

Badania fitoremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi z zastosowaniem *Glechoma hederacea*

Phytoremediation studies of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using *Glechoma hederacea*

Katarzyna Wojtowicz, Piotr Jakubowicz

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

STRESZCZENIE: W artykule przedstawiono zagadnienia związane z fitoremediacją gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi za pomocą *Glechoma hederacea* (bluszcz kurdybanek) jako fitoremedianta. Materiał badawczy stanowiła gleba pobrana z terenu dołu urobkowego charakteryzująca się podwyższonym stężeniem TPH (całkowita zawartość węglowodorów) – 3789,12 mg/kg s.m. oraz WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) – 7,53 mg/kg s.m. Badania fitoremediacji prowadzono w trzech układach: układ 1 – gleba wyjściowa GW + *Glechoma hederacea*, układ 2 – gleba wyjściowa GW + *Glechoma hederacea* + bioaugmentacja biopreparatem (specjalistyczne konsorcjum mikrobiologiczne), układ 3 – gleba wyjściowa GW + *Glechoma hederacea* + bioaugmentacja biopreparatem z dodatkiem γ -PGA (kwas γ -poliglutaminowy) przez sześć miesięcy w warunkach atmosferycznych. Dodatkowo zbadano skuteczność samooczyszczania gleby. Oceny efektywności stosowanych zabiegów fitoremediacyjnych dokonano na podstawie analiz chromatograficznych oraz toksykologicznych. Rezultaty badawcze wykazały, że zastosowanie metod kombinowanych (fitoremediacja wspomagana bioaugmentacją – układy 2 i 3) pozwalało na zwiększenie skuteczności procesu oczyszczania gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. Przeprowadzone analizy chromatograficzne wykazały, że stopień biodegradacji TPH po zakończeniu testu w układzie 1 wynosił 35,52%, natomiast WWA – 27,66%. Wspomaganie procesu fitoremediacji z wykorzystaniem *Glechoma hederacea* inokulacją biopreparatem (układ 2) wpłynęło na wzrost efektywności biodegradacji TPH (65,48%) i WWA (62,93%). Ponadto inokulacja gleby biopreparatem z dodatkiem γ -PGA (układ 3) spowodowała obniżenie zawartości TPH w badanej glebie o 74,90% oraz WWA o 73,85%. Skuteczność zabiegów fitoremediacji z zastosowaniem *Glechoma hederacea* uzupełniono o monitoring toksykologiczny z użyciem trzech testów toksykologicznych: Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®STP.

Słowa kluczowe: biopreparat, fitoremediacja, *Glechoma hederacea*, węglowodory ropopochodne, γ -PGA.

ABSTRACT: The article presents issues related to the phytoremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using *Glechoma hederacea* as a phytoremediation plant. The research material consisted of soil taken from a drill waste pit, characterized by an elevated TPH (total hydrocarbon content) concentration of 3789.12 mg/kg d. m. and PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) 7.53 mg/kg d.m. Phytoremediation studies were carried out in three research systems: system 1 – initial soil GW + *Glechoma hederacea*, system 2 – initial soil GW + *Glechoma hederacea* + bioaugmentation with a biopreparation (a specialized microbial consortium), system 3 – initial soil GW + *Glechoma hederacea* + biopreparation with the addition of γ -PGA (γ -polyglutamic acid) for six months under atmospheric conditions. Additionally, the effectiveness of soil self-cleaning was tested. The effectiveness of the phytoremediation treatments used was assessed based on chromatographic and toxicological analyses. The research results proved that the use of combined methods (phytoremediation supported by bioaugmentation – systems 2 and 3) allows to increase the effectiveness of the treatment process of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. The chromatographic analyses performed showed that the degree of biodegradation of TPH after the test in system 1 was 35.52%, and that of PAHs was 27.66%. Supporting the phytoremediation process using *Glechoma hederacea* and inoculation with a biopreparation (system 2) increased the efficiency of biodegradation of TPH (65.48%) and PAHs (62.93%). Moreover, inoculation of soil with a biopreparation with addition of γ -PGA (system 3) resulted in reduction of TPH content in the tested soil by 74.90% and PAH content by 73.85%. The effectiveness of the applied phytoremediation treatments using *Glechoma hederacea* was supplemented with toxicological monitoring using three toxicological tests: Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ and Microtox®STP.

Key words: biopreparation, phytoremediation, *Glechoma hederacea*, petroleum hydrocarbons, γ -PGA.

Wprowadzenie

Trwałe zanieczyszczenia organiczne, do których zaliczane są substancje ropopochodne, charakteryzują się dużą toksycznością i zdolnością do bioakumulacji (Gałązka i Gałązka, 2015). Obecnie wydobywanie ropy naftowej stanowi główną przyczynę problemów związanych z zanieczyszczeniem gleb węglowodorami ropopochodnymi. Ponadto brak recyklingu olejów odpadowych i składowanie niebezpiecznych odpadów olejowych na składowiskach bez odpowiedniego zarządzania w latach 70. XX w. wpłynęły na powstanie tzw. skażeń historycznych (doły urobkowe), które szczególnie trudno ulegają procesowi oczyszczania (Kluk i Steliga, 2017; Koshlaf i Ball, 2017). Fitoremediacja, jako ekologiczna technologia remediacji gleby, należy obecnie do najbardziej obiecujących metod oczyszczania terenów skażonych węglowodorami ropopochodnymi (Cheng et al., 2017). Ponadto w ostatnich latach obserwuje się intensywny rozwój tzw. metod kombinowanych, wykorzystujących technikę fitoremediacji w połączeniu z bioaugmentacją specjalistycznym konsorcjum mikrobiologicznym lub roztworami biosurfaktantów. W procesie bioaugmentacji powinno stosować się biopreparaty opracowane na bazie wyselekcjonowanych mikroorganizmów autochtonicznych, co pozwala na uniknięcie antagonistycznych oddziaływań mikrobioty autochtonicznej gleby na obce kultury drobnoustrojów (Mrozik i Piotrowska-Seget, 2010; Varjani, 2017).

Fitoremediacja jest w dużym stopniu uzależniona od doboru roślin wykorzystanych w procesie oczyszczania (Lin et al., 2022). Powinny się one charakteryzować tolerancją na wysokie stężenia ksenobiotyków, wysokim stopniem biodegradacji zanieczyszczeń, zdolnością do akumulacji kilku zanieczyszczeń jednocześnie, dużą produkcją biomasy, szybkim wzrostem, a także odpornością na choroby, szkodniki i trudne warunki środowiskowe (Barathi i Vasudevan, 2001; Kubińska, 2020; Wojtowicz i Steliga, 2023). Zazwyczaj w procesie fitoremediacji gleb skażonych substancjami ropopochodnymi wykorzystywane są rośliny z grupy naftofitów, które wykazują ewolucyjnie nabytą zdolność do wzrostu na terenach zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Warto jednak mieć na uwadze, że efektywne pobieranie zanieczyszczeń organicznych przez rośliny jest ograniczone ze względu na ich fotoautotroficzny metabolizm i brak możliwości wykorzystania cząsteczek organicznych jako źródła energii lub węgla (Ptaszek et al., 2020). Dlatego w celu uzyskania większej efektywności procesu fitoremediacji gruntów zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi stosuje się fitoremediację wspomaganą bioaugmentacją.

Bioaugmentacja polega na inokulacji gleby biopreparatami opracowanymi na bazie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów ropopochodnych lub przekształcenia

ich w prostsze związki, charakteryzujące się niższą toksycznością i lepszą przyswajalnością przez rośliny. Połączenie fitoremediacji i inokulacji gleby pozwala na powstanie synergistycznych oddziaływań w układzie roślina–mikrobiota glebowa, wpływających na poprawę efektywności oczyszczania terenów skażonych ropą naftową (Simmer i Schnoor, 2022). Zastosowanie bioaugmentacji umożliwia zwiększenie gęstości populacji drobnoustrojów w warstwie ryzosfery, co pozwala na zwiększenie powierzchni korzeni roślin, umożliwiając im lepszy kontakt z matrycą glebową i pozyskanie większej ilości składników odżywczych niezbędnych do wzrostu (Shehzadi et al., 2014; Sui et al., 2021). Wnikanie korzeni w głębsze warstwy ryzosfery powoduje rozpulchnienie gleby, czego konsekwencją jest poprawa wentylacji oraz przepuszczalności badanego gruntu, a także zwiększenie interakcji pomiędzy mikroorganizmami a zanieczyszczeniem. Z drugiej strony rośliny wspomagają biodegradację, gdyż korzenie roślin wydzielają związki organiczne takie jak kwasy organiczne, cukry, aminokwasy itp., które stanowią źródło węgla i energii do wzrostu bakterii i grzybów ryzosferowych (Weyens et al., 2009; Afzal et al., 2012). Oprócz bioaugmentacji samym biopreparatem można również w celu zintensyfikowania procesu fitoremediacji stosować dodatki do inokulatów takie jak biowęgiel czy biosurfaktanty, np. γ -PGA (Ptaszek et al., 2020), które odpowiadają za poprawę biodostępności zanieczyszczeń.

Materiał badawczy

Badania fitoremediacji prowadzono na specjalnie skonstruowanym stanowisku badawczym, gdzie zgromadzono glebę zanieczyszczoną węglowodorami ropopochodnymi z grup TPH (3789,12 mg/kg s.m.) i WWA (7,53 mg/kg s.m.), pobraną z terenu dołu urobkowego. Przed rozpoczęciem badań fitoremediacji w laboratorium przeprowadzono suplementację gleby nawozem mineralnym Azofoska oraz wapnem nawozowym w celu osiągnięcia optymalnych warunków do rozwoju mikroorganizmów (stosunek substancji biogenych C : N : P = 100 : 10 : 1, pHgleby = 7,5) (Nwankwegu et al., 2016; Wu et al., 2017; Steliga et al., 2020). Analogicznie do fitoremediacji przeprowadzono samooczyszczanie gleby.

Fitoremediantami wykorzystanymi w procesie oczyszczania gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi były sadzonki *Glechoma hederacea* (bluszczyk kurdybanek) o wielkości około 5 cm, które pobrano w marcu 2023 r. z terenu naturalnego wycieku ropy naftowej. Zastosowanie rośliny naturalnie występującej na terenie skażonym ropą naftową, która łatwo ulega ukorzenianiu (poprzez rozłogi) oraz rozrostowi, pozwoliło na szybką adaptację stosowanych fitoremediantów do warunków prowadzenia procesu oczyszczania.

Badania fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją prowadzono z wykorzystaniem biopreparatu opracowanego na bazie szczepów bakterii *Dietzia* sp. IN118, *Gordonia* sp. IN101, *Mycolicibacterium frederiksbergense* IN53, *Rhodococcus erythropolis* IN119, *Rhodococcus globerulus* IN113 oraz *Raoultella* sp. IN109, jak również grzybów *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Candida* sp., *Cladosporium halotolerans*, *Penicillium chrysogenum*. Wszystkie szczepy mikroorganizmów obecne w biopreparacie zostały wyizolowane z gleby (lub dołu urobkowego) skażonej substancjami ropopochodnymi. Biopreparat został opracowany w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB (Wojtowicz et al., 2023a, 2023b). Jako dodatek do biopreparatu wykorzystano naturalny biosurfaktant γ -PGA (kwas γ -poliglutaminowy) produkowany przez szczepy bakterii *Bacillus licheniformis*. γ -PGA zakupiono w postaci dostępnego na rynku preparatu Ambigel® zawierającego 10% czystego kwasu γ -poliglutaminowego (Wojtowicz et al., 2022b).

Metodyka badawcza

Badania fitoremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi prowadzono na stanowisku badawczym utworzonym na terenie ogrodu krośnieńskiego oddziału Instytutu Nafty i Gazu – Państwowego Instytutu Badawczego (rysunek 1). W tym celu wykopano dół o głębokości 30 cm, w którym umieszczono drewnianą skrzynię (bez dna) o wymiarach 80 × 150 × 30 cm. Na dnie skrzyni rozłożono agrowłókninę, po czym umieszczono w niej wstępnie przygotowaną glebę przeznaczoną do badań fitoremediacji (gleba wyjściowa, GW). Stanowisko badawcze podzielono na sektory, w których posadzono po osiem sadzonek bluszczyku kurdybanka (*Glechoma hederacea*), pobranych z terenu wycieku ropy naftowej. Glebę

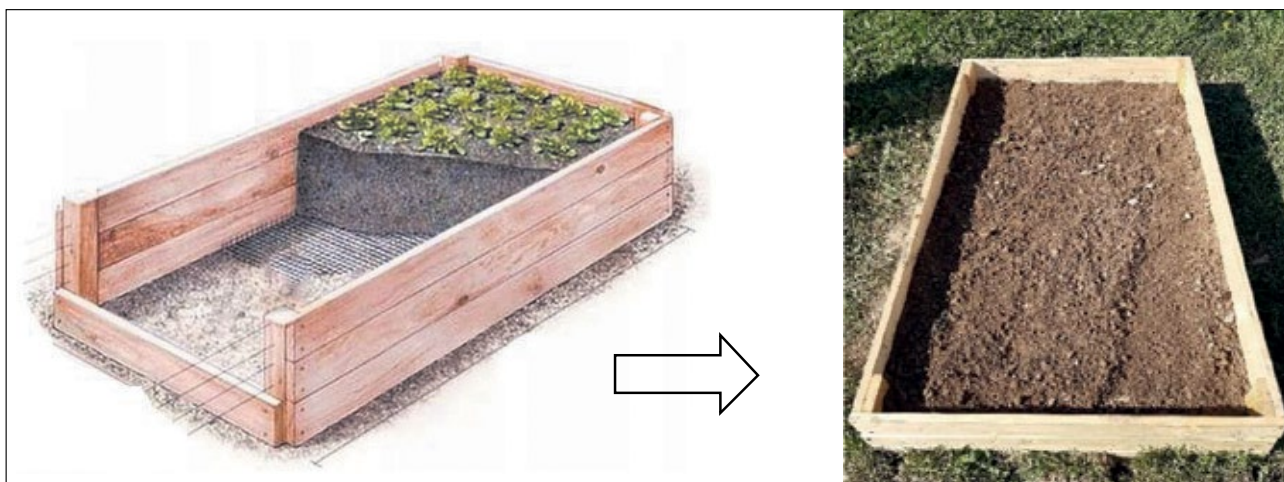
wyjściową zwilżono wodą, a następnie w zależności od układu badawczego przeprowadzono inokulację biopreparatem lub biopreparatem z dodatkiem γ -PGA:

- układ 1 – gleba GW-1 (gleba GW + bluszczyk kurdybanek);
- układ 2 – gleba GW-2 (gleba GW + biopreparat + bluszczyk kurdybanek);
- układ 3 – gleba GW-3 (gleba GW + biopreparat z dodatkiem γ -PGA + bluszczyk kurdybanek).

Równocześnie prowadzono samooczyszczanie gleby GW w warunkach analogicznych do fitoremediacji (gleba GW-4 – próbka kontrolna). Badania fitoremediacji oraz biodegradacji samoistnej trwały 6 miesięcy w rzeczywistych warunkach atmosferycznych, w okresie od kwietnia do września 2023 r.

Po zakończeniu oczyszczania przeprowadzono analizy chromatograficzne próbek glebowych pod kątem oznaczenia stężeń TPH (sumarycznej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych) i WWA (wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych) oraz określono stopień zanieczyszczenia gleby na podstawie analiz toksykologicznych.

Analizy pod kątem oznaczenia TPH i WWA w glebie przeprowadzono zgodnie z procedurami opracowanymi w Zakładzie Technologii Eksploatacji Płynów Złożowych INiG – PIB (PB-18/KE z dnia 14.01.2015 r. i Procedura nr 2/KE/21 z dnia 15.11.2021 r.). Analizy chromatograficzne TPH wykonano z wykorzystaniem chromatografu gazowego Clarus 500 firmy PerkinElmer wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Ilościowe oznaczenie sumarycznej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) przeprowadzono z wykorzystaniem certyfikowanego wzorca BAM K010 firmy Tusnovics Instruments, natomiast oznaczenie poszczególnych n-alkanów wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych – z wykorzystaniem certyfikowanych wzorców firm Supelco i Restek (mieszanina wzorcowa nr D2807 węglowodorów parafinowych: n-C6–n-C44 oraz certyfikowana mieszanina



Rysunek 1. Stanowisko badawcze do prowadzenia badań fitoremediacji

Figure 1. Research stand for phytoremediation research

wzorcowa nr A029668: Fuel Oil Degradation Mix n-C17, pristan, n-C18, fitan) (Steliga et al., 2020). Analizy chromatograficzne WWA wykonywano za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego serii Vanquish Core firmy Thermo Fisher Scientific wyposażonego w detektory: UV-VIS i fluorymetryczny (FLD). Ilościowe oznaczenie poszczególnych WWA wchodzących w skład zanieczyszczeń ropopochodnych wykonano z użyciem certyfikowanych roztworów PAH-Mix nr ref. 722393 firmy Macherey-Nagel oraz CRM47940 firmy Supelco (Wojtowicz, 2022).

Analizę toksykologiczną gleby wyjściowej oraz gleb poddanych procesowi fitoremediacji w trzech wariantach prowadzenia procesu wykonano za pomocą testów toksykologicznych: Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox®STP zgodnie z procedurami producentów.

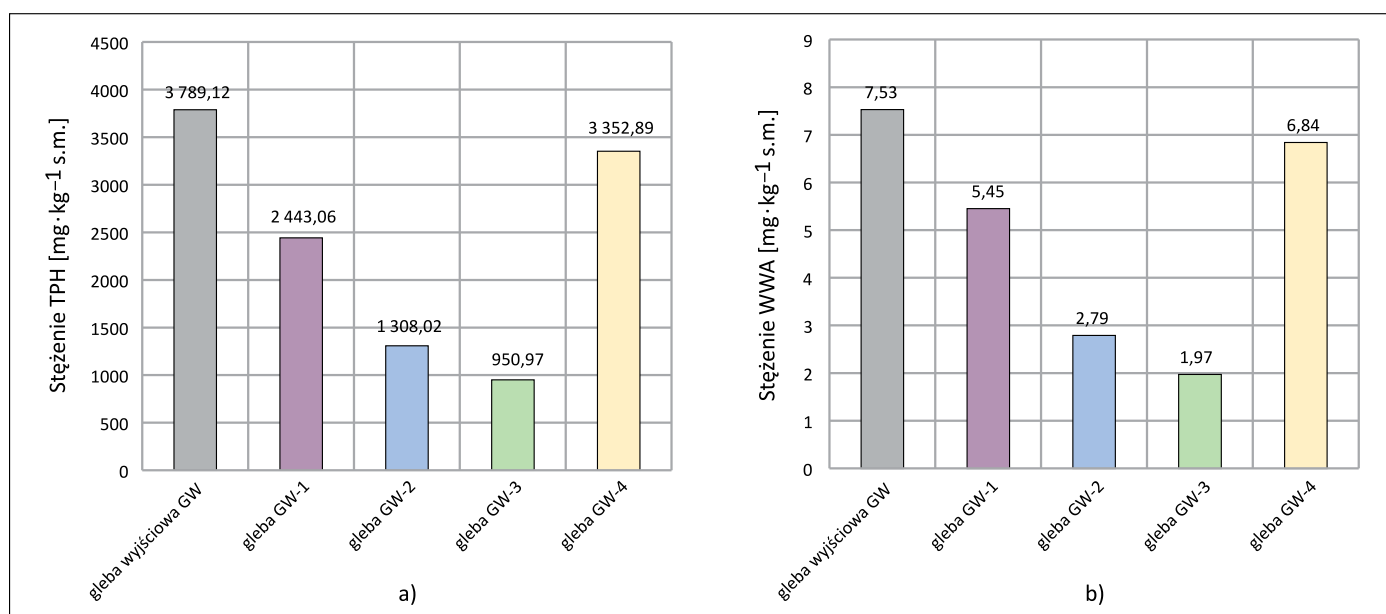
Omówienie wyników

Ocena efektywności fitoremediacji gleby na podstawie analiz chromatograficznych TPH i WWA

Wyniki analiz chromatograficznych przeprowadzonych dla próbki gleby wyjściowej oraz próbek gleb pobranych po zakończeniu eksperymentu z układów 1–3 wykazały, że efektywność fitoremediacji z wykorzystaniem *Glechoma hederacea* była znacznie większa w układach, w których zastosowano inokulację biopreparatem oraz bioaugmentację z dodatkiem γ -PGA. W wyniku sześciomiesięcznego procesu oczyszczania gleby skażonej węglowodorami ropopochodnymi

w układzie 1 uzyskano nieznaczne obniżenie stężenia TPH (35,52%) oraz WWA (27,66%). Zastosowanie metod kombinowanych, tj. fitoremediacji wspomaganej bioaugmentacją, wpłynęło na zwiększenie stopni biodegradacji TPH i WWA, które po zakończeniu eksperymentu wynosiły odpowiednio 65,48% i 62,93% (układ 2) oraz 74,90% i 73,85% (układ 3). Biodegradacja samoistna pozwoliła na obniżenie stężenia TPH o 11,51% i WWA o 9,21%. Zestawienie stężeń TPH i WWA w glebie wyjściowej GW oraz próbkach gleby po zakończeniu procesu oczyszczania na drodze fitoremediacji oraz biodegradacji samoistnej przedstawiono na rysunku 2.

Efektywność procesu bioremediacji gleb skażonych węglowodorami ropopochodnymi zależy od wielu czynników. Jednym z nich jest symetria i wielkość cząsteczki zanieczyszczenia. Generalnie wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego (węglowodory alifatyczne) lub liczby pierścieni aromatycznych w cząsteczce (WWA) maleje szybkość ich biodegradacji. Należy jednak zauważyć, że w przypadku n-alkanów najłatwiej biodegradowalne są zazwyczaj węglowodory o długości łańcucha węglowego od C9 do C21, gdyż krótkołańcuchowe produkty ropopochodne mogą być toksyczne dla mikroorganizmów bakteryjnych obecnych w glebie lub wprowadzonych do gleby na drodze bioaugmentacji (Wojtowicz et al., 2022a; Guirado et al., 2023). Przeprowadzone analizy chromatograficzne po zakończeniu fitoremediacji potwierdziły, że spośród węglowodorów alifatycznych najłatwiej rozkładowi ulegały węglowodory z zakresu n-C9–n-C21, których stopnie biodegradacji mieściły się w przedziałach: 38,57–49,83% (układ 1), 71,42–92,27% (układ 2) oraz



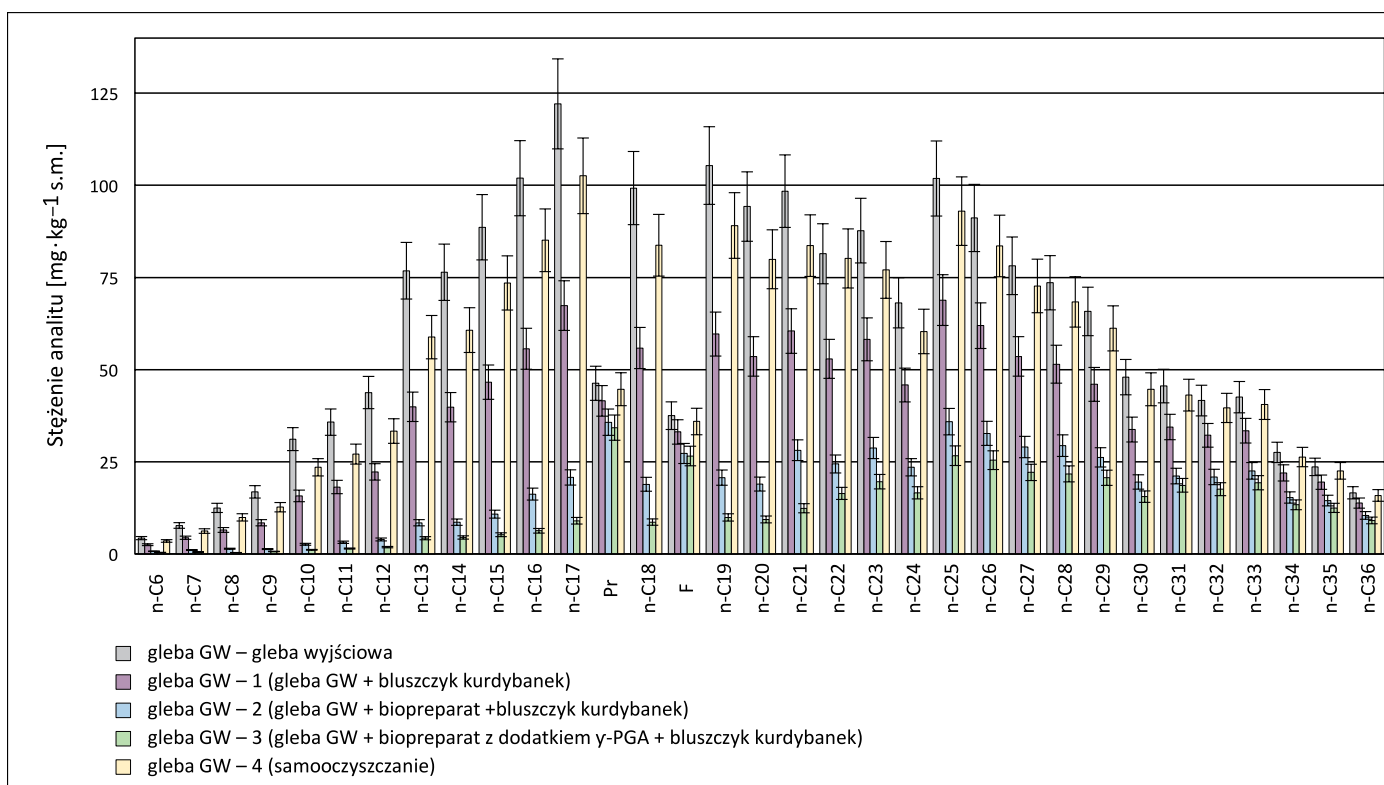
Rysunek 2. Porównanie zmian zawartości: a) TPH i b) WWA w glebie wyjściowej GW, glebach poddanych procesowi fitoremediacji z wykorzystaniem *Glechoma hederacea* jako fitoremedianta oraz glebie po samooczyszczeniu

Figure 2. Comparison of changes in the content of a) TPH and b) PAHs in the initial GW soil, soils subjected to the phytoremediation process using *Glechoma hederacea* as a phytoremediation plant and soil after self-attenuation

87,42–97,35% (układ 3). Stężenie węglowodorów n-C9–n-C21 w glebie poddanej samooczyszczaniu spadło o 15,03–24,76%. Skuteczność usuwania z gleby węglowodorów lekkich była porównywalna i wynosiła: 41,79–48,01% w glebie GW-1, 83,58–88,90% w glebie GW-2, 91,28–97,35% w glebie GW-3 oraz 17,95–20,65% w glebie GW-4. Oznaczone wartości stopni biodegradacji węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha węglowego C22 do C30 wynosiły: w układzie 1 – 29,67–35,05%, w układzie 2 – 59,34–70,05% i w układzie 3 64,64–79,86%, natomiast w glebie po biodegradacji samoistnej 6,88–13,07%. Zdecydowanie najgorzej biodegradacji ulegały węglowodory ciężkie zawierające w cząsteczce powyżej 30 atomów węgla. Skuteczność biodegradacji węglowodorów n-C31–n-C36 w układach 1, 2 i 3 oraz glebie po samooczyszczaniu wynosiła odpowiednio: 16,88–24,40%, 37,10–53,63%, 45,30–59,14% i 4,36–5,40%. Porównanie stężeń n-alkanów w glebie wyjściowej oraz glebach po zakończeniu eksperymentu zamieszczono na rysunku 3.

3-pierścieniowych i 4-pierścieniowych WWA również była zadowalająca i wynosiła odpowiednio: 25,97–28,10% i 15,30–18,43% (gleba GW-1), 60,91–66,09% i 39,76–47,39% (gleba GW-2), 69,43–72,35% i 45,32–55,02% (gleba GW-3) oraz 6,27–8,69% i 2,39–6,42% (gleba GW-4). Skuteczność usuwania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zawierających w cząsteczce powyżej czterech pierścieni aromatycznych była zdecydowanie gorsza: dla układu 1 wynosiła od 7,12% do 10,80%, dla układu 2 – od 27,13% do 33,66% oraz dla układu 3 – od 30,92% do 36,37%. Po zakończeniu biodegradacji samoistnej spadek stężenia 5-pierścieniowych i 6-pierścieniowych WWA wynosił od 1,56% do 2,09%. Porównanie stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie wyjściowej, glebach poddanych procesowi fitoremediacji oraz glebie po biodegradacji samoistnej zamieszczono na rysunku 4.

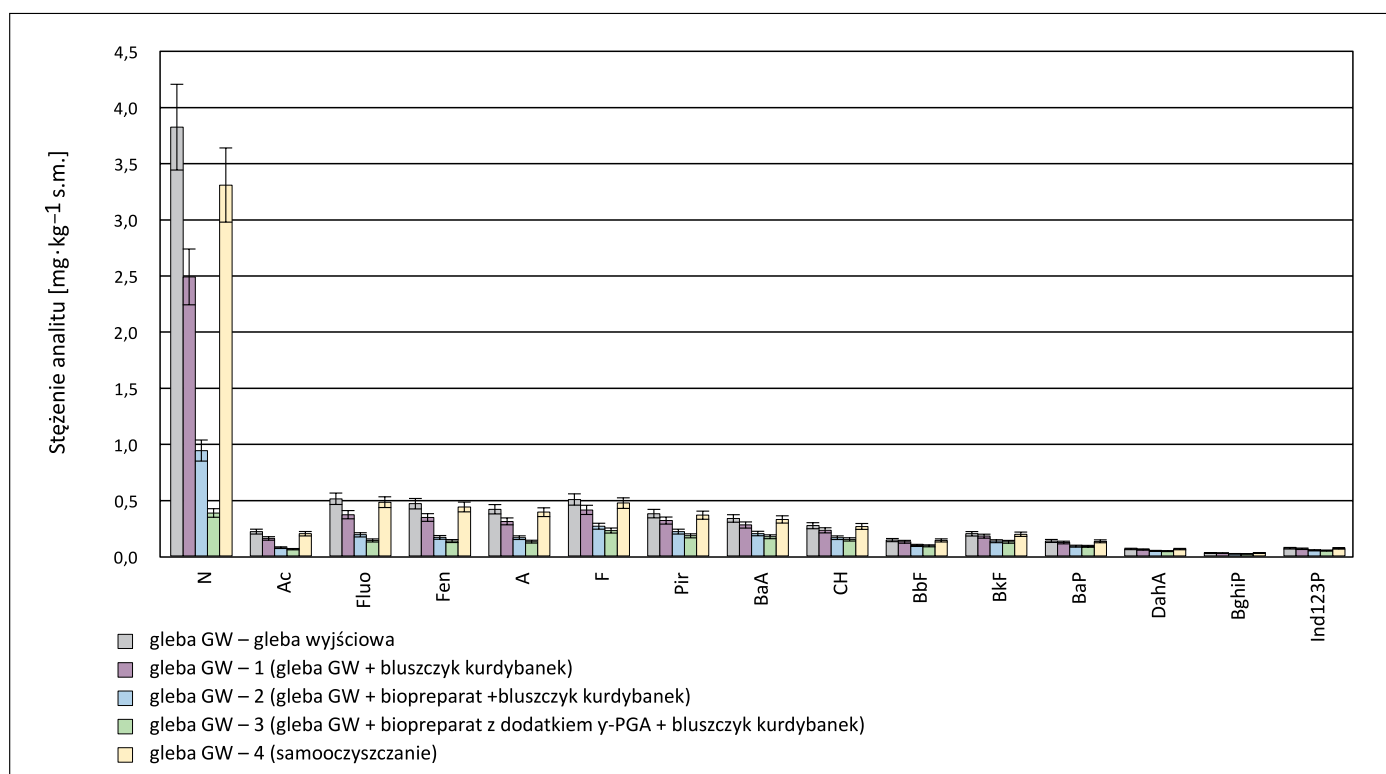
Przeprowadzone analizy chromatograficzne dostarczyły informacji na temat skuteczności stosowanych zabiegów fitoremediacji z wykorzystaniem *Glechoma hederacea*. Zastosowanie



Rysunek 3. Porównanie zmian zawartości n-alkanów w glebie wyjściowej, po zakończeniu fitoremediacji i po samooczyszczaniu
Figure 3. Comparison of changes in n-alkane content in the initial soil and after phytoremediation and after self-attenuation

Podobnie przebiegała biodegradacja WWA, mianowicie wraz ze wzrostem ich masy cząsteczkowej (liczby pierścieni aromatycznych w cząsteczce) malała wydajność biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Oznaczone stopnie redukcji naftalenu w badanych układach wynosiły: 34,93% (układ 1), 75,43% (układ 2), 89,99% (układ 3) oraz 13,50% (samooczyszczanie). Biodegradacja

fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją (układy 2 i 3) pozwoliło na zwiększenie stopni redukcji TPH i WWA w glebie, a tym samym na poprawę efektywności oczyszczania. Wyniki analiz chromatograficznych przeprowadzonych na próbkach gleb pobranych po zakończeniu eksperymentu wykazały najniższe stężenia wszystkich grup węglowodorów w układzie 3, w którym zastosowano fitoremediację za pomocą



Rysunek 4. Porównanie zmian zawartości WWA w glebie wyjściowej i po zakończeniu fitoremediacji

Figure 4. Comparison of changes in the content of n-alkanes in the initial soil and after phytoremediation and self-attenuation

Glechoma hederacea wspomaganą inokulacją biopreparatem z dodatkiem γ -PGA. Fitoremediacja z bioaugmentacją samym biopreparatem (układ 2) również pozwoliła na znaczną redukcję węglowodorów ropopochodnych w glebie. Zdecydowanie niższe wartości stopni biodegradacji węglowodorów ropopochodnych otrzymano w układzie nieinokulowanym, czyli układzie, w którym zastosowano tylko fitoremediację, oraz w glebie poddanej samooczyszczaniu. Wyniki analiz chromatograficznych potwierdziły zasadność stosowania metod kombinowanych w trakcie oczyszczania gleb skażonych węglowodorami ropopochodnymi. Zestawienie stężeń oznaczonych grup węglowodorów w próbkach gleby wyjściowej oraz po zakończeniu fitoremediacji i biodegradacji samoistnej zamieszczono w tabeli 1.

Ocena efektywności fitoremediacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi na podstawie analiz toksykologicznych

Badania fitotoksyczności przeprowadzone na próbkach gleby wyjściowej oraz glebach po zakończeniu fitoremediacji z zastosowaniem *Glechoma hederacea* (gleby GW-1, GW-2, GW-3) z wykorzystaniem standardowego testu Phytotoxkit™ wykazały poprawę jakości gleby po zakończeniu eksperymentu. Liczba wykiełkowanych nasion dla próbki wyjściowej wynosiła: dla *Lepidium sativum* – 80% oraz dla *Sinapis alba* i *Sorghum saccharatum* – 90%. Drugi testowany parametr, jakim było zahamowanie wzrostu korzeni bioindykatorów, kształtował się na poziomie: 13,97% dla rzeżuchy, 11,93% dla gorczycy oraz 10,20% dla sorgo. Fitoremediacja z wykorzystaniem

Tabela 1. Zawartość wybranych grup węglowodorów alifatycznych i WWA w badanych glebach

Table 1. Content of selected groups of aliphatic hydrocarbons and PAHs in the tested soils

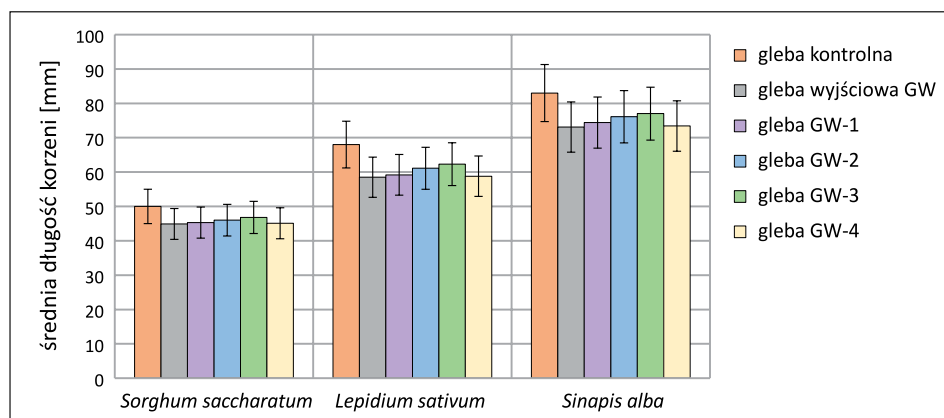
Parametr	Gleba wyjściowa GW	Gleba GW-1	Gleba GW-2	Gleba GW-3	Gleba GW-4
TPH	3789,12	2443,06	1308,02	950,97	3352,89
$\sum n-C6-n-C8$	24,44	13,33	3,12	1,19	19,58
$\sum n-C9-n-C21$	990,61	543,32	162,29	74,30	813,60
$\sum n-C22-n-C30$	695,69	472,43	249,18	184,54	80,58
$\sum n-C31-n-C36$	197,34	155,17	104,66	90,28	631,60
Izoprenoidy	83,77	74,58	50,17	60,79	187,82
Węglowodory niezidentyfikowane	1797,27	1184,22	725,82	539,87	1619,71

cd. Tabela 1/cont. Table 1

Parametr	Gleba wyjściowa GW	Gleba GW-1	Gleba GW-2	Gleba GW-3	Gleba GW-4
∑ WWA	7,53	5,45	2,79	1,97	9,21
∑ 2-pierścieniowe WWA	3,82	2,49	0,94	0,38	3,30
∑ 3-pierścieniowe WWA	1,61	1,17	0,59	0,46	1,50
∑ 4-pierścieniowe WWA	1,48	1,23	0,84	0,72	1,42
∑ 5-pierścieniowe WWA	0,47	0,42	0,31	0,30	0,46
∑ 6-pierścieniowe WWA	0,16	0,14	0,11	0,11	0,15

Glechoma hederacea wpłynęła na spadek zahamowania wzrostu *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* oraz *Sinapis alba* w glebie GW-1 do wartości: 9,40% (sorgo), 12,94% (rzeżucha) i 10,36% (gorczyca), natomiast ich stopnie skielkowania nie uległy zmianie. Zastosowanie metod kombinowanych, tj. fitoremediacji wspomaganą inokulacją biopreparatem lub biopreparatem z dodatkiem γ -PGA, pozwoliło na zwiększenie stopnia skielkowania roślin testowych w glebach GW-2 i GW-3 do 100%. Stopnie zahamowania wzrostu bioindykatorów w glebach GW-2 i GW-3 wynosiły odpowiednio 8,00% i 6,40% (*Sorghum saccharatum*), 10,15% i 8,38% (*Lepidium sativum*) oraz 8,31% i 7,23% (*Sinapis alba*). Dla porównania w glebie poddanej procesowi samooczyszczania zahamowanie wzrostu korzeni *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* oraz *Sinapis alba* wynosiło odpowiednio: 9,80%, 13,53% i 11,57%. Na rysunku 5 zamieszczono porównanie średnich długości korzeni *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* oraz *Sinapis alba* w próbce gleby kontrolnej, wyjściowej oraz próbkach gleby po zakończeniu oczyszczania w badanych układach.

jako bioindykatorów ocenę toksyczności badanych próbek glebowych oparto na wartościach średniej śmiertelności oraz zahamowania wzrostu małżoraczków. Średnia śmiertelność *Heterocypris incongruens* w glebie wyjściowej oraz glebach GW-1 i GW-4 wynosiła 13,33%. Zastosowanie fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją biopreparatem pozwoliło na podwyższenie efektu przeżyciowego małżoraczków do 11,67%. Średnia śmiertelność stosowanych bioindykatorów w glebie oczyszczanej metodą fitoremediacji wspomaganą inokulacją biopreparatem z dodatkiem γ -PGA kształtowała się na poziomie 10,00%. Drugi testowany parametr, czyli średnia hamowania wzrostu małżoraczków, wykazał poprawę jakości gleby w każdym z testowanych wariantów fitoremediacji, czego potwierdzeniem jest spadek jego wartości z 7,21% (gleba wyjściowa) do: 5,84% (gleba GW-1), 3,53% (gleba GW-2) i 2,98% (gleba GW-3). W glebie poddanej samooczyszczaniu średnia hamowania wzrostu *Heterocypris incongruens* wynosiła 6,98%. Wyniki testu Ostracodtoxkit F™ przeprowadzonego na próbkach gleby wyjściowej, glebie po biodegradacji spon-tanicznej oraz po zakończeniu fitoremediacji z wykorzystaniem *Glechoma hederacea* zamieszczono na rysunku 6.



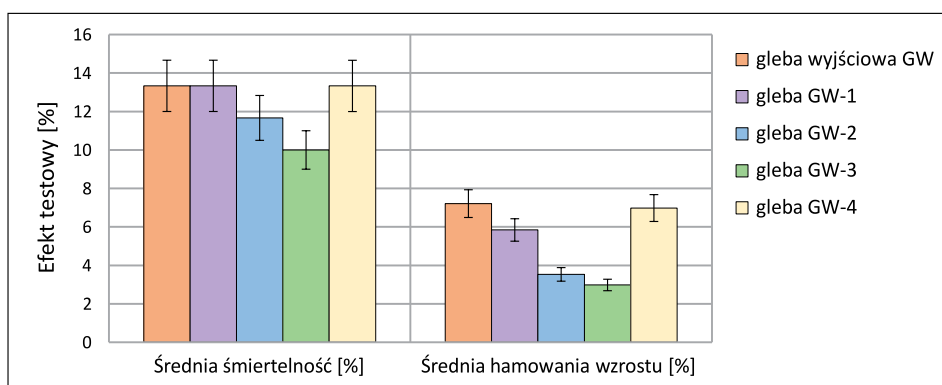
Rysunek 5. Zestawienie średniej długości korzeni bioindykatorów stosowanych w teście Phytotoxkit™ uzyskanych w badanych próbkach gleby

Figure 5. Summary of the average root length of the bioindicators used in the Phytotoxkit™ test obtained in the tested soil samples

Kolejnym testem, jaki przeprowadzono w celu zbadania skuteczności stosowanych zabiegów fitoremedacyjnych w badanych układach, był test Ostracodtoxkit F™. W teście toksyczności chronicznej z zastosowaniem *Heterocypris incongruens*

Wynikiem tego testu jest stopień toksyczności (TU), który w glebie wyjściowej (GW) wynosił 3,9. Zastosowanie fitoremediacji za pomocą *Glechoma hederacea* spowodowało nieznaczna poprawę jakości gleby, czego potwierdzeniem jest spadek wartości TU w glebie GW-1 do 2,9. Wykorzystanie fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją biopreparatem wpłynęło na obniżenie wartości współczynnika toksyczności gleby do poziomu 1,4. Sześciomiesięczny proces fitoremediacji wspomaganą inokulacją biopreparatem z dodatkiem γ -PGA

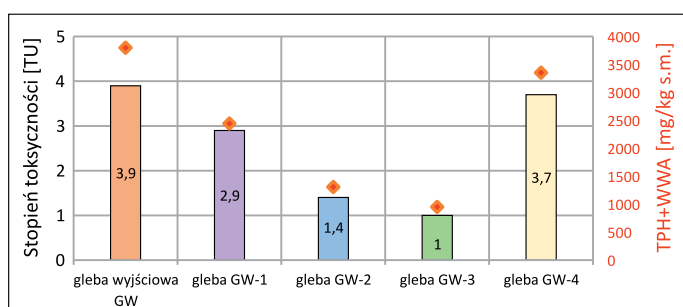
Wynikiem tego testu jest stopień toksyczności (TU), który w glebie wyjściowej (GW) wynosił 3,9. Zastosowanie fitoremediacji za pomocą *Glechoma hederacea* spowodowało nieznaczna poprawę jakości gleby, czego potwierdzeniem jest spadek wartości TU w glebie GW-1 do 2,9. Wykorzystanie fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją biopreparatem wpłynęło na obniżenie wartości współczynnika toksyczności gleby do poziomu 1,4. Sześciomiesięczny proces fitoremediacji wspomaganą inokulacją biopreparatem z dodatkiem γ -PGA



Rysunek 6. Wyniki testu Ostracodtoxkit F™ wykonanego na próbkach gleby wyjściowej, glebie po biodegradacji samoistnej oraz fitoremediacji z wykorzystaniem *Glechoma hederacea* jako fitoremedianta w układach 1–3

Figure 6. Results of Ostracodtoxkit F™ test performed on initial soil samples, soil after spontaneous biodegradation and phytoremediation using *Glechoma hederacea* as a phytoremediation plant in systems 1–3

pozwoili na spadek wartości współczynnika TU w glebie GW-3 do 1,00. Biodegradacja samoistna spowodowała natomiast spadek współczynnika toksyczności TU do 3,7. Zestawienie zmian wartości współczynnika TU w zależności od sposobu oczyszczania gleby oraz zmian stężenia TPH i WWA w glebie zamieszczono na rysunku 7.



Rysunek 7. Zestawienie wartości współczynnika TU w teście Microtox®SPT przeprowadzonym na próbkach gleby wyjściowej i po zakończeniu oczyszczania

Figure 7. Summary of TU coefficient values in the Microtox®SPT test conducted on baseline and post-treatment soil samples

Podsumowanie

1. Fitoremediacja jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych metod remediacji gruntów zanieczyszczonych węglowodarami ropopochodnymi. Zastosowanie technik wspomagających fitoremediację (np. poprzez bioaugmentację) pozwala na znaczne zwiększenie efektywności procesu oczyszczania gleb skażonych substancjami ropopochodnymi.
2. Przeprowadzone badania fitoremediacji wykazały, że sześciomiesięczny proces oczyszczania gleby wyjściowej z wykorzystaniem *Glechoma hederacea* spowodował obniżenie stężenia TPH i WWA o odpowiednio 35,52% i 27,66%.

3. Zastosowanie w procesie fitoremediacji roślin przystosowanych do wzrostu na obszarach skażonych ropą naftową (bluszcz kurdybanek) w połączeniu z inokulacją gleby biopreparatem lub biopreparatem z dodatkiem γ -PGA pozwala na znaczne zwiększenie efektywności biodegradacji TPH i WWA w glebie. W układzie 2 po sześciu miesiącach trwania eksperymentu odnotowano spadek stężenia TPH o 65,48% i WWA o 62,93%, natomiast w układzie 3 stopnie redukcji TPH i WWA wynosiły 74,90% i 73,85%.

4. Przeprowadzone badania biodegradacji samoistnej wykazały nieznaczny spadek stężenia TPH i WWA w glebie po zakończeniu eksperymentu, wynoszący odpowiednio 11,27% i 9,21%.
5. Wykonane analizy toksykologiczne z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ i Microtox®STP potwierdziły skuteczność prowadzonych zabiegów fitoremediacji oraz korelację pomiędzy stężeniem zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie a jej jakością.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Wykorzystanie roślin dziko rosnących na terenach skażonych ropą naftową do fitoremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi* – praca INiG – PIB; nr zlecenia: 0037/KE/2023, nr archiwalny: DK-4100-20/2023.

Literatura

- Afzal M., Yousaf S., Reichenauer T.G., Sessitsch A., 2012. The Inoculation Method Affects Colonization and Performance of Bacterial Inoculant Strains in the Phytoremediation of Soil Contaminated with Diesel Oil. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 35–47. DOI: 10.1080/15226514.2011.552928.
- Barathi S., Vasudevan N., 2001. Utilization of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from a Petroleum-Contaminated Soil. *Environment International*, 26: 413–416. DOI: 10.1016/S0160-4120(01)00021-6.
- Cheng L., Wang Y., Cai Z., Liu J., Yu B., Zhou Q., 2017. Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Saline-Alkali Soil by Wild Ornamental Iridaceae Species. *International Journal of Phytoremediation*, 19: 300–308. DOI: 10.1080/15226514.2016.1225282.
- Gałązka A., Gałązka R., 2015. Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Artificially Polluted Using Plant-Associated-Endophytic Bacteria and *Dactylis glomerata* as the Bioremediation Plant. *Polish Journal of Microbiology*, 64: 241–252. DOI: 10.5604/01.3001.0009.2119.
- Guirado M., Garcia-Delgado C., Pindado O., De La Torre B.O., Escolano O., Eymar E., Millán R., 2023. Bioremediation Study

- of a Hydrocarbon-Contaminated Soil by Profiling Aromatic and Aliphatic Chains. *Applied Soil Ecology*, 190: 104983. DOI: 10.1016/j.apsoil.2023.104983.
- 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.
- Koshlaf E., Ball A.S., 2017. Soil Bioremediation Approaches for Petroleum Hydrocarbon Polluted Environments. *AIMS Microbiology*, 3: 25–49. DOI: 10.3934/microbiol.2017.1.25.
- Kubińska N., 2020. Phytoremediation as an Approach to Clean up Contaminated Soil, Including Petroleum Product Contamination. *Nafta-Gaz*, 76(5): 322–339. DOI: 10.18668/NG.2020.05.05.
- Lin M.-S., Huang C.-Y., Lin Y.-C., Lin S.-L., Hsiao Y.-H., Tu P.-C., Cheng P.-C., Cheng S.-F., 2022. Green Remediation Technology for Total Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Agronomy*, 12: 2759. DOI: 10.3390/agronomy12112759.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., 2010. Bioaugmentation as a Strategy for Cleaning up of Soils Contaminated with Aromatic Compounds. *Microbiological Research*, 165: 363–375. DOI: 10.1016/j.micres.2009.08.001.
- Nwankwegu A.S., Orji M.U., Onwosi C.O., 2016. Studies on Organic and In-Organic Biostimulants in Bioremediation of Diesel-Contaminated Arable Soil. *Chemosphere*, 162: 148–156. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.074.
- Ptaszek N., Pacwa-Płociniczak M., Noszczyńska M., Płociniczak T., 2020. Comparative Study on Multiway Enhanced Bio- and Phytoremediation of Aged Petroleum-Contaminated Soil. *Agronomy*, 10: 947. DOI: 10.3390/agronomy10070947.
- Shehzadi M., Afzal M., Khan M.U., Islam E., Mobin A., Anwar S., Khan Q.M., 2014. Enhanced Degradation of Textile Effluent in Constructed Wetland System Using Typha Domingensis and Textile Effluent-Degrading Endophytic Bacteria. *Water Research*, 58: 152–159. DOI: 10.1016/j.watres.2014.03.064.
- Simmer R.A., Schnoor J.L., 2022. Phytoremediation, Bioaugmentation, and the Plant Microbiome. *Environmental Science Technology*, 56: 16602–16610. DOI: 10.1021/acs.est.2c05970.
- Steliga T., Wojtowicz K., Kapusta P., Brzeszcz J., 2020. Assessment of Biodegradation Efficiency of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Soil Using Three Individual Bacterial Strains and Their Mixed Culture. *Molecules*, 25: 709. DOI: 10.3390/molecules25030709.
- Sui X., Wang X., Li Y., Ji H., 2021. Remediation of Petroleum-Contaminated Soils with Microbial and Microbial Combined Methods: Advances, Mechanisms, and Challenges. *Sustainability*, 13: 9267. DOI: 10.3390/su13169267.
- Varjani S.J., 2017. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223: 277–286. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Weyens N., Lelie D. van der, Taghavi S., Newman L., Vangronsveld J., 2009. Exploiting Plant–Microbe Partnerships to Improve Biomass Production and Remediation. *Trends in Biotechnology*, 27: 591–598. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.07.006.
- 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., 2023. Zastosowanie *Lotus corniculatus* w badaniach biodegradacji TPH i WWA wspomaganą fitoremediacją. *Nafta-Gaz*, 79(7): 443–454. DOI: 10.18668/NG.2023.07.01.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., 2023a. Evaluation of the Effectiveness of Bioaugmentation-Assisted Phytoremediation of Soils Contaminated with Petroleum Hydrocarbons Using *Echinacea purpurea*. *Applied Sciences*, 13: 13077. DOI: 10.3390/app132413077.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., 2023b. Oil-Contaminated Soil Remediation with Biodegradation by Autochthonous Microorganisms and Phytoremediation by Maize (*Zea mays*). *Molecules*, 28: 6104. DOI: 10.3390/molecules28166104.
- Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., Skalski T., 2022a. Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer γ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil. *Materials*, 15: 400. DOI: 10.3390/ma15020400.
- Wojtowicz K., Steliga T., Skalski T., 2022b. Badania laboratoryjne wpływu dodatku γ -PGA na efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych. *Nafta-Gaz*, 78(9): 668–678. DOI: 10.18668/NG.2022.09.04.
- Wu M., Li W., Dick W.A., Ye X., Chen K., Kost D., Chen L., 2017. Bioremediation of Hydrocarbon Degradation in a Petroleum-Contaminated Soil and Microbial Population and Activity Determination. *Chemosphere*, 169: 124–130. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.059.



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



Dr Piotr JAKUBOWICZ
Adiunkt w Zakładzie Technologii Eksploatacji
Płynów Złożowych
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Lubicz 25 A
31-503 Kraków
E-mail: piotr.jakubowicz@inig.pl