

Teresa SUDOL^{*}, Teresa FARBISZEWSKA^{*},
Jadwiga FARBISZEWSKA-BAJER^{**}, Beata CWALINA^{***}

IDENTYFIKACJA SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH W GRUNCIE PRZED I PO PROCESIE BIODEGRADACJI

Przedstawiono wyniki analizy jakościowej i ilościowej próbek przed i po procesie biodegradacji związków ropopochodnych zawartych w gruncie. Badania prowadzono metodą kolumnowej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej, spektrometrii IR i ¹HNMR. Stwierdzono, że w ciągu 7 dni biodegradacji uległo 59% związków ropopochodnych, a węglowodory frakcji pośrednich są znacznie mniej podatne na biodegradację niż węglowodory *n*-parafinowe.

WPROWADZENIE

Różnorodne węglowodory, będące głównymi składnikami materiałów pędnych i paliw, stanowią poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego. Światowe zużycie ropy naftowej – jako źródła tych produktów – wzrasta, powodując, że prawdopodobieństwo skażeń wody i gleby w wyniku katastrof, działań wojennych itd. stale rośnie. Trudne do uniknięcia są także mniejsze, ale bardziej powszechne awarie na stacjach poboru paliwa, kolizje samochodów i niekontrolowane wycieki podczas eksploatacji różnych środków transportowych. Równie groźne są skażenia w okolicy szybów naftowych, związane z wydobywaniem ropy naftowej.

Perspektywy ograniczenia tych zagrożeń, wynikających z rozprzestrzeniania się składników mieszanin ropopochodnych w środowisku człowieka, nieznacznie się poprawiają w ostatnich latach, ponieważ poza mechanicznymi metodami oczyszczania gruntów duże nadzieje wiąże się z biodegradacją węglowodorów za pomocą bakterii.

Bakterie utylizujące węglowodory stanowią od 0,1% do 10% populacji bakterii obecnych w środowisku (Gawrońska H. i in. 1994). Liczne badania dowodzą dużej możliwości zastosowania mikroorganizmów do mineralizacji węglowodorów w środowisku glebowym (Siuta J. 1994, Hollerbach A. i in. 1993). Tempo przemian

^{*} Uniwersytet Opolski, Instytut Chemii, 45-291 Opole, ul. Oleska 48.

^{**} Uniwersytet Opolski, Katedra Inżynierii Procesowej, 45-365 Opole, ul. Dmowskiego 7–9.

^{***} Śląska Akademia Medyczna, Katedra Biochemii i Biofizyki, 41-200 Sosnowiec, ul. Narcyzów 1.

składników ropopochodnych metodą biodegradacji zależy od zasobności gleby w składniki pokarmowe, jej odczynu, stosunków powietrzno-wodnych, temperatury i naświetlenia (Przedwojski R. i in. 1977). Jednym z problemów, który pojawia się po skażeniu gruntów produktami ropopochodnymi jest ocena stopnia skażenia środowiska. Należy przy niej wziąć pod uwagę nie tylko ilość, ale także skład czynnika zanieczyszczającego. Proste metody analityczne nie są już wystarczające, ponieważ nie pozwalają na określenie składu niezwykle złożonych mieszanin węglowodorów alifatycznych, naftenowych i aromatycznych występujących w produktach ropopochodnych. Wykorzystuje się tu sprzężenie metod chromatograficznych, spektroskopowych i testów biologicznych.

W badaniach zanieczyszczenia gleb związkami ropopochodnymi stosuje się również oksyreaktywną analizę termiczną (Cebulak S.J. i in. 1994).

Kolejnym problemem podczas analizy jest metodyka przygotowania próbek, tj. sposób wydzielania produktów naftowych z zanieczyszczonej gleby w zależności od rodzaju zanieczyszczenia oraz stopnia wilgotności gruntu. Możliwe są różne sposoby postępowania (Zakrzewski A. i in. 1994). W przypadku mocno zawilgoconej gleby, zanieczyszczonej benzyną oraz innymi związkami o stosunkowo niskiej temperaturze wrzenia (do 200 °C), można zastosować metody destylacji z parą wodną (Gurka D.F. 1982). Do zanieczyszczeń zawierających węglowodory aromatyczne o pierścieniach skondensowanych lub wrzących w temperaturze powyżej 200 °C stosuje się metodę ekstrakcji rozpuszczalnikami lub metodę chromatografii kolumnowej (Fowle P.J.A. i in. 1986).

Badania nasze, prowadzone wspólnie z firmą „EKO-BAU”, polegały na wyizolowaniu z badanych próbek gruntu i zagęszczeniu ekstraktów substancji ropopochodnych przed i po biodegradacji oraz przeprowadzeniu kompleksowej analizy jakościowej i ilościowej tych próbek z zastosowaniem metod kolumnowej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej, spektrometrii IR i ¹HNMR.

APARATURA I WARUNKI POMIARÓW

Do analizy zanieczyszczeń gruntu stosowano następujące metody instrumentalne:

- kolumnowa chromatografia cieczowa,
- chromatografia gazowa (GC),
- spektroskopia w podczerwieni (IR),
- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (¹HNMR).

Metodę klasycznej, kolumnowej chromatografii cieczowej próbowano zastosować do wstępnego rozdzielania badanych mieszanin na frakcje węglowodorów o różnej budowie. Rozdział prowadzono w kolumnie długości 1 m i średnicy 8 mm, wypełnionej żelalem krzemionkowym o uziarnieniu 150/75 µm. Jako eluenty stoso-

wano kolejno: *n*-heksan, benzen, chloroform i metanol w ilości 2l. Otrzymane frakcje zagęszczono do objętości 1 ml i analizowano metodą chromatografii gazowej (GC) oraz spektroskopii IR i ^1H NMR.

Do analiz metodą chromatografii gazowej zastosowano aparat firmy Hewlett-Packard, model 5890/2, wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny i mini-komputer do obróbki wyników.

Rozdział chromatograficzny prowadzono w kwarcowej kolumnie kapilarnej o wymiarach 25 mm×0,32 mm, ze związaną fazą stacjonarną HP-5 (grubość filmu 0,17 mm). Próbkę dozowano metodą „on column”, to znaczy na zimno, bezpośrednio do kolumny.

Analiza przebiegała z programowaniem temperatury. Temperatura początkowa wynosiła 60 °C, szybkość programowania termostatu kolumn 10 °C/min, a temperatura końcowa 280 °C. Temperatura detektora wynosiła 280 °C. Szybkość przepływu gazu nośnego (helu) utrzymywano na poziomie 2 cm³/min.

W badaniach metodą spektrometrii ^1H NMR posługiwano się przyrządem firmy Tesla, model BS 567A produkcji czechosłowackiej, pracującym przy częstotliwości nominalnej 100 MHz. Rozpuszczalnikiem użytym do analizy próbki był deuterowany chloroform CDCl₃. Jako wzorzec do określenia przesunięć chemicznych zastosowano tetrametylosilan (TMS).

Do analizy metodą spektrometrii IR wykorzystano aparat firmy Analytical model PU-9800 FT-IR Spectrometer. Próbkę badano w formie filmu naniesionego na kryształ soli kuchennej w zakresie liczb falowych 4000–750 cm⁻¹.

METODYKA BADAŃ

Analizę próbek gruntu wykonano przed i po procesie biodegradacji. Próbkę gruntu pobrano ze stacji CPN, w której nastąpiła awaria zbiornika. Był to grunt o strukturze piaszczystej (sypkiej), o bardzo małej zawartości substancji ilastych.

Pobrane próbki gruntu poddano biodegradacji mikroflorą wyizolowaną wcześniej z tego gruntu i poddaną adaptacji do dużych stężeń substancji ropopochodnych.

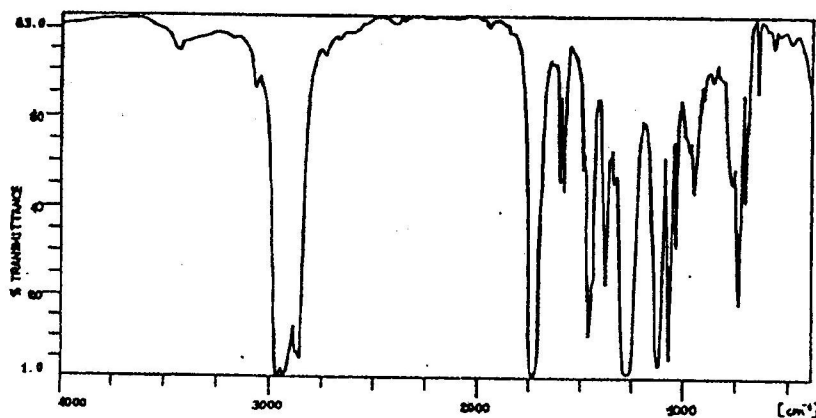
Proces biodegradacji prowadzono w temperaturze pokojowej, w napowietrzanych układach potrójnych, które zawierały po 100 g zanieczyszczonego gruntu i po 100 g pożywki płynnej, zaszczerpionej siedmiodniową hodowlą wyizolowanej mikroflory. Równocześnie ustawiono identyczne układy kontrolne, do których w miejsce mikroorganizmów wprowadzono tymol jako substancję bakteriostatyczną. Czas prowadzenia procesu wynosił 7 dni. Próbkę gruntu ekstrahowano chloroformem w aparatach Soxhleta i analizowano metodami chromatograficznymi oraz spektroskopowymi.

WYNIKI POMIARÓW

Otrzymane widma i chromatogramy wskazywały na złożony skład badanych ekstraktów. W celu wyizolowania grup związków o podobnym charakterze chemicznym jeden z ekstraktów próbowano rozdzielić metodą klasycznej cieczonej chromatografii kolumnowej, stosując gradientową elucję (kolejność rozpuszczalników: *n*-heksan, benzen, chloroform, metanol). Okazało się jednak, że skład odbieranych kolejno frakcji zmieniał się w sposób nieznaczny, co może świadczyć o podobieństwie budowy składników mieszaniny albo o zbyt niskiej sprawności użytej kolumny.

Podobieństwo składu odbieranych frakcji wykazały ich widma IR i NMR.

W związku z tym analizie poddawano ekstrakty chloroformowe w całości, metodami IR, NMR i GC.



Rys. 1. Widmo IR badanych próbek po biodegradacji
Fig. 1. IR spectrum of tested samples after biodegradation process

Sygnały obecne w widmie IR po biodegradacji (rys. 1) wskazują, że zasadniczymi składnikami badanej próbki są węglowodory alifatyczne i aromatyczne z dużą przewagą tych pierwszych. Charakterystyczne pasma absorpcyjne, występujące w omawianym widmie i przyporządkowane im najbardziej prawdopodobne elementy strukturalne analizowanych związków ujęto w tabeli 1.

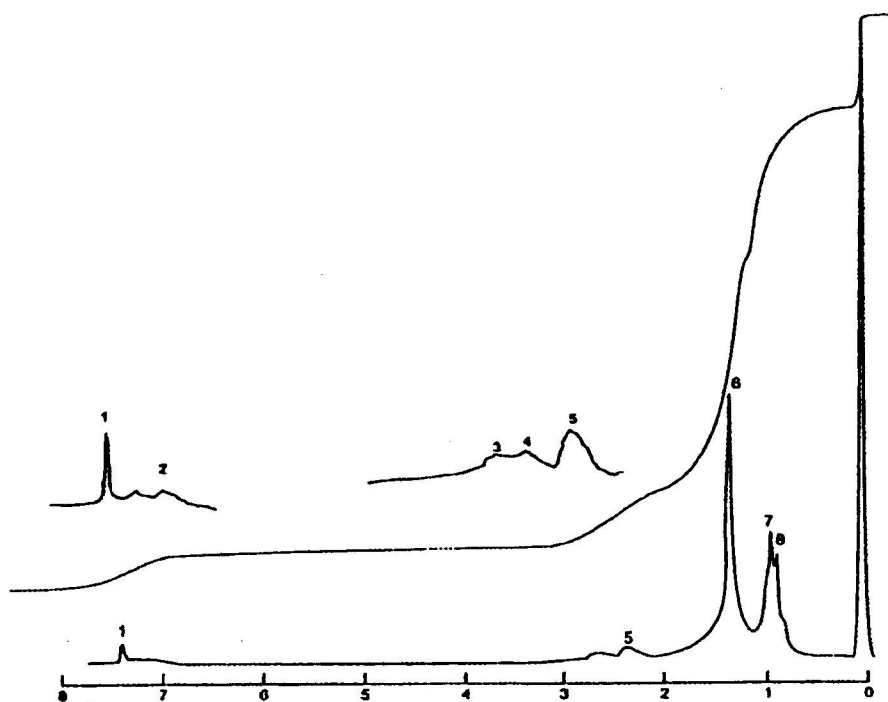
Widmo IR przed biodegradacją wykazywało występowanie tych samych paliw, z wyjątkiem piku o liczbie falowej 1729 cm^{-1} . Pasma to może świadczyć, że nastąpiło częściowe utlenienie węglowodorów w glebie pod działaniem mikroflory. Absorbancja przy tej liczbie falowej jest dość duża, jednak biorąc pod uwagę wysoki współczynnik absorpcji, towarzyszący drganiom grup karbonylowych, ich zawartość nie jest zbyt wysoka.

Widmo NMR (rys. 2) nie wykazuje obecności grup funkcyjnych zawierających atomy tlenu, a jedynie obecność protonów związanych z „parafinowymi”,

„olefinowymi” i „aromatycznymi” atomami węgla. Dystrybucję atomów wodoru w tej próbce ilustruje tabela 2.

Tabela 1. Charakterystyczne pasma w widmie IR badanych próbek
Characteristic bands in samples IR spectrum

Liczba faliowa [cm^{-1}]	Rodzaj drgania	Elementy strukturalne
3069	rozcz. C–H	układy aromatyczne, =C–H
2925, 2855	rozcz. C–H (sym. i asym.)	Ar–CH ₃ lub CH ₂ w cykloalkanach
(1729)	rozcz. C=O	(ketony, kwasy karboksylowe)
1073–1274	rozcz. szkieletowe C–C	łańcuchy węglowodorowe
1450, 1599	rozcz. C=C	układy aromatyczne
1463	def. asym. C–H	CH ₃ , CH ₂
1380	def. sym. C–H	CH ₃
743	def. C–H	skondensowane układy aromatyczne



Rys. 2. Widmo ¹H NMR badanych próbek przed biodegradacją
Fig. 2. ¹H NMR spectrum of tested samples before biodegradation process

Tabela 2. Dystrybucja atomów wodoru w badanych próbkach
Hydrogen atoms distribution in tested samples

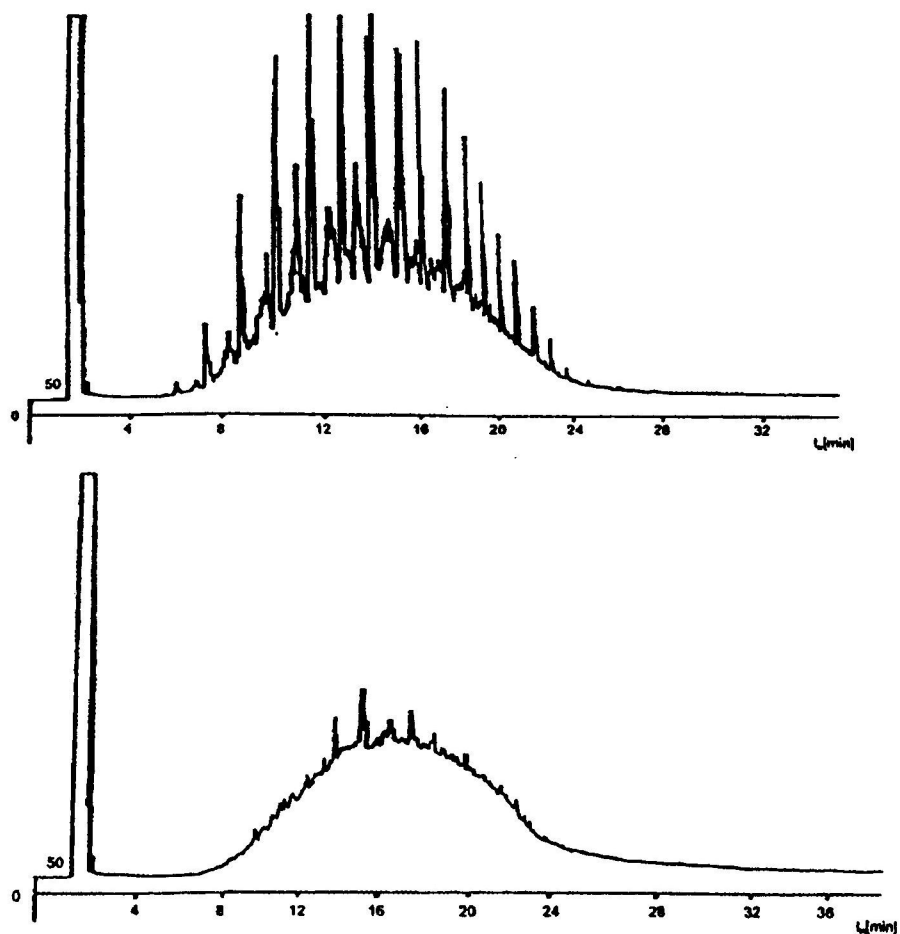
Pozycja protonu	Przesunięcie chemiczne, ppm	Udział procentowy	
		piasek przed biodegradacją	piasek po biodegradacji
H _γ (–CH ₃)	<1,1	27,4	28,8
H _β (–CH ₂ –, –CH–)	1,1 –1,8	46,6	53,0
H _α (Ar–CH ₃)	1,8 –3,2	4,5	13,6
H _{ol} (C=CH)	4,3 –5,8	9,2	–
H _{ar} (Ar–H)	>6,7	12,3	4,5

Analiza chromatograficzna wskazuje, że dominujące w badanej mieszaninie przed biodegradacją są węglowodory *n*-parafinowe. Zawartość węglowodorów *n*-parafinowych po biodegradacji wyraźnie maleje, a do C₁₃ całkowicie znika. Zawartość izoparafin i związków aromatycznych nieznacznie rośnie (rys.3, tab.3).

Tabela 3. Skład mieszanin węglowodorów przed i po biodegradacji
Hydrocarbons mixture composition before and after the biodegradation process

Węglowódór	Masa na 1 kg piasku próby 1, g	Masa na 1 kg piasku próby 2, g	Węglowódór	Masa na 1 kg piasku próby 1, g	Masa na 1 kg piasku próby 2, g
C11	0,01	–	*-C20	0,26	0,25
*-C11	0,02	–	C12	0,21	0,09
C12	0,08	–	*-C21	0,12	0,07
*-C12	0,19	–	C22	0,12	0,04
C13	0,25	–	*-C22	0,03	0,06
*-C13	0,56	0,08	C23	0,08	0,01
C14	0,53	0,09	*-C23	0,00	0,01
*-C14	0,84	0,29	C24	0,06	0,00
C15	0,57	0,07	*-C24	0,00	0,00
*-C15	0,92	0,42	C25	0,04	–
C16	0,49	0,22	*-C25	0,01	0,00
*-C16	0,95	0,51	C26	0,02	0,00
C17	0,69	0,19	*-C26	–	0,00
*-C17	0,65	0,54	C27	0,01	0,00
C18	0,65	0,09	C28	0,01	–
*-C18	0,50	0,55	C29	0,00	
C19	0,48	0,14	Suma		1,00
*-C19	0,38	0,31	<i>n</i> -parafin	4,63	3,10
C20	0,32	0,05	*- frakcji pośrednich	5,44	

Do identyfikacji związków aromatycznych zastosowano system indeksów PAH (Lee L. i in. 1979). Na podstawie obliczonych indeksów PAH przyporządkowano im najbardziej prawdopodobne typy związków aromatycznych, a są to: di-, trime-, tylonaftalelny, metylofluoreny, fenyloantraceny, fluoranten, metyloflaranteny, piren, metylopireny.



Rys. 3. Chromatogramy mieszanin węglowodorów przed i po biodegradacji

Fig. 3. Chromatograms of hydrocarbons mixture
before and after the biodegradation process

W analizie chromatograficznej zastosowano kolumnę o niskiej polarności. Z tego względu węglowodory eluują w kolejności temperatur wrzenia. Znajomość temperatur wrzenia zlokalizowanych na chromatogramie *n*-parafin pozwala określić temperatury wrzenia węglowodorów frakcji pośrednich. Obliczenia wykonano, sumując zawartości kolejnych pojawiających się na chromatogramie węglowodorów. Analiza chromatograficzna wykazała, że 50% związków zawartych w ekstraktach

gruntu pojawia się (wrze) w temperaturze do 183 °C, 90% do 220 °C, reszta związków do 280°C. Powyższe dane wskazują, że w skład związków ropopochodnych, zanieczyszczających badany grunt, nie wchodzi benzyny lekkie, występują natomiast w nich paliwa ciężkie. W omawianym procesie biodegradacji ogólna zawartość węglowodorów *n*-parafinowych uległa zmniejszeniu z 4,63 g/kg gruntu do 1,00 g/kg gruntu, a frakcji pośrednich z 5,44 g/kg gruntu do 3,10 g/kg gruntu.

WNIOSKI

1. Grunt, zanieczyszczony w wyniku awarii na stacji CPN, stanowi złożoną mieszaninę węglowodorów alifatycznych i węglowodorów aromatycznych. Długość łańcuchów *n*-parafin sięga C₂₉. Obecne są też frakcje pośrednie pomiędzy kolejnymi *n*-parafinami do *C₂₆. Frakcje pośrednie to przypuszczalnie węglowodory alifatyczne rozgałęzione oraz węglowodory aromatyczne.

2. Analiza wykazała, że w omawianym procesie, w ciągu 7 dni biodegradacji uległo 59% związków ropopochodnych.

3. Węglowodory frakcji pośrednich są znacznie mniej podatne na biodegradację niż węglowodory *n*-parafinowe.

LITERATURA

- BARTLE K. D., MARTIN T. G., WILLIAMS D. F. (1975), *Fuel* **54**, 226.
CEBULAK S. J., PACHA J., SZEJA W. (1994), *Analiza termiczna w badaniach zanieczyszczenia gleb związkami ropopochodnymi*, Ogólnopolskie sympozjum naukowe, Karwice, 24–31.
FOWLIE P. J. A., BULMAN T. L. (1986), *Anal. Chem.* **58**, 721.
GAWROŃSKA H., GÓRSKI W., OSTASZEWSKI W. (1994), *Problemy biodegradowalności olejów silnikowych*, Ogólnopolskie sympozjum naukowe, Karwice, 46–52.
GURKA D. F., BETOWSKI L. D. (1982), *Anal. Chem.* **54**, 1819.
HETPER J. SUDOL T., KOSSAKOWSKI A. (1993), *Badania strukturalne składników odpadów produkcyjnych kopalni „Walenty”*, Sprawozdanie z prac zleconych przez IETU w Karowicach, WSP Opole.
HOLLERBACH A., KASSNER H., TESCHNER M. (1993), *Chemical and microbiological studies on petroleum contaminated soils after two years of biotreatment*, Biohydrometall. Technol., Proc. Int. Biohydrometall. Symp. 2, 365–737.
LEE L., VASSILAROS L. (1979), *Anal. Chem.* **51**, 768.
PRZEDWOJSKI R., RYTELEWSKI J., MAĆKIEWICZ J. (1977), *Próby ustalenia metod rekultywacji gleb skażonych ropą naftową*, Symp. Naukowe, Płock, 39–43.
SIUTA J. (1994), *Podstawy biologicznego rozkładu ropopochodnych składników w glebach i odpadach*, Ogólnopolskie sympozjum naukowe, Karwice, 1–13.
ZAKRZEWSKI A., GACA J. (1994), *Niekontrolowane wycieki paliw a środowisko*, Ogólnopolskie sympozjum naukowe, Karwice.

Sudol T., Farbiszevska T., Farbiszevska-Bajer J., Cwalina B., (1996), An identification of oil-derived substances in soil before and after their biodegradation, *Physico-chemical Problems of Mineral processing*, **30**, 167–175 (Polish text).

The results of qualitative and quantitative analysis of soil samples before and after biodegradation process were presented. It was found that during 7 days 59% of hydrocarbons were degraded. The investigation was made by means of liquid and gas chromatography and IR and ^1H NMR spectrometry.