ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 2000
Seria: INŻYNIERIA ŚRODOWISKA z. 45 Nr kol. 1487

Ewa KWAPISZ, Małgorzata PIOTROWICZ-WASIAK, Joanna WILCZYŃSKA, Jacek POLAK, Edward GALAS

Politechnika Łódzka, Instytut Biochemii Technicznej
90-924 Łódź, ul Stefanowskiego 4/10

ZASTOSOWANIE GC DO ANALIZY ILOŚCIOWEJ POSTĘPU BIODEGRADACJI WYBRANYCH WĘGLOWODORÓW OLEJU NAPĘDOWEGO

Streszczenie. Zagadnienie doboru szybkich i precyzyjnych metod oznaczania stężenia węglowodorów w skażonych środowiskach jest ważne nie tylko dla oceny poziomu tych skażeń, ale i dla kontroli postępu procesu bioremediacji. Analiza pośrednich i końcowych produktów biodegradacji węglowodorów oleju napędowego prowadzona była z użyciem GC. Sprawdzono użyteczność dwóch metod obliczania stężeń wybranych węglowodorów; metody uproszczonego szacowania i z dodatkiem substancji oznaczanej. Podstawę do dyskusji nad przydatnością obu metod stanowiły dane uzyskane w wyniku hodowli dwóch szczepów bakterii w obecności oleju napędowego. Hodowle prowadzono w zróżnicowanych parametrach natlenienia. Uzyskane wyniki wskazują, że analiza z dodatkiem substancji oznaczanej daje szansę bardziej precyzyjnego oznaczenia ilości węglowodorów; metoda wstępnego szacowania może być użyta do oznaczania stężeń węglowodorów cięższych.

THE APPLICATION OF GC TO QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIODEGRADATION PROGRESS OF SELECTED FUEL OIL HYDROCARBONS

Summary. The problem of appropriate selection of fast and accurate methods of determination of hydrocarbons concentration in polluted sites is important not only for initial evaluation of pollution but also for following of bioremediation progress. GC was used for analysis of the intermediate and final products of petroleum oil biodegradation. The usefulness of two calculation methods for the concentration assessment of selected hydrocarbons was tested; the method of simplified assessment and second method with the addition of determined compound. Evaluation was based on the cultures of two bacterial strains in medium supplemented with petroleum oil. The cultures were carried out in various aeration conditions. The accurate quantitative assay of hydrocarbon is possible by the method with the addition of external standard and the simplified assessment can be applied for the quantification of heavier hydrocarbons.

WPROWADZENIE

Jednym z najpoważniejszych problemów ekologicznych ostatnich lat stało się skażenie środowiska substancjami ropopochodnymi. W celu identyfikacji miejsc skażeń oraz określenia stopnia zagrożenia wskazane jest dysponowanie szybkimi i wiarygodnymi metodami identyfikacji i oznaczenia tych związków. Dysponowanie takimi metodami jest również ważne dla oceny skuteczności procesów biodegradacji tych związków.

Jak wynika z dotychczasowych doświadczeń, szczególnie przydatna w tym przypadku jest chromatografia gazowa. Połączenie chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC-MS) daje możliwość stosunkowo szybkiej identyfikacji zarówno substratów, jak i produktów biodegradacji. Tradycyjna technika GC-FID umożliwia zarówno ocenę jakościową, jak i ilościową procesów biodegradacyjnych.

Specyfika substratu, jakim jest olej napędowy, mnogość znajdujących się w nim substancji, narzuca stosowanie specyficznych warunków rozdziału, identyfikacji i oznaczeń ilościowych poszczególnych związków w mieszaninie. Szczególnej uwagi wymaga opracowanie metod ilościowego oznaczania stężenia poszczególnych węglowodorów [1].

W ramach prowadzonych przez nas prób biodegradacji węglowodorów oleju napędowego przy użyciu szczepów S7 i G3 interesowało nas, które z tych węglowodorów zużywane są w pierwszej kolejności, jaki jest stopień ich biodegradacji, które z tych związków zaliczyć należy do grupy trudno degradowalnych. Zagadnienie to rozpatrywano stosując zróżnicowane parametry natlenienia.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakterii

Materiał biologiczny do badań stanowiły dwa szczepy bakterii, oznaczone symbolami S7 i G3 wyizolowane odpowiednio ze ścieków zakładów petrochemicznych i gleby.

Szczepy przechowywano na podłożu stałym, zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, zestaw soli mineralnych. Wartość pH podłoża regulowano przed sterylizacją do wartości 6,5. Powierzchnię podłoża na skosie pokrywano filmem sterylnego oleju napędowego w ilości 0,05 ml/10 cm^2 powierzchni pożywki. Również na tym podłożu przygotowywano inokulum do prowadzenia hodowli płynnych. Inokulum hodowano w ciągu dwóch dni w temperaturze 30°C.

Warunki hodowli wstrząsanej

Hodowle wstrząsane badanych szczepów prowadzono w podłożu A, stosując jako źródło węgla olej napędowy w stężeniu 6% wagowych. Próby prowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 500 ml wypełnionych podłożem w ilości 40, 60, 80 ml. Stężenie oleju napędowego wynosiło 6%. Szybkość obrotów wytrząsarki 220 obr/min, amplituda 4,5 cm, temperatura hodowli 30°C, czas hodowli - 14 dni.

Analiza chromatograficzna

Próby do analizy stanowiła faza organiczna otrzymana po odwirowaniu zawiesiny hodowlanej w wirówce firmy Beckman w następujących warunkach: 18 000 rpm, temp. 4°C,

czas 20 min. Próby pobierano w 2, 5, 7, 9, 12 i 15 dniu hodowli. Identyfikację wybranych węglowodorów obecnych w danych próbach wykonano przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego z detektorem masowym GC/MS 5890/5972 firmy Hewlett Packard. Urządzenie pracowało w systemie Scan, umożliwiającym identyfikację wszystkich związków chemicznych o ciężarze cząsteczkowym od 50 do 550 Da. Piki uzyskane na chromatografie identyfikowano według wewnętrznej biblioteki spektrometru masowego (nr NBS 75 KL).

Prowadzone w ramach pracy analizy stężenia węglowodorów wykonywano przy użyciu chromatografu wyposażonego w kolumnę kapilarną HP-1 (dł. 10 m, I.D. 0,53 mm) oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny FID. Temperatura nastrzyku wynosiła 300°C, temperatura detektora 300°C. Aparat zaopatrzony jest w komputerowy układ sterowania. Zadawanie próby odbywało się automatycznie. Stosowano następujące warunki rozdziału:

gaz nośny	He	5 ml/min
gaz kompensacyjny	He	20 ml/min
gazy pomocnicze	H_2	50 ml/min
	powietrze	500 ml/min
temperatura nastrzyku	350°C	
temperatura detektora	300°C	
program temperaturowy	40°C	przez 2 min
	40°C → 260°C	z szybkością 4°C/min
	260°C	przez 10 min.

Do oznaczenia ubytku 14 wybranych węglowodorów oleju napędowego podczas degradacji oleju napędowego z udziałem szczepów G3 i S7, hodowanych w zmiennych warunkach natlenienia, zastosowano dwie metody:

a) uproszczoną metodę szacowania stężenia tych związków na podstawie różnic pola powierzchni pod odpowiadającymi im pikami,
b) metodę z dodatkiem substancji oznaczanej [1].

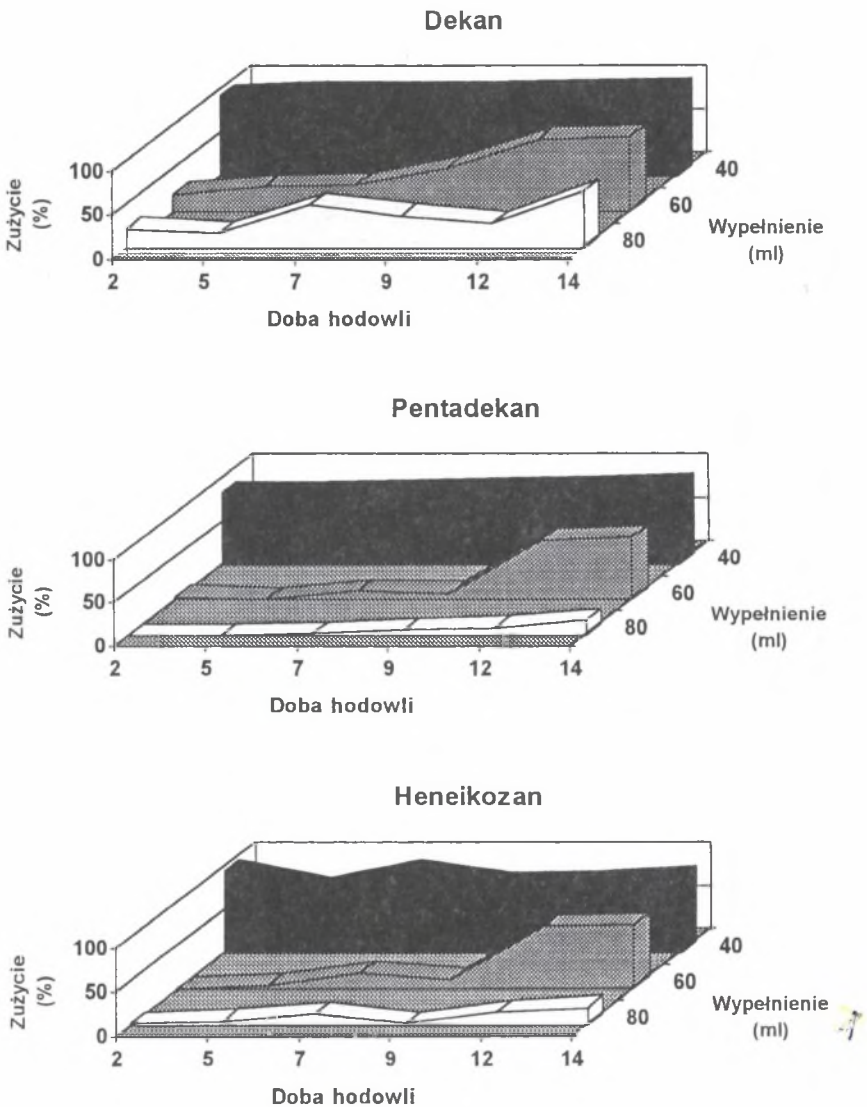
WYNIKI BADAŃ

Chromatografia gazowa znalazła szerokie zastosowanie w analityce związków ropopochodnych. Wymieniana jest w grupie najlepszych technik rozdzielania złożonych mieszanin węglowodorów i innych związków organicznych, zarówno pochodzenia naftowego, jak i petrochemicznego [2]. W ramach pracy podjęto próbę oznaczenia ubytku wybranych 14 węglowodorów, głównych składników oleju napędowego, podczas procesu biodegradacji prowadzonej z udziałem dwóch szczepów bakterii G3 i S7. Szczepy te wykazują zróżnicowaną aktywność degradacyjną w zależności od zastosowanych parametrów natlenienia [3]. Chcąc oznaczyć ilościowo różnice w zużyciu poszczególnych węglowodorów w zastosowanych parametrach aeracji (wypełnienie kolb 40, 60 i 80 ml) sprawdzono użyteczność dwóch metod obliczania stężeń tych związków: metody uproszczonego szacowania opierającej się na porównaniu pól powierzchni pików odpowiadających wybranym związkom oraz metody z dodatkiem substancji oznaczanej. Jako dodatków substancji oznaczanych użyto: tridekanu, pentadekanu, i oktadekanu. Praca stanowi próbę analizy użyteczności tych metod do analizy postępu procesu biodegradacji węglowodorów oleju napędowego z udziałem drobnoustrojów.

Tabela 1

Wpływ warunków natlenienia (wypełnienia kolby podłożem) na dynamikę degradacji 14 głównych węglowodorów oleju napędowego przez szczep G3

Lp.	Węglowodór	Wypełnienie (ml)	Zużycie węglowodorów (%)					
			Doba hodowli					
			2	5	7	9	12	14
1.	Nonan	40	85	94	99	99	-	98
		60	36	60	61	80	93	94
		80	39	56	83	69	97	97
2.	Dekan	40	91	94	94	95	-	98
		60	20	29	31	50	82	84
		80	21	17	48	36	28	63
3.	Undekan	40	79	81	83	84	-	92
		60	8	10	15	26	74	76
		80	-16	6	22	15	13	38
4.	Dodekan	40	70	85	75	76	-	86
		60	4	4	10	16	71	73
		80	4	3	11	8	10	25
5.	Tridekan	40	75	86	78	78	-	87
		60	-2	-3	8	11	69	71
		80	1	2	3	3	7	19
6.	Tetradekan	40	68	68	72	72	-	84
		60	1	-4	9	11	69	72
		80	-3	3	4	4	9	17
7.	Pentadekan	40	82	82	84	85	-	91
		60	3	-6	10	7	68	71
		80	-3	0	1	5	8	17
8.	Heksadekan	40	77	74	95	96	-	98
		60	1	0	11	9	64	72
		80	0	6	4	6	-4	18
9.	Heptadekan	40	88	89	91	94	-	94
		60	5	2	13	12	70	71
		80	0	8	7	8	13	20
10.	Oktadekan	40	31	46	45	87	-	88
		60	-15	0	-5	-1	70	67
		80	-19	5	-8	-9	15	3
11.	Nonadekan	40	90	90	83	85	-	90
		60	-18	6	13	-14	60	63
		80	-28	-38	-22	4	-20	2
12.	Eikozan	40	82	83	84	85	-	91
		60	4	5	16	-8	62	73
		80	1	8	8	11	-8	21
13.	Heneikozan	40	93	72	93	77	-	86
		60	1	4	17	10	70	72
		80	1	4	12	2	14	19
14.	Dokozan	40	82	82	85	86	-	90
		60	4	5	18	13	71	73
		80	2	8	7	8	14	19



Rys. 1. Dynamika biodegradacji dekanu, pentadekanu i heneikozanu przez szczep G3 podczas hodowli z zastosowaniem różnych parametrów natlenienia

Fig. 1. Time course of biodegradation of decan, pentadecan and heneicosan by strain G3 in cultures performed in different aeration conditions

Z danych uzyskanych z hodowli szczepu G3 w obecności 6% oleju napędowego (tabela 1) widać, że w warunkach natlenienia odpowiadających wypełnieniu 40 ml wartości stopnia zużycia wybranych 14 węglowodorów zawarte są w przedziale 84-98%. Zmniejszenie stopnia natlenienia przy wypełnieniu 60 ml powoduje obniżenie dolnej granicy zużycia

węglowodorów do 63%. (63%-94%). Najniższy z zastosowanych parametrów aeracji powoduje spadek wykorzystania węglowodorów do 2%-25%. Węglowodory, takie jak oktadekan i nonadekan, były asymilowane zaledwie z wydajnością 2%-3%. Mimo niskich wartości natlenienia (80 ml) obserwowano wysoki stopień zużycia najlżejszych spośród zidentyfikowanych węglowodorów, tj. nonanu, dekanu i undekanu. Stopień degradacji tych węglowodorów wynosił odpowiednio 97%, 63% i 38%.

Jak widać z danych zamieszczonych w tabeli 1, dynamika ubytku poszczególnych węglowodorów, przy zmiennych warunkach natlenienia, znacznie się różni w zależności od parametrów aeracji. Przy wypełnieniu - 40 ml podłoża wszystkie węglowodory, z wyjątkiem oktadekanu, były już w drugiej dobie hodowli zużywane w bardzo dużym stopniu. W 60 ml podłoża węglowodory C_{11} – C_{22}, aż do 9 doby hodowli zużywane były w niewielkim stopniu. W objętości – 80 ml proces biodegradacji jest wyraźnie limitowany. W przypadku niektórych węglowodorów obserwowano przejściowe gromadzenie się wymienionych węglowodorów w czasie hodowli. Wpływ natlenienia oraz dynamikę zużywania dekanu, pentadekanu i heneikozanu przez szczep G3 obrazuje rysunek 1.

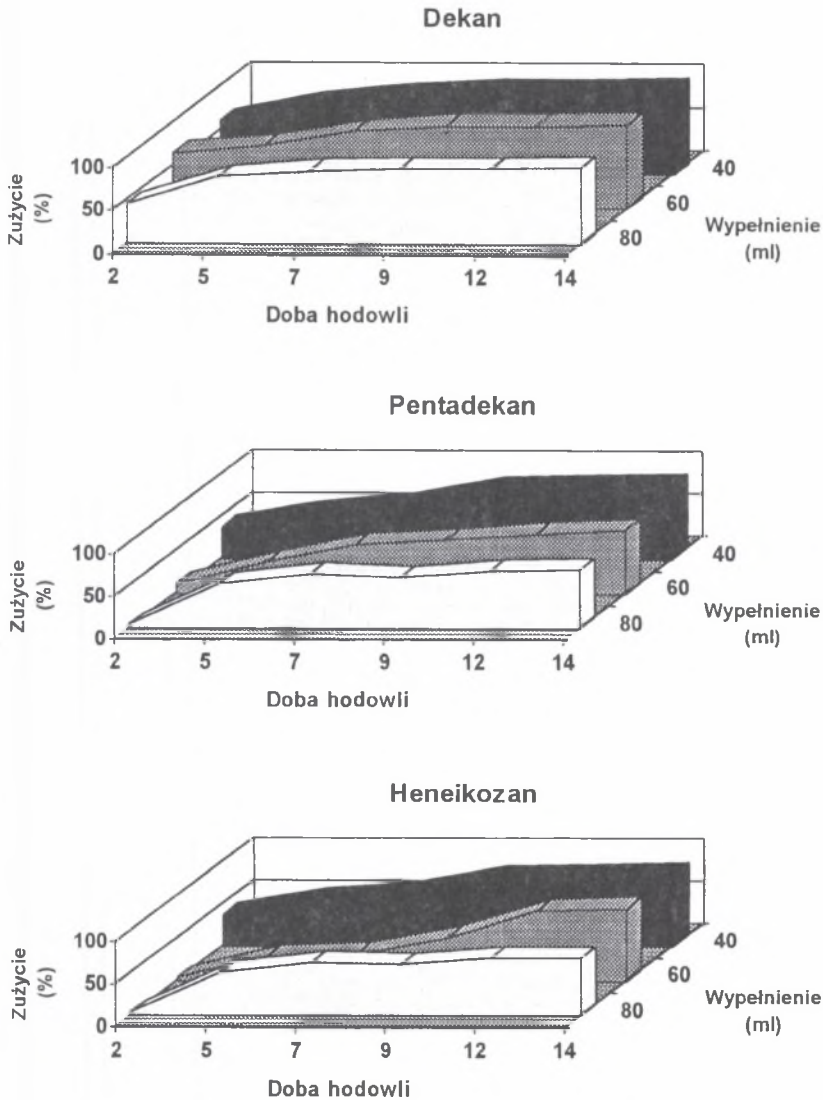
Z danych zawartych w tabeli 2, dotyczącej przebiegu degradacji węglowodorów oleju napędowego z udziałem szczepu S7, widać, że szczep ten wykazuje silne zdolności degradacyjne we wszystkich zastosowanych parametrach natlenienia. Przy wypełnieniu kolb 40 ml wykorzystanie wymienionych w tabeli węglowodorów w ciągu 14 dni hodowli mieściło się w granicach 84-96%. Przy wypełnieniu 60 ml ubytek ten wynosił 62-98%. Warunki natlenienia odpowiadające wypełnieniu 80 ml pozwalają na degradację tych związków w ilości 55-98%. Dynamika zużywania poszczególnych węglowodorów dla szczepu S7 różni się bardzo od tej, obserwowanej dla szczepu G3. W ciągu całej hodowli zużycie 14 badanych węglowodorów utrzymuje się na stałym, wysokim poziomie. Jedynie do drugiej doby hodowli w gorszych z zastosowanych parametrach natlenienia obserwowano dość niski procent ubytku węglowodorów leżących w szeregu powyżej dodekanu. Obserwowano również przejściowe gromadzenie nonadekanu. Wpływ natlenienia na szybkość asymilacji pięciu wybranych węglowodorów przez szczep S7 obrazuje rysunek 2. Dane w nim przedstawione, podobnie jak wartości zamieszczone w tabeli 2, obliczono metodą wstępnego szacowania.

Zarówno szczep G3, jak i szczep S7 z największą szybkością wykorzystują węglowodory od nonanu do dodekanu. Obserwacja ta dotyczy wszystkich analizowanych warunków natlenienia. Do związków trudno degradowanych przez badane szczepy zaliczyć należy nonadekan.

Tabela 2

Wpływ warunków natlenienia (wypełnienia kolby podłożem) na dynamikę degradacji 14 głównych węglowodorów oleju napędowego przez szczep S7

Lp.	Węglowodór	Wypełnienie (ml)	Zużycie węglowodorów (%)					
			Doba hodowli					
			2	5	7	9	12	14
1.	Nonan	40	53	81	92	89	-	91
		60	54	-	94	96	97	98
		80	90	91	91	94	94	98
2.	Dekan	40	59	80	90	94	-	96
		60	63	-	88	95	95	97
		80	44	76	83	86	86	88
3.	Undekan	40	47	72	83	91	-	93
		60	49	-	80	86	87	90
		80	25	73	78	81	81	64
4.	Dodekan	40	42	61	72	85	-	89
		60	25	-	66	71	75	80
		80	14	58	67	68	71	73
5.	Tridekan	40	39	57	68	84	-	87
		60	15	-	60	67	71	77
		80	7	54	64	63	68	69
6.	Tetradekan	40	37	56	65	83	-	86
		60	10	-	61	64	70	76
		80	8	53	64	62	68	69
7.	Pentadekan	40	36	53	63	82	-	86
		60	11	-	57	63	69	74
		80	5	51	63	59	66	68
8.	Heksadekan	40	37	48	64	82	-	86
		60	5	-	58	63	67	74
		80	7	50	61	59	66	68
9.	Heptadekan	40	37	53	63	82	-	86
		60	9	-	60	65	69	75
		80	8	52	63	62	68	69
10.	Oktadekan	40	47	54	64	82	-	88
		60	8	-	52	57	67	74
		80	6	42	56	61	63	67
11.	Nonadekan	40	46	53	63	81	-	88
		60	-20	-	47	50	59	62
		80	-21	35	54	49	54	55
12.	Eikozan	40	14	33	60	81	-	85
		60	0	-	58	63	67	74
		80	-14	48	54	59	66	67
13.	Heneikozan	40	36	53	61	81	-	85
		60	4	-	58	64	67	72
		80	5	49	61	60	66	66
14.	Dokozan	40	30	45	57	80	-	84
		60	19	-	66	63	72	77
		80	7	51	61	61	66	66



Rys. 2. Dynamika biodegradacji dekanu, pentadekanu i heneikozanu przez szczep S7 podczas hodowli przy różnym natlenieniu

Fig. 2. Time course of biodegradation of decan, pentadecan and heneicosan by strain S7 in cultures performed in different aeration conditions

Analizę stopnia wykorzystania trzech węglowodorów tridekanu, pentadekanu i oktadekanu przeprowadzono również metodą z dodatkiem substancji oznaczanej. Próby te wykonano tylko dla pozostałości frakcji organicznej po biodegradacji prowadzonej z udziałem szczepu S7. Porównanie wartości obrazujących stopień zużycia tych węglowodorów, obliczone metodą uproszczonego szacowania i oznaczenia metodą z dodatkiem substancji oznaczanej, przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Zestawienie wyników oznaczania zużycia węglowodorów metodą wstępnego szacowania i z dodatkiem substancji oznaczanej

Szczep	Wypełnienie	Zużycie węglowodorów					
		Tridekan		Pentadekan		Oktadekan	
		szacowanie	ilościowa	szacowanie	ilościowa	szacowanie	ilościowa
S7	40	68	91	86	78	88	95
	60	71	45	74	67	74	78
	80	68	70	68	57	67	72

Analiza ilościowa z dodatkiem substancji oznaczanej daje szansę bardziej precyzyjnego oznaczenia wykorzystania poszczególnych węglowodorów w porównaniu z metodą wstępnego szacowania. Uzyskane w ramach pracy różnice wartości stężeń tridekanu, pentadekanu i oktadekanu, oznaczone wyżej wymienionymi metodami, wynoszą odpowiednio ±17, ±8, i –5%. Jak widać, rozbieżności wyników maleją ze wzrostem ciężaru cząsteczkowego węglowodorów. Zatem można uznać, że przy oznaczaniu węglowodorów cięższych od pentadekanu można się oprzeć na danych uzyskanych metodą wstępnego szacowania. W przypadku węglowodorów lżejszych zalecić należy wykonanie bardziej dokładnej analizy, np. zastosowanej w pracy metody z dodatkiem substancji oznaczanej.

LITERATURA

1. Rodel W., Wolm G.: *Chromatografia gazowa*. PWN, Warszawa 1992.
2. Voelkel A., Olszanowski A., Dziurla E., Janas J.: *Zastosowanie metod chromatograficznych do badań produktów biodegradacji związków organicznych za pomocą preparatów bakteryjnych*. Toruń 1994.
3. Kwapisz E., Galas E., Piotrowicz-Wasiak M.: *Role of nitrogen source and aeration conditions in fuel oil biodegradation by some bacterial strains*. 9th European Congress on Biotechnology, Brussels, Belgium, P2139, 1999.

Abstract

The problem of appropriate selection of fast and accurate methods of determination of hydrocarbons concentration in polluted sites is important not only for initial evaluation of pollution but also for following of bioremediation progress. GC was used for analysis of the intermediate and final products of petroleum oil biodegradation. The usefulness of two

calculation methods for the concentration assessment of selected hydrocarbons was tested; the method of simplified assessment and second method with the addition of external standard. Evaluation was based on the cultures of two bacterial strains in medium supplemented with petroleum oil. The cultures were carried out in various aeration conditions. Bacteria of strain S7 expressed high ability to degradation of selected hydrocarbons in the range from nonane to docosane, which was almost independent on aeration conditions. In the case of strain G3 poor aeration caused delay in hydrocarbons degradation. The accurate quantitative assay of hydrocarbon is possible by the method with the addition of determined compound and the simplified assessment can be applied for the quantification of heavier hydrocarbons.

Recenzent: Prof. dr hab. Barbara Maliszewska-Kordybach