

Barbara Kołwzan

Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi

Produkty naftowe należą do zanieczyszczeń najczęściej występujących w środowisku gruntowo-wodnym. Są one mieszaniną związków – głównie węglowodorów – o zróżnicowanych właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych. Większość składników produktów naftowych działa toksycznie na organizmy żywe, zarówno roślinne, jak i zwierzęce, a także stwarza zagrożenie zdrowia ludzi [15]. Do najbardziej niebezpiecznych należą węglowodory aromatyczne, jak benzen, toluen, ksylen (BTX), oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Szkodliwe działanie produktów naftowych wynika nie tylko z ich bezpośredniej toksyczności, ale także negatywnego wpływu na właściwości fizyczno-chemiczne środowiska gruntowo-wodnego [14]. Produkty naftowe przedostając się w głąb gleby powodują zasklepienie przestrzeni, którymi transportowana jest woda i powietrze, a w konsekwencji – zbrzylenie gleby. Ich obecność powoduje zmniejszenie pojemności kompleksu sorcyjnego gleby, a także przyswajalności związków potasu, magnezu i fosforu, przy jednoczesnym nadmiarze związków węgla. Wynikające z tego zakłócenia równowagi biologicznej prowadzą do ostrych deficytów tlenu w glebie oraz niedoboru form azotu i fosforu przyswajalnych przez rośliny [16]. Skutkiem tych niekorzystnych zmian jest destrukcja materiału siewnego oraz zmniejszenie plonowania roślin. Gleba nie jest przystosowana do zmian wynikających z wprowadzenia do niej znacznych ilości substancji chemicznych, w przeciwieństwie do środowiska wodnego czy atmosfery, gdzie mieszanie, ruch mas wody i powietrza powodują rozcieńczenie zanieczyszczeń, a także przyspieszają procesy samooczyszczania. Ponadto zanieczyszczenia dostają się do gleby najczęściej incydentalnie i punktowo, a biocenoza glebowa nie potrafi szybko przystosować się do ich obecności.

Ze względu na zagrożenia ekologiczne i zdrowotne związane z obecnością w środowisku produktów naftowych, konieczne jest przeprowadzenie szeregu działań mających na celu oczyszczenie terenów z tych uciążliwych i szkodliwych zanieczyszczeń. Technologie prowadzące do ograniczenia migracji zanieczyszczeń, wykorzystujące różnego rodzaju zabezpieczenia (bariery izolacyjne na wodach stojących i płynących, bariery hydrauliczne, bariery pneumatyczno-hydrauliczne, biobariery, przelewy z łapaczami olejów, stabilizacja i zestalanie zanieczyszczeń), stanowią pierwszy krok do eliminacji produktów naftowych ze środowiska, ale nie rozwiązują ostatecznie powstałego problemu [13,17].

Ostatecznym i niezbędnym zabiegiem jest rozkład zanieczyszczeń naftowych. Opracowane dotychczas technologie oczyszczania gruntów oparte są głównie na procesach fizycznych i chemicznych. Większość z nich charakteryzuje się zbyt gwałtowną ingerencją w strukturę gleby, zmieniając jej właściwości i uniemożliwiając jej późniejsze wykorzystanie rolnicze. Dzieje się tak np. w przypadku likwidacji zanieczyszczeń metodami termicznymi. Do najbardziej drastycznych metod należy spalanie w wysokiej temperaturze, które prowadzi do całkowitej eliminacji życia biologicznego w glebie, przy czym destrukcji ulegają także związki organiczne decydujące o jej żyzności. Inne techniki termiczne, takie jak ogrzewanie mikrofalowe i desorpcja parą wodną polegają wprawdzie na zastosowaniu niższych temperatur, jednakże i one przyczyniają się do zmian zarówno w składzie chemicznym gleby, jak i w składzie ilościowym i jakościowym organizmów glebowych. Można się także spodziewać, że przyspieszając proces ulatniania węglowodorów mogą one przyczynić się do rozprzestrzenienia zanieczyszczeń w powietrzu atmosferycznym i wymagają zastosowania bardzo wielu zabezpieczeń eliminujących tego typu zagrożenie. Podobne spostrzeżenia dotyczą związków chemicznych (surfaktanty, rozpuszczalniki) używanych do ekstrakcji zanieczyszczeń, gdyż stanowią one dodatkowe zanieczyszczenie oraz mają negatywny wpływ na biocenozę glebową [28].

Alternatywą dla tych metod jest zastosowanie mikroorganizmów do usuwania produktów naftowych z gleby w procesie bioremediacji. Zasadniczą rolę w procesie biologicznego oczyszczania środowiska zanieczyszczonego produktami naftowymi spełniają mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania węglowodorów w charakterze źródła węgla i energii. Poznanie dróg mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń naftowych pozwala na skuteczne wykorzystanie ich aktywności w procesach technologicznych [26,27]. Bioremediacja bazuje na biodegradacyjnej działalności mikroorganizmów oraz koncentruje się na zwiększeniu wydajności już istniejących, lecz powolnych, procesów samooczyszczania zachodzących w gruncie. Szybkie i skuteczne przeprowadzenie procesu bioremediacji zależy od liczebności i aktywności degradacyjnej mikroorganizmów glebowych. Początkową dużą liczebność mikroorganizmów w gruncie można osiągnąć w procesach biostymulacji i bioaugmentacji. Biostymulacja polega na wzbogaceniu gleby w substancje biogenne i regulacji innych parametrów środowiska decydujących o rozwoju mikroorganizmów (natlenienie, pH, wilgotność), natomiast bioaugmentacja to wzbogacenie zanieczyszczonego terenu w mikroorganizmy specjalnie wyselekcjonowane, o dużej zdolności do biodegradacji zanieczyszczeń. Stosowana jest ona wówczas, gdy rodzima populacja bakterii na skażonym terenie nie jest liczna

i nie wykazuje pożądanej aktywności w kierunku biodegradacji zanieczyszczeń. Technologię tę realizuje się przez bezpośrednią iniekcję zawiesiny mikroorganizmów o pożądanej aktywności katalitycznej wraz z substancjami odżywczymi do skażonego gruntu. O skuteczności procesu biodegradacji węglowodorów naftowych decyduje w dużej mierze także sposób inokulacji gruntu mikroorganizmami. Musi on zapewnić równomierne rozmieszczenie mikroorganizmów w gruncie i możliwość ich dotarcia do substratu pokarmowego. Biopreparaty mogą być wprowadzane do gleby w postaci zawiesiny mikroorganizmów lub jako osadzone na nośniku stałym (immobilizowane) [19].

Do bioaugmentacji wykorzystuje się biopreparaty zawierające szczepy przygotowane w wyspecjalizowanych laboratoriach mikrobiologicznych [9–12]. Dobór szczepów do inokulacji zanieczyszczonych gruntów nastęrcza wiele problemów. Powinny one – oprócz dużej skuteczności rozkładu węglowodorów naftowych – mieć wiele dodatkowych cech umożliwiających ich adaptację i rozwój w nowym środowisku [15]. Warunkiem adaptacji inokulantów w gruncie jest brak antagonistycznych oddziaływań z naturalną mikroflorą gleby. Biopreparaty powinny być całkowicie bezpieczne dla człowieka i środowiska. Dlatego też muszą mieć atest Państwowego Zakładu Higieny, który gwarantuje, że nie zawierają drobnoustrojów chorobotwórczych.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było porównanie skuteczności działania inokulantów zawierających naturalną mikroflorę zanieczyszczonej gleby oraz inokulantów sporządzonych na bazie obcych szczepów bakterii, ale wyjątkowo aktywnych degradacyjnie. Określono skuteczność tych inokulantów w usuwaniu produktów naftowych z gleby zanieczyszczonej olejem napędowym, a także oceniono wpływ procesu bioremediacji na skład fizyczno-chemiczny i mikrobiologiczny gleby oraz odcieków.

Materiały i metody

Inokulanty

W badaniach zastosowano trzy inokulanty sporządzone na bazie szczepów bakterii obcych, tj. *Acinetobacter lwoffii* (K29), *Pseudomonas putida* (K3) i *Rhodococcus erythropolis* (K45), oraz jeden inokulant zawierający mieszaną kulturę bakterii autochtonicznych (BIO-1). Bakterie autochtoniczne zostały wyizolowane z zanieczyszczonej gleby i poddane testom diagnostycznym [3]. Przed przystąpieniem do badań lizymetrycznych sprawdzono skuteczność rozkładu oleju napędowego przez mikroorganizmy zawarte w inokulantach oraz właściwości cytotoksyczne (test MTT) i mutagenne (test Ames) metabolitów powstających w procesie biodegradacji. W przypadku inokulantów zawierających szczepy obce sprawdzono ich interakcje z naturalną mikroflorą skażonego gruntu (test krążkowy). Inokulanty wykorzystane w doświadczeniach polowych zostały wprowadzone do gleby w postaci zawiesiny mikroorganizmów lub jako osadzone na nośniku stałym.

Badania lizymetryczne

Badania lizymetryczne przeprowadzono w Obserwatorium Agro- i Hydrometeorologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, położonym w nizinnej części doliny Odry (szer. geogr. 51°07', dł. geogr. 17°07', wys. 120 m n.p.m.). Lizymetry napełniono na polach płodozmianu monolitami glebowymi o nienaruszonej strukturze i składzie granulometrycznym. Po podcięciu i zamocowaniu perforowanego dna (100 otworów

o śr. 4 mm) przewieziono je do stanowisk pomiarowych w obserwatorium. Masa gleby w wazonie o powierzchni 0,3 m² i wysokości 0,8 m wynosiła ok. 450 kg, stwarzając warunki do normalnej wegetacji większości roślin uprawnych. Stanowiska pomiarowe znajdowały się w łanie roślin, co zapewniło naturalne warunki fitosocjologiczne. Gleba wypełniająca lizymetry była piaszczysto-gliniasta, podścielona gliną (klasa bonitacyjna IVa) i charakteryzowała się następującymi właściwościami fizyczno-chemicznymi [2]:

- zawartość części ziemistych spławalnych: 10+30% (duża zawartość części szkieletowych),
- zawartość frakcji o średnicy powyżej 1,0 mm: 1,9%,
- zawartość frakcji o średnicy poniżej 0,002 mm: 14,2 %,
- ciężar objętościowy: 1,7 g/cm³,
- porowatość: 35%,
- połowa pojemność wodna warstwy o wysokości 100 cm: 217 mm,
- zawartość substancji ekstrahujących się dichlorometanem (w suchej masie): 531 mg/kg,
- zawartość substancji ekstrahujących się tetrachlorkiem węgla (w suchej masie): 595 mg/kg,
- pH: 6,5+7,0.

Gleba użyta do wypełnienia kolumn lizymetrycznych zawierała znaczną ilość składników mineralnych, szczególnie w głębszych warstwach (tab. 1). Składniki organiczne gleby obecne były przede wszystkim w jej warstwie powierzchniowej (do 20 cm). Wykryto tu także niewielkie ilości metali ciężkich (Cd, Zn, Pb, Cu, Ni). Zawartość związków azotu i fosforu w glebie była niewielka i z uwagi na planowaną ilość wprowadzonego węgla organicznego konieczne było uzupełnienie tych pierwiastków w celu optymalizacji przebiegu biodegradacji produktów naftowych.

Powierzchniowa warstwa gleby (do 15 cm) została zanieczyszczona olejem napędowym, a następnie poddano ją oczyszczaniu metodą *in situ* z wykorzystaniem inokulantów bakteryjnych. Olej napędowy wprowadzono do gleby w dwóch etapach. W pierwszym jego zawartość osiągnęła 3%, a następnie po upływie 7 d olej uzupełniono do wartości 10% (w przeliczeniu na suchą masę gleby). Dwuetapowe wprowadzanie oleju napędowego miało na celu zniwelowanie toksycznego oddziaływania produktów naftowych na mikroflorę

Tabela 1. Wskaźniki fizyczno-chemiczne gleby użytej do badań lizymetrycznych (w suchej masie)
Table 1. Physicochemical parameters of the soil used in field experiments

Wskaźnik	Głębokość, cm			
	0,5	20	40	60
Uwodnienie, %	5,61	7,74	10,75	10,4
Substancje organiczne, %	2,5	1,7	0,7	0,7
Substancje mineralne, %	97,5	98,3	99,3	99,3
Azot ogólny, %	0,039	0,03	0,02	0,015
Fosfor, %	0,063	0,046	0,014	0,043
Kadm, %	0,001	0,020	0,019	0,006
Kobalt, %	nw.	nw.	nw.	nw.
Cynk, %	0,038	0,022	0,014	0,039
Ołów, %	0,27	0,28	0,16	0,069
Miedź, %	0,009	0,005	0,003	0,013
Chrom, %	nw.	nw.	nw.	nw.
Nikiel, %	0,002	0,001	0,001	0,002

glebową i umożliwienie jej stopniowej adaptacji. Następnie glebę wzbogacono w inokulanty bakteryjne wprowadzone metodą zraszania. Ogólna liczba bakterii w 1 g gleby (w przeliczeniu na suchą masę) przed zaszczepieniem wynosiła 10^4 komórek, a po wprowadzeniu inokulantów zwiększyła się do 10^8 komórek.

Uzupełniono także zawartość pierwiastków biogennych w glebie. Związki azotu i fosforu wprowadzono w ilościach, które zapewniły ich właściwy stosunek do węgla w glebie, zgodnie z proporcją C:N:P=10:1:0,1 ustaloną w przypadku gleb lekkich. Biogeny wprowadzono do gleby w postaci azotanu amonu, azotanu potasu, fosforanu amonu i fosforanu potasu. Związki te dodano do gleby kilkukrotnie, aby uniknąć toksycznego oddziaływania soli występujących w zbyt dużych ilościach. Zapotrzebowanie na pierwiastki biogenne ustalano na podstawie analizy ich zawartości w glebie oraz na podstawie pomiaru aktywności dehydrogenazowej mikroorganizmów glebowych. Badania przeprowadzono w 12 lizymetrach polowych. Do kolumny kontrolnej (K0) nie wprowadzono oleju napędowego oraz związków azotu i fosforu.

Badania w naturalnych warunkach meteorologicznych trwały łącznie 22 tygodnie. Cały proces obejmował dwie fazy bioremediacji: pierwszą – oczyszczanie właściwe – trwającą 17 tygodni i drugą – doczyszczanie – trwającą 5 tygodni. W celu zachowania stałych warunków przebiegu procesu, uzupełniano w razie potrzeby wodę w glebie do zawartości 60% całkowitej pojemności wodnej (WHC), a jej powierzchniową warstwę natleniało się przez mechaniczne mieszanie.

Monitoring bioremediacji

Monitoring procesu bioremediacji prowadzony był w oparciu o analizę wskaźników fizyczno-chemicznych i mikrobiologicznych gleby oraz odcieków z kolumn lizymetrycznych. Ilościowe oznaczenie drobnoustrojów w gruncie wykonano metodą bezpośredniego liczenia kolonii na płytkach lub metodą rozcieńczeń McCradyego, stosując odpowiednie podłoża hodowlane [20]. Wyniki analiz podano w postaci jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 g gleby lub w postaci najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii (NPL) w 1 g gleby. Aktywność dehydrogenazową mikroorganizmów glebowych oznaczono zmodyfikowaną metodą Casidyego [4], aktywność ureazową metodą Hoffmana i Teichera [6], natomiast aktywność katalazową metodą manganometryczną [21]. Analizy fizyczno-chemiczne gleby oraz odcieków z kolumn lizymetrycznych wykonano zgodnie z obowiązującą metodyką [7].

Zawartość produktów naftowych w glebie oznaczono metodą grawimetryczną w próbkach po ekstrakcji heksanem i dichlometanem. Wyniki podano w przeliczeniu na suchą masę gleby. Analizy chromatograficzne produktów naftowych przeprowadzono na chromatografii gazowej N-504 wyposażonym w kolumnę kapilarną o długości 25 cm i detektor płomieniowo-jonizacyjny 9FID, w warunkach programowania temperatur 30–5 min, 3–1 min, 240–10 min. Jako gaz nośny zastosowano hel, a do detektora wodór i powietrze. Temperatura detektora wynosiła 300 °C. Analiza GC/MS została wykonana na aparacie Hewlett-Packard ser. II GC 5890, MS 5971 na kolumnie kapilarnej HP-5, 25 m, z programowaną temperaturą kolumny w zakresach: olej napędowy – 50 °C (5 min), 3 °C/min do 280 °C (5 min) [22,25].

Omówienie wyników badań

Biologiczne oczyszczanie gleby może być bardziej skuteczne, gdy zwiększy się liczebność mikroorganizmów aktywnych degradacyjnie. Proces bioaugmentacji wykonywany jest najczęściej w oparciu o komercyjne biopreparaty. Zawierają

one aktywne degradacyjnie szczepy pochodzące z kolekcji przygotowanych przez profesjonalne firmy. Biopreparaty – obok niezaprzeczalnych zalet – mają wiele mankamentów, które sprawiają, że nie zawsze ich zastosowanie daje oczekiwane rezultaty. Po pierwsze wymagają ożywienia, gdyż zawierają mikroorganizmy w postaci liofilizowanej, zamrożonej, względnie w stanie anabiozy. Brak profesjonalizmu użytkowników sprawia często, że nie osiągają one wymaganej aktywności degradacyjnej. Ponadto nie jest możliwe w tym przypadku sprawdzenie przed zakupem, czy mikroorganizmy zawarte w biopreparacie nie są antagonistami mikroorganizmów naturalnie zasiedlających glebę poddawaną procesowi oczyszczania. Wprowadzenie mikroorganizmów obcych może spowodować tak głębokie zaburzenia w poszczególnych ekosystemach, że przywrócenie równowagi biologicznej po bioremediacji będzie niezwykle trudne [5].

Alternatywą dla produktów komercyjnych są biopreparaty sporządzone na bazie mikroflory autochtonicznej. Niestety muszą być one indywidualnie dopasowane do każdej zanieczyszczonej gleby, co wymaga izolacji rodzimych mikroorganizmów oraz ich selekcji w laboratorium w celu uzyskania najaktywniejszych szczepów. Następnie oznacza się przynależność taksonomiczną mikroorganizmów i z tak przygotowanego konsorcjum eliminuje się drobnoustroje patogenne. Praktycznie wykorzystane mogą być te biopreparaty, które uzyskają atest PZH gwarantujący ich bezpieczne stosowanie. Przygotowanie takiego biopreparatu jest nie tylko kosztowne, ale także bardzo czasochłonne. Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie, który z przedstawionych typów biopreparatów jest skuteczniejszy i bardziej bezpieczny dla środowiska. Badania lizymetryczne przeprowadzono w warunkach polowych z uwzględnieniem warunków niezbędnych do skutecznego przebiegu procesu bioremediacji gleby.

Charakterystyka inokulantów bakteryjnych

W badaniach lizymetrycznych wykorzystano biopreparaty dokładnie sprawdzone nie tylko pod względem skuteczności działania, ale także innych ważnych cech biologicznych. Charakterystykę inokulantów podano w tabeli 2. Do ich sporządzenia posłużyły trzy szczepy bakterii odznaczających się dużą aktywnością degradacyjną, tj. *Acinetobacter lwoffii* (K29), *Pseudomonas putida* (K3) i *Rhodococcus erythropolis* (K45). Szczepy te pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Biologii i Ekologii Politechniki Wrocławskiej i nie wykazały antagonistycznych oddziaływań z mikroflorą gleby wykorzystanej w badaniach lizymetrycznych [15,24]. Preparat BIO-1 zawierał natomiast mikroorganizmy autochtoniczne, naturalnie zasiedlające glebę użytą w doświadczeniu lizymetrycznym, tj. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus firmus* i *Bacillus sphaericus*. Sprawdzono, że bakterie wchodzące w skład inokulantów nie należały do gatunków chorobotwórczych. Skuteczność rozkładu oleju napędowego przez preparaty sporządzone na bazie mikroorganizmów autochtonicznych była mniejsza w porównaniu do szczepów z kolekcji własnej (tab. 2). Badania wykazały, że podczas biodegradacji węglowodorów naftowych przez mikroorganizmy obecne w tych preparatach nie powstały uboczne produkty o właściwościach cytotoksycznych [8,15] oraz potencjalnie mutagennych i rakotwórczych [1,15].

Inokulanty wprowadzono do gleby w postaci zawiesiny, z wyjątkiem *Rhodococcus erythropolis* (K45), który został osadzony na wiórach jesionowych. Materiały naturalne o charakterze mineralnym (np. zeolity) okazały się mało przydatne

Tabela 2. Charakterystyka inokulantów zastosowanych w badaniach polowych
Table 2. Characteristics of the inoculants used in field experiments

Symbol biopreparatu	K29	K3	K45	BIO-1
Skład jakościowy mikroorganizmów	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus sphaericus</i>
Pochodzenie	Kolekcja własna bakterii glebowych	Kolekcja własna bakterii glebowych	Kolekcja własna bakterii glebowych	Mikroorganizmy autochtoniczne skażonej gleby
Skuteczność biodegradacji oleju napędowego po 21 d inkubacji	97,3%	90,4%	92,1%	71,0%
Analiza właściwości płynu pochodzanego				
Cytotoksyczność	brak	brak	brak	brak
Mutagenność	brak	brak	brak	brak
Sposób inokulacji gruntu	zawiesina	zawiesina	bakterie immobilizowane na wiórach jesionowych	zawiesina
Liczebność bakterii	$32 \pm 71 \cdot 10^8$ jtk/cm ³	$29 \pm 49 \cdot 10^8$ jtk/cm ³	$22 \pm 28 \cdot 10^8$ jtk/g	$51 \pm 97 \cdot 10^8$ jtk/cm ³

do immobilizacji bakterii, gdyż wzbogacały glebę w składniki mineralne, co mogło powodować zachwianie proporcji między składnikami mineralnymi w glebie. Wszelkiego typu materiały syntetyczne pochodzenia antropogenicznego, takie jak żywice syntetyczne, z góry odrzucono jako potencjalne ksenobiotyki. Zaletą wiórów jesionowych była ich mała podatność na rozkład mikrobiologiczny. Ponadto zawierały one znacznie mniejsze ilości żywic hamujących wzrost bakterii, w porównaniu do wiórów z drzew iglastych.

Skuteczność bioremediacji gleby

Przebieg i skuteczność procesu bioremediacji gleby oceniono w oparciu o analizę standardowych wskaźników charakteryzujących ubytek substratu w procesie biologicznego rozkładu oraz na podstawie analizy fizyczno-chemicznej i mikrobiologicznej gleby i odcieków z kolumn lizymetrycznych. Wprowadzenie do monitoringu bioremediacji dodatkowych parametrów miało na celu zbadanie możliwości migracji zanieczyszczeń z gleby do wód oraz ocenę wpływu procesu na aktywność oraz skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów glebowych. Uznano, że analiza wyników badań mikrobiologicznych pozwoli na ocenę skali zagrożenia ekologicznego wynikającego z przebiegu procesu bioremediacji.

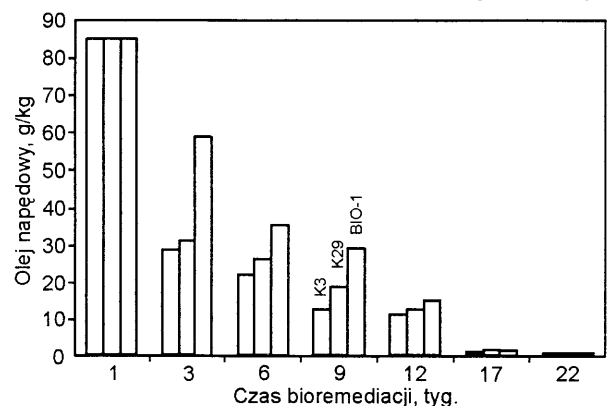
Ubytek produktów naftowych

Przeprowadzone badania wykazały, że biologiczne oczyszczanie gleby przebiegało szybciej w kolumnach lizymetrycznych inokulowanych bakteriami obcymi o dużej aktywności degradacyjnej. Największy ubytek produktów naftowych zanotowano w trzech pierwszych tygodniach badań. Był on skutkiem nie tylko działania drobnoustrojów, ale także odparowywania części węglowodorów oraz procesu utleniania chemicznego. Wpływ mikroorganizmów był szczególnie widoczny w lizymetrach inokulowanych bakteriami należącymi do rodzaju *Pseudomonas* (K3), w których zawartość produktów naftowych zmalała z początkowych 10% do około 3%, podczas gdy w kolumnie zaszczerpionej zespołem mikroorganizmów naturalnie występujących w glebie (BIO-1) wynosiła około 6% (rys. 1).

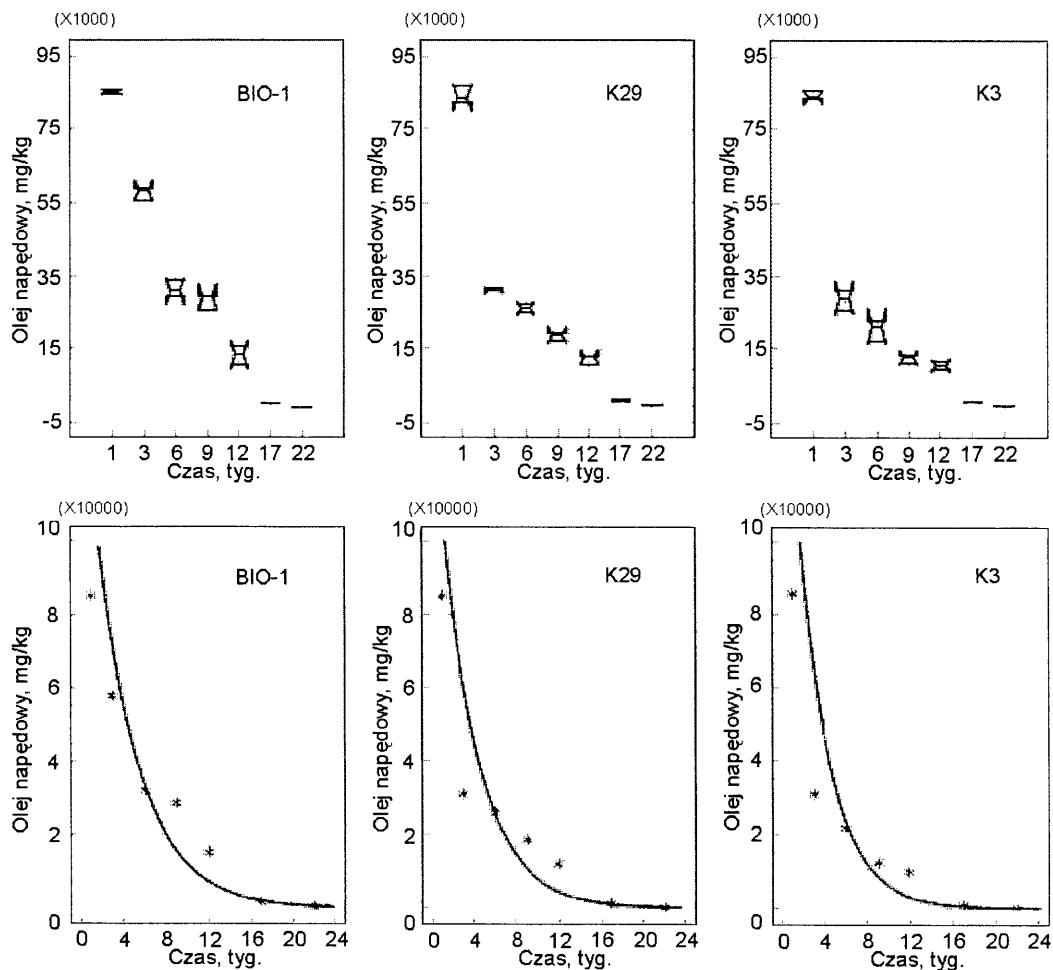
Okazało się także, że inokulacja gleby szczepem *Acinetobacter lwoffii* (K29) dała mniejszą skuteczność bioremediacji gleby. Aktywność tego szczepu zwiększyła się dopiero w drugiej fazie badań. Po 6 tygodniach (II pobór) ubytek produktów

naftowych w glebie (K29 i K3) był zbliżony. Adaptacja mikroflory autochtonicznej trwała ponad 9 tygodni. Po tym czasie zawartość produktów naftowych w glebie z inokulantem BIO-1 zmniejszyła się do 2,8%, podczas gdy w kolumnie inokulowanej szczepem *Pseudomonas putida* (K3) wynosiła 1,2%, a w kolumnie ze szczepem *Acinetobacter lwoffii* (K29) – 1,8%. Dalszy przebieg rozkładu węglowodorów naftowych charakteryzował się bardzo wolnym tempem ich ubytku w glebie. Prawdopodobnie rozłożone zostały wszystkie łatwo biodegradowalne składniki oleju napędowego, a pozostałe należały do trudnorozkładalnych. W ostatnim etapie badań (12–17 tygodni) to samo zjawisko zaobserwowano także w lizymetrach z mikroflorą autochtoniczną (BIO-1). Zawartość produktów naftowych w glebie we wszystkich kolumnach osiągnęła zbliżoną wartość. Oznacza to, że zastosowanie aktywnych szczepów bakterii (K29 i K3) przyspieszyło rozkład jedynie łatwo biodegradowalnych składników oleju napędowego, natomiast adaptacja tych preparatów do rozkładu pozostałych związków była długa, co pozwoliło na zrównanie całkowitego czasu rozkładu węglowodorów naftowych we wszystkich kolumnach, niezależnie od rodzaju zastosowanego inokulantu.

Uzyskane rezultaty wskazywały na konieczność ponownej inokulacji gleby. Do tego celu zastosowano szczep *Rhodococcus erythropolis* (K45), zdolny do wykorzystania w charakterze substratu pokarmowego związków trudnobiodegradowalnych,



Rys. 1. Średnia zawartość oleju napędowego w glebie z lizymetrów
Fig. 1. Average concentration of diesel oil in the soil from lysimeters



Rys. 2. Zawartość produktów naftowych w gruncie podczas bioremediacji
 Fig. 2. Concentration of petroleum products in the soil during bioremediation

takich jak alkiloaromaty czy izoprenoidy. Gleba została ponownie zaszczerpiona po upływie 17 tygodni od rozpoczęcia bioremediacji. Bakterie wprowadzono do gleby w postaci osadzonej na nośniku. Po upływie 5 tygodni od powtórnej inokulacji (czyli po 22 tygodniach bioremediacji) zaobserwowano wyraźny ubytek pozostałości produktów naftowych w glebie. W kolumnie z inokulantem K29 ilość produktów naftowych zmalała do 114,1 mg/kg (ok. 0,01%), a z inokulantem BIO-1 do 409 mg/kg (ok. 0,04%). Najlepsze rezultaty dało ponowne zaszczerpienie gleby uprzednio inokulowanej szczepem *Pseudomonas putida* (K3), w której końcowa zawartość produktów naftowych wyniosła tylko 31,4 mg/kg (ok. 0,003%).

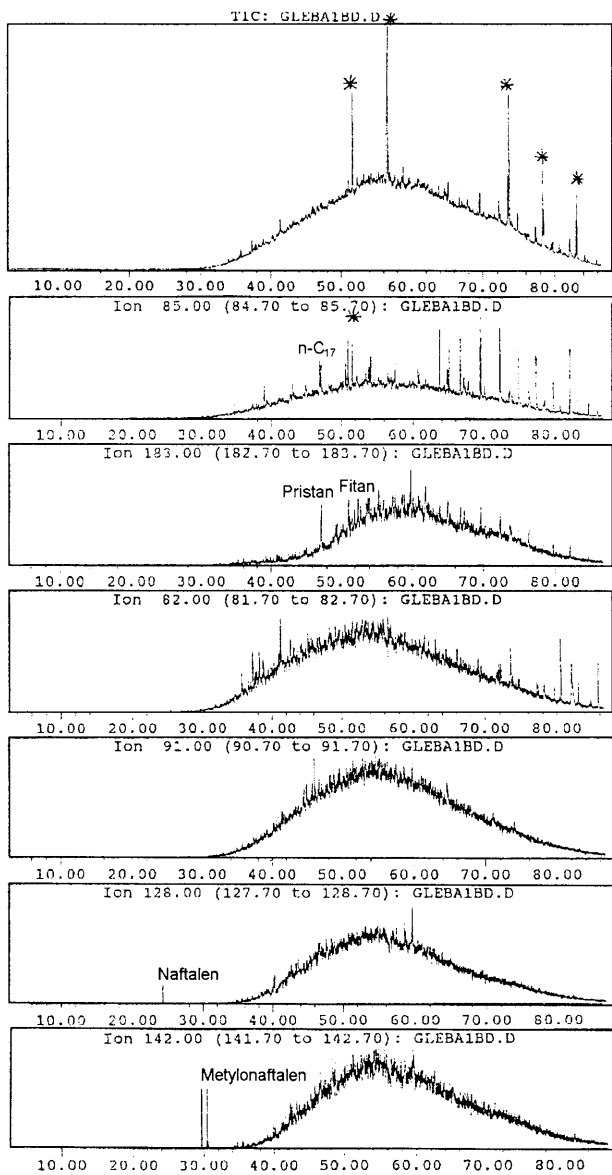
Rysunek 2 przedstawia graficzny obraz wyników analizy statystycznej zawartości produktów naftowych w glebie w poszczególnych lizymetrach (K3, K29, BIO-1). Analizę przeprowadzono w toku bioremediacji. Wprawdzie końcowa zawartość produktów naftowych w oczyszczanej glebie była zróżnicowana, jednak przebieg procesu biodegradacji produktów naftowych we wszystkich lizymetrach był zbliżony i miał charakter malejącej funkcji wykładniczej. Przebieg procesu oczyszczania gleby ilustrują także skrzynki z wcięciami. Środek skrzynki odnosi się do mediany, jej szerokość charakteryzuje rozrzut wartości względem mediany, a kołnierz wartości przekraczające 95% przedział ufności. Z ich wyglądu można dodatkowo wnioskować, że aczkolwiek przebieg procesu rozkładu produktów naftowych miał charakter wykładniczy, to w różnych lizymetrach kształtował się nieco odmiennie w czasie. Szerokość skrzynek w przypadku poszczególnych lizymetrów była wyraźnie niejednolita, co

oznacza, że rozrzut wartości uzyskanych względem mediany był duży na początku badań, a nieznaczny po zakończeniu bioremediacji.

Przeprowadzono także analizę jakościową produktów naftowych w glebie po bioremediacji. Porównanie chromatogramów (GC-MS) pozostałości produktów naftowych zawartych w glebie z poszczególnych lizymetrów (BIO-1, K29, K3) wykazało ich znaczne podobieństwo. We wszystkich próbkach – w porównaniu do oleju napędowego – stwierdzono względny wzrost zawartości węglowodorów izoprenoidowych – pristanu i fitanu. Ponadto obecne były wielkocząsteczkowe n-alkany oraz alkilocykloheksany. Taki skład produktów rozkładu wskazuje na znacznie większą podatność na biodegradację małowcząsteczkowych n-alkanów, w porównaniu do wielkocząsteczkowych n-alkanów i rozgałęzionych węglowodorów oraz cykloalkanów [23]. Chromatogram przedstawiony na rysunku 3 ilustruje skład jakościowy węglowodorów w glebie oczyszczanej preparatem BIO-1.

Skład fizyczno-chemiczny gleby i odcieków z kolumn lizymetrycznych

Proces bioremediacji oceniany był także w oparciu o analizę wybranych wskaźników fizyczno-chemicznych oraz mikrobiologicznych gleby przed, w toku i po procesie oczyszczania. Uzyskiwane na bieżąco wyniki analiz były podstawą do podejmowania decyzji o uzupełnianiu składników pokarmowych i regulacji parametrów technologicznych mających decydujący wpływ na aktywność biodegradacyjną mikroorganizmów. Spośród parametrów mikrobiologicznych analizowano



Rys. 3. Chromatogram GC-MS oleju napędowego po procesie biodegradacji
Fig. 3. GC-MS chromatogram of diesel oil after biodegradation

skład ilościowy i jakościowy mikroflory glebowej oraz jej aktywność enzymatyczną. Informacje te były niezwykle ważne z punktu widzenia konieczności przywrócenia równowagi biologicznej w skażonym terenie po zakończeniu oczyszczania gleby.

Analiza gleby wykonana po procesie bioremediacji określiła zmiany, jakie nastąpiły na skutek jej zanieczyszczenia olejem napędowym i następnie w procesie jej oczyszczania. Stwierdzono znaczne zmniejszenie pH gleby (tab. 3), wzrost zawartości składników organicznych, azotu amonowego i fosforu oraz stałe wymywanie z gleby niektórych jej składników (tab. 4), zwłaszcza metali ciężkich (Zn i Cd). Było to związane ze zmniejszeniem pH gleby, spowodowanym prawdopodobnie znaczną ilością kwaśnych metabolitów powstających w procesie biodegradacji oleju napędowego.

Biologiczne oczyszczanie gleby jest procesem, w którym wiele metabolitów powstających w wyniku biodegradacji produktów naftowych może przedostawać się do wód podziemnych i powierzchniowych, powodując pogorszenie ich jakości. Ze względu na ważność retencyjnej funkcji gleby, dokonano analizy zmian wskaźników fizyczno-chemicznych odcieków z lizymetrów (tab. 5–6).

Tabela 3. Kształtowanie się pH gleby w toku biodegradacji
Table 3. Variations in soil pH during the biodegradation process

Lizyometr	Czas poboru próbek gleby, tygodnie				
	3	6	9	12	17
K3	6,8	6,7	6,4	6,2	5,5
K29	6,6	6,5	6,5	6,4	5,6
BIO-1	6,9	6,8	6,5	6,3	5,6
K0	7,5	7,4	7,0	6,8	6,5

W toku prowadzonego procesu zaobserwowano wyraźne zmniejszenie pH odcieków już w pierwszych tygodniach bioremediacji (tab. 5). Najmniejszą wartość pH=4,9 zanotowano w odcieku z kolumny ze szczepem *Pseudomonas* (K3). Było to prawdopodobnie spowodowane przenikaniem do odpływu związków azotu i fosforu, w które wzbogacona była gleba oraz powstawaniem produktów bioremediacji zmniejszających stężenie jonów wodorowych w odcieku. Potwierdzeniem tego są wartości pozostałych wskaźników analizowanych w toku prowadzonych badań. Na uwagę zasługują wartości ChZT, BZT₅ i utlenialności, które w przypadku lizymetrów doświadczalnych były dużo większe niż w kolumnie kontrolnej. Maksymalne wartości tych wskaźników zbiegają się z gwałtownym ubytkiem produktów naftowych w glebie i sugerują także przenikanie części metabolitów do odcieków. Typowym przykładem są wartości uzyskane w lizymetrze z preparatem BIO-1 po 17 tygodniach trwania badań (tab. 6).

We wszystkich kolumnach (także kontrolnej) zaobserwowano zjawisko wymywania związków azotu i fosforu z gleby. Zawartość tych pierwiastków w glebie powinna być stale kontrolowana i uzupełniana. Potwierdza to sugestie, że pierwiastki biogenne powinny być dodawane w małych ilościach w sposób ciągły.

Analiza zawartości produktów naftowych w odpływach z lizymetrów wykazała, że poprzez warstwę gleby (0,8 m) przenikają do odcieków zaledwie śladowe ich ilości (tab. 7). Stwierdzono, że zjawisko to miało miejsce przede wszystkim w pierwszej fazie bioremediacji, przy czym większe możliwości przenikania produktów naftowych zanotowano w lizymetrach z mikroflorą autochtoniczną (BIO-1). Analiza jakościowa węglowodorów wykazała obecność węglowodorów parafinowych w odciekach z lizymetrów z preparatem BIO-1 oraz ze szczepem z rodzaju *Acinetobacter* (K29), natomiast węglowodory aromatyczne wykryto jedynie w próbce gleby z inokulantem K29 na początku eksperymentu (3 tydzień). Tak nieznaczne ilości wykrytych w odpływach węglowodorów świadczyły o ich zatrzymywaniu w glebie oraz ograniczonej możliwości skażenia wód gruntowych.

Skład mikrobiologiczny gleby

Analiza wskaźników mikrobiologicznych (mikroflora glebowa, aktywność enzymatyczna) miała pomóc w ocenie głębokości zmian, jakie nastąpiły w glebie na skutek wprowadzenia inokulantów i uaktywnienia grupy mikroorganizmów związanych z rozkładem produktów naftowych w glebie. Szczególną uwagę zwrócono na mikroorganizmy biorące udział w przemianach związków azotu, z uwagi na możliwość obserwacji zmian spowodowanych toksycznym oddziaływaniem produktów naftowych na wybrane grupy fizjologiczne bakterii. Ponadto uznano, że wprowadzenie dodatkowych ilości mineralnych nawozów azotowych mogło zakłócić normalny przebieg procesów mikrobiologicznych w glebie.

Tabela 4. Wskaźniki fizyczno-chemiczne gleby po bioremediacji
Table 4. Physicochemical parameters of soil after bioremediation

Wskaźnik	Głębokość, cm								
	0-20			40			60		
	BIO-1	K3	K29	BIO-1	K3	K29	BIO-1	K3	K29
Lizymetr									
Uwodnienie, %	15,3	14,9	15,5	9,1	12,7	13,4	12,3	13,5	14,1
Substancje organiczne, %	3,1	1,9	3,7	1,1	0,9	1,5	0,6	0,7	0,8
Substancje mineralne, %	96,9	98,1	96,3	98,9	99,1	98,5	99,4	99,3	99,2
Azot ogólny, %	0,155	0,126	0,163	0,089	0,059	0,094	0,039	0,046	0,043
Fosfor, %	0,094	0,068	0,12	0,068	0,024	0,052	0,013	0,015	0,012
Kadm, %	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.
Kobalt, %	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.
Cynk, %	0,028	0,023	0,022	0,031	0,026	0,021	0,021	0,015	0,019
Ołów, %	0,006	0,007	0,005	0,016	0,015	0,004	0,001	0,001	0,002
Miedź, %	0,004	0,003	0,004	0,003	0,004	0,002	0,004	0,002	0,002
Chrom, %	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.
Nikiel, %	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.	nw.

Tabela 5. Wskaźniki fizyczno-chemiczne odcieków z lizymetrów (9 tydz.)
Table 5. Physicochemical parameters of the effluents from lysimeters (9th week)

Wskaźnik, jednostka	Lizymetr			
	K0	BIO-1	K3	K29
pH	7,3	5,1	4,9	5,2
Przewodność wt., $\mu\text{S}/\text{cm}$	1071	1087	1475	1287
Chlorki, gCl^-/m^3	39	33	161	98
ChZT, gO_2/m^3	52,3	83,2	54,3	176,1
BZT ₅ , gO_2/m^3	1,9	5,0	5,0	15,0
Utlenialność, gO_2/m^3	16,0	18,6	16,6	27,0
Azot ogólny, gN/m^3	1,0	1,1	2,7	7,2
Fosfor ogólny, gP/m^3	0,31	0,33	0,09	0,64
OWO, gC/m^3	15,2	22,3	16,8	15,5

Tabela 6. Wskaźniki fizyczno-chemiczne odcieków z lizymetrów (17 tydz.)
Table 6. Physicochemical parameters of the effluents from lysimeters (17th week)

Wskaźnik, jednostka	Lizymetr			
	K0	K29	K3	BIO-1
pH	6,5	3,5	3,4	3,5
Przewodność wt., $\mu\text{S}/\text{cm}$	1037	1287	1112	987
Chlorki, gCl^-/m^3	44	96	132	43
ChZT, gO_2/m^3	56,8	126,8	140,9	231,3
BZT ₅ , gO_2/m^3	1,4	14,0	6,8	12,0
Utlenialność, gO_2/m^3	15,6	34,5	42,0	55,0
Azot ogólny, gN/m^3	0,9	9,6	6,8	9,4
Fosfor ogólny, gP/m^3	0,28	0,14	0,33	0,6
OWO, gC/m^3	14,9	35,8	54,2	72,0

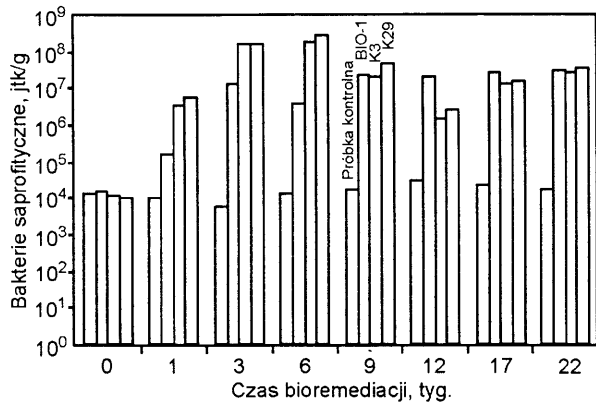
Tabela 7. Zawartość produktów naftowych w odciekach z lizymetrów (g/m^3)
Table 7. Concentration of petroleum products in the effluents from lysimeters (g/m^3)

Lizymetr	Czas poboru próbek, tygodnie			
	3	6	9	12-17
K0	0,01	0,01	0,01	nw.
K29	0,12	0,01	0,01	nw.
K3	0,07	0,01	0,01	nw.
BIO-1	0,18	0,18	0,01	nw.

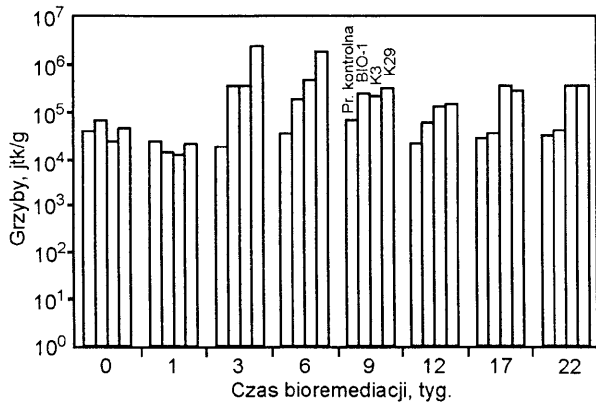
Wpływ bezpośredniego toksycznego działania węglowodorów naftowych na mikroorganizmy glebowe można była zaobserwować tylko bezpośrednio po zanieczyszczeniu gleby olejem napędowym (1 tydzień) (rys. 4–16). W przypadku większości badanych grup mikroorganizmów zanotowano zmniejszenie ich ogólnej liczebności. Dotyczyło to promieniowców (rys. 6), bakterii amylopolitycznych (rys. 8), desulfurikacyjnych (rys. 9), proteolitycznych (rys. 10), wiążących azot (rys. 11), nityfikacyjnych (rys. 14–15) i denityfikacyjnych (rys. 16). Nie stwierdzono natomiast wpływu tego typu zanieczyszczeń na rozwój bakterii moczniowych (rys. 12) i amonifikacyjnych (rys. 13). Liczba grzybów uległa jedynie nieznacznemu zmniejszeniu (rys. 5), natomiast wzrosła ogólna liczba bakterii saprofitycznych (rys. 4) oraz bakterii zdolnych do rozkładu oleju napędowego (rys. 7).

Zastosowane zabiegi bioremediacyjne zniwelowały skutek toksyczny wywołany wprowadzeniem oleju napędowego do gleby (3 tydz.). Polegały one na uzupełnieniu zawartości azotu i fosforu oraz inokulacji gleby bakteriami zdolnymi do rozkładu produktów naftowych. Zaobserwowano szybki wzrost liczebności bakterii saprofitycznych w 1 g gleby do 10^8 komórek (rys. 4), a grzybów do 10^5 – 10^6 komórek (rys. 5). W glebie podanej procesowi oczyszczania biologicznego w kolumnach lizymetrycznych obserwowano także stopniowy przyrost liczebności innych grup bakterii do wartości analogicznej bądź większej niż w kolumnie kontrolnej. Stwierdzono także stymulację wzrostu bakterii amylopolitycznych, desulfurikacyjnych, proteolitycznych, moczniowych, amonifikacyjnych i denityfikacyjnych. W toku prowadzonych badań zaobserwowano nadmierny rozwój grzybów w glebie, spowodowany prawdopodobnie jej zakwaszeniem. Mimo utrzymywania odpowiednich parametrów technologicznych procesu, nadal obserwowano toksyczne oddziaływanie oleju napędowego na rozwój promieniowców, bakterii nityfikacyjnych i bakterii wiążących wolny azot.

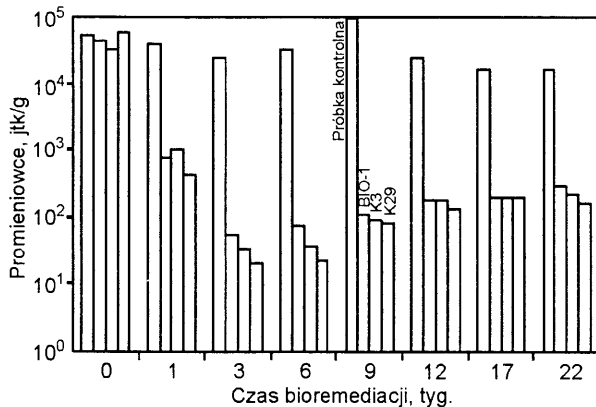
Krzywe obrazujące zmianę liczebności mikroorganizmów w toku prowadzenia bioremediacji miały różny przebieg. Był on uzależniony od typu inokulantu użytego do stymulacji biodegradacji oraz analizowanej grupy mikroorganizmów. Największą liczebność mikroorganizmy osiągnęły w lizymetrach inokulowanych bakteriami należącymi do rodzajów *Acinetobacter* (K29) i *Pseudomonas* (K3). Zaobserwowano także dwa wyraźne maksima liczebności drobnoustrojów między 3 i 6 tygodniem oraz w końcowej fazie procesu (17–22 tydz.) po ponownej



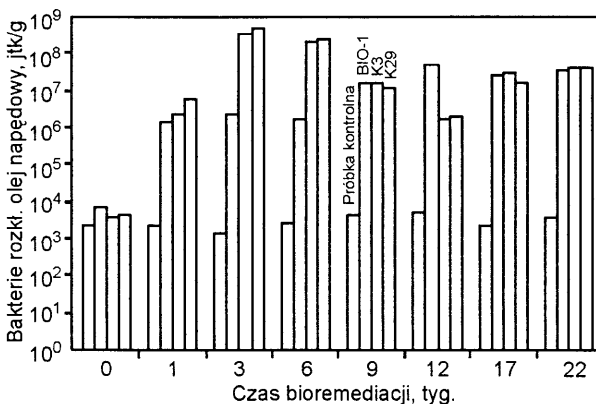
Rys. 4. Liczebność bakterii saprofitycznych
Fig. 4. Number of saprophytic bacteria



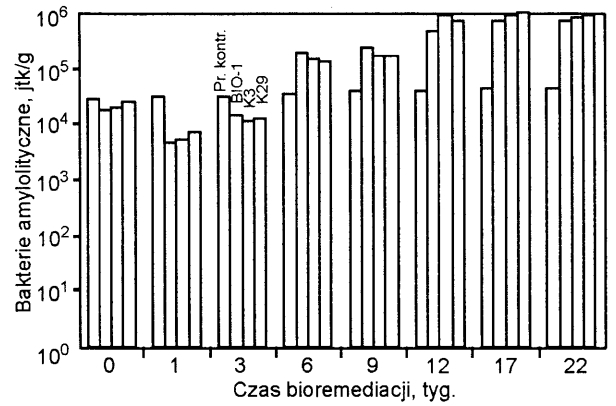
Rys. 5. Liczebność grzybów
Fig. 5. Number of fungi



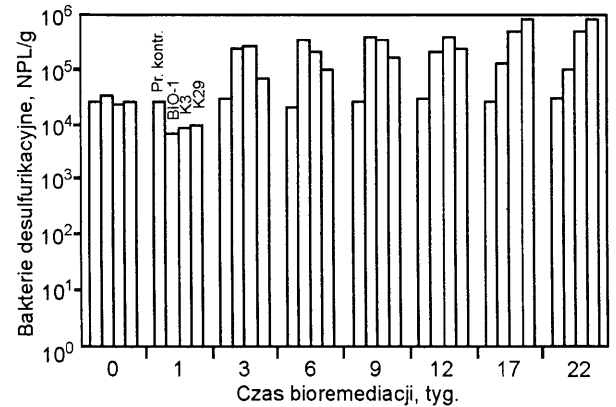
Rys. 6. Liczebność promieniowców
Fig. 6. Number of actinomycetes



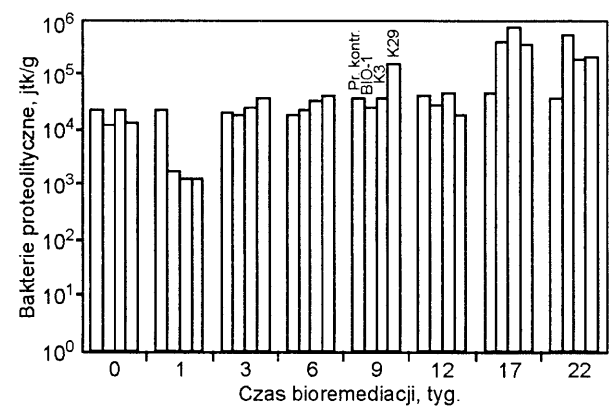
Rys. 7. Liczebność bakterii degradujących olej napędowy
Fig. 7. Number of diesel oil degrading bacteria



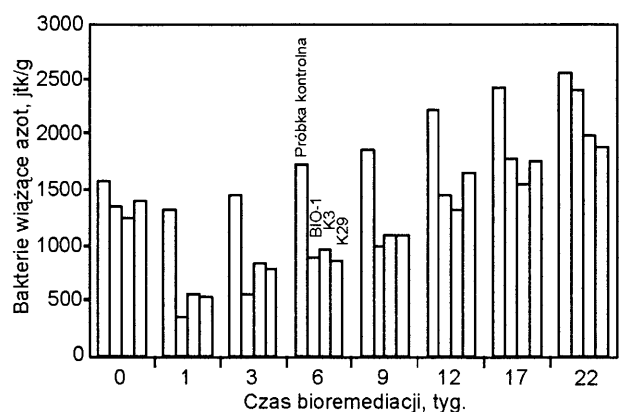
Rys. 8. Liczebność bakterii amylolitycznych
Fig. 8. Number of amylolytic bacteria



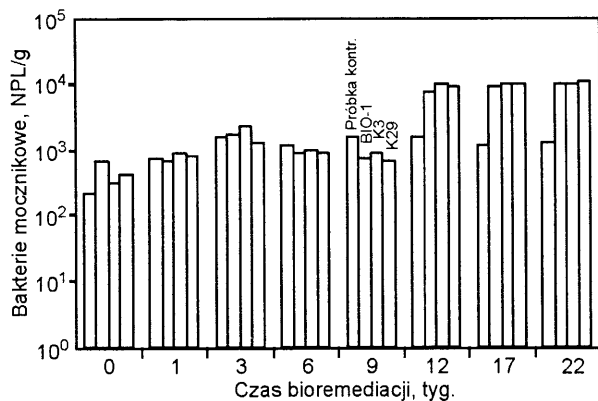
Rys. 9. Liczebność bakterii desulfurikacyjnych
Fig. 9. Number of desulphurizing bacteria



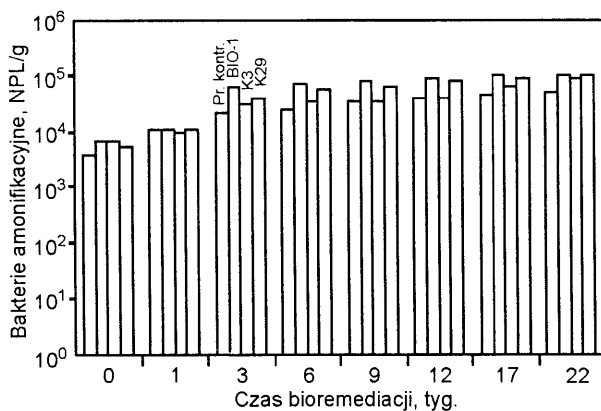
Rys. 10. Liczebność bakterii proteolitycznych
Fig. 10. Number of proteolytic bacteria



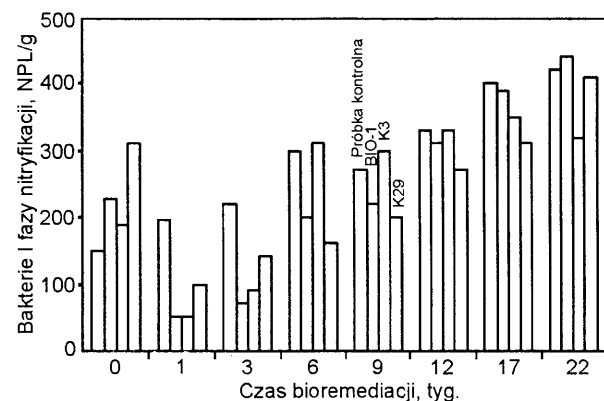
Rys. 11. Liczebność bakterii wiążących azot atmosferyczny
Fig. 11. Number of free nitrogen fixing bacteria



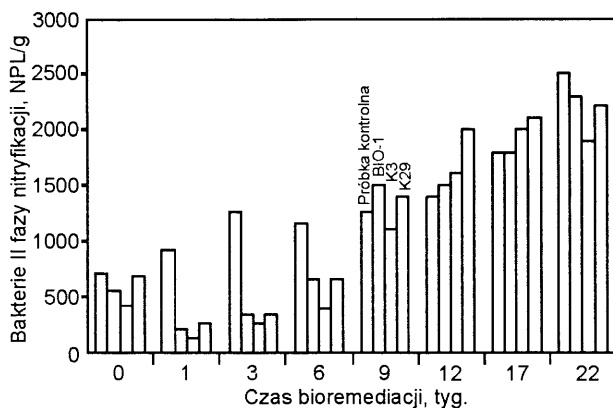
Rys. 12. Liczebność bakterii mocznikowych
Fig. 12. Number of ureal bacteria



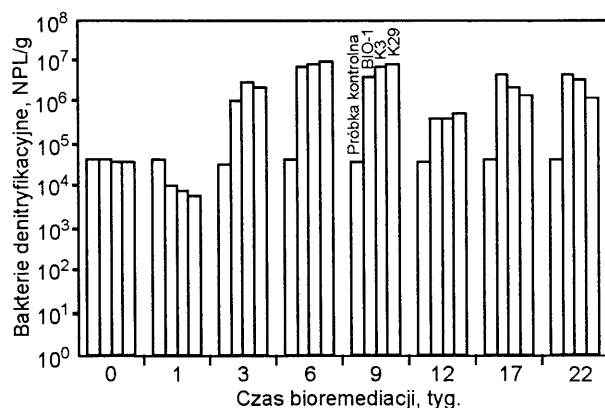
Rys. 13. Liczebność bakterii amonifikacyjnych
Fig. 13. Number of amonifying bacteria



Rys. 14. Liczebność bakterii nityfikacyjnych I fazy
Fig. 14. Number of nitrifying bacteria (phase I)



Rys. 15. Liczebność bakterii nityfikacyjnych II fazy
Fig. 15. Number of nitrifying bacteria (phase II)



Rys. 16. Liczebność bakterii denityfikacyjnych
Fig. 16. Number of denitrifying bacteria

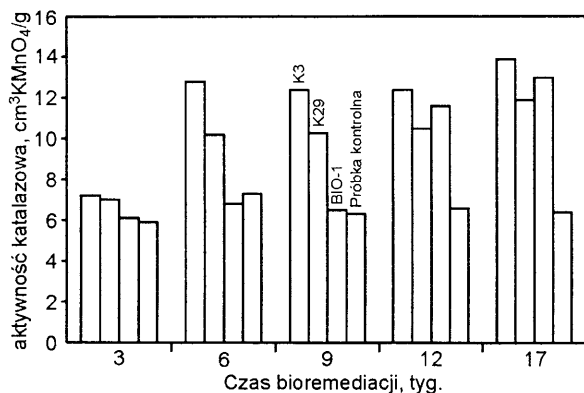
inokulacji gleby szczepem z rodzaju *Rhodococcus* (K45). Nieco inaczej kształtowała się liczebność drobnoustrojów w kolumnach zaszczepionych inokulantem sporządzonym na bazie naturalnej mikroflory (BIO-1). Obserwowano tu stopniowy wzrost liczebności mikroorganizmów z maksimum w ostatnim etapie bioremediacji pomiędzy 9 i 22 tygodniem. Największą liczebność w glebie we wszystkich lizymetrach osiągnęły bakterie rozkładające olej napędowy oraz bakterie saprofityczne. Było ich co najmniej o 4÷5 rzędów wielkości więcej niż w glebie kontrolnej nieskażonej olejem. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory była skorelowana z zachodzącym w tym czasie ubytkiem oleju napędowego w glebie. I tak, w lizymetrach ze szczepem z rodzaju *Pseudomonas* (K3) największy ubytek oleju zaobserwowano w pierwszych 3 tygodniach badań. W tym czasie osiągnięto największą liczebność tego rodzaju bakterii. Podobną sytuację zaobserwowano w kolumnach z mikroflorą naturalną (BIO-1) w ostatnich tygodniach badań.

Na szczególną uwagę zasługuje analiza liczebności bakterii biorących udział w przemianach związków azotu w glebie. Zanotowano zmniejszenie liczebności bakterii nityfikacyjnych, które dopiero w ostatniej fazie procesu osiągnęły liczebność zbliżoną do próbki kontrolnej. Mimo zabiegów bioremediacyjnych nie nastąpiła odbudowa liczebności organizmów wiążących azot atmosferyczny. Udało się to w przypadku bakterii mocznikowych i amonifikacyjnych. Jedynie bakterie denityfikacyjne i w mniejszym zakresie bakterie mocznikowe osiągnęły liczebność populacji większą niż w próbce kontrolnej. Przyczyną intensywnego rozwoju bakterii denityfikacyjnych było prawdopodobnie zjawisko wyczerpywania zasobów tlenu w powietrzu glebowym.

Aktywność enzymatyczna mikroorganizmów glebowych

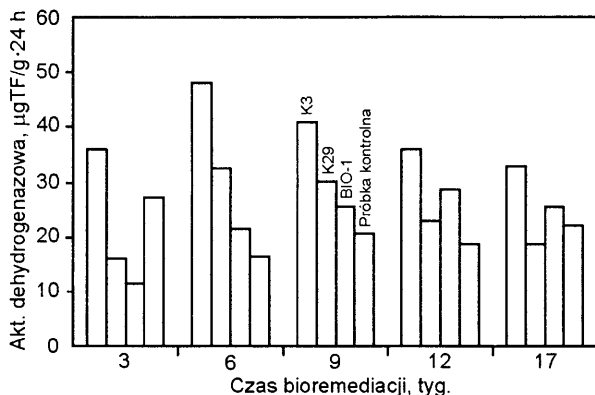
Dane o aktywności enzymów są często ważniejsze niż określenie ogólnej liczby mikroorganizmów zasiedlających oczyszczaną glebę, co potwierdzają wyniki badań nad aktywnością katalazową, dehydrogenazową, fosfatazową, amylazową czy celulozową gleby [4,6]. Aktywność enzymatyczna uważana jest za najbardziej istotny wskaźnik biologicznej aktywności mikroflory glebowej, którego poznanie może dać obiektywny obraz procesów zachodzących w glebie. Dlatego też w badaniach nad enzymami należy szukać mechanizmów warunkujących produktywność ekosystemu [18].

Badania związane z biologicznym oczyszczaniem gleby wpłynęły istotnie na przebieg procesów mikrobiologicznych w glebie. Obok zmian w składzie ilościowym i jakościowym mikroorganizmów zanotowano także zwiększenie ich aktywności enzymatycznej. Wykazano wyraźną stymulację aktywności katalazowej (rys. 17) mikroorganizmów w glebie zaszczerpionej bakteriami z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (K3 i K29). Większą aktywnością charakteryzowały się mikroorganizmy glebowe w lizymetrach z inokulantem K3, natomiast nieco mniejszą aktywność katalazową odnotowano w przypadku stosowania inokulantu K29, gdzie wyraźny jej wzrost zaobserwowano dopiero w ostatniej fazie badań. Kształtowanie się aktywności katalazowej mikroorganizmów glebowych w lizymetrach z mikroflorą autochtoniczną (BIO-1) było dobrym odzwierciedleniem intensywności procesu bioremediacji gleby. Zaobserwowano proces adaptacji mikroflory do nowego substratu pokarmowego, w którym aktywność katalazowa mikroorganizmów glebowych kształtowała się podobnie jak w próbkach kontrolnej. Dopiero w ostatniej fazie bioremediacji gleby aktywność tych enzymów zwiększyła się do wartości analogicznych jak w lizymetrach inokulowanych bakteriami. Wydaje się, że słuszna jest sugestia, że aktywność katalazowa należy do najbardziej charakterystycznych wskaźników aktywności biologicznej mikroorganizmów glebowych [6].



Rys. 17. Aktywność katalazowa mikroorganizmów glebowych
Fig. 17. Catalase activity of soil

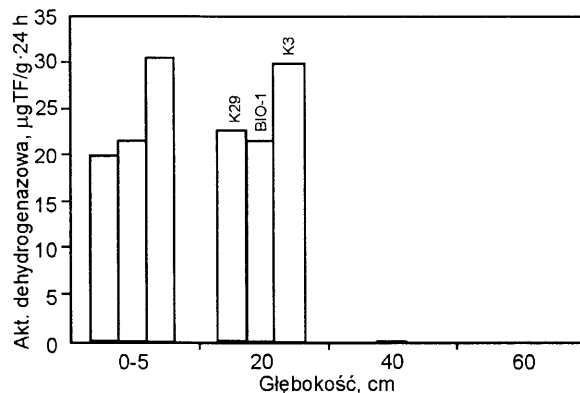
Kształtowanie się aktywności dehydrogenazowej mikroorganizmów w przypadku gleby zanieczyszczonej olejem napędowym było zróżnicowane i zależało przede wszystkim od sposobu, w jaki prowadzono jej remediację (rys. 18). Szczególnie dużą aktywność dehydrogenazową stwierdzono w przypadku gleby z lizymetrów, które inokulowano szczepem *Pseudomonas putida* (K3). Podobnie jak w przypadku



Rys. 18. Aktywność dehydrogenazowa mikroorganizmów glebowych
Fig. 18. Dehydrogenase activity of soil

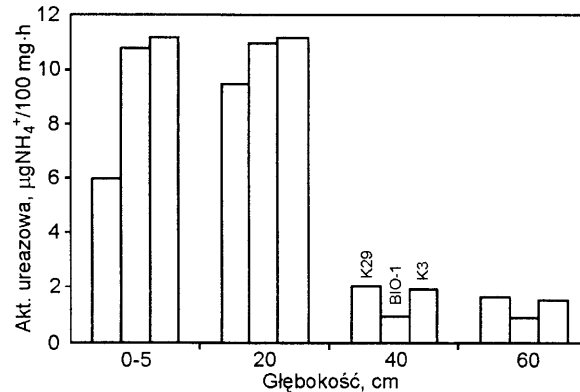
aktywności katalazowej, maksymalne wartości aktywności dehydrogenazowej mikroorganizmów glebowych w poszczególnych lizymetrach uzyskano w czasie, gdy proces degradacji zachodził tam najintensywniej. Kształtowanie się aktywności dehydrogenazowej oznaczono także w przekroju pionowym gleby (rys. 19). Wykazano, że procesy mikrobiologiczne zachodziły w glebie przede wszystkim w jej warstwie powierzchniowej do głębokości 20 cm.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zanieczyszczenie gleby olejem napędowym nie miało zasadniczego wpływu na aktywność ureazową jej mikroorganizmów. Dodatkowe wzbogacenie gleby w związki azotu i fosforu spowodowało stymulację aktywności ureazowej, natomiast wyraźnie widoczne było zmniejszenie tej aktywności na różnych głębokościach gleby (rys. 20–21).



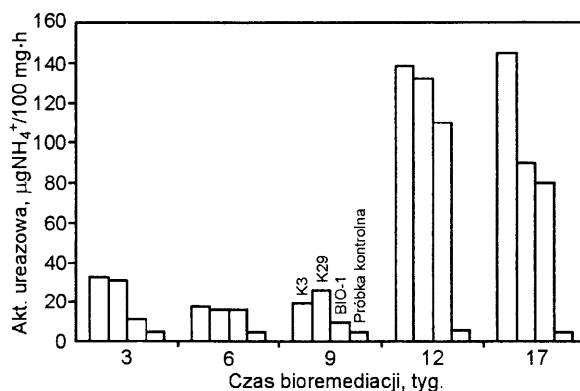
Rys. 19. Aktywność dehydrogenazowa na różnych poziomach w glebie (9 tydzień)

Fig. 19. Dehydrogenase activity at different soil levels (9th week)



Rys. 20. Aktywność ureazowa na różnych poziomach w glebie (9 tydzień)

Fig. 20. Urease activity at different soil levels (9th week)



Rys. 21. Aktywność ureazowa mikroorganizmów glebowych
Fig. 21. Urease activity of soil during bioremediation

Dyskusja i podsumowanie

Ocena przydatności biopreparatów służących do wspomagania procesu bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi okazała się trudna. Należy stwierdzić, że przy zachowaniu tych samych warunków początkowych, w przypadku obu grup inokulantów skuteczność bioaugmentacji była zbliżona. Warunki początkowe to właściwe przygotowanie i dobór inokulantów zawierających mikroorganizmy obce. Mikroorganizmy obce użyte w badaniach były tak samo aktywne jak autochtoniczne oraz nie wykazywały w stosunku do nich antagonizmu. Biorąc pod uwagę krótszy czas bioremediacji gleby należy stwierdzić, że bardziej efektywne okazały się szczepy obce. Po 9 tygodniach procesu bioremediacji zawartość produktów naftowych w glebie z mikroflorą autochtoniczną zmniejszyła się z początkowych 10% do 2,8%, podczas gdy w kolumnie inokulowanej szczepem *Pseudomonas putida* wynosiła 1,2%, a szczepem *Acinetobacter lwoffii* – 1,8%. Uzyskana w tym czasie skuteczność oczyszczania gleby nie była jednak zadowalająca.

Przedłużenie czasu oczyszczania gleby spowodowało wyrównanie skuteczności bioremediacji we wszystkich kolumnach lizymetrycznych, niezależnie od sposobu inokulacji. Wykazano, że proces biodegradacji przebiegał co najmniej w dwóch fazach. Pierwsza z nich to bardzo szybki i skuteczny rozkład łatwo biodegradowalnych składników oleju napędowego, natomiast faza druga to wolniejszy rozkład związków trudno biodegradowalnych. Bioremediacja prowadzona w oparciu o inokulanty sporządzone na bazie mikroflory naturalnej gleby charakteryzowała się jednak wolniejszym przebiegiem pierwszej fazy (do 17 tygodnia procesu). Z tego względu zaproponowano nowe podejście do analizowanego problemu, polegające na ponownej inokulacji gleby poprzedzającej drugą fazę bioremediacji. Do tego celu dobrano bakterie o innych cechach niż wykorzystane w pierwszej fazie. Charakteryzowały się one zdolnością do rozkładu związków aromatycznych i izoprenoidów. Dzięki ponownej inokulacji gleby zwiększono szybkość i skuteczność drugiej fazy bioremediacji. Ubytek węglowodorów po 22 tygodniach bioremediacji był zbliżony we wszystkich lizymetrach i wynosił ponad 99%.

Analiza wskaźników mikrobiologicznych gruntu niezwykle ułatwiła ocenę przydatności badanych biopreparatów. Ważne wnioski wynikały z obserwacji w toku procesu bioremediacji rozwoju w glebie mikroorganizmów reprezentujących wybrane grupy fizjologiczne. Produkty naftowe spowodowały wyraźne zmiany w składzie ilościowym i jakościowym mikroorganizmów glebowych. Wykazano stymulację wzrostu większości z nich. Zwiększyła się także aktywność enzymatyczna mikroorganizmów glebowych związana z rozkładem dużej ilości substancji organicznych. Wyjątek stanowiły promieniowce oraz bakterie wiążące wolny azot i nitryfikatory, których liczebność uległa znacznemu zmniejszeniu w porównaniu do próbki kontrolnej. Pomimo eliminacji produktów naftowych z gleby do ilości śladowych, nie było możliwe przywrócenie naturalnego składu ilościowego i jakościowego tych mikroorganizmów w oczyszczonej glebie. Oznacza to, że przywrócenie równowagi biologicznej na terenach zanieczyszczonych produktami naftowymi nie odbywa się równocześnie z eliminacją tych zanieczyszczeń. Po zakończeniu bioremediacji konieczne jest zastosowanie środków mających na celu pobudzenie do wzrostu mikroorganizmów, które zostały wyeliminowane z gleby na skutek toksycznego oddziaływania produktów naftowych.

Na podstawie analizy kształtowania się liczebności bakterii w glebie z poszczególnych lizymetrów można sądzić, że stosunkowo najmniejsze zmiany w strukturze ilościowej i jakościowej mikroorganizmów spowodowało wprowadzenie inokulantu sporządzonego na bazie mikroflory autochtonicznej zanieczyszczonej gleby. Dlatego też tego typu inokulanty należy uznać za bardziej przydatne do bioaugmentacji.

Potwierdzono słuszność tezy, że nie tylko szybkość biodegradacji zanieczyszczeń, ale także właściwe zarządzanie procesem oczyszczania gleby ma istotny wpływ na możliwość przywrócenia równowagi biologicznej w skażonych ekosystemach [16,18].

Wnioski

◆ Proces biodegradacji oleju napędowego przebiega dwufazowo. W pierwszej fazie degradowane są związki podatne na rozkład mikrobiologiczny (głównie węglowodory parafinowe), natomiast druga faza przebiegała wolno, ze względu na małą podatność związków aromatycznych i alicyklicznych na biodegradację. W procesie bioremediacji gleby przyspieszenie drugiej fazy biodegradacji i osiągnięcie skutecznej eliminacji zanieczyszczeń umożliwia powtórna inokulacja gleby bakteriami zdolnymi do wykorzystania trudno biodegradowalnych składników oleju napędowego.

◆ Dobór inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi powinien uwzględniać następujące elementy:

- interakcje zachodzące między mikroflorą naturalnie zasiedlającą zanieczyszczonej glebę a szczepami wprowadzanymi w charakterze inokulantów,
- przynależność taksonomiczną i właściwości szczepów patogennych,
- skuteczność rozkładu produktów naftowych,
- właściwości toksyczne, mutagenne i rakotwórcze produktów mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów naftowych.

◆ Badania polowe wykazały, że najlepszą skuteczność oczyszczania gleby z produktów naftowych daje proces bioremediacji prowadzony przy wykorzystaniu inokulantów otrzymanych na bazie mikroflory naturalnej gleby, zapewniając skuteczne usunięcie zanieczyszczeń oraz szybsze przywrócenie równowagi ekologicznej na skażonym terenie.

LITERATURA

1. B.M. AMES, J. MCCANN, E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1975, 31, pp. 347–364.
2. S. BAC, Z. PASIERSKI: The significance of plant covers in the process of evaporation. *Zesz. Probl. Nauk. Roln.* 1989, Z. 369.
3. Bergeys Manual Determinative Bacteriology [Eds. R.E. BUCHANAN, N.E. GIBBONS]. The Willcans and Wilkins Comp., Baltimore 1974.
4. L.E. CASIDA, J.O. KLEIN, T. SATORO: Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 1964, 98, pp. 371–373.
5. K. DUNCAN, E. JENNINGS, P. BUCK, W. WELLS *et al.*: Multispecies ecotoxicity assessment of petroleum contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination* 2003, 12, pp. 181–207.
6. W.T. FRANKENBERGER, W.A. DICK: Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indicates in soil. *Soil Science of America Journal* 1983, 47, 5, 945–951.

7. W. HERMANOWICZ: Fizyczno-chemiczne badania wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1976.
8. T. WATANABE, T. HIRAYAMA: Genotoxicity of soil. *Journal of Health Science* 2001, 47(5), pp. 433–438.
9. G. LI, W. HUANG, D.N. LERNER, X. ZHANG: Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research* 2000, Vol. 34, No. 15, pp. 3845–3853.
10. R. XU, J.P. OBBARD: Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *J. Environ. Quality* 2003, Vol. 32, pp. 1234–1243.
11. B. KOŁWZAN: Bacterial preparation for degradation of petroleum products in soil. *Fresenius Environ. Bulletin* 2004, Vol. 13, No. 3a, pp. 216–219.
12. G. MALINA, I. ZAWIERUCHA: Potential of biostimulation for enhancing intrinsic biodegradation in oil hydrocarbon-contaminated soil. *Bioremediation Journal* 2007, 11(3), pp. 141–147.
13. K. GRABAS, B. KOŁWZAN, M. STEININGER: Usuwanie zanieczyszczeń węglowodorowych z osadów dennych stawu osadowego „Kowary” przez bioremediację in situ. *Przemysł Chemiczny* 2005, nr 10, ss. 740–744.
14. B. KOŁWZAN: Biodegradacja produktów naftowych. W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie [red. J. SURYGAŁA], Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
15. B. KOŁWZAN: Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Seria Monografie nr 44, Wrocław 2005.
16. K. DUNCAN, E. JENNINGS, P. BUCK, W. WELLS *et al.*: Multispecies ecotoxicity assessment of petroleum contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination* 2003, Vol. 12, pp. 181–207.
17. E. KLIMIUK, M. ŁEBKOWSKA: Biotechnologia w ochronie środowiska. PWN, Warszawa 2003.
18. P.B. DORN, J.P. SALANITRO: Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere* 2000, Vol. 40, pp. 419–426.
19. A. MUSZYŃSKI, E. KARWOWSKA, M. KALISZEWSKI: Bioremediacja gleby z produktów ropopochodnych przy zastosowaniu mikroorganizmów immobilizowanych na nośnikach stałych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 1996, nr 8, ss. 299–301.
20. A. RODINA: Mikrobiologiczne metody badania wód. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1968.
21. S. RUSSEL: Metody oznaczania enzymów glebowych. Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Warszawa 1972.
22. E. ŚLIWKA: Oznaczanie zanieczyszczeń naftowych w glebie. W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie [red. J. SURYGAŁA], Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
23. E. ŚLIWKA, B. KOŁWZAN, J. SURYGAŁA: Ocena przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego w glebie. *Biuletyn ITN* 2000, 12, 2, ss. 104–109.
24. Z. ZAWADZKI, B. KOŁWZAN, A. KUDŁA: Studies on the oxidation of octane by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Flavobacterium devorans* strains. *Acta Microb. Pol.* 1979, 28, 4, pp. 315–319.
25. I. SIEBIELSKA: Analiza porównawcza metod ekstrakcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z osadów ściekowych. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 1, ss. 51–54.
26. D. MINAI-TEHRANI, A. HERFATMANESH: Biodegradation of aliphatic and aromatic fractions of heavy crude oil-contaminated soil: A pilot study. *Bioremediation Journal* 2007, Vol. 11, No. 2, pp. 71–76.
27. H. LI, R. XU, J.P. OBBARD: Biodegradation of pyrene in marine beach sediments. *Bioremediation Journal* 2007, Vol. 10, No. 4, pp. 169–177.
28. A. GOI, N. KULIK, M. TRAPIDO: Combined chemical and biological treatment of oil contaminated soil. *Chemosphere* 2006, Vol. 63, pp. 1754–1763.

Kołwzan, B. Assessment and Choice of Inoculants for the Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Products. *Ochrona Środowiska* 2008, Vol. 30, No. 4, pp. 3–14.

Abstract: The paper addresses the problem of selecting inoculants in order to aid the bioremediation of soil that has been contaminated with petroleum products being components of diesel oil spills. Bacterial preparations based on indigenous microflora (BIO-1) and preparations obtained from our own culture, containing active foreign strains of *Pseudomonas putida* (K3), *Acinetobacter lwoffii* (K29) and *Rhodococcus erythropolis* (K45), were tested for activity. The tests were conducted in lysimeters by the *in situ* method. The initial content of diesel oil in the soil amounted to 10%. The results have demonstrated that the use of active strains of the species *Acinetobacter lwoffii* and *Pseudomonas putida* accelerated only the degradation of easily biodegradable diesel oil components at the first stage of the bioremediation process. It took a long time to adapt those biopreparations to the biodegradation of the other compounds, and in this way it was possible to equalize the overall time of biodegradation for the petroleum products, irrespective of the type of the inoculant used. The second stage of bioremediation proceeded at a slow rate, which is attributable to the poor biodegradability of aromatic and alicyclic compounds. It has been found that the bioremediation process can be accelerated, and that the efficiency of pollutant removal can be enhanced by re-inoculating the soil with *Rhodococcus erythropolis*, which has the capacity for utilizing petroleum products that are difficult

to biodegrade. When the soil was inoculated with *Acinetobacter lwoffii*, the content of petroleum products was reduced to 114.1 mg/kg (about 0.01%); upon inoculation of the soil with indigenous microflora, the content of petroleum products decreased to 409 mg/kg (about 0.04%). The best results were obtained, however, when the soil inoculated with *Pseudomonas putida* was made subject to re-inoculation; the final content of petroleum products then totalled 31.4 mg/kg (approx. 0.003%). Observations made in the course of the remediation procedure have revealed that the growth of the majority of the soil microorganisms (which represent the physiological groups chosen) was stimulated. Enhancement was also observed in the enzymatic activity of the soil microorganisms with respect to the biodegradation of a large quantity of organic substances. Exceptions were actinomycetes, free nitrogen fixing bacteria and nitrifying bacteria, whose numbers were reduced substantially as compared to the control. Analysis of the variations observed in the bacterial counts in particular lysimeters suggests that the introduction of the inoculant prepared on the basis of the indigenous microflora of the contaminated soil brought about the least substantial changes in the quantitative and qualitative structure of the bacterial population. For that reason inoculants of this type should be regarded as suitable for bioaugmentation, since their application can restore the ecological equilibrium in the contaminated soil.

Keywords: Petroleum products, soil, bioremediation, inoculant, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter lwoffii*, *Rhodococcus erythropolis*.