

MIKROBIOLOGICZNE ASPEKTY BIOLOGICZNEGO OCZYSZCZANIA ŚCIEKÓW Z PROCESU PODZIEMNEGO ZGAZOWANIA WĘGLA – UCGWATER+

mgr Łukasz Jałowiecki,
Instytut Ekologii Terenów Przemysłowych
lic. Mikołaj Glaser,
Uniwersytet Śląski w Katowicach



ZESPÓŁ MIKROBIOLOGII BIORĄCY UDZIAŁ W PROJEKCIE

GRAŻYNA PŁAZA

ŁUKASZ JAŁOWIECKI

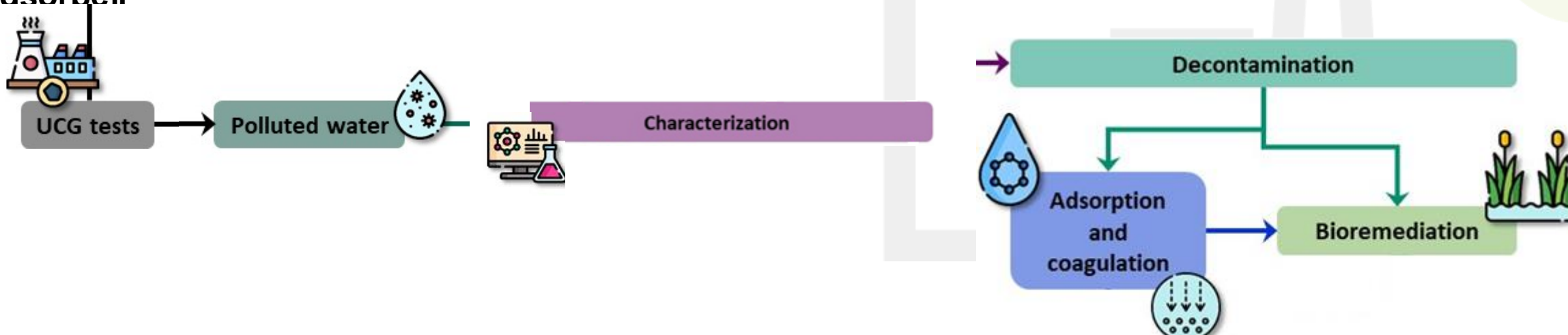
JACEK BORGULAT

MIKOŁAJ GLASER

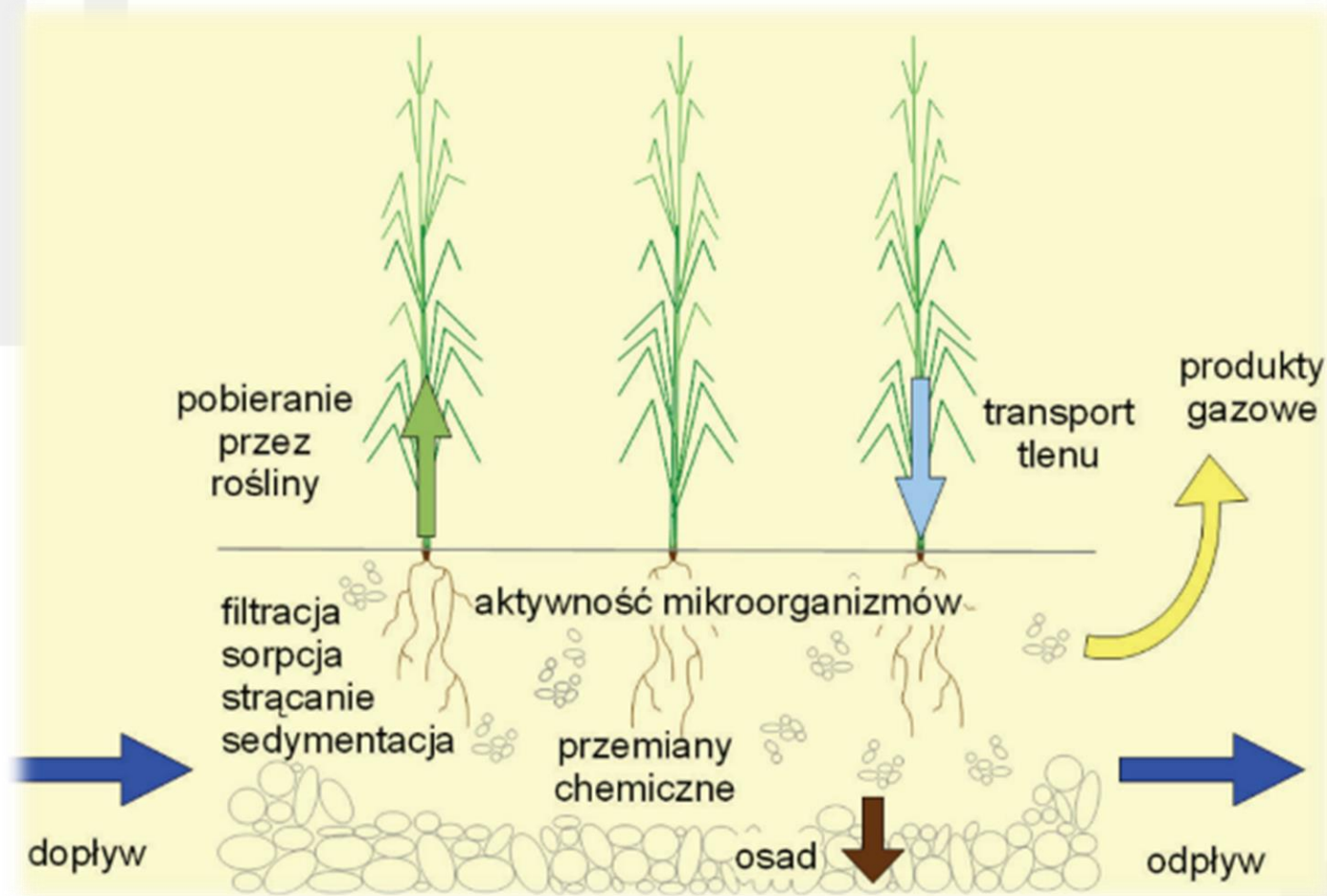
Partnerzy UCGWATERplus współpracują nad szeregiem różnych zadań, aby przyczynić się do realizacji 8 pakietów roboczych, w których projekt jest zorganizowany.



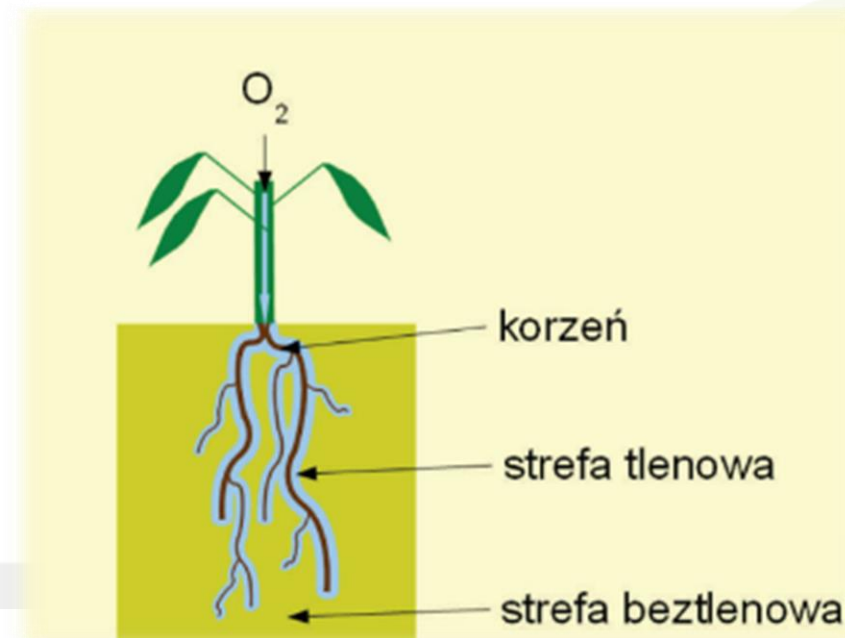
WP6. Dekontaminacja wód UCG poprzez bioremediację i połączone metody bioremediacji i adsorpcji



HYDROFITOWE OCZYSZCZALNIE ŚCIEKÓW - WETLANDY



Główną rolę w biologicznym oczyszczaniu odgrywają mikroorganizmy. Rośliny zaś dostarczają im tlenu i zapewniają odpowiednie warunki do życia



Hydrofitowe oczyszczalnie

ścieków:

1) O przepływie

podpowierzchniowym:

a) pionowym

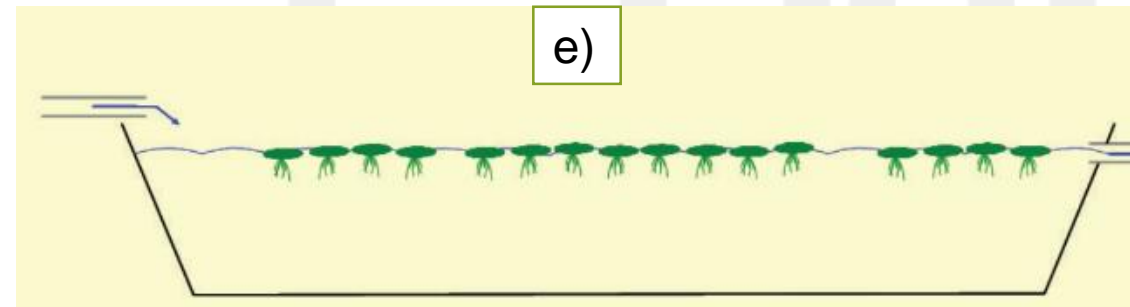
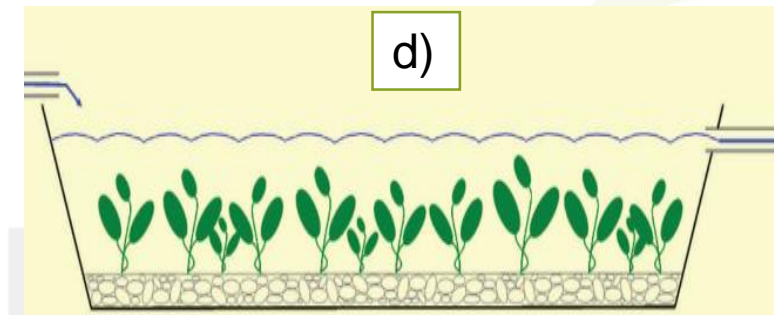
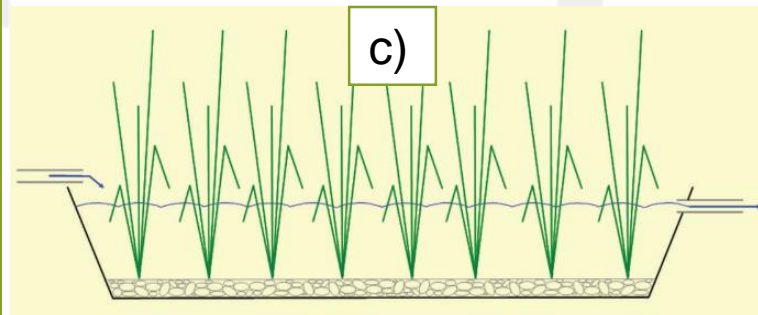
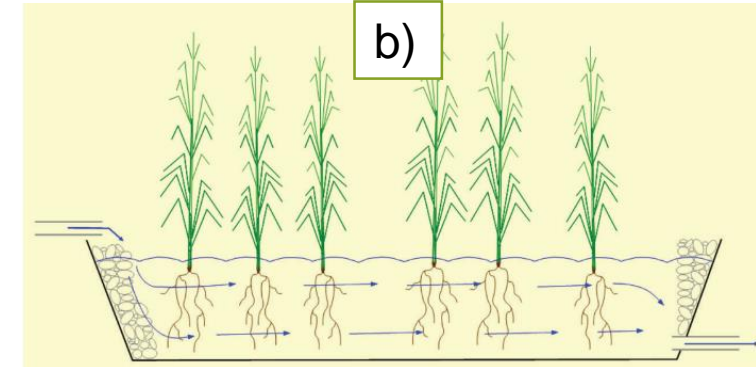
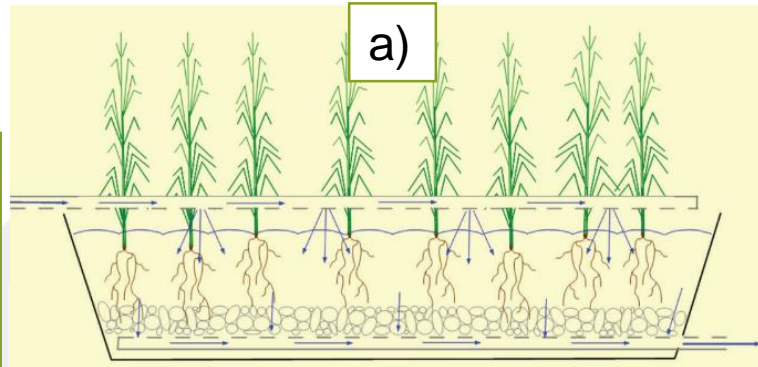
b) poziomym

2) O przepływie powierzchniowym:

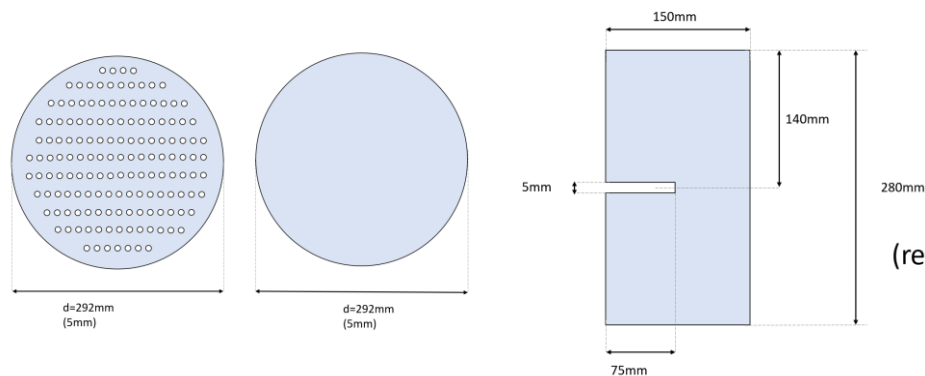
c) z roślinnością wynurzoną

d) z roślinnością zanurzoną

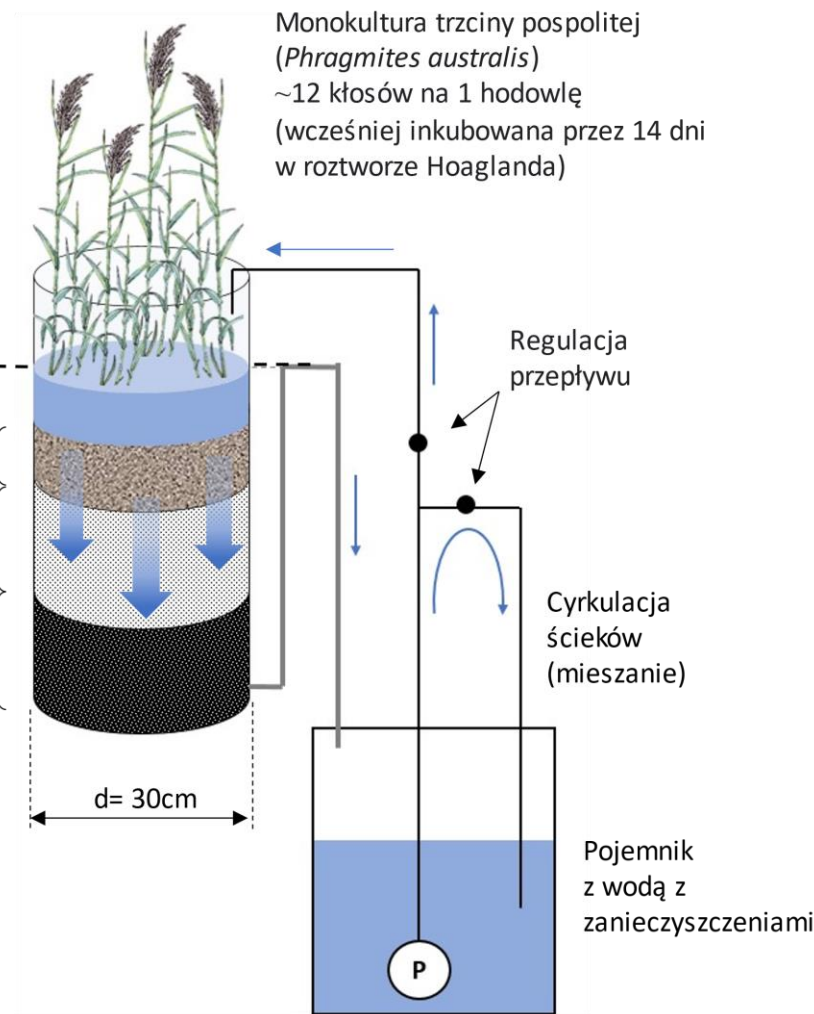
e) z roślinnością pływającą



BUDOWA BIOLOGICZNEJ OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW

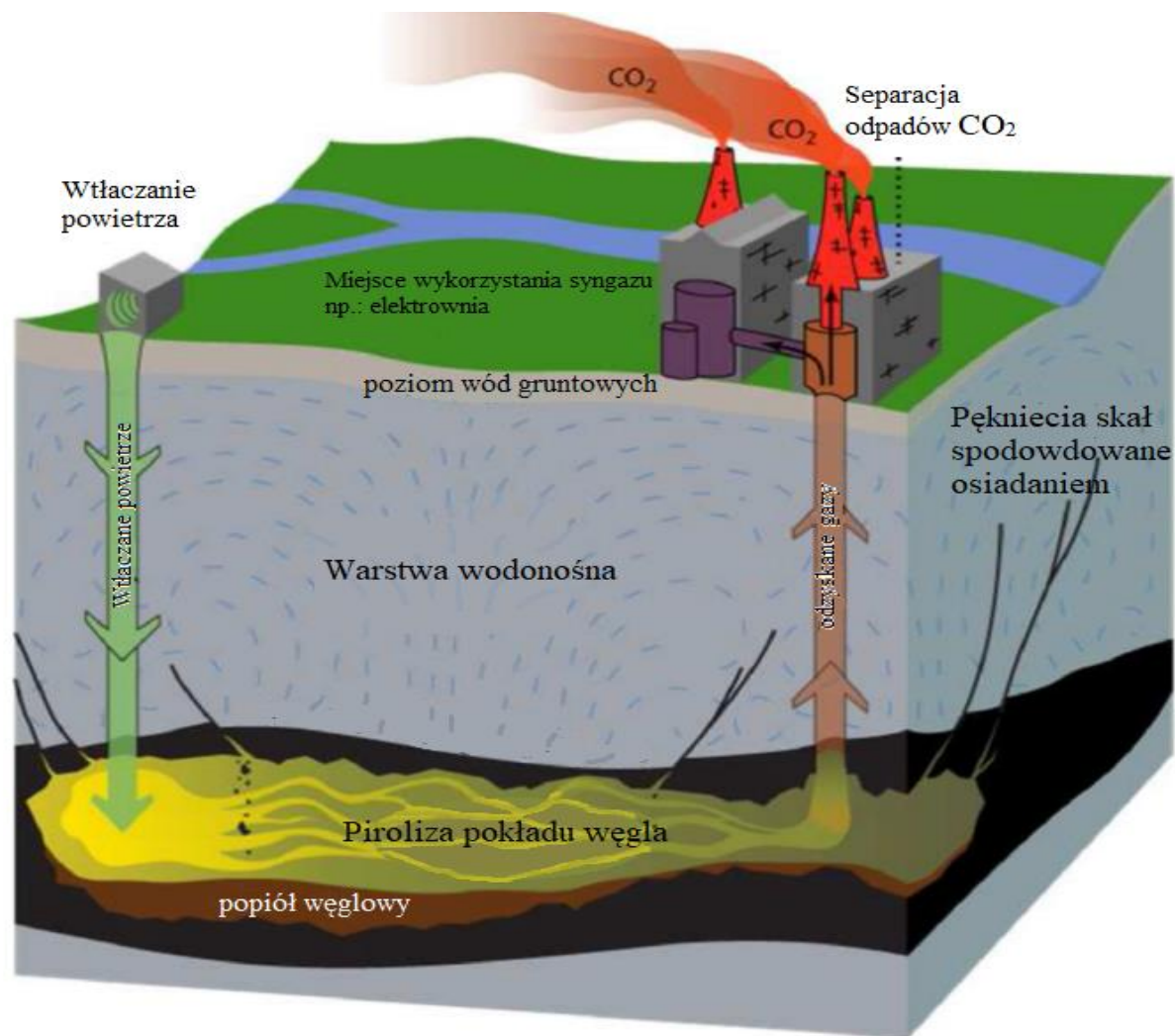


Staty poziom ścieków
(regulacja przez położenie
węża spustowego)



Parametry kolumny	Wartości
średnica	0.30 m
wysokość	0.80 m
Powierzchnia kolumny	633.5 cm ²
warstwy	
(1) kompost	0.10 m
(2) piasek <1.0 mm	0.10 m
(3) frakcja żwiru 5.0- 8.0cm	0.20 m
(4) frakcja żwiru 3.0- 5.0cm	0.20 m
objętość	38 dm ³
Pojemność wodna	11.3 dm ³
Pojemność magazynowania wody w złożu	0.8 dm ³
Średni przepływ przez kolumnę (Q) ^b	5.65 dm ³ d ⁻¹
Obciążenie hydrauliczne	30 cm d ⁻¹
Czas retencji hydraulicznej (HRT)	2 day

PODZIEMNE ZGAZOWANIE WĘGLA (PZW)



Ścieki powstałe podczas podziemnego zgazowania węgla są źródłem takich zanieczyszczeń jak:

- Fenole
- WWA
- BTEX
- Metale ciężkie
- Amoniak
- Cyjanki

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

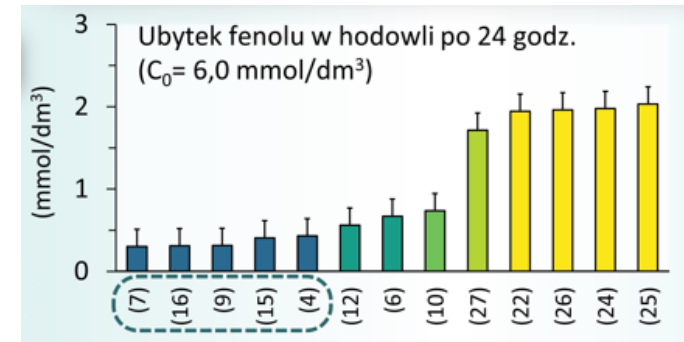
Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

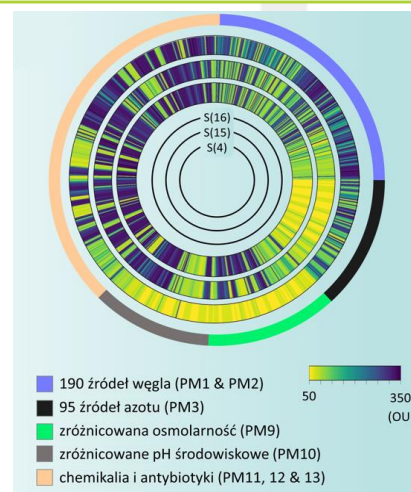
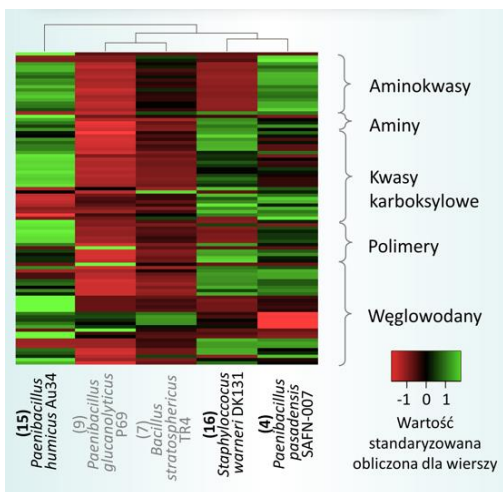
3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang. Phenotype MicroArrays*)

Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415



Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji Blood agar	0	0	0	0	0
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	+	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinyazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-



POBÓR PRÓBEK WÓD PO PROCESIE ZGAZOWANIA WĘGLA



Próbki wody zostały pobrane z powierzchniowego reaktora ciśnieniowego w kopalni doświadczalnej Barbara w Mikołowie

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

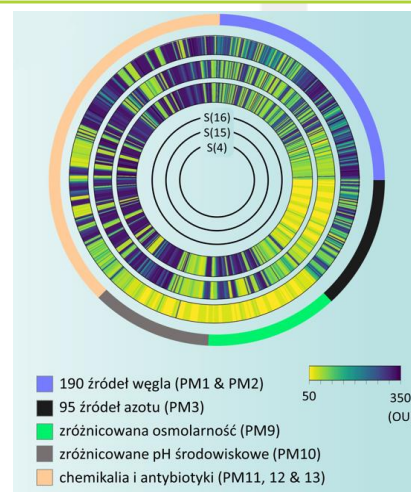
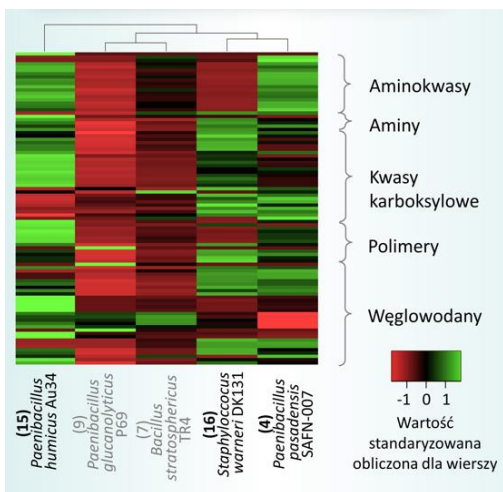
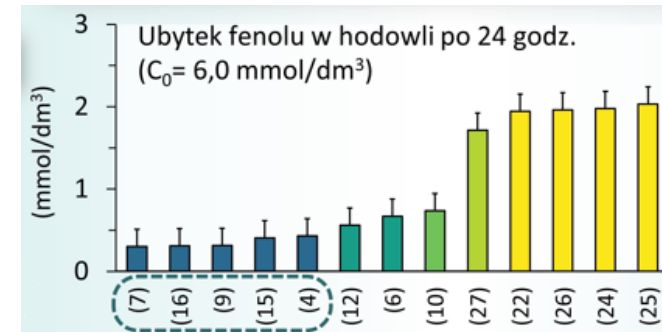
Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang.* *Phenotype MicroArrays*)

Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415

Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji Blood agar	0	0	0	0	0
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	+	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-



POSIEWY NA PODŁOŻU STAŁYM (SMA)

Z próbek wody wykonano posiewy na podłożu stałym SMA (*ang. Standard Methods Agar*)



PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

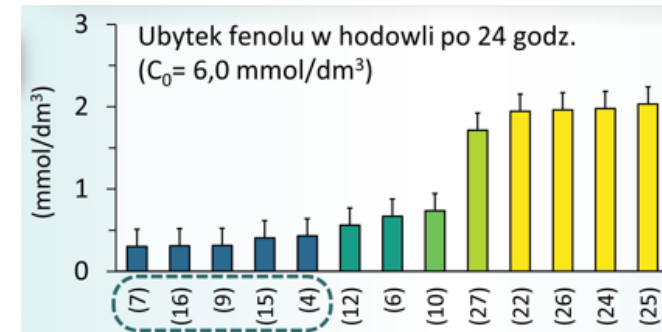
Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

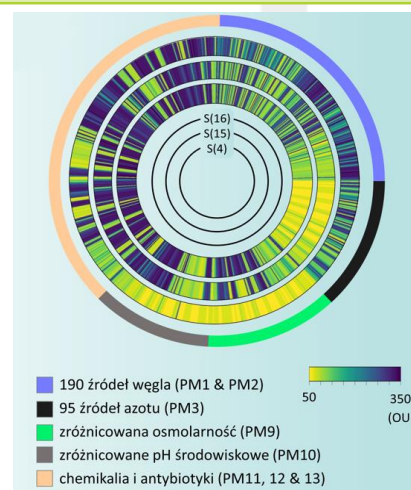
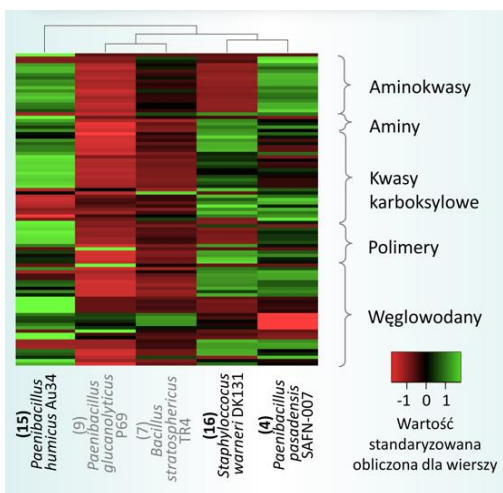
3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang. Phenotype MicroArrays*)

Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415



Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji Blood agar	0	0	0	0	0
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	+	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-



IZOLACJA SZCZEPÓW

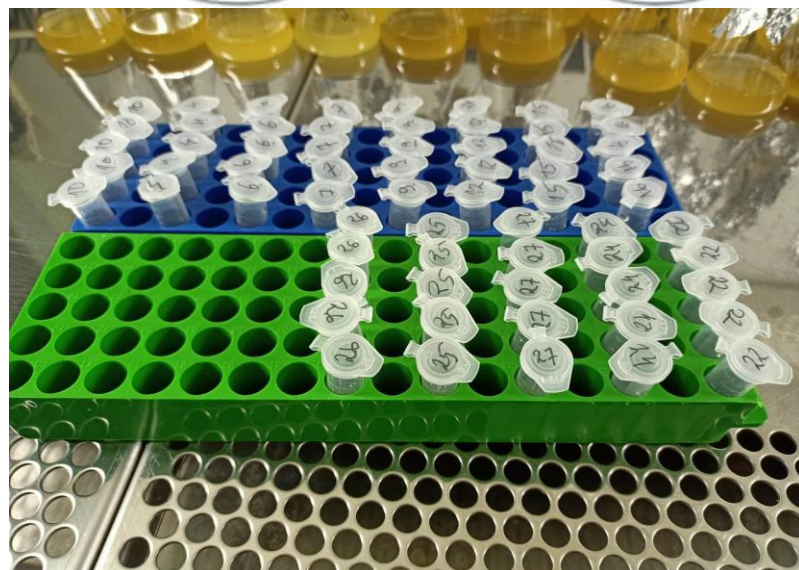
Metoda posiewu redukcyjnego



Uzyskanie czystych kultur



Bankowanie
wyzolowanych
szczepów



Pasaż czystych kultur do płynnej pożywki Luria-Bretani



PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

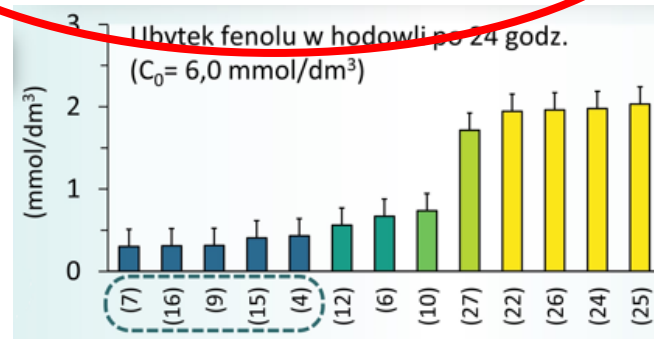
Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

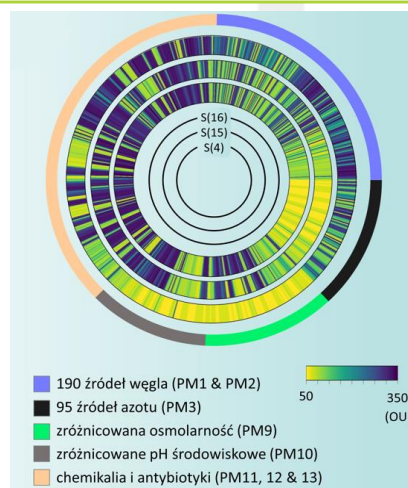
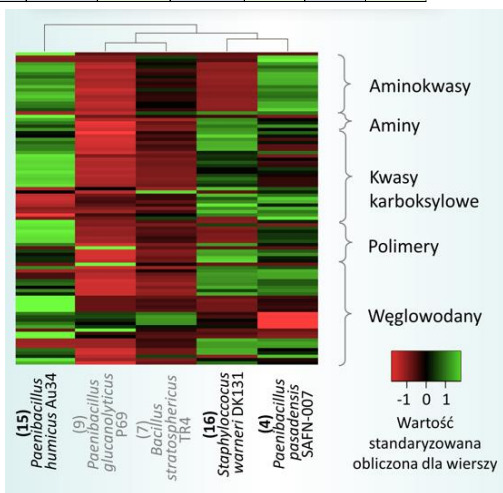
3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang. Phenotype MicroArrays*)

Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

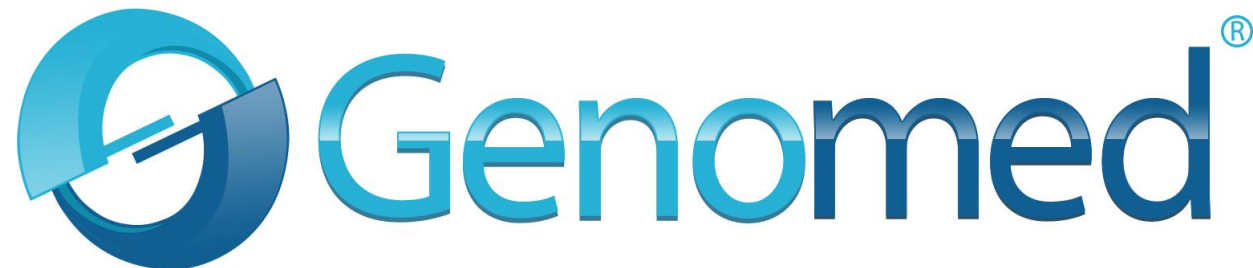
Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415



Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphaericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0
Blood agar	-	-	-	-	-
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-



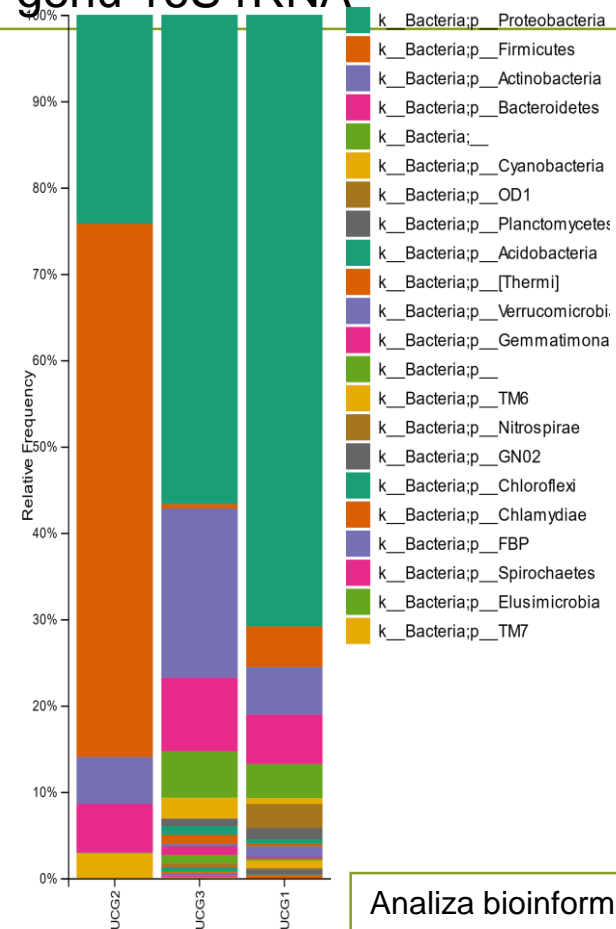
W celu identyfikacji szczepów przeanalizowano sekwencje 16S rRNA badanych szczepów. Do dalszych badań wybrano 13 dominujących szczepów



- (4) *Paenibacillus pasadensis* SAFN-007
- (6) *Paenibacillus humicus* sp29
- (7) *Bacillus stratosphericus* TR4
- (9) *Paenibacillus glucanolyticus* P69
- (10) *Bacillus altitudinis* VMFR49
- (12) *Bacillus nealsoni* LE3
- (15) *Paenibacillus humicus* Au34
- (16) *Staphylococcus warneri* DK131
- (22) *Oceanobacillus picturae* B5
- (25) *Paenibacillus cineris* BB
- (26) *Bacillus pseudomycooides* S2015-2C
- (27) *Paenibacillus cellulositrophicus* KACC-1657

BIORÓŻNORODNOŚĆ WÓD Z PROCESU PODZIEMNEGO ZGAZOWANIA WĘGLA

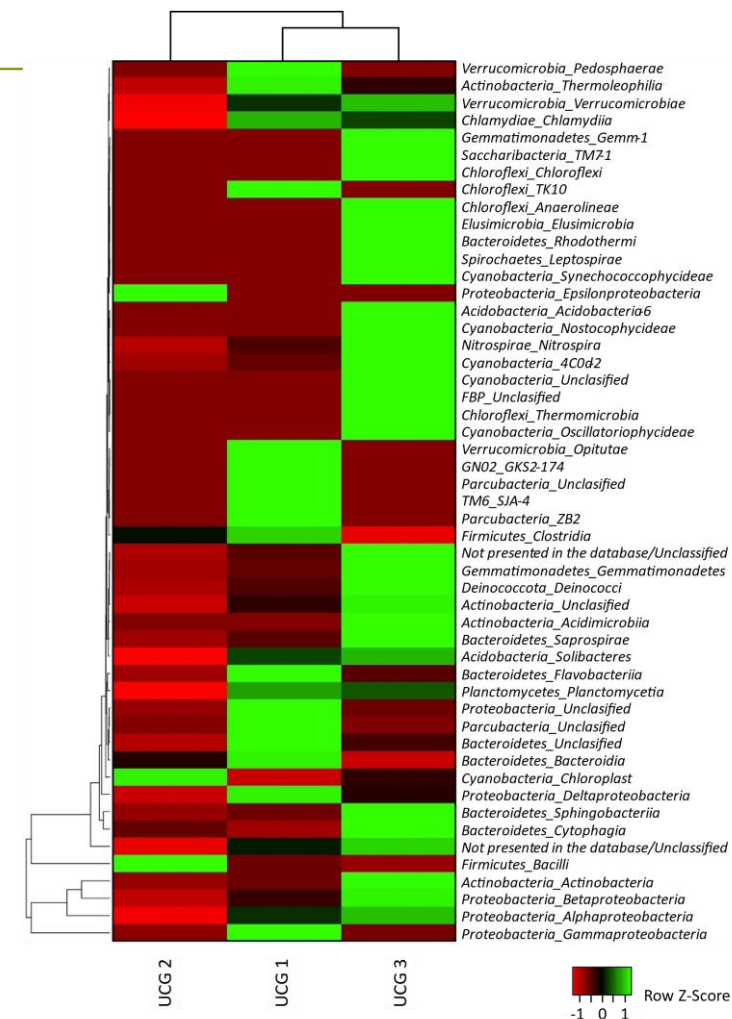
Izolacji metagenomowego (metDNA) DNA przeprowadzona wykorzystując komercyjne zestawy (Power Water kit MoBio, UK) i analiza metagenomiczna populacji bakterii i archeonów przeprowadzona na bazie regionu V3-V4 genu 16S rRNA



ID	Simpson index	Shannon index
UCG1	0,97	4,44
UCG2	0,80	2.50
UCG3	0,95	4.49



Analiza bioinformatyczna zapewniająca klasyfikację odczytów do poziomu gatunku przeprowadzono pakietem oprogramowania QIIME 2



PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

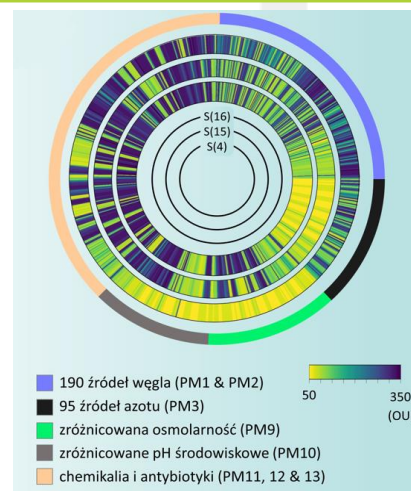
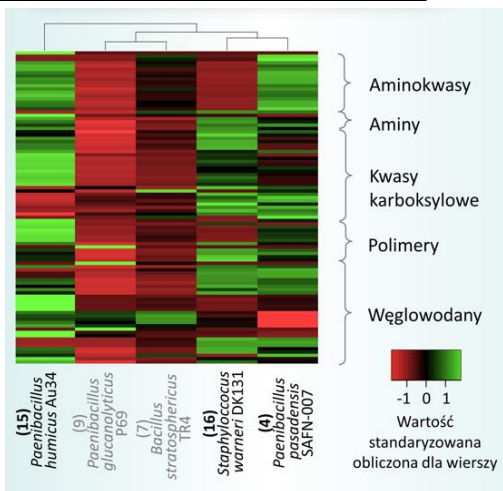
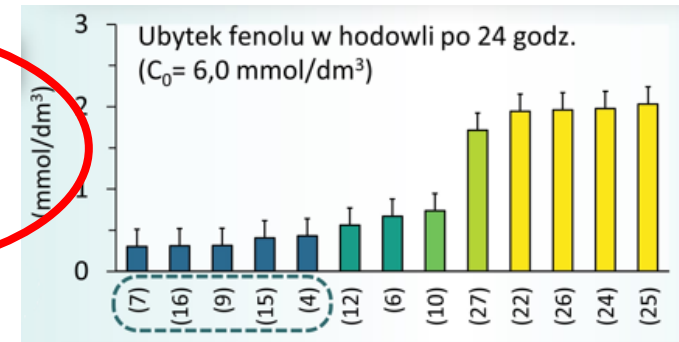
Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang. Phenotype MicroArrays*)

Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415

Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphaericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0
Blood agar	-	-	-	-	-
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-

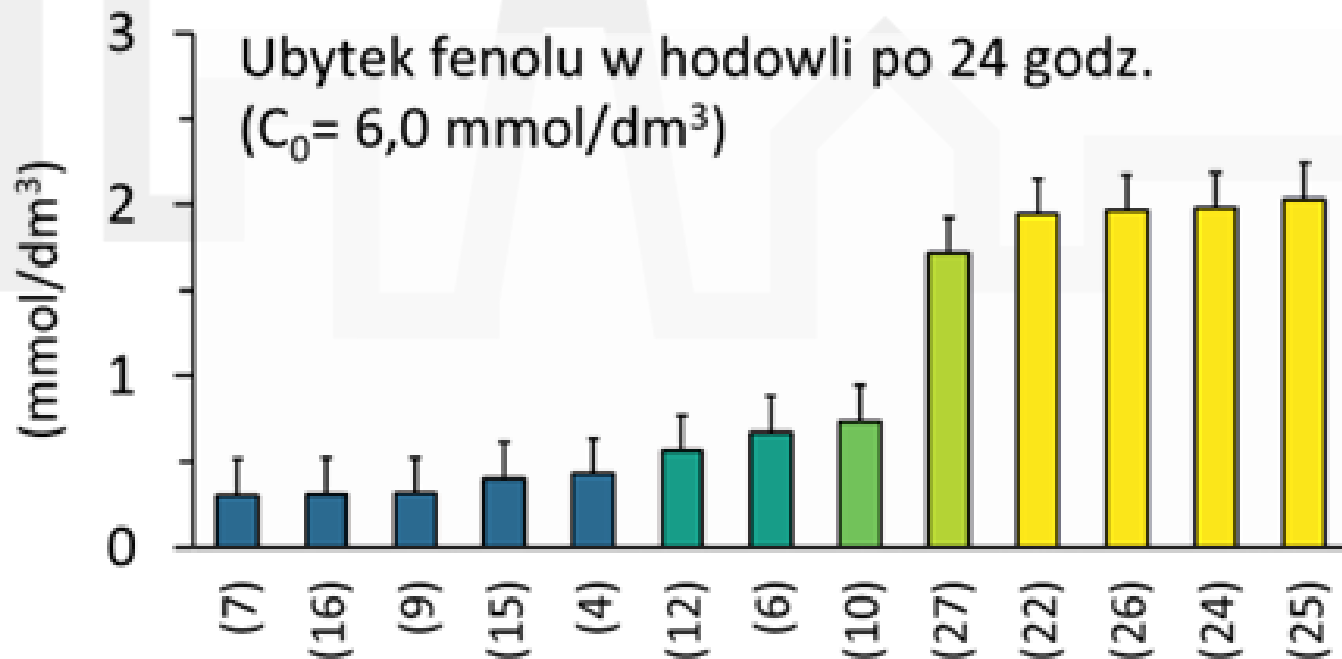




Warunki hodowli:

- temperatura 30°C
- ciągłe mieszanie 100 obr/min
- Początkowe stężenie fenolu – 6 mmol/dm³

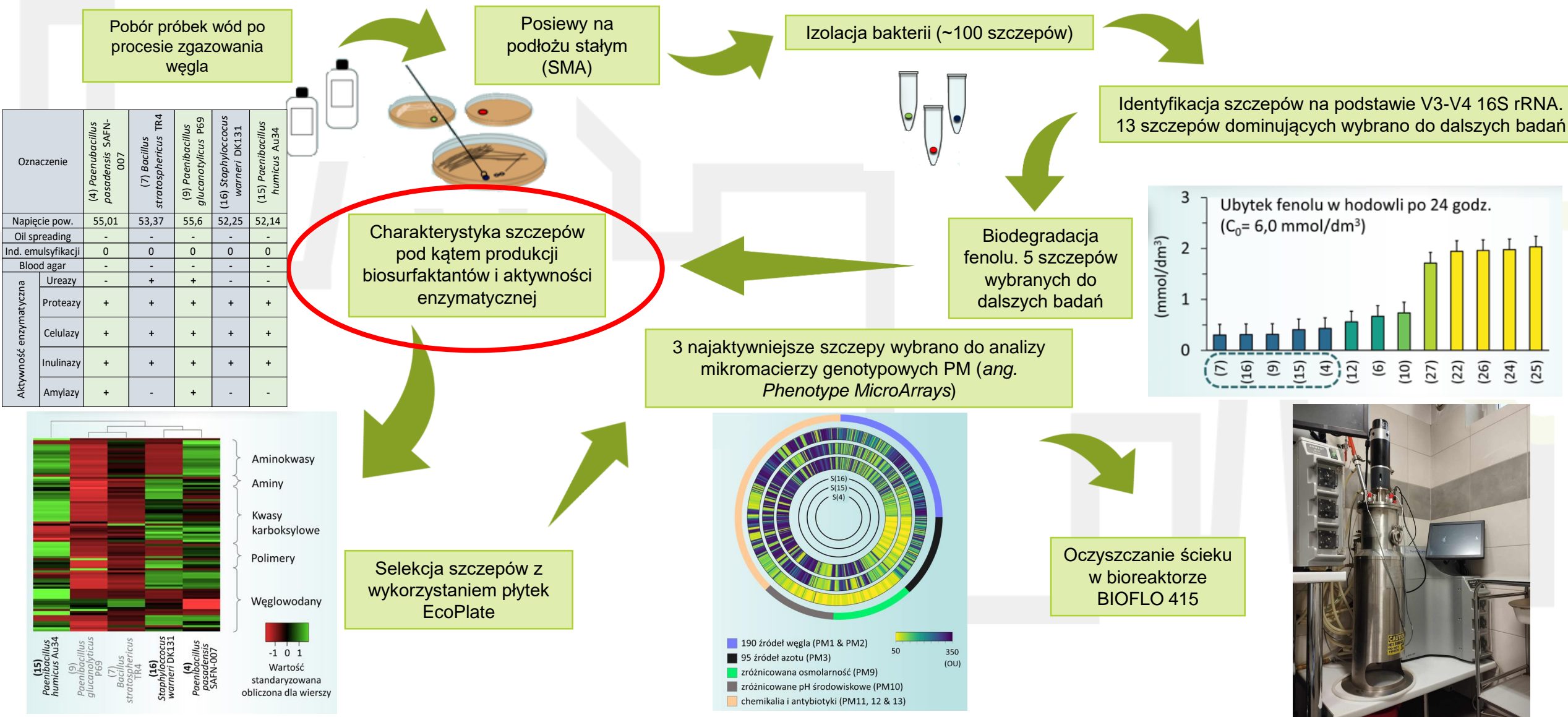
Ubytek fenolu w hodowli po 24 godz.
($C_0 = 6,0 \text{ mmol/dm}^3$)



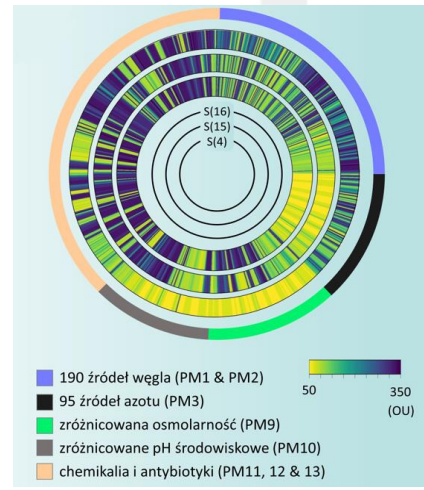
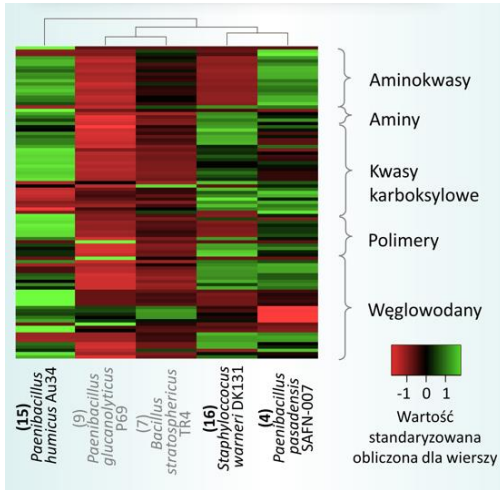
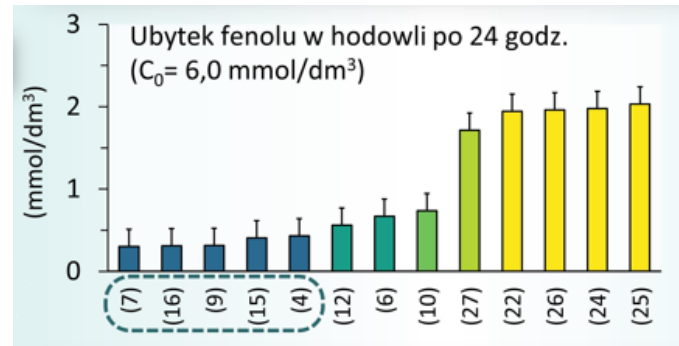
Do dalszych badań wybrano szczepy:

- (4) *Paenibacillus pasadensis* SAFN-007
- (7) *Bacillus stratosphericus* TR4
- (9) *Paenibacillus glucanolyticus* P69
- (15) *Paenibacillus humicus* Au34
- (16) *Staphylococcus warneri* DK131

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ



Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphaericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0
Blood agar	-	-	-	-	-
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-

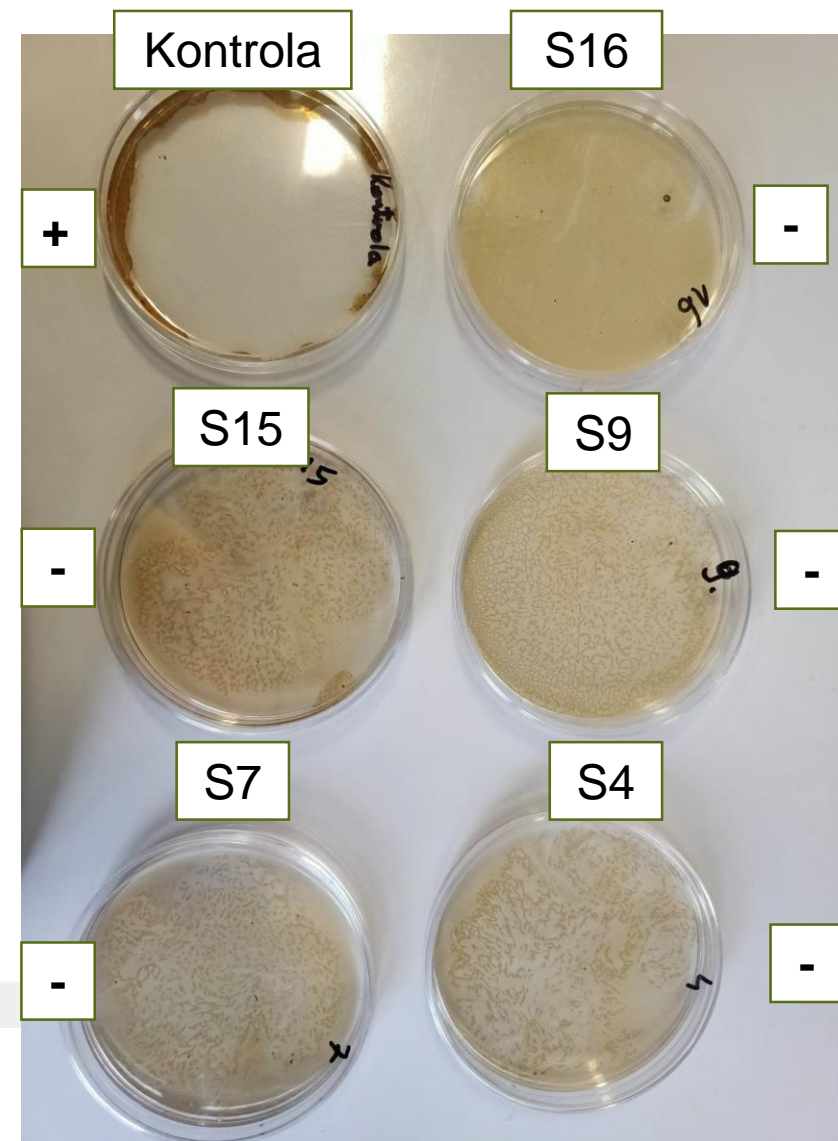
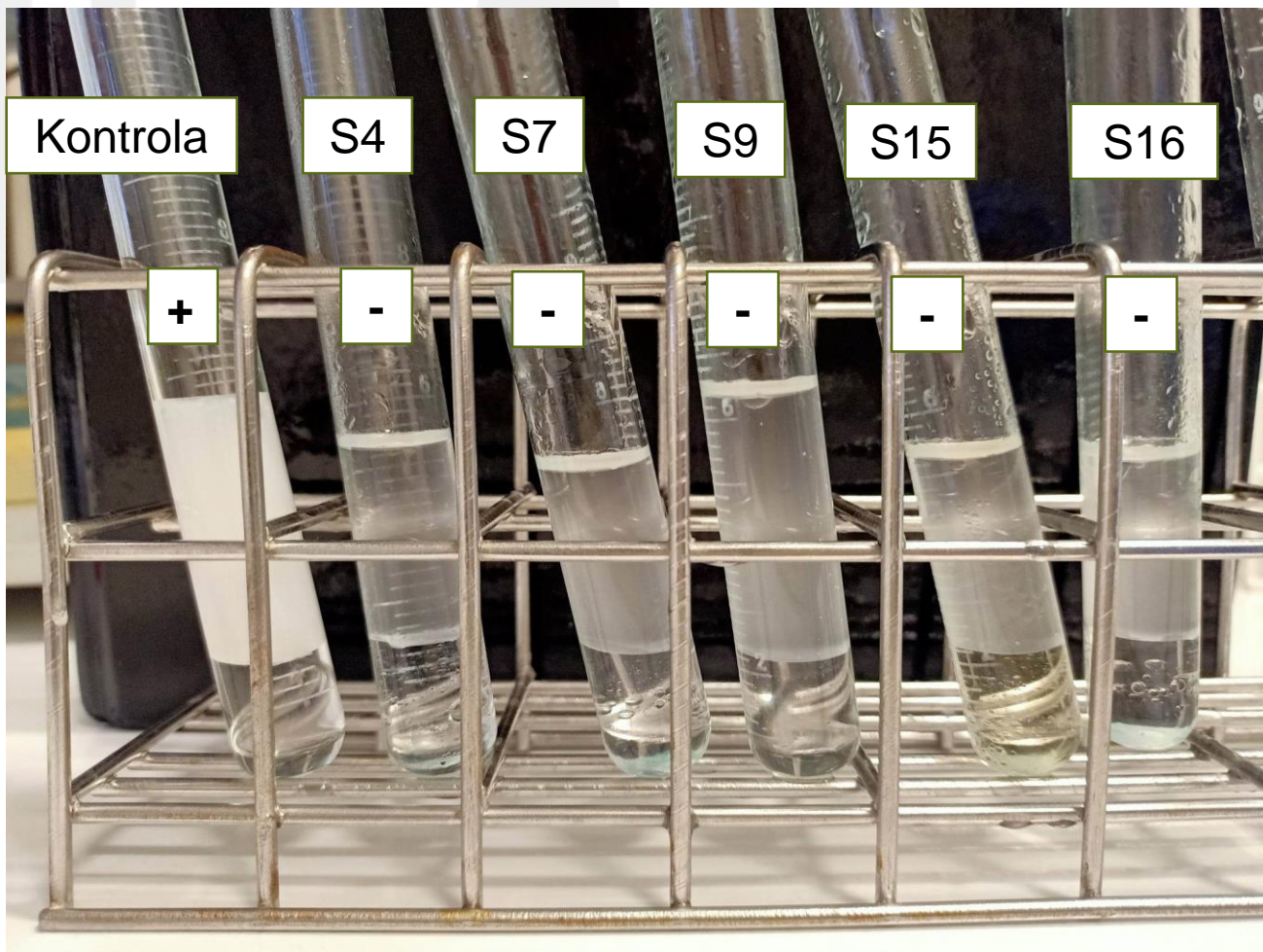


Zdolność szczepów do produkcji biosurfaktantów zbadano poprzez:

- a) Metody bezpośrednie – pomiar napięcia powierzchniowego
- b) Metody pośrednie – Blood agar test, Oil-spreading test, wyznaczenie indeksu emulsyfikacji

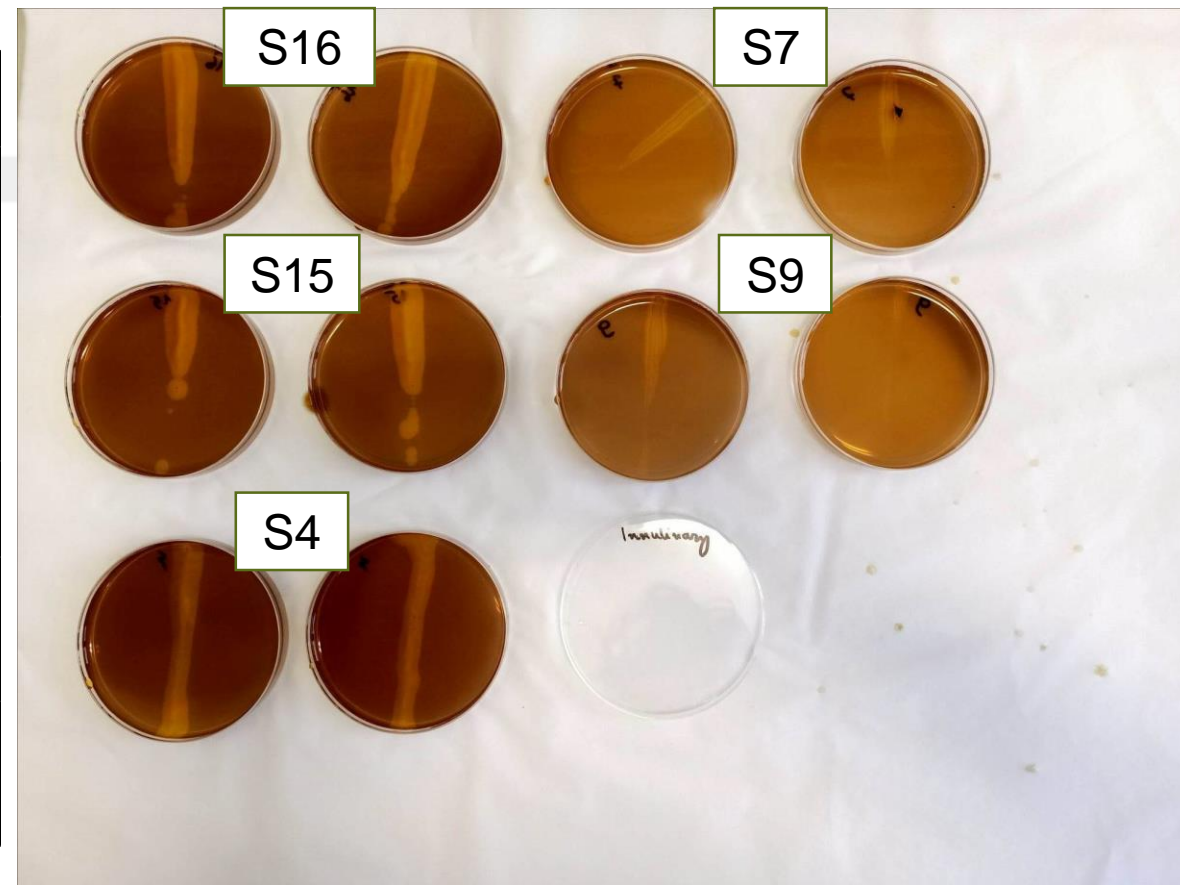


CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW POD KĄTEM PRODUKCJI BIOSURFAKTANTÓW I AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ



CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW POD KĄTEM PRODUKCJI BIOSURFAKTANTÓW I AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

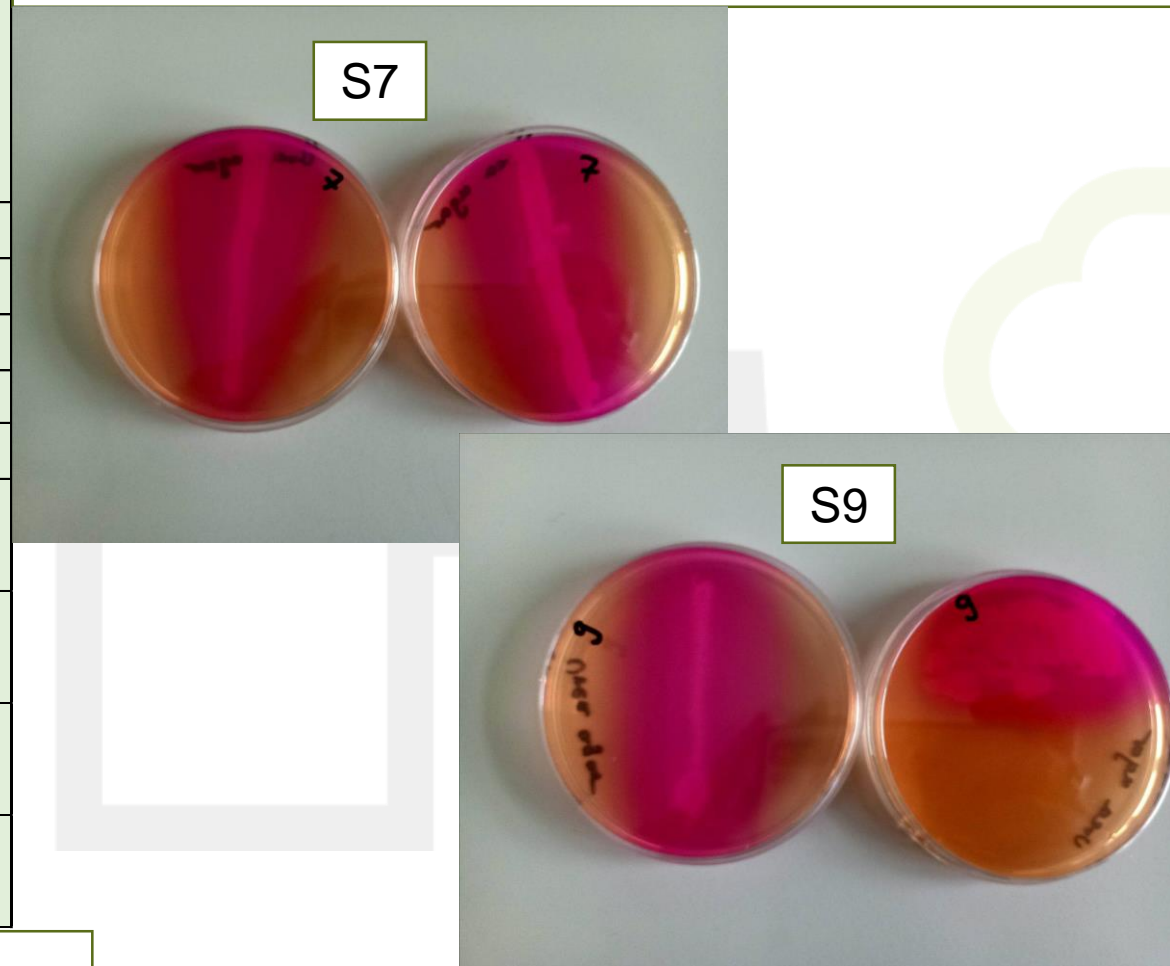
Podłoże, czas inkubacji, temperatura inkubacji	Aktywność enzymatyczna	Wynik pozytywny wskazujący na zdolność do produkcji danego enzymu
Urea Agar Base (UAB), 48h, 30°C	Ureazy	Zmiana zabarwienia podłoża z jasnożółtego na fioletowy
Agar odżywczy ze skrobią, 48h, 30°C	Amylazy	Strefa przejaśnienia wokół wyrosłych kolonii po zalaniu podłoża 1% płynem Lugola
Agar mleczny, 48h, 30°C	Proteazy	Strefa przejaśnienia wokół wyrosłych kolonii
Agar z karboksymetylocelulozą (CMC), 48h, 30°C	Celulazy	Strefa żółtego zabarwienia wokół kolonii po zalaniu podłoża 1% płynem Lugola
Pożywka MHI, 3-5 dni, 30°C	Inulinazy	Strefa przejaśnienia wokół wyrosłych kolonii po zalaniu podłoża 1% płynem Lugola



CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW POD KĄTEM PRODUKCJI BIOSURFAKTANTÓW I AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Oznaczenie	(4) <i>Paenubacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34	
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14	
Oil spreading	-	-	-	-	-	
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0	
Blood agar	-	-	-	-	-	
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-	-

Wszystkie badane szczepy produkują proteazy, celulazy oraz amylazy. Dodatkowo szczep nr 7 i nr 9 produkują ureazy, a szczepy nr 4 i nr 9 amylazy



Napięcie powierzchniowe kontroli (H₂O) – 56,7 (mN/m)

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

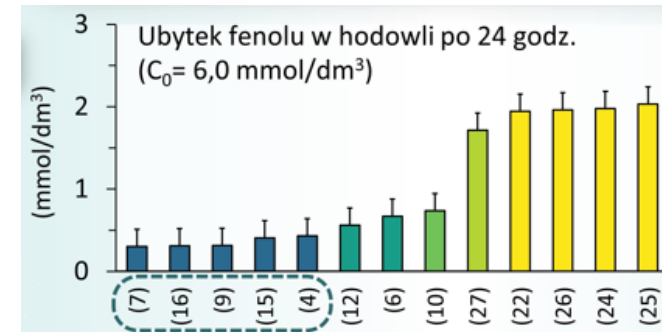
Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang. Phenotype MicroArrays*)

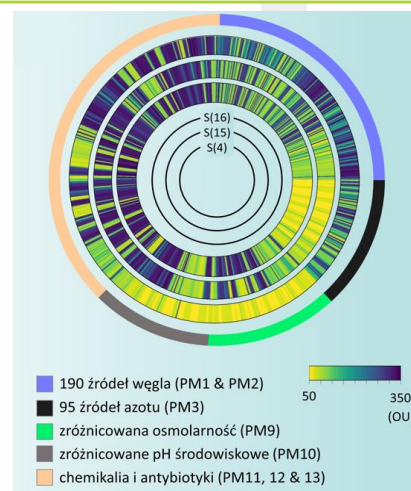
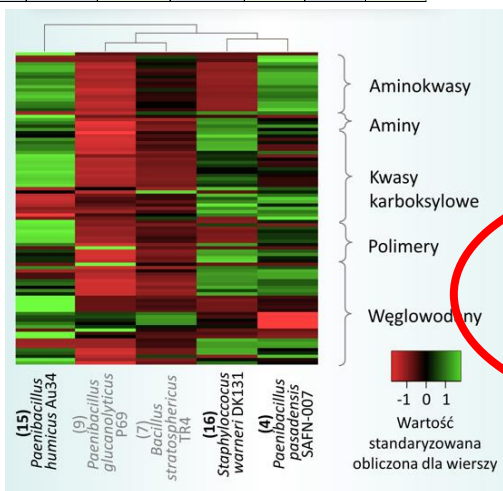


Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

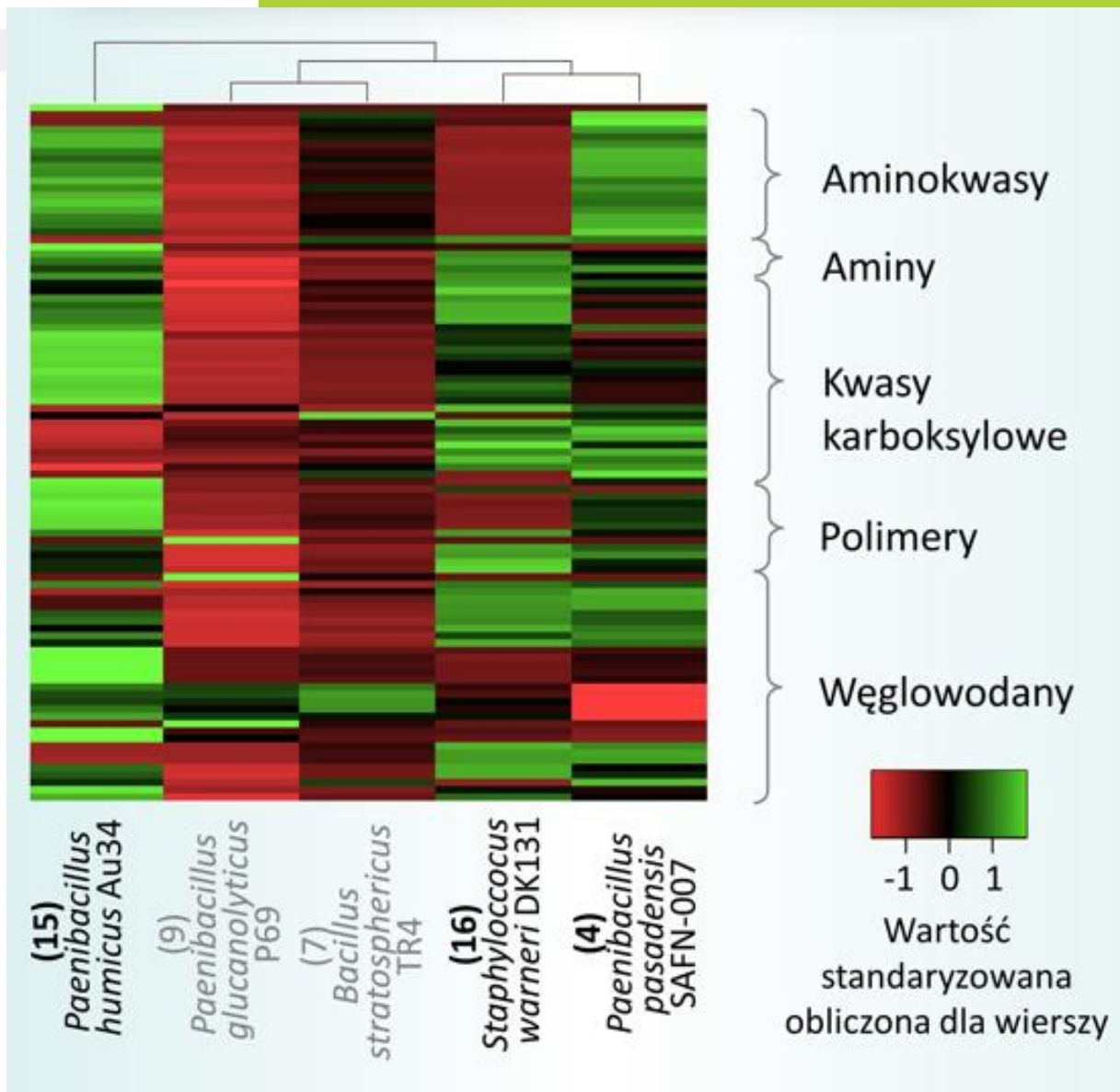
Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415



Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadenis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphaericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0
Blood agar	-	-	-	-	-
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-

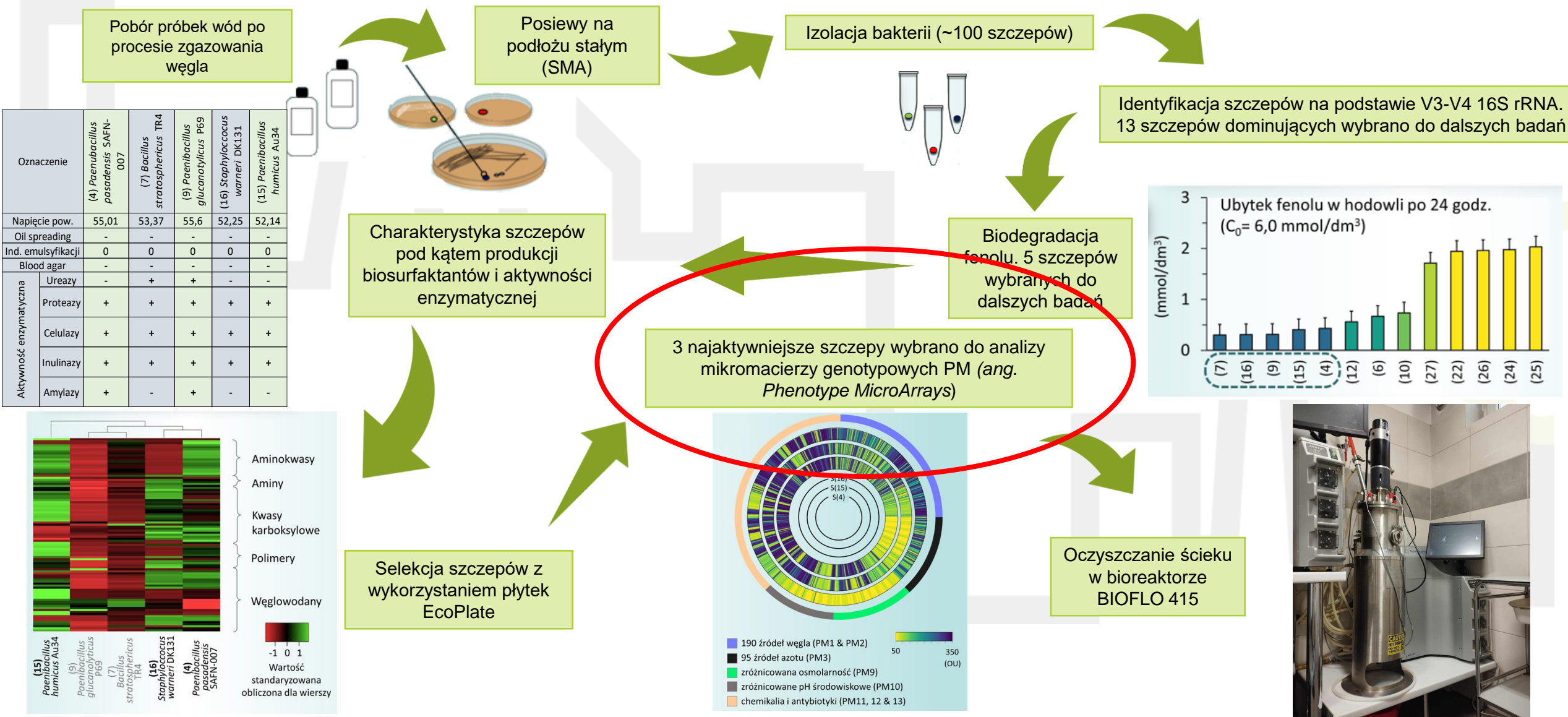


SELEKCJA SZCZEPÓW Z WYKORZYSTANIEM PŁYTEK ECOPLATE

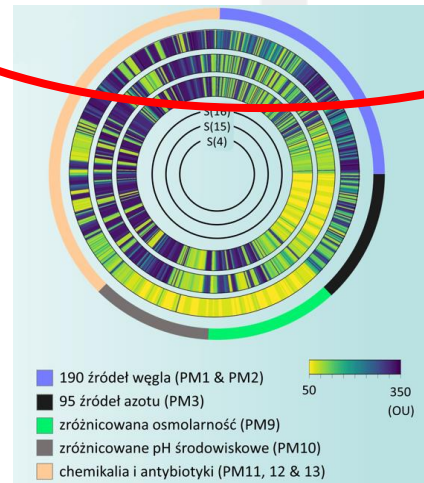
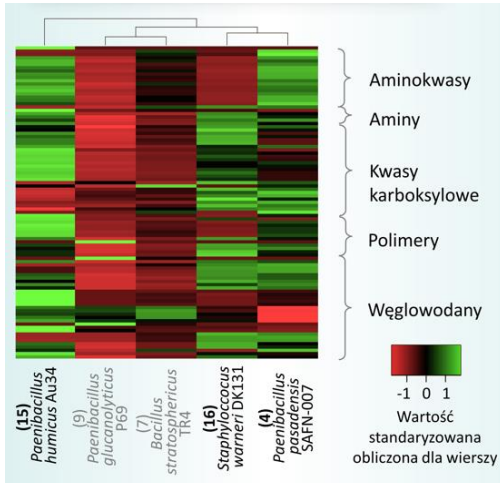
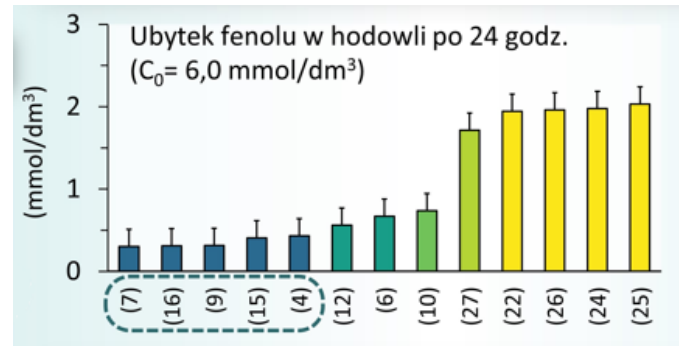


3 najaktywniejsze szczepy:
Paenibacillus humicus Au34, *P. pasadensis* SAFN-007 oraz
Staphylococcus warneri DK131
 zostały wybrane do kolejnych badań

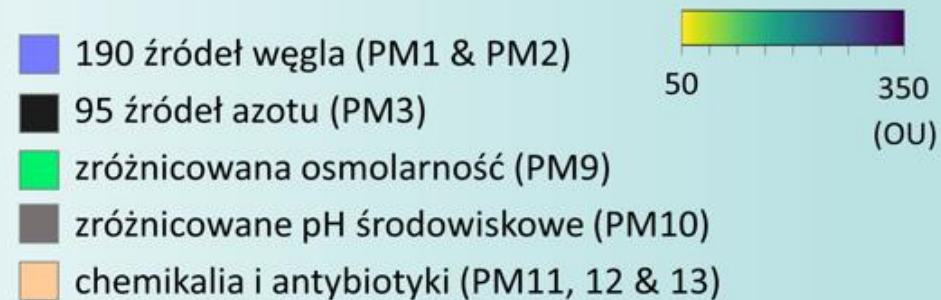
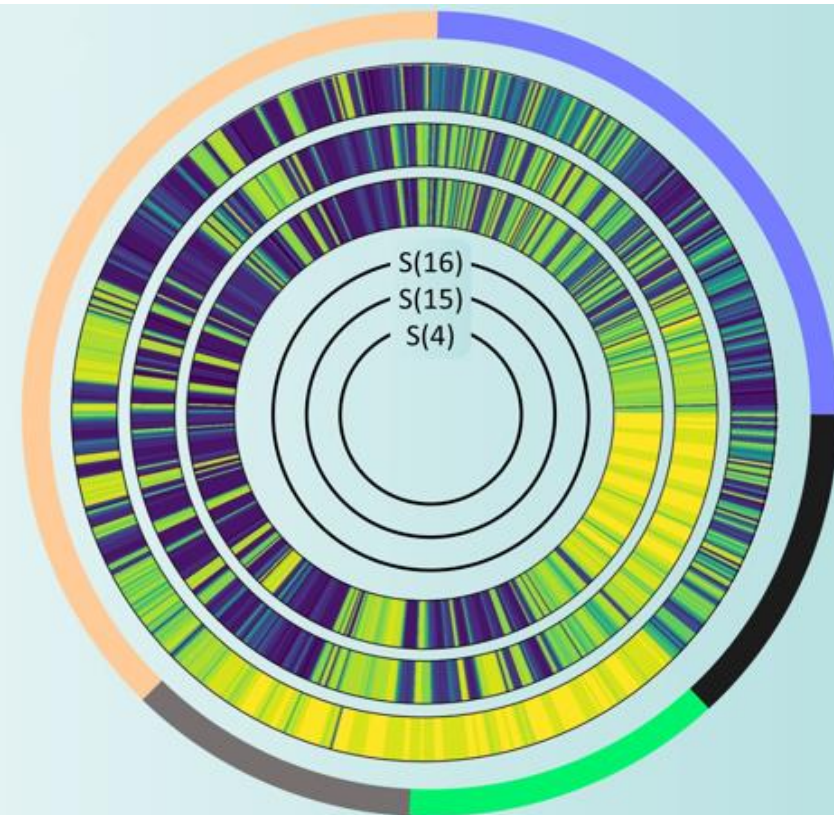
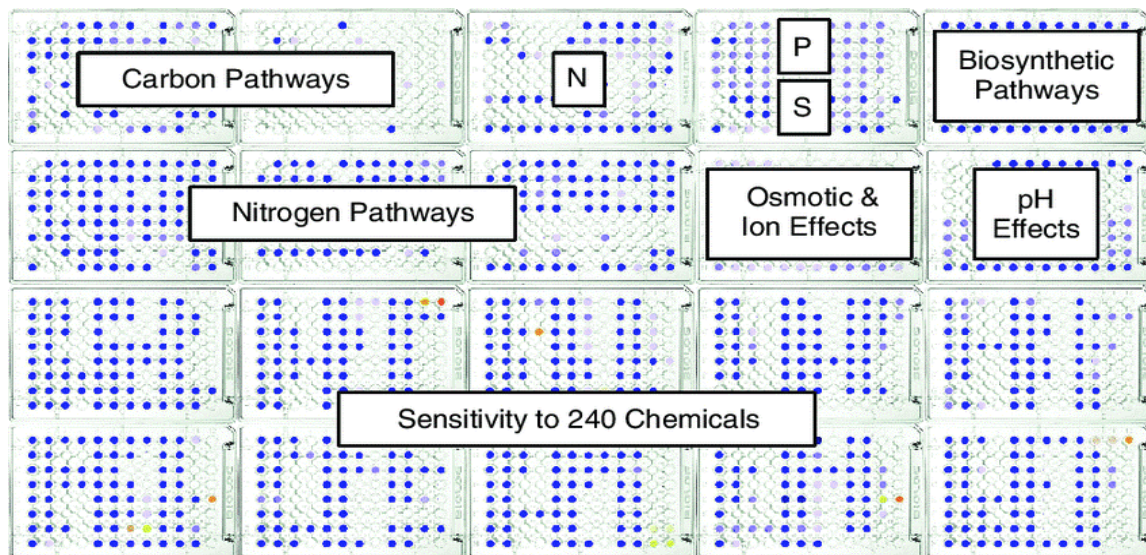
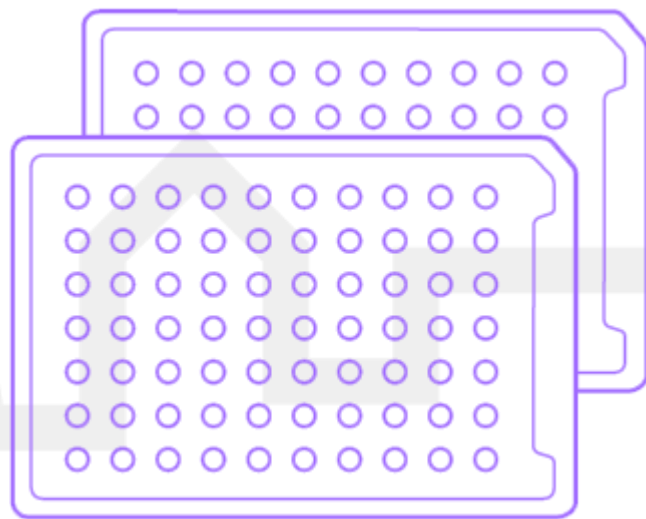
PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ



Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphaericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0
Blood agar	-	-	-	-	-
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-



ANALIZA MIKROMACIERZY FENOTYPOWYCH PM (ANG. PHENOTYPE MICROARRAYS)



PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Pobór próbek wód po procesie zgazowania węgla

Posiewy na podłożu stałym (SMA)

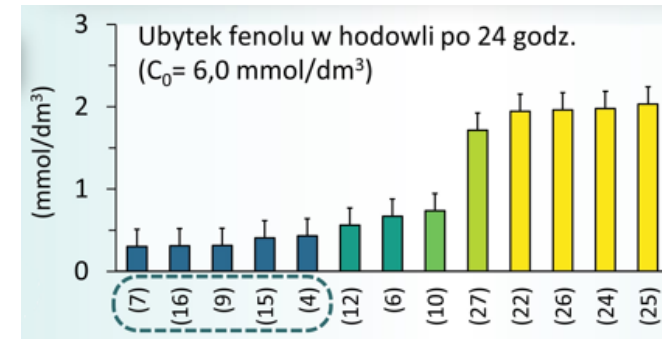
Izolacja bakterii (~100 szczepów)

Identyfikacja szczepów na podstawie V3-V4 16S rRNA. 13 szczepów dominujących wybrano do dalszych badań

Charakterystyka szczepów pod kątem produkcji biosurfaktantów i aktywności enzymatycznej

Biodegradacja fenolu. 5 szczepów wybranych do dalszych badań

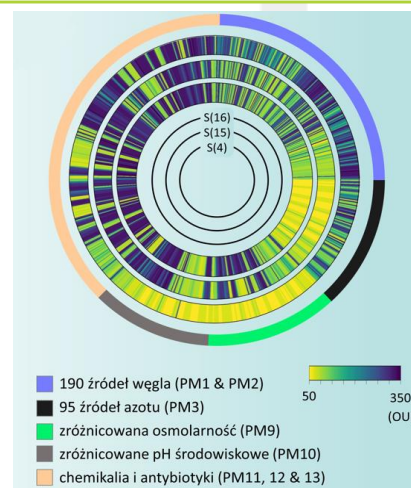
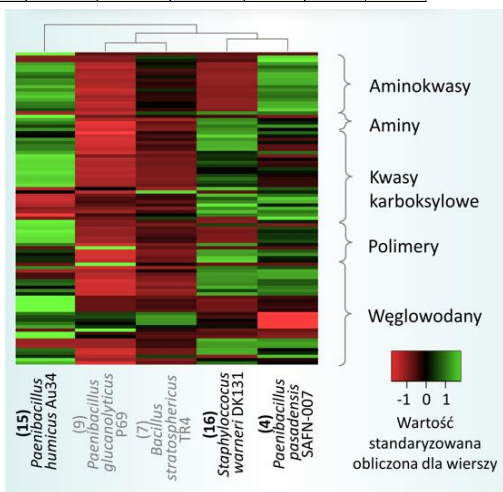
3 najaktywniejsze szczepy wybrano do analizy mikromacierzy genotypowych PM (*ang. Phenotype MicroArrays*)

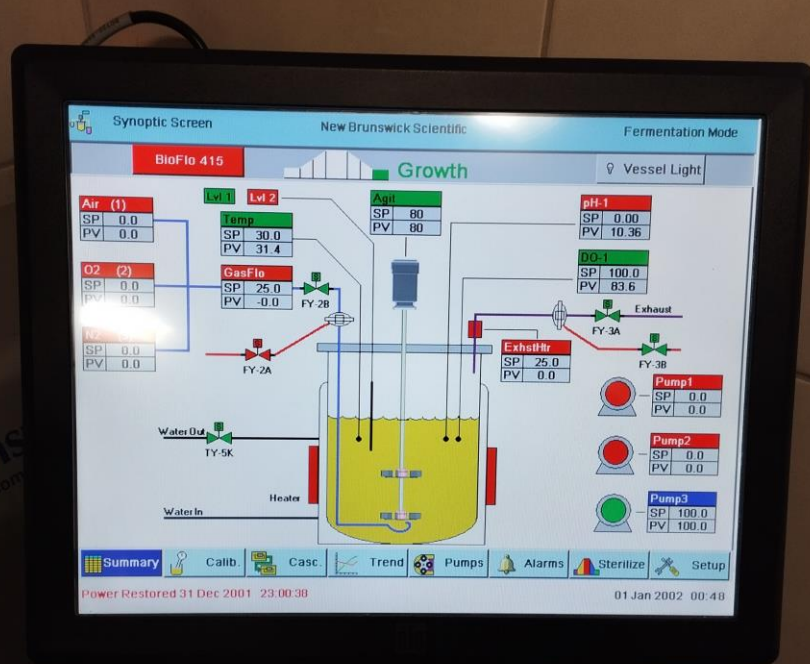


Selekcja szczepów z wykorzystaniem płytek EcoPlate

Oczyszczanie ścieku w bioreaktorze BIOFLO 415

Oznaczenie	(4) <i>Paenibacillus pasadensis</i> SAFN-007	(7) <i>Bacillus stratosphaericus</i> TR4	(9) <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> P69	(16) <i>Staphylococcus warneri</i> DK131	(15) <i>Paenibacillus humicus</i> Au34
Napięcie pow.	55,01	53,37	55,6	52,25	52,14
Oil spreading	-	-	-	-	-
Ind. emulsyfikacji	0	0	0	0	0
Blood agar	-	-	-	-	-
Aktywność enzymatyczna	Ureazy	-	+	-	-
	Proteazy	+	+	+	+
	Celulazy	+	+	+	+
	Inulinazy	+	+	+	+
	Amylazy	+	-	+	-





Warunki hodowli w bioreaktorze:

- temperatura 30°C
- ciągle mieszanie 100 obr/min
- czas trwania: 28 dni

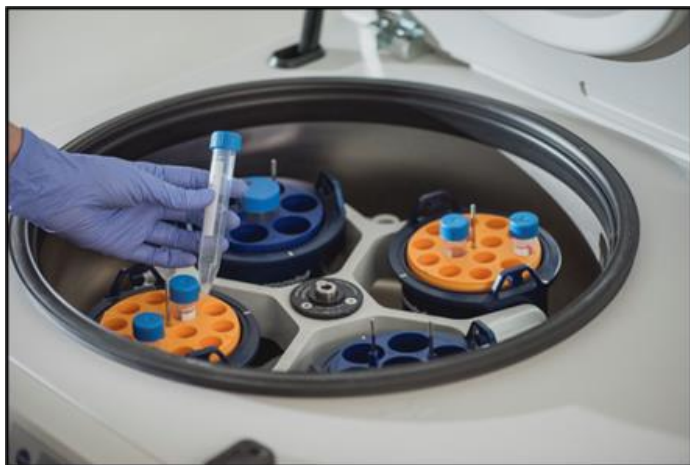
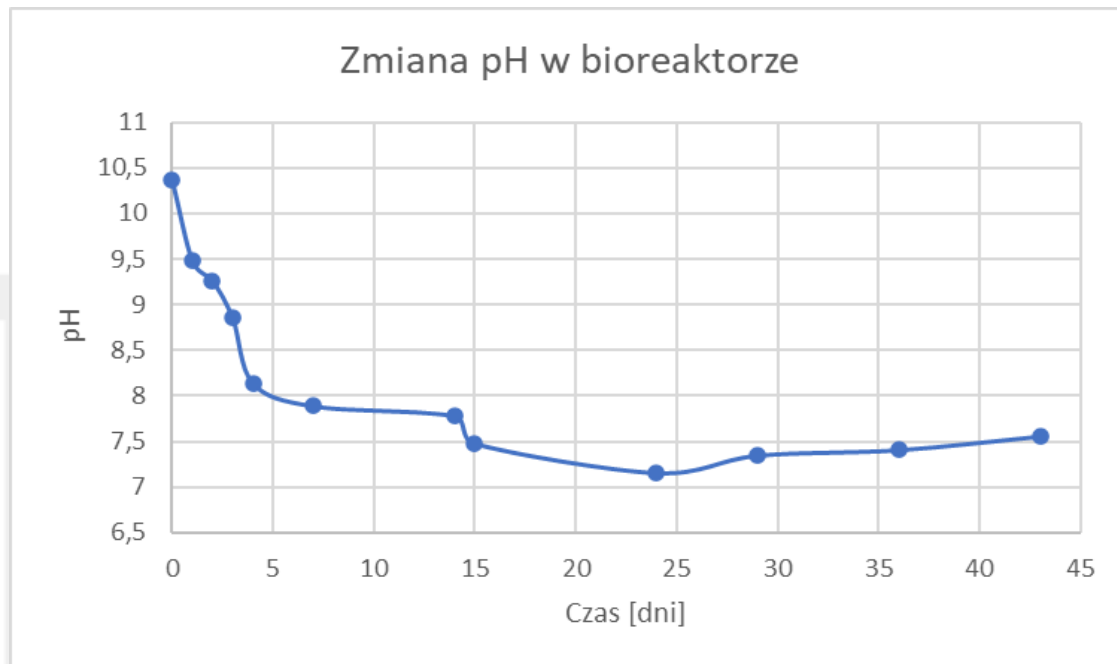
Układ doświadczalny:

- 12 litrów surowego ścieku koksowniczego
- po 1 litrze płynnej hodowli każdego z trzech badanych szczepów



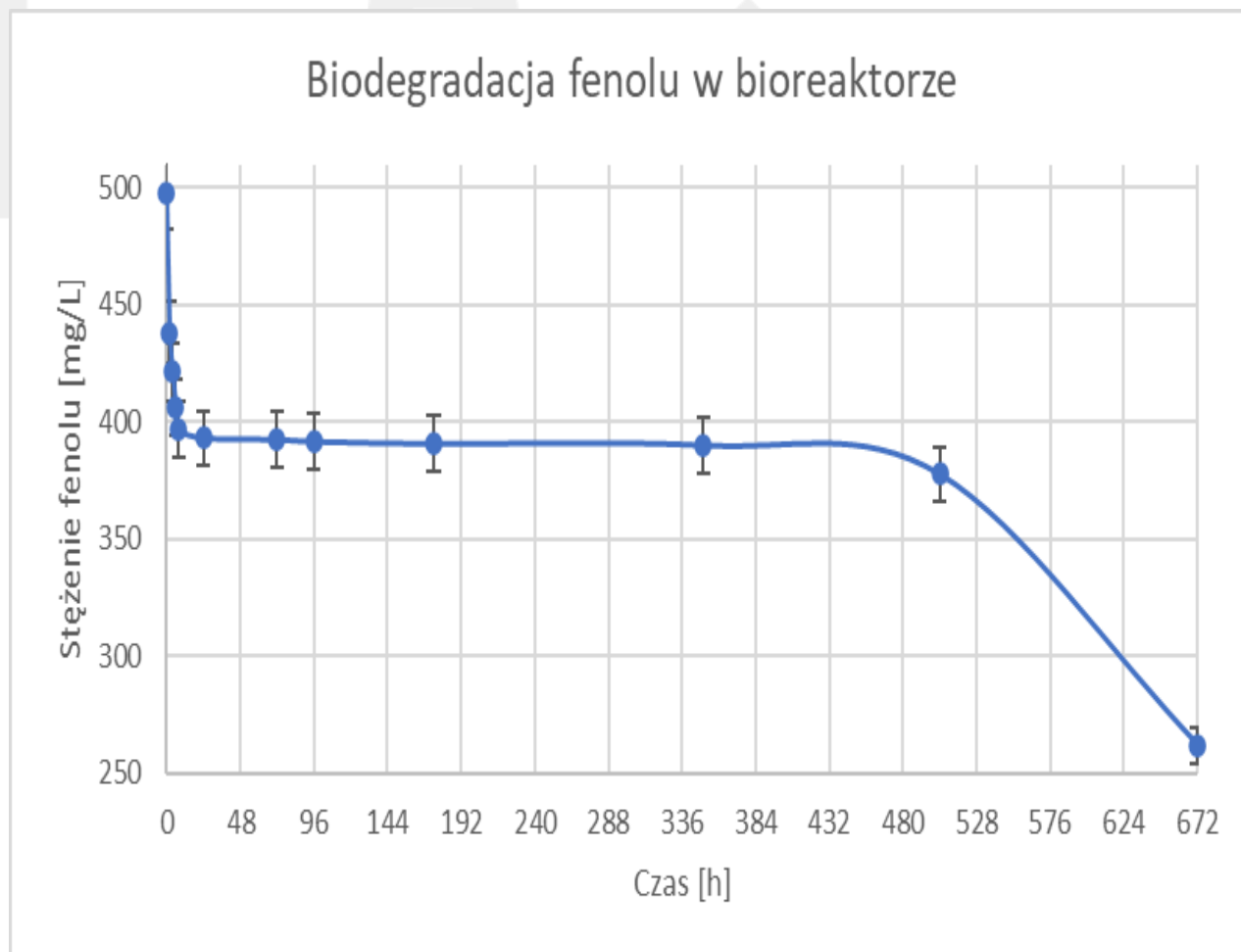
OCZYSZCZANIE ŚCIEKU W BIOREAKTORZE BIOFLO 415

Oznaczana wartość	Ściek surowy przed biodegradacją	Ściek po biodegradacji
pH	10,89	7,56
Redox [mV]	-231,1	-41,4
Konduktancja [mS/cm]	10,687	15,55
ChZT [mgO ₂ /L]	2302	4081
fenole [mg/L]	497,5	262
jon amonowy [mg/L]	80,9	198
cyjanki [mg/L]	16,1	10,1

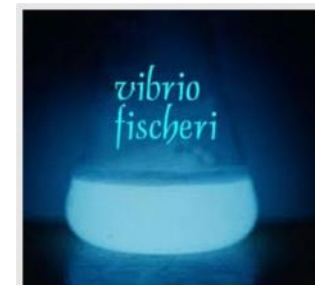


Neutralizacja odczynu pH
ścieku koksowniczego

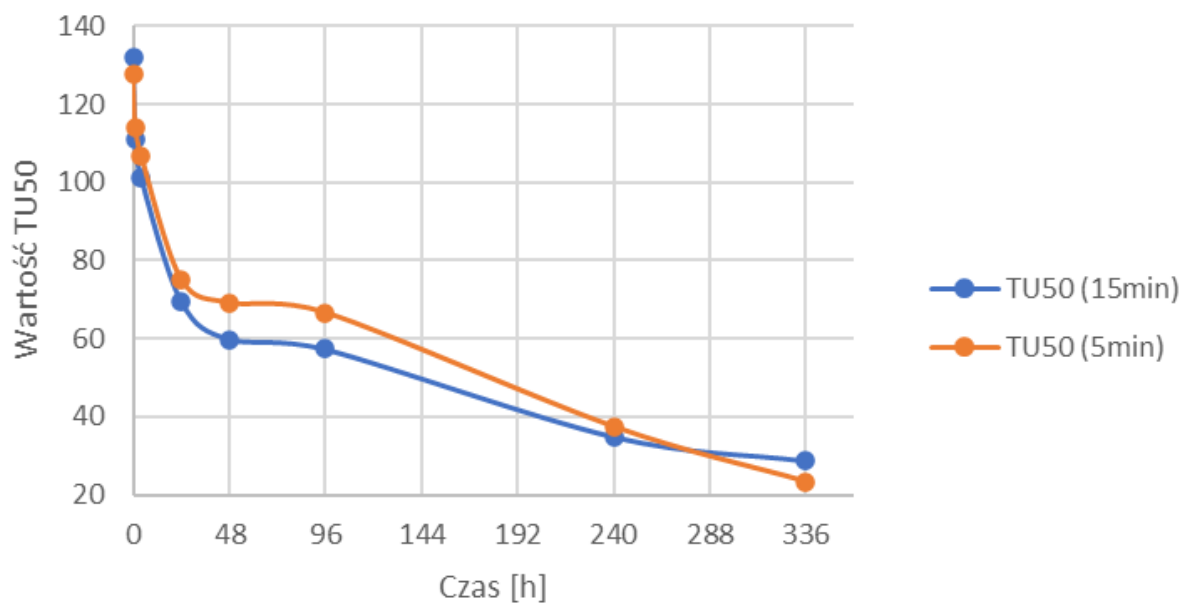
Poziom degradacji fenolu jest równy 47,33%



Zmiana toksyczności ścieku koksowniczego z klasy V. na klasę IV.



Zmiana toksyczności ścieku w bioreaktorze



1. Ścieki po PZW są dobrym źródłem bakterii, które mogą być wykorzystane w procesie biologicznego oczyszczania środowisk zanieczyszczonych związkami fenolowymi
2. W wyniku badań wyizolowano 3 szczepy (*Paenibacillus humicus* Au34, *Staphylococcus warneri* DK131, *Paenibacillus pasadensis* SAFN-007), które ze względu na swoje właściwości, są potencjalnymi kandydatami do wykorzystania w procesie biologicznego oczyszczania środowisk zanieczyszczonych związkami fenolowymi

Konferencje



Oczyszczanie wód poprocesowych z podziemnego zgazowania węgla (PZW) metodami fizykochemicznymi i biologicznymi

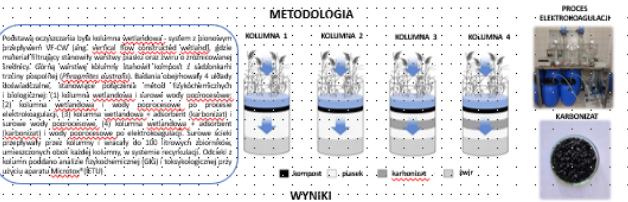
Lukasz Jałowicki¹, Jacek Borgula¹, Aleksandra Strugała-Wilczek¹, Mateusz Saul¹, Mikchał Glaser¹, Grażyna Plaza^{1*}
¹Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowych, ul. Koszalin 6, 40-844 Katowice
²Główny Instytut Górnictwa, Plac Gwarków 1, 40-166 Katowice
³Instytut Technologi Paliw i Energii ul. Zamkowa 1, 41-800 Zabrze
⁴Uniwersytet Śląski, Wydział Nauk Przyrodniczych, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice



WPROWADZENIE

Proces podziemnego zgazowania węgla (PZW) jest metodą pozyskiwania energii chemicznej z pokładów węgla przez doprowadzanie czynnika gazującego (powietrza, tlenu lub pary wodnej) do zapalnego złoża i odbiór wytworzonego gazu syntezowego (mieszany gaz składający się m. in. z H₂ i CO) na powierzchni. Podczas procesu powstają wody poprocesowe zanieczyszczone związkami organicznymi typu fenole i węglowodory aromatyczne typu BTEX i WWA oraz nieorganicznymi typu metale ciężkie, amoniak oraz cyjanki. Zanieczyszczone wody poprocesowe stanowią doskonałe źródło do pozyskania i izolacji mikroorganizmów o cechach ekstremalnych, które następnie mogą być wykorzystane w różnych bioprocjach, w tym procesie bioaugmentacji. Bioaugmentacja jest jedną z metod biotechnologicznych polegającą na wprowadzeniu do zanieczyszczonych środowisk wyspecjalizowanych mikroorganizmów w celu zwiększenia aktywności biodegradacyjnej mikroflory już w nim występującej. Istotną cechą mikroorganizmów jako się tutaj wykorzystuje jest ich wyjątkowa zdolność adaptacji do ekstremalnych warunków środowiska i wykorzystania związków toksycznych jako substratów energetycznych i budulcowych.

Celem badań była ocena możliwości oczyszczenia wód poprocesowych z wykorzystaniem metod fizykochemicznych i biologicznych.



WYNIKI

W tabelach 1-3 przedstawiono wyniki analiz fizykochemicznych po 45 dniach prowadzenia procesu oczyszczania: tabela 1 przedstawia wyniki fizykochemiczne podczas prowadzenia procesu, tabela 2 - (Główna wydzielona i izolowana populacja), tabela 3 - (Izolowana wydzielona i izolowana populacja).

Wzrost	Temperatura	pH	Siarka	Kwasowość	Siarka	Siarka	Siarka	Siarka	Siarka
0	20	7.5	100	100	100	100	100	100	100
15	20	7.5	100	100	100	100	100	100	100
30	20	7.5	100	100	100	100	100	100	100
45	20	7.5	100	100	100	100	100	100	100

WNIOSKI

1. Sześć dni oczyszczania, we wszystkich układach, sprawdziło ponad 90% redukcji WWA i BTEX, oraz zapobiegło powstaniu. Aby osiągnąć większą efektywność oczyszczania konieczne jest zastosowanie dodatkowych metod fizykochemicznych i biologicznych.

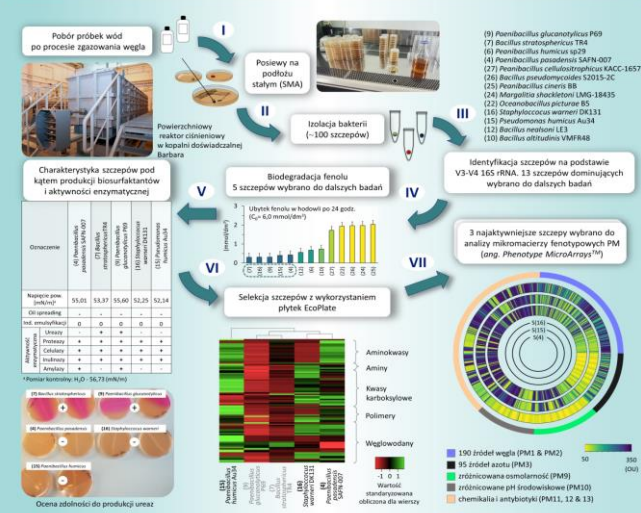
Badania wykonano w ramach projektu nr 101033964 o akronimie UCGWaterPlus (S19U/FRWS/2021/2) i S2119FRWS/2021/2

WODY POPROCESOWE Z PODZIEMNEGO ZGAZOWANIA WĘGLA JAKO ŹRÓDŁO BAKTERII STOSOWANYCH W BIOAUGMENTACJI ŚRODOWISK ZANIECZYSZCZONYCH ZWIĄZKAMI FENOLOWYMI

Lukasz Jałowicki¹, Jacek Borgula¹, Aleksandra Strugała-Wilczek¹, Mikchał Glaser¹, Grażyna Plaza^{1*}
¹Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowych, ul. Koszalin 6, 40-844 Katowice
²Główny Instytut Górnictwa, Plac Gwarków 1, 40-166 Katowice
³Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
⁴Politechnika Śląska, Wydział Organizacji i Zarządzania, ul. Rosoła 26, 41-800 Zabrze

Proces podziemnego zgazowania węgla (PZW) jest metodą pozyskiwania energii chemicznej z pokładów węgla przez doprowadzanie czynnika gazującego (powietrza, tlenu lub pary wodnej) do zapalnego złoża i odbiór wytworzonego gazu syntezowego (mieszany gaz składający się m. in. z H₂ i CO) na powierzchni. Podczas procesu powstają wody poprocesowe zanieczyszczone związkami organicznymi typu fenole i węglowodory aromatyczne typu BTEX i WWA oraz nieorganicznymi typu metale ciężkie, amoniak oraz cyjanki. Zanieczyszczone wody poprocesowe stanowią doskonałe źródło do pozyskania i izolacji mikroorganizmów o cechach ekstremalnych, które następnie mogą być wykorzystane w różnych bioprocjach, w tym procesie bioaugmentacji. Bioaugmentacja jest jedną z metod biotechnologicznych polegającą na wprowadzeniu do zanieczyszczonych środowisk wyspecjalizowanych mikroorganizmów w celu zwiększenia aktywności biodegradacyjnej mikroflory już w nim występującej. Istotną cechą mikroorganizmów jako się tutaj wykorzystuje jest ich wyjątkowa zdolność adaptacji do ekstremalnych warunków środowiska i wykorzystania związków toksycznych jako substratów energetycznych i budulcowych.

Celem niniejszych badań była izolacja i charakterystyka szczepów bakterialnych występujących w wodach poprocesowych z PZW, a następnie ocena wybranych szczepów pod kątem wykorzystania ich w procesie bioaugmentacji środowisk zanieczyszczonych, m.in. związkami fenolowymi.



WNIOSKI

1. Szkiełko po procesie PZW są źródłem bakterii, które mogą być wykorzystywane w procesie bioaugmentacji środowisk zanieczyszczonych związkami fenolowymi
 2. W wyniku badań wyizolowano 3 szczepy (Paenibacillus humicus Au34, Staphylococcus warneri DK131 i Paenibacillus pasadenensis SAFN-007), które ze względu na swoje właściwości, są potencjalnymi kandydatami do wykorzystania w procesie bioaugmentacji środowisk zanieczyszczonych związkami fenolowymi

Badania wykonano w ramach projektu nr 101033964 o akronimie UCGWaterPlus (S19U/FRWS/2021/2) i S2119FRWS/2021/2

Charakterystyka metagenomu bakteryjnego wód poprocesowych z podziemnego zgazowania węgla

Lukasz Jałowicki¹, Jacek Borgula¹, Aleksandra Strugała-Wilczek¹, Grażyna Plaza¹,
¹Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowych, Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Koszala 6, 40-844 Katowice
²Główny Instytut Górnictwa, Plac Gwarków 1, 40-166 Katowice

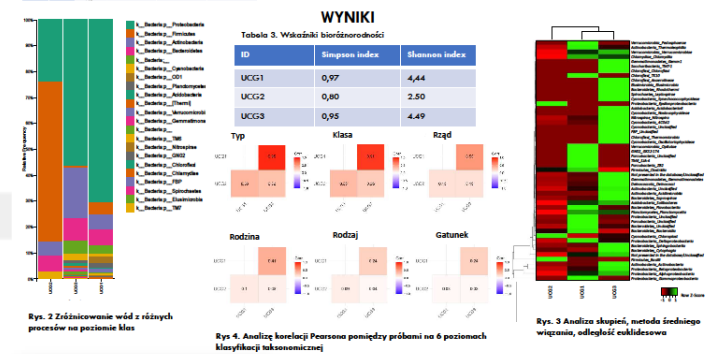
WPROWADZENIE

Proces podziemnego zgazowania węgla (PZW) jest metodą pozyskiwania energii chemicznej z pokładów węgla przez doprowadzanie czynnika gazującego (powietrza, tlen lub pary wodnej) do zapalnego złoża i odbiór wytworzonego gazu syntezowego (mieszany gaz składający się m. in. z H₂ i CO) na powierzchni. Podczas procesu powstają wody poprocesowe zanieczyszczone związkami organicznymi, fenole, węglowodory aromatyczne typu BTEX i WWA oraz nieorganicznymi metale ciężkie, amoniak oraz cyjanki.

Celem badań była charakterystyka mikrobiomu trzech wód poprocesowych z podziemnego zgazowania węgla (ang. Underground Coal Gasification - UCG).

METODYKA

W badaniach wykorzystano trzy wody poprocesowe oznaczone jako UCG1, UCG2 i UCG3 otrzymanych z trzech procesów PZW, w których wykorzystano dwa rodzaje węgla oraz zastosowano różne czynniki gazujące, tj. powietrze i tlen. Pobrane wód pobrano do sterylizacji pojemników o pojemności 1 litr (rys. 1) i przetransportowano do laboratorium. Do izolacji DNA wykorzystano komercyjny zestaw (Power Water kit MoBio, UK). Analiza metagenomu populacji bakterii i eukariotów została przeprowadzona na bazie regionu V3-V4 genu 16S rRNA. Do amplifikacji wybranej regionu i przygotowania biblioteki wykorzystano sekwencja primerów 341F i 785R. Analiza danych została przeprowadzona na sekwencjonatorze MiSeq z użyciem oprogramowania MiSeq Reporter (Illumina) v2.6. Analiza bioinformatyczna obejmowała klasyfikację, odzyskiwanie sekwencji i porównanie sekwencji z bazami danych GenBank i SILVA. Pakiet DADA2 wykorzystano do analizy nowo powstałych sekwencji w procesie sekwencjonowania.



WNIOSKI

Analiza metagenomów wód poprocesowych wykazała, że struktura mikrobiomu bakteryjnego wód UCG1 i UCG3 była podobna i różna w porównaniu z UCG2. W UCG1 i UCG3 dominowały Proteobacteria, podczas gdy w UCG2 najliczniej występowały Firmicutes i dominującymi rodzajami Paenibacillus i Bacillus. Głównym czynnikiem różniącym strukturę bakteryjnych mikrobiomów w wodach poprocesowych był czynnik gazujący.

Badania wykonano w ramach projektu z Funduszu Węgla i Stali nr 101033964 oraz projektu z MEiN o numerach S19U/FRWS/2021/2 i S2119FRWS/2021/2



ABSTRACT
The aim of the conducted study was to identify, isolate and characterize suitable bacterial strains from UCG wastewater as potential candidates for the bioaugmentation approach. For this purpose, the stratified collection procedure and simple biochemical reduction were employed to gain insights into the specific properties of bacteria. From the 100 strains isolated from UCG wastewater, three *Pseudomonas* (isolates SAMP-007, SAMP-008 and SAMP-009) and *Sphingomonas* (isolates SAMP-011) demonstrated the capacity to degrade phenol and specific biochemical properties. Phenol degradation reached more than 90% for the above-mentioned strains, while the average phenol removal rate for other selected strains was 52.5%, ranging from 66.4% to 90%. The bacterial strains belong to multi-enzyme producers and constitute a possible source of potential technologically important enzymes. Phenotypic resistance plasmids were used to characterize the instability properties of the strains. It was found that 70%, 67.4% and 94.2% of the carbon metabolism tested were inhibited by *Pseudomonas* (isolates SAMP-007, SAMP-008 and SAMP-009) and *Sphingomonas* (isolates SAMP-011), respectively. Among *C. source*, the strains have the capability to metabolize some substrates appearing in phenol pathways, such as: *N*-acetyl-D-glucosamine, succinic acid, α -hydroxyglutamic acid, l-glutamic, bromosuccinic acid, β -methylcrotonyl lactone, methylglyoxal, hydroxy phenyl acetic acid, α -hydroxyphenylacetic acid, l-galactonic acid-5-lactone, Diethylacetic acid- β -lactone, phenylglyoxalamine. Strains show different levels of tolerance to pH and osmolarity, and they differ in different habitats. Another characteristic of these strains is their high resistance to many antibiotics (amide-resistant bacteria). These properties allow the use of the isolated bacterial strains as good candidates for bioaugmentation of phenol-contaminated environments. The wastewater from the underground coal gasification process is an example of a good source environment for the isolation of unique bacteria with specific metabolic properties.

Keywords: post-processing wastewater, underground coal gasification (UCG) process, biodegradation, phenol, *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., phenotypic resistance.

INTRODUCTION
One of the key sources of environmental pollution is industrial wastewater. The discharge of industrial wastewater containing the complex of various types of inorganic and organic

pollutants into various water sources disrupts ecological sustainability and poses a risk to human health (Rajgopal et al., 2018; Vymazal, 2021). The wastewater from the underground coal gasification process (UCG process) and from the coke industry are examples of heavily

PLOS ONE

Archives of Environmental Protection Vol. 50 no. 2 pp. 32–41
PL ISSN 2083-4772
DOI: 10.24425/aep.2024.150550

RESEARCH ARTICLE
Constructed wetland as a green remediation technology for the treatment of wastewater from underground coal gasification process

Lukasz Jałowiecki^{1*}, Jack Borgulat², Aleksandra Strugała-Wilczek³, Jan Jastrzębski⁴, Mikkołaj Glaser⁵, Grażyna Płaza⁵

¹ Environmental Microbiology Unit, Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice, Poland; ² Department of Energy Saving and Air Protection, Central Mining Institute, Katowice, Poland; ³ Faculty of Organization and Management, Silesian University of Technology, Zabrze, Poland

* Corresponding author's e-mail: ljałowiecki@ietu.pl

Abstract
The wastewater from underground coal gasification (UCG) process has extremely complex composition and high concentrations of toxic and refractory compounds including phenolics, aliphatic and aromatic hydrocarbons, ammonia, cyanides, hazardous metals and metalloids. So, the development of biological processes for treating UCG wastewater poses a serious challenge in the sustainable coal industry. The aim of the study was to develop an innovative and efficient wetland construction technology suitable for a treatment of UCG wastewater using available and low-cost media. During the bioremediation process the toxicity of the raw wastewater decreased significantly between 74%–99%. The toxicity units (TU) ranged from values corresponding to very high acute toxic for raw wastewater to non-toxic for effluents from wetland cultures after 60 days of the experiment. The toxicity results correlated with the decrease of some organic and inorganic compounds such as phenols, aromatic hydrocarbons, cyanides, metals and ammonia observed during the bioremediation process. The removal percentage of organic compounds like BTEX-PAHs and phenol was around 90% just after 14 days of treatment. A similar removal rate was indicated for cyanide and metals (Cr, Cu and Pb). Conclusions: Constructed wetlands effectively assess remediation technologies. It is desirable to consider combination of physicochemical parameters with ecotoxicity measurements. The present findings show that wetland remediation technology can be used to clean up the heavily contaminated waters from the UCG process. Wetland technology as a nature-based solution has the potential to turn coal gasification wastewater into usable recycled water. It is economically and environmentally alternative treatment method.

Introduction
Although the underground coal gasification (UCG) process generates a smaller amount of wastewater than traditional coal mining, however the wastewater contains a high concentration of environmentally hazardous compounds [1, 2]. The release of numerous organic and

Archives of Environmental Protection Vol. 50 no. 2 pp. 32–41
PL ISSN 2083-4772
DOI: 10.24425/aep.2024.150550

RESEARCH ARTICLE
Insights into bacterial diversity in industrial post-processing water from underground coal gasification (UCG) process

Lukasz Jałowiecki¹, Jack Borgulat², Aleksandra Strugała-Wilczek³, Jan Jastrzębski⁴, Mikkołaj Glaser⁵, Grażyna Płaza⁵

¹ Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice, Poland
² Department of Energy Saving and Air Protection, Central Mining Institute, Katowice, Poland
³ Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland
⁴ Silesian University of Technology, Poland

* Corresponding author's e-mail: ljałowiecki@ietu.pl

Keywords: underground coal gasification process, post-processing wastewater, environmental remediation and bioremediation

Abstract: This study explores the bacterial diversity and metabolic capabilities of the wastewater from the underground coal gasification (UCG) process. The UCG process involves the gasification of coal and the production of synthetic natural gas (SNG) and other products. The wastewater generated during this process is highly contaminated with various organic and inorganic compounds, posing a significant environmental challenge. This study aims to identify and characterize the bacterial community structure and functional diversity of the UCG wastewater. The wastewater samples were collected from different stages of the UCG process and analyzed using high-throughput sequencing techniques (16S rDNA sequencing). The results show a diverse bacterial community, with *Pseudomonas* and *Bacteroides* being the most abundant genera. The study also identifies key metabolic pathways and functional groups involved in the degradation of UCG wastewater pollutants. The findings provide valuable insights into the microbial ecology of UCG wastewater and inform the development of effective bioremediation strategies.

energies

Submit to this Journal
Review for this Journal
Propose a Special Issue

Article Menu

Academic Editors
Anissa Zamir
Alberto Jesus Perez-Bernabeu
Espen Meier

Open Access
Full Text
References
Cite this Article
Download
Download Figures
Download Tables

Are Wetlands as an Integrated Bioremediation System Applicable for the Treatment of Wastewater from Underground Coal Gasification Processes?

Jack Borgulat¹, Mikkołaj Glaser², Lukasz Jałowiecki¹, Aleksandra Strugała-Wilczek³, Jan Jastrzębski⁴, Grażyna Płaza⁵

¹ Environmental Microbiology Unit, Institute for Ecology of Industrial Areas, Koszartha 6 Str., 40-844 Katowice, Poland
² Department of Energy Saving and Air Protection, Central Mining Institute, P.O. Box 16, 40-106 Katowice, Poland
³ Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland
⁴ Author to whom correspondence should be addressed

Energies 2022, 15(12), 4419. <https://doi.org/10.3390/en15124419>
Received: 10 May 2022 / Revised: 16 June 2022 / Accepted: 14 June 2022 / Published: 17 June 2022

This article belongs to the Collection Review Papers in Energy and Environment

Abstract
Underground coal gasification (UCG) can be considered as one of the clean coal technologies. During the process, the gas is released and is produced, which can be used to produce heat and electricity. In fact, UCG can reduce natural gas consumption. However, UCG does carry some environmental risks, mainly related to potential negative impacts on surface and groundwater. Wastewater and sludge from UCG contain significant amounts of aliphatic and aromatic hydrocarbons, phenols, ammonia, cyanides and hazardous metals such as arsenic. This complicated matrix containing high concentrations of hazardous pollutants is similar to wastewater from the coke industry and, similarly to them, requires complex mechanical, chemical and biological treatment. The focus of the review is to explore how the wetland systems, described as one of bioremediation methods, work and whether these systems are suitable for removing organic and inorganic contaminants from heavily contaminated industrial wastewater of which underground coal gasification wastewater is a particularly challenging example. Wetlands appear to be suitable systems for the treatment of UCG wastewater and can provide the benefits of nature-based solutions. This review system the principles of constructed wetlands (CWs) and provides examples of industrial wastewater treated by various wetland systems along with their operating principles. In addition, the physicochemical characteristics of the wastewater from different coal gasification plants (surface conditions, obtained from UCG) use vegetations, are presented. Keywords: bioremediation, bioaugmentation, underground coal gasification (UCG), industrial wastewater



1. Borgulat J., Ponikiewska K., Jałowiecki Ł., Strugała-Wilczek A Płaza G. (2022) **Are wetlands as an integrated bioremediation system applicable for the treatment of wastewater from underground coal gasification processes?** *Energies*, 15(12), 4419.
2. Jałowiecki Ł., Strugała-Wilczek A, Ponikiewska K, Borgulat J., Płaza G, Stańczyk K. (2023) **Constructed wetland as a green remediation technology for the treatment of wastewater from underground coal gasification.** *PloS ONE*
3. Jałowiecki Ł, Borgulat J, Strugała-Wilczek A, Glaser M., Płaza G. (2023) **Raw wastewater from underground coal gasification process as a specific source of phenol-degradating bacteria.** *Journal of Ecological Engineering*
4. Jałowiecki Ł, Borgulat J, Strugała-Wilczek A., Jastrzębski Jan., Płaza G (2024) **Insights into bacterial diversity in industrial post-processing water from underground coal gasification (UCG) proces.** *Archives of Environmental Protection* Vol. 50 no. 2 pp. 32–41



Badania wykonano w ramach projektu z Funduszu Węgla i Stali o nr 101033964 oraz projektów z MEiN o nr 5198/FBWiS/2021/2 i 5211/FBWiS/2021/2

Dziękujemy za uwagę
mgr Łukasz Jałowiecki,
lic. Mikołaj Glaser