3,47–19,11%. Stwierdzono obecność węglowodorów trudno biodegradowalnych z grupy izoprenoidów, tj. pristanu (Pr) w ilości; 1881 mg/kg s.m. odpadu i fitanu (F) – 1631 mg/kg s.m. odpadu. Zawartość BTEX waha się w zakresie od 44 do 13 mg/kg s.m. odpadu, zaś WWA występują w śladowych ilościach (2,5–3,9 mg/kg s.m. odpadu), czyli ich zawartość nie przekracza dopuszczalnych standardów glebowych.

Pobrane i odpowiednio przygotowane próbki odpadu z dołu urobkowego G-40 charakteryzują się bardzo wysoką zawartością TPH na poziomie 101 842 mg/kg s.m. odpadu. Porównanie zawartości poszczególnych zidentyfikowanych węglowodorów stanowiących zanieczyszczenia ropopochodne w próbkach z dołu urobkowego G-40 wskazuje, że największy udział w ogólnej ilości zanieczyszczeń ropopochodnych mają węglowodory z zakresu n-C<sub>13</sub>-n-C<sub>18</sub> (11,605–3,936%). Zawartość węglowodorów z zakresu n-C<sub>7</sub>-n-C<sub>12</sub> utrzymywała się na nieznacznie niższym poziomie od 0,827 do 3,299%, natomiast węglowodorów ciężkich n-C<sub>21</sub>-n-C<sub>36</sub> kształtowała się w granicach 0,372–1,419%. Analiza chromatograficzna wykazała obecność węglowodorów trudno biodegradowalnych, tj. pristanu w ilości 1867 mg/kg s.m. odpadu i fitanu – 964 mg/kg s.m. odpadu. Węglowodory aromatyczne w badanych próbkach występują w śladowych ilościach.

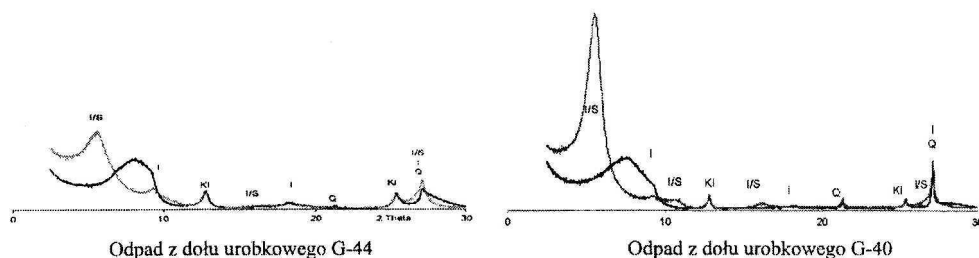
Zawartość TPH w analizowanych próbkach z dołów urobkowych zawierała się w granicach; 8,3–10,2%. Ograniczeniem metod biologicznych jest krytyczne stężenie węglowodorów wynoszące 10%. Przy wyższym stężeniu węglowodory ropopochodne stają się toksyczne dla mikroorganizmów (Colleran 1996; Amakiri and Onofeghara 1983; Steliga 2006a). W celu uzyskania efektywnych wyników biodegradacji węglowodorów ropopochodnych opracowano etapową technologię oczyszczania zastarzałych odpadów z dołów urobkowych zmieszanych z glebą. Polega ona na stopniowym obniżaniu TPH i wprowadzaniu kolejnych etapów przy możliwie niskim pułapie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (Steliga i in. 2006). Ze względu na przeważającą zawartość w zanieczyszczeniach ropopochodnych n-alkanów, charakteryzujących się podatnością na biodegradację (Heddlestone i in. 1986; Qudot i in. 1989; Chaîneau i in. 1999), zmianę zawartości poszczególnych n-alkanów podczas przebiegu procesu biodegradacji przyjęto jako jeden ze wskaźników jej efektywności (Steliga 2006a).

Proces rozkładu pristanu występującego w odpadzie w obecności bakterii rodzaju *Acinetobacter* i *Brevibacterium* (wyizolowanych z odpadu G-44 i G-40) przebiega z dynamiką zbliżoną do rozkładu alifatycznych węglowodorów o prostych łańcuchach. Jednakże w złożonych mieszaninach węglowodorów (zanieczyszczenia ropopochodne w odpadach; G-44 i G-40) rozkład jego jest znacznie wolniejszy niż pozostałych węglowodorów alifatycznych, a także niektórych węglowodorów aromatycznych (Rittmann 1994; Kołwzan 2005; Steliga 2006a) i z tego względu obliczone wartości stosunków n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F przyjęto jako wskaźniki stopnia biodegradacji n-alkanów.

Analiza mineralogiczna odpadów z dołów urobkowych: G-44 i G-40 wykazała obecność zróżnicowanych ilości kwarcu, skaleni i minerałów z grupy illitu oraz minerałów ilastych. Dyfraktogram rentgenowski frakcji ilastej dokumentuje stan wysokiej delaminacji minerałów o strukturze pęczniejącej (smektytu i minerału mieszanopakietowego – smektyt/illit) na podstawie bardzo silnie rozmytego pasma dyfrakcyjnego w zakresie niskokątnym 4–10°(2 θ) (rys. 1). Minerale mieszanopakietowy illit/smektyt w postaci pakietów smektytowych występuje w odpadzie z dołu urobkowego G-44 w ilości 40% , zaś w odpadzie G-40 – 85% . Minerale ilaste zwykle o dużej lepkości, niskiej przewodności hydraulicznej, wysokiej wodorochłonności zwiększają sorpcję zanieczyszczeń ropopochodnych, która wzrasta wraz z czasem zalegania i utrudnia proces ich biodegradacji (Pettersen i in. 1993; Czekaj i in. 2005).

W badanych próbkach odpadów z dołów urobkowych stwierdzono, że nie ma sprzyjających warunków rozwoju flory mikrobiologicznej, gdyż proporcje N:P odbiegają od optymalnych (10:1) i kształtują się średnio na poziomie 5:1 dla odpadu z dołu urobkowego G-44 oraz 1:8 dla odpadu z dołu urobkowego G-40, co dowodzi, że procesy mikrobiologiczne są zahamowane i bez korekty ilości tych składników autochtoniczna flora bakteryjna nie zostanie uaktywniona.

Ponadto odczyn (pH) odpadów kształtuje się na poziomie 5,98–6,02 i odbiega od optymalnego, który powinien wynosić 7,5–7,8 (Atlas 1981). Wilgotność odpadu kształtuje się na zadowalającym poziomie od 22,7 do 30,6%, który jest zbliżony do optymalnej wilgotności gleby wynoszącej dla procesu biodegradacji aerobowej 7–24% (Sims i in. 1993).



Rys. 1. Dyfraktogram rentgenowski frakcji ilastej < 2 μm

linia czarna – próbka w stanie powietrznie suchym, linia szara – preparat glikolowany I/S – minerał mieszanopakietowy illit/smektyt, I – illit, KI – kaolinit, Q – kwarc

Fig. 1. X Ray diffractogramme of clay fraction < 2 micrometers



Analizy chemiczne wykazały, że zawartość metali ciężkich oraz fenoli w opadach wiertniczych: G-44 i G-40 nie przekracza dopuszczalnych wartości, co dowodzi, że w niniejszych zastarzałych dołach urobkowych prowadzono wiercenia metodą udarową, nie stosując płuczek zawierających materiały toksyczne.

Badany zastarzały odpad zmieszany z glebą z dołów urobkowych; G-44 i G-40 jest silnie zdegradowany, o czym świadczy stosunek węgla do azotu wynoszący odpowiednio dla: G-44 – C:N = 690:1 i G-40 – C:N = 824:1.

Analizy mikrobiologiczne wykonane metodą MPN ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) dla odpadu z dołu G-44 wykazały obecność mikroorganizmów na poziomie  $2 \cdot 10^7$  jtk/g odpadu, w tym  $9 \cdot 10^5$  jtk/g odpadu mikroorganizmów utleniających węglowodory ropopochodne. Natomiast z odpadzie pochodzącym z dołu urobkowego G-40 obliczona całkowita liczba mikroorganizmów wynosiła  $1 \cdot 10^6$  jtk/g odpadu, w tym utleniających węglowodory  $2 \cdot 10^5$  jtk/g odpadu. Wysoki poziom skażenia substancjami ropopochodnymi dowodzi, że obecnie procesy biodegradacji zostały zahamowane pomimo obecności mikroorganizmów rozkładających węglowodory ropopochodne.

## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1. Omówienie wyników badań procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadzie z dołu urobkowego G-44

Wstępna faza rekultywacji wykonywana zgodnie z opracowanym projektem rekultywacyjnym GN. 6018-1-15/04 z dnia 20.12.2004 zatwierdzonym przez Starostę Brzozowskiego, polegała na przeprowadzeniu drenażu melioracyjno-odciekowego na oczyszczanym terenie dołu urobkowego G-44 oraz modyfikacji struktury odpadu.

Drenaż melioracyjno-odciekowy polegał na odzysku zanieczyszczeń ropopochodnych poprzez wykonanie rowów odciekowych na głębokości 1,2–1,4 m i drenażu terenu dołu urobkowego G-44 za pomocą rur melioracyjnych, które zostały zamontowane na różnych głębokościach (40, 80, 100, 130 cm ppt). Zanieczyszczenia ropopochodne wraz z wodą z rowów odciekowych zbierano w łapaczkach zamontowanych w dolnej części rekultywowanego terenu.

Badana mineralogiczne odpadu z dołu urobkowego G-44 wykazały wysoką zawartość minerałów ilastych i z tego względu po osuszeniu terenu dołu G-44 przystąpiono do modyfikacji struktury odpadu poprzez zmieszanie go z „czystą ziemią” (nie zawierającą zanieczyszczeń ropopochodnych) w odpowiednich proporcjach (10:1) ustalonych w badaniach laboratoryjnych na podstawie analiz rentgenowskich frakcji ilastej. Zabieg ten miał na celu rozluźnienie struktury odpadu i zwiększenie biodostępności dla mikroorganizmów i substancji odżywczych do zanieczyszczeń ropopochodnych.

W wyniku zabiegu wstępnej rekultywacji, prowadzonego w całej objętości oczyszczanego odpadu z dołu urobkowego G-44, zawartość TPH uległa obniżeniu o 46,9% do 44 394 mg/kg s.m. odpadu, co umożliwiło przeprowadzenie dalszych etapów oczyszczania.

Odpad z dołu urobkowego G-44 po procesie wstępnej rekultywacji posłużył jako materiał w badaniach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*) przebiegu procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

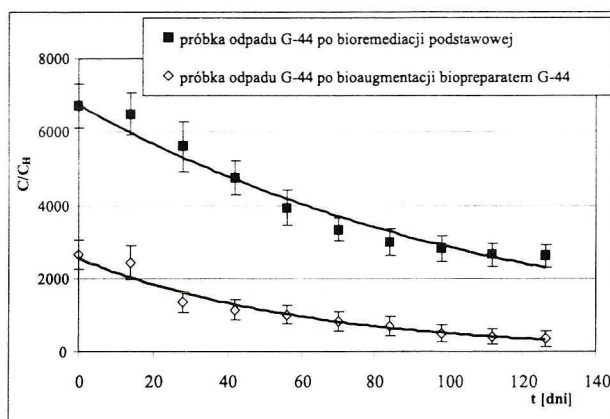
Odpad G-44 na stanowisku badawczym poddano procesowi bioremediacji podstawowej stymulowanej poprzez napowietrzanie oraz stworzenie optymalnych warunków pokarmowych, wodnych, ustalenie odpowiedniego odczynu, a także warunków termicznych. Zapotrzebowanie na tlen odpadu zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi jest wielokrotnie większe niż analogicznej gleby wolnej od zanieczyszczeń i jego niedostatek jest istotnym czynnikiem ograniczającym intensywność bioremediacji (Colleran 1996).

W celu osiągnięcia odpowiedniego odczynu na poziomie pH  $\sim 7,4$  oraz stosunku azotu do fosforu (1:10) w odpadzie dozowano wapno nawozowe i nawóz mineralny (Azofoska o składzie:  $\text{NO}_2\text{-N}$  – 7,5%,  $\text{NH}_3\text{-N}$  – 10,5%,  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-P}$  – 11%,  $\text{K}_2\text{O}$  – 19,1%,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 4,4% oraz mikroelementy: 0,17% Fe, 0,27% Mn, 0,18% Cu, 0,045% Zn, 0,045% B), których dawki określono na podstawie badań laboratoryjnych. Wapno nawozowe dozowano w ilości około 3,0–3,5 g/kg odpadu, zaś dawka nawozu mineralnego „Azofoski” wynosiła 1,0–1,5 g/kg odpadu.

Wapń pochodzący z węgla wapnia sprzyja tworzeniu się struktury gruzelkowej powodując koagulację koloidów glebowych, dzięki czemu poprawiają się warunki powietrzno-wodne w odpadzie. Wpływa on także na odczyn odpadu i zwiększa przeżywalność mikroorganizmów poprzez ochronę ich błon komórkowych przed dezintegrującym wpływem węglowodorów alifatycznych (Kurek i in. 1998).

Temperaturę wewnątrz przyzmy utrzymywano na poziomie 17–20°C, gdyż taką wartość temperatury przyjęto jako możliwą do osiągnięcia w warunkach terenowych w sezonie letnim w umiarkowanej strefie klimatycznej. Temperatura jest czynnikiem, od którego zależy aktywność drobnoustrojów, a tym samym intensywność rozkładu węglowodorów. Podczas przebiegu procesów bioremediacyjnych optymalny zakres temperatur dla większości bakterii wynosi 20–38°C (Bossert i in. 1984; Zhou i in. 1995; Colleran 1996). Wilgotność utrzymywano na poziomie zbliżonym do optymalnego 20–25% stosując zraszanie wodą.

W wyniku prowadzonego w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*) procesu bioremediacji podstawowej, stymulowanej poprzez dobór optymalnych parametrów jej przebiegu, na podstawie wykonanych analiz chromatograficznych można stwierdzić, że w początkowym etapie prowadzenia procesu osiągnięto najwyższy stopień obniżenia zawartości TPH, który kształtuje się następująco: po 30 dniach – 19,1%, po 40 dniach – 31,7%, po 70 dniach – 52,0%, po 90 dniach – 61,8%. Następnie tempo procesu biodegradacji spada i obniżenie TPH utrzymuje się na stałym poziomie. W wyniku prowadzonego procesu nastąpiła znaczna redukcja zanieczyszczeń zawartych w mocno zdegradowanym odpadzie wiertniczym zmieszonym z glebą z 44 394 do 15 499 mg/kg s.m. odpadu (rys. 2). Najwyższy



Rys. 2. Obniżenie zawartości TPH ( $C/C_H$ ) po normalizacji hopenem w kolejnych etapach biodegradacji odpadu z dołu urobkowego G-44 (liczba powtórzeń pomiarów  $n = 4-6$ ,  $p < 0,05$ )

Fig. 2. Reduction in TPH ( $C/C_H$ ) quantity after hopane normalization in biodegradation phases of G-44 waste (number of repetitions  $n = 4-6$ ,  $p < 0.05$ )

stopień obniżenia zawartości węglowodorów zanotowano dla szeregu alifatycznego  $n-C_{13}$ – $n-C_{22}$  w zakresie 65,5–76,5%, a w przypadku cięższych węglowodorów o długości łańcucha od  $n-C_{21}$  do  $n-C_{36}$  biodegradacja zachodziła w granicach 26,7–55,9% (rys. 3).

Bioremediacja podstawowa polegająca na uaktywnieniu jedynie naturalnej mikroflory skażonego terenu, co wykorzystano do obniżenia koncentracji zanieczyszczeń ropopochodnych, spowodowała wzrost liczebności mikroorganizmów utleniających węglowodory ropopochodne z  $9 \cdot 10^5$  do  $8 \cdot 10^6$  jtk/g odpadu.

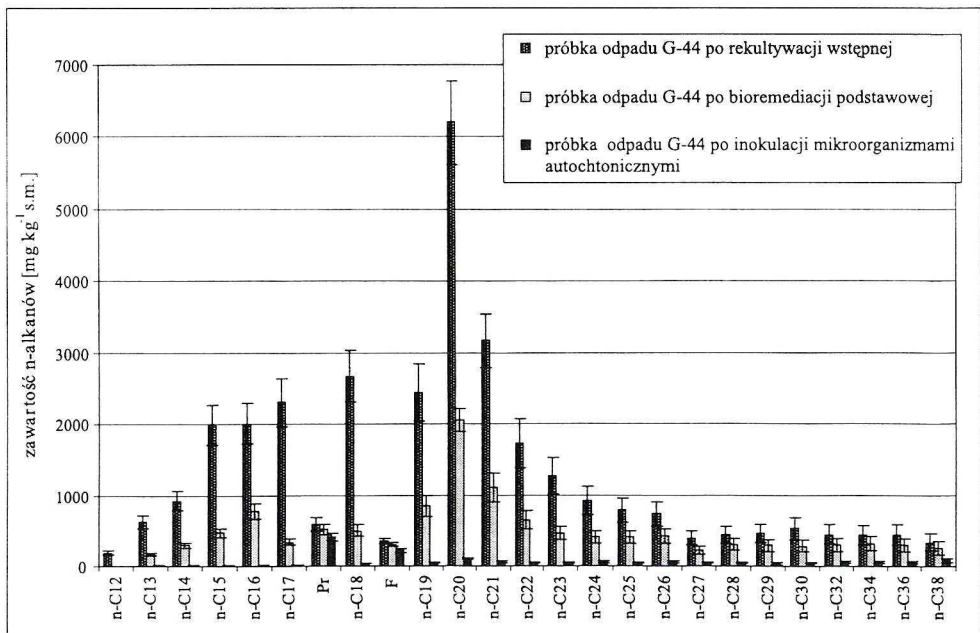
Na podstawie przeprowadzonych badań mikrobiologicznych odpadu z dołu urobkowego G-44 w połączeniu z wynikami analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w odpadzie, opracowano biopreparat G-44 z wyizolowanych, wyselekcjonowanych i namnożonych mikroorganizmów autochtonicznych ukierunkowanych na biodegradację zidentyfikowanych wcześniej zanieczyszczeń ropopochodnych. Przy opracowaniu biopreparatu badania mikrobiologiczne były ukierunkowane pod kątem: ruchliwości mikroorganizmów, zdolności wzrostu w warunkach tlenowych i beztlenowych, zdolności wzrostu w szerokim zakresie temperatur, zdolności wykorzystywania węglowodorów ropopochodnych jako jedyne źródła węgla w procesach życiowych (Steliga 2006a). Opracowany biopreparat zawierał 27 kultur bakteryjnych pochodzących z odpadu z dołu urobkowego G-44 należących do najaktywniejszych bakterii (Atlas 1984, Liu; i in. 1993; Korda i in. 1997; Rahman i in. 2002) rodzajów: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.* i *Sphingomonas sp.* Biopreparat G-44 sporządzono w postaci aktywnej zawiesiny o stężeniu  $1 \cdot 10^9$  jtk/cm<sup>3</sup>. Biopreparat został przebadany na obecność mikroorganizmów patogennych i potencjalnie chorobotwórczych.

Etap bioaugmentacji w ramach procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44, realizowany przez inokulację biopreparatem G-44 sporządzonym na bazie mikroorganiz-

mów autochtonicznych, w warunkach laboratoryjnych przeprowadzono przez okres 130 dni (rys. 3). Umożliwił on obniżenie zawartości TPH do poziomu 1 279 mg/kg s.m. odpadu – zbliżonego do poziomu „tła” na otaczającym terenie.

Analiza chromatograficzna wykazała, że najszybciej zachodzi biodegradacja węglowodorów alifatycznych (n-alkanów) o długości łańcucha węglowego n-C<sub>13</sub>–n-C<sub>22</sub>, które są substancjami najchętniej wykorzystywanymi przez mikroorganizmy. Stopień obniżenia ich zawartości mieści się w przedziale; 93,1–97,3%. Węglowodory z zakresu n-C<sub>23</sub>–n-C<sub>30</sub> ulegają biodegradacji w nieco mniejszym, lecz także w wysokim stopniu (73,7–87,2%), natomiast n-alkany zawierające powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce, które są odporne na biodegradację (Pollard i in. 1999; Wilson i in. 1986; Heddlestone i in. 1986; Rehm i in. 1981), również ulegają biodegradacji w granicach 53,9–62,4%. Przedstawione wyniki badań dowodzą, że opracowany biopreparat G-44 posiada wysoką efektywność oraz szerokie spektrum działania, gdyż obniżenie zawartości jest widoczne prawie dla wszystkich n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych w oczyszczanym odpadzie G-44 (rys. 3).

Obliczone wskaźniki oceny stopnia biodegradacji n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych (n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F) w kolejnych etapach oczyszczania



Rys. 3. Porównanie zmian zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44 w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*).  
(liczba powtórzeń pomiarów  $n = 6-8$ ,  $p < 0,05$ )

Fig. 3. Petroleum hydrocarbon (n-alkanes) content in subsequent waste purification stages.  
Waste from G-44 purified in laboratory conditions (*ex-situ method*)  
(number of repetitions  $n = 6-8$ ,  $p < 0.05$ )

odpadu wiertniczego G-44 ulegają odpowiednio zmniejszeniu (tab. 1), co dowodzi, że biodegradacja przebiega na zadowalającym poziomie.

Analiza mikrobiologiczna wykazała, że w wyniku przeprowadzonej inokulacji biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych wzrosła liczba mikroorganizmów utleniających węglowodory do poziomu  $7 \cdot 10^7$  jtk/g odpadu.

W celu opracowania matematycznego modelu przebiegu procesu biodegradacji TPH w kolejnych etapach oczyszczania w badaniach laboratoryjnych zastosowano biomarker – C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopan, względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji TPH oznaczanej w trakcie przebiegu poszczególnych etapów procesu biodegradacji.

Przebieg procesu biodegradacji TPH w odpadzie z dołu urobkowego G-44 (obejmującego bioremediację podstawową i inokulację biopreparatem G-44) opisano równaniem [1]. Poszczególne współczynniki niniejszego równania ( $k$ ,  $(C/C_H)_0$ ) oraz współczynniki korelacji ( $r^2$ ) dla kolejnych etapów oczyszczania zestawiono w tabeli 2. Stała biodegradacji pierwszego rzędu ( $k$ ) podczas etapu bioremediacji podstawowej wynosi 0,0087 [d<sup>-1</sup>], zaś przy bioaugmentacji biopreparatem G-44 bazie mikroorganizmów autochtonicznych 0,0162 [d<sup>-1</sup>]. Stała biodegradacji pierwszego rzędu ( $k$ ) jest wyższa podczas etapu bioaugmentacji

TABELA 1

Zestawienie wskaźników określających stopień biodegradacji n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44 w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*)

TABLE 1

Indicators of petroleum hydrocarbon biodegradation for subsequent purification stages. G-44 pit waste material purification. Laboratory conditions (*ex-situ* metod)

Wskaźnik	Po wstępnej rekultywacji	Po bioremediacji podstawowej	Po inokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi
n-C <sub>17</sub> /Pr	3,938 ± 0,389	0,659 ± 0,035	0,054 ± 0,005
n-C <sub>18</sub> /F	7,637 ± 0,645	1,666 ± 0,133	0,179 ± 0,014

TABELA 2

Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji TPH w kolejnych etapach procesu oczyszczania odpadu G-44

TABLE 2

Comparison of first – order reaction rates of biodegradation model in subsequent purification stages G-44 pit waste material purification

Etap oczyszczania	$k$ [d <sup>-1</sup> ]	$(C/C_H)_0$	Współczynnik korelacji $r^2$
Bioremediacja podstawowa (G-44)	0,0087 ± 0,002	6814 ± 405	0,9579
Bioaugmentacja biopreparatem (G-44)	0,0162 ± 0,011	2539 ± 189	0,9783

biopreparatem G-44 na bazie mikroorganizmów autochtonicznych, co świadczy o wyższej dynamice przebiegu tego procesu.

Współczynniki korelacji wynoszą odpowiednio; 0,9579 i 0,9783, co świadczy o zadawalającym dopasowaniu punktów pomiarowych z poszczególnych etapów biodegradacji TPH do krzywych opisanych równaniem [1] (rys. 2). Prawidłowość postępowania podczas próby opracowania modelu matematycznego biodegradacji TPH potwierdzają doniesienia literaturowe (Venosa i in. 1996, 1997; Xu i in. 2004).

Przeprowadzone badania w warunkach laboratoryjnych stanowią podstawę opracowania wytycznych prowadzenia procesu biodegradacji substancji ropopochodnych z odpadu pochodzącego z dołu urobkowego G-44 w warunkach przemysłowych metodą *in-situ* (Steliga 2006a; Siuta 2003).

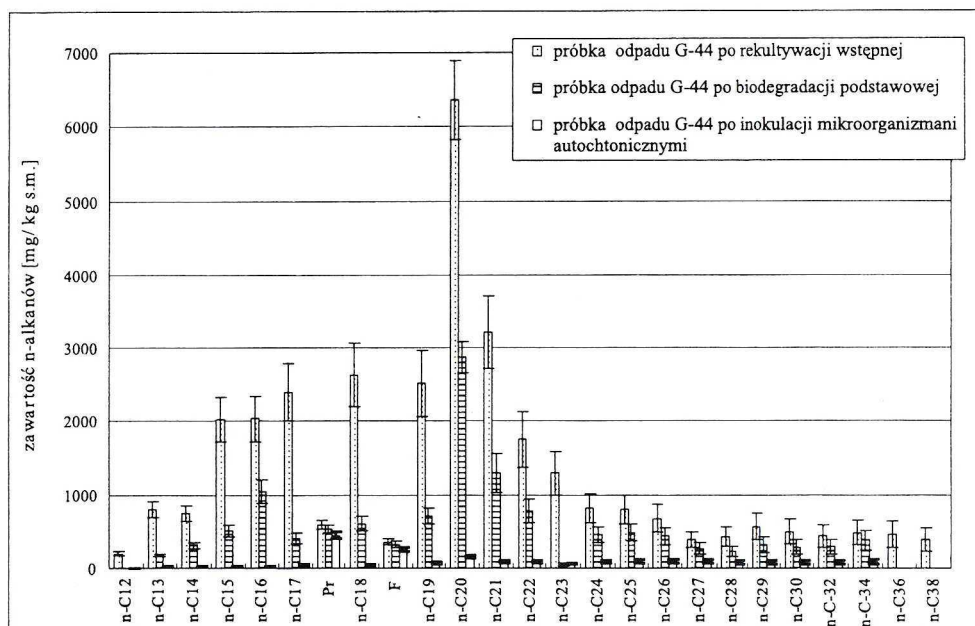
Proces bioremediacji podstawowej przeprowadzono poprzez dawkowanie wapna nawozowego, a następnie nawozów mineralnych w dawkach ustalonych w badaniach laboratoryjnych. Prowadzono ciągły monitoring właściwości fizykochemicznych oczyszczanego odpadu, starając się zachować optymalne wartości parametrów pH  $\sim 7,5$  oraz N:P = 10:1 poprzez stosowanie korekty wyznaczonych dawek substancji biogennych. W okresie letnim, przy zbyt małej ilości opadów, stosowano zraszanie oczyszczanego terenu wodą w celu utrzymania optymalnej wilgotności odpadu. Proces biodegradacji podstawowej w warunkach terenowych prowadzono przez okres 10 miesięcy dozując substancje biogenne w okresie wiosennym i jesiennym.

Zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych monitorowano przez cały okres trwania procesu wykonując analizy chromatograficzne. W wyniku prowadzonego procesu uzyskano obniżenie zawartości TPH do poziomu 21 458 mg/kg s.m. odpadu, co stanowi 51,6% redukcji.

Po procesie biodegradacji podstawowej najwyższy stopień obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych zanotowano dla węglowodorów alifatycznych (n-alkanów) n-C<sub>13</sub> – n-C<sub>22</sub> w zakresie 48,5–69,9%. Węglowodory ciężkie o długości łańcucha od n-C<sub>23</sub> do n-C<sub>38</sub> ulegają trudniej biodegradacji i stopień ich rozkładu wynosi: 21,5–38,7% (rys. 4).

W następnym roku prowadzenia procesu oczyszczania, w okresie wiosennym, rozpoczęto proces inokulacji biopreparatem G-44 na bazie mikroorganizmów autochtonicznych, realizując go w dwóch seriach w odstępach 3-miesięcznych. Biopreparat G-44 rozprowadzano w warstwie powierzchniowej oraz stosowano jego dozowania w wglębne warstwy dołu urobkowego G-44. W wyniku prowadzenia procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44 uzyskano obniżenie zawartości TPH do poziomu 1259 mg/kg s.m. odpadu zbliżonego na otaczającym terenie („tła”). Najszybciej zachodziła biodegradacja n-alkanów o długości łańcucha węglowego n-C<sub>13</sub>–n-C<sub>22</sub>, dla których stopień obniżenia zawiera się w przedziale 79,1–91,2%. Węglowodory ciężkie n-C<sub>23</sub> do n-C<sub>38</sub> ulegają również biodegradacji w wysokim stopniu w granicach 59,8–72,3%, co dowodzi szerokiego spektrum działania w warunkach przemysłowych opracowanego biopreparatu G-44 (rys. 4).

Odnotowane w warunkach przemysłowych (metoda *in-situ*) zmniejszenie wartości stężeń n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F w stopniu tylko nieznacznie niższym w porównaniu z warunkami



Rys. 4. Porównanie zmian zawartości n-alkanów po prowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44 w warunkach przemysłowych (metoda *in-situ*)  
(liczba powtórzeń pomiarów  $n = 8-10$ ,  $p < 0,05$ )

Fig. 4. Petroleum hydrocarbon (n-alkanes) content in subsequent waste purification stages.  
Waste from G-44 purified in the field conditions (*in-situ* method)  
(number of repetitions  $n = 8-10$ ,  $p < 0.05$ )

laboratoryjnymi (metoda *ex-situ*) świadczy, że biodegradacja n-alkanów zachodzi na podobnym poziomie (tab. 1 i 3).

Pełna kontrola procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44 i wydłużenie czasu jego trwania umożliwia osiągnięcie w warunkach przemysłowych (metoda *in-situ*) prognozowanego stopnia biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

TABELA 3

Zestawienie wskaźników określających stopień biodegradacji n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-44 w warunkach przemysłowych (metoda *in-situ*)

TABLE 3

Indicators of petroleum hydrocarbon (n-alkanes) biodegradation for subsequent purification stages. G-44 pit waste material purification. The field process (*in-situ* method)

Wskaźnik	Po wstępnej rekultywacji	Po bioremediacji podstawowej	Po inokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi
$n-C_{17}/Pr$	$4,028 \pm 0,308$	$0,863 \pm 0,048$	$0,109 \pm 0,019$
$n-C_{18}/F$	$7,466 \pm 0,635$	$1,980 \pm 0,125$	$0,192 \pm 0,024$

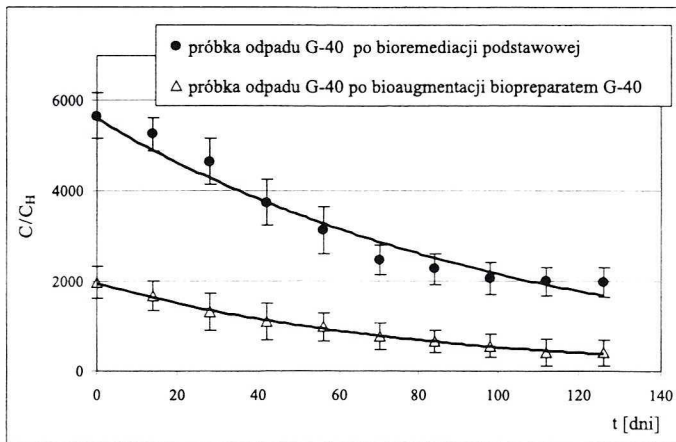
Rekultywację gruntu na dole urobkowym G-44 uznano za zakończoną na podstawie decyzji GN.6018-1-3/06 z dnia 25.05.2006 wydanej przez Starostę Brzozowskiego.

#### 4.2. Omówienie wyników badań procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadzie z dołu urobkowego G-40

W wyniku przeprowadzonego na dole urobkowym G-40 zabiegu rekultywacyjnego, zgodnie z projektem rekultywacyjnym GN.6018-1-1/06 z dnia 27.02. 2006 r. zatwierdzonym przez Starostę Brzozowskiego, obejmującego wykonanie drenażu odciekowo-melioracyjnego w całej objętości oczyszczanego odpadu z dołu urobkowego G-40, uzyskano obniżenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) do poziomu 37 245 mg/kg s.m. odpadu, co stanowi 63,4% redukcji.

Ze względu na wysoką zawartość w odpadzie z dołu urobkowego G-40 zanieczyszczeń ropopochodnych oraz minerałów ilastych o pęczniejącej strukturze (rys. 1), po osuszeniu terenu dołu G-40 podjęto działania mające na celu modyfikację struktury odpadu. Polegały one na zmieszaniu odpadu z dołu urobkowego G-40 z „czystą ziemią” (nie zawierającą zanieczyszczeń ropopochodnych) w optymalnym stosunku określonym na podstawie badań laboratoryjnych wynoszącym 7:1.

Po przeprowadzonych zabiegach odpad G-40 posłużył jako materiał badawczy w badaniach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*). W wyniku prowadzonego w warunkach laboratoryjnych procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-40, podczas etapu bioremediacji podstawowej stymulowanej poprzez biowentylację (dostarczanie tlenu przez napowietrzanie) oraz wzbogacanie środowiska glebowego w składniki biogenne wspomagające rozwój



Rys. 5. Obniżenie zawartości TPH ( $C/C_H$ ) po normalizacji hopanem w kolejnych etapach biodegradacji odpadu G-40 (liczba powtórzeń pomiarów  $n = 4-6$ ,  $p < 0,05$ )

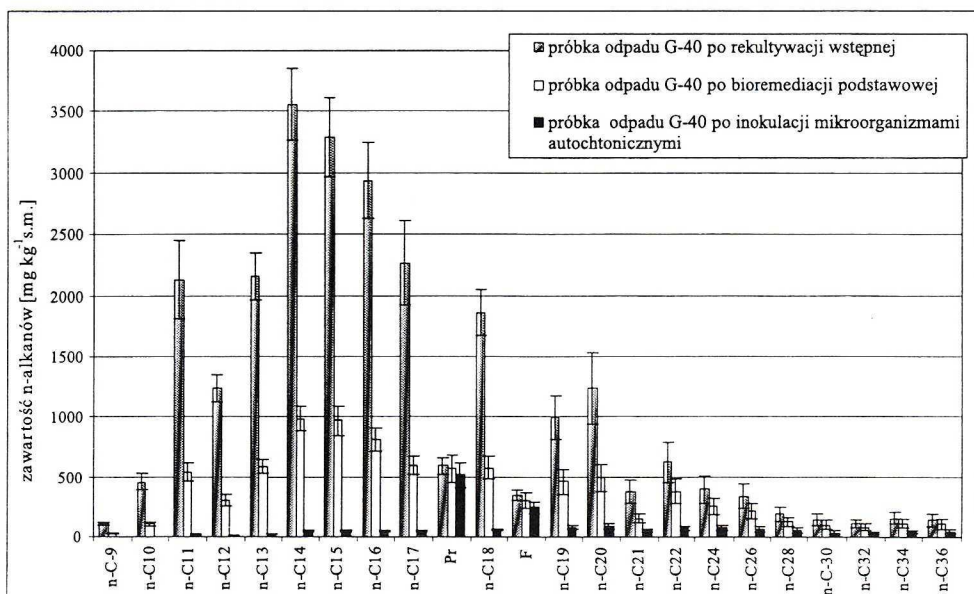
Fig. 5. Reduction in TPH ( $C/C_H$ ) quantity after hopane normalization in biodegradation phases of G-40 waste (number of repetitions  $n = 4-6$ ,  $p < 0.05$ )



mikroflory autochtonicznej, na podstawie wykonanych analiz chromatograficznych można stwierdzić, że po okresie 80 dni nastąpiła znaczna redukcja (63,8%) TPH z 37 245 do 13 458 mg/kg s.m. odpadu. Podczas dalszego przebiegu procesu oczyszczania dynamika biodegradacji zmniejszyła się i utrzymywała się na zbliżonym poziomie (rys. 5). Najwyższy stopień obniżenia zawartości n-alkanów zanotowano dla n-C<sub>10</sub>–n-C<sub>20</sub> w zakresie 59,5–74,5%, a w przypadku cięższych węglowodorów o długości łańcucha węglowego od n-C<sub>21</sub>–n-C<sub>36</sub> biodegradacja zachodziła w granicach 23,2–38,7% (rys. 6).

Dzięki połączeniu uzyskanych wyników z badań mikrobiologicznych odpadu z dołu urobkowego G-40 i analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w odpadzie, opracowano biopreparat G-40 z wyizolowanych, wyselekcjonowanych i namnożonych mikroorganizmów autochtonicznych zawierający 17 aktywnych kultur bakteryjnych. Etap oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-40 poprzez inokulację biopreparatem G-40 prowadzono przez okres 120 dni.

Analiza chromatograficzna wykazała, że po tym okresie dynamika procesu biodegradacji uległa zmniejszeniu i zawartość TPH wynosiła 1 267 mg/kg s.m. odpadu. Najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych (n-alkanów) o długości łańcucha węglowego n-C<sub>13</sub>–n-C<sub>22</sub>, gdyż stopień obniżenia ich zawartości zawierał się w przedziale 82,3–97,1%. Węglowodory z zakresu n-C<sub>24</sub>–n-C<sub>36</sub> ulegały biodegradacji w nieco mniej-



Rys. 6. Porównanie zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-40 w warunkach laboratoryjnych (metoda ex-situ)  
(liczba powtórzeń pomiarów  $n = 6-8$ ,  $p < 0,05$ )

Fig. 6. Petroleum hydrocarbon (n-alkanes) content in subsequent waste purification stages.  
Waste from G-40 purified in laboratory conditions (ex-situ method)  
(number of repetitions  $n = 6-8$ ,  $p < 0.05$ )

szym, lecz także wysokim stopniu (57,6–71,2%), co dowodzi, że opracowany biopreparat G-40 posiada wysoką efektywność oraz szerokie spektrum działania i nadaje się do stosowania w warunkach przemysłowych (rys. 6).

Obliczone na podstawie analiz chromatograficznych wskaźniki oceny stopnia biodegradacji n-alkanów (n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F) w kolejnych etapach oczyszczania odpadu G-40 ulegają odpowiednio zmniejszeniu, co upoważnia do stwierdzenia, że ich biodegradacja przebiega na zadowalającym poziomie (tab. 4).

W celu określenia szybkości biodegradacji TPH w badaniach laboratoryjnych zastosowano biomarker – C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopan, względem którego przeprowadzono normalizację koncentracji analitu TPH zmieniającej się w trakcie prowadzenia kolejnych etapów procesu oczyszczania.

Kinetykę biodegradacji TPH w kolejnych etapach oczyszczania odpadu G-40 (bioremediacji podstawowej i inokulacji biopreparatem G-40) opisano za pomocą równania [1], którego współczynniki przedstawiono w tabeli 5. Stała biodegradacji pierwszego rzędu ( $k$ ) podczas etapu bioremediacji podstawowej wynosi 0,0096 [d<sup>-1</sup>], zaś przy bioaugmentacji biopreparatem G-40 kształtuje się na poziomie 0,0131 [d<sup>-1</sup>]. Współczynniki korelacji ( $r^2$ )

TABELA 4

Zestawienie wskaźników określających stopień biodegradacji n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-40 w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*)

TABLE 4

Indicators of petroleum hydrocarbon biodegradation for subsequent purification stages. G-40 pit waste material purification. Laboratory conditions (*ex-situ* metod)

Wskaźnik	Po wstępnej rekultywacji	Po bioremediacji podstawowej	Po inokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi
n-C <sub>17</sub> /Pr	4,154 ± 0,294	1,047 ± 0,063	0,077 ± 0,008
n-C <sub>18</sub> /F	5,401 ± 0,485	1,906 ± 0,156	0,162 ± 0,014

TABELA 5

Zestawienie współczynników równania modelu matematycznego biodegradacji TPH w kolejnych etapach procesu oczyszczania odpadu G-40

TABLE 5

Comparison of first – order reaction rates of biodegradation model in subsequent purification stages G-40 pit waste material purification

Etap oczyszczania	$k$ [d <sup>-1</sup> ]	$(C/C_H)_0$	Współczynnik korelacji $r^2$
Bioremediacja podstawowa (G-40)	0,0096 ± 0,003	5604 ± 399	0,9497
Bioaugmentacja biopreparatem (G-40)	0,0131 ± 0,009	1961 ± 187	0,9945

dowodzą o zadowalającym dopasowaniu punktów pomiarowych z poszczególnych etapów biodegradacji TPH do krzywych opisanych równaniem [1] (rys. 5). Z porównania matematycznych modeli pierwszorzędowej biodegradacji TPH, wynika, że biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadach z dołu urobkowego G-44 i G-40 w poszczególnych etapach przebiega w podobnym tempie (tab. 2 i 5).

Przeprowadzone badania w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*), podobnie jak w przypadku oczyszczania dołu urobkowego G-44, pozwoliły na opracowanie wytycznych prowadzenia procesu oczyszczania z zanieczyszczeń ropopochodnych odpadu z dołu urobkowego G-40 w warunkach przemysłowych realizowanych metodą *in-situ*.

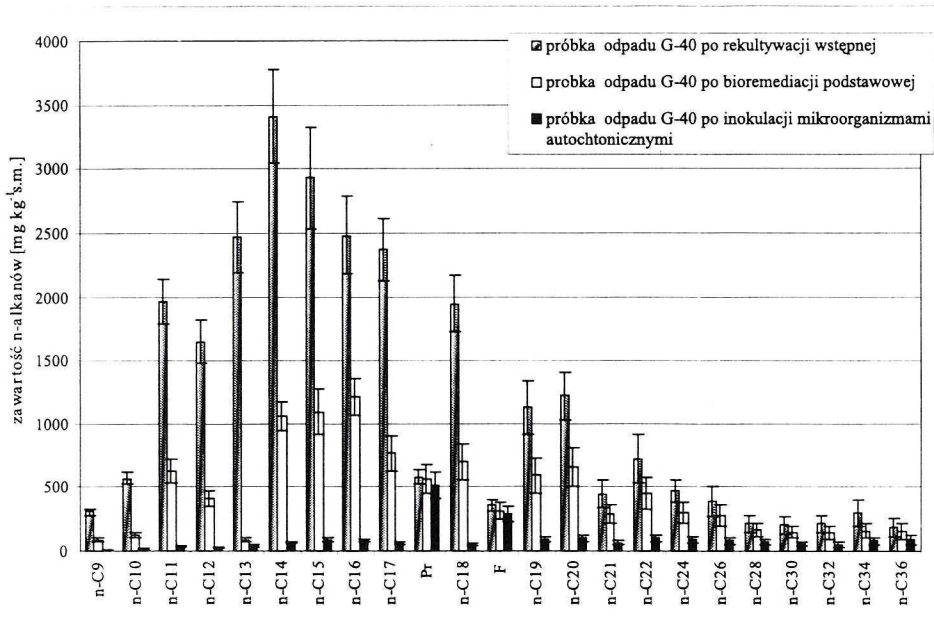
Proces bioremediacji podstawowej przeprowadzono poprzez dawkowanie wapna nawozowego, a następnie nawozu mineralnego (Azofoska) w dawkach ustalonych w badaniach laboratoryjnych. W trakcie procesu prowadzono ciągły monitoring właściwości fizykochemicznych oczyszczanego odpadu, starając się zachować optymalne wartości odczynu odpadu oraz stosunku N:P poprzez korektę wyznaczonych dawek. W okresie letnim, przy zbyt małej ilości opadów, stosowano zraszanie oczyszczanego terenu wodą w celu utrzymania optymalnej wilgotności odpadu. Proces bioremediacji podstawowej w warunkach przemysłowych prowadzono przez okres 10 miesięcy w okresie wiosennym i jesiennym. Zawartość TPH monitorowano przez cały okres trwania procesu wykonując analizy chromatograficzne. W wyniku prowadzonego procesu uzyskano obniżenie zawartości TPH do poziomu 19 106 mg/kg s.m. odpadu, co stanowi 51,3% redukcji. Po procesie bioremediacji podstawowej najwyższy stopień obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych zanotowano dla n-alkanów o długości łańcucha węglowego n-C<sub>10</sub>–n-C<sub>20</sub> w zakresie 46,5–67,9%. Węglowodory ciężkie o długości łańcucha węglowego od n-C<sub>21</sub> do n-C<sub>36</sub> ulegają trudniej biodegradacji i stopień ich rozkładu kształtuje się na poziomie 15,7–37,6% (rys. 7).

W okresie letnim rozpoczęto proces inokulacji biopreparatem G-40 na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i prowadzono go w dwóch seriach w odstępach 3-miesięcznych, stosując napowierzchniowe i wgłębne jego dozowanie. W trakcie prowadzenia procesu oczyszczania (inokulacji biopreparatem G-40) uzyskano obniżenie zawartości TPH z 19 106 do 8658 mg/kg s.m. odpadu.

W następnym roku zabiegi rekultywacyjne na dole urobkowym G-40 prowadzono na podstawie uzyskanego zezwolenia na prowadzenie działalności w zakresie unieszkodliwiania odpadów na dole urobkowym G-40 metodą *in-situ* (Nr SR. 7644-1-8/07 z dnia 13 marca 2007) zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 21 marca 2006 w sprawie odzysku i unieszkodliwiania odpadów poza instalacjami i urządzeniami).

W wyniku prowadzonego procesu oczyszczania (inokulacji biopreparatem G-40) uzyskano obniżenie zawartości TPH z 8 658 do 1 215 mg/kg s.m. odpadu, czyli do poziomu zbliżonego na otaczającym go terenie.

Najszybciej zachodziła biodegradacja n-alkanów o długości łańcucha węglowego n-C<sub>12</sub> – n-C<sub>22</sub>, dla których stopień ich obniżenia zawierał się w przedziale 71,8–87,4%. Węglowodory ciężkie ulegają również biodegradacji w wysokim stopniu w granicach 43,6–69,8%, co dowodzi szerokiego spektrum działania opracowanego biopreparatu G-40 (rys. 7).



Rys. 7. Porównanie zawartości n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-40 w warunkach przemysłowych (metoda *in-situ*) (liczba powtórzeń pomiarów  $n = 8-10$ ,  $p < 0,05$ )

Fig. 7. Petroleum hydrocarbon (n-alkanes) content in subsequent waste purification stages. Waste from G-40 purified in the field conditions (*in-situ* method) (number of repetitions  $n = 8-10$ ,  $p < 0.05$ )

Na podstawie badań mikrobiologicznych przeprowadzonych w trakcie procesu biodegradacji TPH w odpadzie pochodzącym z dołu urobkowego G-40 zanotowano wzrost liczby mikroorganizmów utleniających węglowodory z  $2 \cdot 10^5$  do  $1 \cdot 10^7$  jtk/g odpadu.

Rekultywację gruntu na dole urobkowym G-40 uznano za zakończoną na podstawie decyzji GN.6018-1-11/07 z dnia 13.11.2007 wydanej przez Starostę Brzozowskiego.

TABELA 6

Zestawienie wskaźników określających stopień biodegradacji n-alkanów po przeprowadzeniu kolejnych etapów procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego G-40 w warunkach przemysłowych (metoda *in-situ*)

TABLE 6

Indicators of petroleum hydrocarbon (n-alkanes) biodegradation for subsequent purification stages. G-40 pit waste material purification. The field process (*in-situ* method)

Wskaźnik	Po wstępnej rekultywacji	Po bioremediacji podstawowej	Po inokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi
n-C <sub>17</sub> /Pr	4,030 ± 0,295	1,370 ± 0,091	0,110 ± 0,009
n-C <sub>18</sub> /F	5,436 ± 0,498	2,046 ± 0,164	0,239 ± 0,026

Odnotowane zmniejszenie wartości stosunków n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F wyznaczonych na podstawie analiz chromatograficznych świadczy o zadawalającym stopniu biodegradacji n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych (tab. 6).

Porównywanie wartości stosunków n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F (tab. 4 i 6) po kolejnych procesach oczyszczania realizowanych metodą *ex-situ* (w skali laboratoryjnej) i metodą *in-situ* (w warunkach terenowych) dowodzą o możliwości optymalizacji metody *in-situ* w skali przemysłowej na podstawie wyników uzyskanych w warunkach laboratoryjnych.

Opracowane modele pierwszorzędowej biodegradacji TPH w warunkach laboratoryjnych (metoda *ex-situ*) mogą być pomocne w prognozowaniu efektów biodegradacji TPH w warunkach terenowych (metoda *in-situ*), co można stwierdzić na podstawie przeprowadzonych badań obejmujących zróżnicowane pod kątem stopnia skażenia substancjami ropopochodnymi odpady z dołów urobkowych G-44 i G-40

### Podsumowanie

Przedstawione wyniki dowodzą prawidłowości podjętych decyzji o zastosowaniu do oczyszczania odpadów z dołów urobkowych G-44 i G-40 etapowej technologii oczyszczania odpadów wiertniczych/gleby z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą *in-situ*, która została objęta zgłoszeniem patentowym z dnia 28 stycznia 2005 Nr P 372501.

Obniżenie zawartości TPH w odpadach z dołów urobkowych G-44 i G-40 do poziomu zbliżonego do „tła” określonego dla sąsiadujących terenów uzyskano dzięki optymalizacji czynników mających wpływ na przebieg procesu biodegradacji substancji ropopochodnych.

Chociaż przetransponowanie wyników badań laboratoryjnych (metoda *ex-situ*) na potrzeby oczyszczania odpadów wiertniczych w terenie (metoda *in-situ*) nie jest łatwe ze względu na dużą złożoność i konieczność brania pod uwagę wielu uwarunkowań oraz opracowanie sposobów skutecznego sterowania przebiegiem biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, to jednak pozwalają one na:

- kontrolę przebiegu procesów oczyszczania odpadu wiertniczego z dołu urobkowego,
- dobór optymalnych dawek wapna nawozowego i nawozów mineralnych,
- wstępne określenie ram czasowych prowadzenia poszczególnych etapów oczyszczania,
- zapoznanie się z efektywnością opracowanego biopreparatu na bazie mikroorganizmów autochtonicznych.

Zastowanie biomarkera (C<sub>30</sub>17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-hopan) do normalizacji stężeń TPH w trakcie przebiegu poszczególnych etapów oczyszczania odpadu pozwoliło na przedstawienie pierwszorzędowego modelu biodegradacji TPH i porównanie kinetyki biodegradacji TPH w odpadach pochodzących z dołów urobkowych G-44 i G-40.

Opracowana metoda chromatograficznego oznaczania zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadzie wiertniczym/glebie stwarza możliwość pełnej kontroli przebiegu oczyszczania. Pozwala ona również na uchwycenie zmian zawartości n-alkanów wchodzących w skład

zanieczyszczeń ropopochodnych podczas przebiegu ich biodegradacji w kolejnych etapach oczyszczania. Ponadto umożliwia dokonanie oceny stopnia biodegradacji n-alkanów poprzez określenie zmian wartości wskaźników  $n-C_{17}/Pr$  i  $n-C_{18}/F$ .

Kontrola przebiegu procesu oczyszczania, obok niezaprzeczalnych korzyści wynikających ze śledzenia postępu procesów oczyszczania, pozwala także na uruchomienie środków zaradczych w momencie obniżenia się ich skuteczności.

Dzięki połączeniu analiz chromatograficznych zanieczyszczeń ropopochodnych z badaniami mikrobiologicznymi opracowano indywidualnie dla każdego oczyszczanego dołu urobkowego biopreparat na bazie mikroorganizmów autochtonicznych o składzie i zakresie działania ściśle dostosowanych do chemicznego charakteru zanieczyszczeń ropopochodnych w nich występujących. Biopreparat charakteryzuje się szerokim spektrum oraz wysoką efektywnością działania.

#### LITERATURA

- Amakiri J.O. and Onofeghara F.A., 1983 – Effect of crude oil pollution on the growth of *Zea mays*, *Abelmoschus esculentus* and *Capsicum frutescens*. *Oil Petrochem. Pollut.* 1, 199–205.
- Atlas R.M., 1981 – Microbial degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180–209.
- Atlas R.M., (red.), 1984 – *Petroleum microbiology*, Macmillan, Inc., New York.
- Bossert I. and Bartha R., 1984 – The fate of petroleum in soil ecosystem. R.M. Atlas (ed). *Petroleum* Macmillan Co, New York. 435–476.
- Bragg J.R., Prince R.C., Harner E.J., Atlas R.M., 1994 – Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*. 368:413–418.
- Brown J.L., Syslo J., Lin Y., Getty S., Vemuri R., Nadeua R., 1998 – On-site treatment of contaminated soils: An Approach to bioremediation of Weathered petroleum compounds. *Journal of Soil Contamination*. 6, 773–800.
- Carberry J.B., Wik J., 2001 – Comparison of ex-situ and in-situ bioremediation of unsaturated soils contaminated by petroleum. *Journal of Environmental Science and Health*. 8, 1491–150.
- Chaîneau C.H., Morel J.L., Dupont J., Bury E., Qudot J., 1999 – Comparison of the oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci. Total Environ.* 227, 237–247.
- Chaîneau C.H., Morel J.L., Qudot J., 1995 – Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1615–1621.
- Chaîneau C.H., Morel J.L., Qudot J., 2000 – Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of Maize (*Zea mays* L.). *J. Environ. Qual.* 29, 569–578.
- Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J., Ballerini D., 2005 – Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*. 144, 419–440.
- Chang Z.Z., Weaver R.W., Rhykerd R.L., 1996 – Oil bioremediation in a high and low phosphorous soil. *J. Soil Contam.* 5, 215–224.
- Chang D.Y., Lopez I., Yocklovich S.G., 1992 – Determine of kerosene and # diesel in soil by purge and trap vs. extraction procedure. *J. Soil Contam.* 13, 239–251.
- Colleran E., 1996 – Uses of bacteria in bioremediation: *Methods in Biotechnology*. Vol.2: *Bioremediation Protocols* (Sheehan D. red.) Humana Press. Inc. Totowa N.J.
- Cookson J.T., 1995 – *Bioremediation engineering Design and application*. McGraw-Hill, New York.

- Cunningham C.J., Jvshana J.B., Lozinsky V.I., 2004 – Bioremediation of diesel contaminated soil microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 167–174.
- Czekaj L., Fijał J., Grzynowicz I., Jamrozik A., 2005 – Wpływ odpadów wiertniczych na wybrane fizykochemiczne właściwości gruntu spoistego. *Wiertnictwo-Nafta-Gaz. Rocznik AGH* 21, 111–117.
- De Jonge H., Freijer J.I., Verstraten J.M., Westerveld J., 1997 – Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31, 771–775.
- Hejazi R.F. and Husain T., 2004 – Landform performance under arid conditions. 2. Evaluation of parameters. *Environ. Sci. Technol.* 8, 2457–2469.
- Huddleston R.L., Bleckman C.A., Wolfe J.R., 1986 – Land treatment biological degradation processes. Land treatment: A hazardous waste management alternative (Loehr, R.C., J.E. Malina Jr. red.), University of Texas, 41–62.
- Hutchinson S.L., Banks M.K., Schwab A.P., 2001 – Phytoremediation of Aged Petroleum Sludge. *J. Environ. Qual.* 30, 395–403.
- Huesemann H.M., Hausmann T.S., Fortman T.J., 2003 – Assessment of bioavailability limitations during slurry biodegradation of petroleum hydrocarbons in aged soils. *Environ. Toxicology and Chemistry*. 12, 2853–2860.
- Kołwzan E., 2005 – Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksycologiczną. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Korda A.D., Santos A., Tenente R., Santos P., 1997 – Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical technique, in-situ treatments and commercial mikroorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 677–686.
- Kurek E., Stec A., Staniak D., 1998 – Biodegradacja ex-situ gleby skażonej produktami ropopochodnymi. *Ekonżynieria*. 9, 5–11.
- Lazar I., Voicu A., Nicolescu C. and Mucenica D., 1999 – The use of naturally occurring selectively isolated bacteria for inhibiting paraffin deposition. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 22, 161–169.
- Li H., Zhang Y., Zhang C.G., Chen G.X., 2005 – Effect of petroleum-containing wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in a Paddy soil irrigation area. *J. Environ. Qual.* 34, 1073–1080.
- Liu S. and Sufliata J.M., 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 11, 34–352.
- Morgan P., Witkinson R., 1990 – Assessment of the potential for in situ biotreatment of hydrocarbon-contaminated soils. *Wat. Sci. Tech.* 22, 63–65.
- Pettersen B.W., Andersen B.M., Baggersgard H., Jensen L.H., Lyngso B., Kjaer B.N., 1993 – Remediation of oil polluted soil by compost, compared to the other additives, *Integrated Soil and Sediment Research: A basis for Proper Protection*. Kluwer., 684–687.
- Prince R.C., Elmendorf D.L., Lute J.R., Hsu C.S., Haith C.E., Senius J.D., Dechert G.J., Douglas G.S., Butler E.L., 1994 – 17-alpha(H), 21-beta(H)-Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude-oil. *Environ. Sci. Technol.* 28, 142–145.
- Pollard S.J.T., Whittaker M., Risdien G.C., 1999 – The fate heavy oil wastes in soil microcosms I: A performance assessment of biotransformation indices. *Sci. Total. Environ.* 226, 1–22.
- Qudot J., Dutrieux E., 1989 – Hydrocarbon weathering and biodegradation in tropical estuarine ecosystem. *Mar. Environ. Res.* 27, 195–213.
- Rahman K.S.M., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumaisamy P., Banat I.M., 2002 – Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85, 257–261.
- Rehm H.J., Reiff I., 1981 – Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long chain alkanes. *Advanced in Biochemical Engineering* 19, 175–215.
- Riscer-Roberts E., 1998 – Remediation of Petroleum Contaminated Soil. Lewis Publ. Washington (USA).
- Rittmann B.E., et al., 1994 – In situ bioremediation. Noyes Publications Park Ridge, New Jersey, USA.

- Roche A.C., Miller C.T., 1991 – Assessment of extraction methodologies for measuring subsurface contamination. *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, 732–739.
- Rubin H., Narkis N., 2001 – Feasibility on-situ bioremediation of loam soil contaminated by diesel oil. *Journal Environmental Science and Health.* 8, 1549–1588.
- Santas R., Korda A., Tenente A., Buchholz K., Sandas P., 1999 – Mesocosm assays of oil spill bioremediation with oleophilic fertilizers: Inopol, FI or both? *Marine Pollution Bulletin.* 38, 44–48.
- Saponaro S., Bonomo L., Petruzzelli G., Romele L., Barbafieri M., 2002 – Polycyclic aromatic hydrocarbons slurry phase bioremediation of a manufacturing gas (MGP) aged soil. *Water, Air, and Soil Pollut.* 135, 219–235.
- Saweyr G.M., 1996 – Determination of gasoline range, diesel range organics in soils and water by flame ionization gas chromatography. *J. Soil Contam.* 3, 261–300.
- Sharma V.K., Hicks S.D., Rivera W., Vazquez F.G., 2002 – Characterization and degradation of petroleum hydrocarbons following an oil spill into a coastal environment of south Texas, U.S.A. *Water, Air, Soiland Pollut.* 134, 111–127.
- Sims J.L., Sims R.C., Dupont R.R., Matthews J.E. and Russel H.H., 1993 – In situ bioremediation of contaminated unsaturated surface soils. US EPA Technical Report. EPA /540/5-93/501. Utah State University.
- Siuta J., 2000 – Podstawy biodegradacji ropopochodnych składników w glebach i odpadach. *Inżynieria Ekologiczna* 2, 23–35.
- Siuta J., 2003 – Ekologiczne, technologiczne i prawne aspekty rekultywacji gruntów zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. *Inżynieria Ekologiczna* 8, 7–26.
- Steliga T., 2003 – The effectiveness of soil purification from petroleum hydrocarbons verify by usage ultrasound extraction combined with gas chromatography. *The XXVII Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Katowice* 34–36.
- Steliga T. and Kluk D., 2004 – Analiza przebiegu procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w gruncie z wykorzystaniem chromatografii gazowej. *Wiertnictwo-Nafta-Gaz* AGH 21, 349–356.
- Steliga T., 2006a – Technologia oczyszczania gruntów z zanieczyszczeń ropopochodnych metodą in-situ. *Prace INiG, Kraków* 133, 1–78.
- Steliga T. and Jakubowicz P., 2006 – Badania przemysłowe procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w odpadach wiertniczych. *Bezpieczeństwo pracy i ochrona środowiska w Górnictwie. Miesięcznik WUG* 4, 15–21.
- Van Delef R.J., Doverem A.S.M.J., Snijders A.G., 1994 – The determination petroleum hydrocarbons In soil using a miniaturized extraction method and gas chromatography. *Fresenius J. Anal.Chem.* 350, 638–641.
- Venosa A.D., Suidan M.T., King D., Wrenn B.A., 1997 – Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 18, 131–139.
- Waksmundzka-Hajnos M., 1998 – Properties of florasil and its use in chromatography. *Chem. Anal. (Warsaw)* 43, 300–324.
- Wang Z., Fingas M. and Sergy G., 1994 – Study of 22-year old Arrow oil using biomarker compounds by GC/MS. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1733–1746.
- Wilson B.H. and Rees J.E., 1986 – Biotransformation of gasoline hydrocarbons in methanic aquifer material. *Proc. NWWA/API Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water Prevention, Detection and Restoration, Houston, Texas. National Water Well Association.* 128.
- Wright A.L., Weaver R.W., 2004 – Fertilization and bioaugmentation for oil biodegradation in salt march Mesocosms. *Water, Air, and Soil Pollut.* 156, 229–240.
- Wright A.L., Weaver R.W., Webb J.W., 1997 – Oil bioremediation in salt marsh mesocosms as influenced by N and P fertilization, flooding and season. *Water, Air, and Soil Pollut.* 95, 179–191.
- Wrenn B.A. and Venosa A.D., 1996 – Selective enumeration of aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252–258.
- Xu R., Obbard J.P., 2003 – A.G. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *J. Environ. Qual.* 32, 1243–1243.



- Xu R., Obbard J.P., 2004 – Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments. *J. Environ. Qual.* 33, 861–867.
- Xu R., Lau N.L.A., Ng K.L., Obbard J.P., 2004 – Application of a slow-release fertilizer for oil bioremediation in beach sediment. *J. Environ. Qual.* 33, 1210–1216.
- Yerushaimi L., Sarrazin M., Peisajovich A., Leclair G., 2003 – Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. *Bioremediation Journal* 1, 37–51.
- Zińko J., 1999 – Technologie wykorzystujące metody fizyczne oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego. *Ekologia i Technika* 3, 89–94.

#### OPTIMALIZACJA PROCESU BIODEGRADACJI ZANIECZYSZCZEŃ ROPOPOCHODNYCH W ZASTARZAŁYCH ODPADACH Z DOŁÓW UROBKOWYCH

##### Słowa kluczowe

Zanieczyszczenia ropopochodne, TPH, biodegradacja, bioremediacja, bioaugmentacja\*, mikroorganizmy autochtoniczne, odpad wiertniczy, dół urobkowy, gleba, chromatografia GC.

##### Streszczenie

Substancje ropopochodne stanowią jedno z głównych źródeł skażenia gleby z terenów zastarzałych dołów urobkowych, które powstały w wyniku prowadzenia na tych obszarach prac poszukiwawczych, wybojowych i eksploatacyjnych powodując degradację i nieprzydatność użytkową gleby.

W artykule przedstawiono zagadnienia związane z problemem oczyszczania odpadów pochodzących z zastarzałych dołów urobkowych, na przykładzie dołów urobkowych G-44 i G-40 różniących się zawartością zanieczyszczeń ropopochodnych oraz minerałów ilastych w odpadzie.

Cały cykl oczyszczania gleby/odpadu wiertniczego z zanieczyszczeń ropopochodnych kontrolowany jest za pomocą opracowanej metodyki chromatograficznego oznaczania substancji ropopochodnych w odpadzie wiertniczym/glebie. Pozwala ona na zaobserwowanie zmian zawartości n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych podczas procesu ich biodegradacji w poszczególnych etapach oczyszczania oraz umożliwia ocenę stopnia biodegradacji n-alkanów za pomocą wskaźników: n-C<sub>17</sub>/Pr i n-C<sub>18</sub>/F.

W badaniach laboratoryjnych przy zastosowaniu biomarkera: C<sub>30</sub>17α(H),21β(H)-hopane do normalizacji stężeń analitu (TPH) przedstawiono pierwszorzędowy model biodegradacji TPH w kolejnych etapach prowadzonego procesu oczyszczania.

Omówiono wyniki prac optymalizacyjnych podczas oczyszczania dołów urobkowych wykorzystując etapową technologię oczyszczania odpadu wiertniczego/gleby z zanieczyszczeń ropopochodnych obejmującą: rekultywację wstępną, bioremediację podstawową, bioaugmentację poprzez inokulację\* biopreparatem opracowanym na bazie mikroorganizmów autochtonicznych, którą modyfikowano w zależności od charakteru zanieczyszczeń oczyszczanego obiektu.

Przeniesienie wyników badań laboratoryjnych (*ex-situ*) na warunki przemysłowe stwarza duże trudności, jednakże były one podstawą opracowania wytycznych prowadzenia procesu oczyszczania metodą *in-situ*, a ponadto pozwoliły prześledzić przebieg procesu oczyszczania odpadu z dołu urobkowego, dobrać optymalne dawki substancji biogennej, określić ramy czasowe prowadzenia poszczególnych etapów oczyszczania oraz zapoznać się z efektywnością opracowanego biopreparatu na bazie mikroorganizmów autochtonicznych.

Przedstawiona technologia oczyszczania gleby z dołów urobkowych o wysokiej koncentracji zanieczyszczeń ropopochodnych, polegająca na etapowym prowadzeniu procesu oczyszczania, umożliwiła usunięcie tych zanieczyszczeń do zadowalającego poziomu, co potwierdza jej praktyczną przydatność.

\* Terminologia stosowana przez autorkę.

OPTIMISATION OF BIODEGRADATION PROCESS FOR PETROLEUM POLLUTANTS  
IN WEATHERED WASTES FROM MUD PITS

Key words

Petroleum pollutants, TPH, petroleum hydrocarbons, biodegradation, bioremediation, bioaugmentation, autochthonous microorganisms, chromatography GC, drilling wastes, mud pit, soil

Abstract

Petroleum substances are one of the principal sources of soil contamination on the area of weathered mud pits, which originate from execution of surveying, extraction and exploitation works causing soil degradation and uselessness.

The article presents the matters related to the issue of cleaning of wastes, which originate from weathered mud pits on the basis of the examples of pits no G-44 and G-40, which differ in contents of petroleum pollutants and loamy minerals in wastes.

The total cycle of cleaning of the drilling wastes/soil of the petroleum pollutants was controlled by the elaborated method of chromatographic marking of petroleum substances in drilling wastes/soil. The method allowed for following the changes of contents of n-alkanes included in the oil hydrocarbon in the course of their biodegrading process in particular stages of cleaning and allowed for assessing of the biodegrading level of n-alkanes using indicators: n-C<sub>17</sub>/Pr and n-C<sub>18</sub>/F.

Moreover, within the course of laboratory studies a biomarker: C<sub>30</sub>17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-hopane was used to normalized analyte concentrations (the TPH) in order to present a simplified mathematic model of the course of biodegrading process.

The results of optimization works are discussed for mud pits using the phased cleaning process of drilling waste/soil of the petroleum pollutants, which includes: initial reclaiming, basic bioremediation, and bioaugmentation by inoculation with a biopreparation based on autochthonic microorganisms, which has been modified depending on character of pollutants in cleaned object.

Transferring of the laboratory research results (*ex-situ*) into the industrial conditions generated large difficulties, however, it was the basis for elaboration of guidelines for conducting cleaning process with an *in-situ* method. Moreover, it allowed for following of the cleaning process of drilling pit waste, selection of optimal doses of biogenic substances, determining of time framework of particular stages of cleaning and learning about efficiency of developed biopreparation based on the autochthonic microorganisms.

The presented process of cleaning of mud pit soil featuring high concentration of oil petroleum pollutants, which depends on running a staged process of cleaning, allows for removing of these pollutants to a satisfactory level thus confirming its practical usefulness.