

Ewa Śliwka, Barbara Kołwzan, Kamil Kołodziej

Zastosowanie spektroskopii ^1H NMR do oceny przebiegu biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych

Węglowodory należą do najpowszechniej występujących zanieczyszczeń środowiska. Do wyjątkowo niebezpiecznych skażeń (wycieki setek, a nawet mln ton) dochodzi w akwenach morskich i terenach przybrzeżnych w wyniku katastrof w trakcie wydobywania ropy naftowej na platformach wydobywczych i jej transportu tankowcami. Mniej katastrofalne skutki w środowisku powodują wycieki produktów naftowych do gleby podczas transportu rurociągami i cysternami, a także w czasie ich magazynowania i użytkowania [1]. Poważne skutki ekologiczne stwarza również składowanie odpadów naftowych, np. powstających podczas wydobywania ropy naftowej [2].

Źródłem zanieczyszczeń węglowodorami, obok substancji naftowych, są produkty węglowodórne, takie jak smoły węglowe, które są szczególnie toksyczne ze względu na dużą zawartość wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych (WWA) [3,4]. Węglowodory te charakteryzują się toksycznym oddziaływaniem nie tylko na organizmy roślinne i zwierzęce, a także stwarzają zagrożenie zdrowia ludzi. W przypadku wycieków substancji naftowych do środowiska gruntowo-wodnego konieczne jest przeprowadzenie natychmiastowej akcji ratunkowej, a następnie prac remediacyjnych. Remediacji wymagają również tereny, na których została przekroczona dopuszczalna zawartość zanieczyszczeń węglowodorowych, przewidziana przepisami prawnymi.

Spośród metod likwidacji skutków zanieczyszczenia środowiska węglowodorami w ostatnich latach najbardziej rozwijane są metody biologiczne, w których stosuje się mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania węglowodórów w charakterze źródła węgla i energii. Skuteczność tych metod zależy od bardzo wielu czynników, m.in. od ilości i składu chemicznego zanieczyszczeń oraz rodzaju mikroorganizmów [5]. Substancje naftowe stanowią różne mieszaniny tysięcy związków, głównie węglowodórów parafinowych i cykloparafinowych, natomiast w mniejszych ilościach obecne są w nich węglowodory aromatyczne. W ropie naftowej i ciężkich olejach opałowych występują ponadto związki asfaltowo-żywiczone zawierające

heteroatomy (azot, tlen, siarka), które cechuje duża masa cząsteczkowa i skomplikowana budowa chemiczna. Poszczególne grupy węglowodórów i związków heteroatomowych występują w zanieczyszczeniach węglowodorowych w różnej ilości oraz charakteryzują się bardzo zróżnicowaną podatnością na biodegradację, co wpływa na szybkość i stopień usuwania zanieczyszczeń [4, 5]. Do najtrudniej usuwalnych zanieczyszczeń węglowodorowych należą smoły węglowe, ciężkie frakcje naftowe i ropa naftowa, zwłaszcza w postaci zastarzałej [4]. Ich biodegradacja wymaga często opracowania specyficznych biopreparatów oraz ciągłego monitorowania zawartości zanieczyszczeń. Konieczna może być również kontrola toksyczności powstających metabolitów oraz bardziej szczegółowa charakterystyka zmian składu chemicznego zanieczyszczeń.

Do analizy chemicznej zanieczyszczeń węglowodorowych wykorzystuje się różnorodne techniki. Całkowitą zawartość węglowodórów oznacza się za pomocą chromatografii gazowej (GC-FID), a ponadto stosuje się technikę spektroskopii w podczerwieni (IR) lub grawimetrię [6, 7]. Szczegółowe informacje dotyczące składu chemicznego zanieczyszczeń uzyskuje się analizując indywidualnie chemiczne i klasy związków z użyciem techniki GC sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz dwuwymiarowej chromatografii gazowej (GC×GC) [6–8]. Techniki chromatografii gazowej mogą być stosowane do badania lotnych i średniolotnych substancji naftowych. Wyżej cząsteczkowe zanieczyszczenia naftowe – do takich należą substancje o długoletniej historii skażenia – stanowią mieszaniny o bardzo złożonym charakterze, których poszczególne składniki są trudne do rozdzielenia i analizy ilościowej. W analityce naftowej i cieczy węglowych do charakterystyki ciężkich frakcji naftowych oraz smół i ekstraktów węglowych wykorzystuje się metody spektroskopowe, np. IR, UV, NMR [9–12]. Za pomocą metod ^1H NMR i ^{13}C NMR, bez konieczności wydzielenia związków, można określić podstawowe elementy strukturalne odnoszące się do tzw. średniej cząsteczki, uzyskując w ten sposób ilościowe dane o zmianach w budowie chemicznej reagentów. Takie podejście analityczne do badania zanieczyszczeń naftowych w środowisku opisano dotychczas w niewielu publikacjach [13] oraz w dalszej części pracy.

Celem badań była ocena możliwości zastosowania techniki ^1H NMR do badania przebiegu procesu biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych pochodzących z różnych źródeł.

Dr inż. E. Śliwka, mgr inż. K. Kołodziej: Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii i Technologii Paliw, ul. Gdańska 7/9, 50-344 Wrocław

ewa.sliwka@pwr.edu.pl

Dr hab. B. Kołwzan: Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, Oddział Dolnośląski, ul. Marszałka Józefa Piłsudskiego 74, 50-020 Wrocław

barbara.kolwzan@gmail.com

Zastosowanie techniki NMR w analizie naftowej i środowiskowej

Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR – nuclear magnetic resonance) jest najbardziej przydatnym narzędziem analitycznym spośród technik spektroskopowych stosowanych do badań struktury związków organicznych. W badaniach NMR wykorzystuje się właściwości magnetyczne jąder atomów pierwiastków, mających spinowy moment pędu (spin jądrowy) i moment magnetyczny. Do takich jąder należą m.in. ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . Jeżeli na próbkę umieszczoną w zewnętrznym polu magnetycznym działa energia z zakresu częstotliwości radiowych, to spiny jądrowe badanego izotopu ulegają wzbudzeniu, po czym powracają do stanu równowagi (relaksacja). W zależności od gęstości elektronów znajdujących się wokół jądra, czyli od stopnia, w jakim jest ono przesłaniane przez chmurę elektronową, otrzymuje się sygnały o różnych położeniach w widmie. Różnice położenia tych sygnałów nazywa się przesunięciem chemicznym δ (wyrażanym w ppm). Obok wartości przesunięć chemicznych, istotnymi informacjami otrzymywanymi z widm są ilość, intensywność (pole powierzchni pod sygnałem) i rozszczepienie sygnałów. Wartości przesunięć chemicznych dotyczące typowych związków chemicznych przedstawiane są w formie tabelaryzowanej i dostępne w poradnikach i literaturze chemicznej.

Na podstawie widm ^1H NMR i ^{13}C NMR uzyskuje się dane o rodzaju oraz udziale protonów i atomów węgla, które dają kompleksowe informacje o strukturze cząsteczek związków organicznych, a także przemian, w których uczestniczą. Widma NMR są stosowane przede wszystkim do analizy indywidualnych chemicznych i prostych mieszanin. Techniki ^1H NMR i ^{13}C NMR mają wiele zalet – są nieinwazyjne, nie wymagają żmudnej kalibracji do uzyskania parametrów ilościowych, próbki przygotowuje się w lotnych, łatwych do usunięcia rozpuszczalnikach, co umożliwia wykorzystanie próbek do dalszych analiz. Bardziej dostępna jest technika ^1H NMR, która charakteryzuje się znacznie większą czułością, przy czym próbka wymagana do analizy może być stosunkowo mała. Z tych względów rezonans protonowy ma większe zastosowanie w badaniach próbek środowiskowych, w także technikach łączonych, np. chromatograficznych i elektroforezy kapilarnej (HPLC-NMR, SFC-NMR, CE-NMR) [14, 15].

Widma ^1H NMR próbek naftowych i węglowodórnych dostarczają informacji o rodzaju i udziale protonów występujących w ugrupowaniach wieloskładnikowych mieszanin węglowodórnych. Duża liczba i różnorodność tych ugrupowań powoduje wzajemne oddziaływania i nakładanie się sygnałów. Z tych względów podawane przez poszczególnych autorów dane dotyczące rodzajów i zakresów przesunięć chemicznych są nieco różne. Widma ^1H NMR węglowodórnych można podzielić na część alifatyczną (0,5÷6,0 ppm) i aromatyczną (6,0÷9,0 ppm). W zakresie alifatycznym wyodrębnia się sygnały pochodzące od protonów grup alkilowych n- i izoparafin oraz naftenów, a także występujące w podstawnikach alkilowych pierścieni aromatycznych. Protony w pozycji α do pierścienia aromatycznego dają sygnały w zakresie 2,0÷4,5 ppm, natomiast w pozycji β i dalszej – w zakresie 0,5÷2,0 ppm.

Dane uzyskane z widma, uzupełnione o analizę elementarną (C, H) i masę cząsteczkową, umożliwiają obliczenie szeregu parametrów odniesionych do średniej cząsteczki badanej substancji, m.in. liczby parafinowych, naftenowych, aromatycznych atomów węgla i wodoru, liczby

pierścieni (naftenowych i aromatycznych), a także długości, liczby i stopnia rozgałęzienia podstawników alkilowych oraz współczynnika aromatyczności. Do obliczeń wartości tych parametrów wykorzystywane są algorytmy opracowane wiele lat temu w odniesieniu do substancji węglowodórnych i wyżejcząsteczkowych składników ropy naftowej [10, 11].

Technika ^1H NMR jest stosunkowo rzadko stosowana do oceny przebiegu procesów biodegradacji węglowodórnych, zwłaszcza w próbkach środowiskowych. W pracach [16, 17] oparto się na jakościowej interpretacji widm (identyfikacja ugrupowań protonów) do określenia przemian BTEX [16] oraz ropy naftowej, produktów naftowych i indywidualnych chemicznych (monoaromatów) w procesach biodegradacji w obecności grzybów [17]. Autorzy prac [18, 19] wykorzystali dane dotyczące udziału protonów do określenia zmian w budowie chemicznej ropy naftowej poddanej biodegradacji w warunkach laboratoryjnych, natomiast autorzy pracy [13], na podstawie udziału protonów (5 grup), obliczyli parametry strukturalne – indeks aromatyczności, wskaźnik rozgałęzienia ugrupowań nasyconych i podstawienia węgli aromatycznych w próbkach pochodzących z gleby zanieczyszczonej ropą naftową. Parametry te posłużyły do ilościowego określenia stopnia przemian chemicznych podczas wieloletniej naturalnej degradacji oraz biostymulacji.

Część doświadczalna

Przedmiotem badań były próbki (substraty) naftowe (w nawiasach przyjęte oznaczenia) – ropa naftowa (SRN), olej napędowy (SON) i smoła gazownicza (SSG), a także produkty ich biodegradacji (oznaczone odpowiednio PRN, PON i PSG). Smoła gazownicza pochodziła z terenów zamkniętej gazowni. Proces biodegradacji węglowodórnych prowadzono w szklanych bioreaktorach o pojemności 1 dm³ zawierających 500 cm³ podłoża mineralnego Siskinej-Trocenka (1,56g KH₂PO₄, 2,13g Na₂HPO₄, 0,5g (NH₄)₂SO₄, 0,2g MgSO₄·7H₂O i 0,02g CaCl₂·2H₂O w 1 dm³ wody destylowanej) oraz substancje naftowe i smołę gazowniczą w ilości 0,1% (wag.). Poszczególne bioreaktory zaszczerpiono 10 cm³ biopreparatu zawierającego mikroorganizmy w ilości 34÷67·10⁹ jtk/cm³. Biopreparat został sporządzony na bazie trzech szczepów bakterii zdolnych do rozkładu węglowodórnych – *Acinetobacter calcoaceticus* H29, *Rhodococcus erythropolis* H45 i *Brevibacterium brevis* B1 [4, 5]. Kontrolę stanowiły reaktory nie zaszczerpione mikroorganizmami. Przygotowane reaktory umieszczono na wytrząsarkach i inkubowano w temperaturze 20°C przez 14 d, stale mieszając (140 obr./min). Po inkubacji dokonano ekstrakcji zanieczyszczeń węglowodórnych z próbek używając kolejno porcje dichlorometanu (DCM) – 100 cm³ i 50 cm³, a następnie 50 cm³ heksanu. Ekstrakt heksanowy oddzielono od roztworu wodnego w rozdzielaczu i przesączono. Osad na sączku rozpuszczono w DCM i dołączono do ekstraktu heksanowego. Całość ekstraktu odparowano na wyparce próżniowej. Zagęszczony ekstrakt przeniesiono do fiolki i odparowano do stałej masy.

Analiza ^1H NMR

Widma ^1H NMR substratów i produktów biodegradacji wykonano w Laboratorium Centralnym Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej na spektrometrze Bruker Avance 300 przy częstotliwości 300,13 MHz. Analizowano próbki o masie około 10 mg, rozpuszczone w 99,9%

deuteryzowanym chloroformie (Aldrich). Jako wzorzec zastosowano tetrametylosilan (TMS), w przypadku którego δ przyjęto jako równe 0 ppm. Na podstawie integracji (całkowanie obszarów pod powierzchnią pików) obliczono udział sygnałów poszczególnych rodzajów protonów. Całkowanie zostało przeprowadzone automatycznie. Zakresy przesunięć sygnałów protonów występujących w charakterystycznych ugrupowaniach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wartości przesunięć chemicznych różnych rodzajów protonów

Table 1. Assignments of chemical shifts for different types of protons

| Przesunięcie chemiczne ppm | Rodzaj ugrupowania | | Symbol |
|----------------------------|--------------------|--|--|
| 0,5+1,0 | CH ₃ | w podstawnikach alifatycznych w położeniu γ i dalszym do pierścienia aromatycznego lub w n- i izoparafinach | H _{γ} |
| 1,0+1,4 | CH ₂ | w podstawnikach alifatycznych w położeniu β i dalszym do pierścienia aromatycznego lub n- i izoparafinach | H _{β} |
| 1,4+2,1 | CH ₂ | naftenowe | H _N |
| | CH | | |
| 2,1+2,4 | CH ₃ | grupy metylowe w położeniu α do pierścienia aromatycznego | H _{αCH₃} |
| 2,4+4,3 | CH ₂ | grupy metylenowe (głównie) i metinowe w położeniu α do pierścienia aromatycznego | H _{αCH₂} |
| | CH | | |
| 4,3+6,0 | CH ₂ | olefinowe | H _{OI} |
| | CH | | |
| 6,2+7,2 | CH | monoaromatyczne | H _{Ar1} |
| 7,3+9,0 | | poliaromatyczne | H _{Ar2} |

Wprowadzając pewne założenia, wynikające z podstawowej wiedzy o składzie i budowie chemicznej różnych substancji naftowych i węglowodórnych, w oparciu o procentowy udział protonów, z widm ¹H NMR wyznaczono parametry strukturalne, odnoszące się do średniej hipotetycznej cząsteczki. Przedstawione zależności nie wymagały użycia danych dotyczących składu elementarnego i masy cząsteczkowej, czym różnią się od klasycznych algorytmów [10, 11]:

$$f_A = C_A / C_T \quad (1)$$

$$C_A = H_{Ar1} + H_{Ar2} / 0,8 + H_{\alpha CH_3} / 3 + H_{\alpha CH_2} / 2 \quad (2)$$

$$C_T = C_S + C_A \quad (3)$$

$$C_S = H_{\gamma} / 3 + H_{\beta} / 2 + H_N / 2 + H_{\alpha CH_3} / 3 + H_{\alpha CH_2} / 2 + H_{OI} \quad (4)$$

$$f_R = (C_S - H_{\gamma} / 3) / H_{\gamma} / 3 \quad (5)$$

$$f_{\alpha P} = C_{\alpha} / C_P \quad (6)$$

$$C_{\alpha} = H_{\alpha CH_3} / 3 + H_{\alpha CH_2} / 2 \quad (7)$$

$$C_P = H_{Ar1} + H_{Ar2} + H_{\alpha CH_3} / 3 + H_{\alpha CH_2} / 2 \quad (8)$$

w których:

f_A – współczynnik aromatyczności

f_R – stopień rozgałęzienia łańcuchów alifatycznych

$f_{\alpha P}$ – stopień podstawienia układu aromatycznego

C_S – węgle alifatyczne

C_A – węgle aromatyczne

C_T – suma węgli alifatycznych i aromatycznych

C_{α} – węgle w pozycji α do pierścienia aromatycznego

C_P – aromatyczne węgle peryferyjne (zewewnętrzne)

Należy zwrócić uwagę, że wewnętrzne atomy węgla w aromatycznych strukturach wielopierścieniowych nie są związane z atomami wodoru, dlatego w obliczeniach wartości C_A (2) uwzględniono ich obecność dzieląc wartość H_{Ar2} przez współczynnik korekcyjny. Przyjęto, że wśród wielopierścieniowych aromatów dominowały struktury dwupierścieniowe, stąd wartość współczynnika korekcyjnego wynosiła 0,8 (w przypadku naftalenu stosunek węgli związanych z protonami do węgli aromatycznych wynosi 0,8).

Analiza GC-MS i składu grupowego

Wykonano analizę jakościową poszczególnych substratów (SRN, SON i SSG). Analizę próbek SSG przeprowadzono z użyciem aparatu GC-MS Hewlett-Packard ser. II, GC 5890, MS 5971, wyposażonym w kolumnę kapilarną HP-17MS [4], natomiast próbek SNO i SRN – w kolumnę HP-5, zgodnie z metodą podaną w pracy [6]. Przeprowadzono analizę składu grupowego ropy naftowej oraz smoły gazowniczej, natomiast nie analizowano oleju napędowego (ze względu na obecność lotnych składników, których obecność zaniża wyniki uzyskiwane metodą wagową) oraz produktów biodegradacji (z uwagi na zbyt małe próbki). Oznaczenie wykonano metodą chromatografii cieczowej z użyciem kolumny wypełnionej żelazem krzemionkowym. Jako eluenty stosowano kolejno n-heksan, mieszaninę n-heksanu i DCM w stosunku objętościowym 1:1 oraz metanol, uzyskując frakcje odpowiednio węglowodórów alifatycznych, węglowodórów aromatycznych i żywic. Po odparowaniu rozpuszczalników z eluatów, rozdzielone frakcje oznaczono wagowo.

Dyskusja wyników badań

Charakterystyka chemiczna substratów

Ocena składu jakościowego próbek na podstawie analizy GC-MS wykazała, że stanowiły one mieszaniny węglowodórów, głównie składników eluujących w zakresie n-alkanów C₉–C₃₀₊ (dominowały C₉–C₁₅) w ropy naftowej, C₈–C₂₂ w oleju napędowym oraz C₁₁–C₂₈ (dominowały C₁₃–C₂₀) w smole gazowniczej (tab. 2). Olej napędowy charakteryzował się największą zawartością węglowodórów parafinowych i naftenowych i znacznie mniejszą węglowodórów aromatycznych. Wśród węglowodórów aromatycznych w próbkach naftowych zawartość związków jednopierścieniowych jest kilkakrotnie większa niż wielopierścieniowych [9]. W ropy naftowej, obok węglowodórów alifatycznych, aromatycznych i żywic, obecne były również związki wielkocząsteczkowe – asfalteny, zatrzymywane w kolumnie chromatograficznej.

Tabela 2. Skład chemiczny substratów
Table 2. Chemical composition of substrates

| Próbka | Zakres liczby atomów C | Skład grupowy | | |
|--------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| | | węglowodory alifatyczne | węglowodory aromatyczne | żywice |
| SON | C ₈ –C ₂₂ | ok. 75* | ok. 25* | – |
| SRN | C ₉ –C ₃₀₊ | 44,13 | 32,78 | 14,9 |
| SSG | C ₁₁ –C ₂₈ | 26,30 | 41,30 | 26,7 |

*na podstawie [9]

Tabela 3. Procentowy udział protonów w substratach i produktach biodegradacji
Table 3. Proton distribution in substrates and products of biodegradation

| Próbka | Procentowy udział protonów w substratach | | | | | | | |
|--------|--|------------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| | H _{Ar1} | H _{Ar2} | H _γ | H _β | H _N | H _{αCH₃} | H _{αCH₂} | H _{OI} |
| SON | 2,43 | 0,55 | 29,08 | 48,85 | 12,36 | 2,95 | 3,50 | 0,28 |
| SRN | 2,16 | 1,56 | 26,11 | 50,95 | 11,96 | 2,31 | 4,96 | 0,00 |
| SSG | 5,29 | 5,61 | 17,03 | 36,42 | 9,72 | 12,84 | 10,89 | 2,20 |
| Próbka | Procentowy udział protonów w produktach | | | | | | | |
| | H _{Ar1} | H _{Ar2} | H _γ | H _β | H _N | H _{αCH₃} | H _{αCH₂} | H _{OI} |
| PON | 2,57 | 1,82 | 26,98 | 44,16 | 11,29 | 2,19 | 10,99 | 0,00 |
| PRN | 2,49 | 2,39 | 24,56 | 41,98 | 15,70 | 4,51 | 8,37 | |
| PSG | 3,18 | 5,34 | 18,80 | 35,98 | 12,62 | 13,41 | 10,67 | |

Zawartość węglowodorów alifatycznych w próbce smoły gazowniczej (SSG) była znacznie mniejsza niż w substancjach naftowych, ale większa niż w typowych smolach koksowniczych [20]. Wynikało to prawdopodobnie z wymycia części jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych podczas deponowania smoły na terenie gazowni, a ponadto wskazywało, że surowcem do produkcji tej smoły mógł być węgiel niskouwęglony. W smole tej wykryto obecność ugrupowań olefinowych (analiza GC, ¹H NMR – tab. 3) oraz WWA [4].

Biorąc pod uwagę zróżnicowaną podatność składników grupowych na biodegradację, która maleje w szeregu: węglowodory parafinowe → węglowodory cykloparafinowe → węglowodory aromatyczne, można sądzić, że największą podatność na biodegradację powinien wykazywać olej napędowy, a najmniejszą smoła gazownicza.

Tabela 4. Parametry strukturalne substratów i produktów biodegradacji uzyskane z widm ¹H NMR

Table 4. Structural parameters of biodegradation substrates and products obtained from ¹H NMR spectra

| Parametr | | Olej napędowy (ON) | Ropa naftowa (RN) | Smoła gazownicza (SG) |
|-----------------|--------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| f _A | Substrat (S) | 0,12 | 0,14 | 0,35 |
| | Produkt (P) | 0,21 | 0,22 | 0,33 |
| f _R | Substrat (S) | 3,47 | 3,99 | 6,16 |
| | Produkt (P) | 3,78 | 3,95 | 5,44 |
| f _{αP} | Substrat (S) | 0,46 | 0,47 | 0,47 |
| | Produkt (P) | 0,42 | 0,54 | 0,54 |

Skuteczność biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych

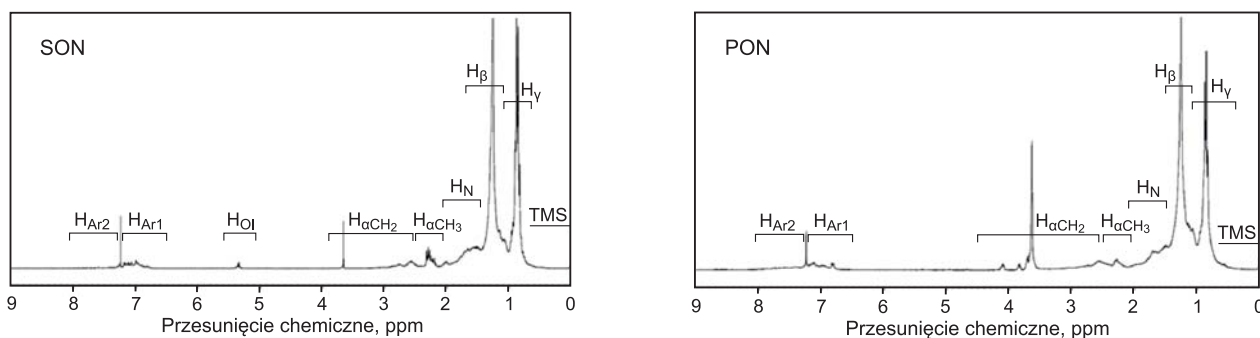
Podstawowym parametrem służącym do oceny przebiegu procesu biodegradacji był ubytek substratów, który został oznaczony metodą wagową. Zmiany w budowie chemicznej oceniono na podstawie udziału poszczególnych rodzajów protonów (analiza ¹H NMR) w substratach i produktach biodegradacji (tab. 3) oraz parametrów strukturalnych (tab. 4). Widma ¹H NMR tych próbek przedstawiono na rysunkach 1–3.

Największy (89,1%), ponad 2-krotnie większy ubytek substratów niż w pozostałych substratach, stwierdzono w przypadku oleju napędowego, który zawierał niżej cząsteczkowe węglowodory oraz największą ilość węglowodorów alifatycznych (tab. 2). Analiza widm ¹H NMR

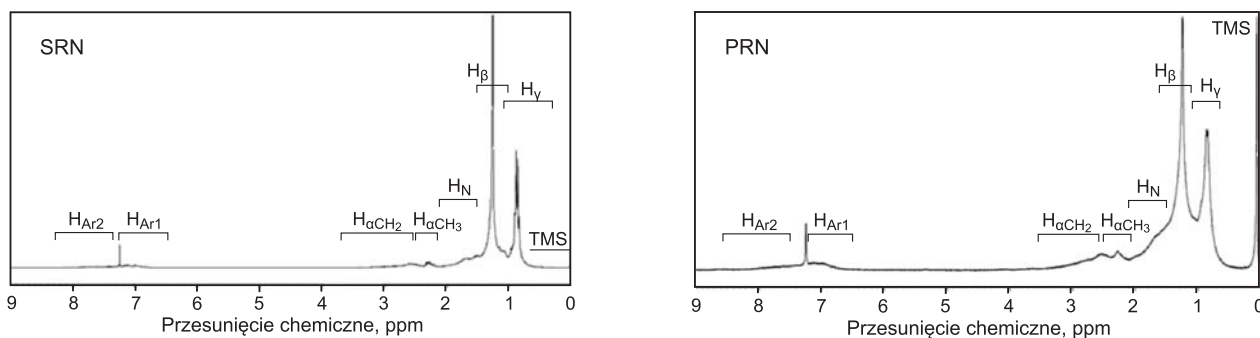
(rys. 1, tab. 3) wykazała w produktach biodegradacji wzrost udziału protonów w ugrupowaniach aromatycznych (H_{Ar1}+H_{Ar2}), zwłaszcza w układach wielopierścieniowych (H_{Ar2}) oraz występujących w grupach bezpośrednio związanych z pierścieniem aromatycznym (H_{αCH₂}). Dane te, wyrażone w postaci współczynnika aromatyczności (f_A) wskazały na znaczny wzrost udziału węgla aromatycznych – z 12% do 21%. Zmniejszenie udziału H_{αCH₃} w produktach biodegradacji świadczyło o usunięciu podstawników metylowych i/lub metylowych pochodnych węglowodorów aromatycznych. Stopień podstawienia węgla aromatycznych łańcuchami alifatycznymi (f_{αP}) w produktach biodegradacji oleju napędowego wynosił 42% i był nieco mniejszy niż w próbce wyjściowej, natomiast wzrastał stopień rozgałęzienia łańcuchów alifatycznych (odpowiednio 3,47 i 3,78).

Podobne zmiany w procentowym udziale protonów zaobserwowano podczas procesu biodegradacji ropy naftowej (rys. 2). W porównaniu do oleju napędowego, wyjściowa próbka SRN charakteryzowała się nieco większym udziałem protonów aromatycznych, zwłaszcza w układach skondensowanych, co wyrażało się również większą wartością parametru f_A (odpowiednio 0,12 i 0,14), ale wzrost aromatyczności w procesie biodegradacji był nieco mniejszy (odpowiednio 1,75-krotnie i 1,57-krotnie). Małe wartości parametru H_{Ar} w przypadku próbek wyjściowych ropy naftowej i ich podobny wzrost w procesie biodegradacji ropy podano w pracy [19]. W porównaniu do oleju napędowego, badana ropa naftowa miała nieco większy stopień rozgałęzienia łańcuchów alifatycznych, który praktycznie nie ulegał zmianie w produktach biodegradacji, natomiast stopień podstawienia węgla aromatycznych w ropie naftowej był zbliżony do próbek SON i SSG, a mniejszy niż w próbkach PRN i PSG. Zawierająca wyżejcząsteczkowe węglowodory ropa naftowa (pozbawiona węglowodorów <C₉) była znacznie trudniej biodegradowalna niż olej napędowy.

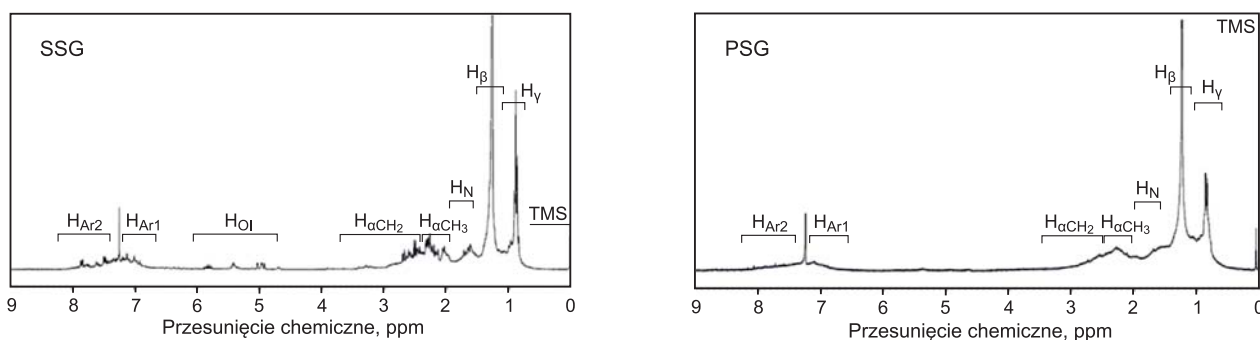
Smoła gazownicza stanowiła próbkę środowiskową, która przez wiele lat była deponowana na terenie nieczynnej gazowni. Jej charakter chemiczny znacznie odbiegał od badanych substancji pochodzenia naftowego. Analiza ¹H NMR (rys. 3) wykazała jej wyższą aromatyczność wyrażoną udziałem protonów aromatycznych (H_{Ar1} i H_{Ar2}) oraz współczynnikiem aromatyczności (0,35), trzykrotnie większym niż w przypadku oleju napędowego. Zbliżoną wartość f_A uzyskano w przypadku składników olejowych pochodzących z węgla brunatnych [12]. Próbka ta charakteryzowała się znacznie większym udziałem protonów



Rys. 1. Widmo ^1H NMR oleju napędowego (z lewej) i produktów jego biodegradacji (z prawej)
 Fig. 1. ^1H NMR spectrum of diesel oil (left) and its biodegradation products (right)



Rys. 2. Widmo ^1H NMR ropy naftowej (z lewej) i produktów jej biodegradacji (z prawej)
 Fig. 2. ^1H NMR spectrum of crude oil (left) and its biodegradation products (right)



Rys. 3. Widmo ^1H NMR smoły gazowniczej (z lewej) i produktów jej biodegradacji (z prawej)
 Fig. 3. ^1H NMR spectrum of coal tar (left) and its biodegradation products (right)

w ugrupowaniach alkilowych bezpośrednio związanych ze strukturami aromatycznymi ($\text{H}_{\alpha\text{CH}_2} + \text{H}_{\alpha\text{CH}_3} - 23,7\%$), przy czym stopień podstawienia peryferyjnych atomów węgla był identyczny jak w próbce ropy naftowej, natomiast stopień rozgałęzienia łańcuchów miał znacznie większą wartość niż w próbkach naftowych. Ponadto stwierdzono obecność struktur olefinowych, które łatwo polimeryzują. Występowanie tych ugrupowań w próbce smoły wskazuje na mały kontakt tej smoły z powietrzem. Badana smoła odbiegała swym składem od typowych smół węglowych – charakteryzowała się większym udziałem węglowodorów alifatycznych, co korelowało z mniejszą wartością współczynnika aromatyczności. Produkty biodegradacji charakteryzowały się bardzo zbliżoną wartością parametrów $\text{H}_{\text{Ar}2}$ i f_A w porównaniu do substratów, przy jednoczesnym zwiększeniu udziału protonów w strukturach alifatycznych. Można więc sądzić, że w procesie biodegradacji smoły zawierającej głównie węglowodory aromatyczne łatwiej usuwane były związki jednopierścieniowe o krótszych łańcuchach alifatycznych. Brak sygnałów struktur olefinowych wskazuje na dużą podatność n-alkenów na biodegradację.

Podsumowanie

Badania biodegradacji substancji naftowych i smoły węglowej wykazały znaczne zróżnicowanie podatności tych zanieczyszczeń na biologiczny rozkład. Skuteczność biodegradacji oleju napędowego w procesie trwającym 14d wynosiła 89%, natomiast ropy naftowej – 45%, zaś smoły gazowniczej – 26%.

Technika ^1H NMR, zastosowana do analizy substratów i produktów biodegradacji, jest bardzo przydatna do szybkiej oceny zmian chemicznych zachodzących podczas rozkładu zanieczyszczeń węglowodorowych. Badane próbki charakteryzowały się zróżnicowanymi udziałami protonów w ugrupowaniach aromatycznych i alifatycznych, które zależały głównie od pochodzenia próbki (naftowa lub węglowa). Produkty biodegradacji próbek naftowych miały bardziej aromatyczny charakter niż substraty, natomiast produkty biodegradacji smoły gazowniczej charakteryzowały się aromatycznością zbliżoną do substratu. Potwierdza to fakt, że węglowodory alifatyczne zawarte w produktach naftowych są bardziej podatne na biodegradację i ich zawartość w mieszaninie maleje w toku procesu biodegradacji.

Technika ^1H NMR może być bardzo przydatna w analityce zanieczyszczeń organicznych środowiska oraz badaniach przebiegu procesów biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych, ze względu na możliwość określania sumarycznych parametrów strukturalnych, różnicujących w istotny sposób próbki pochodzenia naftowego i węglowodorne oraz stopień ich biodegradacji. Jej zaletą jest szybkość wykonania analiz oraz mała ilość analitów potrzebna do analizy. Ponadto jest to technika nieniszcząca, co czyni ją bardzo użyteczną w badaniach mechanizmów przemian zanieczyszczeń węglowodorowych w procesach biologicznych, które prowadzi się z użyciem próbek o małej zawartości substratów i produktów.

Praca została wykonana w ramach badań statutowych Politechniki Wrocławskiej, temat nr S40562/203/06.

LITERATURA

- J. SURYGALA, E. ŚLIWKA: Wycieki ropy naftowej. *Przemysł Chemiczny* 1999, vol. 78, nr 9, ss. 323–325.
- E. ŚLIWKA, B. KOLWZAN, K. GRABAS, J. KLEIN, R. KORZEŃ: Chemical composition and biological properties of weathered drilling wastes. *Environment Protection Engineering* 2012, Vol. 38, No. 1, pp. 129–138.
- M. WEHRER, T. RENNERT, T. MANSFELD, K.U. TOTSCHE: Contaminants at former manufactured gas plants: Sources, properties, and processes (Review). *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2011, Vol. 41, No. 21, pp. 1883–1969.
- E. ŚLIWKA, B. KOLWZAN, K. GRABAS, E. KARPENKO, P. RUTKOWSKI: Influence of rhamnolipids from *Pseudomonas* PS-17 on coal tar and petroleum residue biodegradation. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 1, pp. 139–150.
- B. KOLWZAN: Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną. *Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej* nr 79, Seria Monografie nr 44, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
- E. ŚLIWKA: Oznaczanie zanieczyszczeń naftowych w glebie. W: J. SURYGALA [red.]: *Zanieczyszczenia naftowe w gruncie*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000, ss. 113–160.
- Z. WANG, M. FINGAS, G. SERGY: Study of 22-year-old arrow oil samples using biomarker compounds by GC/MS. *Environmental Science and Technology* 1994, Vol. 28, No. 9, pp. 1733–1746.
- J. GROS, C.M. REDDY, C. AEPPLI, R.K. NELSON, C.A. CARMICHAEL, J.S. AREY: Resolving biodegradation patterns of persistent saturated hydrocarbons in weathered oil samples from the Deepwater Horizon disaster. *Environmental Science & Technology* 2014, Vol. 48, No. 3, pp. 1628–1637.
- J. SURYGALA [red.]: *Vademecum rafinera. Ropa naftowa: Właściwości, przetwarzanie, produkty*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2006.
- J.K. BROWN, W.R. LADNER: A study of the hydrogen distribution in coal-like materials by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. 2. A comparison with infra-red measurement and the conversion to carbon structure. *Fuel* 1960, Vol. 39, No. 1, pp. 87–96.
- J.G. SPEIGHT: A structural investigation of the constituents of Athabasca bitumen by proton magnetic resonance spectroscopy. *Fuel* 1970, Vol. 49, No. 1, pp. 76–90.
- E. ŚLIWKA, J. SURYGALA: The chemical structure of low temperature tars obtained from Polish low rank coals. *Polish Journal of Applied Chemistry* 1994, Vol. 38, No. 1, pp. 101–111.
- S.M. RIOS, N.S. NUDELMAN: Natural attenuation of oil spills in Patagonian soils. Characterization by ^1H NMR spectroscopy. *Environmental Technology* 2008, Vol. 29, No. 1, pp. 23–33.
- K. LEVSEN, A. PREISS, M. SPRAL: Połączenie HPLC z NMR i MS jako technika pozwalająca na określenie struktury chemicznej nieznaną substancji chemicznych, obecnych w próbkach środowiskowych. W: J. NAMIEŚNIK, W. CHRZANOWSKI, P. SZPINEK [red.]: *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. Wydawnictwo CEEAM, Gdańsk 2003, ss. 184–216.
- L.A. CARDOZA, V.K. ALMEIDA, A. CARR, C.K. LARIVE, D.W. GRAHAM: Separations coupled with NMR detection. *Trends in Analytical Chemistry* 2003, Vol. 22, No. 10, pp. 766–775.
- F.X. PRENAFETA-BOLDU, J. VERVOORT, J.T.C. GROTENHUIS, J.W. van GROENSETIJN: Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, Vol. 68, No. 6, pp. 2660–2665.
- M.G. VELIEV, B. DANIELSSON, M.A. SALAMONOV, S.R. ALIEVA, N.R. BEKTASHI: Biodegradation of Baku oil and hydrocarbons by micromycetes. *Petroleum Chemistry* 2008, Vol. 48, No. 1, pp. 56–62.
- K. SUGIURA, M. ISHIHARA, T. SHIMAUCHI, S. HARAYAMA: Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology* 1997, Vol. 31, No. 1, pp. 45–51.
- L.I. SVAROVSKAYA, D.A. FILATOV, T. GERELMAA, L.K. ALTUNINA: IR and ^1H NMR assessments of the biodegradation of oil. *Petroleum Chemistry* 2009, Vol. 49, No. 2, pp. 136–141.
- E.C. NELSON, S. GHOSHAL, J.C. EDWARDS, G.X. MARSH, R.G. LUTHY: Chemical characterization of coal-tar-water interfacial films. *Environmental Science & Technology* 1996, Vol. 30, No. 3, pp. 1014–1022.

Śliwka, E., Kolwzan, B., Kołodziej, K. Application of ^1H NMR Spectroscopy in Assessment of the Course of Hydrocarbon Contaminant Biodegradation. *Ochrona Środowiska* 2015, Vol. 37, No. 2, pp. 55–60.

Abstract: Suitability of ^1H NMR spectroscopy for evaluation of changes in chemical structure of petroleum substances (diesel and crude oils) and coal tar waste upon their biodegradation was assessed. Biodegradation was carried out for 14 days using bacterial strains isolated from petroleum-contaminated soil. Biodegradation effectiveness varied, amounting to 89% for diesel oil, 45% for crude oil and 26% for coal tar. ^1H NMR spectra analysis demonstrated major differences in the distribution of aliphatic and

aromatic protons between petroleum samples and coal tar. The aromaticity factor of petroleum substrates was about 3 times lower ($f_A=0.12$ and 0.14) and it increased in the biodegradation products. This confirms presence of aliphatic components, readily biodegradable, in petroleum substances. Major differences in the f_A parameter values indicate that it can be used to differentiate between the sources of hydrocarbon contamination in environmental samples. An additional advantage of the ^1H NMR technique is a small amount of analyte required for analysis and the non-destructive character of the technique.

Keywords: Nuclear magnetic resonance, petroleum substances, coal tar, biological degradation, soil treatment.