

MINERALOGICAL SCIENCES COMMITTEE OF THE POLISH ACADEMY OF SCIENCES

FACULTY OF GEOLOGY UNIVERSITY OF WARSAW

am *monograph no. 3*

*Bioaktywacja
procesów
geochemicznych*

*w warunkach beztlenowych
w środowiskach glebowych
zanieczyszczonych ropą naftową*

Dorota Wolicka

*Edited by
Andrzej Kozłowski*

WARSZAWA 2011

**Biostymulacja procesów
geochemicznych
w warunkach beztlenowych
w środowiskach glebowych
zanieczyszczonych ropą naftową**

**Biostimulation
of geochemical processes
under anoxic conditions in soil
contaminated by crude oil**

ISBN 978-83-932617-8-9

This book should be quoted as:
AM Monograph No. 3

Publication from this book is available as the *pdf file from:
www.geo.uw.edu.pl/AM/M03/index.htm

The editorial shape of this book is copyrighted by:
© Faculty of Geology, University of Warsaw, 2011
© Committee of Mineralogical Sciences of the Polish Academy of Sciences, 2011

Editor:
Andrzej Kozłowski, Institute of Geochemistry, Mineralogy and Petrology, Faculty
of Geology, University of Warsaw, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa,
Poland; e-mail: a.j.kozlowski@uw.edu.pl

Committee of Mineralogical Sciences of the Polish Academy of Sciences
Faculty of Geology, University of Warsaw

**Biostymulacja procesów
geochemicznych
w warunkach beztlenowych
w środowiskach glebowych
zanieczyszczonych ropą naftową**

Dorota Wolicka

Archivum Mineralogiae Monograph No. 3

Editor
Andrzej Kozłowski

Warszawa 2011

Recenzenci
Hanka Boszczyk-Maleszak
Dariusz Dobrzyński

Redakcja
Barbara Nowak

Korekta
Maria Wojciechowska

Redakcja techniczna
Zofia Kosińska

Redaktor prowadzący
Małgorzata Yamazaki

Skład i łamanie
Dariusz Górski

Publikacja dofinansowana przez Wydział Geologii i Rektora Uniwersytetu Warszawskiego

© Copyright by Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego 2011

ISBN 978-83-235-2895-1 (PDF)

Wydanie I

Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego
00-497 Warszawa, ul. Nowy Świat 4
<http://www.wuw.pl>; e-mail: wuw@uw.edu.pl
Dział Handlowy: tel (0 48 22) 55 31 333
e-mail: dz.handlowy@uw.edu.pl
Księgarnia internetowa: <http://www.wuw.pl/ksiegarnia>

Pamięci

*Profesora Włodzimierza W. Kowalskiego,
Promotora mojej pracy doktorskiej
i mojego Mentora na zawitych ścieżkach geologii,
tę pracę poświęcam*

Składam szczególne podziękowania

*Profesorowi Andrzejowi Kozłowskiemu za utwierdzenie mnie
w słuszności wybranej problematyki badawczej
i duchowe wsparcie podczas realizacji
długotrwałych prac badawczych*

*Dyrektorowi Waldemarowi Wójcikowi
z Polskiego Górnictwa Naftowego i Gazownictwa
za życzliwe zainteresowanie prowadzonymi przeze mnie
badaniami i umożliwienie dostępu
do materiałów badawczych z terenu podkarpackich
kopalni ropy naftowej i gazu ziemnego*

*Bardzo dziękuję wszystkim Pracownikom Wydziału Geologii
Uniwersytetu Warszawskiego
za okazaną mi pomoc i dyskusję podczas
realizowanych przeze mnie badań.
Znalazło to swój udział w zakresie i kształcie
prezentowanej pracy*

SPIS TREŚCI

Wprowadzenie	11
Naturalne i antropogeniczne zanieczyszczenia przypowierzchniowych warstw litosfery	11
Udział mikroorganizmów w procesach geochemicznych w przypowierzchniowych warstwach litosfery	12
Charakter i zakres zanieczyszczeń środowiska ropą naftową i produktami ropopochodnymi oraz rola mikroorganizmów w ich biodegradacji	13
Istota i skala problemu	13
Udział bakterii redukujących siarczany w biodegradacji ropy naftowej i związków ropopochodnych	15
Sulfidogenne mikroorganizmy beztlenowe – historyczny zarys badań	19
Cel i zakres pracy	21
Metody badań	23
Obszar badań	23
Zróżnicowanie skał podłoża	23
Charakterystyka wytypowanych złóż ropy naftowej i gazu ziemnego	25
Charakterystyka gleb na badanym terenie	28
Charakterystyka pobranego materiału badawczego	32
Procedury badań eksperymentalnych	33
Analiza gruntu	33
Selekcja i izolacja sulfidogennych zespołów mikroorganizmów	33
Podłoża hodowlane	34
Oznaczenia	34
Oznaczenia ilościowe ogólnej liczby bakterii i grzybów	34
Oznaczenia chemiczne w hodowlach stacjonarnych	35
Analizy osadów pohodowlanych	36
Obserwacje mikroskopowe	37
Analiza molekularna wyselekcjonowanych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów	37
Algorytm postępowania w eksperymencie badawczym dotyczącym powstawania faz mineralnych <i>in situ</i> w glebach skażonych produktami ropopochodnymi	37

Charakterystyka badanych gruntów	39
Charakterystyka mineralogiczna i fizykochemiczna badanych próbek	39
Charakterystyka mikrobiologiczna badanych próbek	47
Dyskusja	49
Mikrobiologiczne badania eksperymentalne	51
Charakterystyka autochtonicznych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów wyizolowanych z gruntów skażonych ropą naftową i związkami ropopochodnymi	51
Analiza molekularna wyizolowanych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów	55
Dyskusja	64
Minerałotwórcze aspekty metabolizmu mikroorganizmów . . .	68
Ocena mineralogiczna produktów biotransformacji w hodowlach stacjonarnych wyselekcjonowanych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów	68
Udział wyselekcjonowanych zespołów bakterii redukujących siarczany w biotransformacji związków cynku, miedzi i żelaza	69
Teoretyczna analiza możliwych reakcji biogeochemicznych w badanych układach eksperymentalnych	81
Dyskusja	83
Analiza mikroskopowa biogenicznych faz mineralnych w gruntach skażonych produktami ropopochodnymi w warunkach <i>in situ</i>	95
Wnioski i podsumowanie	108
Literatura	112

Biostimulation of geochemical processes under anoxic condition in soil contaminated by crude oil

Dorota Wolicka

Abstract: The presented study was focused on determining the conditions and processes of the formation of mineral phases in anaerobic conditions within soils polluted by crude oil and oil-derived products. Sulphidogenic assemblages of microorganisms were isolated from soils from selected areas of crude oil mines in south-eastern Poland. The results of the experiments indicate that one of the most important microorganism groups responsible for the biodegradation of compounds posing hazard to the environment in anaerobic conditions are sulphate reducing bacteria (SRB). The obtained data indicate that in most anaerobic cultures, averagely 50% SRB took part in the biodegradation of monocyclic aromatic hydrocarbons and diesel fuel applied as the sole carbon source, at a simultaneous reduction of sulphates by about 1800 mg/L. The presence of assemblages of sulphidogenous microorganisms confirmed in soils polluted by crude oil and oil-derived products results in the formation of various mineral phases as the products of their metabolism.

The formation of mineral phases in anaerobic conditions in the presence of oil-derived products and sulphides as the final electron acceptors is not restricted only to the products of transformations such as sulphates and carbonates, depending on direct SRB activity. In some conditions SRB activity may lead to the formation of other mineral phases such as elemental sulphur or mineral compounds containing iron (II), such as vivianite. The presence of high concentrations of heavy metals in the environment, mainly copper, may cause the formation of biogenic mineral phases such as covellite.

The results obtained during the experiments may be the base of introducing a method of effective bioremediation of areas polluted by crude oil and oil-derived products in conditions of periodical or continuous anoxia in the environment. They may be applied in the microbiological revitalization of areas degraded by the oil industry and distribution of oil-derived products.

Key words: environments contamination, petroleum, anaerobic processes, sulphate reduction, microorganisms, biogenic minerals.

WPROWADZENIE

Naturalne i antropogeniczne zanieczyszczenia przypowierzchniowych warstw litosfery

Przypowierzchniowa część litosfery i sama powierzchnia Ziemi obejmują zróżnicowane środowiska geologiczne, które są miejscem ciągłych, dynamicznych przeobrażeń tworzących je skał. Naturalne procesy wietrzenia minerałów i skał prowadzą do redystrybucji składników chemicznych i wytworzenia faz mineralnych pozostających w równowadze fizykochemicznej z warunkami otaczającego środowiska. W wyniku tych procesów powstają specyficzne dla określonych warunków środowiskowych paragenezy mineralne i typy litologiczne.

Większe odchylenia od przeciętnych zawartości pewnych składników chemicznych następują w przypadku wietrzenia koncentracji złożowych, zwłaszcza minerałów kruszcowych. Zatem terminem zanieczyszczeń można by określić tylko te anomalne zawartości składników chemicznych, które negatywnie oddziałują na biosferę (metale ciężkie i radioaktywne, siarka, arsen i inne). Zmiany właściwości chemicznych środowiska następują stopniowo, zatem selekcja i adaptacja zasiedlających je mikroorganizmów do lokalnych warunków środowiska najczęściej zachodzi jednocześnie.

Intensywne przekształcanie środowiska naturalnego, związane z gospodarczym wykorzystaniem jego elementów oraz składowaniem niewykorzystanych odpadów aktywnych chemicznie w ilościach przekraczających możliwości przyswojenia i neutralizacji w procesach naturalnych, może stanowić zagrożenie dla lokalnych ekosystemów i całej biosfery. Szczególnie niebezpieczne są ropa naftowa i produkty ropopochodne (Włostowska, 1993; Łebkowska i in., 1997; Boszczyk-Maleszak i in., 2006).

Kiedy nie jest możliwe naturalne samooczyszczenie środowiska, konieczne jest podjęcie świadomych i celowych przeciwdziałań chroniących środowisko przed szkodliwymi zanieczyszczeniami, a w przypadku terenów skażonych również neutralizacji i likwidacji zanieczyszczeń, i tym samym prowadzących do rewitalizacji tych terenów.

Problem skażenia przypowierzchniowych środowisk geologicznych ropą naftową i produktami ropopochodnymi jest ciągle nierozwiązany, zarówno w kraju, jak i za granicą. Wpływa na to m.in. powszechność stosowania tych związków oraz możliwość szybkiego ich rozprzestrzeniania się w środowisku. Głównymi źródłami zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi są: instalacje wydobywcze węglowodorów, rafinerie przerabiające ropę naftową, urządzenia do dystrybucji i magazynowania paliw, środki transportu surowców ropopochodnych, warsztaty naprawcze taboru samochodowo-kolejowego, lotniska, wycieki ropy, awarie podczas eksploatacji, a także nielegalne odwierty (Wolicka, 2008a).