

## Zastosowanie *Lotus corniculatus* w badaniach biodegradacji TPH i WWA wspomaganej fitoremediacją

### The use of *Lotus corniculatus* in the study of biodegradation of TPH and PAHs assisted by phytoremediation

Katarzyna Wojtowicz, Teresa Steliga

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

**STRESZCZENIE:** W artykule przedstawiono zagadnienia związane z etapową bioremediacją gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi. Badania procesu bioremediacji gleby G6 wykonywano w dwóch etapach. W etapie I przeprowadzono biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych na drodze inokulacji biopreparatem B1, opracowanym na bazie niepatogennych mikroorganizmów autochtonicznych. Badania prowadzono metodą pryzmowania *ex situ* przez okres 3 miesięcy w ściśle kontrolowanych warunkach temperaturowych. W II etapie badań wstępnie oczyszczoną glebę poddano procesowi biodegradacji (inokulacja biopreparatem B2) wspomaganej fitoremediacją w warunkach *ex situ* (metoda wazonowa) przez okres 6 miesięcy. W badaniach fitoremediacji wykorzystano komonice zwyczajną (*Lotus corniculatus*), należącą do grupy naftofitów. Eksperymenty prowadzono w trzech układach: układ 1 – gleba G6-3 + komonica zwyczajna, układ 2 – gleba G6-3 + biopreparat B2 + komonica zwyczajna, układ 3 – gleba G6-3 + biopreparat B2 z dodatkiem  $\gamma$ -PGA (kwas  $\gamma$ -poliglutaminowy) + komonica zwyczajna. Oceny efektywności I i II etapu bioremediacji dokonano na podstawie przeprowadzonych analiz chromatograficznych i testów toksykologicznych. Zrealizowane badania wykazały, że efektywność I etapu bioremediacji gleby G6 wynosiła 41,67% dla TPH (całkowita zawartość węglowodorów) i 34,73% dla WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne). Największą efektywność II etapu bioremediacji odnotowano w układzie 3, natomiast najniższą – w układzie 1. W wyniku II etapu bioremediacji wspomaganego fitoremediacją za pomocą komonicy zwyczajnej po 6 miesiącach badań osiągnięto spadek stężenia TPH w badanych układach o: 13,32% (układ 1), 39,65% (układ 2) oraz 51,79% (układ 3), natomiast efektywność II etapu biodegradacji WWA wynosiła 8,00% w glebie G6-3(1), 37,10% w glebie G6-3(2) oraz 51,34% w glebie G6-3(3). Wykonane testy toksykologiczne z zastosowaniem Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®SPT wykazały spadek właściwości toksycznych gleby po przeprowadzeniu procesu oczyszczania. Uzyskane wyniki analiz chromatograficznych i toksykologicznych wykazały, że wykorzystanie fitoremediacji w II etapie remediacji pozwala na zwiększenie efektywności procesu biodegradacji TPH i WWA.

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, fitoremediacja, węglowodory ropopochodne, *Lotus corniculatus*,  $\gamma$ -PGA.

**ABSTRACT:** The article presents issues related to the staged bioremediation of soil contaminated with petroleum substances. The study of the G6 soil bioremediation process was conducted in two stages. In stage I, the biodegradation of petroleum-derived pollutants was carried out by inoculation with biopreparation B1, developed on the basis of non-pathogenic autochthonous microorganisms. The tests were performed using the ex-situ piling method, for a period of 3 months, under strictly controlled temperature conditions. In the second stage of the research, the pre-cleaned soil was subjected to biodegradation (inoculation with biopreparation B2), assisted by phytoremediation, in ex-situ conditions (pot method), for a period of 6 months. In phytoremediation studies, bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) belonging to the group of naphthophytes was used. The experiments were carried out in three systems: system 1 – soil G6-3 + trefoil, system 2 – soil G6-3 + biopreparation B2 + trefoil, system 3 – soil G6-3 + biopreparation B2 with the addition of  $\gamma$ -PGA ( $\gamma$ -polyglutamic acid) + trefoil. The effectiveness of the first and second stages of bioremediation was assessed on the basis of chromatographic analyses and toxicological tests. The conducted research showed that the efficiency of the first stage of G6 soil bioremediation was 41.67% for TPH (total petroleum hydrocarbons) and 34.73% for PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons). The highest efficiency of the 2<sup>nd</sup> stage of bioremediation was noted in system 3, and the lowest in system 1. As a result of the 2<sup>nd</sup> stage of bioremediation, supported by phytoremediation with bird's-foot trefoil, after 6 months of research, the concentration of TPH in the tested systems decreased by: 13.32% (system 1), 39.65% (arrangement 2) and 51.79% (arrangement 3), while the efficiency of the second stage of PAH biodegradation was 8.00% in soil G6-3(1), 37.10% in soil G6-3(2) and 51.34% in G6-3(3) soil. The conducted toxicological tests applying Phytotoxkit™,

Autor do korespondencji: K. Wojtowicz, e-mail: [katarzyna.wojtowicz@inig.pl](mailto:katarzyna.wojtowicz@inig.pl)

Artykuł nadesłano do Redakcji: 10.01.2023 r. Zatwierdzono do druku: 04.07.2023 r.

Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup> and Microtox<sup>®</sup>SPT showed a decrease in the toxic properties of soil after the cleaning process. The obtained results of chromatographic and toxicological analyses showed that the use of phytoremediation in the second stage of remediation allows us to increase the efficiency of the biodegradation of TPH and PAHs.

Key words: biodegradation, phytoremediation, petroleum hydrocarbons, *Lotus corniculatus*,  $\gamma$ -PGA.

## Wprowadzenie

Rosnące uprzemysłowienie, ciągły wzrost liczby ludności oraz duży popyt na produkty petrochemiczne i zależność od nich doprowadziły na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci do poważnych problemów związanych z zanieczyszczeniem środowiska przyrodniczego. Substancje ropopochodne stanowią jedno z głównych źródeł skażenia gleby powstających podczas prac prowadzonych w górnictwie naftowym (Kluk i Steliga, 2017). Wprowadzenie do ekosystemów zanieczyszczeń z grupy TPH i WWA wywołuje zaburzenia przebiegu naturalnych cykli obiegu materii i energii, degradację gleby, idące w kierunku zmniejszenia pojemności wodnej, oraz utrudnienie wymiany powietrza pomiędzy glebą a atmosferą (Steliga i Kluk, 2020). Ponadto ekotoksyczność i potencjalne konsekwencje zdrowotne, jakie węglowodory ropopochodne stwarzają zarówno dla środowiska (rośliny, zwierzęta), jak i zdrowia ludzi, doprowadziły do wzrostu zainteresowania rozwojem metod rekultywacji gruntów.

Rekultywacja gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, jak np. starych dołów urobkowych, należy do kluczowych problemów ekologicznych, przed którymi stoi obecnie przemysł górniczy. Jedną z częściej wykorzystywanych metod bioremediacji terenów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi jest biodegradacja. W procesie biodegradacji wykorzystywane są mikroorganizmy zdolne do efektywnego rozkładu zanieczyszczeń i przekształcenia ich w produkty nietoksyczne i bezpieczne dla środowiska (Mrozik i Piotrowska-Seget, 2010; Oliver, 2010; Varjani, 2017). Obecnie coraz częściej prowadzone są badania nad przyspieszeniem procesu biodegradacji poprzez wprowadzenie różnego rodzaju modyfikacji oraz technik wspomagających (Wojtowicz et al., 2022b).

Jedną z najszerzej stosowanych technik wspomagających biodegradację węglodorów w środowisku glebowym jest fitoremediacja. Polega ona na zastosowaniu roślin i związanych z nimi mikroorganizmów ryzosferowych do pobierania i gromadzenia substancji toksycznych lub do ich biodegradacji (Barathi i Vasudevan, 2001; Pawlik et al., 2017). Zanieczyszczenia organiczne są pobierane przez rośliny wraz z wodą na zasadzie dyfuzji prostej, która może być utrudniona ze względu na hydrofobowe właściwości większości składników ropy naftowej. Należy jednak zaznaczyć, że rośliny mogą wydzielać związki powierzchniowo czynne (małocząsteczkowe kwasy organiczne,

polipeptydy), które obniżają napięcie powierzchniowe i emulgują substancje hydrofobowe, co wpływa na zwiększenie ich biodostępności i umożliwienie fitoremediacji. Do fitoremediacji wykorzystuje się zazwyczaj rośliny z grupy naftofitów, wykazujące zdolność do wzrostu na terenach zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi oraz absorpcji, akumulowania i/lub degradacji zanieczyszczeń ropopochodnych (Kamath et al., 2004; Khan et al., 2013; Pawlik i Piotrowska-Seget, 2015). Szacuje się, że w przypadku naftofitów zanieczyszczenia naftowe mogą stanowić od 7% do 15% masy rośliny. Do najczęściej spotykanych w literaturze naftofitów należą komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*) (Yousaf et al., 2010; Pawlik et al., 2017), kostrzewa trzcinowa (*Festuca arundinacea*) (Steliga i Kluk, 2020), kukurydza zwyczajna (*Zea mays*) (Liao et al., 2015; Baoune et al., 2019; Anukwa et al., 2020), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea*) (Liu et al., 2012; Heidari et al., 2018; Hou et al., 2019), życica (*Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*) (Tang et al., 2010; Yousaf et al., 2010), lucerna siewna (*Medicago sativa*) (Li et al., 2020), nostryk żółty (*Melilotus officinalis*) (Steliga i Kluk, 2021), dziwaczek peruwiański (*Mirabilis jalapa*) (Peng et al., 2009), sorgo dwubarwne (*Sorghum bicolor*) (Banks et al., 2003) oraz trawy i rośliny strączkowe.

Analizując warunki prowadzenia badań bioremediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi obejmujące poziom skażenia gleby, czas prowadzenia procesu oraz okres prowadzenia badań fitoremediacji (wiosna, lato), spośród wymienionych roślin do badań prowadzonych w skali półtechnicznej wytypowano komonice zwyczajną (*Lotus corniculatus*).

## Materiał badawczy

W badaniach biodegradacji wspomaganych fitoremediacją wykorzystano glebę zanieczyszczoną substancjami ropopochodnymi, dwa biopreparaty, dodatek polimerowy  $\gamma$ -PGA (kwas  $\gamma$ -poliglutaminowy) oraz komonice zwyczajną (*Lotus corniculatus*).

## Gleba

Do badań użyto gleby, którą pobrano z terenu dołu urobkowego G-6, zlokalizowanego w południowo-wschodniej Polsce. Badana gleba charakteryzowała się podwyższonym stężeniem

TPH (4527,70 mg/kg s.m.) oraz WWA (10,48 mg/kg s.m.). Wykonane analizy próbek gleby pod kątem zawartości metali ciężkich nie wykazały przekroczenia dopuszczalnych wartości. Zestawienie wyników analiz fizyczno-chemicznych gleby wykorzystanej w badaniach bioremediacji zamieszczono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Zestawienie wyników analiz fizyczno-chemicznych gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (TPH, WWA) poddanej procesowi biodegradacji metodą pryzmowania *ex situ*

**Table 1.** A summary of the results of physical and chemical analyses of soil contaminated with petroleum substances (TPH, PAHs) subjected to of biodegradation by an ex-situ prism method

| Oznaczenie                                    | Jednostka  | Wartość    |       |
|---|------------|------------|-------|
| pH ekstraktu wodnego gleby 1 : 10             | pH         | 6,37       |       |
| Wilgotność                                    | %          | 28,43      |       |
| BTEX (p-, m-ksylen)                           | mg/kg s.m. | 0,78       |       |
| Sumaryczna zawartość TPH                      | mg/kg s.m. | 4527,70    |       |
| Sumaryczna zawartość WWA                      | mg/kg s.m. | 10,48      |       |
| Krezole                                       | mg/kg s.m. | 1,81       |       |
| Fenole  | mg/kg s.m. | 1,55       |       |
| 2,4-dimetylofenol                             | mg/kg s.m. | 0,16       |       |
| 3,4-dimetylofenol                             | mg/kg s.m. | 2,11       |       |
| Cyjanki                                       | mg/kg s.m. | 0,12       |       |
| Bifenyle                                      | µg/kg s.m. | 751,14     |       |
| Zawartość jonów Cl <sup>-</sup>               | mg/kg s.m. | 172,60     |       |
| Zawartość jonów SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | mg/kg s.m. | 764,80     |       |
| Zawartość jonów NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | mg/kg s.m. | 40,40      |       |
| Zawartość jonów NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | mg/kg s.m. | 174,10     |       |
| Zawartość jonów PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | mg/kg s.m. | 10,40      |       |
| Zawartość jonów S <sup>2-</sup>               | mg/kg s.m. | 9,26       |       |
| Zawartość SiO <sub>2</sub>                    | mg/kg s.m. | 436 752,00 |       |
| Zawartość Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>      | mg/kg s.m. | 888 511,00 |       |
| Zawartość Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>      | mg/kg s.m. | 5 162,00   |       |
| Zawartość CaO                                 | mg/kg s.m. | 6 891,00   |       |
| Zawartość MgO                                 | mg/kg s.m. | 3 947,00   |       |
| Zawartość Mn                                  | mg/kg s.m. | 109,62     |       |
| Zawartość metali ciężkich                     | As         | mg/kg s.m. | 1,00  |
|   | Ba         | mg/kg s.m. | 29,90 |
|   | Cd         | mg/kg s.m. | 0,90  |
|   | Cr         | mg/kg s.m. | 11,30 |
|   | Co         | mg/kg s.m. | 2,90  |
|   | Cu         | mg/kg s.m. | 22,60 |
|   | Hg         | mg/kg s.m. | 0,40  |
|   | Pb         | mg/kg s.m. | 22,70 |
|   | Mo         | mg/kg s.m. | 1,70  |
|   | Sn         | mg/kg s.m. | 5,10  |
|   | Zn         | mg/kg s.m. | 20,30 |
|   | Ni         | mg/kg s.m. | 12,10 |

### Biopreparaty

W badaniach wykorzystano dwa biopreparaty (biopreparat B1 oraz biopreparat B2) opracowane w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB. W pierwszym etapie bioremediacji (badania biodegradacji prowadzone metodą pryzmowania) zastosowano biopreparat B1, opracowany na bazie niepatogennych bakterii autochtonicznych. W drugim etapie badań (badania biodegradacji wspomagane fitoremediacją) użyto biopreparatu B2, opracowanego na bazie niepatogennych bakterii autochtonicznych, wzbogaconego w wybrane szczepy grzybów i drożdży, zdolne do rozkładu węglowodorów ropopochodnych.

### Dodatek γ-PGA

W badaniach zastosowano dodatek γ-PGA (dostępny na rynku preparat Ambigel® zawierający 10% czystego kwasu poli-γ-glutaminowego), otrzymany od dr. Tomasza Skalskiego z Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej.

### Rośliny wykorzystane w badaniach fitoremediacji

W badaniach fitoremediacji wykorzystano nasiona komonicy zwyczajnej, które sadzono do wstępnie oczyszczonego gruntu (po I etapie badań bioremediacji) w maju 2022 roku.

### Metodyka badawcza

Opracowanie etapowej technologii oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi wymagało wykonania kompleksowych badań, które prowadzono w dwóch etapach:

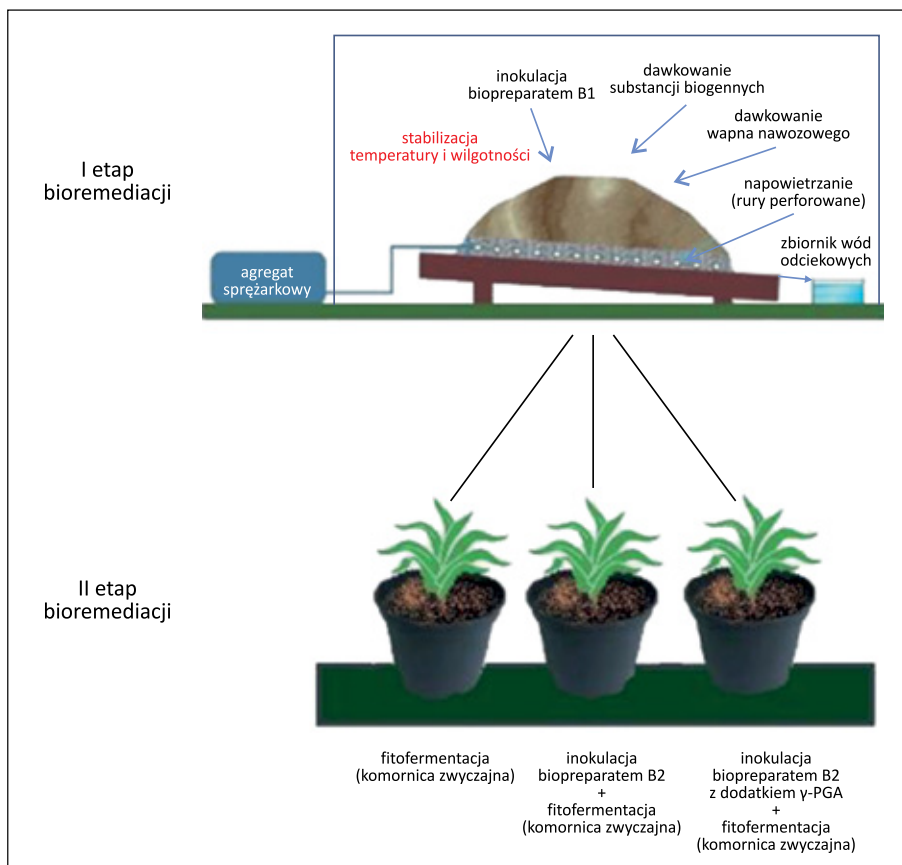
- badania biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych na drodze inokulacji biopreparatem B1 (badania prowadzone w warunkach *ex situ* przez okres 3 miesięcy);
- badania biodegradacji wspomaganej fitoremediacją (biodegradacja prowadzona z wykorzystaniem biopreparatu B2 lub biopreparatu B2 z dodatkiem γ-PGA w połączeniu z fitoremediacją z wykorzystaniem komonicy zwyczajnej – czas obserwacji: 6 miesięcy).

Schemat stanowiska do prowadzenia badań bioremediacji gleby G6 przedstawiono na rysunku 1.

W trakcie prowadzenia oczyszczania monitorowano przebieg biodegradacji TPH i WWA, za pomocą analiz chromatograficznych i toksykologicznych.

### Analizy chromatograficzne

Analizy chromatograficzne przeprowadzone w kolejnych etapach bioremediacji gleby G6 pozwoliły na określenie



**Rysunek 1.** Schemat stanowiska badawczego do prowadzenia dwuetapowego procesu remediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi

**Figure 1.** Scheme of the test stand for conducting the two-stage remediation process of soil contaminated with oil derivatives

efektywności biodegradacji TPH i WWA. Próbkę glebową ze względu na swój złożony charakter przed wykonaniem analizy chromatograficznej wymagały skomplikowanego i czasochłonnego etapu przygotowania. Procedurę przygotowania próbki do analizy chromatograficznej przeprowadzono, wykorzystując wcześniejsze badania, obejmujące:

- pobieranie, suszenie i homogenizację próbki;
- ekstrakcję analitów z matrycy (ekstrakcję TPH przeprowadzono metodą sonikacji z wykorzystaniem dichlorometanu jako rozpuszczalnika (Steliga et al., 2020; Wojtowicz et al., 2022a), natomiast ekstrakcję WWA wykonano metodą QuEChERS (Wojtowicz, 2022; Wojtowicz et al., 2022a));
- oczyszczanie próbki z substancji przeszkadzających (oczyszczanie ekstraktu glebowego z substancji polarnych do analizy chromatograficznej TPH przeprowadzono z wykorzystaniem kolumniek Bakerbond z wypełnieniem Florisil nr 7213-03 (Steliga et al., 2020; Wojtowicz et al., 2022a), natomiast ekstrakt WWA poddano oczyszczeniu metodą dSPE z wykorzystaniem specjalnych fiolek z wypełnieniem MgSO<sub>4</sub> i PSA nr JO3937 (Wojtowicz, 2022; Wojtowicz et al., 2022a));
- zagęszczanie próbki (zastosowano wyparkę próżniową).

### Analiza chromatograficzna TPH

Ilościową i jakościową analizę substancji ropopochodnych w badanej glebie (n-alkany, węglowodory z grupy izoprenoidów: pristan i fitan, węglowodory niezidentyfikowane) przeprowadzono z użyciem chromatografu Clarus 500 GC firmy PerkinElmer, wyposażonego w kolumnę kapilarną RTX-1 (30 m × 0,53 mm) firmy Restek, przy przepływie 20 ml/min helu jako gazu nośnego oraz z zastosowaniem następujących parametrów temperaturowych: temperatura inżektora 290°C, temperatura detektora 320°C, program temperatury pieca: 30°C – przebieg izotermiczny 2 przez 1 min, 30–105°C – przyrost temperatury z szybkością 10°C/min, 105–285°C – przyrost temperatury z szybkością 5°C/min, 285°C – przebieg izotermiczny przez 5 min. Do oznaczania ilościowego sumarycznej zawartości TPH zastosowano zestaw standardów kalibracyjnych firmy Tusnovics Instruments, zaś do ilościowego oznaczania poszczególnych n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych oparto się na wzorcach certyfikowanych firm Supelco oraz Restek (mieszanka wzorcowa nr D2807 węglowodorów n-parafinowych: n-C<sub>6</sub>–n-C<sub>44</sub> oraz certyfikowana mieszanka wzorcowa nr A 029668: Fuel Oil Degradation Mix n-C<sub>17</sub>, pristan, n-C<sub>18</sub>, fitan) (Steliga et al., 2020; Wojtowicz et al., 2022a).

### Analiza chromatograficzna WWA

Analizę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gruntu, obejmującą ich identyfikację oraz oznaczenie ilościowe, wykonano z użyciem chromatografu HPLC serii Vanquish Core firmy Thermo Scientific wyposażonego w dwa detektory (UV-VIS i FLD), kolumnę NUCLEODUR C<sub>18</sub> PAH (125 × 4 mm, 3 μm) firmy Macherey-Nagel oraz autosampler (dozowana objętość próbki: 10 μl).

Analizy próbek przeprowadzono przy następujących parametrach urządzenia: eluenty: A – metanol 70%, B – acetonitryl; przepływ: 1,5 ml/min; gradient: 20% B przez 1,5 min, 20–50% B w 1,5 min, 50–100% B w 1 min, 100% B przez 1 min, 100–0% B w 3 min, 100% A przez 3 min. Do oznaczania ilościowego poszczególnych WWA wykorzystano certyfikowany wzorzec PAH-Mix nr 722393 firmy Macherey-Nagel (Wojtowicz, 2022).

## Analiza toksykologiczna

Do oceny skuteczności procesu biodegradacji TPH i WWA wykorzystano pakiet testów toksykologicznych stosowanych w analizach bioindykacyjnych. Testy toksykologiczne w krótkim czasie dostarczają informacji o toksycznym (zarówno o charakterze ostrym, jak i przewlekłym) oddziaływaniu związków chemicznych na wybrany organizm wskaźnikowy lub populację. W niniejszej pracy do oceny skuteczności stosowanych zabiegów remediacyjnych w procesie oczyszczania gleby w warunkach *ex situ* wykorzystano trzy testy toksykologiczne: Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit™ oraz Microtox®STP. Testy przeprowadzono zgodnie z procedurą opracowaną przez producenta.

## Omówienie wyników

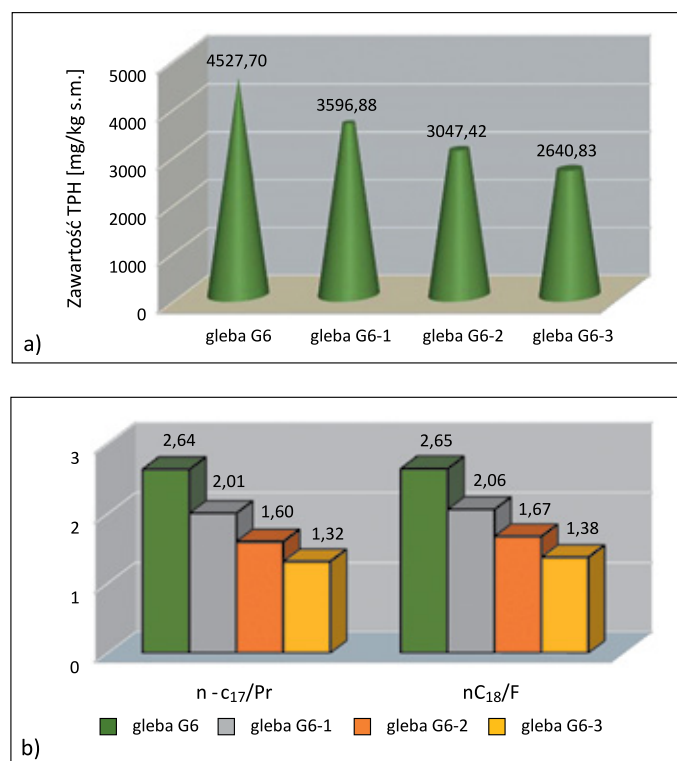
### Ocena efektywności I etapu bioremediacji gleby na podstawie analiz chromatograficznych TPH i WWA

Na skutek przeprowadzonego w warunkach półtechnicznych (metodą *ex situ*) procesu biodegradacji, w następstwie inokulacji biopreparatem B1 po 3 miesiącach trwania procesu osiągnięto obniżenie zawartości TPH z 4527,7 mg/kg s.m. do 2640,83 mg/kg s.m. (rysunek 2a). Stopień obniżenia poziomu TPH w kolejnych miesiącach I etapu bioremediacji zanieczyszczonej gleby G6 kształtował się następująco:

- po 30 dniach – 20,56% (gleba G6-1);
- po 60 dniach – 32,69% (gleba G6-2);
- po 90 dniach – 41,67% (gleba G6-3).

Ponadto identyfikacja węglowodorów z grupy izoprenoidów (Pr i F), należących do związków trudno biodegradowalnych, przyczyniła się do przedstawienia stopnia biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w postaci zmian wartości wskaźników  $n-C_{17}/Pr$  i  $n-C_{18}/F$ . Zestawienie wartości wskaźników biodegradacji  $n-C_{17}/Pr$  i  $n-C_{18}/F$  zamieszczono na rysunku 2b.

Wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że podczas pierwszego etapu bioremediacji gleby G6 najszybciej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego  $n-C_{10}$ – $n-C_{21}$ , a jej wydajność mieściła się w granicach 54,08–78,00%. Nieznacznie wolniej biodegradowalne okazały się węglowodory z zakresu  $n-C_6$ – $n-C_9$ , których stopnie biodegradacji wynosiły od 65,18% do 78,50%. Węglowodory z zakresu  $n-C_{22}$ – $n-C_{30}$  również ulegają biodegradacji w zadowalającym stopniu (22,05–47,63%). Węglowodory powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce, które należą do związków trudno biodegradowalnych, uległy rozkładowi na niższym poziomie – 14,77–18,65%. Zawartość węglowodorów niezidentyfikowanych po 3 miesiącach prowadzenia I etapu bioremediacji zmalała o 37,97%. Szczegółowy przebieg



**Rysunek 2.** a) Porównanie zmian zawartości TPH w trakcie I etapu bioremediacji gleby G6 (metodą *ex-situ*); b) Wartości stosunków  $n-C_{17}/Pr$  i  $n-C_{18}/F$  w glebie inokulowanej biopreparatem B1 w kolejnych miesiącach jej oczyszczania metodą *ex situ*

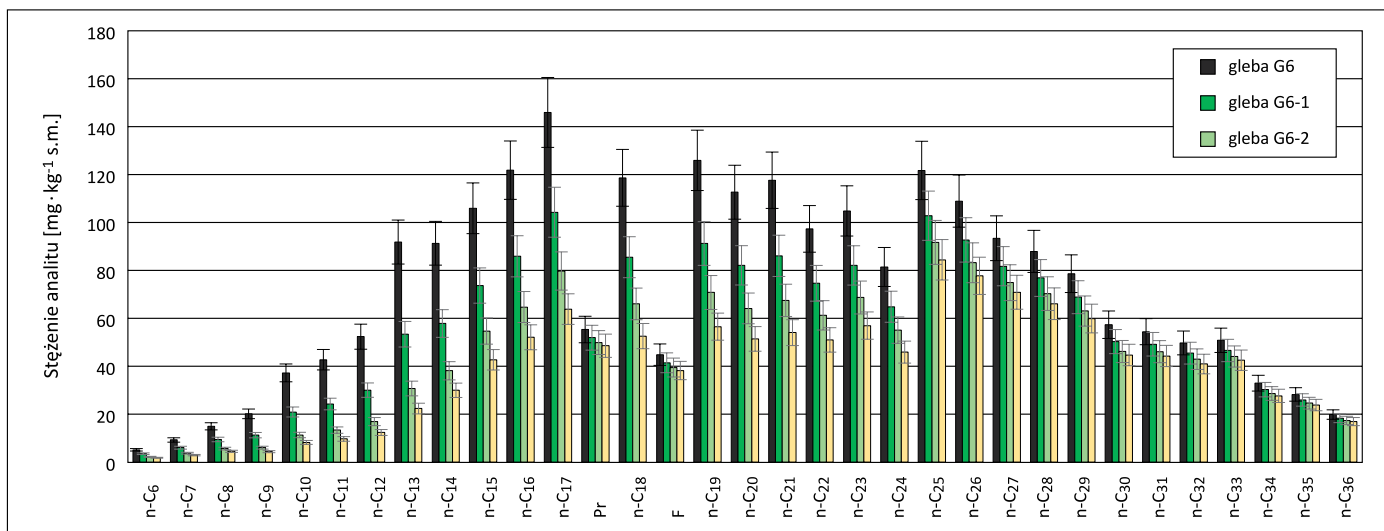
**Figure 2.** a) Comparison of changes in TPH content during the first stage of G6 soil bioremediation (*ex-situ* method); b) Values of the  $n-C_{17}/Pr$  and  $n-C_{18}/F$  ratios in the soil inoculated with the B1 biopreparation in subsequent months of soil purification using the *ex-situ* method

biodegradacji węglowodorów alifatycznych w glebie G6 inokulowanej biopreparatem B1 przedstawiono na rysunku 3.

W wyniku I etapu bioremediacji gleby G6 po 3 miesiącach osiągnięto obniżenie zawartości WWA z 10,48 mg/kg s.m. do 6,84 mg/kg s.m. (rysunek 4). Stopień skuteczności usuwania WWA w kolejnych miesiącach oczyszczania kształtował się następująco:

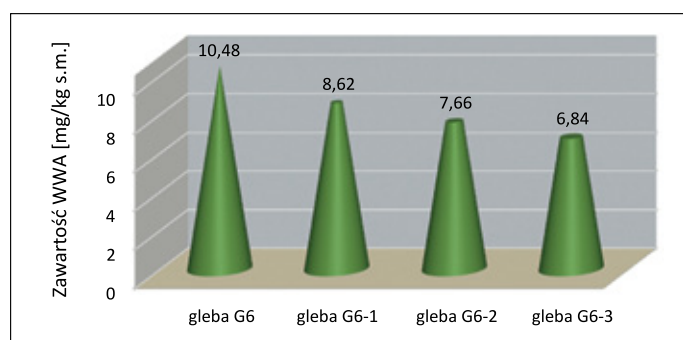
- po 30 dniach – 17,71% (gleba G6-1);
- po 60 dniach – 26,95% (gleba G6-2);
- po 90 dniach – 34,73% (gleba G6-3).

Przeprowadzona analiza chromatograficzna pozwoliła na określenie stopnia redukcji poszczególnych zidentyfikowanych WWA. W glebie inokulowanej biopreparatem B1 po zakończeniu I etapu bioremediacji najwyższy stopień biodegradacji zanotowano dla naftalenu i wynosił on 43,81%. Nieco trudniej biodegradowalne okazały się 3-pierścieniowe WWA (acenaften, fluoren, fenantren, antracen), których stopnie biodegradacji kształtowały się w granicach od 30,12% do 38,05%. W przypadku 4-pierścieniowych WWA (flouranten, piren, benzo(a)antracen, chryzen) stopień zmniejszenia ich zawartości był znacznie niższy i zawierał się w przedziale od



**Rysunek 3.** Zestawienie stężeń n-alkanów w glebie inokulowanej biopreparatem B1 w ciągu 3 miesięcy obserwacji (I etap procesu bioremediacji)

**Figure 3.** Summary of n-alkane concentrations in the soil inoculated with biopreparation B1 over 3 months (first stage of the bioremediation process)



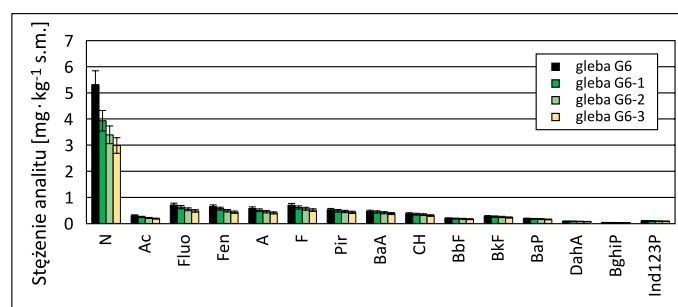
**Rysunek 4.** Porównanie zmian zawartości WWA w trakcie I etapu bioremediacji gleby G6

**Figure 4.** Comparison of changes in PAH content during the first stage of G6 soil bioremediation

18,79% do 26,80%. WWA 5-pierścieniowe i WWA 6-pierścieniowe były trudniej biodegradowalne, gdyż efektywność procesu biodegradacji na drodze inokulacji biopreparatem B1 po zakończeniu I etapu bioremediacji określono na poziomie 14,77–16,61%. Szczegółowy przebieg biodegradacji WWA w glebie G6 inokulowanej biopreparatem B1 przedstawiono na rysunku 5.

**Ocena efektywności II etapu bioremediacji gleby na podstawie analiz chromatograficznych TPH i WWA**

Po zakończeniu I etapu bioremediacji gleby G6 przeprowadzono badania biodegradacji gleby wspomaganej fitoremediacją (II etap bioremediacji). W tym celu wykorzystano wstępnie oczyszczoną glebę G6-3, w której wysiano komonicę zwyczajną. Następnie badaną glebę G6-3 inokulowano biopreparatem B2 lub biopreparatem B2 z dodatkiem  $\gamma$ -PGA. Badania biodegradacji w połączeniu z fitoremediacją prowadzono



**Rysunek 5.** Zestawienie stężeń WWA w glebie inokulowanej biopreparatem B1 w ciągu 6 miesięcy obserwacji (metoda *ex situ*): N – naftalen, Ac – acenaften, Fluo – fluoren, Fen – fenantren, A – antracen, F – fluoranten, Pir – piren, BaA – benzo(a)antracen, CH – chryzen, BbF – benzo(b)fluoranten, BkF – benzo(k)fluoranten, BaP – benzo(a)piren, DahA – dibenzo(a,h)antracen, BghiP – benzo(g,h,i)perylene, Ind123P – indeno(1,2,3-c,d)piren

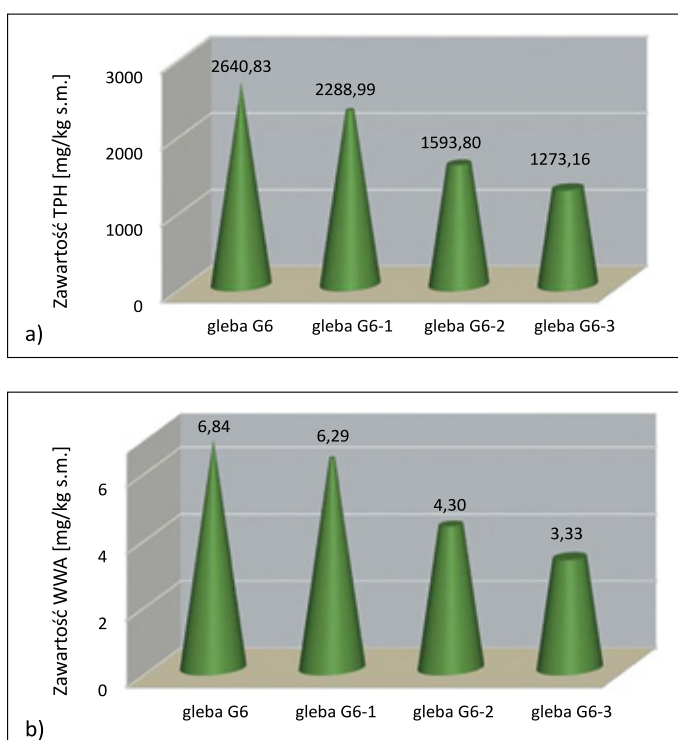
**Figure 5.** List of PAH concentrations in the soil inoculated with the B1 biopreparation within 6 months of observation (*ex-situ* method): N – naphthalene, Ac – acenaphthene, Fluo – fluorene, Phen – phenanthrene, A – anthracene, F – Fluoranthene, Pir – pyrene, BaA – benzo(a)anthracene, CH – chrysene, BbF – benzo(b)fluoranthene, BkF – benzo(k)fluoranthene, BaP – benzo(a)pyrene, DahA – dibenzo(a,h)anthracene, BghiP – benzo(g,h,i)perylene, Ind123P – indeno(1,2,3-c,d)pyrene

w plastikowych donicach o pojemności 10 L na opracowanym stanowisku badawczym przez okres 6 miesięcy. W II etapie bioremediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi zbadano efektywność procesu biodegradacji TPH i WWA wspomaganej fitoremediacją w trzech układach:

- układ 1 – gleba G6-3(1) – (gleba G6-3 + komonica zwyczajna);
- układ 2 – gleba G6-3(2) – (gleba G6-3 + biopreparat B2 + komonica zwyczajna);

- układ 3 – gleba G6-3(3) – (gleba G6-3 + biopreparat B2 z dodatkiem  $\gamma$ -PGA + komonica zwyczajna).

Na skutek przeprowadzonego II etapu bioremediacji wspomaganego fitoremediacją za pomocą komonicy zwyczajnej po 6 miesiącach badań osiągnięto spadek stężenia TPH w badanych układach o: 13,32% (układ 1), 39,65% (układ 2) oraz 51,79% (układ 3), natomiast efektywność II etapu biodegradacji WWA wynosiła 8,00% w glebie G6-3(1), 37,10% w glebie G6-3(2) oraz 51,34% w glebie G6-3(3). Porównanie zmian zawartości TPH i WWA w glebie G6-3 poddanej fitoremediacji, inokulacji biopreparatem B2 w połączeniu z fitoremediacją oraz inokulacji biopreparatem B2 z dodatkiem  $\gamma$ -PGA w połączeniu z fitoremediacją przedstawiono na rysunku 6.



**Rysunek 6.** Porównanie zmian zawartości TPH (a) i WWA (b) w glebie G6-3 po II etapie bioremediacji prowadzonym w trzech układach

**Figure 6.** Comparison of changes in the content of TPH (a) and PAH (b) in the G6-3 soil after the second stage of bioremediation conducted in three systems

Wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że w trakcie bioremediacji gleby G6-3 (II etap bioremediacji) najskuteczniej zachodziła biodegradacja węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego  $n-C_{10}-n-C_{21}$ , dla których stopnie biodegradacji zawierały się w granicach 19,27–31,76% (gleba G6-3(1)), 48,08–69,46% (gleba G6-3(2)) oraz 63,47–90,01% (gleba G6-3(3)). Zadowalający stopień biodegradacji zaobserwowano również w przypadku węglowodorów lekkich o długości łańcucha węglowego  $n-C_6-n-C_9$ , oraz węglowodorów z zakresu  $n-C_{22}-n-C_{30}$ . W obydwu przypadkach biodegradacja

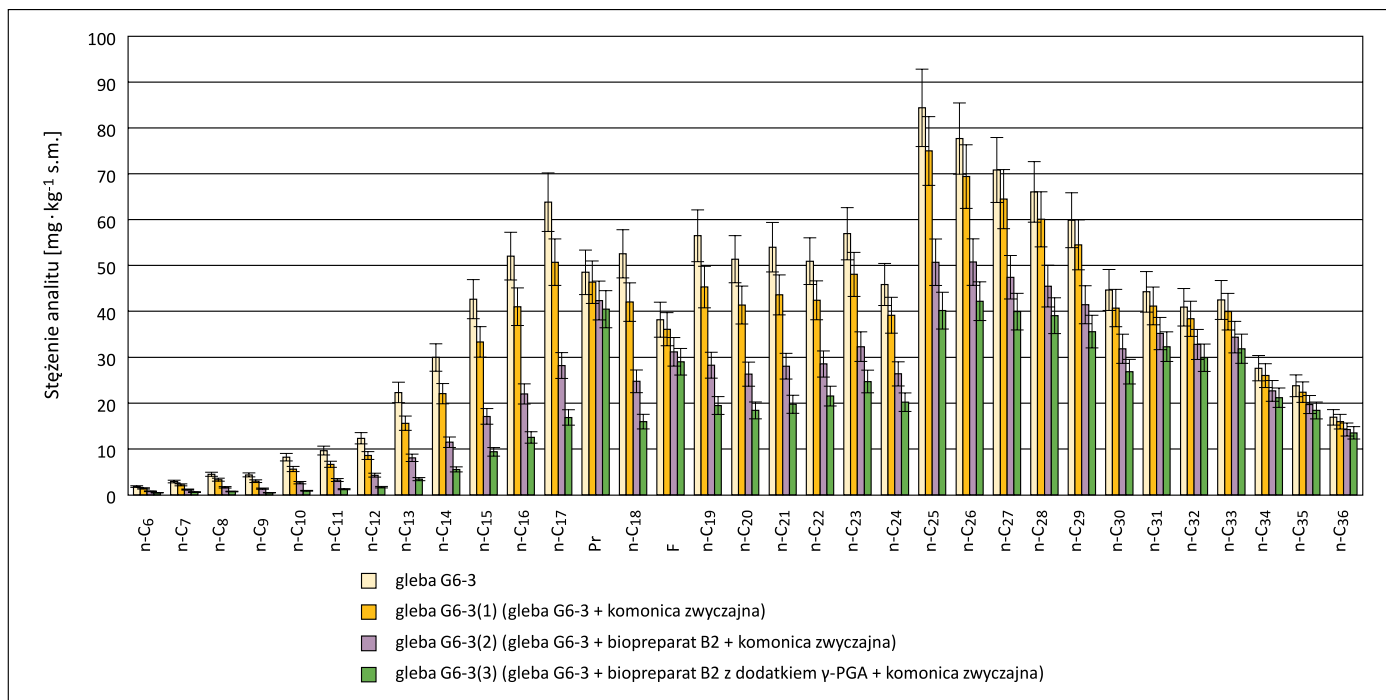
najlepiej zachodziła w układzie 3, czyli glebie inokulowanej mieszaniną biopreparatu B2 i PGA w połączeniu z fitoremediacją. Wartości stopni biodegradacji  $n-C_6-n-C_9$  kształtowały się w zakresie 76,06–84,52%, natomiast  $n-C_{22}-n-C_{30}$  – w przedziale 39,91–57,78%. Węglowodory powyżej 30 atomów węgla w cząsteczce uległy rozkładowi w mniejszym stopniu, a ich stopnie biodegradacji dla układów 1, 2 i 3 wynosiły odpowiednio: 5,59–6,93%, 15,74–20,55% oraz 20,00–27,01%. Zawartość węglowodorów niezidentyfikowanych po 6 miesiącach prowadzenia II etapu bioremediacji zmalała o 13,32% w glebie G6-3(1), o 39,65% w glebie G6-3(2) oraz o 51,79% w glebie G6-3(3).

Porównanie zmian zawartości węglowodorów alifatycznych w glebie G6-3 po II etapie bioremediacji przedstawiono na rysunku 7.

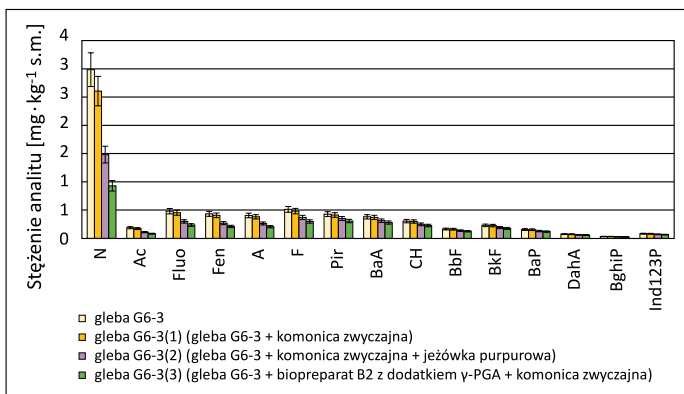
Podobnie jak w przypadku TPH, największą efektywność II etapu biodegradacji odnotowano w glebie inokulowanej mieszaniną biopreparatu B2 i roztworu  $\gamma$ -PGA, natomiast najmniejszą – w glebie niepoddanej inokulacji. Spośród oznaczonych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych największy stopień biodegradacji po 6 miesiącach prowadzenia eksperymentu odnotowano dla naftalenu i wynosił on 12,72% w glebie G6-3(1), 50,37% w glebie G6-3(2) oraz 68,88% w glebie G6-3(3). Nieco gorzej biodegradowalne okazały się 3-pierścieniowe WWA (Ac, Fluo, Fen, A), których stopnie biodegradacji kształtowały się w granicach od 5,92% do 8,18% w układzie 1, od 35,18% do 42,01% w układzie 2 oraz od 49,31% do 56,39% w układzie 3. Na drodze procesu biodegradacji wspomaganego fitoremediacją obniżono stężenia 4-pierścieniowych WWA (F, Pir, BaA, CH) w układach 1, 2 i 3 o odpowiednio 2,26–6,05%, 18,99–27,87% oraz 25,81–41,91%. WWA 5-pierścieniowe i WWA 6-pierścieniowe były trudniej biodegradowalne, a ich stopnie biodegradacji wynosiły: od 1,47% do 1,97% w glebie G6-3(1), od 14,02% do 17,23% w glebie G6-3(2), od 20,20% do 24,00% w glebie G6-3(3).

Szczegółowy przebieg biodegradacji WWA w glebie G6-3 poddanej II etapowi bioremediacji w badanych układach przedstawiono na rysunku 8.

Komonica zwyczajna jest byliną charakteryzującą się drobnymi liśćmi w barwie intensywnej zieleni. Analizując cechy morfologiczne *Lotus corniculatus* w pierwszym oraz szóstym miesiącu prowadzenia badań bioremediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, można zauważyć, że w układach inokulowanych biopreparatem B2 z dodatkiem  $\gamma$ -PGA rośliny te rozwijały się najlepiej. Świadczy o tym zarówno liczba skielkowanych nasion w pierwszym miesiącu prowadzenia badań (rysunek 9), jak i wzrost roślin, kolor liści oraz rozwój korzenia w kolejnych miesiącach. W glebie G6-3(3) długość części nadziemnej i korzeniowej roślin po zakończeniu fazy wzrostu zawierała się w granicach od 30 cm do 40 cm,



**Rysunek 7.** Porównanie zmian zawartości n-alkanów w glebie po zakończeniu II etapu bioremediacji prowadzonego w trzech układach  
**Figure 7.** Comparison of changes in the content of n-alkanes in the soil after the end of the second stage of bioremediation conducted in three systems



**Rysunek 8.** Porównanie zmian zawartości WWA w glebie po zakończeniu II etapu bioremediacji prowadzonego w trzech układach  
**Figure 8.** Comparison of changes in the content of PAHs in the soil after the end of the second stage of bioremediation conducted in three systems

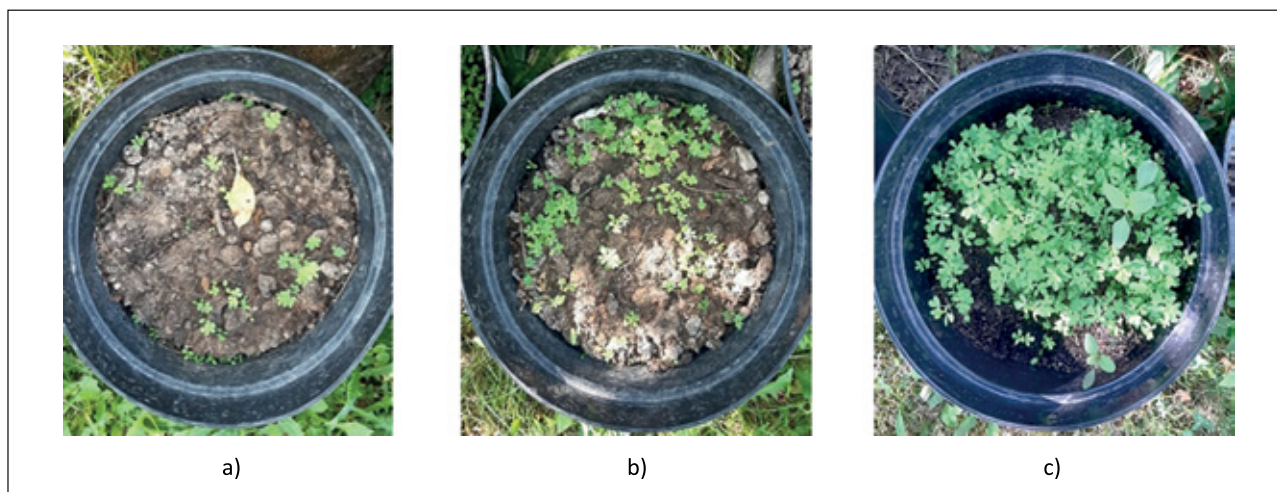
a ich liście były duże, gęsto występujące i charakteryzowały się intensywnie zieloną barwą. System korzeniowy był silnie rozwinięty, co pozwalało na zwiększenie dostępności do zanieczyszczeń, spulchnienie gleby oraz lepszą dyfuzję składników z gleby do części nadziemnej rośliny. W glebie inokulowanej samym biopreparatem B2 wzrost *Lotus corniculatus* był znacznie wolniejszy. W pierwszym miesiącu prowadzenia badań skiełkowała mniejsza liczba nasion, co wpłynęło na dalszy etap bioremediacji. Pomimo słabego skiełkowania po sześciu miesiącach prowadzenia procesu oczyszczania długość części

nadziemnej i korzeniowej roślin po zakończeniu fazy wzrostu osiągnęła rozmiary porównywalne z roślinami inokulowanymi mieszaniną biopreparatu B2 i PGA (30–40 cm), jednak ich liście były drobniejsze, a system korzeniowy gorzej rozbudowany. W glebie niepoddanej inokulacji biopreparatem w II etapie badań bioremediacji – rozwój *Lotus corniculatus* był zdecydowanie najgorszy. Nieznaczna liczba nasion wykiełkowała w pierwszym miesiącu badań, a długości części nadziemnej i korzeniowej roślin po zakończeniu fazy wzrostu osiągnęły rozmiary nieprzekraczające 20 cm. Poza tym rośliny te posiadały nieznaczną liczbę liści, a ich system korzeniowy praktycznie się nie rozwinął (krótkie pojedyncze korzenie). Zdjęcia komonicy zwyczajnej wykonane po miesiącu i sześciu miesiącach II etapu bioremediacji gleby w badanych układach przedstawiono na rysunkach 9–11.

**Ocena efektywności bioremediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi na podstawie analiz toksykologicznych**

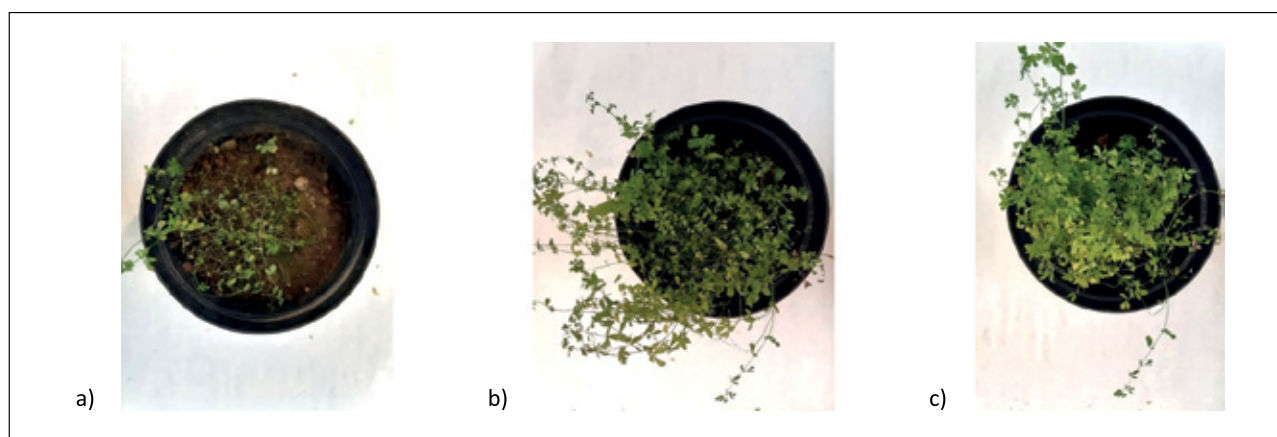
Badania toksykologiczne przeprowadzono na próbkach gleby przed procesem oczyszczania – gleba wyjściowa – G6, po zakończeniu I etapu bioremediacji – gleba G6-3 (3 miesiące) oraz po zakończeniu II etapu bioremediacji w badanych układach prowadzenia procesu (fitoremediacja, inokulacja biopreparatem B2 wspomaganą fitoremediacją oraz inokulacja





**Rysunek 9.** Wygląd komonicy zwyczajnej po pierwszym miesiącu II etapu bioremediacji; a) gleba G6-3(1); b) gleba G6-3(2); c) gleba G6-3(3)

**Figure 9.** The appearance of bird's-foot trefoil after the first month of the second stage of bioremediation; a) soil G6-3(1); b) soil G6-3(2); c) soil G6-3(3)



**Rysunek 10.** Wygląd komonicy zwyczajnej w szóstym miesiącu II etapu bioremediacji; a) gleba G6-3(1); b) gleba G6-3(2); c) gleba G6-3(3)

**Figure 10.** The appearance of bird's-foot trefoil in the 6th month of the second stage of bioremediation; a) soil G6-3(1); b) soil G6-3(2); c) soil G6-3(3)



**Rysunek 11.** Wygląd osobników komonicy zwyczajnej po zakończeniu II etapu bioremediacji; a) gleba G6-3(1); b) gleba G6-3(2); c) gleba G6-3(3)

**Figure 11.** The appearance of bird's-foot trefoil individuals after the 2nd stage of bioremediation; a) soil G6-3(1); b) soil G6-3(2); c) soil G6-3(3)

mieszanią biopreparatu B2 i roztworu  $\gamma$ -PGA w połączeniu z fitoremediacją) – gleba G6-3(1), G6-3(2), G6-3(3). Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie zmian własności toksycznych gleby w kolejnych etapach oczyszczania.

**Badania fitotoksyczności gleby z wykorzystaniem testu Phytotoxkit™**

Przeprowadzone testy fitotoksyczności wykazały, że próbka gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (gleba G6) przed procesem biodegradacji charakteryzowała się toksycznymi właściwościami dla testowanych roślin: *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* oraz *Sinapis alba*. Najbardziej wrażliwa na zanieczyszczenia z grupy TPH i WWA okazała się rzeżucha, dla której po 72 godzinach testu odnotowano zahamowanie wzrostu korzeni na poziomie 43,1%. Nieznacznie wyższą odporność na zanieczyszczenia wykazały sorgo (40,2%) oraz gorczyca (39,7%). Drugi testowany parametr, jakim jest procent wykiełkowanych nasion, kształtował się w granicach 80–90%. Prowadzony przez okres 3 miesięcy proces oczyszczania gleby w warunkach *ex situ* na drodze bioaugmentacji biopreparatem B1 spowodował spadek zawartości zanieczyszczeń w badanych glebach, czego potwierdzeniem są wyniki ponownie przeprowadzonego testu fitotoksyczności. W przypadku gleby G6-3 odnotowano średni wzrost długości korzeni z: 21,5 mm do 39,9 mm dla *Sorghum saccharatum*, z 30,2 mm do 52,4 mm dla *Lepidium sativum* oraz z 40,2 mm do 66,3 mm dla *Sinapis alba*. Ponadto we wstępnie oczyszczonej glebie G6-3 *Sorghum saccharatum* oraz *Sinapis alba* wykiełkowały w 100%, a zahamowanie wzrostu korzenia osiągnęło 16,88–24,06%. W wyniku prowadzonego II etapu bioremediacji najlepszy efekt obniżenia właściwości toksycznych gleby uzyskano w układzie inokulowanym biopreparatem B2 z dodatkiem  $\gamma$ -PGA w połączeniu z fitoremediacją

(*Lotus corniculatus*), w którym odnotowano średnią długość korzeni *Sorghum saccharatum* – 46,9 mm, *Lepidium Sativum* – 66,3 mm oraz *Sinapis alba* – 78,6 mm. Zahamowanie wzrostu korzeni kształtowało się w granicach od 1,75% do 3,91%. Najmniejsze obniżenie właściwości toksycznych gleby uzyskano w układzie bez inokulacji biopreparatem (układ 1). Zestawienie wyników testu Phytotoxkit™ przeprowadzonych w trakcie bioremediacji gleby G6 zamieszczono w tabeli 2.

**Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Ostracodtoxkit F™**

W badaniach toksyczności gleby z zastosowaniem testu Ostracodtoxkit F™ gleba kontrolna nie wykazywała właściwości toksycznych. Średnia długość skorupiaków *Heterocypris incongruens* (małżoraczek) po 6 dniach trwania testu wynosiła 773  $\mu$ m. Ponadto podczas kontaktu gleby kontrolnej z testowanymi skorupiakami odnotowano jedynie dwa przypadki śmiertelne. W próbce gleby wyjściowej G6 zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi (TPH, WWA) zaobserwowano wzrost śmiertelności skorupiaków do 46,67% oraz zahamowanie wzrostu małżoraczków o 37,1%. Przeprowadzenie I etapu bioremediacji pozwoliło na obniżenie średniej śmiertelności małżoraczków do 18,33% oraz średniej zahamowania wzrostu do 11,7%. Badania toksyczności gleby z zastosowaniem testu Ostracodtoxkit F™ przeprowadzone po zakończeniu II etapu bioremediacji gleby wykazały największy spadek średniej śmiertelności *Heterocypris incongruens* oraz średniej hamowania wzrostu w glebie G6-3(3) wynoszący odpowiednio 5,00% i 1,94%, natomiast najwyższe wartości średniej śmiertelności i hamowania wzrostu odnotowano w glebie G6-3(1). Zestawienie wyników testu Ostracodtoxkit F™ w kolejnych etapach bioremediacji gleby G6 zamieszczono w tabeli 3.

**Tabela 2.** Zestawienie wyników testu Phytotoxkit™ wykonanego na próbkach gleby kontrolnej, gleby zanieczyszczonej TPH i WWA (gleba G6), gleby po I etapie remediacji (gleba G6-3) oraz gleb po zakończeniu II etapu bioremediacji w badanych układach

**Table 2.** Summary of the results of the Phytotoxkit™ test performed on samples of control soil, soil contaminated with TPH and PAHs (soil G6), soil after the first stage of remediation (soil G6-3) and soils after the end of the second stage of bioremediation in the tested systems

| Testowany organizm         | Mierzony parametr             | Gleba     |       |       |         |         |         |
|----------------------------|-------------------------------|-----------|-------|-------|---------|---------|---------|
|                            |                               | kontrolna | G6    | G6-3  | G6-3(1) | G6-3(2) | G6-3(3) |
| <i>Sorghum saccharatum</i> | kiełkowanie [%]               | 100       | 90    | 100   | 100     | 100     | 100     |
|                            | średnia długość korzenia [mm] | 48        | 21,50 | 39,90 | 41,50   | 43,30   | 46,90   |
|                            | zahamowanie wzrostu [%]       | 0         | 55,21 | 16,88 | 13,54   | 9,79    | 2,29    |
| <i>Lepidium sativum</i>    | kiełkowanie [%]               | 100       | 60    | 80    | 100     | 100     | 100     |
|                            | średnia długość korzenia [mm] | 69        | 30,20 | 52,40 | 55,70   | 62,2    | 66,30   |
|                            | zahamowanie wzrostu [%]       | 0         | 56,23 | 24,06 | 19,28   | 9,86    | 3,91    |
| <i>Sinapis alba</i>        | kiełkowanie [%]               | 100       | 90    | 100   | 100     | 100     | 100     |
|                            | średnia długość korzenia [mm] | 80        | 40,20 | 66,30 | 68,30   | 73,40   | 78,60   |
|                            | zahamowanie wzrostu [%]       | 0         | 49,75 | 17,13 | 14,63   | 8,25    | 1,75    |

**Tabela 3.** Zestawienie wyników testu Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup> wykonanego na próbkach gleby kontrolnej, gleby zanieczyszczonej TPH i WWA (gleba G6), gleby po I etapie remediacji (gleba G6-3) oraz gleb po zakończeniu II etapu bioremediacji w badanych układach

**Table 3.** Summary of the results of the Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup> test performed on samples of control soil, soil contaminated with TPH and PAH (soil G6), soil after the first stage of remediation (soil G6-3) and soils after the end of the second stage of bioremediation in the tested systems

| Parametr                      | Gleba     |       |       |         |         |         |
|-------------------------------|-----------|-------|-------|---------|---------|---------|
|                               | kontrolna | G6    | G6-3  | G6-3(1) | G6-3(2) | G6-3(3) |
| Średnia śmiertelność [%]      | 3,30      | 46,67 | 18,33 | 15,00   | 8,33    | 5,00    |
| Średnia hamowania wzrostu [%] | –         | 37,10 | 11,70 | 7,95    | 5,02    | 1,94    |

**Tabela 4.** Zestawienie wyników testu Microtox®SPT wykonanego na próbkach gleby kontrolnej, gleby zanieczyszczonej TPH i WWA (gleba G6), gleby po I etapie remediacji (gleba G6-3) oraz gleb po zakończeniu II etapu bioremediacji w badanych układach

**Table 4.** Summary of the results of the Microtox®SPT test performed on samples of control soil, soil contaminated with TPH and PAHs (soil G6), soil after the first stage of remediation (soil G6-3) and soils after the end of the second stage of bioremediation in the tested systems

| Parametr   | Gleba     |       |      |         |         |         |
|--|-----------|-------|------|---------|---------|---------|
|  | kontrolna | G6    | G6-3 | G6-3(1) | G6-3(2) | G6-3(3) |
| Współczynnik toksyczności w teście Microtox®SPT TU | –         | 15,70 | 8,70 | 5,20    | 2,70    | 1,20    |

### Badania toksyczności gleby z wykorzystaniem testu Microtox®SPT

Badania toksyczności gleby na poziomie troficznym reducentów przeprowadzono z wykorzystaniem testu Microtox®SPT (do fazy stałej), pozwalającego na bezpośredni kontakt bakterii luminescencyjnych (*Vibrio fischeri*) z testowaną próbką gleby. Badania wykazały, że przed rozpoczęciem procesu biodegradacji gleba skażona substancjami ropopochodnymi (TPH, WWA) charakteryzowała się wysoką toksycznością, o czym świadczy wartość współczynnika toksyczności TU = 15,7. W wyniku inokulacji biopreparatem B1 uzyskano obniżenie wartości współczynnika TU w teście Microtox®SPT do wartości 8,7, natomiast przeprowadzone zabiegi fitoremediacji w badanych układach spowodowały obniżenie wartości TU w zakresie od 1,2 do 5,2.

Zestawienie wartości współczynników TU uzyskanych w teście Microtox®SPT dla badanych gleb zamieszczono w tabeli 4.

### Podsumowanie

1 Biodegradacja polega na destrukcji lub transformacji substancji toksycznych przez organizmy autochtoniczne w formy mniej szkodliwe lub całkowicie obojętne dla środowiska. Coraz częściej prowadzone są badania nad przyspieszeniem procesu biodegradacji zanieczyszczeń (TPH, WWA) na drodze procesów biotechnologicznych, przy wykorzystaniu bioaugmentacji biopreparatami opracowanymi na bazie mikroorganizmów zdolnych do efektywnego rozkładu zanieczyszczeń oraz modyfikowania ich poprzez

stosowanie dodatków do biopreparatów lub wykorzystanie technik wspomagających, np. fitoremediacji.

- 2 Fitoremediacja jest jedną z metod, które w istotny sposób mogą wpłynąć na efektywność biodegradacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Zastosowanie roślin z grupy naftofitów, jak np. *Lotus corniculatus*, w procesie fitoremediacji wstępnie oczyszczonej gleby pozwala na znaczne obniżenie stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie.
- 3 Zastosowanie dodatku  $\gamma$ -PGA do biopreparatu B2 pozwoliło na podniesienie efektywności biodegradacji TPH i WWA w glebie oraz wpłynęło na rozwój komonicy zwyczajnej wykorzystanej w zabiegu fitoremediacji.
- 4 Opracowanie technologii oczyszczania gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi wymaga przeprowadzenia kompleksowych badań laboratoryjnych obejmujących analizy fizyczno-chemiczne, chromatograficzne i toksykologiczne. Prawidłowo zrealizowane badania pozwalają na określenie najbardziej optymalnych parametrów prowadzenia procesu oczyszczania. W wyniku zastosowania etapowej technologii oczyszczania gruntów – po 9 miesiącach prowadzenia badań osiągnięto efektywność biodegradacji TPH i WWA w stosunku do gleby wyjściowej G6 wynoszącą odpowiednio:
  - gleba G6-3(1) – 49,44% (TPH), 39,95% (WWA);
  - gleba G6-3(2) – 64,80% (TPH), 58,94% (WWA);
  - gleba G6-3(3) – 71,88% (TPH), 68,24% (WWA).

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Biodegradacja zanieczyszczeń ropopochodnych z zastosowaniem biopreparatu i roztworu PGA wspomagana fitoremediacją*, praca INiG – PIB; nr zlecenia: 0019/KE/2022, nr archiwalny: DK-4100-0007/2022.

## Literatura

- Anukwa F.A., Onuoha E.M., Nkang A., Nkereuwem J., 2020. Phytoremediation Potential of *Zea mays* L. and *Panicum coloratum* L. on Hydrocarbon Polluted Soils. *International Journal of Botany*, 17(1): 1–7. DOI: 10.3923/ijb.2021.1.7.
- Banks M.K., Kulakow P., Schwab A.P., Chen Z., Rathbone K., 2003. Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation*, 5(3): 225–234. DOI: 10.1080/713779222.
- Baoune H., Aparicio J.D., Acuña A., El Hadj-khelil A.O., Sanchez L., Polti M.A., Alvarez A., 2019. Effectiveness of the *Zea mays-Streptomyces* Association for the Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons Impacted Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184: 109591. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109591.
- Barathi S., Vasudevan N., 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*, 26(5–6): 413–416. DOI: 10.1016/S0160-4120(01)00021-6.
- Heidari S., Fotouhi Ghazvini R., Zavareh M., Kafi M., 2018. Physiological Responses and Phytoremediation Ability of Eastern Coneflower (*Echinacea purpurea*) for Crude Oil Contaminated Soil. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 16(2). DOI: 10.22124/cjes.2018.2957.
- Hou L., Liu R., Li N., Dai Y., Yan J., 2019. Study on the Efficiency of Phytoremediation of Soils Heavily Polluted with PAHs in Petroleum-Contaminated Sites by Microorganism. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 31401–31413. DOI: 10.1007/s11356-019-05828-1.
- Kamath R., Rentz J.A., Schnoor J.L., Alvarez P.J.J., 2004. Chapter 16 Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soils: Principles and Applications. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 151: 447–478. ISBN 9780444516992.
- Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M., 2013. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90(4): 1317–1332. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.045.
- Kluk D., Steliga T., 2017. Efektywna metoda identyfikacji zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w glebach. *Nafta-Gaz*, 73(7): 488–495. DOI: 10.18668/NG.2017.07.06.
- Li L., Zhu P., Wang X., Zhang Z., 2020. Phytoremediation Effect of *Medicago sativa* Colonized by *Piriformospora indica* in the Phenanthrene and Cadmium Co-Contaminated Soil. *BMC Biotechnology*, 20(20). DOI: 10.1186/s12896-020-00613-2.
- Liao C., Xu W., Lu G., Liang X., Guo C., Yang C., Dang Z., 2015. Accumulation of Hydrocarbons by Maize (*Zea mays* L.) in Remediation of Soils Contaminated with Crude Oil. *International Journal of Phytoremediation*, 17(7): 693–700. DOI: 10.1080/15226514.2014.964840.
- Liu R., Jadeja R.N., Zhou Q., Liu Z., 2012. Treatment and Remediation of Petroleum-Contaminated Soils Using Selective Ornamental Plants. *Environmental Engineering Science*, 29: 494–501. DOI: 10.1089/ees.2010.0490.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiology Research*, 165(5): 363–375. DOI: 10.1016/j.micres.2009.08.001.
- Oliver J.D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4): 415–425. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
- Pawlik M., Cania B., Thijs S., Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z., 2017. Hydrocarbon Degradation Potential and Plant Growth-Promoting Activity of Culturable Endophytic Bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a Long-Term Polluted Site. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 19640–19652. DOI: 10.1007/s11356-017-9496-1.
- Pawlik M., Piotrowska-Seget Z., 2015. Endophytic bacteria associated with *Hieracium piloselloides*: their potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth promotion. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 78: 860–870. DOI: 10.1080/15287394.2015.1051200.
- Peng S., Zhou Q., Cai Z., Zhang Z., 2009. Phytoremediation of Petroleum Contaminated Soils by *Mirabilis jalapa* L. in a Greenhouse Plot Experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2–3): 1490–1496. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.036.
- Steliga T., Kluk D., 2020. Application of *Festuca arundinacea* in Phytoremediation of Soils Contaminated with Pb, Ni, Cd and Petroleum Hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194: 110409. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110409.
- Steliga T., Kluk D., 2021. Assessment of the Suitability of *Melilotus officinalis* for Phytoremediation of Soil Contaminated with Petroleum Hydrocarbons (TPH and PAH), Zn, Pb and Cd Based on Toxicological Tests. *Toxics*, 9(7), 148. DOI: 10.3390/toxics9070148.
- Steliga T., Wojtowicz T., Kapusta P., Brzeszcz J., 2020. Assessment of Biodegradation Efficiency of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Soil Using Three Individual Bacterial Strains and Their Mixed Culture. *Molecules*, 25(3): 709. DOI: 10.3390/molecules25030709.
- Tang J., Wang R., Niu X., Zhou Q., 2010. Enhancement of Soil Petroleum Remediation by Using a Combination of Ryegrass (*Lolium perenne*) and Different Microorganisms. *Soil and Tillage Research*, 110(1): 87–93. DOI: 10.1016/j.still.2010.06.010.
- Varjani S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223: 277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Wojtowicz K., 2022. Opracowanie metodyki oznaczania WWA w próbkach gleb z wykorzystaniem chromatografii cieczowej HPLC. *Nafta-Gaz*, 78(2): 141–153. DOI: 10.18668/NG.2022.02.06.
- Wojtowicz K., Steliga T., Skalski P., 2022a. Badania laboratoryjne wpływu dodatku  $\gamma$ -PGA na efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych. *Nafta-Gaz*, 78(9): 668–678. DOI: 10.18668/NG.2022.09.04.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta T., Brzeszcz J., Skalski T., 2022b. Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer  $\gamma$ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil. *Materials*, 15(2): 400. DOI: 10.3390/ma15020400.
- Yousaf S., Andria V., Reichenauer T.G., Smalla K., Sessitsch A., 2010. Phylogenetic and Functional Diversity of Alkane Degrading Bacteria Associated with Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus*) in a Petroleum Oil-Contaminated Environment. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1–3): 523–532. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.08.067.



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



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