

# **Metody analityczne w ocenie jakości wody**



ANNA GACEK

---

# **Metody analityczne w ocenie jakości wody**

Usuwanie związków ropopochodnych  
metodami hybrydowymi

Wydawnictwo Naukowe SCHOLAR  
Warszawa 2021



Recenzenci:

dr hab. Marzenna Popek, prof. UMG

dr hab. inż. Tomasz Wasilewski, prof. UTH Rad.

Redaktor prowadzący:

Piotr Małyшко

Redakcja i korekta:

Jerzy Lewiński

Okładka:

Katarzyna Juras

Publikacja została dofinansowana przez Uniwersytet Ekonomiczny  
w Krakowie

Copyright © 2021 by Wydawnictwo Naukowe Scholar, Warszawa

ISBN 978-83-66849-23-5

Wydawnictwo Naukowe Scholar Spółka z o.o.

ul. Oboźna 1, 00-340 Warszawa

tel. 22 692 41 18; 22 826 59 21; 22 828 93 91

dział handlowy: jak wyżej, w. 108

e-mail: [info@scholar.com.pl](mailto:info@scholar.com.pl)

[www.scholar.com.pl](http://www.scholar.com.pl)

Wydanie pierwsze

Skład i łamanie: WN Scholar (*Jerzy Łazarzski*)

Druk i oprawa: [www.druk-24h.com.pl](http://www.druk-24h.com.pl)

## Spis treści

<b>Wprowadzenie</b> .....	7
<b>1. Akty prawne obowiązujące w Polsce dotyczące zanieczyszczeń wód substancjami ropopochodnymi</b> .....	13
<b>2. Węglowodory ropopochodne jako czynniki obniżające jakość środowiska wodnego</b> .....	22
2.1. Charakterystyka produktów ropopochodnych .....	22
2.2. Znaczenie substancji ropopochodnych dla środowiska i zdrowia człowieka .....	33
<b>3. Metody oznaczania substancji ropopochodnych w wodzie</b> .....	37
3.1. Fluorescencja w wodach naturalnych .....	44
3.2. Spektroskopia fluorescencyjna w badaniach węglowodorów ropopochodnych .....	46
<b>4. Oczyszczanie wód ze związków ropopochodnych</b> .....	63
4.1. Bioremediacja w środowisku wodnym .....	63
4.2. Biodegradacja w obecności wybranych surfaktantów – saponin .....	80
4.3. Fotoliza i utlenianie chemiczne .....	82
<b>5. Ocena zmian jakości wody podczas procesu oczyszczania</b> .....	95
5.1. Metodyka badań i wykorzystane materiały .....	96
5.1.1. Gromadzenie środowiskowych próbek wody .....	98
5.1.2. Stosowane odczynniki chemiczne .....	99
5.1.3. Charakterystyka fluorymetrycznej metody oznaczania substancji ropopochodnych w wodzie .....	99
5.1.4. Analiza spektralna filtrów zastosowanych do pomiarów fluorymetrycznych .....	102
5.1.5. Separacja mechaniczna zanieczyszczeń ropopochodnych .....	102
5.1.6. Procedura fotochemicznego rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych .....	104
5.1.7. Procedura procesu bioremediacji .....	107

5.2. Badania separacji mechanicznej substancji ropopochodnych . . . . .	114
5.3. Badania fotochemiczne substancji ropopochodnych . . . . .	120
5.4. Badania bioremediacji substancji ropopochodnych . . . . .	129
5.4.1. Skuteczność biodegradacji substancji ropopochodnych w teście statycznym . . . . .	130
<b>6. Modelowe układy hybrydowe . . . . .</b>	<b>138</b>
<b>Wnioski . . . . .</b>	<b>146</b>
<b>Załącznik. Tabela MNP . . . . .</b>	<b>151</b>
<b>Bibliografia . . . . .</b>	<b>153</b>
<b>Spis rysunków i tabel . . . . .</b>	<b>180</b>
<b>Indeks nazwisk . . . . .</b>	<b>184</b>

## Wprowadzenie

*Woda nie jest produktem handlowym takim jak każdy inny,  
ale raczej dziedzicznym dobrem,  
które musi być chronione, bronione i traktowane jako takie.*

(Ramowa dyrektywa wodna 2000).

Często spotykana opinia, że wodę można spotkać tylko na Ziemi, jest kompletnie błędna. Występuje ona w trzech postaciach: gazowej, ciekłej i stałej, i we wszystkich trzech znajduje się w kosmosie. Cząsteczki pary wodnej wykryto w atmosferach przynajmniej trzech planet Układu Słonecznego. Obłoki pary wodnej znajdują się także w przestrzeni kosmicznej. Badania (Moneti i in. 2001) pokazały, że wszechświat jest bardziej obfity w wodę, niż oczekiwano – w rzeczywistości jest to trzecia najliczniejsza cząsteczka w zimnych regionach Drogi Mlecznej, które są kolebką takich gwiazd jak Słońce i układów słonecznych, takich jak nasz. Średnia temperatura wody w tych regionach wynosi  $-263^{\circ}\text{C}$ . W zimnej chmurze o masie tysiącrotnie większej od Słońca ilość wody (łodu i pary) odpowiada około stu masom Jowisza, a szacuje się, że w Drodze Mlecznej są miliony zimnych chmur. Badania (Moneti i in. 2001) pozwoliły również na określenie, ile wody jest w postaci gazowej, a ile „zamrożonej”: 99% wody to lód skondensowany na zimnych ziarnach pyłu, podczas gdy tylko 1% ma postać gazową.

Woda w postaci ciekłej nie istnieje w przestrzeni kosmicznej, ponieważ temperatura i ciśnienie tam panujące na to nie pozwalają. Woda w stanie ciekłym znajduje się natomiast na co najmniej kilku obiektach Układu Słonecznego. W tej postaci występuje na pewno na Ziemi, czasem również na Marsie (Martín-Torres i in. 2015; Ojha 2015), najprawdopodobniej na księżycach Jowisza (Paganini i in. 2020), ale także na księżycach Saturna (Iess i in. 2014; Platt, Bell 2014; Witze 2014), a na jednym z nich – Enceladusie – z całą pewnością.

Cząsteczka wody, dwa atomy wodoru i jeden atom tlenu, jest stosunkowo prosta. Ponieważ występuje we wszechświecie powszechnie, bardzo często wiąże się ją z obecnością życia. Życie, jakie znamy, jest uzależnione od wody. Na Ziemi

woda jest substancją warunkującą jego istnienie, tworzy 60–80% masy żywych organizmów tutaj występujących, w tym człowieka. Woda całkowita w organizmach ludzi, w zależności od zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie, płci i wieku, stanowi ok. 45–65% (średnio 60%) masy ciała (Badowska-Kozakiewicz 2013). Aby jednak życie zaistniało i zakwitło, musi być spełnionych wiele różnych warunków. Jednym z nich jest jakość wody, gdyż ona determinuje, kim jesteśmy i jaka jest otaczająca nas przyroda. Ponieważ woda jest bardzo dobrym rozpuszczalnikiem, właściwie jedynie laboratoryjnie można otrzymać ją w czystej postaci – nie znajdziemy takiej w środowisku. Naturalnie występująca woda zawiera dużo rozpuszczonych w sobie soli, głównie chlorku sodu (około 97% wód na Ziemi), ale również rozpuszczone są w niej gazy atmosferyczne, z których w największym stężeniu znajduje się dwutlenek węgla. W zależności od rodzaju i ilości rozpuszczonych w niej substancji woda może wykazywać właściwości zarówno lecznicze, jak i toksyczne. Zawarte w niej mikro- i makrozanieczyszczenia mają wpływ na rozwój organizmów żywych, mogą zmieniać ich cechy, samopoczucie, bezwarunkowe reakcje. Niebagatelne znaczenie mają również zanieczyszczenia mikrobiologiczne, które mogą być szkodliwe dla człowieka, zwierząt i roślin. Woda naturalna w wielu przypadkach przed zastosowaniem musi zostać uzdatniona i dotyczy to zarówno wody pitnej, jak i przemysłowej. Zdając sobie sprawę z konieczności utrzymania dobrej jakości wody, należy rozważyć, czy któreś ze wspomnianych wcześniej kosmicznych jej źródeł będzie w stanie uchronić nas przed niedostatkami dobrej jakości wody na Ziemi. Obecnie (2021) tego jeszcze nie wiadomo, a problem braku podstawowej do życia substancji wydaje się coraz bardziej palący.

Woda ma więc podstawowe znaczenie dla wszystkich form życia i jest tym samym jednym z najważniejszych zasobów na Ziemi. Niezbędna jest dla rozwoju ekosystemów, determinuje działania gospodarcze i rozwój cywilizacyjny, w znacznym stopniu decyduje o poziomie życia społeczeństwa. Sposób, w jaki produkuje się żywność, wytwarza energię, pozbywa odpadów i konsumuje zasoby, niszczy równowagę natury w zakresie czystego powietrza, wody i gleby, od której zależy przetrwanie wszystkich gatunków, w tym ludzi. Dostępność wody odpowiedniej jakości i w odpowiedniej ilości jest konieczna do podtrzymania życia i do wszelkiej aktywności człowieka. Niska jakość wody wpływa niekorzystnie na możliwość jej zagospodarowania w przemyśle, może zmniejszać atrakcyjność turystyczną regionu, obniża jej zdatność do spożycia przez ludzi, a tym samym powoduje generowanie dodatkowych kosztów w całokształcie działalności gospodarczej na terenie danego obszaru: przemysłu, rolnictwa, budownictwa, transportu, handlu itd.

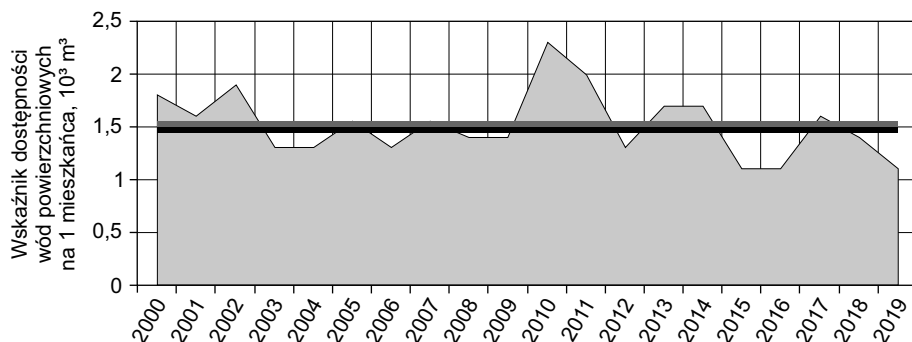
Zanieczyszczenie wody jest globalnym problemem dotyczącym zarówno krajów rozwiniętych, jak i rozwijających się. Szczególne znaczenie ma degradacja wód słodkich, które stanowią niespełna 3% wszystkich wód występujących na Ziemi. Podkreślenia wymaga jednak fakt, że jedynie 1% to woda słodka



użyteczna dla ludzi, gdyż pozostałe 2% jest uwięzione w lodowcach. W Polsce z ogólnej sumy wód większość stanowią zasoby wód powierzchniowych, natomiast pozostała część to wody podziemne.

Wielkość zasobów wody słodkiej na Ziemi w wyniku działalności człowieka i zanieczyszczenia naturalnego stała się jednym z najczęściej dyskutowanych zagadnień środowiskowych. Nieumiarkowany pobór wody, zarówno w celu nawadniania w rolnictwie, jak i do użytku przemysłowego i na potrzeby rozwoju obszarów miejskich, stanowi jedno z podstawowych zagrożeń dla środowiska wodnego w całej Unii Europejskiej. Również zmiany klimatu i związane z nimi wzrost częstotliwości i intensywności susz powodują szkody w środowisku i gospodarce. Przykładem obrazującym zasięg tych strat jest stan rolnictwa we Włoszech będący wynikiem susz w lecie 2017 r. – straty szacuje się na 2 mld euro. W przewidywaniach dotyczących stanu wody podkreślana jest utrzymująca się tendencja do co raz większych jej niedoborów. Problem ten będzie dotyczył wszystkich krajów członkowskich UE (COM/2018/337 final – 2018/0169 [COD]).

Sumarycznie wielkość wód słodkich na ziemi oszacowana jest na 35 mln m<sup>3</sup>, z czego 2/3 zretencjonowane jest w lodowcach i pokrywie śnieżnej. Wody podziemne są drugim co do wielkości jej źródłem i gromadzą ok. 29,6% zasobów, natomiast rzeki, słodkie jeziora i płytkie wody podziemne stanowią zaledwie 0,4% objętości wszystkich wód słodkich (Bajkiewicz-Grabowska, Mikulski 2013). Całkowite zasoby wodne na świecie szacuje się również na 43 750 km<sup>3</sup>/rok. Ameryka jako cały kontynent ma największy udział w światowych zasobach słodkiej wody wynoszący 45,3%, następnie Azja – 28,5%, Europa – 15,2%, Afryka – 9% i Oceania – 2,1% (Review of World Water Resources 2003). Średnio w Europie na jednego człowieka przypada 5100 m<sup>3</sup> wody rocznie. Do oceny wielkości zasobów wód stosowany jest tzw. wskaźnik dostępności wód powierzchniowych, który określa wielkość ich odpływu (z terytorium kraju łącznie z dopływami z zagranicy) w ciągu roku w przeliczeniu na jednego mieszkańca. Źródłem prawie wszystkich zasobów wody w Polsce są opady atmosferyczne, podczas gdy dopływ spoza granic kraju w bilansie wodnym wynosi kilka procent. W Polsce średni wskaźnik dostępności wód powierzchniowych w latach 2000–2019 wyniósł nieznacznie powyżej 1500 m<sup>3</sup> (szara linia na rys. 1). Jest on ponad trzy razy mniejszy od średniej europejskiej (i 4,5 razy mniejszy od średniej światowej), co czyni nasz kraj jednym z najuboższych w wodę w Europie. Wskaźnik dostępu do wody niższy od 1500 m<sup>3</sup> na osobę rocznie uważany jest za bardzo niski i wywołuje poważne trudności w gospodarowaniu jej zasobami. Przykładem tego jest występowanie na części obszaru Polski trudności w zaopatrzeniu w wodę z powodu wysychania mniejszych rzek nawet na kilka miesięcy. Rysunek 1 przedstawia zmiany wskaźnika dostępności wód powierzchniowych w Polsce od roku 2000 do 2019. Linia czarną zaznaczono poziom krytyczny dostępności wody (1500 m<sup>3</sup> rocznie na osobę).



**Rysunek 1.** Wskaźnik dostępności wód powierzchniowych na 1 mieszkańca w Polsce w latach 2000–2019

Źródło: opracowanie własne na podstawie: GUS Białystok, grudzień 2020.

W Raporcie o stanie środowiska w Polsce z 2018 r. (GIOŚ, Raport 2018, s. 112) Główny Inspektorat Ochrony Środowiska pisze: „Podstawowym problemem w zakresie zaopatrzenia w wodę ludności jest w dalszym ciągu mała dostępność wody wysokiej jakości, pomimo wyraźnego spadku wielkości poborów wody przez przemysł i gospodarstwa domowe w ostatnim dziesięcioleciu”. Doceniając kluczowe znaczenie słodkiej wody powierzchniowej i zdając sobie sprawę z ograniczeń wielkości zasobów wodnych, warto podjąć stosowne działania umożliwiające redukcję zagrożeń.

Zagadnienia jakości oraz czystości wody są przedmiotem zainteresowania nie tylko Polski, ale wszystkich sektorów gospodarek krajów UE. Sytuacja ta wynika z poważnego problemu będącego udziałem wielu państw członkowskich, mianowicie destruktywnego wpływu niedoboru wody na środowisko i gospodarkę. Kwestia deficytu wody dotyczy jednej trzeciej terytorium UE. Rosnące zapotrzebowanie na nią wraz ze zmianami klimatu przyczyniają się do traktowania zagadnienia wystarczającej ilości i jakości wody w sposób najbardziej priorytetowy (COM/2018/337 final – 2018/0169 [COD]). Poza doskonaleniem procesów efektywnego wykorzystywania dostępnej wody bardzo cenne staje się powtórne wykorzystanie oczyszczonych ścieków w bezpiecznych i opłacalnych warunkach. Podjęcie odpowiednich działań w tym kierunku stworzy korzystne warunki odciążenia nadmiernie eksploatowanych zasobów wodnych. Ponowne wykorzystanie wód skutkuje również wieloma innymi zaletami, np. w rolnictwie pomaga w recyklingu składników odżywczych, pokrywając zapotrzebowanie na nie roślin, i tym samym przyczynia się do redukcji użycia nawozów stałych (COM [2015] 614). Problemy zapewniania jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego wód regulowane są przepisami prawnymi zarówno w skali krajowej, jak i europejskiej. Kontrola jakości dotyczy nie tylko wód przeznaczonych do spożycia przez ludzi, ale również obejmuje wody

powierzchniowe i podziemne, z których korzysta bezpośrednio lub pośrednio każdy człowiek.

Aby zmierzyć się z palącym problemem zbliżającego się niedostatku wód słodkich, niezbędne jest efektywniejsze zarządzanie zasobami wodnymi. W komunikacie Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie niedoboru wody i susz (COM[2007] 414 final) stwierdzono, że kwestią priorytetową staje się oszczędzanie wody, natomiast wszelkie możliwości bardziej oszczędnego gospodarowania nią powinny zostać zbadane. Przykładowo w ramach zintegrowanego podejścia w zakresie zarządzania wodą oczyszczone ścieki z oczyszczalni ścieków komunalnych stanowią alternatywne źródło zaopatrzenia w nią do różnych celów. Ponowne wykorzystanie oczyszczonych wód ma pozytywny wpływ na środowisko, oferując wiele korzyści ekologicznych, gospodarczych i społecznych. Dodatkowo proces ten wydłuża cykl życia wody i pozostając w zgodzie z założeniami gospodarki o obiegu zamkniętym, przyczynia się do oszczędzania zasobów wodnych.

Systemy oczyszczania wód i usuwania z nich substancji niepożądanych czy toksycznych praktykowane w różnych krajach UE mogą znacznie się różnić. W związku z rosnącą liczbą zanieczyszczeń antropogenicznych utrzymują się jednak na poziomie znacznie poniżej swojego pełnego potencjału. Stale rosnące wymagania co do jakości wody przeznaczonej do picia i na cele przemysłowe wymuszają stosowanie coraz bardziej rozbudowanych układów technologicznych i poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych metod oczyszczania. Tradycyjne metody, np. mechaniczne, są niewystarczające. Metody chemiczne czy biologiczne generują nowe zanieczyszczenia, które też muszą być usuwane. Dlatego nowoczesne układy technologiczne są złożone z wielu procesów jednostkowych (Anielak 2021). Coraz częściej są stosowane metody katalityczne, elektroliza, flotacja, sorpcja czy procesy membranowe. Produkuje się nowe adsorbenty, złoża filtracyjne czy masy katalityczne.

Książka ta wpisuje się w nurt badań dotyczących metod służących poprawie czystości i ocenie jakości wód. Jej przedmiotem jest wykorzystanie systemów hybrydowego oczyszczania wód powierzchniowych obejmujących zaawansowane procesy utleniania i bioremediację za pomocą metod spektroskopii fluorescencyjnej w celu kontroli jakości procesów oczyszczania. Przedstawiono w niej takie zagadnienia, jak:

- stan prawny dotyczący czystości wód;
- znaczenie węglowodorów ropopochodnych w odniesieniu do zdrowia człowieka;
- obecność substancji ropopochodnych w wodzie, ze szczególnym uwzględnieniem węglowodorów ropopochodnych;
- metody wysokoefektywnego usuwania zanieczyszczeń, także o niewielkich stężeniach granicznych;

- modelowy układ technologiczny i metody stosowane w układach oczyszczania wody;
- wykorzystywane urządzenia procesowe oraz wartości ich parametrów techniczno-technologicznych.

W części empirycznej przedstawiono wyniki własnych badań dotyczących usuwania wybranych związków pochodzących z przeróbki ropy naftowej oraz ogólne zagadnienia związane z metodami badań fluorescencyjnych i ich zastosowaniami. Zaprezentowano również modelowy układ hybrydowy oczyszczania wody w kontekście racjonalności pod względem kosztów stosowania przy jednoczesnym zapewnieniu wysokiego poziomu ochrony zdrowia publicznego i środowiska. Ustalono minimalne wymogi (parametry odniesienia czynników zanieczyszczających) dotyczące jakości odzyskanej wody na kolejnych etapach oczyszczania. Odzysk oczyszczonej wody w proponowanym wariantcie usuwania związków ropopochodnych wynosi 98%. Podjęcie badań i działań poprawiających jakość wody przyczyni się do zmniejszenia jej deficytu, który dziś jest faktem w UE, oraz pomoże w zwiększeniu recyklingu wody i stosowaniu bezpiecznych metod jej ponownego wykorzystania.

Badania do niniejszej publikacji zostały wykonane w ramach rozprawy doktorskiej „Skuteczność fizyko-chemicznych i hybrydowych metod usuwania związków ropopochodnych ze środowiska wodnego”. Publiczna obrona rozprawy odbyła się w roku 2019, a jej pełny tekst dostępny jest w bibliotece Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie. W książce uwzględniono uwagi recenzentów rozprawy oraz dokonano niezbędnych aktualizacji. Jest to wersja skrócona, w której ocena jakości wód została ograniczona do wód stojących.

Pragnę podziękować promotorowi rozprawy doktorskiej Panu prof. dr. hab. Andrzejowi Gajewskiemu za opiekę naukową, dr. inż. Przemysławowi Szopie, promotorowi pomocniczemu, za wsparcie i konsultacje podczas prac nad dysertacją. Podziękowania kieruję również do pań recenzentek: prof. UEP dr hab. Ewy Sikorskiej oraz prof. UMG dr hab. Marzenny Popek, których cenne uwagi merytoryczne stanowiły pomoc podczas opracowywania tej publikacji.

## 1. Akty prawne obowiązujące w Polsce dotyczące zanieczyszczeń wód substancjami ropopochodnymi

Podczas milenijnego szczytu Narodów Zjednoczonych w 2000 r. oraz w trakcie Światowego Szczytu Zrównoważonego Rozwoju w Johannesburgu w 2002 r. światowi przywódcy z bogatych i biednych krajów uznali kluczowe znaczenie słodkiej wody powierzchniowej i podziemnej dla rozwoju człowieka. Zobowiązali się do zmniejszenia o połowę liczby ludzi, którzy nie mają dostępu do czystej, pitnej wody lub nie mają środków, by się w nią zaopatrzyć, oraz ludzi pozbawionych dostępu do odpowiednich urządzeń sanitarnych. Cele te miały zostać zrealizowane w precyzyjnie określonym czasie, do 2015 r. W Unii Europejskiej Ramowa dyrektywa wodna WFD 2000/60/WE ustanawia monitorowanie dużej liczby tzw. substancji priorytetowych w celu przywrócenia dobrego stanu chemicznego i ekologicznego wszystkich części wód. Dyrektywa ta została zaimplementowana w Polsce pod nazwą Ustawy wodnej. Kwestia jakości i czystości wód jest jednak obwarowana przepisami prawnymi w znacznie szerszym stopniu, a najważniejsze z nich zostały podsumowane w tym rozdziale. W 2020 r. Światowe Forum Ekonomiczne, organizujące rokrocznie spotkania prezesów najbogatszych światowych korporacji, przywódców politycznych oraz wybranych intelektualistów i dziennikarzy, opublikowało Raport o globalnych ryzykach (The Global Risks Raport 2020), w którym kryzys wodny został uwzględniony pośród pięciu najważniejszych zagrożeń z uwagi na dotkliwość ich skutków w ciągu kolejnych dziesięciu lat. Głównym problemem jest przewidywane znaczące obniżenie ilości dostępnej świeżej wody o odpowiedniej jakości, powodujące szkodliwe skutki dla zdrowia ludzkiego i/lub działalności gospodarczej. W raporcie The Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES 2019) podkreślono, że każdego roku na całym świecie do wód wrzuca się od 300 do 400 mln ton metali ciężkich, rozpuszczalników i toksycznych szlamów. Stwierdzono również malejące tendencje w zdolności przyrody do dostarczania czystego powietrza i wody, zapewniania dobrej gleby i innych niezbędnych składników.

Głównym podmiotem odpowiedzialnym za krajową gospodarkę wodną jest od 1 stycznia 2018 r. Państwowe Gospodarstwo Wodne Wody Polskie – Krajowy Zarząd Gospodarki Wodnej. Wody Polskie prowadzą działania m.in. z zakresu ochrony przed powodzią i suszą oraz ochrony jakości zasobów wodnych, w tym monitoring jakości wód koordynowany przez Główny Inspektorat Ochrony Środowiska. Pewnymi aspektami prawa wodnego (np. wynikającymi z realizacji Dyrektywy azotanowej [1991]) zajmuje się Ministerstwo Rolnictwa. Na podstawie art. 349 ust. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2017 r. Prawo wodne (Dz.U. z 2018 r. poz. 2268, z późn. zm.) oraz zgodnie z ust. 3 tego artykułu badania i ocena jakości wód powierzchniowych w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska w zakresie elementów fizykochemicznych, chemicznych i biologicznych należą do kompetencji właściwego organu Inspekcji Ochrony Środowiska. Zgodnie z art. 25b ustawy z dnia 20 lipca 1991 r. o Inspekcji Ochrony Środowiska (Dz.U. z 2013 r. poz. 686, z późn. zm.) Główny Inspektor Ochrony Środowiska opracowuje, nie rzadziej niż raz na cztery lata, raport o stanie środowiska w Polsce. W opracowaniach tych ujęty jest zawsze m.in. stan wód powierzchniowych i podziemnych w Polsce. Raporty o stanie środowiska w województwach opracowywane są przez wojewódzkich inspektorów ochrony środowiska.

Problematyka ochrony wód przed zanieczyszczeniami nie dotyczy jednak jedynie dzisiejszych czasów. Sięgając wstecz tylko do początku XX w., można odnaleźć zapisy mające moc prawną traktujące o czystości wód. Aktem prawnym obejmującym prawo wodne w II Rzeczypospolitej była Ustawa wodna z dnia 19 września 1922 r. Na mocy Ustawy zachowano kilka aktów prawnych państw zaborczych pochodzących z końca XIX w., które dotyczyły głównie regulacji konkretnych rzek. Prawa te normowały gospodarcze użycie wód, przede wszystkim w zakresie ochrony przeciwpowodziowej i żeglugi. Problemy zanieczyszczenia wody były ujęte w ogólnym zakazie zanieczyszczania wód ze szkodą dla innych. Bardziej szczegółowo zagadnienie czystości wód poruszone zostało w późniejszych latach w prawie rybackim.

Oddzielnym aktem prawnym traktującym bezpośrednio o kwestii zanieczyszczeń wód jest Ustawa z dnia 31 stycznia 1961 r. O ochronie wód przed zanieczyszczeniem. Rok później obowiązywać zaczęła Ustawa z dnia 30 maja 1962 r. – Prawo wodne, która zastąpiła kilkakrotnie znowelizowaną w międzyczasie Ustawę wodną z 1922 r. Ustawa Prawo wodne została zastąpiona ustawą o tym samym tytule z dnia 24 października 1974 r. i obowiązywała z pewnymi zmianami do 2001 r. Od tego czasu, przez 16 lat, do roku 2017, obowiązywało Prawo wodne uchwalone 18 lipca 2001 r. Wprowadzało ono na polski grunt prawny Ramową Dyrektywę Wodną (2000), choć jego treść do pewnego stopnia była zbliżona do poprzednich wersji ustaw. 20 lipca 2017 r. uchwalona została nowa ustawa o tym samym tytule – Prawo wodne, która weszła w życie 1 stycznia 2018 r. i obowiązuje do dzisiaj.

Członkostwo Polski w Unii Europejskiej narzuca dostosowanie polskich przepisów do standardów obowiązujących w UE. Polskie prawodawstwo uwzględnia zasadnicze elementy zaostrzonego prawa ekologicznego UE. Najważniejszym dokumentem Unii Europejskiej dotyczącym zagadnienia czystości środowiska wodnego jest Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej, zwana Ramową Dyrektywą Wodną (RDW). Ma na celu uporządkowanie i koordynację istniejącego europejskiego ustawodawstwa wodnego. Głównym jej zadaniem jest ustalenie znormalizowanego dla wszystkich członków Unii zakresu ochrony wód, a przez to osiągnięcie dobrego ich stanu, zarówno ekologicznego, jak i chemicznego. RDW swoim zakresem obejmuje wody śródlądowe, łącznie z wodami podziemnymi, oraz wody przejściowe i wody przybrzeżne. Dyrektywa ustala sposoby redukcji oraz kontroli zanieczyszczeń i równoważenia wykorzystania wody z ochroną środowiska.

Zgodnie z RDW do szczegółowego określania stanu ekologicznego wód powierzchniowych stosowane są wskaźniki biologiczne, podczas gdy pozostałe wskaźniki (fizyczno-chemiczne, hydromorfologiczne) mają wartość pomocniczą. Załącznik VIII do RDW przedstawia Wskaźnikowy Wykaz Najważniejszych Zanieczyszczeń, wśród których na pozycji 4. znajdują się „substancje i preparaty lub produkty ich rozkładu, wobec których udowodniono, że posiadają właściwości rakotwórcze lub mutagenne”, a na pozycji 5. „trwałe węglowodory oraz trwałe i biokumulujące się toksyczne substancje organiczne”. W Załączniku X do RDW wyszczególnione są substancje priorytetowe w dziedzinie polityki wodnej, wśród których znajdują się poliaromatyczne węglowodory, a także m.in. antracen, benzen, fluoranten, naftalen, benzo(a)piren, benzo(b)fluorantan, benzo(g,h,i)perylene, benzo(k)fluorantan, indeno(1,2,3-cd)piren. Sześć związków z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) zostało wyszczególnionych także pośród 44 substancji, dla których Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie środowiskowych norm jakości w dziedzinie polityki wodnej podaje średnie roczne oraz maksymalne dopuszczalne wartości w wodach powierzchniowych. Związki te zostały zakwalifikowane jako niebezpieczne oraz priorytetowe w dziedzinie polityki wodnej. Tej kwestii poświęcona jest również Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE zmieniająca dyrektywy 2000/60/WE i 2008/105/WE w zakresie substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej. Wymieniono w niej osiem spośród WWA (antracen, fluoranten, naftalen, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)piren) w wykazie substancji priorytetowych, a sześć spośród nich (wyłączono fluoranten i naftalen) uznano za priorytetowe niebezpieczne. Wymienione związki pojawiły się na liście substancji niebezpiecznych, które powinny być analizowane w środowisku,

opublikowanej już w 1976 r. przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska. Osiem pozostałych WWA to dibenzo(a,h)antracen, benzo(a)antracen, chryzen, acenaften, acenaftylen, fluoren, fenantren i piren (US EPA 1986).

W 2014 r. RDW została zaktualizowana przez Dyrektywę Komisji 2014/101/UE z dnia 30 października 2014 r. zmieniającą Dyrektywę 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiającą ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej. Zapisy obecne w Załączniku VIII oraz Załączniku X nie uległy jednak zmianie.

Zalecenia opisanych dyrektyw znalazły odbicie w polskich przepisach prawnych. Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 1 marca 2019 r. w sprawie wykazu substancji priorytetowych (Dz.U. z 2019 r. poz. 528) przedstawia listę zidentyfikowanych priorytetowych substancji niebezpiecznych, w tym WWA jako sumę benzo(a)pirenu, benzo(b)-fluorantenu, benzo(g,h,i)perylenu, benzo(k)fluorantenu, indeno(1,2,3-cd)-pirenu, z wyłączeniem antracenu, fluorantenu i naftalenu (również substancji priorytetowych niebezpiecznych), które wymieniono odrębnie.

Załącznik 14 Rozporządzenia Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 11 października 2019 r. w sprawie klasyfikacji stanu ekologicznego, potencjału ekologicznego i stanu chemicznego oraz sposobu klasyfikacji stanu jednolitych części wód powierzchniowych, a także środowiskowych norm jakości dla substancji priorytetowych (Dz.U. z 2019 r. poz. 2149) określa środowiskowe normy jakości rozumiane jako stężenie określonej substancji zanieczyszczającej lub grupy substancji zanieczyszczających w wodzie lub faunie wodnej, lub florze wodnej, lub osadach dennych, które nie powinno być przekroczone z uwagi na ochronę zdrowia ludzkiego i środowiska. W grupie wskaźników chemicznych charakteryzujących występowanie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego wymienione zostały benzen z grupy lotnych węglowodorów aromatycznych oraz antracen, naftalen, fluoranten, a także jako grupa WWA: benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perylen oraz indeno(123,cd)piren (tabela 1).

Dla związków WWA omawiane w ustawie normy jakości wody odnoszą się do stężenia benzo(a)pirenu i są oparte na jego toksyczności. Uznaje się występowanie benzo(a)pirenu za wskaźnik występowania innych WWA. Do celów porównawczych w wodzie wystarczy zatem monitorować benzo(a)piren.

Na podstawie ustawy Prawo wodne (Dz.U. z 2018 r. poz. 2268 oraz z 2019 r. poz. 125, 534 i 1495) wydano również Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej w sprawie form i sposobu prowadzenia monitoringu jednolitych części wód powierzchniowych i jednolitych części wód podziemnych (Dz.U. z 2019 r. poz. 2147), w którym określono formy i sposób prowadzenia monitoringu jednolitych części wód powierzchniowych i jednolitych części wód podziemnych. Wyszczególniono tam wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, określając dotyczący tych związków zakres badań,



ich częstotliwość, rodzaj punktów pomiarowo-kontrolnych i kryteria doboru jednolitych części wód do monitorowania.

**Tabela 1.** Dopuszczalne stężenia wybranych substancji ropopochodnych w wodach powierzchniowych, µg/l

Wybrane substancje ropopochodne	Cieki naturalne i jeziora		Wody przejściowe i wody przybrzeżne	
	Stężenie średnioroczne w wodzie	Maksymalne dopuszczalne stężenie w wodzie	Stężenie średnioroczne w wodzie	Maksymalne dopuszczalne stężenie w wodzie
Antracen	0,1	0,1	0,1	0,1
Benzen	10	50	8	50
Fluoranten	0,0063	0,12	0,0063	0,12
Naftalen	2	130	2	130
Benzo(a)piren	0,00017	0,27	0,00017	0,027
Benzo(b)fluoranten	)	0,017	)	0,017
Benzo(k)fluoranten	)	0,017	)	0,017
Benzo(ghi)perylene	)	0,0082	)	0,00082
Indeno(1,2,3-cd)piren	)	–	)	–

\* Dla grupy substancji priorytetowych „wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)” środowiskowe normy jakości dla flory wodnej lub fauny wodnej i odpowiadające im średnioroczne środowiskowe normy jakości w wodzie odnoszą się do stężenia benzo(a)pirenu i są oparte na jego toksyczności. Do celów porównań ze środowiskowymi normami jakości dla flory wodnej lub fauny wodnej w wodzie monitorowany jest jedynie benzo(a)piren.

Źródło: Dz.U. z 2019 r. poz. 2149, Załącznik 14.

Warto wspomnieć o osobnej dyrektywie UE dotyczącej jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dyrektywa Rady 98/83/WE z dnia 3 listopada 1998 r.). Normy w Załączniku I tej dyrektywy są ogólnie oparte na dokumencie „Wytyczne dotyczące jakości wody do picia” Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz opinii Naukowego Komitetu Doradczego Komisji mającej na celu zbadanie toksyczności i ekotoksyczności związków chemicznych. W celu spełnienia minimalnych wymagań tej dyrektywy woda musi być wolna od wszelkich mikroorganizmów i pasożytów (Załącznik I Część A) oraz wszelkich substancji, które w ilościach lub stężeniach stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego (Załącznik I Część B). Ustalone w Części B maksymalne stężenia wynoszą dla benzo(a)pirenu – 0,010 µg/dm<sup>3</sup> oraz dla WWA (jako suma stężeń: benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(ghi)perylene i indeno(1,2,3-cd)pirenu) – 0,10 µg/dm<sup>3</sup>.

Również Światowa Organizacja Zdrowia nawiązuje w swoich dokumentach do kwestii jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. W latach 1958 i 1963 pojawiały się pierwsze „Wytyczne dla jakości wody pitnej”. Jednak

dopiero w 1971 r. w dokumencie pod tą samą nazwą znalazła się informacja, że niektóre spośród substancji WWA są rakotwórcze i w związku z tym stężenia sześciu WWA (fluoranten, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)-piren, benzo(ghi)perylene i indeno(1,2,3-cd)piren) nie powinny przekraczać w wodzie pitnej  $0,2 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ . W edycji „Wytycznych dla jakości wody pitnej” z roku 1984 jedynym WWA, dla którego dostarczono wystarczające dowody na działanie toksyczne, aby ustalić graniczną dopuszczalną wartość jego stężenia, był benzo(a)piren. Dla tego związku ustalona została wartość dopuszczalna  $0,01 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ . Koncepcja kontroli WWA w wodzie pitnej opiera się na badaniu stężeń tych związków w nieskażonej wodzie gruntowej i zaleceniu nieprzekraczania tych stężeń. Obecnie najnowsze zalecenia z 2017 r. zawarte w dokumencie „Wytyczne dotyczące jakości wody do picia” ustalają maksymalny poziom benzo(a)pirenu w wodzie pitnej na  $0,7 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ . Związek ten będący przedstawicielem WWA w niezanieczyszczonych wodach podziemnych występuje w zakresie stężeń  $0-5 \text{ ng}/\text{dm}^3$ . Stężenia w zanieczyszczonych wodach podziemnych mogą przekraczać  $10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ . Typowy zakres stężeń sumy wybranych WWA w wodzie pitnej to  $1-11 \text{ ng}/\text{dm}^3$  (WHO 2017).

Polski ustawodawca również przygotował wiele przepisów odnoszących się do wody pitnej. Ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzeniu ścieków określa zasady działalności przedsiębiorstw wodociągowo-kanalizacyjnych, tworzenia warunków do zapewnienia ciągłości dostaw i odpowiedniej jakości wody oraz niezawodnego odprowadzania i oczyszczania ścieków, a także zasady ochrony interesów odbiorców usług, z uwzględnieniem wymagań ochrony środowiska i optymalizacji kosztów. Zawiera ona również wymagania dotyczące jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Wynika z niej, że przedsiębiorstwo wodociągowo-kanalizacyjne jest obowiązane do prowadzenia regularnej wewnętrznej kontroli jakości wody i ścieków. W ustawie tej określone są również warunki korzystania z ciągów wodno-kanalizacyjnych, w których nie powinny znajdować się substancje wymienione w art. 9. pkt. 1–2, m.in. substancje ropopochodne, takie jak benzyna czy olej napędowy, a także inne chorobotwórcze i toksyczne.

Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 29 sierpnia 2019 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia przez ludzi (Dz.U. z 2019 r. poz. 1747), podaje trzy kategorie wód: A1, A2, A3, oraz odpowiadające im wskaźniki jakości. Kategorie te odpowiednio klasyfikują wodę jako wymagającą: prostego uzdatniania fizycznego (m.in. filtracji, dezynfekcji), typowego uzdatniania fizycznego i chemicznego (m.in. utleniania wstępnego, dekantacji, filtracji, dezynfekcji) oraz wysokosprawnego uzdatniania fizycznego i chemicznego. W Załączniku I do Rozporządzenia podane są wartości dopuszczalne wskaźników jakości wody, wśród których na pozycjach 26. i 27. znajdują się rozpuszczone lub emulgowane

węglowodory oraz WWA. Wybrane wartości wskaźników dla poszczególnych kategorii wód przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Wartości graniczne wskaźników jakości wody, mg/l

Kategoria wody	A1	A2	A3
Rozpuszczone lub zemulgowane węglowodory	0,05	0,2	1
WWA	0,0002	0,0002	0,001

Źródło: Dz.U. z 2019 r. poz. 1747.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. W sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi określa wymagania bakteriologiczne, fizykochemiczne oraz organoleptyczne. W wytycznych dotyczących parametrów chemicznych wód określono dopuszczalne stężenie WWA, mierzone jako suma stężeń związków: benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(ghi)perylenu, indeno(1,2,3-cd)pirenu, na 0,10  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ . Oddzielnie wyróżniono benzo(a)piren jako substancję szczególnie niebezpieczną i ustalono jej dopuszczalny poziom na 0,010  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ .

W Załączniku I Rozporządzenia Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 r. w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych, wymienione są substancje szczególnie szkodliwe dla środowiska wodnego powodujące zanieczyszczenie wód, które powinno być: eliminowane (wykaz I) oraz ograniczane (wykaz II). Do grupy z wykazu I zalicza się m.in. trwałe oleje mineralne i węglowodory ropopochodne, które pochodzą z ropy naftowej lub przeróbki chemicznej węgla, a także sama ropa naftowa. Są to ciekłe substancje charakteryzujące się trudną rozpuszczalnością w wodzie, niską i bardzo niską prężnością par, a przez to pozostające przez długi okres w środowisku wodnym przy praktycznym braku emisji ich składników do atmosfery. Do substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego, powodujących zanieczyszczenie wód, które powinno być ograniczane, zalicza się m.in. nietrwałe oleje mineralne i węglowodory ropopochodne, które są substancjami gazowymi lub ciekłymi o niskich temperaturach wrzenia (charakteryzujące się wysoką prężnością par i trudno emulgujące się w wodzie) i które w normalnych warunkach łatwo odparowują, przemieszczając się tym samym ze środowiska wodnego do powietrza atmosferycznego. Do grupy tej zaliczone są węglowodory ropopochodne. Dopuszczalna granica ich stężenia dla rafinerii ropy naftowej to 5  $\text{mg}/\text{dm}^3$  oraz 15  $\text{mg}/\text{dm}^3$  dla pozostałych rodzajów ścieków. Rozporządzenie nie podaje dopuszczalnych stężeń WWA w ściekach oczyszczonych. Można jedynie zakwalifikować te związki do substancji, które należy eliminować ze względu na przynależność do wykazu I lub II.

Przegląd obowiązujących aktów prawnych dotyczących czystości wód wskazuje na istniejący problem występowania niebezpiecznych dla zdrowia człowieka i całego środowiska związków ropopochodnych w środowisku wodnym. W odniesieniu do wód powierzchniowych wykazano na podstawie zawartych w podsumowaniu statystycznym wskaźników jakości wód analizowanych w latach 2014–2019 (GIOS 2019), że udział przekroczeń norm przez węglowodory ropopochodne (badanych na podstawie indeksu olejowego) wynosi:

- dla jednolitych części wód rzecznych (JCWP) – 27 na 1845 ocenianych jednolitych części wód powierzchniowych, co stanowi 1,5%;
- dla jednolitych części wód jeziornych – 1 na 512 ocenianych jednolitych części wód powierzchniowych, co stanowi 0,2%;
- dla jednolitych części wód przejściowych i przybrzeżnych – nie odnotowano żadnych.

Podsumowanie statystyczne wskaźników chemicznych jakości wód dla jednolitych części wód powierzchniowych dla wybranych najbardziej kancerogennych WWA przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 3.** Podsumowanie statystyczne wskaźników chemicznych jakości wód analizowanych na potrzeby oceny wykonanej za 2019 r. dla jednolitych części wód rzecznych

Związek	Liczba ocenianych JCWP	Liczba przekroczeń	Udział przekroczeń (%)
<b>Wody rzeczne</b>			
Antracen	1919	6	0,3
Benzo(a)piren	1795	1422	79,2
Benzo(b)fluoranten	1545	158	10,2
Benzo(k)fluoranten	1544	80	5,2
Benzo(g,h,i)perylene	1545	309	20
Fluoranten	1499	298	19,9
Naftalen	1756	0	0,0
<b>Wody jeziorne</b>			
Antracen	498	0	0,0
Benzo(a)piren	464	152	32,8
Benzo(b)fluoranten	413	7	1,7
Benzo(k)fluoranten	413	3	0,7
Benzo(g,h,i)perylene	414	24	5,8
Fluoranten	384	11	2,9
Naftalen	495	0	0,0

**Tabela 3** – cd.

Związek	Liczba ocenianych JCWP	Liczba przekroczeń	Udział przekroczeń (%)
<b>Wody przejściowe i przybrzeżne</b>			
Antracen	19	0	0,0
Benzo(a)piren	10	10	100,0
Benzo(b)fluoranten	9	1	11,1
Benzo(k)fluoranten	9	0	0,0
Benzo(g,h,i)perylene	9	4	44,4
Fluoranten	5	1	20,0
Naftalen	19	0	0,0

Źródło: GIOS 2019.

W przypadku grupy wskaźników charakteryzujących występowanie substancji szczególnie szkodliwych (priorytetowych) dla środowiska wodnego największą liczbę przekroczeń zaobserwowano w zakresie benzo(a)pirenu: w wodach rzecznych 79,2%, w wodach jeziornych 32,8% oraz wodach przejściowych i przybrzeżnych 100%. Raport Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska z roku 2020 (GIOS 2020) ukazał, że w środowisku wodnym największy wpływ na klasyfikację miały wskaźniki chemiczne, dla których wprowadzono bardziej rygorystyczne normy środowiskowe, m.in. benzo(a)piren z grupy WWA (które w większości badanych JCWP nie osiągały stanu dobrego).

Podsumowując, analiza zawartości węglowodorów ropopochodnych jest wymagana w wielu miejscach, począwszy od zakładów przemysłu naftowego, poprzez miejsca wycieków (katastrof) ropy, po monitoring ścieków przemysłowych, odcieki z wysypisk i wód gruntowych.

## 2. Węglowodory ropopochodne jako czynniki obniżające jakość środowiska wodnego

Środowisko wodne narażone jest na typowe problemy, wśród których można wymienić toksyczne substancje nieorganiczne, metale ciężkie, bakterie i inne patogeny, podwyższone stężenie azotu oraz inne śladowe chemikalia i mikroelementy. Zanieczyszczenia chemiczne są często uważane za mniej priorytetowe niż zanieczyszczenia mikrobiologiczne, ponieważ niekorzystne skutki zdrowotne wynikające z zanieczyszczeń chemicznych są zwykle związane z długotrwałym narażeniem, podczas gdy skutki zanieczyszczenia mikrobiologicznego są zazwyczaj natychmiastowe. Zanieczyszczenia chemiczne mogą jednak powodować bardzo poważne problemy zdrowotne, niezależnie od tego, czy występują naturalnie, czy pochodzą z antropogenicznego źródła zanieczyszczenia. Wybrane do badań zanieczyszczenia występują powszechnie w środowisku wodnym. Ich degradacja, zarówno poprzez procesy przebiegające w przyrodzie, jak również przy zastosowaniu nowoczesnych technologii oczyszczania ścieków, jest nie do końca poznana i nie w pełni skuteczna.

### 2.1. Charakterystyka produktów ropopochodnych

Ropa naftowa stanowi płynną mieszaninę węglowodorów, a także związków organicznych tlenu, siarki i azotu oraz śladowych ilości różnych związków nieorganicznych i pierwiastków (np. metali ciężkich). Właściwości ropy zależą od miejsca pochodzenia. Zazwyczaj są to ciecze o mniejszej od wody gęstości w zakresie 700–1000 kg/m<sup>3</sup>, barwie od żółtawej do brunatnoczarnej. Wśród nich warto wyróżnić naftę, która zwana jest inaczej kerozyną, ze względu na jej powszechne zastosowanie jako paliwo, rozpuszczalnik czy do celów kosmetycznych. Nafta jest ciekłą frakcją ropy naftowej o gęstości 780–810 kg/m<sup>3</sup>, wrzącą w zakresie temperatur 170–250°C. W jej skład wchodzi węglowodory, których cząsteczki zawierają 12–15 atomów węgla.

Węglowodór z definicji należy do grupy związków chemicznych złożonych wyłącznie z wodoru i węgla. Według jednej z klasyfikacji węglowodorów można podzielić je na trzy główne klasy: alifatyczne, alicykliczne i aromatyczne. Można również zdefiniować dalsze podklasy. Oczywiście chemia węglowodorów może być o wiele bardziej skomplikowana. W rzeczywistości w jednej próbce konwencjonalnej lub syntetycznej ropy naftowej mogą znajdować się tysiące pojedynczych związków organicznych. Można również spotkać wiele mylących odniesień do wody zanieczyszczonej węglowodorami. Terminologia taka jak:

- WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne),
- BTEX (benzen, etylobenzen, toluen, ksylen),
- TPH (suma węglowodorów ropopochodnych),
- TRPH (całkowite odzyskiwalne węglowodory ropopochodne),
- TOG (całkowity olej i smar),
- organiczne/nieorganiczne,

przyczynia się do tych niejasności. Zasadniczo zanieczyszczenia wód węglowodorami w literaturze są omawiane w stężeniach ppm. Tak więc np. poziom węglowodorów 30 ppm w wodzie może zawierać dowolną liczbę związków, które łącznie wynoszą 30 ppm: związki występujące w paliwach odrzutowych, olejach napędowych, olejach smarowych itp. Innymi słowy, badania nie są szczególnie ukierunkowane na ustalenie połączenia źródła węglowodorów i określonego związku. Zwykle przedmiotem zainteresowania jest całkowita suma związków węglowodorowych. Węglowodór może zatem odnosić się do szerokiej gamy związków. Odpowiednie dostępne techniki pomiarowe mogą pozwolić na zdefiniowanie zanieczyszczającego węglowodoru.

Główne klasy węglowodorów zdefiniowano poniżej. Opis ten wykorzystuje fizyczną strukturę chemiczną do ustalenia grupowania. Zatem w skład ropy naftowej wchodzi następujące grupy węglowodorów (Solecki 2005):

- alifatyczne (parafinowe),
- cykloalkany (naftalenowe),
- areny (węglowodory aromatyczne),
- olefinowe.

Według najprostszej chemicznej klasyfikacji węglowodorów można podzielić je na:

- nasycone (alkany mające tylko pojedyncze wiązania między atomami węgla i/lub wodoru);
- nienasycone (alkeny lub olefiny, które zawierają co najmniej jedno podwójne wiązanie węgiel-węgiel, oraz alkiny, które mają potrójne wiązanie węgiel-węgiel, np. acetylen);
- aromatyczne (monoaromatyczne, takie jak BTEX, oraz wielopierścieniowe aromatyczne WWA, takie jak naftalen, benzo(a)piren czy fluoren).

Parafiny (alkany) to grupa węglowodorów występująca w ropie naftowej i produktach ropopochodnych w dużych ilościach. Związki te są nasyconymi

węglowodorami łańcuchowymi o ogólnym wzorze  $C_nH_{2n+2}$ . Mogą one mieć łańcuch prosty (n-parafiny, n-alkany) lub rozgałęziony (izo-parafiny, izo-alkany). Związki o prostym łańcuchu to węglowodory alifatyczne. Jeden atom łączy się z drugim w sposób liniowy, a ostatni w łańcuchu pozostaje „otwarty”. Związki te mogą być dość duże i rozciągać się w wielu łańcuchach rozgałęzionych z wieloma „otwartymi” końcami. Rozgałęzienie łańcucha powoduje obniżenie temperatury wrzenia, zatem izo-parafiny mają niższe temperatury wrzenia niż ich odpowiedniki n-parafinowe (Mastalerz 2000).

Nafteny (cykloalkany lub cykloparafiny) to grupa węglowodorów występująca w największych ilościach (średnio 50%) w ropie naftowej i produktach pochodzących z jej przerobu. Ich budowa chemiczna jest pierścieniowa, są związkami nasyconymi, zawierają najczęściej pięcio- lub sześcioczłonowe pierścienie z bocznym łańcuchem o różnej długości. Największy udział masowy mają metylocyklopentan oraz metylocykloheksan, nawet do 2% ropy. Cykloparafiny mają mniejszą lotność i większą gęstość niż parafiny (Fąfara i in. 2006).

Areny to węglowodory aromatyczne (WA), czyli węglowodory pierścieniowe, w których występują obejmujące cały pierścień zdelokalizowane orbitale molekularne. Areny dzielą się na jednopierścieniowe, tzw. BTEX, zawierające jeden pierścień benzenowy, oraz wielopierścieniowe (WWA), zawierające minimum dwa skondensowane pierścienie benzenowe. W surowej ropie naftowej można znaleźć do 15% arenów, natomiast w olejach smarowych nawet powyżej 50%. Wśród nich największy udział mają toluen i m-ksylen. Węglowodory aromatyczne są niebezpieczne dla środowiska ze względu na toksyczność, kancerogenność i – w przypadku węglowodorów jednopierścieniowych – dobrą rozpuszczalność w wodzie.

Olefiny (alkeny) są nienasyconymi węglowodorami mającymi jedno lub więcej podwójnych wiązań pomiędzy atomami węgla. Mogą mieć budowę łańcuchową lub pierścieniową. Surowa ropa naftowa nie zawiera olefin, natomiast są one obecne w produktach naftowych.

Mieszanie węglowodorów tworzących ropę można rozdzielać na różne frakcje ze względu na różnice temperatur wrzenia poszczególnych jej składników. Podczas destylacji ropy oddziela się od siebie węglowodory o różnym składzie chemicznym. W procesie tym wykorzystuje się ciśnienie normalne dla frakcji wrzących w temperaturach do  $300\div 350^\circ\text{C}$ . Dla frakcji, których temperatura wrzenia znajduje się powyżej tego zakresu, wykorzystuje się zmniejszone ciśnienie w celu przeciwdziałania rozkładowi składników ropy (Surygała [red.] 2006).

Produkty ropopochodne są złożone z mieszanin związków chemicznych pochodzących z destylacji i frakcjonowania ropy naftowej (tabela 4). Składają się głównie z szerokiej gamy węglowodorów alifatycznych i aromatycznych, które mają bardzo różną rozpuszczalność w wodzie. Pozornie jednorodna grupa związków ropopochodnych różni się właśnie rozpuszczalnością w wodzie, a także temperaturami topnienia i wrzenia, co wiąże się z ich stanem skupienia.



**Tabela 4.** Charakterystyka i zastosowanie poszczególnych frakcji ropy naftowej

Liczba atomów węgla w cząsteczce	Temperatura wrzenia (°C)	Fracje	Zastosowanie
1–6	0–30	gaz	gaz i gaz płynny
5–7	10–60	eter naftowy	rozpuszczalniki
7–8	60–120	benzyna lekka	paliwa silnikowe lekkie
6–9	70–150	benzyna ciężka	paliwa silnikowe
10–16	175–300	nafta	paliwo lotnicze, dieslowskie
16–18	300	olej opałowy	paliwo dieslowskie, surowiec do krakingu
18–20	300	oleje woskowe	oleje smarne, oleje mineralne, surowiec do krakingu
21–40	300	woski parafinowe	świecarstwo, papiernictwo
Powyżej 40	powyżej 300	pozostałe	smoły, asfalty, uszczelniacze

Źródło: Rakowska i in. 2012.

Ważną kwestią związaną z czystością wód jest identyfikacja zanieczyszczeń węglowodorami ze względu na ich bardzo negatywny wpływ na człowieka oraz cały ekosystem, co zostało opisane w odrębnym rozdziale. Powszechność występowania ropy naftowej pozwalająca na wszechstronny zakres jej wykorzystania prowadzi do ciągłego zanieczyszczania środowiska produktami ropopochodnymi. Węglowodory są stosowane głównie jako paliwa (węglowodory ropopochodne) lub przemysłowe chemikalia (zarówno na bazie ropy naftowej, jak i naturalne). Chemikalia przemysłowe mogą być stosowane jako rozpuszczalniki i środki odtłuszczające (toluen, ksylen, rozpuszczalnik Stoddarda, spirytus naftowy/etery, terpentyna mineralna, limonen) lub jako prekursorzy do syntezy szerokiej gamy chemikaliów, takich jak polimery (ze styrenu), i detergentów (z alkilobenzenów). Węglowodory mogą przedostać się do środowiska w sposób naturalny, ale również z wycieków. W szczególności problem ten dotyczy środowiska wodnego ze względu na łatwość przenikania ropy i jej pochodnych do hydrosfery. W środowisku wodnym substancje ropopochodne przedostają się z wycieków ropy (na przykład w wodzie zęzowej) lub mogą pochodzić ze zrzutów przemysłowych na skutek celowego stosowania (oleje rozprowadzane na niezamkniętych drogach, olej napędowy jako rozpuszczalnik do stosowania herbicydów).

Główne źródła pochodzenia węglowodorów można zatem podzielić na dwa rodzaje. Pierwsze z nich to źródła naturalne: węglowodory takie jak terpeny (np. guma, pinen, limonen, kamfora), fitan, pristan, skwalen. Drugie, antropogeniczne, to węglowodory na bazie ropy naftowej, takie jak gaz ziemny, LPG, benzyna, nafta, paliwo lotnicze, olej napędowy, oleje opałowe, oleje bunkrowe, oleje smarowe, oleje transformatorowe, smary, asfalt i bitum (Gacek, Gajewski 2015).

W odniesieniu do wód powierzchniowych można wyróżnić cztery główne źródła pochodzenia zanieczyszczeń: zanieczyszczenia naturalne (lub środowiskowe), rolnicze, przemysłowe i mieszkaniowe (lub domowe). Niektóre zanieczyszczenia wód występują naturalnie, niezależnie od działań podejmowanych przez człowieka. Rodzaje i stężenia naturalnych zanieczyszczeń zależą od charakteru materiału geologicznego, przez który porusza się woda powierzchniowa, oraz od jakości wody dopływającej do zbiornika wodnego. Rolnictwo jest źródłem pestycydów, herbicydów oraz związków chemicznych pochodzących z nawozów naturalnych i sztucznych. Przemysł produkcyjny i usługowy mają wysokie wymagania dotyczące wody chłodzącej, wody technologicznej i wody do czyszczenia. Zanieczyszczenie wód powierzchniowych może występować, gdy woda zużyta wraca do obiegu hydrologicznego. Domowe ścieki mogą być źródłem wielu kategorii zanieczyszczeń, w tym bakterii, wirusów, azotanów i związków organicznych. Podobnie odpady zrzucone w pobliżu zbiorników wodnych lub zakopane w ziemi mogą zanieczyścić glebę i wypłukać do wód. Produkty ropopochodne znaleziono w wodach płynących w pobliżu zakładów przemysłowych (Gacek, Szopa, Czerniak 2017). Pochodne ropy naftowej mogą z łatwością przedostawać się również do gleby wraz z wieloma rodzajami ścieków, a także wraz z wodami opadowymi i roztopowymi, spłukującymi powierzchnie ulic i dróg (Srogi 2007). Ma to swoje przełożenie na zanieczyszczenie również wód gruntowych. Źródłem skażenia wód gruntowych może być także surowa ropa naftowa pochodząca z niekontrolowanej erupcji, jak i z katastrofy podczas jej transportu bądź przesyłania. Podstawowym problemem dla wody pitnej są potencjalne wycieki skażające źródła wody, penetracja systemów dystrybucji wody i zanieczyszczenie wody już uzdatnionej do spożycia. Incydenty takie mogą prowadzić do wysokich stężeń węglowodorów ropopochodnych.

W zanieczyszczonej warstwie wodonośnej występować mogą węglowodory o gęstości większej lub mniejszej od gęstości wody. W zależności od masy właściwej oraz podłoża i jego własności fizycznych substancje te płyną po powierzchni lub przenikają do warstwy wodonośnej. W rezultacie część związków ropopochodnych znajdujących się na powierzchni gleby osiąga zwierciadło wody gruntowej, a część ulega sorpcji na jej cząstkach. Węglowodory o gęstości większej od gęstości wody pod wpływem sił grawitacji migrują do spągu warstwy wodonośnej (warstwy nieprzepuszczalnej) i rozprzestrzeniają się w kierunkach horyzontalnych w bardzo niewielkim zakresie (Solecki 2005). Natomiast drugi rodzaj węglowodorów unosi się na powierzchni wody podziemnej i przemieszcza na znaczne odległości. Również te węglowodory, które są rozpuszczalne w wodzie, mogą migrować (wymywane przez deszcze) w głębsze warstwy gruntu oraz do wód podziemnych, co powoduje poważne zagrożenie dla źródeł zaopatrzenia w wodę pitną. Znane są przypadki awarii rurociągów naftowych i awarii zbiorników na terenach roponośnych w wyniku fali powodziowej (Gierak 1995), które spowodowały zanieczyszczenia wód

w studniach na obszarze oddalonym do kilku kilometrów od miejsca wypadku. Zanieczyszczenia przesiąkały przez warstwę gleby i przedostawały się do wód gruntowych, uniemożliwiając eksploatację studni.

Paliwowe produkty ropopochodne, mimo że w większości są substancjami słabo rozpuszczalnymi w wodzie, działają szkodliwie na organizmy wodne. Z tego powodu przedostanie się dużych ilości tych związków do środowiska wodnego stanowi dla niego poważne zagrożenie. Może być to przyczyną długo utrzymujących się niekorzystnych zmian w środowisku wodnym. Olej napędowy jest substancją o potencjalnym działaniu rakotwórczym. Natomiast benzyna jest substancją rakotwórczą, mutagenną, szkodliwą i drażniącą. Olej napędowy jest lżejszy od wody, w wyniku czego gromadzi się na jej powierzchni, skąd częściowo odparowuje. Benzyna również jest lżejsza od wody, ale charakteryzuje się równocześnie dużą lotnością, w wyniku czego szybko odparowuje i nie kumuluje się w środowisku.

Szybka identyfikacja występowania tych związków chemicznych ma zasadnicze znaczenie dla żywych istot i dla utrzymania zdrowego środowiska wodnego, gdyż węglowodory ropopochodne mogą oddziaływać na środowisko na wiele sposobów. Stanowią one źródło energii dla aktywności mikrobiologicznej, a zatem mogą zwiększać obciążenie zapotrzebowaniem na tlen (BZT). Mogą przyczyniać się do powstawania nieprzyjemnego zapachu, niektóre z nich są łatwopalne (wybuchowe w zamkniętych przestrzeniach), przez co zwiększają ryzyko pożaru. Bardzo duża część węglowodorów ropopochodnych jest toksyczna: neurotoksyczna (np. heksan) i rakotwórcza (np. benzen, benzo(a)piren). Grupa nierozpuszczalnych w wodzie węglowodorów mająca mniejszą od niej gęstość może unosić się na powierzchni wody, tworząc na niej warstwę oleistą, może także pokrywać glebę, sierść zwierząt, pióra ptaków itp.

Węglowodory ropopochodne wprowadzane do środowiska przez człowieka można podzielić na pewne grupy determinowane ich pochodzeniem, co przedstawiono na rys. 2.

#### **węglowodory alifatyczne o zawartości węgla C6–C12**

- benzyna

#### **węglowodory alifatyczne o zawartości węgla C12–C372**

- olej mineralny

#### **węglowodory aromatyczne jednopierścieniowe, tzw BTEX, czyli benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny**

- przemysł chemiczny – rozpuszczalniki i reagenty

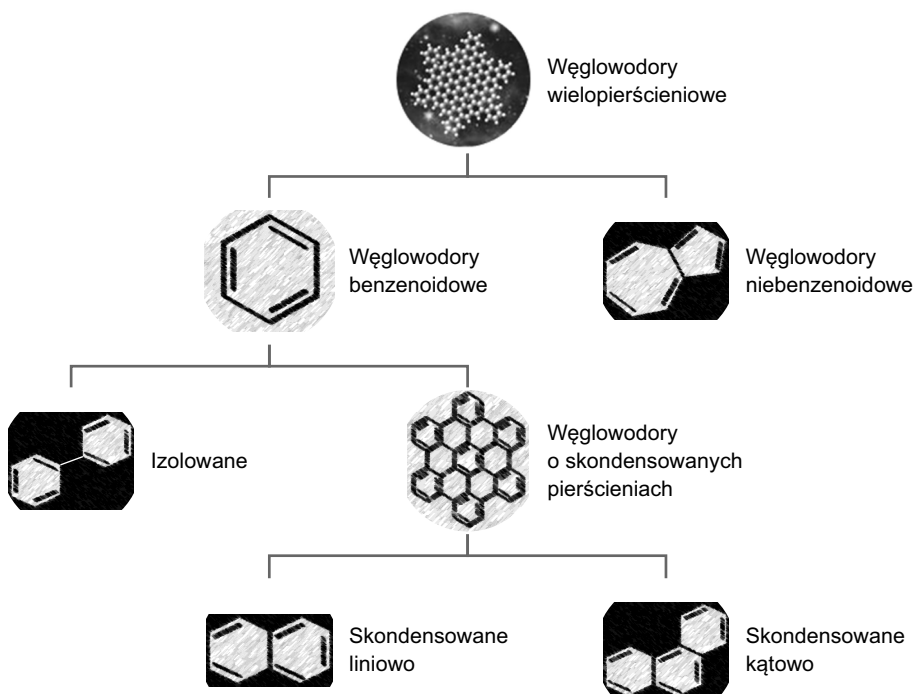
#### **węglowodory aromatyczne wielopierścieniowe (WWA)**

- spaliny samochodowe, depozycja mokra i sucha, ścieranie samochodowych opon gumowych, asfalt bogaty we frakcje WWA oraz źródła niekontrolowane (nielegalne zrzuty ścieków gospodarczych, przemysłowych, odcieki ze składowisk odpadów)

### **Rysunek 2. Pochodzenie różnych grup węglowodorów**

Źródło: opracowanie własne na podstawie Synak i in. 2010.

Szczególną grupę spośród związków ropopochodnych stanowią wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. WWA są obszerną grupą związków chemicznych o budowie pierścieniowej, charakteryzującą się podobnymi własnościami fizykochemicznymi. Ich najbardziej ogólny podział przedstawiony został na rys. 3.



**Rysunek 3.** Ogólny podział węglodorów wielopierścieniowych

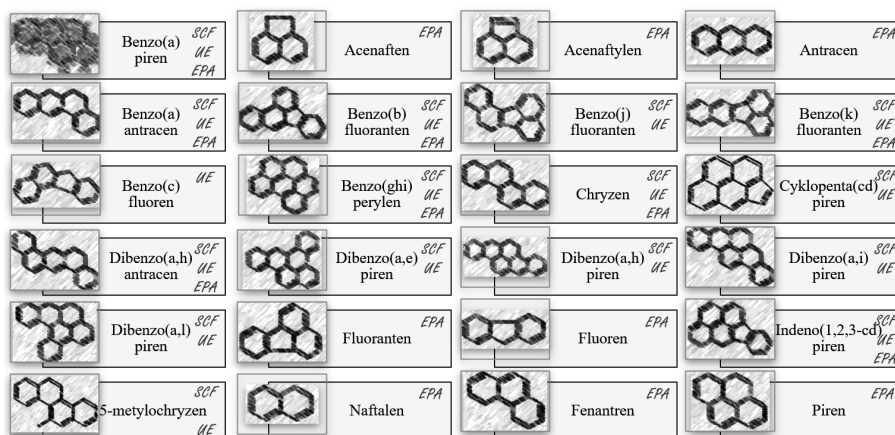
Źródło: opracowanie własne, obraz: <https://astrobiology.nasa.gov/news/excited-states-of-pahs/> (dostęp: 1.04.2019)

WWA tworzą klasę organicznych związków, które w swojej budowie zawierają dwa lub więcej aromatycznych pierścieni złożonych z węgla i wodoru. WWA są jednymi z najpowszechniej występujących, trwałych zanieczyszczeń organicznych. W normalnych warunkach są bezbarwnymi, białymi lub bladżółtymi ciałami stałymi, mało reaktywnymi chemicznie, nierozpuszczalnymi lub bardzo słabo rozpuszczalnymi w wodzie. Ulegają działaniu zarówno tlenu, jak i innych utleniaczy. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego wykazują właściwości fluorescencyjne, co daje możliwość ilościowego ich oznaczania (Wu, Kim, Weyand 1994).

Większość z WWA dostaje się do środowiska poprzez atmosferę z różnorodnych procesów spalania i pirolizy. Naturalnymi źródłami WWA są wybuchy wulkanów, pożary lasów oraz reakcje biochemiczne bakterii, glonów i roślin.

Te ostatnie skutkują powstawaniem najbardziej niebezpiecznych dla zdrowia człowieka i całej biosfery związków WWA. Obecne w powietrzu WWA występują zawsze w formie ciała stałego zaadsorbowanego na powierzchni pyłów, mgły, dymów. Przyspiesza to ich depozycję zarówno suchą, jak i mokrą. W naturalnym środowisku wodnym występują głównie w formie zaadsorbowanej na cząstkach materii zawieszanej. Około 0,5% wszystkich WWA zanieczyszczających środowisko utrzymuje się w wodach powierzchniowych (Synak i in. 2010). Trzeba jednak podkreślić, że ilość WWA pochodzenia naturalnego w zestawieniu z ilością WWA ze źródeł antropogenicznych jest niewielka. Pierwsze stanowią „naturalne tło”, drugie traktować trzeba jako skażenie. Przykładem tego mogą być tereny, na których przez wiele lat istniały zakłady przerobu węgla – tam obserwowane jest znaczące skażenie gleby (Miller 2011).

Znanych jest ponad 100 różnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, jednak w środowisku najczęściej monitorowane są te wymienione na rys. 4. Zgodnie z zaleceniami Komitetu Naukowego UE ds. Żywności (SCF), Unii Europejskiej (UE) i Agencji Ochrony Środowiska USA (EPA) są to związki objęte najliczniejszą liczbą badań ze względu na ich największą udowodnioną toksyczność (Lerda 2009). Związki te mają w swojej budowie (z wyłączeniem naftalenu) od trzech do sześciu pierścieni.



**Rysunek 4.** Nazwy i struktury WWA monitorowane zgodnie z zaleceniami Komitetu Naukowego UE ds. Żywności (SCF), Unii Europejskiej (UE) i Agencji Ochrony Środowiska USA (EPA)

Źródło: opracowanie własne.

W środowisku wodnym WWA występują, jak wspomniano, głównie w formie zaadsorbowanej na cząstkach ciał stałych, komórkach mikroorganizmów lub w formie mikrokryształicznych agregatów. Ich hydrofobowy charakter powoduje, że są one bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie. Lepszą rozpuszczalnością

w wodzie charakteryzują się związki aromatyczne niż alifatyczne oraz te o niższej masie cząsteczkowej. Przykładowo, rozpuszczalność najlepiej rozpuszczalnego w wodzie węglowodoru o budowie pierścieniowej, benzenu, wynosi  $0,7 \text{ g/dm}^3$  w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ , a rozpuszczalność w wodzie w tych samych warunkach alifatycznego n-heksanu zawierającego w cząsteczce również sześć atomów węgla wynosi  $0,1 \text{ g/dm}^3$ . Związki alifatyczne zawierające powyżej ośmiu atomów węgla w cząsteczce uznawane są za nierozpuszczalne w wodzie. Inaczej jest ze związkami aromatycznymi. Wybrane właściwości węglowodorów aromatycznych uznanych za najbardziej szkodliwe przedstawione zostały w tabeli 5. Podano w niej również współczynnik  $\log K_{ow}$ , który w skali logarytmicznej przedstawia współczynnik podziału oktanol/woda, czyli stosunek stężenia danej substancji w fazie oktanolowej do jej stężenia w fazie wodnej w dwufazowym układzie oktanol/woda. Stosunek stężenia substancji rozpuszczonej między wodą a oktanołem jest dobrze znaną właściwością, która jest powszechnie stosowana jako miara hydrofobowości. Związki, dla których  $\log K_{ow} > 3$ , charakteryzują się wysoką lipofilowością i wysokim potencjałem bioakumulacji. Jest to typowa wartość współczynnika podziału dla większości trwałych zanieczyszczeń organicznych (chlorowane węglowodory, PCB, WWA, PCDD i PCDF).

**Tabela 5.** Właściwości wybranych węglowodorów aromatycznych

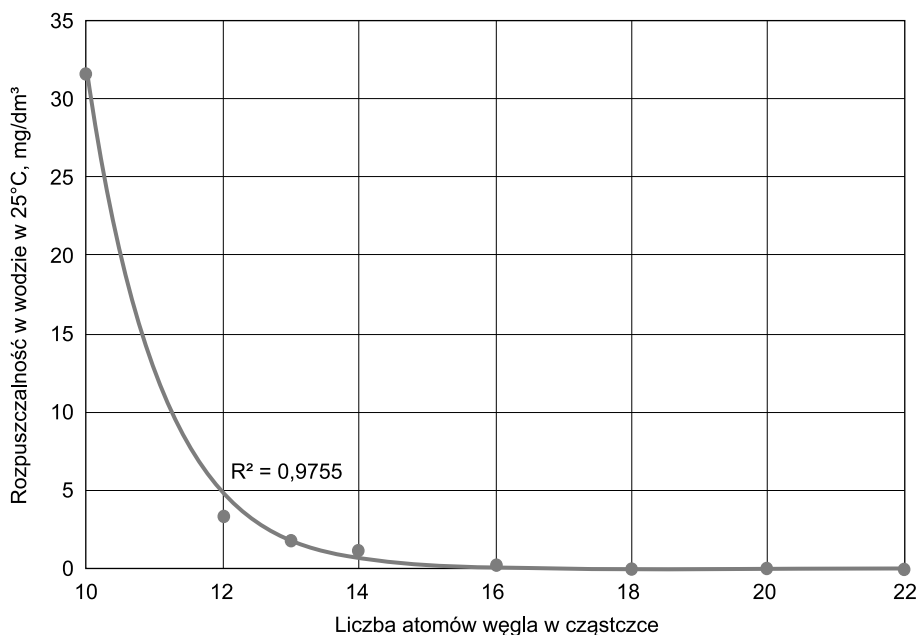
Związek	Masa cząsteczkowa	Liczba atomów węgla w cząsteczce	$\log K_{ow}$	Rozpuszczalność w wodzie w $25^\circ\text{C}$ , $\text{mg/dm}^3$
Naftalen	128,16	10	3,5	31,7
Acenafthen	154,21	12	4,33	3,42
Fluoren	166	13	4,18	1,98
Fenantren	178,24	14	4,5	1,29
Antraceni	178,24	14	4,5	0,045
Piren	202,26	16	4,9	0,135
Fluoranten	202,26	16	5,1	0,26
Benzo(a)antraceni	228	18	5,6	0,0057
Benzo(a)piren	252,32	20	6,0	0,0038
Benzo(b)fluoranten	252,32	20	6,06	0,014
Benzo(k)fluoranten	252,32	20	6,06	0,0043
Indeno(1,2,3-cd)piren	276	22	6,4	0,00053

Źródło: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (dostęp: 10.10.2018).

Jak wynika z tabeli 5, im więcej atomów węgla w cząsteczce, a co za tym idzie, większa masa cząsteczkowa związku, tym większa lipofilowość (większa hydrofobowość), a zarazem mniejsza rozpuszczalność w wodzie. Widać wyraźną zależność wykładniczą pomiędzy rozpuszczalnością wybranych WWA

w wodzie a liczbą atomów węgla w cząsteczce (rys. 5). Dodatkowo confirmacja cząsteczki ma również ogromny wpływ na rozpuszczalność związków w wodzie. Jednak ważny jest fakt, że związki o niskiej rozpuszczalności nie występują w wodzie samodzielnie, lecz razem z innymi, tworząc złożone mieszaniny. Jest to istotne z punktu widzenia konsekwencji zdrowotnych, gdyż skutki działania złożonych mieszanin mogą różnić się od tych powodowanych przez pojedyncze WWA (WHO/SDE/WSH/03.04/59), co zostało bliżej przedstawione w kolejnym podrozdziale.

Należy dodać, że rozpuszczalność węglowodorów ropopochodnych wzrasta wraz ze stężeniem i obecnością rozpuszczalników oraz substancji powierzchniowo czynnych. Od składu wód zależy trwałość emulsji tworzonych przez te związki. Ponieważ węglowodory ropopochodne występują w wodzie w postaci cienkiej warstwy powierzchniowej, powodują one ograniczenie lub całkowite uniemożliwienie przenikania tlenu z atmosfery do wody.



**Rysunek 5.** Zależność rozpuszczalności wybranych WWA w wodzie od liczby atomów węgla w cząsteczce

Źródło: opracowanie własne na podstawie: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (dostęp: 10.10.2018).

Dla większości populacji główne drogi narażenia się na działanie WWA to żywność oraz powietrze. Podstawowym źródłem zanieczyszczeń wody pitnej przez WWA są powłoki ze smoły węglowej w rurach dystrybuujących wodę pitną, które są używane w celu ochrony tych rur przed korozją. Fluoranten to najbardziej znany WWA znajdujący w wodzie pitnej; jest to przede wszystkim

związane ze stosowaniem okładzin ze smoły węglowej w żeliwnych rurociągach wodnych. WWA zostały wykryte w różnych produktach spożywczych jako wynik ich osadzania z powietrza oraz w rybach z zanieczyszczonych wód. WWA powstają również podczas niektórych metod przygotowywania żywności, takich jak: pieczenie, grillowanie, prażenie czy smażenie. Korzystanie z otwartych kominków grzewczych, co jest powszechne głównie w krajach rozwijających się, może zwiększyć ekspozycję na WWA. W przypadku, gdy istnieje podwyższony poziom skażenia wody w rurach przez powłoki ze smoły węglowej, spożycie WWA z wody pitnej może być równe spożyciu zanieczyszczonej żywności lub nawet przekraczać je (Guidelines for Drinking-water Quality 2011).

Antropogenicznym źródłem emisji WWA do środowiska jest praktycznie każdy proces prowadzący do niecałkowitego spalania związków organicznych, a więc oddziaływanie przemysłu (poważne zanieczyszczenie gleb na obszarach, gdzie przez wiele lat istniały zakłady przerobu węgla) oraz działania pozaprzemysłowe (spaliny pojazdów, spalanie odpadów, palenie tytoniu, przygotowywanie potraw). WWA będące wynikiem działalności człowieka zawsze występują w środowisku jako mieszaniny wieloskładnikowe. Skład ilościowy i jakościowy tych mieszanin jest różny w zależności od źródeł pochodzenia, którymi są:

- produkty niepełnego spalania paliw kopalnych;
- lotne pyły i popioły powstające ze spalania paliw lub utylizacji odpadów;
- przemysł ciężki związany z przetwarzaniem węgla i ropy naftowej (koksownie, rafinerie, huty żelaza, aluminium i miedzi, produkcja i wykorzystanie smoły i kreozotu),

w tym szczególnie istotne to:

- niska emisja pochodząca z indywidualnych źródeł ciepła (okres zimowy);
- transport samochodowy (tereny zurbanizowane) (Synak i in. 2010).

Naturalne i antropogeniczne substancje organiczne zawarte w wodach powierzchniowych, w tym węglowodory aromatyczne, nie zawsze są toksyczne, ale w wyniku procesów utleniania i dezynfekcji stają się substancjami niebezpiecznymi, tzw. ubocznymi produktami procesu utleniania i dezynfekcji (Anielak, Jaworska, Pitrus 2012). Związki ropopochodne, a szczególnie WWA, należą do tych istotnie negatywnie wpływających na organizmy żywe. Zanieczyszczenie wód tymi składnikami jest niebezpieczne dla życia biologicznego na skutek tworzenia powierzchniowych i zemulgowanych warstw odcinających dopływ tlenu atmosferycznego, a także sedymentacji cięższych frakcji nierozpuszczalnych w wodzie oraz toksycznego oddziaływania związków rozpuszczonych.

Substancje ropopochodne w środowisku wodnym mogą ulegać powolnym przemianom w wyniku różnorodnych procesów fizycznych, chemicznych, biologicznych czy też fotochemicznych (Walton, Anderson 1988; Pehkonen, Zhang 2002; MeeKyung, O'Keefe 2000). Przemiany te obejmują m.in. reakcje addycji, redukcji, hydrolizy, oksydacji czy też kompleksowania. Szybkość procesów degradacyjnych zależy od związków i medium, w jakim się one znajdują, a także



czynników środowiskowych charakterystycznych dla danego ośrodka. Powstające w wyniku tych reakcji związki mogą obciążać środowisko w mniejszym lub większym stopniu (Kot-Wasik, Dąbrowska, Namieśnik 2003).

## **2.2. Znaczenie substancji ropopochodnych dla środowiska i zdrowia człowieka**

Ekspozycja na składniki produktów ropopochodnych poprzez spożywanie wody przez człowieka jest najczęściej krótkoterminowa i powodowana przypadkowym wyciekami. Wiele najbardziej rozpuszczalnych węglowodorów aromatycznych jest wykrywalnych przez zmysł smaku lub zapachu w stężeniach poniżej stężeń stanowiących zagrożenie dla zdrowia, szczególnie w przypadku ekspozycji krótkoterminowej. Człowiek ma próg wrażliwości sensorycznej dla substancji takich jak alkilobenzeny i alkilonaftaleny na poziomie kilku mg/dm<sup>3</sup>. Dzięki temu ryzyko zatrucia zagrażającego zdrowiu poprzez jednorazowe spożycie zanieczyszczonej wody jest bardzo niewielkie (WHO 2011).

W przypadku incydentalnego wycieku substancji ropopochodnych może być konieczne przeprowadzenie specyficznej oceny ryzyka dla zdrowia. Fakt, że produkty ropopochodne są złożone z mieszaniny wielu węglowodorów, jest czynnikiem komplikującym ocenę potencjalnego ryzyka dla konsumentów. Tradycyjne podejście w ocenie szkodliwości poszczególnych związków chemicznych znajdujących się w wodzie pitnej zanieczyszczonej wyciekami jest w dużym stopniu niewłaściwe. W celu poprawy jakości analiz zagrożenia bardziej praktyczne jest oznaczenie wielu frakcji węglowodorów oraz określenie stężenia dopuszczalnego w wodzie dla tych frakcji. Metody badań służące ocenie zawartości i analizie tych substancji w dużym stopniu zależą od natury rozpatrywanego problemu. Zawartość nasyconych i aromatycznych węglowodorów w produktach ropopochodnych jest więc często ustalana osobno. Najbardziej powszechnie akceptowane podejście zostało opracowane przez Total Petroleum Hydrocarbons Criteria Working Group w Stanach Zjednoczonych, która podzieliła sumę węglowodorów ropopochodnych na frakcje alifatyczne i aromatyczne na podstawie liczby atomów węgla i temperatury wrzenia, aby otrzymać równoważną liczbę atomów węgla (WHO 2011). Mimo że podejście to opiera się na analizie frakcji węglowodorów, które w większości są słabo rozpuszczalne w wodzie, a najbardziej rozpuszczalne frakcje (składające się głównie z węglowodorów aromatycznych o niższej masie cząsteczkowej) występują w największym stężeniu, taki pragmatyzm stanowi odpowiednią podstawę dla oceny potencjalnych zagrożeń dla zdrowia związanych ze skażeniami wody pitnej przez produkty ropopochodne na większą skalę.

Badania wpływu na organizmy żywe ropy naftowej i substancji ropopochodnych powodowane są ich udowodnionym działaniem kancerogennym,

mutagennym i teratogennym (Bąkowski, Bodzek 1998; Billiard i in. 2008; Brette i in. 2014; Brette i in. 2017; Brown i in. 2017; Cunha i in. 2020). Niektóre związki pochodzące z przeróbki ropy naftowej są wyjątkowo rakotwórcze i mutagenne, co – z punktu widzenia zdrowotnego – jest najważniejszym następstwem ich oddziaływania na organizmy, zwłaszcza ludzi. Grupę szczególnie niebezpieczną stanowią związki pierścieniowe, zwłaszcza WWA. Do najbardziej niebezpiecznych WWA należą te o liczbie pierścieni powyżej trzech, spośród których można wymienić m.in. benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten czy dibenzo(a,e)piren (IARC 1983; Nisbet, LaGoy 1992; Burczynski, Lin, Penning 1999; Synak i in. 2010; Staal i in. 2007; Incardona i in. 2011; Bandowe i in. 2014; Jarvis i in. 2014; Perrichon i in. 2014; Goodale i in. 2015; Le Bihanic i in. 2015; Wincent i in. 2016; Chlebowski i in. 2017; Geier i in. 2018; Clerge i in. 2019; Idowu i in. 2019; McCarrick i in. 2019; Shankar i in. 2019; Cunha i in. 2020). Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA) wymienia 126 związków chemicznych i pierwiastków na liście „Zanieczyszczeń priorytetowych” (*Priority pollutants*) w Ustawie o czystej wodzie (Clean Water Act), które traktuje jako najbardziej szkodliwe. W grupie tych związków znajdują się wymienione w tabeli 5 węglowodory oraz m.in. składniki benzyny (np. benzen, toluen, etylobenzen) oraz inne węglowodory jednopierścieniowe i WWA (Federal Water Pollution Control Act 2002).

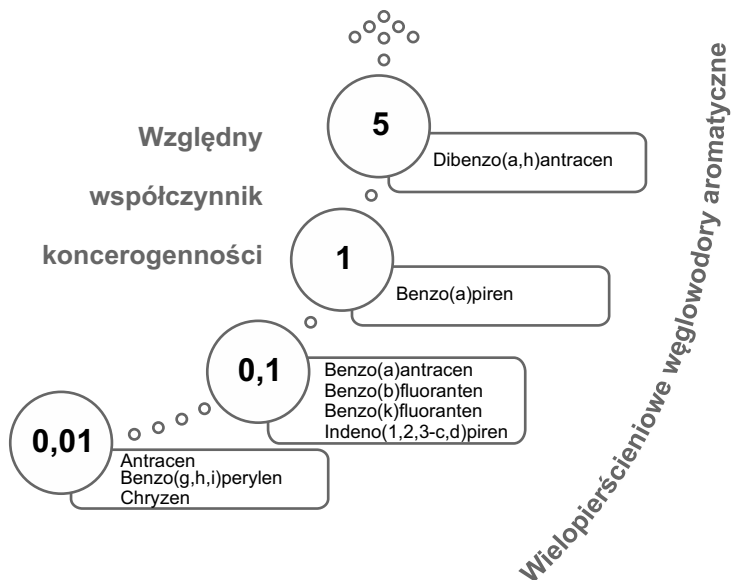
WWA absorbowane są przez rośliny z zanieczyszczonego powietrza, gleby czy też wód gruntowych, przez co mogą gromadzić się w różnych ich organach: liściach (Prajapati, Tripathi 2008; Murakami i in. 2012; Wang, Liu, Yang 2012), korzeniach (Wang, Liu, Yang 2012; Binet, Portal, Leyval 2000), korze, w łyku, na poziomie miazgi oraz ksylemu w rocznych przyrostach pierścieniowych (Yin i in. 2011; Kuang i in. 2014). Badania wykazały niekorzystny wpływ tych pyłów na procesy syntezy biologicznej w roślinach zimozielonych (Gacek, Szopa, Czerniak 2014). Wykazano, że WWA mogą być transportowane z korzeni roślin do ich liści (Oleszczuk, Baran 2005; Lin i in. 2006), prawdopodobnie wraz z wiosennym sokiem drzewnym, co stanowi również potencjalne zagrożenie dla konsumentów. Chemiczne środki ochrony roślin (do których produkcji są stosowane m.in. WWA) również mogą być powodem pojawienia się zanieczyszczeń w sokach drzewnych (Odukkathil, Vasudevan 2013). Substancje te są absorbowane przez rośliny, zarówno przez liście, jak i system korzeniowy, wchłaniane są z gleby i z wód podziemnych (Tarcau i in. 2013). Zostało udowodnione, że pestycydy przy wprowadzaniu do gleby wokół systemu korzeniowego, a także na skutek spływu wraz z wodami powierzchniowymi pobierane są przez korzenie i transportowane do nadziemnych części rośliny (Sammarie, Akela 2011). Może to stanowić niebezpieczeństwo dla konsumentów spożywających rośliny i ich soki z obszarów zanieczyszczonych. Do wnętrza organizmu ludzkiego związki z grupy WWA dostają się przez drogi oddechowe, skórę, ale przede wszystkim przez układ pokarmowy.

W celu systematycznej oceny WWA zostały ustalone „względne współczynniki kancerogenności” (WWK), odnoszące się do rakotwórczości benzo(a)-pirenu (B(a)P). Określono je przez porównanie danych z badań dotyczących stanu m.in. skóry. Kolejność kancerogennej mocy WWA jest spójna. W związku z tym stworzono użyteczny schemat dla określania mocy rakotwórczej tych związków w stosunku do B(a)P.

Założeniem tej koncepcji jest przyjęcie B(a)P jako związku wskaźnikowego, dla którego ustalono wartość WWK równą 1. Siła rakotwórczego działania innych związków obliczana jest w stosunku do B(a)P (Smolik 2001). Wartość WWK równa 0 oznacza brak aktywności rakotwórczej związku. Odpowiedni model matematyczny rozwijający tę koncepcję zastosowali w 1992 r. Nisbet i LaGoy (Nisbet, LaGoy 1992) i obliczyli na podstawie dostępnych wyników badań WWK dla 17 WWA.

IARC (International Agency for Research on Cancer) już w 1983 r. podjęła próbę oceny kancerogennego działania 41 WWA. W wyniku tej analizy wyodrębniono siedem WWA występujących w powietrzu i w żywności: benzo(a)antracen, chryzen, benzo(b)fluoranten, benzo(j)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren i indeno(1,2,3-c,d)piren, które uznano za substancje najbardziej rakotwórcze z badanej grupy.

Wartość względnych współczynników kancerogenności dla uznanych obecnie (2021 r.) dziewięciu najbardziej toksycznych WWA przedstawiono na rys. 6.



**Rysunek 6.** Wartości względnych współczynników kancerogenności dla najbardziej rakotwórczych WWA

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Nisbet, LaGoy 1992.

Jako miarę narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne przyjmuje się wskaźnik będący sumą iloczynów stężeń tych dziewięciu WWA i ich względnych współczynników rakotwórczości.

Oprócz bezpośredniego zagrożenia WWA stwarzają dodatkowo niebezpieczeństwo pośrednie. W środowisku pojawiają się produkty przejściowe rozkładu tych substancji. W procesach oczyszczania – w wyniku utleniania i dezynfekcji związków chemicznych, nawet nieszkodliwych – często są generowane nowe, niebezpieczne związki kancerogenne i mutagenne. Często wykazują one znacznie większą toksyczność dla mikroorganizmów, zwierząt i ludzi niż substancje wyjściowe (Wang, Wang, Shao 2018). Przykładem mogą być przemiany niektórych związków aromatycznych (Carmona i in. 2009; Ghosal 2016). Mają one działanie prokancerogenne i powodują zapoczątkowanie procesów tworzenia komórek złośliwych oraz działanie promutagenne, czyli uruchamiające procesy zmian materiału genetycznego, które następnie przekazywane są potomstwu (Nwinyi, Ajayi, Amund 2016; Cao, Wang, Liu 2020). W organizmie ludzkim przy narażeniu środowiskowym główną drogą wchłaniania WWA jest przewód pokarmowy. Substancje te ulegają enzymatycznemu utlenianiu w komórkach układu wątrobowego, a ich metabolitami są kolejno: epoksydy, diole, fenole i chinony. Szczególnie te pierwsze są wyjątkowo groźne (Kot-Wasik, Dąbrowska, Namieśnik 2003).

Interakcja WWA i innych związków może powodować wyższe lub niższe wskaźniki rozwoju nowotworów, niż można oczekiwać na podstawie zawartości znanych rakotwórczych WWA. Wyniki badań pokazują, że WWA i mieszaniny WWA mogą wywoływać kardiotoxycznosc oraz że zależy ona od wielkości i struktury WWA (Incardona i in. 2004; Incardona i in. 2005; Incardona i in. 2011; Van Tiem, Di Giulio 2011; Brette i in. 2017).

### 3. Metody oznaczania substancji ropopochodnych w wodzie

Zanieczyszczenie wody może być ważnym czynnikiem ograniczającym dostępność jej zasoby. Brak lub niedobór czystej wody stanowi poważny problem, który wpływa na środowisko i powoduje nierównowagę społeczno-ekonomiczną. Z tego powodu należy opracowywać nowe, coraz doskonalsze strategie procesów oczyszczania środowiska wodnego, a także dążyć do lepszego zrozumienia tych procesów. Kluczowe jest monitorowanie stanu wód za pomocą odpowiednich i wygodnych technik analitycznych, a następnie podjęcie działań w odpowiednim czasie i przestrzeni (*in situ*, *ex situ*).

Istnieją trzy badania, które są zwykle wymagane w odniesieniu do węglowodorów w środowisku. Prowadzi się monitoring: BTEX (benzen, toluen, etylobenzen i ksyleny), TPH (suma węglowodorów ropopochodnych) i WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne). Ponieważ właściwości węglowodorów zależą od wielkości cząsteczek, często przydatne jest odniesienie się do liczby atomów węgla zawartych w węglowodorze. I tak stan skupienia węglowodorów przedstawia się następująco:  $C_1$ – $C_4$  to gazy,  $C_5$ – $C_{16}$  to ciecze, powyżej  $C_{16}$  to ciała stałe. Węglowodory mają niską rozpuszczalność w wodzie: węglowodory nienasycone i aromatyczne są słabo rozpuszczalne w wodzie, natomiast węglowodory nasycone są nierozpuszczalne w wodzie. Rozpuszczalność maleje wraz ze wzrostem wielkości cząsteczek. Podano w poprzednim rozdziale przybliżoną ideę względnej rozpuszczalności węglowodorów w wodzie: monoaromatyczne (benzen > toluen > etylobenzen itp.) > olefiny > alkany (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Standardowo stężenie związków ropopochodnych w środowisku wodnym podaje się w postaci ich sumy TPH. Suma węglowodorów ropopochodnych (TPH) to termin powszechnie stosowany do opisania ilości węglowodorów ropopochodnych wyekstrahowanych i oznaczonych ilościowo za pomocą określonej metody w matrycy środowiskowej. Historycznie TPH mierzono za pomocą metody US EPA 418.1, która obejmowała ekstrakcję do freonu i pomiar za pomocą spektroskopii w podczerwieni. Ze względu na szkodliwy wpływ freonów na warstwę ozonową nie można obecnie używać tej

metody (Konwencja wiedeńska o ochronie warstwy ozonowej, Dz.U. z 1992 r. Nr 98, poz. 488). Dzisiejsza aparatura daje szerokie możliwości oznaczania związków ropopochodnych różnymi metodami analitycznymi, w zależności od celu badań. Szczegółowe opisywanie przeprowadzonej analizy oraz stosowanie sprawdzonych, powtarzalnych metod jest – poza podawaniem wyników analiz – czynnikiem strategicznym. Metody analityczne oznaczania TPH znacznie się od siebie różnią; każda zapewnia wyniki w określonym zakresie, a niektóre są niespecyficzne. Metody o różnej wydajności ekstrakcji mogą dawać różne stężenia TPH dla tej samej próbki (Speight 2014). Wyniki uzyskane przy użyciu odmiennych procedur są więc zawsze trudne do porównania, ponieważ w grę wchodzi różne standardy kalibracji i rozpuszczalniki ekstrakcyjne (Wongnapapan, Wattayakorn, Snidvongs 1999). Stąd zrozumienie, w jaki sposób przeprowadzono analizę, jest bardzo istotne dla poprawnej interpretacji uzyskanych wyników. Dodatkowy opis jakościowy uzupełniający opis ilościowy jest niezwykle ważny ze względu na możliwość porównywania wyników z danymi zaczerpniętymi z literatury, porównanie analiz wykonanych przez różne laboratoria, także różnymi metodami. Postępowanie takie czyni ocenę realnego stanu środowiska poprawną.

Opisywane w literaturze metody badań obejmujące monitoring zanieczyszczeń środowiska substancjami ropopochodnymi są bardzo różnorodne. W zależności od badanych frakcji ropy naftowej lub rodzajów związków ropopochodnych wybierane są inne techniki analiz. Wiele z nich to techniki o skomplikowanym przebiegu. W kolejnych akapitach pokrótce opisano najczęściej wybierane metody analizy zanieczyszczeń węglowodorowych występujących w środowisku wodnym, jednak najwięcej miejsca poświęcono metodom fluorymetrycznym ze względu na wybór tej właśnie techniki do przeprowadzenia badań i pomiarów opisanych w dalszej części książki.

Można wyróżnić dwie grawimetryczne metody EPA. Opisane są one w rekomendacjach zawartych w Ustawie o czystej wodzie (Clean Water Act): EPA 413.1 dla olejów i smarów w wodzie (EPA/600/4-79/020) oraz EPA 1664A (EPA-821-R-98-002) dla materiału dającego się ekstrahować n-heksanem z żelu krzemionkowego (uważanego również za całkowite węglowodory ropopochodne). Obie obejmują ekstrakcję rozpuszczalnikiem, odparowanie i ważenie do stałej masy (Cortes i in. 2012), ale metoda olejowo-tłuszczowa nie rozróżnia polarnej materii organicznej od części węglowodorów ropopochodnych (Matthew 2009). EPA 1664A została opracowana w celu zastąpienia EPA 413.1, która wykorzystuje jako rozpuszczalnik ekstrakcyjny freon (substancję zubożającą warstwę ozonową). Nowa metoda polega na ekstrakcji n-heksanem, który jest bardziej przyjazny dla środowiska (ale łatwopalny) i może oznaczać całkowite stężenie węglowodorów ropopochodnych w tej samej procedurze dla analizy oleju i smaru (EPA-821-R-98-002). Grawimetryczne oznaczanie TPH w próbkach środowiskowych jest dość proste i niedrogi, dzięki czemu zyskało przez

lata bardzo dużą popularność, ponieważ nie wymaga żadnej specjalistycznej aparatury. Jednak metoda ta jest bardziej odpowiednia dla próbek o wysokim stężeniu analitów ze względu na jej niską czułość. Ponadto jest to technika czasochłonna, zwłaszcza na etapie odparowania rozpuszczalnika, a także wykazuje dużą tendencję do utraty związków o niskiej masie cząsteczkowej, co powoduje błędy w pomiarze (Okparanma, Mouazen 2013). Skuteczność ekstrakcji rozpuszczalnika jest stosunkowo niska w przypadku związków o wyższej masie cząsteczkowej, ale można ją zwiększyć przez dodanie chlorku sodu. Koekstrakcji części materii organicznej z wieloma polarnymi grupami funkcyjnymi sprzyja niska polarność rozpuszczalnika (Martl, Ritter 2013).

Całkowitą zawartość węglowodorów oznaczać można poprzez techniki instrumentalne, stanowiące niezwykle obszerny zbiór metod i technik badawczych, które zyskują coraz większe znaczenie we współczesnej analityce. Wyróżniają się one prostotą stosowanych procedur, co ułatwia automatyzację badań oraz oferuje znaczące przyspieszenie oznaczeń przy wykorzystaniu minimalnej liczby próbek. Jednocześnie dokonywać można oznaczeń seryjnych z dużą powtarzalnością wyników. Metody te wymagają zwykle kalibracji i przygotowania wzorców ze względu na porównawczy charakter oznaczenia. W analityce substancji ropopochodnych do charakterystyki ciężkich frakcji naftowych oraz smół i ekstraktów węglowych wykorzystuje się metody spektroskopowe, np. IR, UV, NMR (Brown, Ladner 1960; Speight 1970; Śliwka, Surygała 1994; Wang, Fingas, Sergy 1994; Śliwka 2000; Surygała [red.] 2006). Natomiast do oznaczania substancji ropopochodnych w próbkach środowiskowych wykorzystuje się także metodę chromatografii gazowej (GC) oraz spektrometrię w podczerwieni (IR). Metody spektroskopowe z powodzeniem wykorzystywane są w analizie jakościowej i ilościowej w różnych dziedzinach przemysłu. Zaletą metod spektroskopowych jest ich nieniszczący charakter i możliwość wykonania pomiarów bezpośrednio na próbce, a także ewentualność zastosowania w badaniach różnych aspektów jakości produktów, np. wody.

Metoda IR umożliwia oznaczenie różnych klas węglowodorów, takich jak olej i smar, związki organiczne z grupy benzyny lub suma węglowodorów ropopochodnych (TPH) (Strother, Lowry, Bravo 2013). W ilościowym oznaczaniu węglowodorów wykorzystuje się absorpcję w połączeniu z pomiarem intensywności pasm pochodzących od drgań walencyjnych poszczególnych grup węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Sumaryczne oznaczanie stężenia związków ropopochodnych (TPH) polega na pomiarze absorpcji promieniowania IR. Analizując widma w zakresie MIR, można przyporządkować charakterystyczne pasma odpowiednim drganiom grup funkcyjnych. W układach aromatycznych i w alkenach w zakresie  $1000\text{--}635\text{ cm}^{-1}$  występują silne pasma pochodzące od drgań deformacyjnych wiązań C-H poza płaszczyznę cząsteczki. Obszar  $1500\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  odpowiada drganiom deformacyjnym w płaszczyźnie grupy metylenowej oraz metylowej. Dla związków aromatycznych

i heteroaromatycznych w zakresie  $1600\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  pojawiają się silne pasma drgań szkieletowych. W dolnej części rejonu  $1800\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  obserwowane są drgania odpowiadające m.in. alkenom ( $\text{C}=\text{C}$ ). W rejonie  $2000\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$  występują słabe pasma przypisane nadtonom drgań deformacyjnych wiązań  $\text{C-H}$  poza płaszczyzną pierścienia aromatycznego. Kolejny zakres  $2700\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$  pokazuje ostre pasma wskazujące na obecność wiązań potrójnych ( $\text{C}=\text{C}$  lub  $\text{C}\equiv\text{N}$ ), natomiast szerokie pasma absorpcyjne przypisuje się grupie  $\text{OH}$  lub  $\text{N-H}$ . W obszarze  $2800\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$  pojawia się słabe wąskie pasmo pochodzące od drgań rozciągających wiązań  $\text{C-H}$  w aldehydach, grupie metoksynowej i  $\text{N}$ -metylowej. Przy liczbie falowej  $2850\text{ cm}^{-1}$  występują nakładające się pasma przypisane drganiom rozciągającym wiązań  $\text{C-H}$ . Szerokie pasma absorpcyjne o dużej lub średniej intensywności występujące w obszarze  $3650\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$  sugerują obecność grup  $\text{O-H}$  lub  $\text{N-H}_2$ . W rejonie tym widoczne jest również ostre pasmo o średniej intensywności przy liczbie falowej  $3300\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające grupie etylenowej (Zieliński, Rajca, 2000; Burns, Ciurczak 2001; Stuart 2004; Silverstein i in. 2007). Dla badań węglowodorów ropopochodnych wykorzystuje się absorpcję światła wiązania  $\text{C-H}_2$  przy  $2930\text{ cm}^{-1}$ , co jest charakterystyczne dla oleju i smaru, lub pomiar absorbancji w zakresie od  $3200\text{ cm}^{-1}$  do  $2700\text{ cm}^{-1}$ , po którym następuje ostateczny odczyt następnie porównywany z absorbancją wzorca oleju odniesienia (ATSDR 1999; EPA-821-R-98-002).

Zaletą metody jest wyeliminowanie etapu odparowania rozpuszczalnika, dzięki czemu jest ona bardziej odpowiednia dla lotnych składników ropy naftowej (Onianwa 1995). Pomiar jest bardzo powtarzalny i dokładniejszy od metod grawimetrycznych, oszczędza czas i jest stosunkowo łatwiejszy do przeprowadzenia (Martl, Ritter 2013). Jednak odczyty IR czasami mogą błędnie sugerować obecność zanieczyszczeń ropopochodnych w wodzie, ponieważ niektóre związki pochodzenia innego niż ropne (np. kwas humusowy lub fulwowy) mogą generować silną absorbancję w zakresie podczerwieni wykorzystywanej w pomiarach, dając fałszywie dodatni wynik, zwłaszcza gdy pominięto etap oczyszczania (Cortes i in. 2012). Dodatkowo metoda ta nie daje informacji na temat rodzaju wykrytego węglowodoru. Metody IR używane do pomiarów węglowodorów ropopochodnych zarekomendowane były w Ustawie o czystej wodzie i obejmowały EPA 413.2 dla całkowitego odzyskiwalnego oleju i smaru (TOG) oraz EPA 418.1 dla wszystkich odzyskiwalnych węglowodorów ropopochodnych (TRPHC) (ATSDR 1999). Obie metody wykorzystywały fluorowęglowodór  $\text{CFC-113}$ , który został wycofany z użycia. Również rozpuszczalniki chlorowcowane (freon,  $\text{CCl}_4$ ) stosowane do ekstrakcji w tej metodzie, chociaż stosunkowo nietoksyczne i niepalne, są głównym źródłem substancji zubożających warstwę ozonową, które zostały wycofane w nowelizacji ustawy o czystym powietrzu z 1990 r. (Strother, Lowry, Bravo 2013). Dlatego też EPA 418.1 jest stopniowo zastępowana metodą grawimetryczną EPA (EPA 1664) wymagającą użycia  $n$ -heksanu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego i/lub metodą chromatografii



gazowej (np. ISO 9377-2 lub 8015D) (Cortes i in. 2012; Martl, Ritter 2013; EPA-821-R-98-002).

Zgodnie z obowiązującym Rozporządzeniem Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 r. w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych (Dz.U. z 2019 r. poz. 1311) metodą służącą do oznaczenia węglowodorów ropopochodnych jest chromatografia gazowa. Norma PN-EN ISO 9377-2 jest opisem metody GC stosowanej do oznaczenia indeksu oleju mineralnego w wodach powierzchniowych, ściekach i ściekach oczyszczonych. Poza najczęściej stosowaną techniką chromatografii gazowej GC-FID wykorzystuje się technikę GC sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz dwuwymiarową chromatografię gazową (GC×GC) (Śliwka 2000; Wang, Fingas, Sergy 1994; Gros i in. 2014).

Wodne próbki pólnotne są najczęściej przygotowywane metodą ekstrakcji ciecz–ciecz, chociaż można również stosować ekstrakcję do fazy stałej. Próbki stałe są zwykle ekstrahowane za pomocą urządzenia Soxhleta. Ekstrakty poddaje się oczyszczaniu kolumnowemu na bazie tlenku glinu lub żeluz krzemionkowego, za pomocą którego usuwa się substancje tłuszczowe na podstawie polarności, a węglowodory ropopochodne są frakcjonowane na frakcje alifatyczne i aromatyczne. Każda frakcja jest następnie bezpośrednio wstrzykiwana do chromatografu gazowego wyposażonego w niepolarną kolumnę kapilarną w celu oznaczenia analitycznego (EPA 8015C; Weisman [red.] 1998). Identyfikację analitów przeprowadza się przez porównanie czasu retencji pojedynczego związku z czasem retencji wzorca odniesienia. Wzorce kalibracyjne służą do sporządzania krzywych kalibracyjnych, za pomocą których określa się ilościowo interesujące związki (Weisman [red.] 1998).

Frakcje alifatyczne i aromatyczne są oddzielnie analizowane na chromatografie gazowej przy użyciu detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID), który ze względu na względną czułość i selektywność w odniesieniu do węglowodorów jest wybierany najczęściej. Te dwie frakcje zazwyczaj dzieli się na zakresy liczby atomów węgla na podstawie markerów WWA i n-alkanów (Cortes i in. 2012; BCME 2001). W celu określenia całkowitego poziomu węglowodorów ropopochodnych w próbce najczęściej są szacowane obszary objęte składnikami rozdzielonymi i nierozdzielonymi (Wang, Fingas 2003).

Całkowite węglowodory są czasami mierzone za pomocą FID, podczas gdy frakcja aromatyczna jest określana za pomocą detektora fotojonizacyjnego (PID). Dlatego frakcję alifatyczną szacuje się, odejmując zawartość aromatyczną od całkowitego wyniku dla węglowodorów. Jednak PID nie jest całkowicie selektywny dla związków aromatycznych i dlatego może być przeszacowany. Alternatywnie GC w połączeniu z detektorem spektrometrii mas (MSD), szczególnie w trybie monitorowania jonów (SIM), może dać lepsze wyniki w analizie

związków aromatycznych. Dzieje się tak, ponieważ SIM pozwala na wykrywanie związku obecnego w wyjątkowo niskim stężeniu w złożonej matrycy, jednak pod warunkiem, że pożądany związek ma znaczący jon fragmentaryczny o masie, która odróżnia go od innych związków węglowodorowych, a także może dostarczyć bardziej kompleksowych informacji na temat związku (Cortes i in. 2012).

Wadami metod chromatografii są czasochłonność oraz bardzo droga aparatura analityczna (chromatograf gazowy wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny lub foto-jonizacyjny). Ponadto wyżej cząsteczkowe zanieczyszczenia ropopochodne stanowią mieszaniny o bardzo złożonym charakterze, których poszczególne składniki są trudne do rozdzielania i analizy ilościowej (Śliwka, Kołwzan, Kołodziej 2015). Węglowodory ropopochodne składają się głównie z trzech grup związków: alkanów, alkenów i związków aromatycznych (Wigger, Torkelson 1997), z których alkany są kluczowymi składnikami wielu rafinowanych produktów ropopochodnych (np. benzyny, oleju napędowego, nafty, paliwa do silników odrzutowych i oleju opałowego) i są podzielone na kilka klas, które obejmują: alkany liniowe (n-alkany), alkany rozgałęzione, izoprenoidy, cykloalkany (np. sterany i triterpany) oraz nierozpuszczalne złożone mieszaniny, które są trudne do rozdzielania metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych (Wongnapapan, Wattayakorn, Snidvongs 1999; de Abreu-Mota i in. 2014). Obecność nierozpuszczalnych złożonych mieszanin na chromatogramach zwykle wskazuje na degradację ropy naftowej. Są one powszechnie spotykane w zakresie n-alkanów o dużej masie cząsteczkowej, ale czasami występują również w przedziale niskocząsteczkowym (Revill, Carr, Rowland 1992; Sakari i in. 2014).

Zawsze występuje kompromis w wyborze kolumny GC i warunków, które zapewnią dobre oddzielenie substancji lotnych i takich, które będą oddzielać węglowodory o większej zawartości węgla w cząsteczkach. Ze względu na utratę substancji lotnych podczas ekstrakcji US EPA i inne organizacje nie akceptują ważności wyników dla benzenu (C6) uzyskanych metodami ekstrakcji rozpuszczalnikiem. Bardziej lotne węglowodory należy analizować przy użyciu dodatkowych technik (np. Prug&Trap lub Headspace), najlepiej za pomocą chromatografii gazowej-spektrometrii mas (GC-MS). WWA pochodzą głównie z oleju napędowego, ciężkich frakcji ropy naftowej i ze źródeł węglowych. Wszystkie metody chromatograficzne oddzielają poszczególne WWA, a zatem każda wartość „WWA ogółem” odzwierciedla stężenia pojedynczych związków, które dodano, aby uzyskać sumę. Różne metody badania „WWA ogółem” mogą dawać więc różne sumy. Analiza WWA może być przeprowadzona za pomocą GC-MS lub wysokoprężnej chromatografii cieczowej HPLC z detektorem fluorescencyjnym.

Do szerokiego zakresu rozwiązywania problemów dotyczących zanieczyszczenia środowiska wodnego można zastosować spektroskopię absorpcyjną

fluorescencyjną. Najstarszą z technik stosowanych w badaniach fizyko-chemicznych jest spektroskopia UV/VIS, lecz mimo tego nadal pozostaje w użyciu ze względu na wiele zalet. Ogólnie w analizie produktów ropopochodnych wykorzystuje się m.in. spektroskopię absorpcyjną w zakresie: nadfioletu (UV), widzialnym (Vis) w podczerwieni bliskiej (NIR) i podstawowej (MIR), spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektroskopię emisyjną (Scotter 1997; Christensen i in. 2006; Sadecka, Tothova 2007). Spektroskopia absorpcyjna UV wykorzystuje właściwości niektórych związków organicznych, m.in. ropopochodnych związków aromatycznych, do silnego pochłaniania promieniowania UV. Oznaczając absorbancję promieniowania UV próbki wody lub ścieków, można określić sumę związków organicznych występującą w badanej próbce. Wysoka korelacja zachodzi pomiędzy promieniowaniem UV, barwą oraz zawartością związków organicznych. Metoda ta jest stosowana do monitoringu ścieków przemysłowych i oceny usuwania związków organicznych w procesie koagulacji. Analizuje się zawartość rozpuszczonych w wodzie związków organicznych, głównie aromatycznych (benzenu, toluenu, fenoli). Analiza ta nie obejmuje jednak wszystkich związków organicznych występujących w wodzie, zwłaszcza niektórych węglowodorów alifatycznych. W analityce ciężkich frakcji naftowych oraz smół i ekstraktów węglowych również wykorzystuje się metody spektroskopowe, tj. IR, UV, NMR (Surygała [red.] 2006; Brown, Ladner 1960; Speight 1970; Śliwka, Surygała 1994). Za pomocą techniki spektroskopii w podczerwieni (IR) (Śliwka 2000; Wang, Fingas, Sergy 1994) oznacza się sumaryczną liczbę związków ropopochodnych. Oznaczenie to może być wykonywane tylko w przypadku substancji rozpuszczalnych w ekstrakcie.

Metodami znacznie przewyższającymi absorpcyjometryczne pod względem czułości są metody fluorymetryczne. Spektroskopia fluorescencyjna jest jedną z najszerzej stosowanych metod spektroskopii optycznej w badaniach analitycznych. Postępy w technologii fluorescencyjnej przyczyniają się do zmniejszenia kosztów i upraszczania wcześniej niejednokrotnie złożonych instrumentów. Wdrożenie aparatury, która może być stosowana bezpośrednio w terenie (małe rozmiary, zmniejszona waga, autonomiczność) oraz która może zapewnić szybką analizę badanej próbki, jest interesującą kwestią zarówno dla laboratoriów badawczych, podmiotów naukowych, jak i prawnych. W publikacjach naukowych można znaleźć dziesiątki tysięcy badań, w których została wykorzystana właśnie ta metoda. Ma ona szeroki zakres stosowalności, począwszy od analiz śladowych ilości metali w środowisku po pomiary pH komórek w warunkach fizjologicznych. Spektroskopię fluorescencyjną stosuje się do badania zarówno typowych związków organicznych, jak i związków o dużej masie cząsteczkowej, w tym biomolekuł oraz związków nieorganicznych. W laboratoriach naukowo-badawczych jest stosowana do analizowania fundamentalnych procesów molekularnych. W zastosowaniu analitycznym zjawisko fluorescencji używane jest przede wszystkim w laboratoriach klinicznych, gdzie fluorescencyjne testy

immunologiczne w dużej mierze zastąpiły techniki radioaktywne (Szabo 2000). Istnieje kilka powodów tak szerokiego wykorzystania spektroskopii fluorescencyjnej. Przede wszystkim jest to wysoki poziom czułości i szeroki zakres pomiarowy, jaki można osiągnąć. Można za ich pomocą oznaczać substancje zarówno organiczne, jak i nieorganiczne o stężeniach od dziesiętnych części ppb do kilku ppm. Metody te charakteryzują się dobrą precyzją i dokładnością, są bardziej selektywne niż metody absorpcyjometryczne, ponieważ dają większą możliwość doboru warunków oznaczenia w postaci odpowiedniej długości fali promieniowania wzbudzającego i mierzonego wtórnego promieniowania fluorescencji oraz pH roztworu. Pomiary wymagają niewielkich ilości substancji, które po wykonaniu analizy można odzyskać. Poprzez wstępne określenie zakresu stężeń badanych substancji w próbkach można dodatkowo obniżyć koszty analiz, które dają jedną z najlepszych dokładności pomiarowych. Oprzyrządowanie do pomiarów fluorescencji jest wygodne i osiągnęło wysoki poziom dojrzałości, jednak jego doskonalenie trwa nadal. Ogólnie aparaty UV/Vis należą do najtańszych w porównaniu z innymi technikami spektroskopowymi. Automatyczna rejestracja widm jest techniką szybką, więc na rezultaty badań nie trzeba czekać.

Fluorescencję związków wykorzystuje się zarówno w oznaczeniach jakościowych, jak i ilościowych. Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej w badaniach jakości wody ujawnia charakterystyczne długości fal związane z określonymi zanieczyszczeniami. Techniki te można wykorzystać do mapowania właściwości i zanieczyszczeń pochodzących z próbek wody (wody powierzchniowej, gruntowej i morskiej) zebranych podczas rutynowego pobierania próbek, bez konieczności wykonywania dodatkowych prac w terenie. Technikę tę stosuje się również do badań żywności, gdzie rozpuszczalnikiem jest woda (Czerniak, Gacek, Szopa 2011; Gacek i in. 2012; Sikorska 2008). W rzeczywistości wraz z postępem technologicznym spektroskopia fluorescencyjna stała się elastycznym, szybkim i przenośnym narzędziem diagnostycznym.

Wspomnieć jednak trzeba także o ograniczeniach tej techniki. To, że dotyczy ona rejestracji widm elektronowych, narzuca jedynie wybrane obszary zastosowań. Z drugiej strony wada ta jest także zaletą, gdyż selektywność metody determinowana jest tym, że nie wszystkie związki fluoryzują, a te, które mają taką własność, fluoryzują pod wpływem określonego promieniowania w ściśle określonej długości fali.

### 3.1. Fluorescencja w wodach naturalnych

Fluorescencja w naturalnych wodach jest generowana głównie przez kwasy humusowe (huminowe i fulwowe) i grupy aminokwasowe w białkach, których obecność wynika głównie z rozkładu materiału roślinnego (Senesi i in. 1991). Kwasy huminowe (HA) mają większą długość fali wzbudzenia i emisji

fluorescencji niż kwasy fulwowe (FA) (Miano i in. 1988) ze względu na wzrost stopnia aromatyczności, zawartości grup karboksylowych oraz polikondensowanych i sprzężonych struktur aromatycznych. Ponadto do najczęściej badanych fluorescencyjnych składników organicznych wód naturalnych należą aminokwasy w białkach i peptydach. Trzy fluorescencyjne aminokwasy (tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina) wskazują na obecność białek i peptydów. Fluorescencja tych charakterystycznych aminokwasów wynika z obecności grupy indolowej (heterocyklu skondensowanego pierścienia zawierającego zarówno pierścień benzenowy, jak i heterocykliczny pierścień aromatyczny, w którym atom azotu występuje jako część pierścienia) lub innej aromatycznej struktury pierścienia, w której elektrony są „współdzielone”, a nie występują jako pary z przeciwnymi spinami, a zatem są „luźno związane” i dostępne w celu przeniesienia na wyższy poziom energetyczny.

Ze względu na trudności związane z identyfikacją poszczególnych związków fluorescencyjnych w wodach te grupy fluoroforów są nazywane humusopodobnymi, fulwowopodobnymi i białkopodobnymi (szczególnie tryptofanopodobnymi lub tyrozynopodobnymi), ponieważ ich fluorescencja występuje w tym samym obszarze długości fal (Pittalis i in. 2012).

Antropogeniczne źródła rozpuszczonej materii organicznej (DOM, ang. *dissolved organic matter*), takie jak odpady z gospodarstw czy odcieki z oczyszczalni ścieków, charakteryzują się wysokim poziomem fluorescencji białkowej (tryptofanowej i/lub tyrozynowej) (Baker 2001). Fluorescencję można wykorzystać do śledzenia DOM w obrębie „naturalnych” zlewni (Baker, Inverarity 2004), ponieważ w kształtowaniu się właściwości wód w tym obszarze biorą udział nie tylko jego naturalne elementy składowe (podłoże i szata roślinna), lecz również zewnętrzne czynniki – klimat i działalność człowieka. Także stosunek tryptofanu do kwasu fulwowego można wykorzystać do identyfikacji różnych potencjalnych źródeł DOM (Baker 2002). Spektroskopia fluorescencyjna została również zastosowana w celu oszacowania zawartości fluorescencyjnych środków wybielających jako część większości detergentowych preparatów do prania (Boving i in. 2004).

Metody fluorymetryczne znajdują zastosowanie w szacowaniu ilości zanieczyszczeń aromatycznymi węglowodorami w ujściach rzek i wód morskich (Maher 1983). Zarówno ropa naftowa, jak i paliwa zawierają różne fluorofory, które pod wpływem promieniowania ultrafioletowego wykazują silną fluorescencję, różniącą się intensywnością i odcieniem. Fluorescencja ta wynika głównie z emisji węglowodorów aromatycznych.

Technika fluorescencji okazuje się również dobrym narzędziem do uzyskania informacji o składzie fitoplanktonu. Fitoplankton jest pierwszym ogniwem wodnego łańcucha pokarmowego i można go uznać za bardzo czuły wskaźnik stanu ekologicznego systemu wodnego. Liczne badania wykazały, że zanieczyszczenia organiczne, a w następstwie tego zwiększona ilość składników

odżywczych, mogą powodować zmiany w składzie taksonomicznym fitoplanktonu (Kaas, Henriksen 2000; Sivonen, Jones 1999).

Pigmenty fotosyntetyczne fitoplanktonu mają za zadanie wychwytywać światło słoneczne o określonych długościach fal w celu fotosyntezy. Chlorofil to zielone pigmenty, które zawierają stabilną cząsteczkę porfiryny w kształcie pierścienia, wokół której elektrony mogą swobodnie migrować. Pierścień może łatwo zyskać lub stracić wzbudzone elektrony, dostarczając pobudzone elektrony do pobliskich cząsteczek. W tym procesie chlorofil przechwytuje energię fotonów ze światła słonecznego i przenosi ją do innych cząsteczek, które są odpowiedzialne za kolejne etapy łańcucha procesu fotochemicznego.

Chlorofil a (chl a) jest głównym związkiem z grupy chlorofili. Wszystkie taksony fitoplanktonu zawierają chlorofil a, z tego powodu jego stężenie uważa się za wskaźnik biomasy fitoplanktonu (Morel, Berthon 1989). Oznaczanie chlorofilu a (chl a) wykonuje się rutynowo w badaniach wód morskich. Stężenie chlorofilu jest skorelowane ze stężeniem fitoplanktonu i dlatego jest wykorzystywane do oszacowania wielkości produkcji pierwotnej i biomasy w oceanach. Oprócz chl a w próbkach morskich występuje również chlorofil b (chl b) i chlorofil c (chl c), wraz z ich odpowiednimi produktami degradacji; fenofityną a, feofityną b i fenoporfiryną c. Znajomość pigmentów pomocniczych (chl b i chl c) i ich produktów degradacji dostarcza użytecznych informacji dotyczących składu taksonomicznego i stanu populacji glonów (Moberg i in. 2001).

Udoskonalenia technologii spektroskopii fluorescencyjnej, w szczególności zakres i stabilność długości fali źródła światła, szybkość skanowania i możliwości przetwarzania danych, pozwoliły jej stać się bardziej elastycznym, szybkim i przenośnym narzędziem diagnostycznym. Przy użyciu prostego sprzętu możliwe jest ukierunkowanie na pojedynczą parę długości fali wzbudzenia i emisji, diagnostyka konkretnej cząsteczki (Nagao i in. 2003; Del Vecchio, Blough 2004), która jest przydatna w określaniu obecności lub braku i charakteru docelowego związku.

Inne dostępne techniki obejmują fluorescencyjną spektrometrię emisyjną, w której pomiar promieniowania emitowanego przez próbkę jest podstawą ustalenia długości fali wzbudzenia (Ferrari i in. 1996; Hautala i in. 2000), oraz synchroniczne skanowanie fluorescencyjne (SFS). Obecnie spektroskopia fluorescencji z macierzą widm wzbudzeniowo-emisyjnych (EEMS) jest najnowocześniejszą stosowaną techniką (Hudson i in. 2007).

### **3.2. Spektroskopia fluorescencyjna w badaniach węglowodorów ropopochodnych**

Spektrofotometria fluorescencji ultrafioletowej (UVF) jest szybką i wartościową metodą przesiewową do analizy TPH w próbkach środowiskowych.

Badane związki ekstrahuje się w rozpuszczalniku, a następnie dokonuje się optycznego pomiaru cząsteczek węglowodoru za pomocą spektrometru fluorescencji ultrafioletowej. W próbkach wodnych w terenie spektrofotometria fluorescencji UV jest podstawową używaną metodą (Matthew 2009; ITOPFL 2012). Węglowodory aromatyczne fluoryzują, gdy ich wiązania  $\pi$  są wzbudzone przez światło ultrafioletowe, a stężenie węglowodorów w ekstraktach próbki jest mierzone za pomocą fluorometru (Matthew 2009). Technika ta ma większy potencjał w zakresie odróżniania węglowodorów aromatycznych o niskiej masie cząsteczkowej z dwoma–trzema pierścieniami od związków o dużej masie cząsteczkowej (Weisman [red.] 1998). Jednak alifatyczne alkany nie reagują na promieniowanie ultrafioletowe, ponieważ nie mają wiązań  $\pi$ . Dlatego też próbki zawierające olej parafinowy nie mogą być wykrywane tą metodą (Matthew 2009).

Aby uzyskać wiarygodne wyniki analityczne, należy sporządzić krzywą kalibracyjną przy użyciu określonych zanieczyszczeń węglowodorowych. Procent odzysku przy zastosowaniu metody UVF w przypadku n-heksanu użytego jako rozpuszczalnik ekstrakcyjny wynosił 132% i został opisany w pracy Miriam Matthew (2009). W innych badaniach (Martl, Ritter 2013) metoda okazała się wrażliwa na niewielkie zmiany w przygotowaniu lub składzie próbki, mogąc tym samym przyczyniać się do obniżenia dokładności i powtarzalności wyników.

Każdy związek chemiczny ma charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych (elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych), tzn. odległości między tymi poziomami są różne dla różnych związków chemicznych. Absorpcja promieniowania o długości fali w zakresie 100–800 nm powoduje w cząsteczce przejścia elektronowe. Energia tych przejść jest najwyższa. Energie zmian oscylacyjnych i rotacyjnych są niższe, a związany z nimi zakres długości fal mieści się w paśmie podczerwieni. Podczas absorpcji promieniowania z zakresu UV-Vis następują zmiany zarówno energii elektronowej, jak i oscylacyjnej oraz rotacyjnej. Stan elektronowego wzbudzenia może ulegać dezaktywacji poprzez liczne fizyczne procesy bądź skutkować emisją promieniowania (luminescencja) lub konwersją nadmiarowej energii w ciepło, przez co powraca do stanu podstawowego. Stany elektronowego wzbudzenia mogą również oddziaływać z cząsteczkami w stanie podstawowym, co skutkuje przeniesieniem energii lub reakcjami przeniesienia elektronów, pod warunkiem spełnienia pewnych kryteriów.

Energie potrzebne do zmiany rozkładu elektronów w cząsteczce wynoszą kilka elektronowoltów (energia 1 eV odpowiada liczbie falowej  $8065,54 \text{ cm}^{-1}$ ). Odpowiednio fotony emitowane lub absorbowane w tych przejściach leżą w obszarze światła widzialnego lub promieniowania nadfioletowego. Obszary te rozciągają się od ok.  $13000 \text{ cm}^{-1}$  dla światła czerwonego do  $22000 \text{ cm}^{-1}$  dla światła niebieskiego i do  $50000 \text{ cm}^{-1}$  dla nadfioletu (tabela 6).

**Tabela 6.** Podstawowe właściwości światła w zakresie od podczerwieni do nadfioletu

Światło	Długość fali, nm	Częstość, $\cdot 10^{14}$ Hz	Liczba falowa, $\cdot 10^4$ cm <sup>-1</sup>	Energia, eV
Podczerwień	1000	3,00	1,00	1,24
Czerwone	630–760	3,94–4,76	1,59–1,32	1,63–1,97
Pomarańczowe	600–630	4,76–5,00	1,67–1,59	1,97–2,07
Żółte	560–600	5,00–5,35	1,79–1,67	2,07–2,21
Zielone	450–560	5,35–6,66	2,22–1,79	2,21–2,76
Niebieskie	420–450	6,66–7,14	2,38–2,22	2,76–2,95
Fioletowe	380–420	7,14–7,89	2,63–2,38	2,95–3,26
Bliski nadfiolet	300	9,99	3,33	4,13
Daleki nadfiolet	200	15,00	5,00	6,20

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Atkins 2002.

Z każdym stanem elektronowym związane są pasma stanów oscylacyjnych, które odpowiadają różnym energiom oscylacyjnym cząsteczek. Z kolei z każdym stanem oscylacyjnym związane są pasma stanów rotacyjnych. Różnica energii pomiędzy stanami oscylacyjnymi odpowiada częstotliwości podczerwieni, a różnice poziomów energii rotacyjnych odpowiadają częstotliwości mikrofal. W 20°C większość cząsteczek znajduje się na najniższym poziomie oscylacyjnym stanu podstawowego. Całkowita energia wewnętrzna cząsteczki  $E$ , określonego stanu cząsteczki, może być przedstawiona jako suma jej energii elektronowej  $E_{el}$ , oscylacyjnej  $E_{osc}$  i rotacyjnej  $E_{rot}$ :

$$E = E_{el} + E_{osc} + E_{rot} \quad (1.6)$$

Ogólną zmianę energii będącą wynikiem absorpcji fotonu światła można przedstawić następująco:

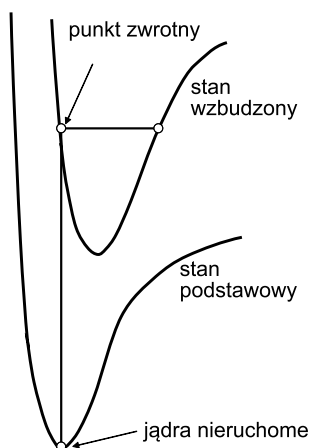
$$\Delta E = \Delta E_{el} + \Delta E_{osc} + \Delta E_{rot} \quad (1.7)$$

Absorpcja fotonu przez cząsteczkę zazwyczaj odbywa się do poziomu oscylacyjnego powyżej zerowego poziomu oscylacyjnego wzbudzonego stanu singletowego. Widmo absorpcji cząsteczkowej nakreśla różnicę energii pomiędzy stanem podstawowym i kilkoma poziomami oscylacyjnymi wzbudzonego stanu singletowego.

Pozycje, jakie zajmują jądra atomowe w podstawowym elektronowym stanie cząsteczki, determinowane są siłami kulombowskimi wywieranymi na nie przez inne jądra i przez elektrony. W wyniku przejścia elektronowego zmieniają się siły kulombowskie wywierane na jądro przez otaczające je elektrony. Reakcją cząsteczki na tę zmianę jest oscylacja. Wynika z tego, że część energii



wykorzystanej na zmianę rozkładu elektronów powoduje w rzeczywistości wzbudzenie oscylacji w absorbującej foton cząsteczce. Wynikiem tego jest zmiana obrazu widma spektralnego – zamiast jednej, ostrej, odpowiadającej temu czystemu wzbudzeniu elektronowemu linii pojawia się wiele linii. Przejście elektronowe jest bardzo szybkie, trwa ok.  $10^{-15}$  s, okres oscylacji jest natomiast rzędu  $10^{-13}$  s. Na tej podstawie została sformułowana zasada Francka–Conдона: „Ponieważ masy jąder atomowych znacznie przewyższają masę elektronu, przejścia elektronowe zachodzą szybciej, niż zdąży na nie zareagować układ jąder”. Wyjaśnia ona pojawienie się oscylacyjnej struktury pasma. Na skutek przejścia elektronowego w jednych obszarach cząsteczki następuje szybkie zwiększenie gęstości elektronowej, a zmniejszenie się jej w innych. Powoduje to, że początkowo nieruchome jądra atomowe zaczynają oscylować, drgając w przód i w tył wokół swych pierwotnych położeń, które zachowały podczas szybkiego wzbudzenia elektronowego. Odległość jąder w początkowym (równowagowym) stanie elektronowym staje się punktem zwrotnym w nowym stanie elektronowym, tzn. tym punktem oscylacji, w którym jądra osiągnęły swe maksymalne wychylenie. W rzeczywistości elektronowo wzbudzona molekula może znaleźć się w jednym z wielu oscylacyjnych stanów wzbudzonych, w wyniku czego absorpcja zachodzi dla różnych wartości liczb falowych  $\nu$ . W stanach stałym i ciekłym indywidualne przejścia mogą być tak szerokie, że zlewają się razem, co skutkuje szerokim pasmem absorpcji (Atkins 2002). Przejście elektronowe z podstawowego stanu oscylacyjnego do leżącego nad nim stanu oscylacyjnego cząsteczki wzbudzonej elektronowo przedstawione jest na rys. 7. Według zasady Francka-Conдона to przejście jest najbardziej intensywne. Przejścia do innych stanów oscylacyjnych również występują, ale ich intensywność jest mniejsza.



**Rysunek 7.** Przejście elektronowe z podstawowego stanu oscylacyjnego do leżącego nad nim stanu oscylacyjnego cząsteczki wzbudzonej elektronowo

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Atkins 2002.

Atomy mogą wykonywać ruchy oscylacyjne we wszystkich cząsteczkach, a w cząsteczkach złożonych liczba drgań jest bardzo duża. W cząsteczce benzenu o 12 atomach węgla atomy wykonują aż 30 różnych ruchów oscylacyjnych. Jedne z nich polegają na okresowym powiększaniu i kurczeniu się pierścienia, inne na jego wyginaniu w różne odkształcone postaci. Zgodnie z zasadami mechaniki kwantowej każda z tych oscylacji może zostać wzbudzona jedynie poprzez dostarczenie cząsteczce pewnej minimalnej energii. Oscylacje można wzbudzić absorpcją promieniowania elektromagnetycznego, a jego częstość może dostarczyć cennych informacji na temat cząsteczki. Cząsteczki dwuatomowe zdolne są tylko do drgań rozciągających i ściskających wiązanie. Cząsteczka wieloatomowa nieliniowa może wykonywać ich znacznie więcej, ponieważ dodatkowo deformacji ulegać mogą kąty między wiązaniami. Przykładowo, cząsteczka naftalenu zdolna jest do wykonania 48 drgań.

Cząsteczki absorbują promieniowanie elektromagnetyczne poprzez procesy kwantowe, w których przechodzą ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Energia zaabsorbowanego fotonu światła odpowiada różnicy energii między tymi dwoma stanami. W przypadku światła z zakresu ultrafioletu i widzialnego (200 nm–800 nm) jest to energia na poziomie 1,55 eV do 6,20 eV. Oddziaływanie fotonów z cząsteczkami powoduje wzbudzenie elektronów walencyjnych z podpowłoki o niższej energii do podpowłoki o wyższej energii.

Spektrofluorymetryczna metoda oznaczania substancji wykorzystuje elektronowe przejścia energetyczne zachodzące w atomach lub cząsteczkach spowodowane absorpcją, a następnie emisją promieniowania elektromagnetycznego. Taką emisję określa się jako fotoluminescencję. Mechanizm przejść elektronowych decyduje o tym, czy jest to fluorescencja, fluorescencja opóźniona czy fosforescencja.

Istnieją cztery główne procesy dezaktywacji wewnątrzcząsteczkowej najniższego stanu singletowego  $S_1$ : fluorescencja (F), konwersja wewnętrzna (IC), przejście interkombinacyjne (ISC), reakcja fotochemiczna (R) oraz wygaszanie (+Q). Najważniejsze dla spektroskopii wzbudzenie elektronowe spowodowane absorpcją promieniowania elektromagnetycznego jest przyczyną emisji zwanej fluorescencją.

Jeśli układ elementarny (atom lub cząsteczka) pochłania energię w postaci promieniowania elektromagnetycznego, wówczas przechodzi ze stanu elektronowego podstawowego (o najniższej energii) w jeden z możliwych elektronowych stanów wzbudzonych. Elektrony walencyjne przechodzą z orbitali stanu podstawowego do orbitali stanu wzbudzonego. W cząsteczkach elektron jest przenoszony z najwyższego zapełnionego orbitalu molekularnego (HOMO – z ang. Highest Occupied Molecular Orbital) do najniższego niezapełnionego orbitalu molekularnego (LUMO – z ang. Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Proces ten regulowany jest przez szereg tzw. reguł wyboru, a prawdopodobieństwo przejścia dla absorpcji fotonu znajduje odzwierciedlenie w molowym

współczynnika absorpcji  $\varepsilon \left( \frac{dm^3}{mol \text{ cm}} \right)$ , który jest determinowany przez prawo Lamberta–Beera:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon bc}, \quad (1.8)$$

gdzie:

$$\varepsilon bc = A, \quad (1.9)$$

oraz:

$A$  – absorbancja;  $A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$ ;

$T$  – transmitancja;  $T = \frac{I}{I_0}$ ;

$I$  – natężenie promieniowania przechodzącego;

$I_0$  – natężenie promieniowania padającego;

$b$  – droga optyczna próbki, cm;

$c$  – stężenie substancji w roztworze,  $\frac{mol}{dm^3}$ .

Jeżeli stężenie podawane jest w jednostkach  $\frac{mol}{dm^3}$ , a grubość warstwy w cm, to współczynnik absorpcji nazywamy molowym współczynnikiem absorpcji  $\varepsilon$  lub współczynnikiem ekstynkcji (ekstynkcją)  $\varepsilon$ .

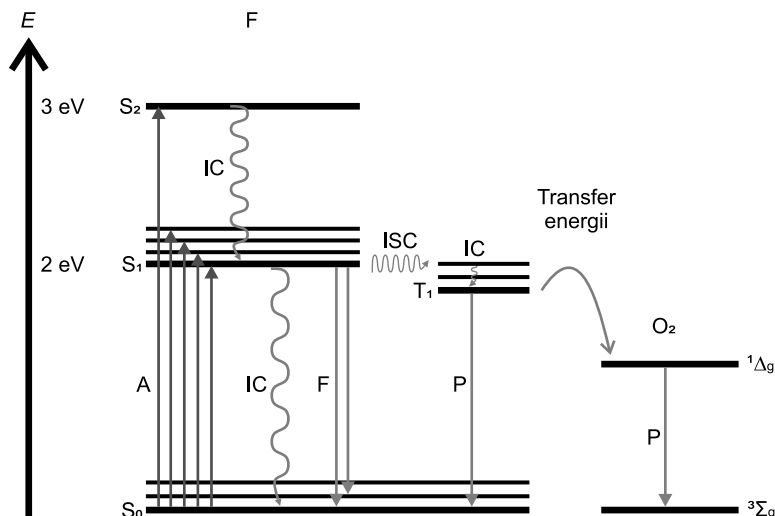
Przejście z HOMO do LUMO ma charakter przejścia pionowego na diagramie Francka–Condon, a więc odbywa się bez zmiany geometrii cząsteczki. Wzbudzone elektrony nie pozostają w takim stanie zbyt długo, lecz spontanicznie powracają do bardziej stabilnego stanu podstawowego. Następnie taki układ może nadmiar energii wydzielić w wyniku reakcji chemicznej lub powrócić do stanu podstawowego, oddając energię na skutek zderzeń z innymi atomami lub cząsteczkami (tzw. przejścia bezpromieniste) albo poprzez emisję promieniowania elektromagnetycznego (tzw. przejścia promieniste).

W większości przypadków energia wzbudzenia cząsteczki absorbującej foton zamienia się w nieuporządkowany ruch cieplny w otoczeniu cząsteczki (konwersja wewnętrzna, przejścia interkombinacyjne). Jednak utrata przez cząsteczkę energii wzbudzenia jest możliwa również w procesie zaniku promienistego, na drodze którego elektron powraca do swego stanu podstawowego, emitując foton. W zakresie niewysokich temperatur energia wzbudzenia elektronowego jest zbyt duża, aby cząsteczka mogła się jej w tak łatwy bezpromienisty sposób pozbyć. Dominuje więc drugi mechanizm – promienisty.

W zjawisku fluorescencji emisja promieniowania występująca samorzutnie ustaje niemal natychmiast po wyeliminowaniu promieniowania wzbudzającego

( $t \leq 10^{-8}$ s). Emisja promieniowania związana jest z przejściem cząsteczki między stanami elektronowymi o tej samej multipletowości (np.  $S_1 \rightarrow S_0$ ). W zjawisku fosforescencji następuje zmiana multipletowości (Lakowicz 2010), a trwanie samorzutnej emisji możliwe jest jeszcze przez dłuższy czas (ułamki sekund do kilku godzin). Zanim wzbudzony atom lub cząsteczka przejdą do stanu podstawowego, osiągną stan metatrwały o czasie życia dłuższym niż  $10^{-8}$  s. Opóźniona fluorescencja, która trwa znacznie dłużej niż fluorescencja, występuje na skutek wielu mechanizmów, spośród których można przywołać anihilację tryplet-tryplet czy termicznie aktywowaną fluorescencję opóźnioną. Czas wygaszania fluorescencji jest krótszy od fosforescencji i zazwyczaj służy, choć nie jest to podział zbyt ścisły, za postawę do odróżnienia obu tych zjawisk. Różnica ta daje do zrozumienia, że fluorescencja polega na bezzwłocznej konwersji promieniowania zaabsorbowanego w energię ponownie wyemitowaną, podczas gdy fosforescencja powoduje magazynowanie energii i powolne jej wydzielanie. Zjawisko fosforescencji praktycznie nie jest wykorzystywane w analizie strukturalnej związków organicznych (Zieliński, Rajca 2000), natomiast często do badań jakości, takich jak np. pomiary farb specjalnych czy znaków ewakuacyjnych (Szopa, Czerniak, Gacek 2013).

Na rys. 8 przedstawiono uproszczony diagram Jabłońskiego, który schematycznie obrazuje elektronowe i oscylacyjne poziomy cząsteczki, pokazując następujące po sobie etapy procesu fluorescencji. Absorpcja fotonu powoduje przeniesienie cząsteczki do stanu elektronowo wzbudzonego, co jest zobrażowane za pomocą strzałek skierowanych ku górze. Następnie cząsteczka ta, zderzając się z otaczającymi ją molekułami, przekazuje im część swojej energii i przechodzi na niższe poziomy oscylacyjne. Ten bardzo szybki proces powoduje przejście cząsteczki na niższy poziom oscylacyjny (konwersja wewnętrzna) w stanie elektronowo wzbudzonym. Cząsteczki znajdujące się obok mogą jednak nie być zdolne do pochłonięcia większej energii, dzięki czemu wzbudzona cząsteczka mogłaby powrócić do podstawowego stanu elektronowego w sposób bezpromienisty. Jeżeli cząsteczka ta przetrwa w stanie wzbudzonym odpowiednio długo, by wyemitować foton, oddaje resztę energii w postaci promieniowania i powraca do stanu podstawowego (obrazują to strzałki skierowane w dół). Czyli po początkowej absorpcji stany oscylacyjne wzbudzonego stanu elektronowego ulegają bezpromienistemu zanikowi – relaksacji oscylacyjnej – oddając energię do otoczenia. Następujące potem przejście promieniste zachodzi z podstawowego stanu oscylacyjnego do górnego stanu elektronowego. Z reguły odstęp energetyczny między stanami elektronowymi (grube czarne linie) jest od 10 do 100 razy większy od odstępu między stanami oscylacyjnymi. Przejście elektronowe do stanu podstawowego zachodzi zgodnie z zasadą Francka–Condon („pionowo”). Widmo procesu fluorescencji wykazuje strukturę oscylacyjną dolnego stanu elektronowego.

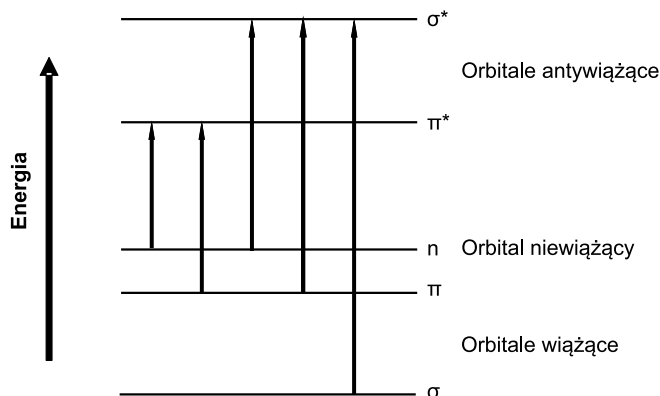


**Rysunek 8.** Uproszczony diagram Jabłońskiego ukazujący kolejne etapy prowadzące do fluorescencji

A – absorpcja, F – fluorescencja, E – energia, IC – konwersja wewnętrzna, ISC – przejścia interkombinacyjne, P – fosforescencja

Źródło: Pigoń, Ruziewicz 2007.

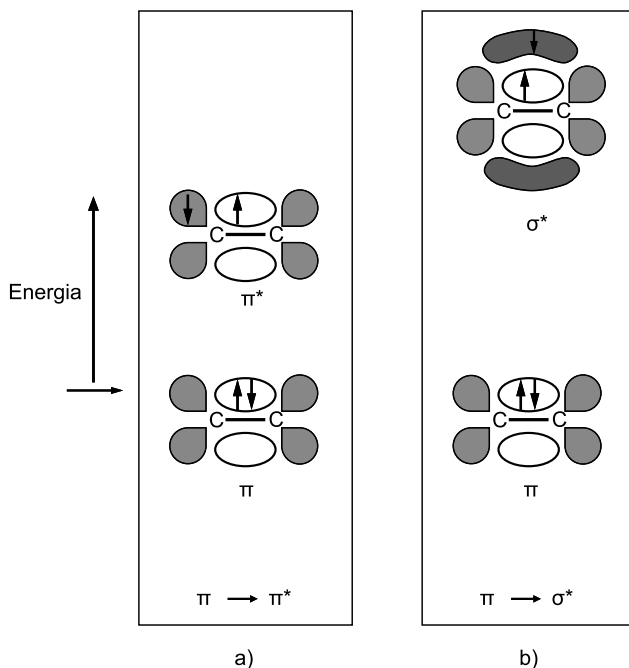
W związkach organicznych w stanie podstawowym elektrony mogą znajdować się na wiążących orbitalach  $\sigma$  i  $\pi$  oraz na orbitalach niewiążących  $n$  (wolne pary elektronowe). Elektrony te mogą ulegać wzbudzeniu pod wpływem kwantu energii i przechodzić na orbitale o wyższej energii antywiążące  $\sigma^*$  i  $\pi^*$  (Zieliński, Rajca 2000). Na rys. 9 przedstawiono schematycznie możliwe przejścia elektronowe o energii rosnącej od lewej strony:  $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \pi \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$ :



**Rysunek 9.** Przejścia elektronowe w cząsteczkach związków organicznych

Źródło: opracowanie własne.

Zgodnie z równaniem Plancka energia wzbudzenia jest odwrotnie proporcjonalna do długości absorbowanej fali, przez co przejścia o dużej energii powodują absorpcję w obszarze krótkofalowym, a przejścia o małej energii – w obszarze długofalowym. Na rys. 10a przedstawiono proces absorpcji na przykładzie podwójnego wiązania węgiel-węgiel. Chromoforowe (wykazujące charakterystyczne obszary absorpcji) właściwości podwójnego wiązania C=C polegają na wzbudzeniu przez absorbowany foton elektronu z orbitalu wiążącego  $\pi$  do orbitalu antywiążącego  $\pi^*$ . Działanie chromoforowe jest zatem związane z przejściem  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Proces wzbudzania jest określany jako przejście  $\pi \rightarrow \pi^*$ , a stan wzbudzenia jako stan  $\pi-\pi^*$ . Energia tego przejścia dla nieskoniugowanego wiązania podwójnego wynosi ok. 7 eV, co odzwierciedla absorpcję w zakresie dalekiego nadfioletu, przy długości fali 180 nm. W przypadku, gdy wiązanie podwójne tworzy część łańcucha wiązań skoniugowanych, energie orbitali molekularnych znajdują się bliżej siebie i przejście zostaje przesunięte w obszar widma z zakresu widzialnego.



a) stan niższej energii  $\pi$  z dwoma elektronami z antyrównoległymi spinami i niewypełnionymi antywiązącymi orbitalami  $\pi$  (zaciemnione) oraz stanem wyższej energii  $\pi^*$  z jednym elektronem na orbitalu wiążącym  $\pi$  i jednym na orbitalu antywiązącym  $\pi$ , oba ze spinami elektronowymi antyrównoległymi;  
 b) przejście  $\pi \rightarrow \sigma^*$  podwójnego wiązania C=C z taką samą konfiguracją elektronową w stanie o niższej energii, jak na rysunku a, oraz stan o wyższej energii  $\sigma^*$  z jednym elektronem znajdującym się w orbitalu wiążącym  $\pi$  i jednym elektronem znajdującym się w orbitalu antywiązącym  $\sigma$  (zaciemnione).

**Rysunek 10.** Przejście  $\pi \rightarrow \pi^*$  podwójnego wiązania C=C

Źródło: Szabo 2000.

Istnieją też inne orbitale antywiążące o większej energii, jak np. orbital anywiążący  $\sigma^*$ . Wzbudzenie elektronu z orbitalu wiążącego  $\pi$  do orbitalu anywiążącego  $\sigma^*$  może nastąpić, jeżeli energia fotonu odpowiada różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym i stanem wzbudzenia  $\pi\text{-}\sigma^*$  (rys. 10b).

Miarą intensywności pasma absorpcji jest wartość molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon_{\max}$  przy długości fali w maksimum absorpcji  $\lambda_{\max}$ . Wartość  $\epsilon_{\max}$

jest miarą prawdopodobieństwa przejścia i dla przejść wzbronionych  $\epsilon$  przyj-

muje małe wartości (rzędu kilku  $\frac{dm^3}{mol \cdot cm}$ ), a dla przejść dozwolonych wartości duże (do  $1,5 \cdot 10^5 \frac{dm^3}{mol \cdot cm}$ ). W tabeli 7 podano przykładowe wartości  $\lambda_{\max}$

i  $\epsilon_{\max}$  dla przejść elektronowych w wybranych związkach niesprężonych. Jak wynika z tych danych, alkany są przezroczyste w zakresie bliskiego nadfioletu z powodu możliwości wystąpienia jedynie wysokoenergetycznego przejścia  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ . Obecność w cząsteczce grup mających podwójne wiązanie (chromoforów) powoduje z kolei silne przesunięcie maksimum absorpcji w kierunku długofalowego obszaru widma. Wynika to z małej energii wzbudzenia elektronów  $\pi$ . Chromofory dzieli się na dwie grupy z powodu innego charakteru przejść elektronowych. Pierwsza z nich to ugrupowania zawierające wielokrotne wiązania C–C, natomiast druga – zawierające wiązania wielokrotne C–heteroatom (auksochromy) posiadający wolną parę elektronową. W pierwszej grupie związków występują jedynie przejścia  $\pi \rightarrow \pi^*$ , w drugiej –  $\pi \rightarrow \pi^*$  oraz pojawiają się również mniej intensywne przejścia typu  $n \rightarrow \pi^*$ .

**Tabela 7.** Dane absorpcyjne izolowanych grup chromoforowych (przejścia o najniższej energii)

Grupa	Układ	Przejście	Przykład	$\lambda_{\max}$ , nm	$\epsilon_{\max}$ , $\frac{dm^3}{mol \times cm}$
<b>Związki zawierające orbitale <math>\sigma</math></b>					
	C—H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	metan*	125	duży
	C—C	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	etan*	135	duży
<b>Związki zawierające orbitale <math>\sigma</math> i <math>\pi</math> oraz <math>\sigma</math>, <math>\pi</math> i <math>n</math></b>					
Alkenowa	—CH=CH—	$\pi \rightarrow \pi^*$	eten*	165	16 000
Alkenowa	—CH=CH—	$\pi \rightarrow \pi^*$	2-metylo-2-buten*	185	7 940
Acetylenowa	—C≡C—	$\pi \rightarrow \pi^*$	etyn*	173	6 000
Acetylenowa	—C≡C—	$\pi \rightarrow \pi^*$	Heks-2-yn*	172	2 500

\* w fazie gazowej lub w stanie pary;  $\lambda_{\max}$  i  $\epsilon_{\max}$  zależy od rodzaju rozpuszczalnika

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Zieliński, Rajca 2000; Dunmur, Murray 2008.

Pojedyncze wiązanie podwójne nie wystarcza, aby wystąpiło silne pasmo absorpcyjne nadające się do celów analitycznych. Dopiero oddziaływania, czyli

sprzężenia pomiędzy grupami chromoforowymi ( $\pi$ - $\pi^*$ ) oraz między chromoformami i auksochromami prowadzą do powstania silnych pasm absorpcji w zakresie 200–400 nm lub 400–800 nm.

Większość związków organicznych ma budowę bardziej skomplikowaną niż omówione połączenia. Jeżeli w cząsteczce znajduje się kilka chromoforów, to widmo elektronowe związku zależy od wzajemnej ich konfiguracji. Sprzężenie chromoforów powoduje powstanie nowego układu chromoforowego mającego zupełnie inny układ orbitali, który tworzy nowe możliwości przejść elektronowych  $\pi \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$  (Zieliński, Rajca 2000). W tabeli 8 podano przykładowe dane absorpcyjne przejść  $\pi \rightarrow \pi^*$  w polienach.

**Tabela 8.** Pasma absorpcji przejścia  $\pi \rightarrow \pi^*$  w polienach

Układ	$\lambda_{\max}$ , nm		$\epsilon_{\max} \cdot 10^{-3}, \frac{dm^3}{mol \times cm}$					Rozpuszczalnik			
	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 6						
H-(CH=CH) <sub>n</sub> -H	167	10	217	21	263	52	304	77	364	138	heksan
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -(CH=CH) <sub>n</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	306	24	334	40	358	75	384	86	420	114	benzen

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Zieliński, Rajca 2000; Dunmur, Murray 2008.

Jedną z reguł wyboru, która determinuje prawdopodobieństwo przejścia cząsteczki do stanu wzbudzonego, mówi, że dozwolone są tylko te przejścia, przy których zachowane są spiny elektronów. Spiny elektronów w stanie podstawowym orbitalu wiążącego  $\pi$  w wiązaniu C–C są sparowane i antyrównoległe. Zachowują taki stan po przejściu do stanu wzbudzonego  $\pi$ - $\pi^*$ . Stany owych spinów elektronowych opisuje multipletowość  $M$ . Elektrony posiadają wyznaczoną kwantową liczbę spinową  $S$ , jedną z dwu możliwych:  $+1/2$  lub  $-1/2$ , na postawie czego można obliczyć multipletowość stanu zgodnie z równaniem:

$$M=2|\sum S|+1 \quad (1.10)$$

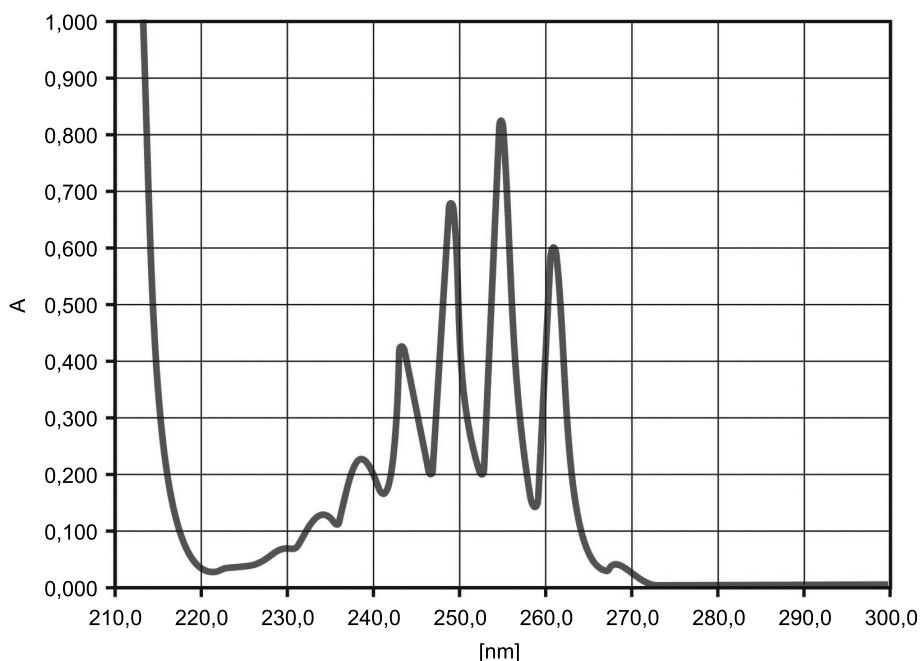
W stanie podstawowym  $\sum S=0$ , więc  $M=1$  i ten stan jest wyznaczony jako podstawowy stan singletowy  $S_0$ . W stanie wzbudzonego  $\pi$ - $\pi^*$  oryginalne spiny są antyrównoległe zorientowane, a  $M=1$ . Ten stan wzbudzenia jest więc wyznaczony jako stan singletowy. Na rysunku 9 stan  $\pi$ - $\pi^*$  jest pierwszym stanem wzbudzonego  $S_1$ , a stan  $\pi$ - $\sigma^*$  jest drugim stanem wzbudzonego  $S_2$ .

W związkach organicznych mamy do czynienia z przejściami elektronów wiążących ( $\pi$  i  $\sigma$ ) i niewiążących ( $n$ ). Przejścia  $\pi \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$  występują w średnim nadfiolecie oraz świetle widzialnym, głównie w cząsteczkach aromatycznych



i innych zawierających wiązania  $\pi$ . Większość pomiarów metodą spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis dotyczy tego rodzaju przejść. Potrzebna energia odpowiada promieniowaniu z zakresu (200–700) nm (Szabo 2000).

Przykładowo, benzen wykazuje szerokie pasmo absorpcji pomiędzy 230 nm a 270 nm (rys. 11). W rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak n-heksan, pasmo to posiada strukturę subtelną. Jeżeli do pierścienia benzenu przyłączona jest grupa auksochromowa, pasmo benzenoidowe przesuwa się w kierunku dłuższych fal. Podstawniki z wolną parą elektronową ułatwiają przejścia  $\pi \rightarrow \pi^*$  na skutek oddziaływania z układem aromatycznym i powodują batochromowe przesunięcie pasma (przesunięcie pasma absorpcyjnego w kierunku fal dłuższych).



**Rysunek 11.** Absorpcyjne widmo UV benzenu w n-heksanie

Źródło: opracowanie własne.

Emitowane promieniowanie charakteryzuje się niższą energią (tym samym większą długością fali) od promieniowania wzbudzającego. Przyczyną różnicy energii jest utrata jej części na rzecz otaczających cząsteczek. Promieniowanie emitowane składa się z fal o różnej energii, co wynika z faktu, że każda z fluoryzujących cząsteczek może wejść na inny poziom energii wibracyjnej stanu podstawowego. Dla każdej substancji mającej zdolność do fluorescencji obserwuje się charakterystyczne maksimum emisji promieniowania, dla którego intensywność fluorescencji jest największa.

Wszystkie fale światła wokół tego maksimum posiadają długość fali większą niż długość fali promieniowania wzbudzającego. Różnica między energią promieniowania wzbudzającego a emitowanego (w jego maksimum) zwana jest przesunięciem stokesowskim i opisana jest równaniem:

$$\Delta E = hv_{ex} - hv_{em} = hc \left( \frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \right), \quad (1.11)$$

gdzie:

$v_{ex}$  – częstotliwość fali absorbowanej,

$v_{em}$  – częstotliwość fali emitowanej,

$\lambda_{ex}$  – długość fali absorbowanej,

$\lambda_{em}$  – długość fali emitowanej,

$h$  – stała Plancka.

Odstępstwem od tej reguły jest sytuacja, gdy cząsteczka pochłaniająca kwant światła już znajduje się w stanie wzbudzenia. W widmie fluorescencji mogą pojawić się wówczas tzw. linie antystokesowskie, czyli fale o energii większej od energii promieniowania wzbudzenia.

Wielkość przesunięcia stokesowskiego manifestuje polarność środowiska otaczającego molekułę fluoryzującą. Przejście cząsteczki do stanu wzbudzonego zazwyczaj związane jest ze wzrostem jej momentu dipolowego. Proces ten powoduje polaryzację powłok elektronowych cząsteczek rozpuszczalnika, przesunięcie indukcyjne ich atomów oraz polaryzację orientacyjną. Utrata energii w tych procesach skutkuje przesunięciem się maksimum fluorescencji w kierunku fal dłuższych. Przesunięcie to będzie tym większe, im większa jest różnica momentów dipolowych cząsteczki w jej stanie wzbudzonego i podstawowym, a także im rozpuszczalnik jest bardziej polarny oraz im większa jest możliwość zmiany orientacji cząsteczek rozpuszczalnika w czasie trwania stanu wzbudzonego cząsteczki (około  $10^{-15}$  s). Wynika z tego, że przesunięcie stokesowskie będzie największe dla cząsteczek o długim czasie życia w stanie wzbudzonego, znajdujących się w rozpuszczalniku o dużej przenikalności elektrycznej i małej lepkości.

Intensywność fluorescencji zależy od zdolności cząsteczek rozpuszczalnika do absorbowania kwantów wzbudzeń elektronowych i oscylacyjnych. Zaobserwowano, że rozpuszczalniki, których cząsteczki cechują się dużym odstępem między poziomami oscylacyjnymi (np. woda) i zdolne są do absorbowania znacznych ilości energii elektronowej, wygaszają fluorescencję rozpuszczonych w nich substancji.

Zjawisko fluorescencji dotyczy zazwyczaj związków aromatycznych o budowie polarnej, które zawierają sprzężone układy wiązań podwójnych oraz niektóre ich kompleksy z metalami. Sprzężony układ wiązań podwójnych w WWA rozciągających się na całą cząsteczkę powoduje, że absorbują one dość

intensywnie światło z obszaru bliskiego ultrafioletu, a te o dużej masie cząsteczkowej nawet światło widzialne.

Różne węglowodory aromatyczne wymagają innych warunków wzbudzenia, a także dają inne zakresy długości fal promieniowania fluorescencyjnego. Istnieje zależność zmian widmowych fluorescencji od długości fali, jaką ma światło wzbudzające. Jeżeli wzbudzenie występuje w bliskiej części spektrum ultrafioletowego, a jeszcze bardziej w jego części widzialnej, wówczas fluorescencja pochodzi tylko od wielopierścieniowych węglowodorów. Ponieważ ich udział jest raczej niewielki i zależy bezpośrednio od rodzaju badanego produktu, pojawia się wysoki stopień zależności uzyskanego sygnału analitycznego od określonego związku ropopochodnego. Przedstawiono to w tabeli 9.

**Tabela 9.** Zakresy rodzaju przejść elektronowych i przykładowe długości fal w zależności od rodzaju związku

Rodzaj przejścia	$\lambda$ absorpcji, nm	Rodzaj związku
$n \rightarrow \sigma^*$	167	H <sub>2</sub> O (–O–)
	183	CH <sub>3</sub> OH (C–O)
	258	CH <sub>3</sub> I (C–I)
		inne, np. aminy, halogenoalkany, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
$n \rightarrow \pi^*$	240–1000	aldehydy, ketony
$\pi \rightarrow \pi^*$	165–1000	alkeny, związki aromatyczne
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	120–190	alkany

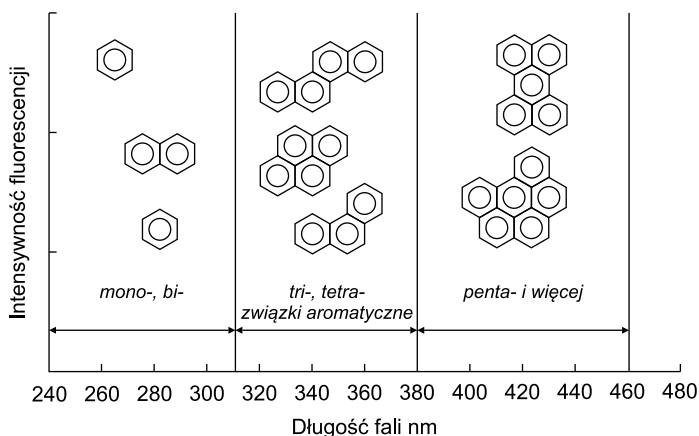
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Pigoń, Ruziewicz 2007; Kęcki 1998.

Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego tylko niektóre węglowodory są wzbudzane i oddają energię na sposób luminescencyjny, głównie wysokocząsteczkowe z grupy policyklicznej. Intensywność rejestrowanego promieniowania jest bardzo różna. Aby uzyskać wiarygodne wyniki, konieczne jest posiadanie dostępnego roztworu wzorcowego, który zawiera te same składniki luminescencyjne (w tych samych względnych proporcjach), które są obecne w analizowanej próbce.

Charakterystyczne pasmo wzbudzenia fluorescencji (rys. 12) w zakresie 240–310 nm jest związane ze strukturami aromatycznymi szeregu benzenu i naftalenu. Zakresy spektralne w 310–380 nm są specyficzne dla węglowodorów trój- i czteropierścieniowych, zakres 380–460 nm jest charakterystyczny dla wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (pięć i więcej). Składniki żywiczone wykazują zdolność fluorescencji około 490 nm oraz w zakresie dłuższych fal (Sierra i in. 2001; Tedesco 1995).

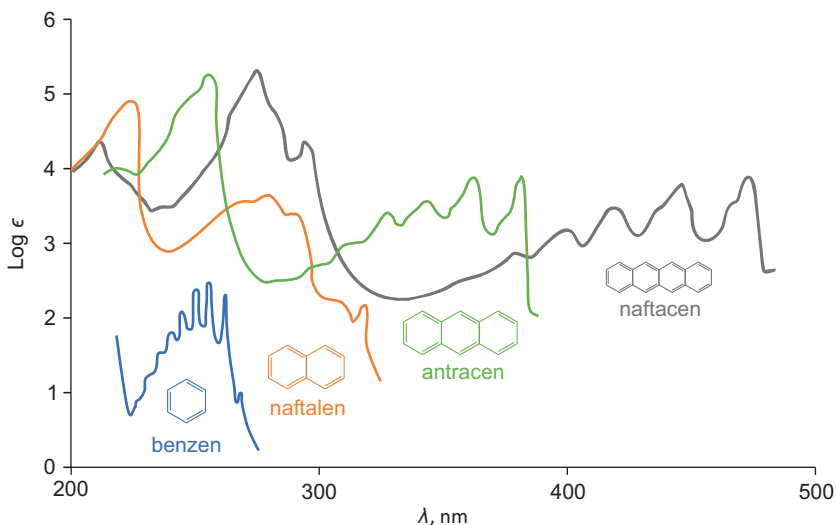
Widmo emisji jest unikatowe dla każdego węglowodoru aromatycznego. Widma UV/Vis przykładowych związków aromatycznych przedstawiono na rys. 13. Funkcje przedstawiają zależność logarytmu molowego współczynnika

absorpcji ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) od długości fali (nm). Wzrost liczby pierścieni w szeregu związków aromatycznych powoduje przesunięcie batochromowe (w kierunku fal dłuższych) wszystkich pasm absorpcyjnych, aż do zakresu widzialnego. Przykładowo, benzen posiada maksimum absorpcji w 256 nm. Podstawienie grupy metylowej (toluen) do pierścienia benzenu przesunęło to maksimum do 261 nm. Maksyma absorpcji wybranych związków aromatycznych przedstawiono w tabeli 10.



**Rysunek 12.** Charakterystyczne zakresy długości fali wzbudzenia dla węglowodorów aromatycznych


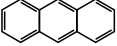
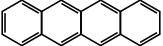
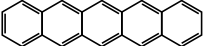
Źródło: Kursheva i in. 2009.



**Rysunek 13.** Widma UV/VIS przykładowych węglowodorów aromatycznych

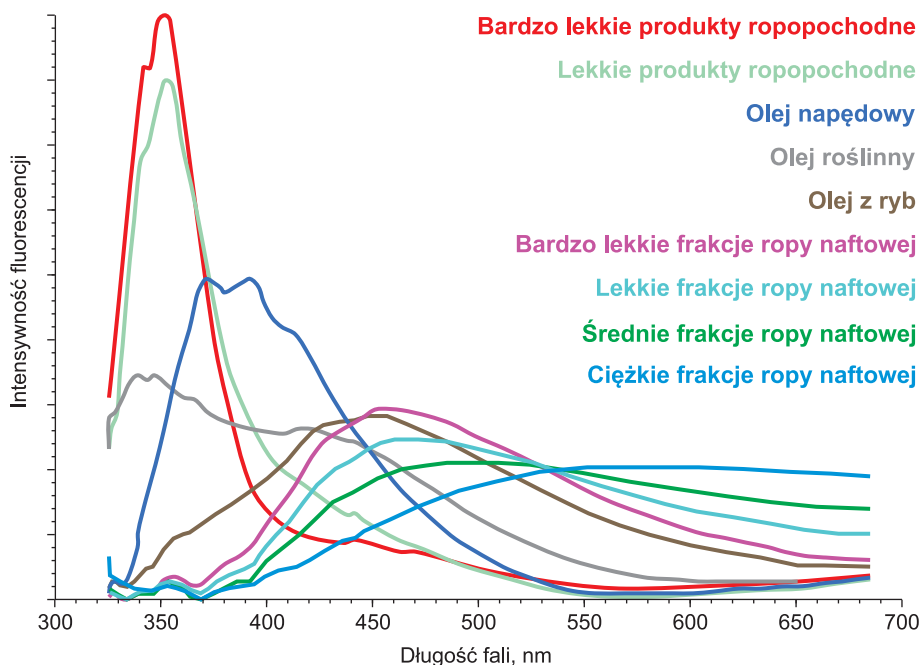
Źródło: opracowanie na podstawie: Dunmur, Murray 2008; Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, DOI: 10.1055/b-0035-108186.

**Tabela 10.** Maksima absorpcji dla wybranych węglowodorów aromatycznych

Węglowódor pierścieniowy	Maksimum absorpcji, nm
naftalen 	312
antracen 	375
naftacen 	480
pentacen 	580

Źródło: Dunmur, Murray 2008.

Na rys. 14 przedstawiono zależność intensywności fluorescencji od długości fali emisji dla różnych frakcji i produktów z ropy naftowej przy fali wzbudzenia o długości 308 nm.

**Rysunek 14.** Widmo emisji dla różnych frakcji ropy naftowej przy fali wzbudzenia 308 nm

Źródło: opracowanie własne na podstawie Martin, Germain 2008.

Benzyna składa się zazwyczaj w 32% ze związków aromatycznych, lecz w większości monoaromatycznych (BTEX). Mimo to zawiera wystarczającą ilość WWA, aby zareagować na wzbudzenie światłem UV. Olej mineralny ma zwykle 38% związków aromatycznych, przeważnie WWA, dzięki czemu pod wpływem promieniowania UV wykazuje wysoką intensywność fluorescencji. Kerozyna (nafta lotnicza, składnik paliwa do silników odrzutowych) zawiera 23% związków aromatycznych, prawie wszystkie naftaleny, dzięki czemu fluoreskuje dostatecznie dobrze w promieniowaniu UV (Martin, Germain 2008).

## 4. Oczyszczanie wód ze związków ropopochodnych

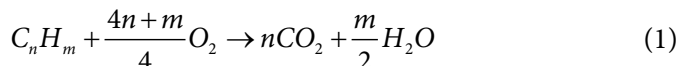
Zagadnienie oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń ropą naftową od dziesięcioleci pozostaje bardzo aktualnym tematem. Degradacja TPH w środowisku obejmuje: biodegradację (Abdel-Shafy, Al-Sulaiman, Mansour 2014; Perera i in. 2011), fotoutlenianie i utlenianie chemiczne, adsorpcję na cząstkach gleby, wymywanie, bioakumulację (Nadarajah i in. 2002). Każdy z tych procesów w inny sposób wpływa na poszczególne związki. Wynika to głównie z faktu, że każdy z nich ma unikatową strukturę i zestaw właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych. W tym rozdziale na potrzeby przeprowadzonych badań przeanalizowano procesy biodegradacji tlenowej i beztlenowej przez mikroorganizmy, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Przeanalizowano również literaturę dotyczącą badań degradacji węglowodorów ropopochodnych innymi metodami, takimi jak fotoliza i utlenianie.

### 4.1. Bioremediacja w środowisku wodnym

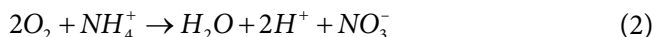
Mocno zanieczyszczone wody powierzchniowe mogą być bardzo dobrym źródłem węgla, azotu, fosforu i innych składników odżywczych dla wielu rodzajów mikroorganizmów, które wykorzystując je, mogą spowodować rozkład toksycznych związków. Wykorzystanie zanieczyszczeń jako źródła węgla dla bakterii wydaje się dobrym sposobem na usunięcie ze środowiska szczególnie niebezpiecznych i trudno usuwalnych związków chemicznych. Przekształcenie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w węgiel i wodę w procesie metabolizmu bakterii wydaje się dobrą proekologiczną metodą oczyszczania wód.

Przemiany związków organicznych odbywające się z udziałem mikroorganizmów i enzymów mogą zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Ten rodzaj reakcji rozkładu określany jest jako biodegradacja, która prowadzi do przemian grup funkcyjnych, a nawet do całkowitego rozpadu związku do ditlenku węgla, wody i soli nieorganicznych (Jeannot 1994). Reakcje

biochemiczne, czyli takie, w których biorą udział mikroorganizmy, opierają się często na reakcjach utleniania związków organicznych:



lub związków nieorganicznych:



W obu tych przypadkach w procesach degradacji bierze udział tlen rozpuszczony w wodzie. Ilość tlenu niezbędna do życia zwierząt wodnych wynosi ok. 5 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Jeśli w środowisku wodnym będą przebiegały reakcje chemiczne zużywające tlen, a tak się często dzieje podczas przedostania się tam zanieczyszczeń, to w niesprzyjających warunkach może dojść do wyginięcia fauny. W środowisku wodnym mogą zachodzić następujące procesy chemiczne: redukcja azotanów, hydroliza estrów (pestycydów, organicznych estrów kwasu fosforowego), dehalogenizacja związków chlorowcowych, hydroksylacja związków aromatycznych.

Znaczna liczba zbiorników wodnych, w szczególności płytkich jezior i stawów położonych w miastach i miejscowościach turystycznych, była i jest intensywnie wykorzystywana gospodarczo. W wyniku tego nastąpiła silna eutrofizacja wód (zarastanie). Kąpiel w takich akwenach jest niebezpieczna dla człowieka, gdyż w wyniku zakwitnięcia sinic (skutek degradacji jezior) uwalniają się toksyny uszkadzające układ nerwowy i wątrobę. Zbiorniki, gdzie na dużą skalę pojawiają się sinice, są również nieprzydatne ze względów gospodarczych. Hodowla ryb czy pobór wody w celach spożywczych są tam niemożliwe.

Dotychczas naturalne zbiorniki wodne, takie jak jeziora czy stawy, oczyszczane były w sposób mechaniczny. Usuwano z nich osady denne, a wraz z nimi zgromadzone tam zanieczyszczenia. Metody te są bardzo inwazyjne i bardzo nieekologiczne. Często jedne zanieczyszczenia zastępowane są innymi, które również muszą zostać usunięte. Efekty tych prac są widoczne dopiero po trzech-pięciu latach, gdyż dopiero wówczas ekosystem zbiorników wodnych ponownie zaczyna funkcjonować. Problemem wynikającym z takiej metody oczyszczania akwenów jest składowanie i utylizacja osadów dennych. Generuje to dodatkowe koszty, poza tym jest uciążliwe.

Jedną z najbardziej perspektywicznych metod rozwiązania tego problemu jest bioremediacja oparta na procesach rozkładu produktów ropopochodnych za pomocą mikroorganizmów zdolnych do utleniania węglowodorów. Polega ona na wykorzystaniu zdolności mikroorganizmów do rozkładu związków toksycznych, takich jak węglowodory ropopochodne, i ich utlenieniu do ditlenku węgla i wody. W skład mikroorganizmów uczestniczących w procesie bioremediacji wchodzi: bakterie, archeony oraz grzyby. Bioremediacja przeprowadzana



jest głównie w celu oczyszczenia gleb i wód podziemnych z substancji toksycznych, szczególnie ropopochodnych. Mikroorganizmy zdolne do asymilowania węglowodorów ropopochodnych, zarówno bakterie, jak i grzyby, wyizolowane ze skażonych miejsc, są badane pod kątem ich potencjału degradacji. Podczas gdy bakterie mają tę zaletę, że szybko się zmieniają, dostosowując do warunków środowiskowych, są one ograniczone tym, że większość gatunków jest w stanie wykorzystywać tylko ograniczony i często wąski zakres węglowodorów. Z drugiej strony grzyby są bardziej wszechstronne w wykorzystywaniu węglowodorów ropopochodnych (Jayasena, Perera 2021). Główne wyzwania związane ze stosowaniem biodegradacji mikrobiologicznej do zwalczania zanieczyszczeń to całkowite usunięcie wszystkich składników węglowodorowych i uzyskanie odpowiedniej wydajności procesu. Potrzeba zwiększenia potencjału degradacji przez drobnoustroje nadal napędza poszukiwania nowych izolatów, a także zainteresowanie badaniami konsorcjów drobnoustrojów (Ambrosoli i in. 2005). Korzystanie z nich wymaga zrozumienia indywidualnych wymagań mikroorganizmów, a także interakcji między nimi.

Biodegradacja WWA była najczęściej badanym procesem degradacji opisanym w literaturze. Pierwsze badania biodegradacji WWA dotyczyły degradacji tlenowej. Niemniej jednak wykazano również, że degradacja zachodzi beztlenowo w warunkach denitryfikacji (Haritash, Kaushik 2009; Peng i in. 2008). Aby bakterie zdegradowały dany WWA, musi on stać się biodostępny (Cerniglia 2003; Dandie i in. 2004; Fredslund i in. 2008). WWA stają się biodostępne, gdy są w stanie rozpuszczonym lub w fazie gazowej. Jednak biodostępność danego WWA jest skomplikowana. Istotnym czynnikiem biodostępności WWA jest ich rozpuszczalność, która jest silnie zależna od ich mas cząsteczkowych (Thorsen, Gregory, Damian 2004; Chen, Aiken 1999). WWA mają strukturę niepolarną, która uniemożliwia ich rozpuszczanie się w wodzie. Niemniej jednak nie są całkowicie nierozpuszczalne, zwłaszcza WWA o niższej masie cząsteczkowej. Na przykład kątowe układy pierścieni benzenowych są termodynamicznie najbardziej stabilną konfiguracją, ale otwarte obszary (nazywane obszarami zatokowymi, ang. *bay region*) utworzone między ustawionymi pod kątem pierścieniami benzenowymi są narażone na atak enzymów. To sprawia, że te kątowe struktury są bardziej biodegradowalne niż struktury liniowe lub klastrowe. Na degradację WWA może również wpływać inhibicja kompetycyjna (hamowanie konkurencyjne). Z drugiej strony tempo degradacji może się zmniejszyć, jeśli bakterie biorące udział w rozkładzie WWA znajdą substancję chemiczną, która jest łatwiej dla nich przyswajalna. Konkurencyjne hamowanie występuje, gdy miejsca aktywne enzymów wykorzystywanych przez bakterie do rozkładania WWA jako źródła węgla są niespecyficzne. Te niespecyficzne enzymy mogą przyłączać się do wielu różnych związków. Jeśli obecne są inne substancje, które łatwiej się rozkładają, enzym degraduje je jako źródło węgla, a WWA pozostaną w środowisku (Wang i in. 2009).

Istnieją raporty z badań dotyczące oczyszczania gleb i osadów zanieczyszczonych WWA metodami bioremediacji *in situ* lub *ex situ*. Straube i in. (2003) udokumentowali, że oczyszczanie gleby zanieczyszczonej WWA z zakładu obróbki drewna osiągnięto poprzez biostymulację jej wodą oraz dodatkami służącymi m.in. jako źródło azotu oraz poprzez bioaugmentację drobnoustrojów szczepu *Pseudomonas aeruginosa*. Zaobserwowano, że w ciągu roku zostało usunięte z gleby około 86% wszystkich WWA, w tym takich jak piren i B(a)P. W innym badaniu dotyczącym oczyszczania starej gazowni zanieczyszczonej związkami pierścieniowymi, w tym WWA, zaobserwowano, że niskocząsteczkowe WWA i związki heterocykliczne ulegały degradacji szybciej niż ich odpowiedniki wysokocząsteczkowe (Lundstedt i in. 2003). Ponadto niepodstawione WWA ulegały degradacji szybciej niż pokrewne alkilo-WWA, a także związki heterocykliczne zawierające azot. Badania laboratoryjne nad usuwaniem WWA obecnych w zanieczyszczonej glebie przy użyciu konsorcjów bakteryjnych w dwóch tlenowych bioreaktorach w fazie zawieszinowej, które pracowały półciągle i były zasilane co tydzień lub co miesiąc, wykazały, że większość WWA, w tym wysokocząsteczkowe WWA, ulegały biodegradacji w większym stopniu (do 76%) w bioreaktorze zasilanym co tydzień (Singleton i in. 2011).

Wody podziemne zanieczyszczone policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi można również poddać bioremediacji za pomocą procedur bioremediacji *in situ* i *ex situ*. Jednak ze względu na wysokie koszty związane z wydobyciem i transportem na ogół nie przeprowadza się oczyszczania *ex situ* zanieczyszczonych wód podziemnych. Udokumentowano kilka prac dotyczących uzdatniania wody zanieczyszczonej WWA. Bewley i Webb (2001) opisali bioremediację *in situ* warstwy wodonośnej zanieczyszczonej różnymi zanieczyszczeniami, w tym fenolami, związkami BTEX i WWA. Miejsce poddano bioremediacji przy użyciu procedury obejmującej połączenie bioaugmentacji i biostymulacji. Składniki odżywcze (handlowa mieszanina moczniaka i fosforanu diamonu), komercyjna mieszanina bakterii rozkładających fenol (PHENOBAC, Microbac Ltd, Durham) i azotan sodu (źródło tlenu) były wprowadzone poprzez wiele iniekcji do warstwy wodonośnej i studni służących do poboru wód gruntowych. Po ponad dwóch i pół roku średnie stężenie WWA zmniejszyło się z 11 µg/l do 0,9 µg/l. Nastąpiła również redukcja innych zanieczyszczeń (tamże).

Niektóre fizyczne i chemiczne metody oczyszczania gleb z substancji ropopochodnych mające prowadzić do rekultywacji skażonych gruntów, chociaż skuteczne, są na ogół pomyślane jako rozwiązania doraźne i często zanieczyszczenia te są przenoszone do środowiska wodnego. W chwili obecnej (2021) bioremediacja stanowi jedyną metodę rekultywacji gleby, która odznacza się skutecznym przekształceniem zanieczyszczeń w nieszkodliwe substancje. Ponadto jest to metoda bardzo efektywna i ekonomiczna (Hernandez, Plaza, Polo 2002). Technika ta doskonale sprawdza się również na obszarach skażonych metalami

ciężkimi, składowiskach odpadów, terenach oczyszczalni ścieków, fabryk, hut, a także tam, gdzie testowano broń atomową. Zanieczyszczenia tego typu, przekształcane przez mikroorganizmy na drodze ich metabolizmu do innych związków, stają się mniej lub w ogóle nieszkodliwe.

Bioremediacja może być procesem inicjowanym i sterowanym przez człowieka. Wówczas precyzuje się ją jako bioremediację inżynieryjną. Według Christophera Kaplana i Christophera Kittsa (2004) w jej skład wchodzi:

- biostymulacja (bioremediacja inżynieryjna *in situ*) – polegająca na stymulowaniu wzrostu i aktywności mikroorganizmów żyjących w oczyszczanym gruncie poprzez ich właściwe odżywianie i dostarczanie tlenu;
- bioaugmentacja (bioremediacja inżynieryjna *ex situ*) – polegająca na dostarczaniu mikroorganizmów do obszarów zanieczyszczonych, gdzie kondycja i liczebność rodzimych drobnoustrojów jest zbyt niska do prowadzenia procesów oczyszczania. Mogą to być wyizolowane rodzime kultury mikroorganizmów, namnażane w bioreaktorach, lub specjalnie wyselekcjonowane konsorcjum.

W opozycji stoi bioremediacja naturalna, czyli ta, która zachodzi samoistnie. Komórka bakteryjna znajdująca się w naturalnym środowisku zmuszona jest do ciągłej adaptacji do nowych, zmieniających się warunków bytowania. Wykorzystywane są tu zatem procesy naturalnej biodegradacji przeprowadzanej przez mikroorganizmy. W procesie tym wymagany jest jedynie regularny monitoring stężenia zanieczyszczeń. Wyróżnić można jeszcze ważną z punktu widzenia ochrony i oczyszczania środowiska fitoremediację. Wykorzystuje ona zdolność roślin do akumulowania związków metali ciężkich.

Jedną z form bioremediacji inżynieryjnej *ex situ* jest hodowla mikroorganizmów w bioreaktorach. Stosuje się ją, gdy skażenie znajduje się w fazie wodnej pierwotnie lub gdy zostanie tam celowo wprowadzone. Bioreaktory to urządzenia, w których hoduje się drobnoustroje zdolne do degradacji skażeń, mogące być dodatkowo wspomagane różnymi czynnikami przyspieszającymi procesy mineralizacji, np. biosurfaktantami, ligandami, pierwiastkami biogennymi czy substratami stymulującymi rozwój specyficznej grupy mikroorganizmów. Procesy prowadzone w bioreaktorach mogą być kontrolowane i stymulowane. Przykładem takiego zarządzania procesowego jest regulacja i optymalizacja mieszania, mieszania z powietrzem czy mieszania z powietrzem wzbogaconym w dodatkowy tlen (Błaszczuk 2009, s. 169). W procesie bioremediacji kluczowy jest jednak dobór odpowiednich mikroorganizmów.

Mikroorganizmy występują powszechnie, odnaleźć je można w każdym środowisku, a ze względu na swoje małe rozmiary oraz właściwości chemotaktyczne są zdolne dotrzeć do każdego zanieczyszczenia pojawiającego się w stężeniu odpowiednim dla ich wzrostu. Substancje skażające środowisko mogą stać się dla nich pokarmem, źródłem węgla i energii lub też akceptorem elektronów. Dzięki ogromnej bioróżnorodności posiadanych enzymów katabolicznych są

w stanie efektywnie zaatakować i – w większości przypadków – zmineralizować wiele skażeń. Mogą one również wytyczać nowe szlaki metaboliczne pod wpływem obecności określonego zanieczyszczenia. Adaptacja do określonego zanieczyszczenia może dotyczyć całej mikroflory lub jej części, a także na poziomie danej populacji. Ta zdolność jest fundamentalną zasadą procesu bioremediacji, z którego człowiek może korzystać przy usuwaniu wprowadzonych przez siebie do środowiska substancji toksycznych. Mikroorganizmy mogą również inicjować przemiany, których organizmy wyższe nie potrafią, np. rozkład pierścienia aromatycznego (Kot-Wasik, Dąbrowska, Namieśnik 2003). Biomasa mikroorganizmów jest porównywalna z biomasą wszystkich organizmów wyższych występujących w biosferze, a gromadzi dziesięciokrotnie więcej azotu i fosforu. Wynikiem tego jest udział mikroorganizmów w procesach biodegradacji każdego ze związków, zarówno naturalnych, jak i sztucznych (ksenobiotyków), nawet bez ingerencji z zewnątrz. Oprócz wbudowywania w swoją biomasę zanieczyszczeń mikroorganizmy prowadzą procesy mineralizacji, biotransformacji i immobilizacji (Błaszczuk 2009).

Przebieg mikrobiologicznej degradacji jest zależny od struktury chemicznej związków oraz ich stężenia, a także czynników środowiskowych. Bioremediacją mogą być objęte wszystkie zanieczyszczenia, jednak literatura przedstawia głównie następujące rodzaje związków (tamże):

- węglowodory ropopochodne i ich pochodne (benzyna, olej napędowy, wielonasycone węglowodory aromatyczne WWA, kreozot, etery, estry, alkohole, ketony);
- węglowodory chlorowcopochodne (gdzie wbudowany w miejsce wodoru jest chlor, brom, fluor), które są znacznie bardziej toksyczne i nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne w wodzie;
- nitroaromatyczne (które posiadają grupę  $-\text{NO}_2$  dołączoną do pierścienia aromatycznego w miejsce wodoru);
- metale ciężkie (cynk, chrom, kadm, kobalt, miedź, nikiel, ołów, rtęć).

Za początek badań nad mikrobiologicznym rozkładem substancji ropopochodnych można uznać okres po wynalezieniu silnika spalinowego. Pierwsze zapisy dotyczące rozwoju mikroorganizmów w produktach ropopochodnych pojawiły się już pod koniec XIX w. (Miyoshi 1895). Po tych odkryciach, w połowie ubiegłego wieku, podejmowano prace dotyczące mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów, chociaż początkowo dokonywano ich w celu wykorzystania węglowodorów jako substratów do produkcji biomasy (Champagnat, Llewelyn 1962; Champagnat 1964; Ballerini 1978; Cooney i in. 1980; Shennan 1984). Badania te koncentrowały się na optymalizacji wzrostu mikroorganizmów na nisko- ( $\text{C}_1$ – $\text{C}_{13}$ ) i średniomolekularnych ( $\text{C}_{14}$ – $\text{C}_{20}$ ) węglowodorach (Hatch 1975; Prokop, Sobotka 1975). Badania podstawowe pozwoliły na poznawanie drogi przemian metabolicznych alkanów, cykloalkanów oraz węglowodorów aromatycznych (Rogoff 1961; Van der Linden, Thijsse 1965; McKenna, Kallio 1964;

Markovetz, Kallio 1971; Pirnik, Atlas, Bartha 1974; Gudin, Syrratt 1975; National Academy of Sciences 1975; Perry 1977, 1979; Stirling, Watkinson, Higgins 1977; Higgins, Gilbert 1978; Hopper 1978; Trudgill 1978).

Badania przeprowadzone na początku XXI w. wykazały, że warunkiem wzrostu i rozwoju mikroorganizmów w paliwach jest obecność, oprócz organicznych związków węgla, których źródło stanowi samo paliwo, także wody oraz pierwiastków biogenych (Kwiatkowska, Wichary 2000, 2001; Hill 2003; Janda 2005; Kłofutar, Golob 2007). Inne badania sugerują, że hydrofobowość bakterii jest krytycznym parametrem w biodegradacji n-alkanów (Elumalai i in. 2017). W skład mikroflory stanowiącej zanieczyszczenie paliw wchodzi zarówno drobnoustroje zdolne jedynie do przeżycia przez pewien czas w paliwie, jak i szczepy aktywnie wykorzystujące jego składniki jako główne źródło węgla i energii. Intensywność wzrostu i rozwoju drobnoustrojów zależy od warunków panujących w zbiornikach paliw i systemach zasilania pojazdów, takich jak skład paliwa, temperatura otoczenia, wilgotność, oraz od składu gatunkowego populacji mikroorganizmów zasiedlających instalację.

Do biodegradacji substancji ropopochodnych zdolnych jest ponad 1% wszystkich mikroorganizmów. Wiele z nich ma odpowiednie plazmidy metaboliczne, dzięki którym węglowodory mogą być stosunkowo szybko atakowane. Liczba komórek bakterii degradujących węglowodory przypadająca na 1 cm<sup>3</sup> plamy olejowej wynosi 10<sup>5</sup> (dla samych WWA – 10<sup>4</sup>). Po kilku tygodniach ich procentowa zawartość rośnie do 10%, a degradacja osiąga tempo 0,5–50 g/m<sup>3</sup> na dobę. W pierwszych dwóch–trzech tygodniach obserwuje się najwyższą prędkość degradacji lekkiej frakcji olejowej (C<sub>12</sub>–C<sub>23</sub>), następnie po namnożeniu organizmów następuje atak na trudniej degradowalne frakcje węglowodorów alifatycznych (C<sub>23</sub>–C<sub>40</sub>) i aromatycznych. Po wyczerpaniu frakcji drobnocząsteczkowej degradacja frakcji cięższych i pierścieniowych następuje znacznie wolniej (Błaszczuk 2009).

Badania nad biodegradacją ropy naftowej w wodnych emulsjach przy użyciu bakterii potwierdzają sekwencyjność rozkładu jej składników (Czechowski, Kołwzan 2008). Względne tempo degradacji węglowodorów zostało przedstawione na rys. 15.

Węglowodory ropy naftowej można uszeregować pod względem podatności na biodegradację w następującej kolejności (od najłatwiej do najtrudniej degradowanych): liniowe alkanany C<sub>10</sub>–C<sub>25</sub> > węglowodory gazowe C<sub>2</sub>–C<sub>4</sub> > alkanany C<sub>5</sub>–C<sub>9</sub> > alkanany rozgałęzione do C<sub>12</sub> > alkeny C<sub>2</sub>–C<sub>11</sub> > rozgałęzione alkeny > cykloalkany oraz węglowodory aromatyczne jedno- i wielopierścieniowe (Guzik i in. 2010). Błaszczuk (2009) podaje następującą kolejność prędkości degradacji poszczególnych frakcji węglowodorów i ich pochodnych: alkanany > alkanany o łańcuchach nierozgałęzionych > alkeny o łańcuchach rozgałęzionych > drobnocząsteczkowe węglowodory n-alkiloaromatyczne > monopierścieniowe węglowodory aromatyczne > cykliczne alkanany > wielopierścieniowe węglowodory

aromatyczne (WWA) > asfalteny. Czechowski i Kołwzan (2008), a przed nimi Fedorak i Westlake (1981); Atlas i Bartha (1992); Oudot, Merlin i Pinvidic (1998) podają natomiast: n-alkany > n-alkilocykloheksany + n-alkilobenzeny > izoalkany + izoalkilobenzeny ≥ rdzeniowe węglowodory aromatyczne + rdzeniowe węglowodory aromatyczne zawierające siarkę > rdzeniowe węglowodory aromatyczne podstawione grupami metylowymi (alkilowymi) > wielopierścieniowe węglowodory alicykliczne (dwucykliczne seskwiterpeny i pięciocykliczne triterpeny). W tym samym porządku maleje ilość wyizolowanych drobnoustrojów, wykazujących zdolność do wzrostu w obecności wymienionych grup substratów. Wynikiem tego jest stwierdzenie, że najwyższą podatność na biodegradację wykazują węglowodory prostołańcuchowe oraz jednopierścieniowe alicykliczne i aromatyczne zawierające podstawnik prostołańcuchowy. W obrębie danej grupy związków biodegradacja jest bardziej efektywna dla składników o niższej masie cząsteczkowej. Wzrost liczby atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym prostym oraz wystąpienie w nim rozgałęzień łańcucha zmniejsza podatność składnika molekularnego na biodegradację. Wśród policyklicznych węglowodorów aromatycznych oraz polimetyloaromatycznych wzrost podatności na biodegradację wiąże się ze zmniejszaniem liczby podstawników metylowych (alkilowych) oraz liczby pierścieni aromatycznych. Wielopierścieniowe węglowodory alicykliczne (terpeny) wykazują najmniejszą podatność na biodegradację (Czechowski, Kołwzan 2008). Czynniki środowiskowymi, które wpływają na szybkość rozkładu węglowodorów, są: zawartość tlenu, temperatura, odczyn oraz obecność substancji pokarmowych i ksenobiotyków (Guzik i in. 2010). Według Raportu U.S. EPA 600/9-89/073 (1989) dodatkowo można wyszczególnić: dostępność wody, pH w zakresie 5,5–8,5, obecność azotu, fosforu i innych pierwiastków nielimitujących wzrost mikroorganizmów, temperaturę z zakresu 4–45°C.

#### węglowodory łatwo degradowalne

- węglowodory C<sub>1</sub>–C<sub>15</sub> i fenole

#### węglowodory względnie łatwo degradowalne

- olej mineralny
- monochloropochodne węglowodory
- węglowodory o pojedynczych pierścieniach

#### węglowodory względnie trudno degradowalne

- węglowodory > C<sub>20</sub>
- polichlorowane węglowodory

#### węglowodory trudno degradowalne

- WWA

**Rysunek 15.** Względne tempo degradacji węglowodorów

Źródło: Błaszczuk 2009.

Obecność innych niż węglowodory źródeł węgla, a także substancji toksycznych może opóźnić proces biodegradacji. Mikroorganizmy najpierw rozkładają substancje łatwiej biodegradowalne, a w następnej kolejności węglowodory będące składnikami produktów ropopochodnych. Postęp procesu biodegradacji determinowany jest składem ilościowym i jakościowym mikroorganizmów oraz ich wyposażeniem enzymatycznym.

Projektowanie procesów bioremediacji wymaga znajomości fizjologii drobnoustrojów, szlaków biodegradacji, zasad funkcjonowania systemów enzymatycznych z pogranicza metabolizmu peryferyjnego i centralnego, dzięki którym może dojść do utlenienia ksenobiotyków. Ze względu na obszerność zagadnienia oraz zakres tematyczny tej książki omówione zostały jedynie najważniejsze drogi metaboliczne funkcjonujące u bakterii, według których mogą być rozkładane węglowodory ropy naftowej, w warunkach tlenowych i beztlenowych.

Z chemicznego punktu widzenia reakcje zachodzące podczas asymilacji węglowodorów ropy naftowej przez drobnoustroje to głównie: acylowanie, alkilowanie, dealkilowanie, dehalogenacja, hydroliza estrów lub amidów, utlenianie, redukcja, hydroksylacja pierścienia aromatycznego, rozerwanie pierścienia, kondensacja i tworzenie koniugatów. Działanie drobnoustrojów ujawnia się przede wszystkim: utlenieniem cząsteczki węglowodoru, rozerwaniem wiązań C–C, atakiem na grupy funkcyjne zawierające np. metal lub siarkę oraz biokrakingiem węglowodorów cięższych (Kwapisz 2006).

Żaden z drobnoustrojów nie jest zdolny do biodegradacji węglowodorów wszystkich grup, mogą one jedynie przyswajać wybrane rodzaje związków o określonych strukturach chemicznych. Do grupy mikroorganizmów wykazujących zdolność do degradacji składników ropy naftowej lub wybranych jej frakcji należą przede wszystkim grzyby i bakterie. Do zespołów drobnoustrojów najpowszechniej występujących w paliwach silników wysokoprężnych, takich jak diesel i biodiesel, zalicza się grzyby pleśniowe z rodzaju *Cladosporium sp.* oraz bakterie: redukujące siarczany, np. *Desulfovibrio sp.* (Hill 2003) i *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) (Klofutar, Golob 2007). Skutkiem aktywności życiowej mikroorganizmów jest rozkład węglowodorów oraz wydzielanie do środowiska metabolitów: wody, związków siarki i substancji powierzchniowo czynnych (Lasocki, Karwowska 2010). Bakterie metabolizujące węglowodory występują licznie zarówno w wodach słodkich, morskich, jak i gruntowych.

Alkany są bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie, a ich rozpuszczalność maleje wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej (Eastcott i in. 1988). Z wyjątkiem alkanów o bardzo małej masie cząsteczkowej wartości rozpuszczalności są znacznie poniżej zakresu mikromolarnego ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  M dla heksanu i  $2 \cdot 10^{-10}$  M dla heksadekanu). Utrudnia to wchłanianie alkanów przez mikroorganizmy (Rojo 2009). Nie jest jasne, w jaki sposób alkany dostają się do komórki mikroorganizmu. Mechanizm może się różnić w zależności od rozpatrywanego gatunku bakterii, masy cząsteczkowej alkanu i właściwości fizykochemicznych

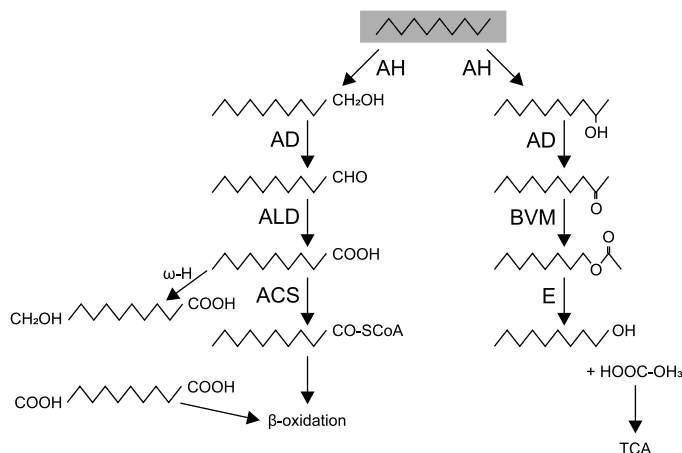
środowiska (Wentzel i in. 2007). Alkany o niskiej masie cząsteczkowej są wystarczająco rozpuszczalne, tak że bezpośrednio pobieranie alkanu z wody może zapewnić wystarczający transfer masy do komórki. W przypadku n-alkanów o średniej masie cząsteczkowej i długich łańcuchach mikroorganizmy mogą uzyskać do nich dostęp poprzez przyleganie do kropelek węglowodorów lub w procesie wspomaganym przez środek powierzchniowo czynny. Większość bakterii rozkładających alkany wydziela różne środki powierzchniowo czynne, które ułatwiają emulgowanie węglowodorów (Hommel 1990; Ron, Rosenberg 2002). Doniesiono, że środki powierzchniowo czynne zwiększają wchłanianie i asymilację alkanów, takich jak heksadekan, w ciekłych kulturach (Beal, Betts 2000; Noordman, Janssen 2002). Środki powierzchniowo czynne wytwarzane przez mikroorganizmy prawdopodobnie pełnią również inne role, takie jak ułatwianie ruchliwości komórek na powierzchniach stałych (Köhler i in. 2000; Caiazza i in. 2005) lub adhezja czy odrywanie od powierzchni lub biofilmów (Neu 1996; Boles, Thoendel, Singh 2005).

Mikrobiologiczny rozkład n-alkanów zwykle rozpoczyna się tzw. monoterminalem atakiem – w reakcji powstaje alkohol pierwszorzędowy, a następnie aldehyd i kwas monokarboksylowy (ZoBell 1950; Foster 1962a, 1962b; Van der Linden, Thijsse 1964; McKenna, Kallio 1965; Miller, Johnson 1966; Van Eyk, Bartels 1968; Ratledge 1978). Dalsza degradacja kwasu monokarboksylowego zachodzi na drodze  $\beta$ -oksydacji. Kwasy tłuszczowe po związaniu się z koenzymem A są degradowane do kwasów krótszych o dwa atomy węgla i acetylokoenzymu A. Kwasy tłuszczowe powstające podczas biodegradacji alkanów czasem mogą się kumulować (Atlas, Bartha 1973; King, Perry 1975), ale ponieważ początkowa addycja tlenu do węglowodoru jest procesem stopniowym, zazwyczaj każda powstała cząsteczka kwasu karboksylowego jest szybko metabolizowana. Niekiedy występuje oksydacja subterminalna prowadząca do powstania alkoholu drugorzędowego, a następnie ketonu. Nie jest to jednak podstawowa ścieżka metabolizmu n-alkanów dla mikroorganizmów (Markovetz, Kallio 1971). Zauważono, że mocno rozgałęzione węglowodory izoprenoidowe, takie jak pristan, poddają się omega-oksydacji – jako główne produkty tej drogi metabolicznej powstają kwasy dikarboksylowe (McKenna, Kallio 1971; Pirnik i in. 1974; Pirnik 1977). Rozgałęzienia z podstawnikami metylowymi powodują wzrost odporności węglowodorów na atak mikrobiologiczny (McKenna, Kallio 1964; Fall, Brown, Schaeffer 1979; Schaeffer i in. 1979).

Tlenowe degradatory alkanów wykorzystują  $O_2$  do aktywacji cząsteczki alkanu. Enzymy aktywujące alkan, które są monoooksygenazami, pokonują niską reaktywność chemiczną węglowodoru poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu. W przypadku n-alkanów zawierających dwa lub więcej atomów węgla degradacja tlenowa zwykle rozpoczyna się od utlenienia końcowej grupy metylowej w celu wytworzenia alkoholu pierwszorzędowego, który jest dalej utleniany do odpowiedniego aldehydu, a na koniec przekształcany w kwas



tłuszczowy (rys. 16). Kwasy tłuszczowe są sprzężone z koenzymem A (CoA) i dalej przetwarzane przez  $\beta$ -utlenianie w celu wytworzenia acylokoenzymem A – acetylo-CoA (van Hamme i in. 2003; Wentzel i in. 2007). W niektórych przypadkach oba końce cząsteczki alkanu są utleniane przez  $\omega$ -hydroksylację kwasów tłuszczowych na końcowej grupie metylowej, tworząc  $\omega$ -hydroksykwas tłuszczowy, który jest dalej przekształcany w kwas dikarboksylowy i przetwarzany przez  $\beta$ -utlenianie (Watkinson, Morgan 1990; Coon 2005).



AH – hydroksylaza alkanowa; AD – dehydrogenaza alkoholowa; ALD – dehydrogenaza aldehydowa; ACS – syntetaza acylo-CoA; w-H – w-hydroksylaza; BVM – monooksygenaza Baeyera–Villigera; E – esteraza; TCA – cykl kwasów trikarboksylowych.

**Rysunek 16.** Drogi tlenowej degradacji n-alkanów poprzez utlenianie terminalne (po lewej) i subterminalne (po prawej)

Źródło: Rojo 2009.

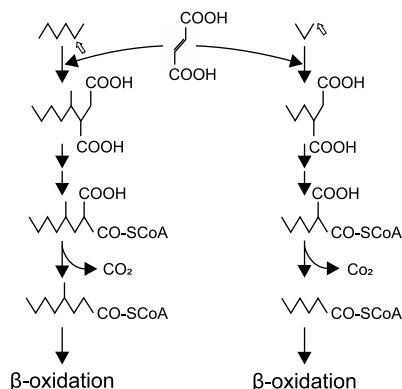
Alkany o rozgałęzionych łańcuchach są trudniejsze do degradacji niż liniowe n-alkany. Jednak kilka szczepów bakteryjnych może degradować alkany o rozgałęzionych łańcuchach, takie jak izooktan (Solano-Serena i in. 2004) lub pristan (Watkinson, Morgan 1990). *Alcanivorax sp.* może również degradować rozgałęzione alkany, takie jak wspomniany pristan, a także fitan (Hara, Syutsubo, Harayama 2003). Szlaki metaboliczne odpowiedzialne za asymilację rozgałęzionych alkanów są gorzej scharakteryzowane niż w przypadku n-alkanów i mogą obejmować  $\omega$ - lub  $\beta$ -utlenianie cząsteczki węglowodoru (Watkinson, Morgan 1990).

Węglowodory są bardzo cennymi zasobami naturalnymi dla energetyki i przemysłu chemicznego, ponieważ stanowią główne składniki naturalnej ropy, węgla i gazu. Węglowodory alifatyczne i aromatyczne oraz inne związki aromatyczne stanowią najobficiej występujące małe cząsteczki organiczne na Ziemi i są obecne głównie w beztlenowych (pozbawionych  $O_2$ ) glebach lądowych, osadach morskich lub w głębokich środowiskach podpowierzchniowych.

Węglowodory powstają również biologicznie wytwarzane przez bakterie, zwierzęta i rośliny lub w wyniku abiotycznych procesów termogenicznych w osadach głębinowych (Wilkes, Schwarzbauer 2010). Tak więc takie związki są potencjalnymi i wszechobecnymi substratami dla metabolizmu drobnoustrojów, chociaż często uważa się je za odporne w warunkach beztlenowych.

Stwierdzono, że w procesach degradacji węglowodorów w warunkach tlenowych uczestniczą gatunki bakterii należących do ponad 20 rodzajów, zaklasyfikowanych do kilku typów: *Proteobacteria* ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -*Proteobacteria*), do którego należą bakterie rzędu *Pseudomonadales*, w tym *Pseudomonas aeruginosa*, bakterie Gram-dodatnie, *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* (*Bacteroidetes*) (Błaszczuk 2009). Zdolność do asymilacji węglowodorów ropopochodnych wykazują jednak głównie bakterie Gram-ujemne. Wśród bakterii o stosunkowo szerokim spektrum substratowym wymienić należy szczepy z grupy *Pseudomonas* (Kwapisz 2006). *Pseudomonas aeruginosa* wykazują szybki wzrost w obecności ropy naftowej oraz wysoką tolerancję na rosnące stężenie substratu. Niektóre szczepy pałeczek ropy błękitnej są zdolne do rozkładu wielu węglowodorowych składników ropy naftowej (United States Patent 6110372). Należy jednak pamiętać, że aktywność biodegradacyjna jest cechą szczepową.

W warunkach beztlenowych alkanu muszą być aktywowane poprzez mechanizm, który nie jest oparty na  $O_2$ . Opisano kilka szczepów bakteryjnych zdolnych do wykorzystywania alkanów jako źródła węgla przy braku  $O_2$  (Widdel, Rabus 2001). Te mikroorganizmy wykorzystują azotany lub siarczany jako akceptory elektronów. Ich wzrost jest znacznie wolniejszy niż w przypadku tlenowych produktów degradacji alkanów. Jednak beztlenowa degradacja alkanów odgrywa ważną rolę w usuwaniu węglowodorów w środowisku. Analizowane szczepy zwykle wykorzystują wąski zakres alkanów jako substratu. Przykładowo szczep BuS5, bakteria redukująca siarczany należąca do rodziny *Desulfosarcina/Desulfococcus*, asymiluje tylko propan i butan (Kniemeyer i in. 2007); *Azoarcus* sp. HxN1, bakteria denitryfikacyjna, wykorzystuje alkanu C6–C8, podczas gdy *Desulfobacterium* Hdx3 metabolizuje alkanu C12–C20 (Widdel, Rabus 2001). W przypadku niektórych szczepów zostały zbadane szlaki metaboliczne prowadzące do degradacji węglowodorów. Wyniki badań wskazują, że stosowane są dwie ogólne strategie przedstawione na rys. 17. Pierwsza obejmuje aktywację alkanu w pozycji subterminalnej przez dodanie cząsteczki fumaranu do alkanu, z wytworzeniem pochodnej alkilobursztynianu. Uważa się, że reakcja ta zachodzi poprzez wytworzenie organicznego rodnika pośredniego, najprawdopodobniej rodnika glicylowego (Rabus i in. 2001). Produkt reakcji jest następnie łączony z CoA i przekształcany w acylo-CoA, który może być dalej metabolizowany przez  $\beta$ -oksydację. W drugim mechanizmie reakcji, który został opisany dla propanu, cząsteczkę fumaranu dodaje się do jednego z końcowych atomów węgla alkanu (Kniemeyer i in. 2007).



Początkowa aktywacja alkanu następuje poprzez dodanie cząsteczki fumaranu, która jest później regenerowana. Przyłączanie zwykle występuje w pozycji subterminalnej, ale w jednym przypadku zaproponowano również dodawanie terminalne. Dalsza degradacja wymaga przegrupowania szkieletu C; produkty są najprawdopodobniej przetwarzane przez  $\beta$ -utlenianie.

### Rysunek 17. Beztlenowa degradacja alkanów

Źródło: Rojo 2009.

Ponieważ węglowodory aromatyczne charakteryzują się stosunkowo większą rozpuszczalnością w wodzie i toksycznością niż alkan, ważne jest poznanie dróg ich biodegradacji oraz czynników sterujących procesami eliminacji w środowisku. Bioremediację z zanieczyszczeń WWA obserwuje się w zanieczyszczonych osadach i glebach, gdzie mikrobiocenozy istnieją w warunkach beztlenowych (Rabus, Widdel 1995; Coates, Anderson, Lovley 1996; Coates i in. 1996; Harms, Rabus, Widdel 1999; Meckenstock i in. 2016; Musat, Vogt, Richnow 2016; Von Netzer i in. 2016). Proces ten jest jednak powolny, a biochemiczny mechanizm biodegradacji nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony (Haritash, Kaushik 2009). Wiadomo, że biodegradacja WWA inicjowana jest poprzez wprowadzenie obu atomów tlenu cząsteczkowego w pierścień aromatyczny. Reakcja ta jest katalizowana przez wieloskładnikową dioksygenazę, która składa się z reduktazy, ferredoksyny i białka zawierającego w swojej strukturze klastry żelazowo-siarkowe (Harayama, Kok, Neidle 1992). Przeprowadzono kilka badań degradacji naftalenu w porównaniu z innymi WWA w warunkach beztlenowych. Stopień i zakres degradacji WWA jest skorelowany z liczbą pierścieni benzenowych oraz obecnością lub brakiem bocznych łańcuchów w strukturze związku (Coates i in. 1997). Wykazano, że w warunkach beztlenowych mogą być degradowane jedynie WWA mające dwa do czterech pierścieni (Włodarczyk-Makula, Wierzbička 2013). Brak jest dowodów na to, by WWA z większą liczbą pierścieni były w takich warunkach degradowane (Bregnard i in. 1996; Coates i in. 1996; Lagenhoff, Zehnder, Schraa 1996; Haritash, Kaushik 2009). Badania przeprowadzone przez Roberta Ambrosolego i in. (2005) dały podstawy do twierdzenia, że jest możliwa beztlenowa degradacja fluorenu, fenantrenu

i pirenu przez mieszane konsorcja bakteryjne w pewnych określonych warunkach na drodze metabolizmu fermentacyjnego i oddechowego. Ze wszystkich badań przeprowadzonych do tej pory dotyczących różnych związków aromatycznych, takich jak fenole, krezole, aniliny, benzoesy, toluen, benzen, ksyleny, związki nitroaromatyczne i chlorowane związki aromatyczne i wiele innych, można założyć, że bakterie beztlenowe metabolizują węglowodory ścieżką podobną do bakterii tlenowych (Fuchs i in. 1994; Haritash, Kaushik 2009). Najpierw związki aromatyczne są przekształcane w kilka głównych półproduktów. Następnie pierścień aromatyczny jest aktywowany i rozerwany, a powstałe związki niearomatyczne są przekształcane w metabolity główne. W warunkach beztlenowych głównymi półproduktami są benzoesan (lub benzoil-S-CoA) i – w mniejszym stopniu – rezorcyny i floroglucyny (Fuchs i in. 1994; McNally, Mihelcic, Lueking 1998). Reakcje biorące udział w procesach, które prowadzą do półproduktów głównych, obejmują: karboksylację, dekarboksylację, hydroksylację, redukcję, dehydroksylację, dezaminację, dechlorację, rozkład eterów arylowych, reakcje z liazami. Aromatyczne półprodukty główne są atakowane redukcyjnie (Evans 1977) i rozerwane w procesie hydrolizy. W rezultacie te niearomatyczne produkty są przekształcane do metabolitów głównych.

Zidentyfikowano czyste kultury kilku bakterii beztlenowych denitryfikacyjnych (McNally, Mihelcic, Lueking 1998) i redukujących siarczany (Galushko i in. 1999), zdolnych do degradacji WWA. Większość z nich jest z rodzaju *Pseudomonas*. Grupa *Pseudomonas* zawiera wiele bakterii tlenowych rozkładających naftalen (Fuentes i in. 2016). W badaniach (Ridgeway i in. 1990) obliczono, że 86,9% spośród mikroorganizmów degradujących węglowodory w zanieczyszczonej benzyną warstwie wodonośnej to bakterie z grupy *Pseudomonas*. Aitken i in. (1998) wyizolowali z wielu miejsc zanieczyszczonych pochodnymi ropy naftowej co najmniej trzy gatunki *Pseudomonas* zdolnych do degradacji B(a)P.

Chociaż takson *Pseudomonas* jest znany z wielu szczepów zdolnych do degradacji różnych związków organicznych, w tym węglowodorów alifatycznych i aromatycznych, cechy te zostały również rozpoznane w innych rodzajach Gammaproteobacteria. Niemniej jednak aktywność metaboliczna *Pseudomonas* została zbadana znacznie dokładniej niż w przypadku innych grup drobnoustrojów. Bogactwo publikacji dotyczących przemian węglowodorów potwierdza kluczową rolę tego rodzaju wśród innych degradatorów ropy naftowej. Whyte i in. (1997) po raz pierwszy opisali degradujące węglowodory psychrotroficzne (zimnoodporne) szczepy *Pseudomonas*, które metabolizowały  $nC_5$ – $nC_{12}$ , toluen i naftalen zarówno w temperaturze 5°C, jak i 25°C. Szerszy zakres degradowanych związków wykazał halofilny (preferujący słone wody lub gleby) organizm *Pseudomonas* sp. BZ-3. Przekształcił  $nC_6$ , ksylen, benzen, naftalen, fenantren, antracen i piren (Lin i in. 2014). Autorzy podali, że przy początkowym stężeniu 50 mg/l aż 75% fenantrenu uległo degradacji w obecności NaCl w stężeniu 20 g/l. *Pseudomonas aeruginosa* DQ8, wyizolowany

z gleby zanieczyszczonej ropą naftową na chińskim polu naftowym Daqing, wykorzystywał n-alkany, a także niektóre WWA (np. fluoren, fenantren, piren, fluoranten). Nie była metabolizowana jednak żadna z grup BTEX (Zhang i in. 2011). Badania Gai i in. (2012) ukazały szczep wykazujący dwie zróżnicowane strategię enzymatyczne w kierunku fluorenu. Szczep ten zdolny jest utleniać związek zarówno poprzez monooksydację C9, jak i utlenianie C3, C4 (tamże). *Pseudomonas aeruginosa* szczep W10 również preferencyjnie wykorzystywał n-C<sub>16</sub>, a także naftalen, fenantren, fluoranten i piren (Chebbi i in. 2017). Jednak jego wzrostowi nie sprzyjał żaden ze związków BTEX ani n-C<sub>8</sub>. Z kolei *Pseudomonas* spp. szczepy DN34 i D36 metabolizowały n-alkany oraz WWA o niskiej masie cząsteczkowej: naftalen, fluoren i fenantren (Fuentes i in. 2016). Następnie dalsze badania ujawniły podobne zdolności metaboliczne innych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* RM1 i SK1, które zamieszkiwały zanieczyszczoną glebę tropikalną. Organizmy te usuwały zarówno węglowodory alifatyczne, jak i aromatyczne ze zużytego oleju silnikowego (Salam 2016). Stwierdzono istotne obniżenie stężeń nC<sub>13</sub>-nC<sub>16</sub>, nC<sub>23</sub>-nC<sub>26</sub>, pristanu, antracenu i pirenu w badanym podłożu. Chaerun i in. (2004) zbadali aktywność drobnoustrojów na wybrzeżach Atake po wycieku ropy w porcie Nachodka na Morzu Japońskim i wyizolowali *Pseudomonas aeruginosa* spp. A5 i A6, które również wykazywały zdolności do multidegradacji węglowodorów. Oprócz nasyconych związków alifatycznych A5 wykorzystywał kilka WWA, podczas gdy A6 rósł również na toluenie. Badanie nad *Pseudomonas* sp. WJ6 (Xia i in. 2014) wykazało, że szczep był zdolny do transformacji kilku n-alkanów (nC<sub>12</sub>, nC<sub>22</sub>, nC<sub>32</sub>, nC<sub>40</sub>) i różnych WWA (naftalen, fluoren, fenantren i piren). Rósł zauważalnie i szybko na średnio- i długołańcuchowych n-alkanach do nC<sub>32</sub>, podczas gdy nieco wolniej przy wykorzystaniu nC<sub>40</sub> i WWA. Degradacja fluorenu przebiegała wydajniej niż naftalenu i fenantrenu. WJ6 wykorzystywał szerszą gamę składników ropy naftowej jako źródła węgla niż inne szczepy *Pseudomonas*. *Pseudomonas* sp. LGM2, izolowany z gleby zanieczyszczonej olejem, metabolizowany fenantren, piren, B(a)P oraz związki alifatyczne: nC<sub>18</sub> i pristan (Guermouche M'rassi i in. 2015). Szczepy bakteryjne PS-I, PS-II i PS-III, również zidentyfikowane jako *Pseudomonas*, usuwały nie tylko alifatyczne, ale także aromatyczne frakcje ropy naftowej (Mittal, Singh 2009). Spektrum metaboliczne *Pseudomonas* spp. G2, H10, B3 obejmowało m.in. nC<sub>16</sub> i toluen (Kołwzan 2005). Badania przeprowadzone przez Aislabie i in. (2000) ujawniły obecność szczepów *Pseudomonas* w glebach zanieczyszczonych olejem Antarktyki. Bakterie te, szczepy Ant30 i 8/48, mogą przekształcać węglowodory nC<sub>7</sub>, nC<sub>11</sub>, monoaromatyczne (toluen, m-, p-ksylen) i diaromatyczne. Z kolei Auffret i in. (2015) wyodrębnili *Pseudomonas* sp. z konsorcjum bakteryjnego Mix3. Bakteria ta wykorzystywała n-alkany (nC<sub>8</sub>, nC<sub>16</sub>), wszystkie związki z grupy BTEX oraz naftalen. Inne badanie wykazało obecność szerokiego profilu metabolicznego u psychotolerancyjnych (tolerujących zimną temperaturę) *Pseudomonas* spp. 7/167 i 8/46

(Farrell i in. 2003). Oba organizmy były zdolne do wzrostu na szerokiej gamie związków, w tym na średniołańcuchowych n-alkanach i niektórych węglowodorach aromatycznych. Stwierdzono dodatkowo, iż izolat 8/46 mógł degradować benzen, a 7/167 nie, podczas gdy izolat 7/167, w przeciwieństwie do 8/46, był w stanie rosnąć na 2-metylnaftaleni. Spośród izolatów pozyskanych z powierzchniowej wody morskiej pobranej z obszarów przybrzeżnych Antarktyki psychrotolerancyjny *Pseudomonas* sp. HY7a wyrósł na wybranych n-alkanach, benzenie i toluenie (Lo Giudice i in. 2010).

Wykazano, że B(a)P degradowany jest również przez konsorcja *Pseudomonas* i innych bakterii (Trzesicka-Młynarz, Ward 1995). W badaniach tych wykazano, że konsorcja bakteryjne wykazują się większą skutecznością usuwania słabo rozpuszczalnych w wodzie WWA niż pojedyncze szczepy czystej kultury. Również w publikacji Elumalai i in. (2017) zbadano skuteczność czystych izolatów *Geobacillus thermoparaffinivorans* IR2, *Geobacillus stearothermophilus* IR4 i *Bacillus licheniformis* MN6 oraz ich mieszanego konsorcjum na degradację długołańcuchowych n-alkanów C32 i C40. Stwierdzono, że wydajność biodegradacji jest znacznie wyższa dla C32 przez konsorcjum mieszane (90%) w porównaniu ze szczepami czystymi, podczas gdy szczepy czyste były lepsze w degradacji C40 niż konsorcjum mieszane (87%).

Szczepy *Pseudomonas aeruginosa* aktywnie namnażają się przy dużym stężeniu fenantrenu, co zostało wykazane przez Romero (Romero i in. 1998). W badaniach tych stwierdzono przewagę liczby szczepów *Pseudomonas aeruginosa* nad innymi szczepami wyizolowanych z próbek środowiskowych wykorzystujących fenantren jako źródło pokarmowe. Komórki tych mikroorganizmów zostały zaszczipione w płynnej pożywce prostej. Zaobserwowano całkowite usunięcie fenantrenu w ciągu 30 dni. *Pseudomonas aeruginosa* wykazały się najlepszą aktywnością wzrostu na fenantrenie.

*Pseudomonas aeruginosa* jest gatunkiem z rodzaju *Pseudomonas*, rodziny *Pseudomonadaceae*, rzędu *Pseudomonadales*. Bakteria ta jest Gram-ujemną, niezarodnikującą, ruchliwą (jedna rzęska umieszczona biegunowo) pałeczką o cylindrycznym, wydłużonym kształcie, osiągającą wielkość 0,5–0,8  $\mu\text{m}$  x 1,5–3,0  $\mu\text{m}$ . Nie wytwarza otoczki i przetrwalników, jest oksydazo- i katalazododatnia. Wykazuje metabolizm oksydacyjny w próbie na podłożu Hugh-Leifsona (sposób rozkładu cukrów przez drobnoustroje odbywa się na drodze utleniania), jest bakterią denitryfikacyjną, produkującą amoniak z rozkładu acetamidu. Większość szczepów (98%) produkuje rozpuszczalny w wodzie pigment. Pigment piocyjania (niebieskozielona) jest produkowana przez ponad 90% szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, dzięki czemu można ją oznaczać metodami fluorescencyjnymi. Większość szczepów jest zdolna do wzrostu w 42°C, ale nie w 4°C, co odróżnia *Pseudomonas aeruginosa* od *Pseudomonas fluorescens*, które rosną w 4°C, ale nie rosną w 42°C.

*Pseudomonas aeruginosa* można znaleźć w wodach powierzchniowych, mogą bytować w chlorowanej wodzie, gdyż odznaczają się znaczną odpornością na zabiegi dezynfekcyjne, wchodzi w skład biofilmów tworzonych wewnątrz urządzeń rozpraszających wodę (Khan 2000). *Pseudomonas aeruginosa* występuje także w ściekach, wodach zanieczyszczonych ściekami oraz w glebie, przewodzie pokarmowym ludzi zdrowych (2–3% populacji ludzkiej), w szpitalach i w otoczeniu człowieka.

Verrhiest i in. (2002) prowadził badania nad interakcją pomiędzy mieszaniną WWA i mikrobiocenozy w naturalnych osadach śludkowodnych. Wykazał on m.in., że mikroorganizmy macierzyste mają dużą zdolność degradacji WWA w zależności od właściwości fizyko-chemicznych i dostępności obecnych w osadach substancji. W technologii bioremediacji często wykorzystuje się konsorcja drobnoustrojów wykazujących szczególne predyspozycje do degradacji poszczególnych grup węglowodorów. Konsorcja takie muszą charakteryzować się zdolnością do szybkiej adaptacji w skażonym środowisku oraz rozkładem zanieczyszczeń prowadzącym do detoksykacji środowiska ze składników ropopochodnych. Należy tutaj zaznaczyć, że poza szybkim obniżaniem się stężeń węglowodorów oczekuje się również braku gromadzenia się szkodliwych metabolitów.

W celu oczyszczania wód z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* stosuje się głównie filtrację, koagulację powierzchniową, naświetlanie wody promieniami UV i chlorowanie końcowe za pomocą NaOCl. Do czynników fizycznych działających letalnie na pałeczki ropy błękitnej zalicza się również niskie pH i wysuszenie. W laboratoriach sterylizacji takiej dokonuje się najczęściej w autoklawie lub w aparacie Kocha, a czasem przez przesączenie przez filtr o odpowiednio małych porach. Promieniowanie UV ma silne działanie bakteriobójcze, dotyczy to w szczególności promieniowania o długości fali 254–265 nm (w zakresie UV-C) (Bolton 1999). Podstawą skutecznej dezynfekcji promieniami ultrafioletowymi jest prawidłowy dobór urządzenia UV, którego dokonuje się na podstawie wielkości maksymalnego chwilowego przepływu ( $\text{m}^3/\text{h}$ ), jakości wody (transmisja UV) oraz żądanej dawki UV ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Gwarantuje ono wówczas usunięcie 99,9% wszelkich mikroorganizmów. W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* najbardziej istotna jest dawka promieniowania, która zależy od natężenia promieniowania. Przy długości fali 254 nm dawka promieniowania eliminująca bakterię wynosi 10,5 (Kashi 2015). Do zalet wynikających ze stosowania lamp UV należą: duża skuteczność niszczenia bakterii, krótki czas kontaktu, znikoma ilość niepożądanych ubocznych produktów dezynfekcji, stosunkowo małe gabaryty lamp UV i łatwy ich montaż. Wadą metody jest to, iż w przypadku wysokiej mętności i dużego zabarwienia wody skuteczność dezynfekcji lampami UV obniża się.

## 4.2. Biodegradacja w obecności wybranych surfaktantów – saponin

Związki powierzchniowo czynne umożliwiają rozproszenie w roztworach wodnych substancji, które są słabo lub wcale niemieszające się z fazą wodną (Noordman i in. 2002). Podstawowy proces, który wówczas zachodzi, to emulsyfikacja, czyli tworzenie się emulsji. Wielokrotnie zwiększa się międzyfazowa powierzchnia wymiany masy, co powoduje zwiększenie przenikania cząsteczek związku organicznego do roztworu, co z kolei przekłada się na zwiększenie dostępności biodegradowanych związków dla komórek (Schippers i in. 2000).

Saponiny są surfaktantami pochodzenia naturalnego o względnie niskiej toksyczności i wysokiej biodegradowalności. Właściwości te stanowią istotną zaletę z perspektywy wykorzystania ich w biodegradacji optymalizowanej surfaktantami. Liczba prac opisujących zastosowanie surfaktantów wytwarzanych przez mikroorganizmy w procesach biodegradacji węglowodorów jest obszerna, natomiast liczba publikacji dotyczących biodegradacji zanieczyszczeń w obecności saponin – stosunkowo niewielka.

Wszystkie węglowodory aromatyczne są słabo rozpuszczalne w wodzie. W warunkach tlenowych pierwszy bakteryjny atak związany z ich degradacją to działanie oksigenaz, które w bezpośrednim kontakcie włączają tlen do struktury łańcucha węglowodoru. Emulsyfikacja nierozpuszczalnych w wodzie węglowodorów jest jedną ze strategii umożliwiających bakteriom skuteczny atak enzymatyczny. Bakterie zdolne do degradacji węglowodorów produkują silnie oddziałujące środki powierzchniowo czynne, biosurfaktanty, wykorzystując jako źródło węgla różne, niemieszające się wzajemnie substraty węglowe (hydrofilowe i hydrofobowe). Powodują one dyspersję cząsteczek oleju w sposób podobny do soli kwasów żółciowych dyspergujących tłuszcze w przewodzie pokarmowym człowieka. Dopiero rozproszone cząsteczki są atakowane przez system enzymatyczny bakterii. Na wytwarzanie biosurfaktantów ma wpływ wiele czynników, takich jak: źródło węgla, pH, temperatura czy biodostępność substratów (Rosenberg, Ron 1999). Mikroorganizmy syntetyzują różnorodne biosurfaktanty. Związki te efektywnie zwiększają powierzchnię biofilmu i napięcie powierzchniowe. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* powszechnie syntezują ramnolipidy (Ron, Rosenberg 2001).

Uruchomienie mechanizmów ułatwiających wykorzystywanie związków hydrofobowych w charakterze substratu pokarmowego i wytwarzanie substancji obniżających napięcie powierzchniowe może przebiegać z inną szybkością u poszczególnych szczepów bakterii. Wprowadzenie biosurfaktantu „z zewnątrz” będzie stymulowało proces biodegradacji, zwłaszcza u tych szczepów, które nie mają takich mechanizmów lub na ich uruchomienie potrzebują więcej czasu. Badania wykazały, że zarówno szczepy adaptowane, jak



i nieadaptowane skuteczniej rozkładały ciężką frakcję destylacyjną ropy naftowej w obecności surfaktantu – ramnolipidu (Witek 2011).

Dodatkowe surfaktanty są stosowane w procesach bioremediacji, jeżeli temperatura procesu odbiega od optymalnej lub degradacja obejmuje ciężkie frakcje destylacyjne ropy naftowej, zawierające węglowodory ciężko biopryswajalne. W literaturze znajdują się zarówno informacje o pozytywnym, jak i negatywnym działaniu biosurfaktantów na proces biodegradacji produktów naftowych (Cubitto i in. 2004; Wang, Mulligan 2004; Zhou, Zhu 2007a, 2007b). Środki powierzchniowo czynne (syntetyczne lub naturalne) dodawane w czasie bioremediacji przyspieszają tempo degradacji niektórych węglodorów przez pewne gatunki bakterii, dla innych gatunków stają się inhibitorami (Smulek, Kaczorek 2015). Determinowane jest to strukturą związku powierzchniowo czynnego, stanem fizycznym substratu, stopniem dyspersji i emulgowania węglodorów oraz rodzajem bakterii prowadzącej biodegradację. Większość badań opisanych w literaturze dotyczących wpływu biosurfaktantów na biodegradację węglodorów koncentruje się na pojedynczych związkach (Witek 2011). Natomiast problem zanieczyszczenia środowiska produktami ropopochodnymi dotyczy bardzo skomplikowanych mieszanin węglodorów. Produkty naftowe różnią się zawartością składników łatwo- i trudno biodegradowalnych.

Remediacja w obecności środków powierzchniowo czynnych jest technologią mającą ogromny potencjał, ale i wpływ na środowisko. Pozostałości syntetycznych substancji powierzchniowo czynnych w środowisku poddanych działaniu takiej rekultywacji stanowią wyzwanie dla projektowania metodologii procesów remediacji. Doprowadziło to do badania zdolności naturalnych substancji powierzchniowo czynnych w rekultywacji.

Wśród prac dotyczących badań biodegradacji węglodorów ropopochodnych z wykorzystaniem saponin pochodzenia roślinnego odnaleźć można wyniki świadczące o pozytywnym ich wpływie na cały proces. Stwierdzono dwukrotne zwiększenie degradacji pirenu przez szczep *Sphingomonas sp.* w obecności saponin w porównaniu z degradacją bez udziału saponin (Kobayashi i in. 2012). Szczepy z rodzajów *Pseudomonas* i *Mycobacterium* w obecności saponin z *Q. saponaria* zwiększały efektywność biodegradacji WWA (Soeder i in. 1996). Potwierdzony został wzrost wydajności biodegradacji fenantrenu z użyciem saponin w warunkach ograniczonej obecności tlenu (Choi i in. 2009). Dodatek saponin z *Sapindus mukorossi* i ich mieszaniną z syntetycznymi surfaktantami powodował wzrost biodegradowalności naftalenu (Rao i in. 2014; Diddi, Maitra 2017). Odnotowano również pozytywny efekt saponin z *Q. saponaria* na bakteryjną degradację oleju napędowego (Kaczorek i in. 2008).

Badania nad roślinnymi związkami powierzchniowo czynnymi koncentrują się na ich chemicznym wyodrębnieniu i ocenie ich zdolności do zwiększania rozpuszczalności pojedynczych zanieczyszczeń. Badania przeprowadzone

i opisane w tej książce objęły sprawdzenie zdolności wodnego ekstraktu *Sapindus Mukorossi* do zwiększania rozpuszczalności mieszaniny węglowodorów.

### 4.3. Fotoliza i utlenianie chemiczne

Fotolizę definiuje się jako rozkład związku w wyniku reakcji zapoczątkowanych przez absorpcję światła (Manahan 1994). Reakcje te zachodzą, gdy światło pochłonięte przez związki wzbudza elektrony w cząsteczkach. Wzbudzenie to tworzy niestabilny układ strukturalny, co w konsekwencji pozwala na oddziaływanie na związek kilku procesów fizycznych i chemicznych (Schwarzenbach, Gschwend, Imboden 1993). Promieniowanie słoneczne docierające do Ziemi ma długość fali powyżej 286,3 nm. Krótsze fale praktycznie nie docierają do powierzchni Ziemi wskutek silnej absorpcji przez ozon w stratosferze oraz przez tlen w wyższych warstwach atmosfery. Zakresy absorpcji  $O_2$  i  $O_3$  uniemożliwiają przenikanie do powierzchni Ziemi promieniowania ultrafioletowego o dużej częstotliwości. Intensywność promieniowania UV docierającego do powierzchni Ziemi zależy od wielu czynników: szerokości geograficznej, gęstości powietrza, zachmurzenia, pory roku czy wielkości dziury ozonowej. W środowisku wodnym promieniowanie to jest absorbowane w powierzchniowej warstwie sięgającej średnio do około 2 m (Kot-Wasik, Dąbrowska, Namieśnik 2003).

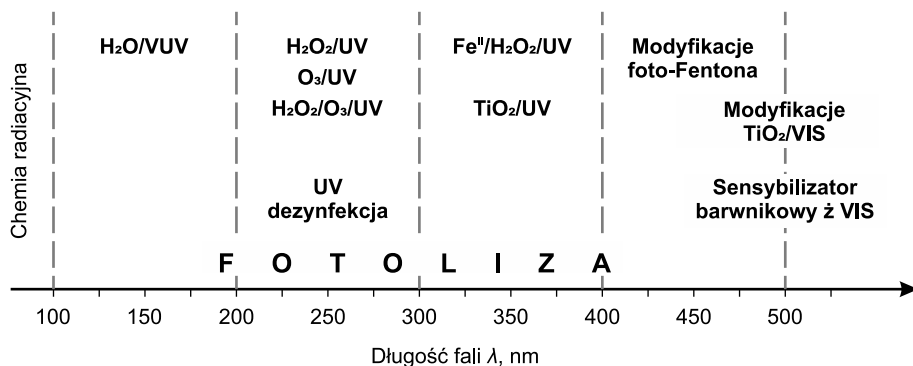
Degradacja fotochemiczna związków ma prowadzić do zrywania wiązań w cząsteczkach w celu otrzymania prostszych związków lub zniszczenia biologicznych struktur mikroorganizmów, doprowadzając do dezynfekcji. Degradacja związków może być prowadzona do pełnej mineralizacji, z wydzielaniem ditlenku węgla, wody i kwasów mineralnych. Fotochemiczny rozkład związków organicznych może zachodzić zarówno w atmosferze, jak i na powierzchni gleb i wód. Skutkiem procesów degradacji fotochemicznej dla zanieczyszczonych wód jest oczyszczanie lub zapobieganie negatywnym skutkom, jakie toksyczne związki mogą powodować. Często reakcje te wspomagane są obecnością dodatkowych utleniaczy lub katalizatorów.

Rozszczępienie wiązania w związku chemicznym wywołane absorpcją promieniowania elektromagnetycznego nazywane jest fotolizą. Różnorodne procesy fotolizy i odpowiadające im zakresy długości fal przedstawiono na rys. 18.

Rozerwanie wiązań chemicznych powoduje powstanie dwóch związków posiadających po jednym niesparowanym elektronie, co stymuluje powstawanie bardzo reaktywnych wolnych rodników. Reagują one z innymi związkami, powodując wytworzenie nowego związku i kolejnego wolnego rodnika. W wyniku takich reakcji łańcuchowych ostatecznie zachodzi reakcja utleniania, tzn. przyłączenia tlenu do atomu jakiegoś pierwiastka. Reakcje rodnikowe prowadzą do wielu różnych zmian w budowie chemicznej materiałów, np. pęknięcia wiązań

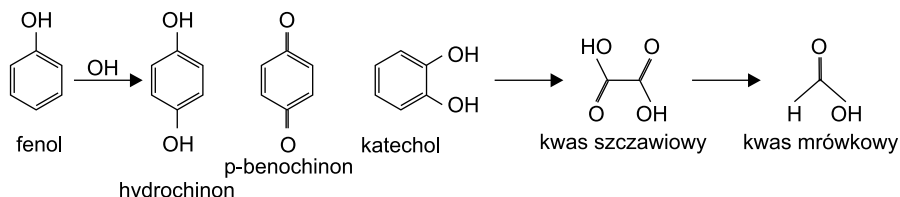
łańcuchowych, tworzenia łańcuchów bocznych, powstawania nowych grup funkcyjnych.

Wyróżnia się dwa rodzaje fotolizy: bezpośrednią i pośrednią (Xue, Xu, Jin 2005). Fotoliza bezpośrednia polega na zainicjowaniu reakcji chemicznej poprzez wzbudzenie cząsteczki absorbującej foton. Zwykle tymi reakcjami są procesy utleniania. Potencjał fotolizy zależy od stopnia pokrycia się widma absorpcyjnego UV/VIS danego związku z widmem emisyjnym promieniowania o długości fali 290–750 nm. Efektami bezpośredniego działania promieniowania UV mogą być: transformacje związków organicznych w inne, zerwanie wiązań chemicznych, całkowita degradacja substancji organicznych. Promieniowanie UV może powodować również dysocjację związków utleniających i tworzenie się bardzo reaktywnych rodników zdolnych do degradacji organicznych zanieczyszczeń (Mill 1989). Przykładem związku o budowie pierścieniowej, ulegającemu degradacji na drodze fotolizy bezpośredniej, termicznej dysocjacji oraz reakcji z rodnikami hydroksylowymi  $\text{OH}^\bullet$ , jest fenol. Szybkość degradacji fenolu rośnie wraz z obniżaniem wartości pH, a wzrostem stężenia rozpuszczonego w wodzie tlenu. Pośrednie produkty reakcji (hydrochinon, p-benzochinon, katechol) dowodzą, że rodniki  $\text{OH}^\bullet$  biorą udział w mechanizmie degradacji fenolu (Wu i in. 2001). Proces ten przedstawiono na rys. 19.



**Rysunek 18.** Zakresy długości fal i odpowiadające im procesy fotolizy

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Miller 2011.



**Rysunek 19.** Fazy procesu degradacji fenolu w roztworach wodnych

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Naffrechoux i in. 2000.

W reakcjach fotolizy pośredniej przemiany cząsteczek zachodzą w wyniku oddziaływań z innymi cząsteczkami, które zaabsorbowały fotony (reakcje fotosensybilizowane) lub pod wpływem działania nietrwałych produktów (rodników) generowanych w reakcjach bezpośrednich innych substancji (reakcje fotokatalityczne). Fotodegradacja pośrednia jest powodowana reakcjami z rodnikami, np.  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_3$  czy  $\text{NO}_3$ . Dla przykładu, w wyniku reakcji z rodnikami  $\text{OH}^\bullet$  ponad 90% związków organicznych występujących w fazie gazowej w troposferze ulega przemianom chemicznym. Ilość rodników  $\text{OH}^\bullet$  i szybkość reakcji ze związkiem jest zależna od intensywności światła słonecznego oraz ich stężenia zarówno w  $\text{O}_3$ , jak i  $\text{H}_2\text{O}$  (Kot-Wasik, Dąbrowska, Namieśnik 2003).

Powstawanie rodników fotochemicznych można podzielić na następujące po sobie etapy: absorpcja fotonu przez cząsteczkę → zerwanie wiązania chemicznego cząsteczki przez promieniowanie o dostatecznej energii → tworzenie się wysoce reaktywnych form przejściowych – rodników ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{OOH}^\bullet$ ).

W związku z dwoma rodzajami fotolizy można również wyróżnić dwa typy reakcji: pierwotne i wtórne. Pierwotnymi reakcjami fotochemicznymi są reakcje bezpośrednie. Produkty pierwotne reakcji fotochemicznych zachowują na ogół dużą część energii wzbudzenia (uznaje się je za procesy adiabatyczne), w związku z czym są nietrwałe i łatwo reagują z innymi składnikami otoczenia. W reakcjach wtórnych produkt pierwotny lub produkty dalszych reakcji ulegają kolejnej reakcji fotochemicznej. Procesy fotochemiczne prowadzące do uzyskania trwałych produktów są zazwyczaj sumą reakcji pierwotnych i wtórnych.

Utleniacze, np. nadtlenuk wodoru, stosowane indywidualnie często okazują się zbyt słabe do skutecznej eliminacji trudno degradowalnych lub toksycznych zanieczyszczeń chemicznych. Z tego powodu bardzo dużą uwagę skupiają tzw. metody pogłębionego utleniania nazywane też metodami zaawansowanego utleniania AOP (Plant, Jeff 1994; Scott, Ollis 1995; Kowal 1996; Biń 1998, 2011; Nawrocki 1999; Barbusiński 2001; Kos, Perkowski, Ledakowicz 2001; Prousek 1996a, 1996b). Zainteresowanie zastosowaniem AOP do degradacji toksycznych zanieczyszczeń z wody i ścieków można zaobserwować od momentu, gdy okazało się, że proste ozonowanie wody wykazuje ograniczoną skuteczność degradacji bardziej złożonych związków, takich jak pestycydy, WWA, detergenty, barwniki, farmaceutyki itp.

Wspólną cechą AOP jest umożliwianie generowania rodników hydroksylowych  $\text{OH}^\bullet$ , które cechuje wysoka reaktywność, gdyż w środowisku wodnym wyróżniają się najwyższym potencjałem redoks (2,8 V) spośród typowych utleniaczy. Oddziałują one na niemal wszystkie skażenia organiczne, gdyż są nieselektywne i łatwo wchodzi z nimi w reakcje. Metody te są bardzo efektywne i wykorzystywane jako alternatywne sposoby oczyszczania w stosunku do metod konwencjonalnych (Legrini, Oliveros, Braun 1993; Nogueira, Guimarães 2000). Skala i zakres praktycznych zastosowań procesów zaawansowanego utleniania w oczyszczaniu wód są uzależnione od konieczności ochrony środowiska

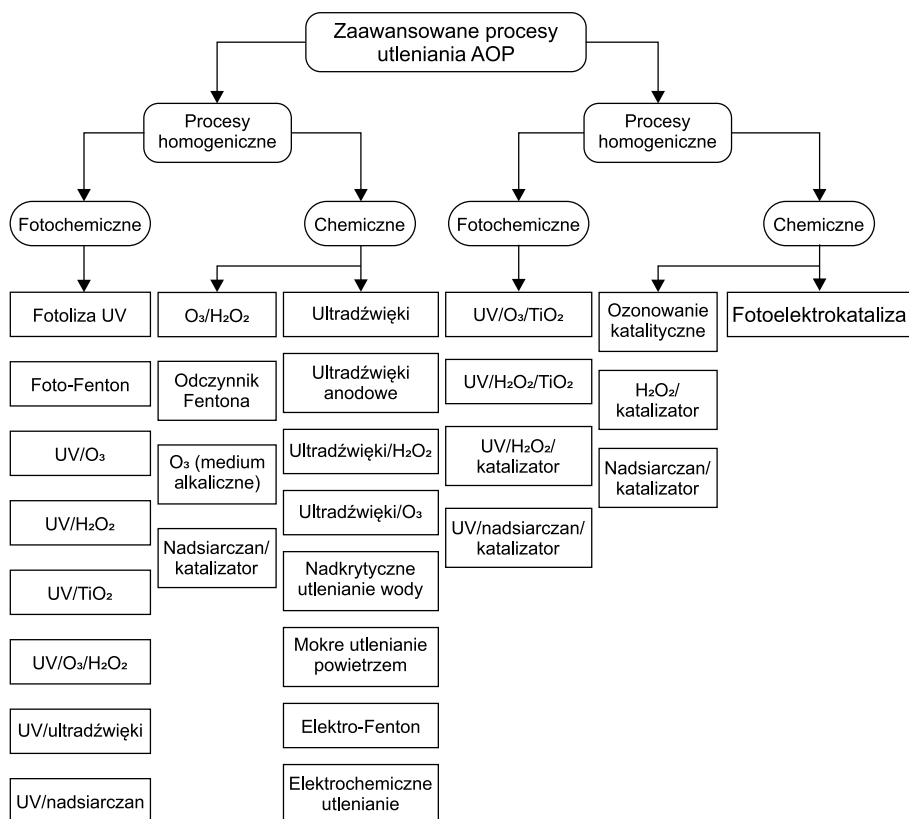
(eliminacja toksycznych zanieczyszczeń) oraz w znacznym stopniu – od względów ekonomicznych. Zawarte w wodach zanieczyszczenia mogą być toksyczne oraz niebiodegradowalne w naturalnych warunkach. Wymagają więc oczyszczenia, tzn. obniżenia do poziomu zgodnego z wymaganiami norm środowiskowych, wielkości kluczowych parametrów. Utlenianie chemiczne (szczególnie AOP) powinno służyć do degradacji niebiodegradowalnych i toksycznych zanieczyszczeń. Przy odpowiednim doborze metody utleniania możliwe jest uzyskanie zmian charakterystyki związków chemicznych zawartych początkowo w wodach – rozpad na prostsze związki i zmniejszenie pierwotnej toksyczności.

Większość fotochemicznych metod degradacji zalicza się do zaawansowanych procesów utleniania, które przebiegają pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze otoczenia oraz bazują na wysokiej reaktywności i wysokim potencjale utleniającym rodników hydroksylowych. AOP stosowane są w ochronie środowiska od ponad 30 lat (Glaze, Kang, Chapin 1987). Początkowo wykorzystywały one ozon, nadtlenek wodoru i promieniowanie UV oraz różne kombinacje tych trzech. Dzisiaj (2021) liczba metod klasyfikowanych jako AOP jest znacznie większa i obejmuje procesy fotokatalityczne, elektrochemiczne, wspomaganie ultradźwiękami (sonoliza), techniki plazmy niskotemperaturowej, napromieniowanie próżniowym ultrafioletem (VUV) i strumieniem elektronów oraz ich kombinacje (Oppenländer 2003). Procesów fotochemicznego utleniania przebiegających w natlenionych roztworach wodnych na drodze bezpośredniego działania promieniowania UV (VIS) na degradowany związek lub na drodze pośredniej z udziałem sensybilizatora nie zalicza się do AOP. Grupa AOP nie obejmuje tych procesów pomimo toku reakcji z udziałem organicznych rodników nadtlenkowych, rodnikoanionu ponadtlenkowego czy molekularnego tlenu singletowego, uważanych za reaktywne cząsteczki tlenowe (Blough, Zepp 1995).

Najważniejsze metody AOP stosowane w degradacji zanieczyszczeń środowiska wodnego to procesy z zastosowaniem:  $H_2O_2/UV$ ,  $H_2O/VUV$ ,  $TiO_2/UV$ ,  $O_3/UV$ ,  $Fe^{III}(Fe^{II})/H_2O_2/UV$ ,  $H_2O_2/sonoliza$ ,  $O_3/H_2O_2$ ,  $Fe^{II}/H_2O_2$ ,  $H_2O_2/\gamma$ ,  $\beta$ . Pierwszych pięć wymienionych procesów to procesy fotochemiczne. Szczególnie są one wykorzystywane do usuwania substancji szkodliwych ze środowiska wodnego (Esplugas i in. 2007; Gaya, Abdullah 2008; Liu, Kanjo, Mizutani 2009). Na rys. 20 przedstawiono podział i rodzaje procesów AOP.

Jednym z najpopularniejszych utleniaczy w AOP poza ozonem jest nadtlenek wodoru. W warunkach normalnych jest diamagnetyczną, lekko kwaśną cieczą o bardzo jasnoniebieskim zabarwieniu oraz gęstości i lepkości zbliżonej do wody (w zależności od stężenia  $H_2O_2$ ). Roztwory nadtlenku wodoru, również te o sporym stężeniu, z wyglądu przypominają czystą wodę. Czysty  $H_2O_2$  ma masę cząsteczkową równą 34,015. Najpowszechniej znany jest pod nazwą „woda utleniona”, czyli trzyprocentowy roztwór  $H_2O_2$ , używany m.in. do dezynfekcji ran czy przy rozjaśnianiu włosów. Często stosowane są roztwory

o jeszcze większym stężeniu, głównie w przemyśle, zwane perhydrolem (nazwa zastrzeżona handlowo), czyli trzydziestoprocentowy roztwór  $H_2O_2$ . Nazwa systematyczna nadtlenu wodoru według IUPAC to dioksydan. Należy on do substancji często spotykanych w przyrodzie, jednak zazwyczaj występuje w niskich stężeniach. Można go odnaleźć m.in. w komórkach żywych, także człowieka, jako tzw. reaktywna forma tlenu, pojawiająca się na skutek procesów oddychania oraz metabolizmu. Przy pH zbliżonym do obojętnego  $H_2O_2$  może być utleniaczem grup tiolowych, fenolowych, indolowych i innych. Bardzo niskie stężenia  $H_2O_2$  (rzędu ułamka  $mg/dm^3$ ) wykrywane są również w powietrzu, zwłaszcza po burzy z wyładowaniami atmosferycznymi. Substancja ta pojawia się także w wodach powierzchniowych (w wyniku reakcji zachodzących pod wpływem promieniowania słonecznego oraz tlenu atmosferycznego), gdzie być może odpowiada za ich lepszą jakość poprzez powstrzymywanie rozwoju bakterii beztlenowych (Rarata, Surmacz 2009).



**Rysunek 20.** Klasyfikacja metod oczyszczania środowiska wodnego na podstawie zaawansowanych procesów utleniania (AOP)

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Amor i in. 2019.

Nadtlenek wodoru miesza się z wodą w każdym stosunku, rozpuszcza się również w wielu rozpuszczalnikach organicznych. Praktycznie nie rozpuszcza się w rozpuszczalnikach niepolarnych (węglowodorowych), takich jak benzen czy eter naftowy. Czysty  $H_2O_2$  jest lepszym utleniaczem od anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ , anion rodniaka wodoronadtlenkowego), jednak posiada on stosunkowo niską reaktywność oraz jest obojętny elektrycznie.

Nadtlenek wodoru jako związek chemiczny jest wyjątkowy, gdyż zawiera atomy tlenu, których formalny stopień utlenienia wynosi  $-1$  ( $O^{-1}$ ). Tlen zaś powszechnie występuje na skrajnych stopniach utlenienia, tj.  $0$  ( $O^0$ ) lub  $-2$  ( $O^{-2}$ ). W takiej postaci  $H_2O_2$  powstaje w wyniku dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu:



Tlen w cząsteczce  $H_2O_2$  zajmuje pośredni stopień utlenienia ( $-1$ ), zatem związek ten można rozważać dwojako: jako częściowo utleniony, jak i zredukowany. Dlatego też  $H_2O_2$  dość łatwo ulega reakcji dysproporcjonowania.

Uwalniany w reakcji rozkładu tlen atomowy jest tym „właściwym” utleniaczem:



Powstający w powyższej reakcji tlen atomowy nazywany jest też rodnikiem tlenowym. Jest to atom, który ma jeden niesparowany elektron ( $O^{\cdot}$ ).  $30\%$   $H_2O_2$ , zawiera  $14,12\%$  aktywnego tlenu uwalnianego podczas jego rozkładu. Metoda  $H_2O_2/UV$  jest w głównej mierze źródłem rodników hydroksylowych, które są zdolne do wytworzenia innych reaktywnych cząsteczek tlenu na drodze reakcji ze związkami zanieczyszczającymi.

Zbadano, że w wypadku degradacji fotochemicznej jednego ze związków ropopochodnych, fenolu, przy użyciu  $H_2O_2/UV$  pojawiają się związki pośrednie, takie jak benzokwinon, hydrokwinon, katechol i rezorcyna (Wąsowski, Piotrowska 2002). Główną różnicą pomiędzy degradacją fotochemiczną i fotokatalityczną jest liczba produktów pośrednich. W przypadku rozkładu fotokatalitycznego z użyciem  $TiO_2$  liczba ta jest pomijalnie mała.

Fotokataliza jest reakcją katalityczną, której towarzyszy absorpcja promieniowania przez katalizator lub substrat. Fotokatalizatorami nazywane są substancje, które promują reakcje w obecności światła i nie są przy tym zużywane. Procesy fotochemiczne wykorzystują promieniowanie UV lub światło z zakresu widzialnego jako selektywny reagent zdolny do zainicjowania reakcji chemicznych. Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) fotokataliza jest procesem, w którym zmiana szybkości reakcji lub jej inicjacja zachodzą pod wpływem promieniowania UV, widzialnego lub

podczerwonego w obecności fotokatalizatora, który absorbuje światło i bierze udział w przemianie chemicznej substratów reakcji (IUPAC 2007).

Istnieją dwa rodzaje procesów fotokatalizy. Pierwszy z nich, nazywany fotoreakcją sensybilizowaną, występuje, gdy fotokatalizator zostaje wzbudzony przez promieniowanie o odpowiedniej energii, a następnie oddziałuje z reagentem znajdującym się w stanie podstawowym. Drugi typ reakcji to fotoreakcja katalizowana, która występuje, gdy promieniowanie wzbudza substraty, które następnie reagują z katalizatorem znajdującym się w stanie podstawowym.

Fotoreakcje katalizowane dzieli się na reakcje jednorodne (homogeniczne), które zachodzą całkowicie w jednej fazie (ciekłej, gazowej), oraz na niejednorodne, heterogeniczne, które przebiegają zawsze na granicy rozdziału faz. W heterogenicznym układzie fotokatalitycznym fotoindukowane przemiany cząsteczkowe lub reakcje zachodzą na powierzchni katalizatora. Fotokataliza heterogeniczna znajduje zastosowanie w wielu procesach. Pozwalają one na usuwanie zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych zarówno z fazy ciekłej, jak i gazowej. Degradacja fotokatalityczna znajduje coraz większą popularność w procesach oczyszczania ścieków i wód, które zawierają niewielkie ilości substancji trudno usuwalnych. Podstawową zaletą tego procesu są: możliwość utlenienia do ditlenku węgla, wody i jonów nieorganicznych nieszkodliwych dla środowiska niepożądanych szkodliwych związków chemicznych (całkowita mineralizacja), w większości przypadków niskie koszty, warunki reakcji w zakresach temperatur i ciśnień niewymagających dużych modyfikacji. Stosując światło słoneczne, można obniżyć koszty fotokatalizy, jednak stale trwają badania nad katalizatorem wydajnym w tym zakresie promieniowania (Liu i in. 2014).

Światło UV dostarcza fotony wymagane do przeskoku elektronu z pasma walencyjnego do pasma przewodzenia fotokatalizatora. Wpływ zarówno długości fali, jak i natężenia światła jest znamienny w procesie fotokatalitycznym. Przy niewielkich natężeniach światła wraz z jego wzrostem szybkość fotokatalitycznej degradacji rośnie liniowo. Przy dużych natężeniach promieniowania padającego jego dalsze zwiększanie nie powoduje już istotnej zmiany szybkości fotodegradacji.

Fotokatalizatorami mogą być substancje, które są zdolne do inicjowania reakcji w obecności światła i nie są przy tym zużywane. Dobry fotokatalizator jest fotoaktywny i zdolny do wykorzystania światła widzialnego i/lub bliskiego UV, obojętny biologicznie i chemicznie, fotostabilny (nieulegający fotokorozji), niedrogi, nietoksyczny. Do najbardziej popularnych związków stosowanych w procesach fotokatalitycznych należą  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  oraz  $\text{ZnS}$ .

Ditlenek tytanu jest powszechnie stosowanym związkiem w wielu gałęziach przemysłu: kosmetycznym, malarskim, motoryzacyjnym, medycznym, lotniczym itd. (Carp, Huisman, Reller 2004). Wykorzystuje się go do oczyszczania wody, powietrza oraz sterylizacji (inaktywacji bakterii i mikroorganizmów).

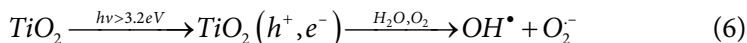


Bardzo dobrze sprawdza się m.in. w procesach usuwania barwników oraz pochodnych fenoli ze ścieków przemysłowych, które stanowią szczególne zagrożenie dla środowiska i organizmów wodnych (Tayade i in. 2007; Yang i in. 2014). W środowisku wodnym jako fotokatalizator procesów degradacji zanieczyszczeń najpowszechniej stosowany jest właśnie ten związek.

Głównymi zaletami tlenku tytanu (IV) są takie cechy, jak stabilność fotochemiczna i chemiczna, bierność biologiczna, a przede wszystkim nietoksyczność dla środowiska i człowieka. Istotny jest fakt, że produkcja  $\text{TiO}_2$  jest prosta i nie generuje wysokich kosztów (Robertson 1996). Półprzewodnik ten jest substancją stałą o barwie białej, nierozpuszczalną w wodzie.  $\text{TiO}_2$  wykazuje niską absorpcję światła z zakresu widzialnego, natomiast aktywowany jest promieniowaniem z zakresu bliskiego UV o długości fali wzbudzającej do 388 nm (Oppenländer 2003). Wynika to z faktu, że związek ten ma wysoką wartość przerwy energetycznej.  $\text{TiO}_2$  występuje naturalnie w trzech formach polimorficznych: anatazowej, rutyłowej i brukitowej, z przerwami energetycznymi odpowiednio: 3,2 eV, 3,0 eV i ~3,2 eV. Rutyl jest formą najbardziej znaną i stabilną termodynamicznie. Atanaz wykazuje wyższą aktywność fotokatalityczną w porównaniu z pozostałymi formami ditlenku tytanu (Pelaez i in. 2012; Banerjee i in. 2014). Ładunki, które wytwarzane są na powierzchni  $\text{TiO}_2$ , wykazują silne właściwości utleniające oraz redukujące (Van Gerven i in. 2007). Wartości potencjałów krawędzi pasm są odpowiednie do generowania reaktywnych form tlenu: utleniania wody do rodnika hydroksylogowego lub redukcji tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego. Udokumentowano, że ditlenek tytanu ma wysoką stabilność chemiczną i może być ponownie użyty po oddzieleniu go od mieszaniny reakcyjnej. Badania wskazują, że istnieje możliwość pięciokrotnego wykorzystania  $\text{TiO}_2$  w procesie fotokatalitycznego utleniania bez obniżenia efektywności procesu (Suryaman i in. 2009).

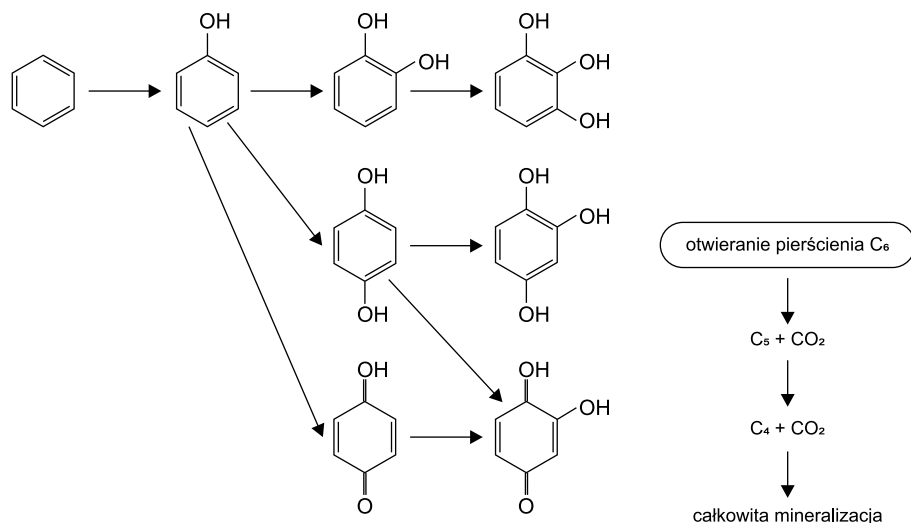
Podczas naświetlania fotokatalizatora półprzewodnikowego, takiego jak  $\text{TiO}_2$ , generowane są ładunki, które na powierzchni mogą reagować z zaadsorbowanymi zanieczyszczeniami, tlenem lub wodą. Reakcje redoks  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  dają początek reaktywnym formom tlenu (np. anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylogowego), które następnie utleniają zanieczyszczenia organiczne. Tworzenie rodników hydroksylogowych odbywa się na drodze silnego pochłaniania promieniowania UV (Jones, Egerton 2000). Ditlenek tytanu odznacza się wysokim potencjałem utleniającym fotogenerowanych dziur wynoszącym +2,53 V w stosunku do standardowej elektrody wodorowej (SHE) w roztworze o pH=7. W reakcji fotogenerowanych dziur z cząsteczkami wody mogą powstawać rodniki hydroksylogowe ( $\text{OH}^\cdot$ ), których potencjał utleniający jest tylko nieznacznie niższy. Dzieje się tak, gdy na powierzchni  $\text{TiO}_2$  fotowzbudzona dziura pasma walencyjnego ( $h^+_{\text{vb}}$ ) zostaje uwięziona, co prowadzi do powstania uwięzionych dziur ( $h^+_{\text{tr}}$ ), które nie utleniają wody. Potencjał redoks elektronów pasma przewodnictwa wynosi -0,52 V, co jest wartością wystarczającą do redukcji

cząsteczki tlenu do  $O^{2-}$  lub do  $H_2O_2$ . W zależności od panujących warunków zasadniczą rolę w mechanizmie reakcji fotokatalitycznej odgrywają dziury  $h^+$ , rodniki  $OH^\cdot$ ,  $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$  lub  $O_2$  (Fujishima, Zhang 2006). W uproszczony sposób schemat powstawania wolnych rodników można przedstawić następująco:



Reakcje fotokatalizy półprzewodnikowej z wykorzystaniem ditlenku tytanu zostały szerzej opisane w literaturze (Chen 2016; Kohtani, Kawashima, Miyabe, 2017). Obejmują one zmiatanie wolnych rodników (ang. *trapping*), adsorpcję zanieczyszczenia organicznego i fotogenerowanych produktów pośrednich, atak rodnika hydroksylowego na wyjściowy związek organiczny z wytworzeniem produktów pośrednich, atak rodnika hydroksylowego na produkty pośrednie z wytworzeniem innych produktów pośrednich oraz inne reakcje.

Fotodegradacja każdej substancji organicznej zachodzi z wytworzeniem związków pośrednich powstających w wyniku ataku  $OH^\cdot$ . Na rys. 21 przedstawiono fotodegradację benzenu, związku o najprostszej budowie z grupy węglowodorów pierścieniowych.



**Rysunek 21.** Ścieżka fotodegradacji benzenu

Źródło: Suegara i in. 2005.

Reakcje fotolizy z udziałem WWA są podobne do reakcji w procesach biodegradacji (tj. WWA rozkładają się skuteczniej, gdy są w fazie gazowej lub w fazie ciekłej) (Finlayson-Pitts Jr, Pitts 1997). Fotodegradacja w mniejszym stopniu występuje również wtedy, gdy WWA są zaadsorbowane na cząstkach w atmosferze lub w glebie. Reakcje te przebiegają skuteczniej wraz ze wzrostem

powierzchni cząstek. Reakcje fotolizy są również silniejsze na jasnych cząstkach, takich jak żel krzemionkowy lub tlenek glinu, niż na ciemniejszych, takich jak sadza. Na przykład antracen ma okres półtrwania 30 min. na tlenku glinu, natomiast na sadzy ponad 12 dni (Thomas, Ronald 1985).

Podobnie jak w przypadku degradacji mikrobiologicznej reakcje fotodegradacji w dużym stopniu zależą od struktury degradowanych węglowodorów ropopochodnych. Ogólnie liniowe, 2-pierścieniowe i niektóre WWA zawierające połączenia benzenowe w ułożeniu klastrowym ulegają szybkiej degradacji w bezpośrednim świetle. Najwolniej rozkładają się związki z ułożeniem kątowym pierścieni (np. fenantren i dibenz(a,h)antracen). Dzieje się tak głównie dlatego, że są to najbardziej stabilne strukturalnie cząsteczki (Korfmacher i in. 1980). Ponadto fotoliza wydaje się bardziej skuteczna w przypadku związków o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak naftalen, ponieważ związki te są bardziej biodostępne i będą miały dłuższy czas ekspozycji na światło słoneczne (tamże). Cząsteczki WWA zaadsorbowane na cząstkach popiołu lotnego mogą osadzać się wewnątrz struktury porów popiołu. Część WWA zostaje przez to osłonięta przed światłem, co zapobiega zachodzeniu reakcji fotolitycznych (Niu, Sun, Schramm 2007).

Związki aromatyczne ulegające procesom fotodegradacji wytwarzają produkty pośrednie zawierające dwie–trzy grupy hydroksylowe. Przyłączenie tych grup nie wywołuje jednak rozerwania pierścienia aromatycznego. Badania wskazują na brak obecności węglowodorów alifatycznych, z czego można wnioskować, że otwarty pierścień podlega bardzo szybko mineralizacji (Xie i in. 2011). Grupy podstawnikowe, jak np.  $\text{NO}_2$  i  $\text{COOH}$ , nie są podstawiane przez grupy  $\text{OH}$  aż do momentu rozerwania pierścienia.

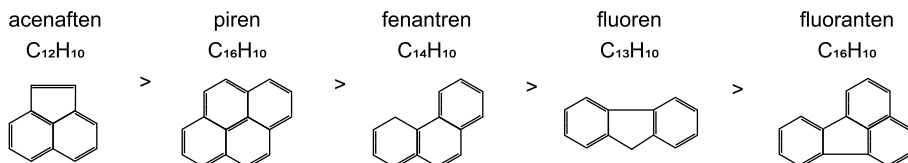
Na powierzchni fotokatalizatora zachodzi reakcja redoks. Utlenianie związku przebiega na skutek ataku rodnika hydroksylowego, równocześnie redukowany jest tlen. Atak rodników  $\text{OH}^\bullet$  w przypadku związków aromatycznych zachodzi w położeniach *meta*, *orto* i *para*. Determinowane jest to istniejącymi grupami funkcyjnymi przyłączonymi do pierścienia.

Węglowodory aromatyczne pod wpływem światła oraz tlenu stosunkowo łatwo ulegają reakcjom fotochemicznym, tworząc związki epoksydowe, chinony, diole, fenole i aldehydy oraz pochodne zawierające azot w pierścieniu, np.: 1,5-dihydroksynaftalen, karbazol, akrydynę, 9-fluorenon, 9-hydroksyfenantren, 4-hydroksyakrydynę, ksanton, antrachinon, 1,8-dihydroksyantrachinon, 1-nitropiren. Im większa liczba skondensowanych pierścieni w cząsteczce WWA, tym łatwiej się ona utlenia (Nakamiya i in. 2004).

W badaniach (Miller 2011) wyznaczano szybkość degradacji związków benzo(a)pirenu, chryzenu oraz fluorantenu, stosując różne dawki nadtlenu wodoru. Szybkość ta była jednakowa dla wszystkich trzech związków, a najkorzystniejsza występowała dla stężeń  $\text{H}_2\text{O}_2$  w przedziale  $0,001 \text{ mol/dm}^3$  do  $0,05 \text{ mol/dm}^3$ . Podobne wartości prędkości reakcji w zależności od stężeń

$H_2O_2$  zostały uzyskane także wcześniej, w pracy Binia i Zielińskiego (2000). W pracy Dąbek i Oziminy (2009) stężenie  $H_2O_2$  na poziomie  $500 \text{ mg/dm}^3$  również dało bardzo dobre rezultaty. Udział bezpośredniej fotolizy w procesie rozkładu węglowodorów ropopochodnych zależy od początkowego stężenia nadtlenu i wraz ze wzrostem tego stężenia zmniejsza się do kilku procent. Wpływ odczynu roztworu reakcyjnego na szybkość procesu zbadano również dla trzech wartości pH: kwaśnego, obojętnego i zasadowego. Degradacja toksycznych związków następowała najszybciej w odczynie kwaśnym i porównywalnie szybko w obojętnym.

WWA ulegają degradacji pod wpływem promieniowania UV z zakresu 10–400 nm i promieniowania gamma o długości fali mniejszej od 124 pm (Cataldo, Keheyan 2006). Z tego powodu utrzymuje się, że fotodegradacja oraz utlenianie, a także ich połączenie są najefektywniejszymi metodami rozkładu WWA (Dugay i in. 2002; Włodarczyk-Makuła, Obstój 2013). Fotodegradacja wybranych WWA w wodach została zbadana pod wpływem światła z lampy ksenonowej (Xia i in. 2009). Można uszeregować zbadane węglowodory ze względu na stopień usunięcia ze środowiska wodnego następująco:



Określono, że rozkład acenaftenu przebiega najszybciej, następnie fluorenu, fenantrenu, fluorantenu i najdłużej pirenu. Reakcje fotodegradacji zależą zatem w dużym stopniu od struktury WWA. Ogólnie rzecz biorąc, liniowe, dwupierścieniowe i niektóre grupy WWA ulegają szybkiej degradacji przy działaniu bezpośredniego światła. Skośne WWA (np. fenantren i dibenz(a,h)antracen) ulegają najwolniej degradacji. Spowodowane jest to głównie faktem, że mają one najbardziej strukturalnie stabilne cząsteczki. Ponadto fotoliza wydaje się bardziej skuteczna dla związków o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak naphalen, ponieważ związki te są bardziej biodostępne i będą miały dłuższe czasy ekspozycji na światło słoneczne (Korfmacher i in. 1980).

Naświetlanie promieniami UV wykorzystywano w badaniach nad rozkładem WWA zaadsorbowanych na cząstkach popiołów lotnych. Skuteczność fotodegradacji obniżała się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej WWA. Naświetlanie UV-B intensyfikowało proces fotodegradacji (Niu, Sun, Schramm 2007).

Badania utleniania wybranych WWA z wykorzystaniem ditlenku wodoru, ozonu oraz promieniowania ultrafioletowego przeprowadzono w kontekście toksyczności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i produktów ich rozkładu (Jamroz i in. 2002). Stwierdzono, że podczas procesów

fotchemicznych powstawały produkty pośrednie wykazujące toksyczność na wybrane bioindykatory. Największą toksycznością wykazały się substancje, które powstawały w trakcie procesów degradacji węglowodorów z użyciem  $H_2O_2$ . Utlenianie chemiczne wydaje się marginalnym mechanizmem degradacji TPH w większości warunków środowiskowych. W przypadku utleniania chemicznego, naturalnie lub w ramach technologii oczyszczania (Abdel-Shafy, Mansour 2013), szybkość utleniania węglowodorów zależy od wielu właściwości układu: masy cząsteczkowej i struktury związku, obecności pierścieni, jego stanu skupienia, temperatury, siły utleniacza. Stwierdzono, że obróbka chemiczna i/lub obróbka fizyczna mogą skutecznie usunąć WWA z wód powierzchniowych (Moursy, Abdel-Shafy 1983). Wykazano, że fluoranten był najbardziej stabilnym z WWA badanych pod kątem utleniania przez ozon (Alebic-Juretic, Cvitas, Klasinc 1990). Zhang i in. (2008) przedstawili synergiczny efekt napromieniowania UV i katalizy  $TiO_2$  lub  $ZnO$  jako skuteczny w degradacji WWA w zanieczyszczonej glebie (Hassan i in. 2015). W celu zwiększenia fotodegradacji pirenu pod wpływem promieniowania UV użyto tlenków żelaza i kwasu szczawiowego, które mogą tworzyć układy podobne do tych, w których występują procesy Fentona, jednak bez udziału dodatkowego  $H_2O_2$ , (Wang i in. 2009). Badano również sonochemiczną degradację WWA przy użyciu ultradźwięków o wysokiej częstotliwości (Wang, Chen, Yao 2003; Manariotis, Karapanagioti, Chrysikopoulo 2011).

Procesy degradacji z udziałem występujących w warstwach powierzchniowych zbiorników wodnych naturalnych substancji o charakterze sensybilizatorów przyczyniają się do rozkładu materiału organicznego. Jednocześnie one same jako część tej materii ulegają przemianom. Zanieczyszczenia wprowadzone do środowiska również ulegają procesom degradacji. Fotosensybilizacja w napowietrzonych roztworach wodnych umożliwia wytwarzanie reaktywnych form tlenu, takich jak molekularny tlen singletowy, rodniko-anion ponadtlenkowy, a także rodniki hydroksylowe czy rodniki organiczne, mających znaczenie w procesach degradacji. Reagenty te mogą powstawać w trakcie napromieniowania UV roztworów zawierających związki organiczne. Przykładem są tu niektóre WWA zdolne do generowania molekularnego tlenu singletowego.

W naturalnych wodach powierzchniowych pod wpływem promieniowania słonecznego wytwarzane są reaktywne cząsteczki tlenu na drodze reakcji ze związkami zanieczyszczającymi. Dzieje się to głównie dzięki obecności rozpuszczonej materii organicznej o właściwościach sensybilizujących. Molekularnemu tlenu singletowemu w wodach powierzchniowych towarzyszą również produkty fotochemicznego przeniesienia elektronu: rodniko-anion ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru. Występowanie tych reaktywnych form tlenu zaobserwowano także w wodach morskich (Blough, Zepp 1995; Clark, De Bruyn, Jones 2009).

W środowisku wodnym procesy fotolizy bezpośredniej i pośredniej występują obok siebie w tym samym czasie. Reakcje fotochemiczne są przyspieszane

obecnością mikroorganizmów, alg czy substancji humusowych na skutek ich zdolności do pochłaniania promieniowania słonecznego. Większość związków z grupy WWA ulega fotolizie znacznie szybciej w obecności alg (Zepp, Schlotzhauer 1983). Również niejonowe związki organiczne, zwłaszcza pestycydy, ulegają fotodegradacji dużo szybciej w obecności mikroorganizmów (Sinkkonen, Paasivirta 2000). Procesy fotochemicznej degradacji zachodzą w naturalnych wodach powierzchniowych razem z procesami biologicznymi, wzajemnie się uzupełniając, prowadzą do skutecznej eliminacji zanieczyszczeń ze środowiska wodnego. Dzieje się tak jednak do pewnego poziomu stężeń, powyżej którego równowaga procesów biologiczno-fotochemicznych ulega załamaniu.

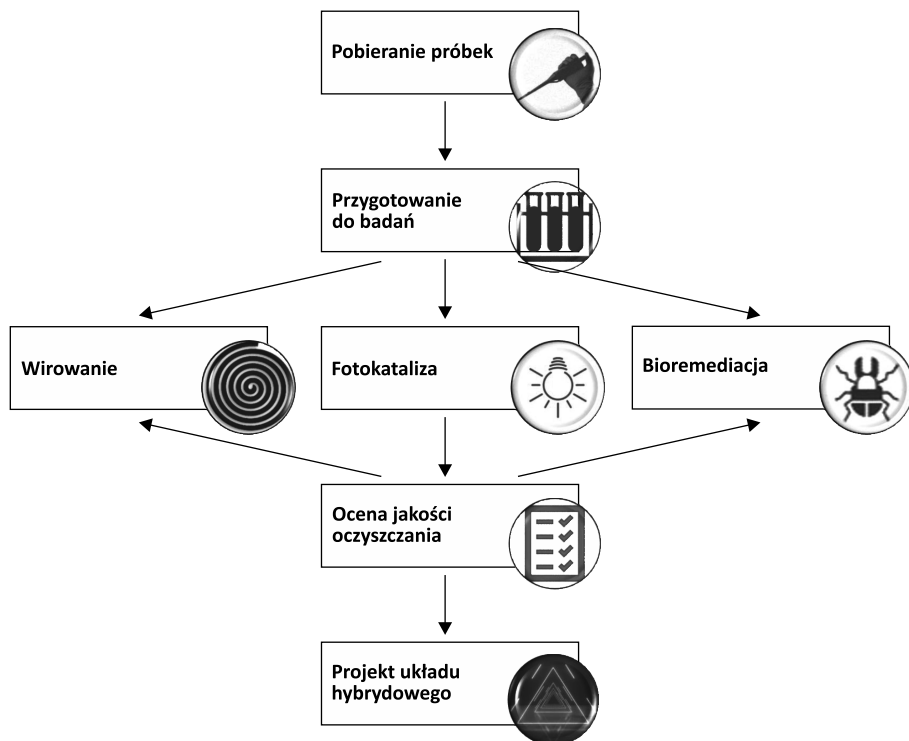
Wykorzystanie obecnych w przyrodzie sensybilizatorów w badaniach nad degradacją naturalnego materiału organicznego oraz antropogenicznych zanieczyszczeń jest zagadnieniem poruszonym w wielu interesujących pracach (Zhan i in. 2006; Pajares i in. 2010; Shen, Ji 2010). Bez wątpienia są one źródłem lepszego poznania procesów samooczyszczania wód, a także inspiracją do praktycznego wykorzystania tych procesów.

## 5. Ocena zmian jakości wody podczas procesu oczyszczania

Ocenę jakości wód w kwestii zanieczyszczenia substancjami ropopochodnymi odniesiono do Rozporządzenia Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej (Dz.U. z 2019 r. poz. 1747), a jako wskaźnik jakości wody przyjęto wskaźnik całkowitej zawartości węglowodorów ropopochodnych (wskaźnik TPH). Jako maksymalną dopuszczalną wartość wybranego wskaźnika określono na 0,05 mg/l, zgodnie z ustaleniami powyższego rozporządzenia dla kategorii wody A1 (najlepszej).

W procesie oczyszczania wód z substancji ropopochodnych zastosowano hybrydowy układ składający się z mechanicznego etapu oczyszczania za pomocą odwirowania oraz mikrobiologicznej remediacji w środowisku wodnym i procesów fotolitycznych. Jakość wód oceniano po każdym etapie oraz podczas różnych warunków prowadzenia procesów jednostkowych. W procesach bioremediacji posługiwano się mikroorganizmami obecnymi naturalnie w środowisku, gdzie wykazano zanieczyszczenie substancjami ropopochodnymi – badano skuteczność bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.

Rys. 22 schematycznie przedstawia procedurę badawczą od pobrania próbek ze środowiska, poprzez ich przygotowanie do poszczególnych badań, następnie wykorzystane metody usuwania substancji ropopochodnych, ocenę skuteczności oczyszczania na poszczególnych etapach, aż po zaprojektowanie układu hybrydowego.



**Rysunek 22.** Schemat postępowania badawczego

Źródło: opracowanie własne.

## 5.1. Metodyka badań i wykorzystane materiały

Materiał badawczy w badaniach empirycznych stanowiły:

- wody zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi pochodzącymi z benzyny, oleju mineralnego, węglowodorami ze spalania paliw ciekłych;
- stojące wody śródlądowe na terenie miasta Krakowa wykorzystywane w celach rekreacyjnych, zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi.

Wykonane badania były ukierunkowane na określenie wpływu warunków reakcyjnych na szybkość, efektywność i ekologiczność procesu oczyszczenia. Dotyczyły zarówno próbek środowiskowych, jak i modelowych. Obejmowały one określenie wpływu odczynu środowiska reakcyjnego, stężenia zanieczyszczeń, mocy i zakresu spektralnego stosowanego promieniowania, a także – w odpowiednich procesach – stężenia nadtlenu wodoru i wybranego fotokatalizatora (dwutlenku tytanu) oraz oceny przydatności bakterii *Pseudomonas aeruginosa* wyodrębnionej z próbek środowiskowych do bioremediacji substancji ropopochodnych.



Badania laboratoryjne obejmowały wykonanie testów analizujących:

- efektywność separacji badanych węglowodorów ropopochodnych w procesach odwirowania w funkcji czasu wirowania, prędkości obrotowej wirówki, temperatury próbki, wyjściowego stężenia TPH w wodzie;
- szybkość rozkładu i/lub efektywność usuwania wybranych węglowodorów ropopochodnych przez mikroorganizmy *Pseudomonas aeruginosa*;
- szybkość rozkładu i efektywność usuwania wybranych węglowodorów ropopochodnych w procesach utleniania wykorzystujących nadtlenuki wodoru i ditlenek tytanu oraz promieniowanie UV.

Testy laboratoryjne objęły również test dynamiczny obrazujący szybkość i zdolność rozkładu tych węglowodorów przy zmiennych parametrach fizykochemicznych panujących w układzie z katalizatorem reakcji utleniania w postaci  $TiO_2$ .

Badania podzielono na trzy etapy, w których wykorzystane zostały narzędzia i metody badawcze przedstawione w tabeli 11.

**Tabela 11.** Metody i narzędzia badawcze na poszczególnych etapach badań

Etap badań	Metody i techniki badawcze	Narzędzia badawcze
Badanie skuteczności odwirowania	<ul style="list-style-type: none"> <li>– spektroskopia fluorescencyjna,</li> <li>– odwirowanie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– spektrofluorymetr modułowy MSF 101,</li> <li>– fluorymetr FLUORAT®-02,</li> <li>– układ stabilizacji temperatury z wykorzystaniem termostatu Haake,</li> <li>– wirówka laboratoryjna.</li> </ul>
Badanie skuteczności procesów fotokatalitycznych na degradację związków ropopochodnych	<ul style="list-style-type: none"> <li>– zaawansowane procesy utleniania (AOP),</li> <li>– spektroskopia fluorescencyjna,</li> <li>– spektroskopia absorpcyjna.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– lampa ksenonowa o mocy 200 W,</li> <li>– spektrofluorymetr modułowy MSF 101,</li> <li>– fluorymetr FLUORAT®-02,</li> <li>– spektrofotometr UV/Vis Perkin Elmer Lambda BIO,</li> <li>– akty prawne, normy przedmiotowe.</li> </ul>
Badanie skuteczności bioremediacji na degradację związków ropopochodnych	<ul style="list-style-type: none"> <li>– spektroskopia fluorescencyjna,</li> <li>– spektroskopia absorpcyjna,</li> <li>– hodowla bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– spektrofluorymetr modułowy MSF 101,</li> <li>– spektrofotometr UV/Vis Perkin Elmer Lambda BIO,</li> <li>– układ stabilizacji temperatury z wykorzystaniem termostatu Haake,</li> <li>– akty prawne, normy przedmiotowe.</li> </ul>

Źródło: opracowanie własne.

Szczegółowo metodykę badań każdego z etapów opisano w kolejnych podrozdziałach.

### 5.1.1. Gromadzenie środowiskowych próbek wody

Pobór próbek stanowi ważny element w całym procesie badania jakości wody. Od momentu pobrania do wykonania badań próbki wód mogą zmieniać swoje właściwości. Naturalne procesy degradacji mogą wpływać na skład pobieranych próbek środowiskowych. Przed etapem oznaczeń końcowych reakcje związane z remediacją mogą w istotny sposób utrudnić interpretację uzyskiwanych wyników. Znajomość tych procesów może istotnie wpłynąć na efektywność technologii remediacyjnych oraz osłabiać lub zupełnie eliminować ich wpływ na wyniki badań. W przypadku związków organicznych z grupy WWA należy wziąć pod uwagę, że mogą one adsorbować się na ściankach naczynia lub na cząstkach fazy stałej w zawiesinie. Adsorpcja substancji związana jest z ich rozpuszczalnością w wodzie oraz wartością współczynnika podziału oktanol-woda. Im większa jest zdolność związku do sorpcji na cząstkach fazy stałej, tym wartość współczynnika podziału ma większą wartość (Manoli, Samara 1999; Kot, Morawska, Namieśnik 2001). Na skutek kontaktu pobranej próbki analitycznej z powietrzem lub jej oddziaływania z fazą gazową może również dochodzić do niepożądanych procesów odparowywania lotnych substancji, takich jak fenole.

Próbki wody zostały pobrane ze zbiornika wodnego Bagry wykorzystywanego sezonowo w celach rekreacyjnych jako kąpielisko, a także jako miejsce do żeglugi i rekreacji motorowodnej. Pobór próbek do analiz zawartości TPH w poszczególnych punktach zbiornika odbywał się w oddaleniu o kilka metrów od linii brzegowej, gdzie głębokość słupa wody wynosiła około jednego metra, z głębokości pięciu do dziesięciu centymetrów poniżej powierzchni wody. Do tego celu wykorzystano zakręcane butelki ze szkła bursztynowego o pojemności jednego litra każdy. Każdą z butelek przepłukiwano kilkakrotnie przed pobraniem próbki właściwej. Na każdej zostały zawarte informacje dotyczące miejsca/punktu poboru, dnia, godziny poboru oraz objętości próbki. Czas przechowywania wody do momentu rozpoczęcia badań w żadnym z przypadków nie przekraczał ośmiu godzin (Hounslow 1995). Bezpośrednio po przewiezieniu do laboratorium próbki wody zostały podzielone na objętości 100 cm<sup>3</sup> i przeniesione do rozdzielacza o pojemności 250 ml. Szkło, w którym przechowywane były próbki wody, przepłukano 10 cm<sup>3</sup> n-heksanu. Heksan przelano do rozdzielacza i energicznie wstrząsano nim przez co najmniej minutę. Następnie warstwy zostały rozdzielone. Końcowe ekstrakty substancji ropopochodnych w n-heksanie analizowane były metodą spektroskopii fluorescencyjnej w UV w celu określenia stężenia rozpuszczonych TPH.

Wodę z wybranych punktów poboru próbek przebadano równocześnie pod kątem obecności bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Próbki wody do analiz zawartości bakterii *Pseudomonas aeruginosa* pobrano zgodnie z normą ISO 19458:2007. Wodę zebrano do sterylnych butelek o pojemności 100 ml

zawierających specjalne podłoże do wzrostu bakterii chronione w Europie tajemnicą handlową (Pseudalert®) oraz do sterylnych butelek z bursztynowego szkła. W celu pobrania próbki zakręconą butelkę wprowadzano pod wodę na głębokość około 10 cm. Następnie napełniano butelkę, odkręcając ją i odwracając bokiem, następnie zakręcano i wyciągano na wierzch. Próbki transportowano w ciemnych pojemnikach wypełnionych lodem, w których panowała temperatura około 3°C. Próbki dostarczano do laboratorium w jak najkrótszym czasie, nieprzekraczającym trzech godzin.

### 5.1.2. Stosowane odczynniki chemiczne

W badaniach laboratoryjnych wykorzystane zostały przedstawione poniżej związki chemiczne. Ich wybór podyktowany był koniecznością prowadzenia badań w zgodzie z normami wymienionymi w tej książce oraz informacjami płynącymi z literatury naukowej dotyczącymi pożądanymi właściwościami badanych związków.

- związki chemiczne do preparatyki koloidów i warstw fotokatalizatorów: komercyjny tlenek tytanu (IV)  $\text{TiO}_2$  cz.d.a. – P.P.H. Stanlab Sp. J.; Propanol-2 (alkohol izopropylowy) cz. – Eurochem BGD Sp. z o.o.; woda destylowana;
- zanieczyszczenie modelowe poddane degradacji: olej półsyntetyczny do silników dwusuwowych Sil-Oil (klasa jakości: API-TC, JASO-FC, ISO-L-EGC); benzyna Pb95 ze stacji LukOil;
- związki chemiczne do oznaczeń analitycznych: n-heksan 99% cz.d.a – POCH Basic; wzorzec TPH w n-heksanie; woda destylowana; odczynnik Pseudalert® – IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA;
- ekstrakt z *Sapindus Mukorossi* w stężeniu 0,05g/dm<sup>3</sup>.

### 5.1.3. Charakterystyka fluorymetrycznej metody oznaczania substancji ropopochodnych w wodzie

Metoda fluorymetryczna wykorzystana do badań opisanych w tej książce jest regulowana w Federacji Rosyjskiej przez dokument o numerze ПНД/Ф 14.1: 2: 4.128-98 dotyczący ochrony środowiska. Do pomiaru intensywności fluorescencji zastosowano fluorymetryczny analizator cieczy FLUORAT®-02. Za pomocą spektrofotometrii fluorescencyjnej w UV analizowane były ekstrakty TPH w n-heksanie.

Omawianą metodę fluorymetryczną można stosować dla stężeń produktów ropopochodnych w wodzie w zakresie od 0,005 do 50,0 mg/dm<sup>3</sup>. Błąd względny w otrzymanych wynikach (przy P równym 0,95 [ $\delta$ , %]) wynosi od 25 do 50% dla różnych stężeń. Zakresy błędów przedstawione zostały w tabeli 12. Dotyczą one analizy próbek bez ich rozcieńczenia lub zatężenia. Na błędy powstające przy oznaczeniach spektroskopii fluorescencyjnej wpływ mają obecne w roztworze substancje towarzyszące, które mają zdolność absorpcji promieniowania

i fluorescencji lub wygaszania fluorescencji. Istotny wpływ na natężenie promieniowania fluorescencyjnego ma również temperatura (fluorescencja maleje wraz z jej wzrostem), rodzaj rozpuszczalnika i pH roztworu.

**Tabela 12.** Błąd metody fluorymetrycznej przy prawdopodobieństwie  $P = 95\%$

Mierzona wartość	Masowe stężenie produktów ropopochodnych TPH
Granice pomiaru, mg/dm <sup>3</sup>	0,005–50,0
Charakterystyka błędu względnego ( $\delta$ , %)	dla 0,005–0,010 mg/dm <sup>3</sup> → $\delta = 50\%$ , dla 0,010–0,50 mg/dm <sup>3</sup> → $\delta = 35\%$ , dla 0,50–50 mg/dm <sup>3</sup> → $\delta = 25\%$

Źródło: certyfikat urządzenia FLUORAT®-02.

Istotą techniki fluorymetrycznej opisanej w tej książce była dehydratacja produktów ropopochodnych, a następnie ich ekstrakcja z wody za pomocą n-heksanu, następnie oczyszczanie uzyskanego ekstraktu (w przypadku takiej konieczności) i ostatecznie pomiar natężenia fluorescencji ekstraktu. Procedura ekstrakcji została przeprowadzona zgodnie z metodyką opracowaną przez Lumex Ltd. M 01–5-2007, na podstawie GOST R 51797–2001 (ГОСТ Р 51797–2001, 2001).

Metoda opisana powyżej wykorzystywana była we wszystkich oznaczeniach TPH, chyba że zostało zaznaczone inaczej. Badania przeprowadzono w Katedrze Metrologii i Analizy Instrumentalnej na Wydziale Towaroznawstwa i Zarządzania Produktem Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie.

Do badań zawartości TPH w wodzie zastosowano wzorzec ГСО 7950–2001 (ЛЮМ-НИИ). Dokument Federalny Federacji Rosyjskiej o numerze ПНД Ф 14.1: 2: 4.128-98 dotyczący ochrony środowiska przyjmuje ten wzorzec jako właściwy dla ilościowej analizy chemicznej wód i przeprowadzania pomiarów stężenia masowego produktów ropopochodnych w próbkach wód naturalnych i pitnych metodą fluorymetryczną na analizatorze cieczy FLUORAT®-02. Wzorzec jest zgodny z wymaganiami GOST 8.315-97 i ma certyfikat Federalnej Agencji ds. Regulacji Technicznych i Metrologii. Przeznaczony jest do prowadzenia badań roztworów produktów ropopochodnych ekstrahowanych w n-heksanie lub cyklo-heksanie w celu kalibracji chromatografów i innych przyrządów pomiarowych, certyfikacji technik pomiarowych i kontroli błędów technik pomiarowych. Użyty wzorzec jest roztworem oleju turbinowego T-22 zgodnie z normą GOST 32–74 lub oleju przemysłowego I-40A zgodnie z normą GOST 20799–88 w n-heksanie. Stężenie oleju w n-heksanie to 1 mg/cm<sup>3</sup>.

Olej i jego pochodne są nietrwałymi mieszaninami węglowodorów nasyconych i nienasyconych, a także ich pochodnymi różnego rodzaju. Hydrochemia umownie traktuje pojęcie „produktów ropopochodnych”, ograniczając je jedynie do węglowodorów alifatycznych, aromatycznych i acyklicznych, które

stanowią główną i najbardziej powszechną część oleju i jego składników uwalnianych w procesie rafinacji. W praktyce międzynarodowej, jak też i w Polsce, występuje termin „indeks oleju mineralnego” odnoszący się do zawartości produktów ropopochodnych w wodzie. Zgodnie z normą PN-EN ISO 9377-2 indeks oleju mineralnego obejmuje swoim zakresem sumę stężeń związków, które można oddzielić rozpuszczalnikiem węglowodorowym o temperaturze wrzenia między 36°C a 69°C, nieadsorbujących się na tzw. florisilu, czyli spreparowanej ziemi okrzemkowej, o czasie retencji zawartym między wymyciem n-dekanu ( $C_{10}H_{22}$ ) a n-tetrakontanu ( $C_{40}H_{82}$ ). Substancjami, które spełniają wymienione wymagania, są węglowodory alifatyczne o długim lub rozgałęzionym łańcuchu, alicykliczne, aromatyczne oraz aromatyczne z podstawnikami alkilowymi.

Olej turbinowy T-22 jest olejem mineralnym, który otrzymuje się z ropy naftowej o niskiej zawartości siarki przez oczyszczanie kwasem. W składzie tego oleju nie ma specjalnych dodatków. Mineralny olej przemysłowy I-40A również wchodzi w skład grupy olejów bez dodatków. Jest to olej destylacyjny lub mieszanina resztkowych i destylowanych olejów ropy naftowej otrzymywanych z siarki i ropy naftowej o niskiej zawartości siarki, o selektywnym oczyszczaniu.

Mineralne oleje bazowe zgodnie z klasyfikacją API zaliczane są w zależności od zawartości węglowodorów nasyconych, zawartości siarki i wskaźnika lepkości do Grupy I, II lub III. Bez względu na podział o olejach tych można powiedzieć, że są mieszaniną wysokowrzących węglowodorów, które mogą zawierać 20–45 atomów węgla w cząsteczkach o różnych strukturach i różnym stopniu nasycenia. Oleje mineralne T-22 oraz I-40A są mieszaninami składającymi się z 70–80% węglowodorów nasyconych, tj. izoparafinowych i naftenowych – jedno-, dwu- i trójpierścieniowych z długimi podstawnikami alkilowymi oraz 20–30% węglowodorów dwu- i trójpierścieniowych naftenowo-aromatycznych i aromatycznych z dużym udziałem w tej grupie węglowodorów alkilobenzenowych z długimi łańcuchami. Długość łańcuchów alkilowych maleje podczas przejścia od węglowodorów jednopierścieniowych do węglowodorów wielopierścieniowych, naftenowych, naftenowo-aromatycznych i aromatycznych (Beran 2008).

Węglowodory parafinowe, będące głównym składnikiem rafinowanych olejów mineralnych, nie ulegają żadnym charakterystycznym reakcjom chemicznym. Wszystkie stosowane metody oznaczania olejów są niespecyficzne; stosuje się metody grawimetryczne i spektrofotometryczne (fluorescencja, refraktometria, spektrofotometria w podczerwieni i nadfiolecie). Jeżeli oleje zawierają w swoim składzie wiązania wielokrotne lub pierścienie aromatyczne, istnieje możliwość oznaczenia ich metodą spektrofotometrii w nadfiolecie. Przed oznaczaniem olejów mineralnych w nadfiolecie należy w pierwszej kolejności zbadać widmo roztworu badanego oleju w zakresie 200–300 nm i sprawdzić, czy w tym zakresie ma ono wyraźne pasma adsorpcji. Jako rozpuszczalnik można stosować cykloheksan lub n-heksan, które w zakresie odpowiednio 205–380 nm

i 195–380 nm nie mają własnych pasm absorpcji i jednocześnie są doskonałymi rozpuszczalnikami olejów.

#### 5.1.4. Analiza spektralna filtrów zastosowanych do pomiarów fluorymetrycznych

W celu uzyskania dokładnej informacji dotyczącej zakresu promieniowania elektromagnetycznego stosowanego do wzbudzenia fluorescencji węglowodorów ropopochodnych znajdujących się w ekstraktach w n-heksanie oraz zakresu promieniowania elektromagnetycznego pochodzącego z fluorescencji próbek za pomocą metody absorpcyjometrycznej przebadano optyczne, ograniczające zakres widma promieniowania elektromagnetycznego, przeznaczone do pomiarów węglowodorów ropopochodnych (TPH), filtry wzbudzenia oraz emisji. Do tego celu wykorzystano spektrofotometr UV/Vis Perkin Elmer Lambda BIO oraz spektrofluorymetr modułowy MSF 101. Przeanalizowane filtry wykorzystano w badaniach za pomocą fluorymetru FLUORAT®-02. Do pomiarów TPH w urządzeniu FLUORAT®-02 wykorzystano lampę ksenonową o mocy 150 W oraz odpowiednie filtry optyczne ograniczające zakres widma promieniowania elektromagnetycznego przeznaczone do pomiarów węglowodorów ropopochodnych (TPH). Przepuszczalność filtrów została podana w tabeli 13.

**Tabela 13.** Zakresy przepuszczalności filtrów dla urządzenia FLUORAT®-02

Rodzaj filtru	Zakres długości fal, nm
Filtr na torze wzbudzenia	230–300
Filtr na torze emisji	280–350

Źródło: opracowanie własne.

#### 5.1.5. Separacja mechaniczna zanieczyszczeń ropopochodnych

Spośród technologii separacji mechanicznej najwyższą efektywność osiągnęła metoda rozdzielania faz z użyciem wirówek. Wirowanie pozwala na rozbicie nawet bardzo trwałych emulsji. Zasada działania wirówek oparta jest na wytworzeniu poprzez obroty bębna siły odśrodkowej, w której wyniku frakcja o większej gęstości przemieszcza się ku zewnętrznej części urządzenia, natomiast frakcja lżejsza, bogata w olej, pozostaje bliżej osi. Proces rozdzielania faz oparty jest więc na sedymentacji lub filtracji mającej miejsce pod wpływem różnicy ciśnień w polu odśrodkowym. Siła odśrodkowa generowana w wirówkach jest znacznie większa niż siła powodowana przyspieszeniem ziemskim, więc czas potrzebny na rozdzielanie frakcji jest znacznie krótszy niż w przypadku separatorów statycznych. Przy prawidłowo dobranych parametrach (średnica bębna, prędkość odśrodkowa) rozdział faz ciecz–ciało stałe, ciecz–ciecz, ciało stałe–ciecz–ciecz może trwać kilka sekund, w przeciwieństwie do sedymentacji

lub separacji grawitacyjnej, gdzie odbywa się to przez wiele godzin, a nawet dni. Dodatkowo wirówki zazwyczaj zajmują mniej miejsca w porównaniu z innymi separatorami.

Możliwości separacyjne wirówek określa się tzw. współczynnikiem rozdziału  $\Omega$  zdefiniowanym jako stosunek siły odśrodkowej  $N_n$  do siły ciężkości  $N_g$ . Stanowi on wielkość charakterystyczną dla danej wirówki:

$$\Omega = \frac{N_n}{N_g} = \frac{m \cdot \omega^2 \cdot r}{m \cdot g}, \quad (3)$$

gdzie:

$\omega = 2\pi n$  – prędkość kątowna bębna, 1/s,

$n$  – liczba obrotów bębna w jednostce czasu, 1/s,

$r$  – odległość cząstki od osi obrotu bębna, m,

$m$  – masa cząstki, kg,

$g$  – przyspieszenie ziemskie, m/s<sup>2</sup>.

Z równania (3) wynika, że skuteczność wirowania można podnieść poprzez zastosowanie większej prędkości obrotowej bębna oraz przez zwiększenie jego promienia. Jednak modyfikacja prędkości daje w sposób oczywisty lepsze rezultaty.

Do usuwania substancji ropopochodnych z zanieczyszczonych próbek wód wykorzystano metodę rozdzielania faz z użyciem wirówki. Przeprowadzono badania wody, w której źródła zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi były modelowo spreparowane w laboratorium, oraz wody pobranej ze środowiska o zanieczyszczeniu antropogenicznym wynikającym z działalności człowieka użytkującego zbiornik wodny.

Badania skuteczności odwirowania zanieczyszczeń ropopochodnych z próbek modelowych zostały zaprojektowane pod względem czterech parametrów (Hamacher i in. 2000; Bilo'o, Ngassoum 2013). Wybrano zakresy następujących parametrów:

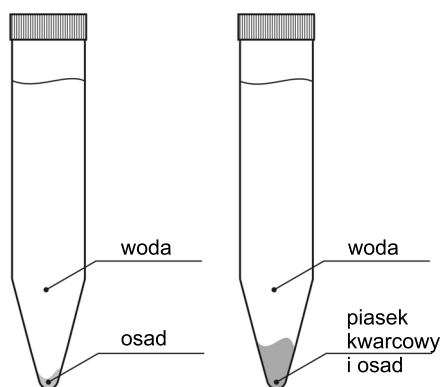
- prędkość obrotowa wirówki: 700–3700 obr./min.;
- czas wirowania: 10–30 min.;
- temperatury odwirowywanych próbek: 20°C i 55°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) (Pawlak, Rauhkyte, Oloyede 2008; Huang i in. 2011);
- początkowe stężenie substancji ropopochodnych w wodzie.

Wirowanie realizowano czterokrotnie dla każdej z próbek wody. W celu sprawdzenia wpływu każdego z parametrów wirowania pozostałe wartości parametrów były stałe (wybrano najskuteczniejsze). Badania zapoczątkowane zostały sprawdzeniem skuteczności różnych prędkości wirowania.

Badania skuteczności odwirowania zanieczyszczeń ropopochodnych z próbek środowiskowych zostały zaprojektowane pod względem pięciu poniższych parametrów:

- prędkość obrotowa: 1700–3700 obr./min.;
- czas wirowania: 30 min.;
- temperatura wirowania: 20° C ( $\pm 2$  ° C).

Zrezygnowano z badań prędkości obrotowej poniżej 1700 obr./min. ze względu na ich znacząco niższą skuteczność w porównaniu z wyższymi prędkościami. Wybrano również jeden czas wirowania, dla którego osiągnięto w badaniach próbek laboratoryjnych najlepszą efektywność odwirowania TPH (30 min.). Wirowanie realizowano czterokrotnie dla każdej z próbek wody. W celu sprawdzenia wpływu każdego z parametrów wirowania, podobnie jak w przypadku próbek modelowych, pozostałe wartości parametrów były stałe.



**Rysunek 23.** Probówki z wodą po odwirowaniu

Źródło: opracowanie własne.

Próbki wody wirowane były w probówkach o pojemności 10 ml. Woda po etapie wirowania pobierana była z górnej warstwy probówki, co zostało pokazane na rys. 23. Do dalszych badań zbierano około 80% wody z górnej części każdej probówki. Oznaczeń zawartości TPH dokonano techniką fluorymetryczną za pomocą analizatora FLUORATU®-02.

### 5.1.6. Procedura fotochemicznego rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych

Fotochemiczne badania przeprowadzono w celu oceny czystości wód na podstawie zawartości substancji ropopochodnych mierzonej stężeniem TPH. Spośród procesów pogłębionego utleniania, które można prowadzić w temperaturze otoczenia, do degradacji związków ropopochodnych wykorzystano bezpośrednie działanie promieniowaniem UV oraz reakcję rodników hydroksylowych generowanych poprzez fotolizę nadtlenu wodoru (układ  $H_2O_2/UV$ ), a także reakcje fotokatalityczne z użyciem jako fotokatalizatora tlenku tytanu (IV).



Reakcje fotokatalityczne zostały przebadane w układzie z cząstkami  $\text{TiO}_2$  w zawieszynie. Wyniki badań pozwoliły na określenie skuteczności degradacji TPH wybranych procesów, które bardzo często stosowane są w przebiegu uzdatniania wody mającego na celu rozkład zanieczyszczeń. Badania obejmowały również ocenę skuteczności degradacji TPH na drodze reakcji z rodnikami  $\text{OH}^\bullet$ , a następnie porównanie ich z takimi procesami, jak: degradacja w układzie  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  oraz działanie wyłącznie promieniowania UV.

Na podstawie badań własnych wyznaczono dawkę katalizatora wynoszącą  $10 \text{ mgTiO}_2/\text{dm}^3$  oraz ustalono czas kontaktu katalizatora z mieszaniną w czasie procesu naświetlania promieniami UV na okresy: 1 min.; 1,5 min.; 3 min.; 5 min. oraz 7 min., co odpowiadało wartościom powierzchniowej gęstości energii: 2,7; 5,4; 9,0 oraz  $12,6 \text{ J/cm}^2$ . Przygotowując zawieszinę proszku, naważkę proszku umieszczono w roztworze rozcieńczalnika – wodzie. Następnie rozbijano aglomeraty proszku za pomocą mieszalnika ultradźwiękowego przez 20 minut.

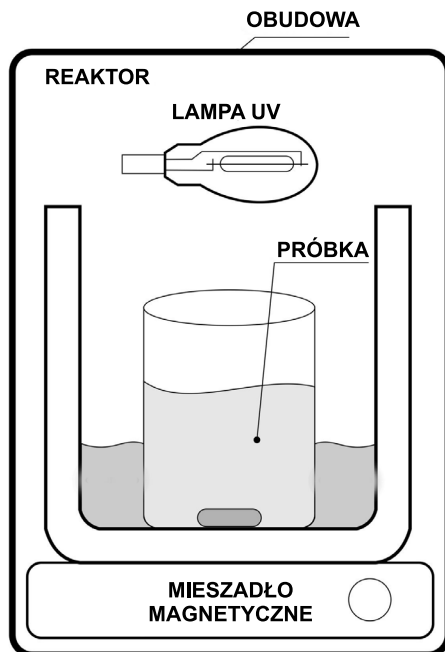
Środowisko wodne, w którym przebiega fotoliza, ma niejednokrotnie wpływ na jej efektywność. Nawet gdy molowe współczynniki absorpcji nie zmieniają się w zależności od pH, jak ma to miejsce przy tak niepolarnych związkach jak WWA, to powstające cząsteczki wzbudzone mogą podlegać oddziaływaniu środowiska, determinując zajście reakcji chemicznej. Zatem pH roztworu jest ważnym parametrem decydującym o reakcjach utleniania zachodzących na powierzchni fotokatalizatorów. Wstępne badania własne nie wykazywały jednak zależności pomiędzy pH roztworu w zakresie 5,0 do 6,0 a skutecznością rozkładu TPH w wodzie. Badania innych autorów również wskazują, że w przypadku cząstek ditlenku tytanu wartość pH mieszcząca się w zakresie od 4,0 do 6,0 nie wykazywała istotnych różnic (Zawadzki i in. 2017). Wobec powyższego badania degradacji TPH przeprowadzono w środowisku lekko kwaśnym o pH równym 6,0. Wybrano takie warunki również ze względu na łatwość utrzymania pH na tym poziomie podczas procesów fotokatalizy.

Separację cząsteczek katalizatora w próbkach poprocesowych wykonano w procesie filtracji. Należy zaznaczyć, że nie pozwala on na zatrzymanie zanieczyszczeń TPH, co związane jest z charakterystyką zastosowanych filtrów, a w szczególności ze średnicą ich porów, która przekracza średnicę cząstek substancji ropopochodnych. Separację katalizatora z mieszaniny poreakcyjnej przeprowadzono w procesie filtracji przy użyciu układu filtracyjnego wyposażonego w filtry o porowatości  $0,45 \mu\text{m}$ .

Procesy prowadzono w laboratoryjnym reaktorze zbudowanym na potrzeby pracy, którego schemat przedstawiony jest na rys. 24.

Badania wpływu promieniowania UV na substancje ropopochodne znajdujące się w mieszaninie reakcyjnej odbywały się przy użyciu wysokociśnieniowej lampy ksenonowej charakteryzującej się emisją ciągłego widma promieniowania w zakresie 250–2450 nm o mocy 150 W. W trakcie trwania procesu roztwory reakcyjne były mieszane, co zapewniało równomierne rozprowadzenie

katalizatora w trakcie procesu, a także równomierne odprowadzanie ciepła z układu.



**Rysunek 24.** Reaktor do badań fotochemicznych

Źródło: opracowanie własne.

Przedmiot badań stanowiły roztwory wody pochodzącej ze środowiska (zbiornik Bagry, miasto Kraków) z dodatkiem substancji ropopochodnych o stężeniu podanym w tabeli 14.

**Tabela 14.** Stężenia TPH w próbkach wody poddanych procesom AOP

Rodzaj próbki	Stężenie TPH, mg/l
Woda środowiskowa – 1. punkt poboru	1,72
Woda środowiskowa – 2. punkt poboru	3,43
Woda z dodatkiem roztworu olej:benzyna	5,53
Woda z dodatkiem roztworu olej:benzyna	7,58

Źródło: badania własne.

### **Układ modelowy roztworów wodnych**

Układ modelowy sporządzony był z użyciem roztworu olej półsyntetyczny:benzyna. Do wody pobranej ze zbiornika wodnego dodawano związki ropopochodne z roztworu olej półsyntetyczny:benzyna znajdujących się

względem siebie w stosunku 1:25. Do sporządzenia roztworu wykorzystano benzynę Pb95 pobraną z jednej ze stacji LukOil oraz olej półsyntetyczny do silników dwusuwowych Sil-Oil (klasa jakości: API-TC, JASO-FC, ISO-L-EGC) zawierający hydrowerfnowane węglowodory C<sub>20</sub>–C<sub>50</sub>, niezawierający związków chlorowcoorganicznych. Zawartości substancji ropopochodnych znajdujących się w badanych próbkach wyznaczone zostały na podstawie analizy TPH. Sumaryczne stężenia TPH w przygotowanych podłożach wyniosły: 2,50 mg/l, 5,00 mg/l, 7,50 mg/l. Do połowy z nich dodano także ekstrakt saponin z *Sapindus mukorossi* o stężeniu 0,05 g/dm<sup>3</sup>. Dodatki zastosowane do podłoża obniżyły pH próbek do 6.

### **Warunki reakcyjne**

W zakresie badań nad skutecznością układu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV ustalono warunki reakcyjne na podstawie danych literaturowych i doświadczeń z własnej praktyki laboratoryjnej. Utlenianie TPH przeprowadzono z wykorzystaniem 30% roztworu nadtlenu wodoru w stężeniu 0,05 mol/dm<sup>3</sup> oraz przy użyciu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz światła UV. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej, w stałym pH wynoszącym 6,0 oraz w różnych czasach trwania procesu (do 60 min.). Celem tych badań był dobór optymalnego czasu prowadzenia procesu fotoutleniania związków TPH oraz porównanie efektów degradacji zanieczyszczeń przy zastosowaniu samego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz układu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV.

W pierwszej kolejności przeprowadzono utlenianie poprzez dodanie do przygotowanych próbek 30% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w stężeniu 0,05 mol/dm<sup>3</sup>. Całość intensywnie wymieszano. Badania nad degradacją TPH w układzie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV z użyciem lampy wysokociśnieniowej rozpoczęto od sprawdzenia efektywności podstawowej składowej procesu, tzn. przebiegu zaniku substratów w tzw. reakcji ciemnej, gdy z TPH reaguje sam nadtlenek wodoru.

Następnie przygotowane próbki wystawiono na działanie światła słonecznego. Przeprowadzono pomiary zawartości TPH po czasie: 1 min., 10 min., 20 min., 30 min., 40 min., 50 min. i 60 min. W czasie trwania procesu próbki były przechowywane z dostępem światła słonecznego.

Na kolejnym etapie przeprowadzono utlenianie za pomocą 30% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w takim samym stężeniu jak poprzednio. Całość również intensywnie wymieszano, a następnie próbki przełożono do ciemni. Przeprowadzono proces naświetlania promieniowaniem UV w czasie: 0,25 min., 0,5 min., 1 min., 1,5 min., 3 min., 5 min., 10 min., 15 min., i dokonano natychmiast analizy zawartości TPH w próbkach.

### **5.1.7. Procedura procesu bioremediacji**

Analiza procesów bioremediacji obejmowała wykazanie potencjału rodzimych szczepów mikroorganizmów odnalezionych w wodach zbiornika Bagry

Wielkie (Kraków, małopolskie) do biodegradacji związków pochodzących z ropy naftowej. Badania bioremediacji zanieczyszczeń wód przeprowadzone zostały na podstawie wzrostu bakterii tlenowych z rodzaju *Pseudomonas*, gatunku *aeruginosa*, wykorzystujących związki ropopochodne jako składnik pożywienia. Do badań wybrano *Pseudomonas aeruginosa* ze względu na wysoką efektywność biodegradacji substancji ropopochodnych w porównaniu z innymi bakteriami (Pijanowska i in. 2007). Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* równocześnie bardzo często obecne są w wodach powierzchniowych. Wstępne badania wskazały na wykorzystywanie węglowodorów do wzrostu bakterii w próbkach laboratoryjnych. Przeprowadzono badanie biodegradacji *ex situ* w próbkach modelowych przygotowanych na bazie próbek pobranych ze środowiska.

### **Hodowle mikroorganizmów**

Do prawidłowego wzrostu i rozwoju bakterii konieczne jest takie środowisko, które będzie zaspokajać ich wymagania pokarmowe. Pobrane przez bakterie składniki są źródłem substancji budulcowych komórki, a także energii, która jest potrzebna dla rozmnażania i wzrostu. W hodowlach bakterii *Pseudomonas aeruginosa* bardzo często stosuje się pożywki typu LB (ang. *lysogeny broth*), lecz można również wykorzystać inne związki do utworzenia odpowiedniego podłoża. *Pseudomonas aeruginosa* potrzebuje 24 godzin do wzrostu na podłożu bogatym. Wzrost na podłożu minimalnym może odbywać się w znacznie dłuższym czasie, w zależności od składników odżywczych oraz stężenia źródła węgla.

*Pseudomonas aeruginosa* rośnie najlepiej w warunkach tlenowych, niezależnie od podłoża, ale jest zdolna do wzrostu również w warunkach beztlenowych na niektórych źródłach węgla. Hodowla bakterii odbywała się w zamkniętych pojemnikach, na podłożu płynnym o objętości 100 ml, nad którym zgromadzone było powietrze o objętości około 10 ml.

Opisane badania przeprowadzono na przygotowanych czterech rodzajach hodowli mikroorganizmów. Pierwszą z nich prowadzono w próbkach zawierających wodę środowiskową z dodatkiem substancji ropopochodnych o wyznaczonych stężeniach TPH: 2,50 mg/l, 5,00 mg/l, 7,50 mg/l. Próbkę z drugiej hodowli zawierały dodatkowo saponiny z *Sapindus mukorossi* o stężeniu 0,05 g/dm<sup>3</sup>. Trzecia i czwarta hodowla były hodowlami kontrolnymi, nie zawierały one dodatku związków ropopochodnych. Próbkę trzeciej hodowli zawierały jedynie wodę pobraną ze zbiornika wodnego wraz z bakteriami *Pseudomonas aeruginosa*, do próbek czwartej hodowli dodano ekstrakt saponin z *Sapindus mukorossi* o stężeniu 0,05 g/dm<sup>3</sup>.

### Warunki procesu bioremediacji

Przeanalizowano wody pod kątem obecności bakterii rodzaju *Pseudomonas aeruginosa*, a także równocześnie zbadano zawartość węglowodorów ropopochodnych, którego wskaźnikiem było stężenie TPH w wybranych punktach pomiarowo-kontrolnych zbiornika wodnego Bagry Wielkie. Następnie przeprowadzono analizę wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* w obecności modelowych stężeń substancji ropopochodnych w warunkach laboratoryjnych. Za pomocą testów statycznych określono szybkość biodegradacji związków ropopochodnych z wody w funkcji czasu oraz efektywność ich usuwania przy zmiennych wartościach temperatury, ustalonych wartościach początkowego stężenia TPH w próbkach oraz pH w zakresie 5–6. Przeprowadzono również analizę zmian skuteczności degradacji TPH prowadzonej przez wybrane mikroorganizmy w obecności surfaktantu roślinnego. W tabeli 15 podsumowano warunki prowadzonego procesu bioremediacji, które określone zostały następującymi zmiennymi:

#### 1) Początkowe stężenie substancji ropopochodnych

Zawartości substancji ropopochodnych znajdujących się w badanych próbkach, wyznaczone na podstawie analizy TPH, wynosiły: 2,50 mg/l, 5,00 mg/l, 7,50 mg/l. Proces bioremediacji prowadzono również dla próbek odniesienia, bez zawartości substancji ropopochodnych.

#### 2) pH środowiska wodnego

Odczyn środowiska wodnego był utrzymywany w obrębie pH 5 do 6. Wybrano ten zakres wartości na podstawie danych literaturowych jako optymalne pH dla wzrostu *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3) Temperatura inkubacji bakterii

Przy wyborze temperatury dla wzrostu tej bakterii kierowano się prędkością wzrostu kolonii bakterii dla różnych temperatur oraz aktywnością kilku czynników zjadliwości aktywnych dopiero powyżej 30°C. Eksperyment został przeprowadzony w temperaturze pokojowej 25°C oraz temperaturze 38°C. Wybrane temperatury są odpowiednie dla *Pseudomonas aeruginosa*, gdyż potrafią one przetrwać w bardzo szerokim zakresie temperatur, od bardzo niskich (4°C) do bardzo wysokich (42°C). Temperatury procesu bioremediacji ustalono na 38°C ze względu na bardzo szybkie tempo wzrostu kolonii *Pseudomonas aeruginosa* w tej temperaturze oraz na 25°C z powodu próby stworzenia warunków temperaturowych zbliżonych do naturalnych w okresie letnim.

#### 4. Wpływu czasu inkubacji

Hodowle bakterii prowadzono przez okres trzech tygodni. Próbki zawierające kolonie bakterii *Pseudomonas aeruginosa* były inkubowane w warunkach dynamicznych (wytrząsanie) w temperaturze 25°C i 38°C w okresach 7, 14 i 21 dni. Po każdym z tych czasów próbki wody pobierane były do badań zawartości TPH oraz ilości jtk.

## 5) Badanie wpływu napięcia powierzchniowego

Zbadano wpływ wprowadzenia do próbek surfaktantu, saponin z *S. mukorossi*, w celu określenia jego przydatności do stymulacji procesu biodegradacji. Ekstrakt saponin dodano w stężeniu  $0,05 \text{ g/dm}^3$ , dzięki czemu napięcie powierzchniowe zostało obniżone do  $0,04 \text{ N/m}$ . W próbkach bez dodatku saponin napięcie powierzchniowe wynosiło  $0,07 \text{ N/m}$ . Eksperyment został przeprowadzony w temperaturze inkubacji  $38^\circ\text{C}$ . Próbki były pobierane w odstępach czasu jak powyżej i analizowane pod kątem wzrostu kolonii bakterii *Pseudomonas aeruginosa* oraz zawartości TPH.

Tabela 15. Warunki prowadzenia procesu bioremediacji

Stężenie substancji ropopochodnych (TPH), mg/l	Napięcie powierzchniowe, N/m	Czas inkubacji, dni	Temperatura, °C
2,50	$40 \cdot 10^{-3}$	7	25
			38
		14	25
			38
		21	25
			38
	$70 \cdot 10^{-3}$	7	25
			38
		14	25
			38
		21	25
			38
5,00	$40 \cdot 10^{-3}$	7	25
			38
		14	25
			38
		21	25
			38
	$70 \cdot 10^{-3}$	7	25
			38
		14	25
			38
		21	25
			38

Tabela 15 – cd.

Stężenie substancji ropopochodnych (TPH), mg/l	Napięcie powierzchniowe, N/m	Czas inkubacji, dni	Temperatura, °C
7,50	40·10 <sup>-3</sup>	7	25
			38
		14	25
			38
			21
	70·10 <sup>-3</sup>	7	25
			38
		14	25
			38
			21
			25
			38

Źródło: opracowanie własne.

### **Badania obecności *Pseudomonas aeruginosa***

Liczbę bakterii występujących w danym środowisku można określić różnymi metodami. Powszechnie stosowane dzielą się na bezpośrednie i pośrednie. Metody bezpośrednie służą do oznaczania sumy żywych i martwych komórek. Metody pośrednie (hodowlane) opierają się na obserwacji wzrostu żywych komórek. Dzięki zdolności drobnoustrojów do rozmnażania oznacza się tylko żywe komórki zdolne do wzrostu w pożywkach płynnych lub stałych. Wyróżnia się metody: płytkową, rozcieńczeń oraz modyfikacje metod hodowlanych: petrifilmy, test łopatkowy, metoda filtracji membranowej, a także metoda najbardziej prawdopodobnej liczby drobnoustrojów.

Hodowanie bakterii pozostaje najczęściej stosowanym sposobem detekcji *Pseudomonas aeruginosa*, jednak sposób ten jest czasochłonny i podatny na niezgodności wyników ze względu na zanieczyszczenia próbek. Ponadto ta metoda ma niską czułość. Aby rozwiązać te problemy, opracowano różne testy, z których każdy ma swoje zalety i wady. Metody te mogą być ograniczone przez niską stabilność i małą powtarzalność (Tang i in. 2017).

Badania przesiewowe na obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa* zostały przeprowadzone przy użyciu pożywki Pseudalert®. Wykonano testy ilościowe według procedury IDEXX Laboratories, Inc. Technika znormalizowanej zgodnie z normą ISO 16266–2:2018. Wielkość kolonii bakterii wykorzystanych do bioremediacji oceniona została za pomocą metod spektrofotometrycznych w zakresie światła ultrafioletowego oraz widzialnego.

Metodyka IDEXX pozwala na bezpośrednie wykrycie *Pseudomonas aeruginosa* w czasie 24 godzin zarówno jakościowo, jak i ilościowo, a co najważniejsze – jest odporna na zanieczyszczenia próbki innymi bakteriami. Ponadto detekcja bakterii w pełni zamkniętych rezerwuarach minimalizuje ryzyko rozprzestrzenienia się ich w sposób niekontrolowany. Metodyka ta została zwalidowana i wpisana jako obowiązująca do normy ISO 16266–2:2018 Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Part 2: Most probable number method. Do głównych zalet metod należą: specyficzne wykrywanie *Pseudomonas aeruginosa*, minimalizowanie ryzyka wyników fałszywie dodatnich oraz brak czynnika subiektywnego przy odczycie.

Norma ISO 16266–2:2018 odwołuje się do dokumentów ISO/IEC Directives, Part 1 oraz ISO/IEC Directives, Part 2. W tekście normy ISO 16226–2:2018 są przywoływane następujące dokumenty:

- ISO 8199:2010, Jakość wody – Ogólne wytyczne oznaczania liczby bakterii metodą hodowli;
- ISO 11133:2014-07, Mikrobiologia żywności, pasz i wody. Przygotowanie, produkcja, przechowywanie i przeprowadzanie badań pożywek;
- ISO 19458:2007, Jakość wody – Pobieranie próbek do analiz mikrobiologicznych;
- ISO/IEC Guide 2 – Standardization and related activities – General vocabulary.

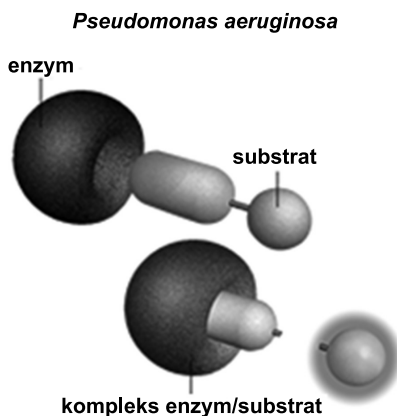
Całość lub część ich treści stanowią wymagania dla dokumentu ISO 16226–2:2018. Niektóre elementy Normy są objęte prawami autorskimi. Dokument ten został przygotowany przez Komitet Techniczny ISO/TC 147, Jakość wody, Subkomitet SC 4, Metody mikrobiologiczne.

Norma ISO 16266–2:2018 precyzuje metodę oznaczania *Pseudomonas aeruginosa* w wodzie. Opiera się ona na wzroście wykrywanych bakterii w płynnym podłożu i kalkulacji najbardziej prawdopodobnej liczby mikroorganizmów (MPN) poprzez odniesienie do tabeli MPN (załącznik 1). Dokument stosowany może być do wielu typów wód. Mogą to być wody szpitalne, wody pitne, niegazowane wody butelkowane przeznaczone do spożycia przez ludzi, wody podziemne, wody w pływalniach, basenach spa, w tym zawierające dużą liczbę bakterii heterotroficznych. Normy tej nie stosuje się do wód butelkowanych gazowanych, wód smakowych, wód do wież chłodniczych lub morskich, dla których ta metoda nie została zwalidowana. Metody opisane w normie mogą jednak być użyte dla wymienionych środowisk przez laboratoria, jednak muszą one zostać poprzedzone stosowną walidacją przed ich zastosowaniem.

Metoda IDEXX oparta jest na technologii wykrywania enzymów bakteryjnych, która sygnalizuje obecność *Pseudomonas aeruginosa* poprzez hydrolizę substratu w odczynniku. Badany gatunek drobnoustrojów zdolny jest do wzrostu w wyseparowanym bulionie oraz do hydrolizowania diagnostycznego substratu obecnego w odczynniku: 7-amino-4-metylokumaryny. Komórki



*Pseudomonas aeruginosa* szybko rosną i rozmnażają się dzięki bogatej podaży aminokwasów, witamin i innych składników odżywczych obecnych w odczynniku. Aktywnie rosnące szczepy *Pseudomonas aeruginosa* mają enzym, który rozszczepia substrat w odczynniku w celu wytworzenia niebieskiej fluorescencji w świetle ultrafioletowym (rys. 25.). Użyty w badaniach odczynnik Pseudalert® wykrywa *Pseudomonas aeruginosa* przy 1 jtk na 100 ml próbki wody w ciągu 24 godzin.



**Rysunek 25.** Hydroliza substratu w odczynniku Pseudalert®: enzym rozszczepia podłoże w odczynniku w celu generowania fluorescencji w świetle ultrafioletowym

Źródło: <http://idexx.com> (dostęp: 8.06.2020).

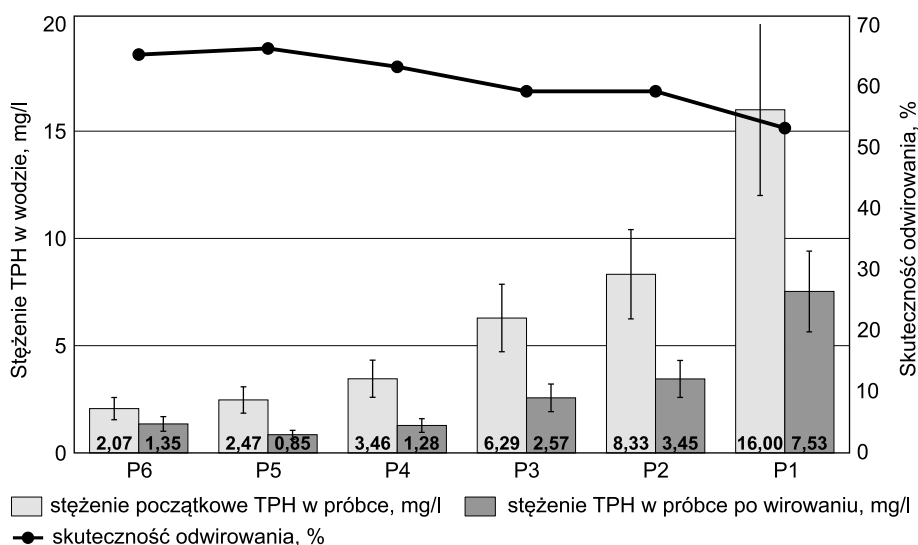
Oznaczenie jakościowe *Pseudomonas aeruginosa* wykonano zgodnie z Normą ISO 16266–2:2018. Do każdej 100 ml próbki wody znajdującej się w sterylnych pojemnikach zawierających środek przeciwpieniący (IDEXX) dodano pożywkę Pseudalert® i po zamknięciu wytrząsano w celu całkowitego rozpuszczenia pożywki. Następnie tak przygotowane próbki inkubowano w 38°C w ciągu 24–25 godzin. Po inkubacji dokonano analizy obecności kolonii bakterii pod wpływem promieniowania UV (365 nm). Niebieska fluorescencja wskazywała na obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Badania przeprowadzano w sezonie letnim i zimowym.

Przy wyznaczaniu ilościowym kolonii bakterii *Pseudomonas aeruginosa* do każdej 100 ml próbki wody znajdującej się w sterylnych pojemnikach zawierających środek przeciwpieniący (IDEXX) dodano pożywkę Pseudalert® i po zamknięciu wytrząsano w celu całkowitego rozpuszczenia pożywki. Następnie tak przygotowane próbki po kilkuminutowym odstaniu w celu opadnięcia piany zostały przeniesione do 51 dołków, uszczelnione i inkubowane w procesie wymuszonego wytrząsania w 38,0°C w ciągu 24–25 godzin. Temperatura była stabilizowana z dokładnością  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Po inkubacji dokonano analizy obecności kolonii bakterii w każdym z dołków pod wpływem promieniowania UV

(365 nm). Każdy z dołków wykazujący niebieską fluorescencję był zliczany jako próbka pozytywna (bakteria *Pseudomonas aeruginosa* obecna). Kolonie bakterii liczone były przy wykorzystaniu tabeli MPN i wyrażone w jednostkach tworzących kolonię na 100 ml (jtk/100 ml).

## 5.2. Badania separacji mechanicznej substancji ropopochodnych

Oceniono efektywność odwirowania substancji ropopochodnych z wody w funkcji stężenia początkowego TPH w wodzie przy prędkości obrotowej 1700 obr./min. Separację prowadzono dla temperatury próbek 20°C przez 10 min. Założono dla celów badawczych stężenia w zakresie 2,00–16,00 mg/l. Na rys. 26 przedstawiono początkowe stężenia TPH w próbkach, otrzymane stężenia TPH w wodzie po odwirowaniu wraz z błędem metody fluorymetrycznej przy prawdopodobieństwie  $P = 95\%$  oraz podano również obliczoną skuteczność odwirowania TPH z próbek.



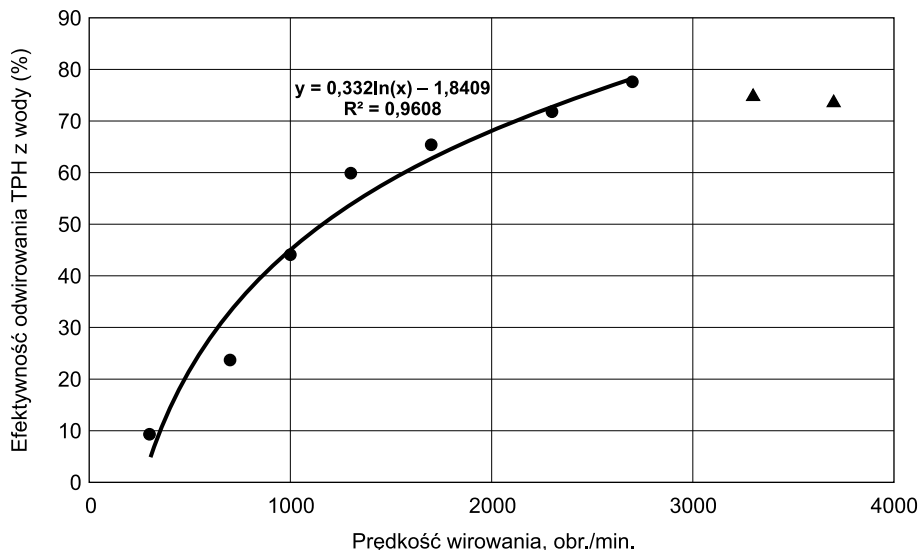
**Rysunek 26.** Stężenia TPH przed wirowaniem i po wirowaniu ( $T = 20^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 1700$  obr./min.,  $t = 10$  min) oraz skuteczność odwirowania

Źródło: badania własne.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że dla próbek modelowych wody zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi w stężeniach 2,00–16,00 mg/l istnieje korelacja pomiędzy skutecznością odwirowania a początkowym stężeniem TPH. Można wnioskować, że przy stałym czasie

i prędkości obrotowej wirowania procentowa skuteczność odwirowania jest większa dla niższych początkowych stężeń TPH i maleje wraz ze wzrostem stężenia TPH.

Następnie zbadano skuteczność separacji próbek o stężeniu TPH w wodzie 2,07 mg/l dla prędkości obrotowych w zakresie 300–3700 obr./min. przy zachowaniu stałych pozostałych parametrów (temperatura, czas wirowania). Skuteczność odwirowania substancji ropopochodnych z wody została przedstawiona na rys. 27.



**Rysunek 27.** Skuteczność odwirowania substancji ropopochodnych z wody przy różnych prędkościach obrotowych ( $t = 10$  min.,  $T = 20^{\circ}\text{C}$ )

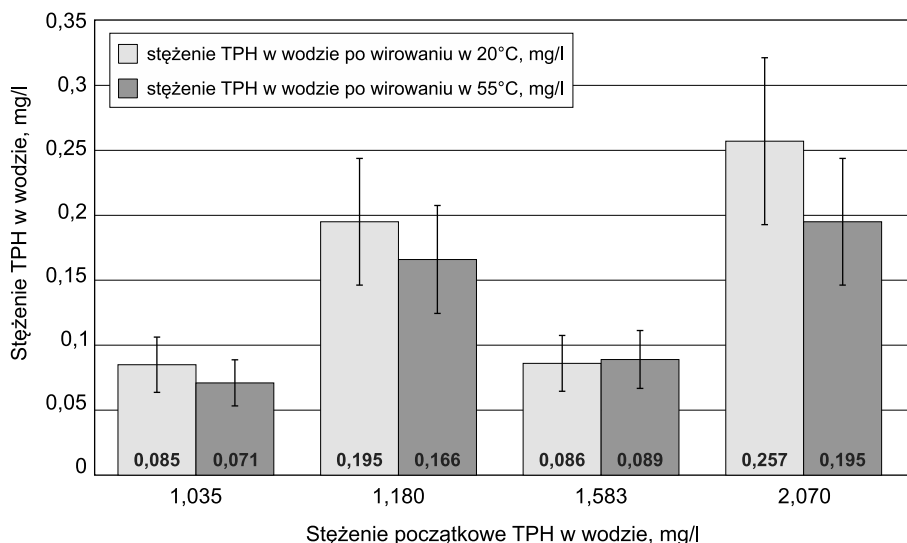
Źródło: badania własne.

Stopień oczyszczania próbek ze związków ropopochodnych rośnie logarytmicznie wraz ze wzrostem prędkości obrotowej. Skuteczność oczyszczenia wody dla prędkości 2700 obr./min. wynosi 77,6% i była ona maksymalna w zaprojektowanych warunkach wirowania. Dalsze zwiększanie prędkości obrotowej nie przynosiło wyraźnych korzyści w oczyszczaniu wody.

Następnie dla kolejnych próbek modelowych o zakresie stężeń 1,035–2,070 mg/l porównano skuteczność odwirowania w dwóch temperaturach:  $20^{\circ}\text{C}$  i  $55^{\circ}\text{C}$ , ze stałą prędkością wirowania 2700 obr./min. w czasie 10 min. Wyniki tych pomiarów wraz z błędem metody fluorymetrycznej przy prawdopodobieństwie  $P = 95\%$  przedstawiono na rys. 28.

Wyniki pomiarów wskazują na niewielką poprawę efektywności odwirowania TPH w wyższej temperaturze, jednak błąd względny w otrzymanych wynikach przy  $P = 95\%$  wskazuje, że różnice te nie są istotne. Efektywność

odwirowania TPH z wody w badanych zakresach stężeń w temperaturze 20°C mieściła się w granicach 83,5–94,6%, natomiast dla temperatury 55°C: 85,9–94,4% (tabela 16). Procentowa skuteczność oczyszczania wody dla próbek z modelowymi zanieczyszczeniami olejowymi w czasie wirowania 10 min. była podobna dla tych samych stężeń w badanych temperaturach.



**Rysunek 28.** Stężenie TPH w wodzie przed wirowaniem i po wirowaniu (n = 2700 obr./min., t = 10 min., T = 20°C i T = 55°C)

Źródło: badania własne.

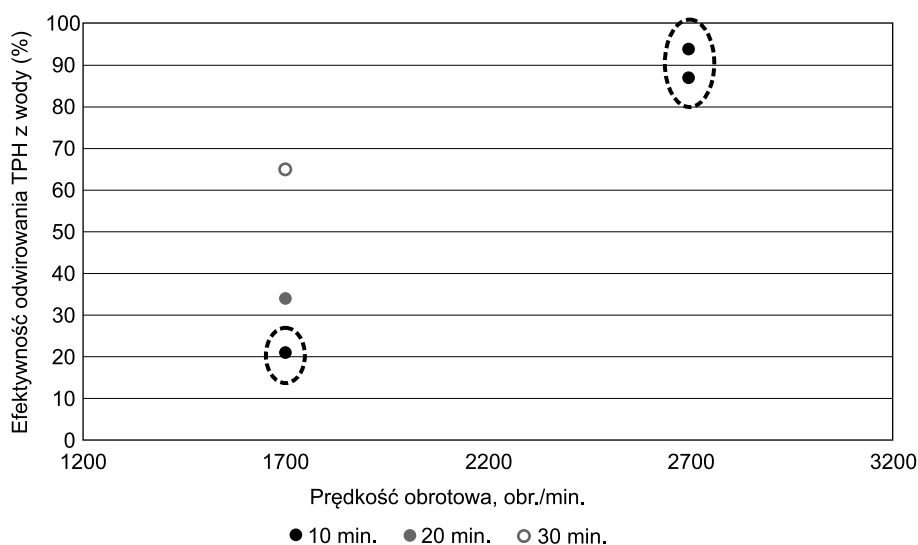
**Tabela 16.** Efektywność wirowania w dwóch temperaturach (prędkość wirowania 2700 obr./min., czas 10 min.)

Stężenie TPH w wodzie przed wirowaniem, mg/l	Efektywność odwirowania w 20°C (%)	Efektywność odwirowania w 55°C (%)
1,035	91,8	93,1
1,180	83,5	85,9
1,583	94,6	94,4
2,070	87,6	90,6

Źródło: badania własne.

Efektywność odwirowania dla każdego z badanych czasów nie wykazywała zależności dla dwóch badanych temperatur: 20°C i 55°C. W dalszej kolejności zbadano skuteczność odwirowania związków ropopochodnych z próbek dla różnych czasów wirowania. Ustalono trzy czasy: 10 min., 20 min. i 30 min., pozostałe warunki obejmowały: temperaturę próbek wynoszącą 20°C, prędkość obrotową wirowania 1700 obr./min. oraz stężenie początkowe próbki wynoszące

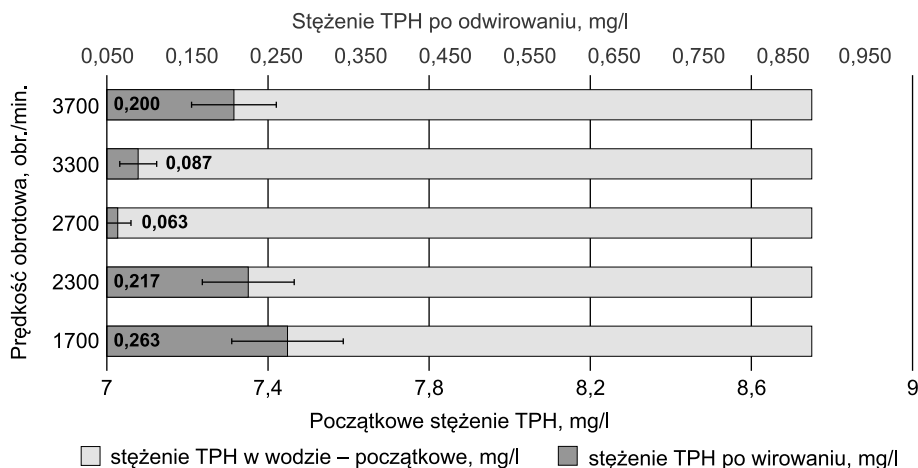
2,47 mg/l. Przy tej prędkości obrotowej uzyskano bardzo powtarzalną procentową skuteczność odwirowania dla każdej z przebadanych próbek. Wraz ze zwiększeniem czasu wirowania znacznie zwiększa się skuteczność odwirowania: z 21% poprzez 34% do 65% w badanym okresie. Wyniki te zostały skonfrontowane z prędkością obrotową 2700 obr./min. Skuteczność separacji związków ropopochodnych z wody dla tej prędkości obrotowej wynosiła 87% dla próbki o wyjściowym stężeniu zanieczyszczeń 2,070 mg/l, a 94% dla próbki o wyjściowym stężeniu 1,583 mg/l w czasie wirowania 10 min. (rys. 29). Widać zatem, że zwiększenie prędkości obrotowej wirowania pozwala na skrócenie czasu procesu odwirowania i uzyskanie w wyniku tego znacząco lepszej skuteczności separacji substancji ropopochodnych z wody.



**Rysunek 29.** Porównanie przykładowych efektywności odwirowania substancji ropopochodnych w zależności od prędkości i czasu wirowania

Źródło: badania własne.

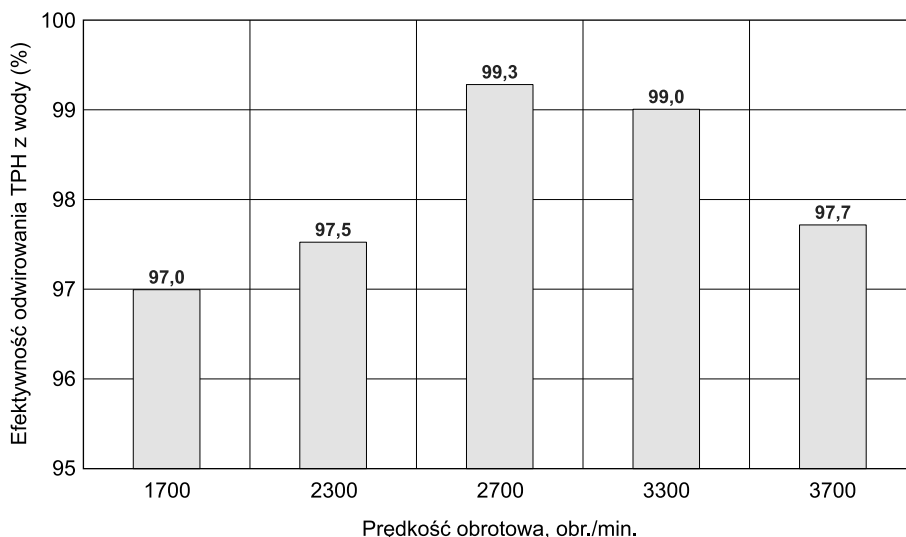
Dla próbek środowiskowych zbadano wpływ prędkości obrotowej na skuteczność separacji związków TPH w czasie wirowania 30 min. w temperaturze 20°C. Można zauważyć obniżenie zawartości TPH w wodzie wraz ze wzrostem prędkości wirowania od 1700 obr./min. do 2700 obr./min. (rys. 30). Dla prędkości 2700 obr./min. i 3300 obr./min. błędy względne wyznaczone dla stężeń TPH pozostających w wodzie po procesie separacji, wynikające z zastosowanego przyrządu pomiarowego, nakładają się. Można uznać obie prędkości obrotowe za tak samo efektywnie separujące TPH z wody. Dla prędkości obrotowej wynoszącej 2700 obr./min. stężenie TPH w wodzie było najniższe i wynosiło  $0,063 \pm 0,016$  mg/l.



**Rysunek 30.** Stężenie TPH przed odwirowaniem i po odwirowaniu (czas 30 min., temperatura próbek 20°C)

Źródło: badania własne.

Odnosząc omówione wyniki pomiarowe do procentowej skuteczności oczyszczania próbek środowiskowych z substancji ropopochodnych, można zobrazować efektywność odwirowania w postaci wykresu przedstawionego na rys. 31.



**Rysunek 31.** Efektywność odwirowania TPH z próbek wody rzecznej przy różnych prędkościach obrotowych, czas wirowania 30 min. i T = 20°C

Źródło: badania własne.

Efektywność oczyszczenia przy prędkości obrotowej 1700 obr./min. wyniosła 97%. Zwiększenie prędkości obrotowej do 2300 obr./min. spowodowało niewielką zmianę skuteczności odwirowania próbek; wyniosła ona 97,5%. Najwyższą skuteczność oczyszczania osiągnięto dla prędkości 2700 obr./min., bo aż 99,3%. Dalsze zwiększenie prędkości obrotowej nie wpływało korzystnie na oczyszczanie wody z substancji ropopochodnych. Dla prędkości obrotowych 3300 obr./min. i 3700 obr./min. można było zauważyć obniżanie efektywności odwirowania, odpowiednio: 99,0% i 97,7%. Uwzględniając przedziały niepewności standardowych, odwirowanie przy prędkości 2700 obr./min. i 3300 obr./min. osiągnęło skuteczność na tym podobnym poziomie, a stężenie TPH w wodzie jest porównywalne (wynosiło odpowiednio:  $0,063 \pm 0,016$  mg/l i  $0,087 \pm 0,022$  mg/l). Efektywność odwirowania obliczona została na podstawie średnich wartości otrzymanych stężeń TPH.

Na podstawie wyników z przeprowadzonych badań stwierdzono, że dla próbek modelowych wody zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi w stężeniach 1,00–2,10 mg/l największe znaczenie dla skuteczności odwirowania tych substancji miała prędkość obrotowa. Wykazano, że najlepsza efektywność odwirowania substancji ropopochodnych z wody pojawia się dla prędkości obrotowej wirówki wynoszącej 2700 obr./min. (96%). Dla większych prędkości obrotowych potrzebne jest dostarczenie większej ilości energii, co jest równoznaczne z podniesieniem kosztów procesu. Równocześnie większe prędkości obrotowe nie przynoszą oczekiwanej poprawy skuteczności oczyszczania wody z substancji ropopochodnych. Nie stwierdzono więc potrzeby stosowania wyższych prędkości obrotowych wirówki, gdyż nie byłoby to uzasadnione ekonomicznie. Stwierdzono również, że dłuższy czas wirowania poprawia skuteczność separacji związków ropopochodnych z próbek, jednak nie daje tak korzystnych efektów, jak odpowiedni dobór prędkości obrotowej. Rezultaty badań laboratoryjnych wskazują na najlepszą efektywność odwirowania substancji ropopochodnych z próbek modelowych w czasie 30 min. wirowania.

Analiza wpływu temperatury próbek modelowych podczas odwirowywania nie wykazała jej istotnego wpływu na skuteczność separacji substancji ropopochodnych ze środowiska wodnego. Podniesienie temperatury z 20°C do 55°C przyniosło nieznaczne korzyści, jeśli chodzi o stopień odwirowania związków ropopochodnych, jednak różnice te znajdują się w zakresie niepewności pomiarowej dla wybranej metody oznaczania substancji ropopochodnych. Tak niewielkie zmiany w skuteczności odwirowania związków ropopochodnych z wody prowadzą do wniosku, że nie jest ekonomicznie opłacalne zwiększanie temperatury próbek podczas prowadzenia procesu separacji z użyciem wirówki.

Oszacowano eksperymentalnie, że w zakresie separacji TPH te same warunki procesu odwirowania zastosowane dla próbek o stężeniach TPH wysokich (maksymalne stężenie TPH wynosiło 16 mg/l) oznaczają się niższą

efektywnością, natomiast dla próbek o stężeniach niższych (minimalne stężenie TPH wynosiło 2,47 mg/l) efektywnością wyższą.

Separacja mechaniczna z użyciem wirówki środowiskowych próbek wody zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi doprowadziła do zmniejszenia stężenia związków TPH w wodzie do poziomu poniżej Rozporządzenia Ministra Środowiska (2014). Na podstawie wyników badań dotyczących prędkości wirowania w zakresie 1700–3700 obr./min., w czasie 30 min. ze stałą temperaturą próbek 20°C, wyznaczono najbardziej efektywną prędkość obrotową służącą separacji związków ropopochodnych z wody. Wynosiła ona, podobnie jak dla próbek modelowych, 2700 obr./min. W czasie 30 min. odwirowywania próbek znajdujących się w stałej temperaturze 20°C każda z prędkości wirowania spowodowała co najmniej 97-procentowe oczyszczenie skażonych wód. Prędkość 2700 obr./min. spowodowała jednak oczyszczenie wody z substancji ropopochodnych na największym poziomie wynoszącym 99%.

Wpływ wzrostu temperatury na oczyszczanie wody z próbki silnie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi był niewielki przy prędkości obrotowej 2700 obr./min. i czasie wirowania 10 min. Skuteczność oczyszczania wody z TPH dla obu badanych temperatur (20°C i 55°C) jest bardzo podobna. W czasie wirowania 10 min., przy prędkości obrotowej 2700 obr./min. i przy każdej z zadanych temperatur stopień oczyszczania był mniejszy od 95% dla każdej z badanych próbek.

Stwierdzono zależność między początkowym stężeniem substancji ropopochodnych w wodzie i efektywnością odwirowywania. Odwirowywanie próbek wody o początkowych niskich stężeniach TPH dawało większą efektywność. W badanych przedziałach stężeń różnica ta znajdowała się na poziomie 10% (dla skrajnych stężeń).

Odwirowanie jest szybką metodą służącą odseparowaniu substancji ropopochodnych z wody, choć jej efektywność jest niska przy małych prędkościach obrotowych i krótkim czasie pracy. Względy ekonomiczne nie zawsze pozwolą na maksymalizację efektywności wirówki w celu osiągnięcia najlepszego oczyszczenia wody. Z tego powodu rozważa się łączenie różnych metod, aby stopień oczyszczenia wód znajdował się na wysokim poziomie, ale jednocześnie koszty związane z usuwaniem substancji ropopochodnych były minimalizowane.

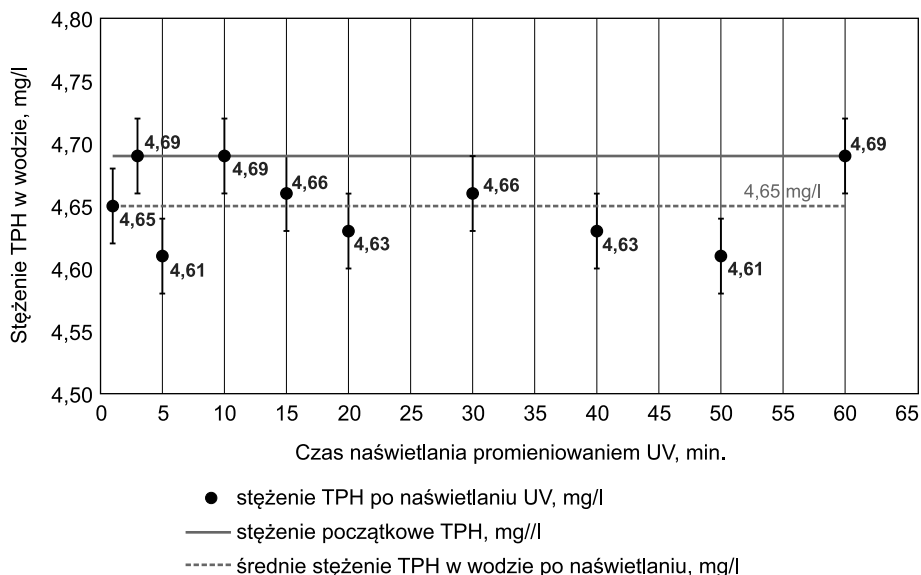
### 5.3. Badania fotochemiczne substancji ropopochodnych

Analizowano kinetykę rozkładu substancji ropopochodnych obecnych w wodzie pod wpływem czynników utleniających z wykorzystaniem UV, TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. Przeprowadzono badania mające porównać wymienione metody i określić ich skuteczność. We wszystkich metodach badano degradację węglowodorów ropopochodnych za pomocą analizy TPH. Wyniki



badania wskazują, że w zależności od zastosowanych warunków utlenienia stężenia związków ropopochodnych ulegają obniżeniu. Wielkość i szybkość tych zmian zależy od rodzaju zastosowanego światła, obecności katalizatora oraz od użytego utleniacza. Na skuteczność oczyszczania wód w tym samym czasie również ma wpływ początkowe stężenie związków znajdujących się w wodzie.

Wodne roztwory związków ropopochodnych poddano działaniu promieniowania UV w różnym czasie naświetlania (rys. 32). Z otrzymanych wyników wynika, że dla zastosowanych warunków utlenienia stężenia badanych substancji ulegają obniżeniu średnio o 0,04 mg/l przy odchyleniu standardowym 0,03 mg/l. Można wnioskować, że badane substancje w niewielkim stopniu ulegały degradacji pod wpływem działania wykorzystanego promieniowania w badanym zakresie czasu. Wyniki badań wskazują, że degradacja TPH w zadanych warunkach nie prowadzi do ich mineralizacji ani do efektywnego obniżania ich stężenia w wodzie.

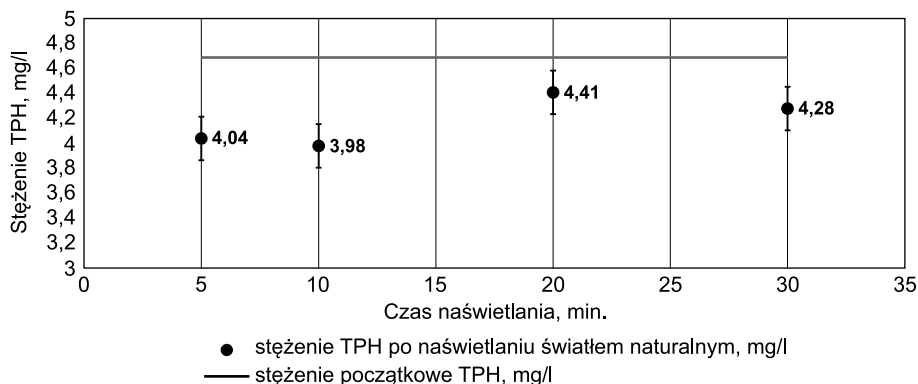


**Rysunek 32.** Stężenie TPH w próbkach pod wpływem zmian czasu ekspozycji na działanie promieniowania UV

Źródło: badania własne.

Badania fotokatalizy z udziałem  $\text{TiO}_2$  przeprowadzono dla wodnego roztworu substancji ropopochodnych oraz ekspozycji na światło naturalne oraz światło UV pochodzące z lampy ksenonowej w różnym czasie. Na pierwszym etapie badań oceniono stopień zmienności TPH w próbkach po czasie ekspozycji 5 min., 10 min., 20 min. i 30 min. na naturalne światło słoneczne. Wyniki tych badań przedstawiono na rys. 33. Zanotowano pewną zmienność w stężeniu

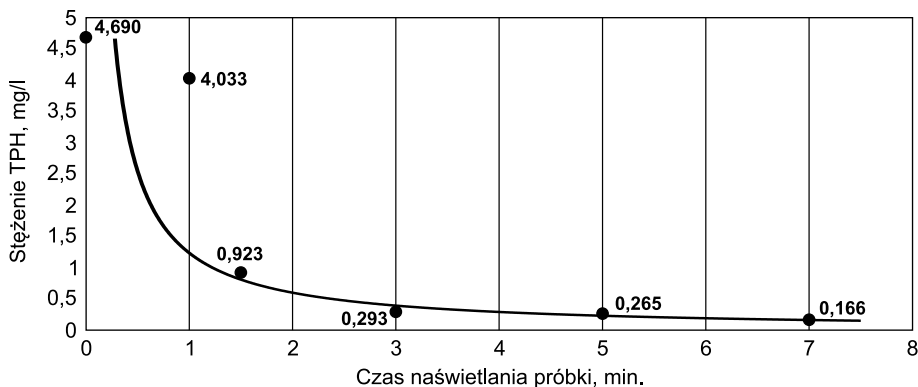
TPH dla każdej z próbek. W porównaniu z wynikami otrzymanymi dla naświetlania promieniowaniem UV można zauważyć, że drugi proces, w którym połączono działanie światła naturalnego i  $\text{TiO}_2$ , pozwolił na niewielkie obniżenie zawartości TPH w wodzie. Pomiar stężenia TPH wykazały wartości nie większe od 4,41 mg/l, podczas gdy w poprzednim badaniu najniższą zanotowaną wartością było stężenie 4,61 mg/l.



**Rysunek 33.** Stężenie TPH w próbkach, w których obecny był  $\text{TiO}_2$ , naświetlanych światłem naturalnym

Źródło: badania własne.

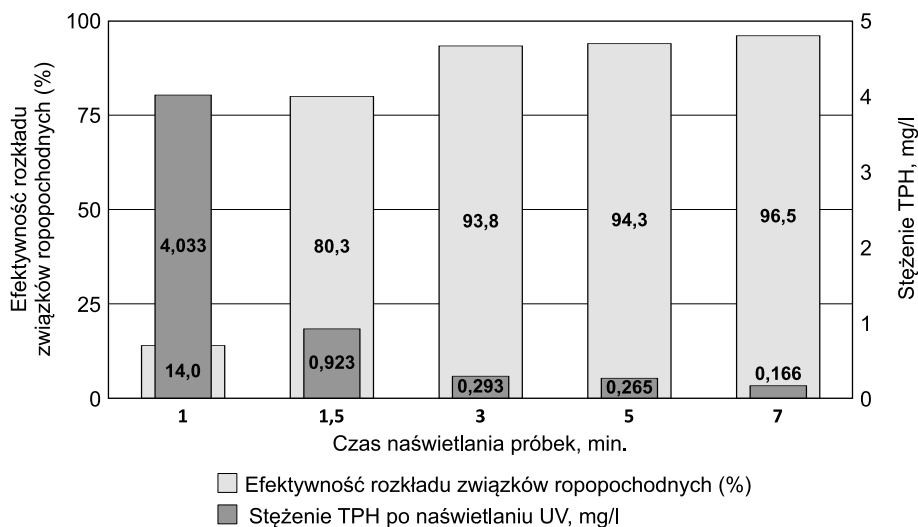
Na kolejnym etapie badań zastosowano proces fotokatalizy z udziałem  $\text{TiO}_2$  oraz promieniowanie UV. Oceniono stopień usunięcia związków ropopochodnych w następujących okresach naświetlania: 1 min., 1,5 min., 3 min., 5 min., 7 min. Największe obniżenie stężeń TPH zaobserwowano na pierwszym etapie prowadzenia procesu naświetlania promieniowaniem UV (rys. 34).



**Rysunek 34.** Zależność czasu naświetlania promieniami UV i stężenia związków TPH obecnych w roztworze z  $\text{TiO}_2$

Źródło: badania własne.

Efektywność reakcji utleniania i redukcji związków w procesie fotokatalizy wzrastała w naświetlanych roztworach wodnych z rozproszonym w układzie  $\text{TiO}_2$  wraz z wydłużaniem czasu naświetlania. Po 3 min. prowadzenia procesu uzyskano niemal 93,8% rozkład związków TPH (rys. 35). Dalsze naświetlanie próbek promieniami UV skutkowało dalszym obniżeniem stężenia badanych substancji, ale już nie tak efektywnym. Po 7 min. zanotowano 96,5% rozkład związków.

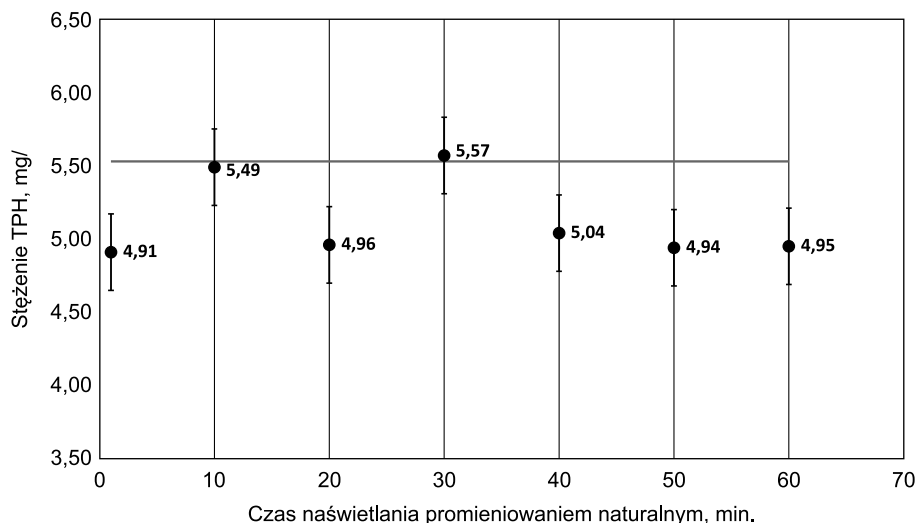


**Rysunek 35.** Zestawienie efektywności rozkładu związków ropopochodnych i stężenia TPH po procesie fotokatalizy pod wpływem promieniowania UV z udziałem  $\text{TiO}_2$

Źródło: badania własne.

W dalszej części badań prowadzono analizę działania ditlenku wodoru na wodne roztwory substancji ropopochodnych. Oznaczono początkowe stężenie TPH w wodzie, które wynosiło 5,53 mg/l. Prowadzono 60-minutowy proces fotochemiczny z udziałem nadtlenu wodoru o stężeniu  $0,05 \text{ mol/dm}^3$  w świetle naturalnym.

Roztwory poddane działaniu naturalnego światła słonecznego wykazywały zmienność zawartości TPH przedstawioną na rys. 36. Po pierwszej minucie zanotowano obniżenie stężenia TPH do wartości 4,91 mg/l. Następnie po 10 min. stężenie TPH wzrosło do 5,49 mg/l, po 20 min. znów obniżyło się do 4,96 mg/l i ponownie wzrosło po 30 min. do 5,57 mg/l. W kolejnych interwałach czasowych: 40 min., 50 min. i 60 min. nastąpiło obniżenie stężenia TPH, które utrzymywało się na wyrównanym poziomie, odpowiednio: 5,04 mg/l, 4,94 mg/l i 4,95 mg/l. Ostateczne zmniejszenie zawartości TPH w próbkach po 60 min. oszacowano na 10,5%. 60-minutowe działanie nadtlenu wodoru o stężeniu  $0,05 \text{ mol/dm}^3$  nie powoduje znaczącej redukcji TPH w badanych próbkach.



**Rysunek 36.** Zmiany stężenia TPH w roztworach z  $H_2O_2$  poddanych działaniu światła naturalnego

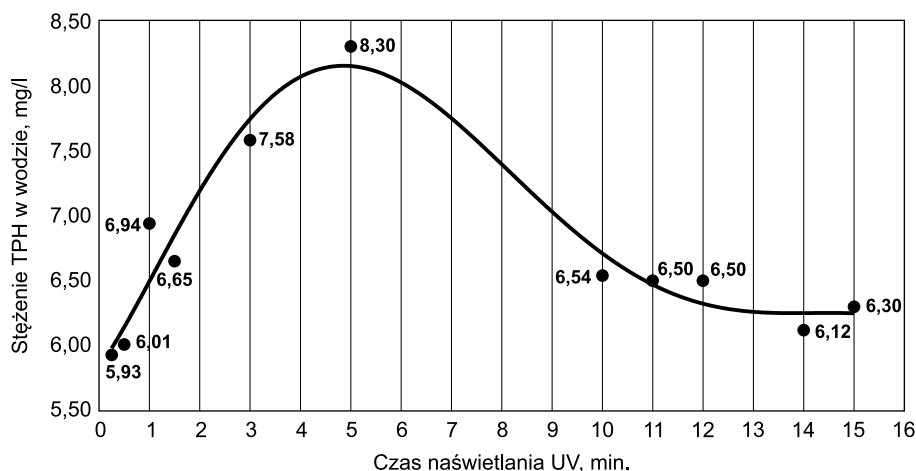
Źródło: badania własne.

W kolejnej części eksperymentu zostały użyte próbki o wyższym stężeniu początkowym TPH, oszacowanym metodą fluorymetryczną na 7,53 mg/l. Woda z drugiego punktu poboru próbek zawierała więcej TPH, została ona więc przeznaczona do badań z użyciem UV ze względu na spodziewany lepszy rezultat usuwania związków ropopochodnych z użyciem  $H_2O_2$  oraz światła UV.

Roztwory poddane działaniu światła UV wykazywały znaczącą zmienność zawartości TPH w czasie przedstawioną na rys. 37. Po 15 s naświetlania próbek zanotowano obniżenie stężenia TPH do wartości 5,93 mg/l. Następnie po 30 s nastąpił wzrost TPH do 6,01 mg/l, po 1 min. dalszy wzrost do 6,94 mg/l, a po 1,5 min. nastąpiło ponowne obniżenie do 6,65 mg/l. W kolejnych badanych czasach naświetlania następował intensywny wzrost zawartości TPH: dla 3 min. – 7,58 mg/l i dla 5 min. – 8,30 mg/l. Po 10 min. zanotowano duże zmniejszenie zawartości TPH do wartości 6,54 mg/l, a po 15 min. niewielkie do 6,30 mg/l. Ostateczne obniżenie zawartości TPH w próbkach po 15 min. oszacowano na 16,3%.

W trakcie pomiarów zanotowano zwiększającą się zawartość TPH w badanych próbkach, aż do przekroczenia stężenia początkowego. Wzrost ten mógł wynikać z działania  $H_2O_2$  oraz promieniowania ultrafioletowego na cięższe frakcje badanych próbek, które pod wpływem czynników fotochemicznych zostawały rozbijane na inne cząsteczki, mniejsze i lżejsze, wykazujące fluorescencję w badanym zakresie fal. Szlaki rozpadu węglowodorów aromatycznych w procesach pogłębionego utleniania są nadal nie do końca poznane i jest niewiele prac wskazujących konkretnie powstające związki

podczas trwania procesów (Thominette, Verdu 1984; Ehrhardt, Petrick 1985; Calvert i in. 2002; Cordeiro, Corio 2009). Badania takie wykonywane są na pojedynczych związkach i konkretnie celowane są na poznanie dróg degradacji tych związków.

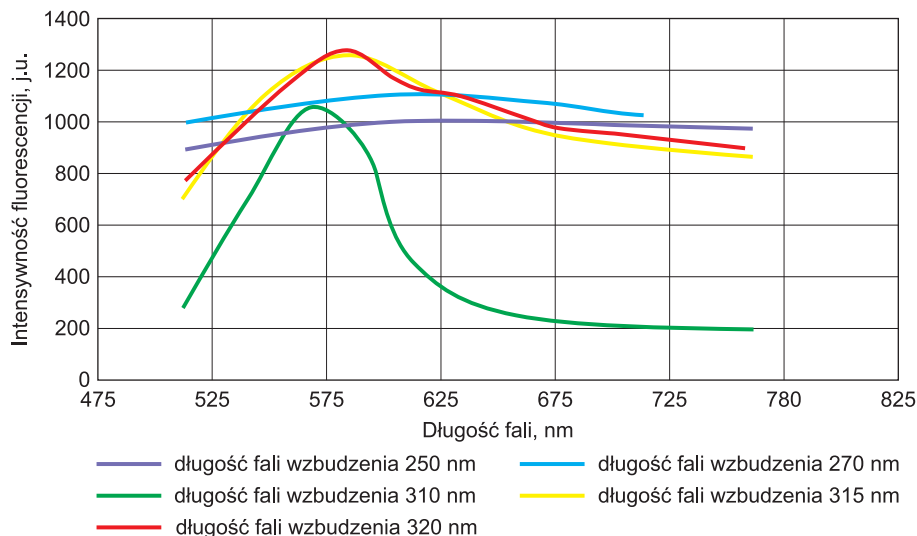


**Rysunek 37.** Stężenie TPH w roztworach z  $H_2O_2$  poddanych działaniu promieniowania UV

Źródło: badania własne.

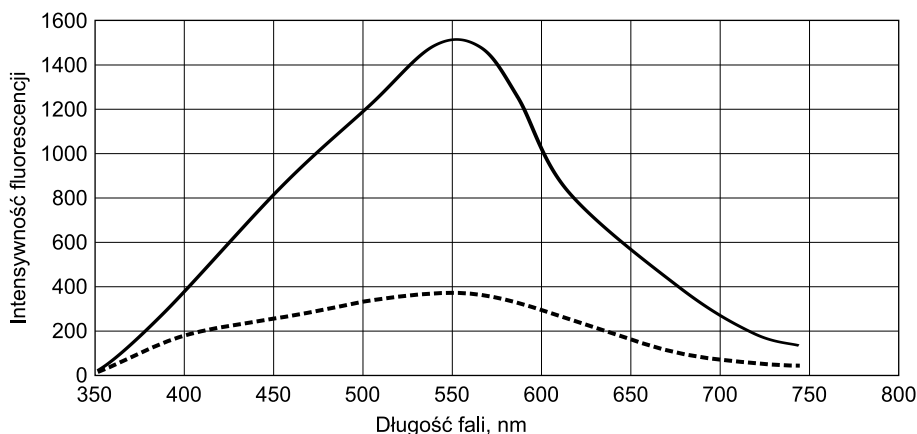
W celu potwierdzenia powyższych wniosków lub ich zaprzeczenia dokonano pomiarów fluorescencji na spektrofлуorymetrze modułowym MSF 101: próbek wyjściowych oraz próbek po procesie fotoutleniania w obecności  $H_2O_2$ . Przebadano je, wykorzystując falę wzbudzenia o długości 310 nm. Długość fali wybrano na podstawie danych literaturowych (Martin, Germain 2008) oraz badań własnych. Długość fali 310 nm daje bardzo dobrą charakterystykę widma – duży skok intensywności fluorescencji umożliwia lepsze rozpoznanie jej zaniku. Intensywność fluorescencji przy różnych długościach fali wzbudzenia dla próbek przed procesem utleniania przedstawiono na rys. 38.

Dla wybranej długości fali wzbudzenia zaobserwowano zmniejszenie intensywności fluorescencji pochodzącej z badanych próbek pojawiającej się przy długości fali emisji 550 nm (rys. 39). Fluorescencja pochodzi od związków występujących w średniej i ciężkiej frakcji ropy naftowej. Zostało to pokazane na rys. 13, gdzie przedstawione są widma wzbudzenia wybranych węglowodorów aromatycznych, oraz na rys. 14, gdzie ukazano widma emisji dla różnych frakcji ropy naftowej. Jako kryterium usuwania TPH z badanych próbek przyjęto wyraźne obniżenie bądź zanikanie sygnałów pochodzących z fluorescencji występującej dla długości fali 550 nm, co uwidocznione jest w widmie zmniejszeniem maksimum funkcji.



**Rysunek 38.** Intensywność fluorescencji przy różnych długościach fali wzbudzenia dla próbek przed procesem utleniania

Źródło: badania własne.



**Rysunek 39.** Intensywność fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 310 nm dla próbek przed procesem utleniania (linia ciągła) i po nim (linia przerywana)

Źródło: badania własne.

Analiza procesu fotochemicznego ( $\text{H}_2\text{O}_2$ /światło widzialne) i fotokatalizycznego ( $\text{TiO}_2$ /światło widzialne) oraz działania wyłącznie światłem UV na próbki wykazała, że te trzy procesy są mało skuteczne w usuwaniu związków TPH z wody w czasie do 60 min.

Udział bezpośredniej fotolizy w procesie rozkładu TPH zależy od początkowego stężenia nadtlenu wodoru. Przedstawione wyniki badań wskazują, że

nadtlenek wodoru jest zbyt słabym czynnikiem utleniającym, aby samodzielnie spowodować rozkład TPH w zadanym układzie modelowym i tym samym doprowadzić do ich usunięcia z roztworu. Degradacja TPH nie poprawia się w wyniku stosowania  $H_2O_2$  jako wyłącznego dodatku do wody zanieczyszczonej badanymi związkami. Zwiększenie szybkości degradacji TPH uzyskano poprzez zastosowanie układu  $H_2O_2$  i światła UV. Ten korzystny efekt obserwowany był dzięki jednoczesnej obecności rodników hydroksylowych  $OH^\bullet$ , które generowane są z nadtlenu wodoru w wyniku promieniowania UV.

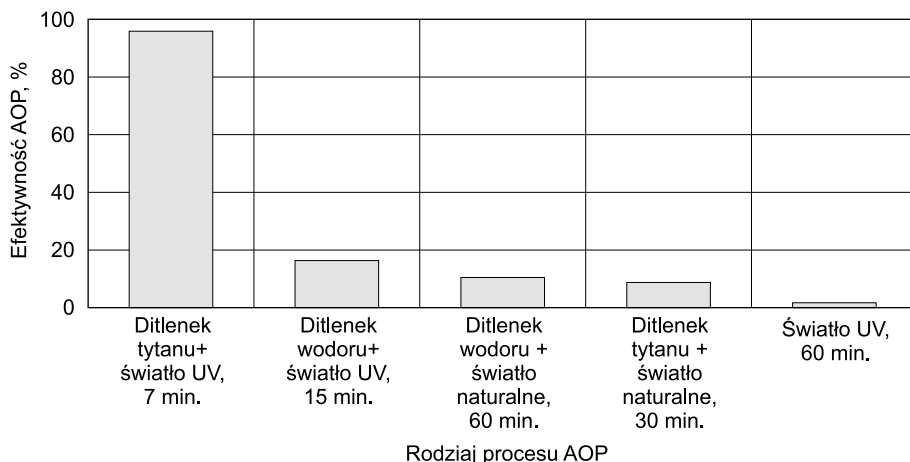
W przypadku degradacji fotochemicznej przy użyciu  $H_2O_2$ /UV zaobserwowano zwiększające się początkowo stężenia TPH i dopiero późniejsze ich zmniejszenie. Można na podstawie dodatkowych badań fluorescencyjnych wnioskować, że następował rozkład związków o większej masie cząsteczkowej, które wykazywały fluorescencję przy długości fali 550 nm. Sugeruje to powstawanie związków pośrednich dających obraz w widmie fluorescencyjnym w zakresie badanych związków TPH. Ze względu na złożoność mieszaniny reakcyjnej w trakcie procesu fotoutleniania generowane były uboczne produkty utleniania i redukcji badanych substancji. W zakresie badań procesów fotochemicznych w literaturze spotyka się głównie opisy procesów utleniania pojedynczych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, uznając je za wskaźnik całej grupy (Jorfi i in. 2013; La Nafie 2014). Podaje się, że produktami utleniania WWA są m.in. diole, chinony, aldehydy, związki metylowe i karboksylowe (Włodarczyk-Makuła 2011).

Rozkład zanieczyszczeń w układzie  $H_2O_2$ /UV jest procesem stosunkowo szybkim oraz – w odpowiednich warunkach – efektywnym, co jest rezultatem wysokiej reaktywności generowanych w układzie rodników hydroksylowych. Należy pamiętać, że skuteczność oczyszczania zapewniana jest głównie ze względu na dostarczanie odpowiedniej ilości energii do układu, ale również z powodu ilości generowanych rodników  $OH^\bullet$  wynikających ze stężenia  $H_2O_2$ . Efektywność procesu  $H_2O_2$ /UV w wodach naturalnych jest zazwyczaj zmniejszona w stosunku do próbek modelowych ze względu na znaczną absorpcję promieniowania przez rozpuszczoną materię organiczną. Jednak z powodu preparatyki niniejszych próbek modelowych można przyjąć, że są one możliwie najwierniejszym odwzorowaniem środowiska.

Główną różnicą pomiędzy degradacją fotochemiczną i fotokatalityczną okazała się skuteczność degradacji TPH w czasie potrzebnym do obniżenia zawartości TPH w badanych roztworach. W przypadku fotokatalitycznego rozkładu skuteczność rozkładu TPH była znacznie wyższa w krótszym czasie, podczas gdy w przypadku fotoutleniania proces degradacji był znacznie dłuższy i mniej skuteczny, a także w znacznych ilościach pojawiły się produkty pośrednie. Proces fotokatalityczny już po 1,5 min. wykazywał skuteczność degradacji TPH 80%, a po 7 min. wynosiła ona już 96,5%. Biorąc pod uwagę zarówno wyniki przeprowadzonych badań, jak i porównując ekonomikę procesu fotokatalitycznego

( $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ) i fotochemicznego ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ), można wnioskować, że przy użyciu tego samego źródła UV proces pierwszy jest bardziej ekonomiczny. Istnieją uzasadnione przesłanki wskazujące, że fotokataliza jest procesem skuteczniejszym w redukcji TPH ze środowiska wodnego, prowadzącym do niemal całkowitej mineralizacji TPH z mniejszymi ilościami produktów pośrednich.

Spośród badanych układów degradacji TPH ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , UV oraz ich kombinacji) najkorzystniejszy okazał się układ  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  przy stężeniu początkowym  $10 \text{ mgTiO}_2/\text{dm}^3$  w zawiesinie reakcyjnej. W układzie  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  również osiągnięto obniżenie zawartości toksycznego zanieczyszczenia, ale nie tak wydajne, jak w przypadku tego pierwszego. Na rys. 40 przedstawiono skuteczność badanych układów w oczyszczaniu roztworów wodnych z TPH na koniec każdego z procesów.



**Rysunek 40.** Skuteczność badanych fotochemicznych metod degradacji TPH z roztworów wodnych

Źródło: badania własne.

Przeprowadzone badania i analiza otrzymanych wyników pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków: W wyniku działania nadtlenu wodoru lub promieniowania UV na substancje TPH praktycznie nie zaobserwowano ich rozkładu. Z kolei połączenie nadtlenu wodoru w stężeniu  $0,05 \text{ mol}/\text{dm}^3$  i promieniowania UV skutkuje obniżeniem stężenia badanych zanieczyszczeń organicznych w roztworze wodnym. Skuteczność degradacji związków TPH z wody w tym układzie wynosi 16,3% po 15 min. Zmniejszanie stężenia TPH jest jednak najszybsze dla układu  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  w stężeniu  $10 \text{ mgTiO}_2/\text{dm}^3$  w roztworze koloidalnym. Po 7 min. zanotowano 96% rozkład związków TPH, przy czym nie osiągnięto całkowitej mineralizacji tej substancji. Stwierdzono, że najskuteczniejszym utleniaczem w stosunku do badanych substancji jest  $\text{TiO}_2$  działający synergicznie z promieniowaniem UV. Porównanie ekonomiki

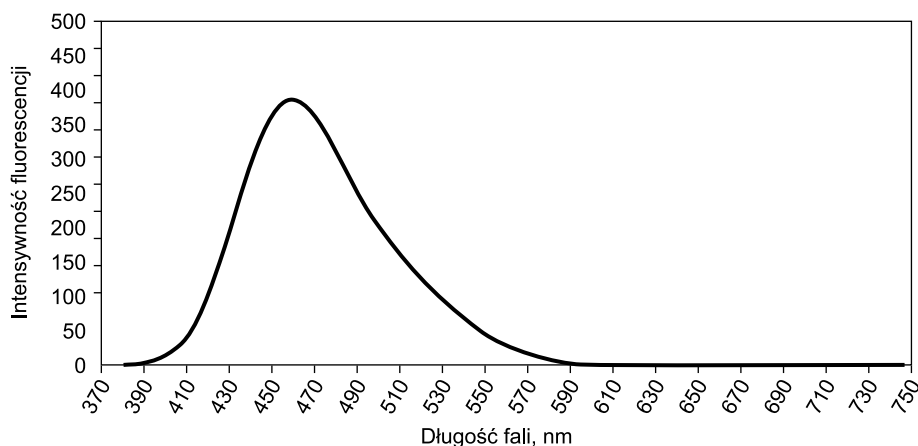


procesu fotochemicznego z udziałem  $H_2O_2$  i fotokatalitycznego z udziałem  $TiO_2$  wykazało, że ten drugi jest bardziej ekonomiczny; można wnioskować, że fotokataliza jest, spośród badanych, najlepszym procesem z mniejszą ilością produktów pośrednich (Wąsowski, Piotrowska 2002).

## 5.4. Badania bioremediacji substancji ropopochodnych

Badania (Gacek, Szopa, Czerniak 2013; Gacek, Czerniak 2019) wykazały obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w okresie letnim, a także sezonową zmienność występowania tych mikroorganizmów w zbiorniku wodnym Bagry. Podczas sezonu letniego przeprowadzono analizę ilościową zawartości bakterii w próbkach pobranych z tego zbiornika. Wykazano obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa* we wszystkich punktach poboru próbek. Do kolejnych badań wybrano jeden z tych punktów. Obliczona metodą Najbardziej Prawdopodobnej Liczby Drobnoustrojów (MPN) liczba jednostek tworzących kolonię wynosiła 146 jtk/100 ml. Przy poziomie ufności 95% zakres jednostek tworzących kolonie znajduje się w przedziale 73,1–101,3 jtk/100 ml. Przykładowy wykres intensywności fluorescencji pochodzącej od badanych bakterii przedstawiono na rys. 41. Maksimum fluorescencji przypada na długość fali  $455 \pm 3$  nm.

W tym samym okresie przeprowadzono równoległe analizę jakościową zawartości TPH w tym samym zbiorniku wodnym. W każdym z punktów poboru próbek wykazano obecność TPH o stężeniu poniżej 2 mg/l. Próbki wody środowiskowej przeznaczone do badań zmodyfikowano według przedstawionej w oddzielnym rozdziale metodyki.



**Rysunek 41.** Intensywność fluorescencji pochodzącej od *Pseudomonas aeruginosa*

Źródło: badania własne.

#### 5.4.1. Skuteczność biodegradacji substancji ropopochodnych w teście statycznym

Skuteczność biodegradacji w przedstawionych poniżej badaniach mierzono, dokonując pomiarów zmieniających się stężeń TPH w próbkach. Podstawowym założeniem było, że im niższe końcowe stężenie TPH, tym nastąpił efektywniejszy proces bioremediacji. Jako drugi wyznacznik skuteczności biologicznego oczyszczania wyznaczono przyrost jtk *Pseudomonas aeruginosa*, co wydaje się logiczną konsekwencją założeń procesów bioremediacji. Dla bakterii, które mają sprzyjające warunki do wzrostu (wystarczającą ilość składników odżywczych oraz możliwość łatwego dostępu do nich, sprzyjającą temperaturę, pH), nastąpi proliferacja komórek mikroorganizmów.

##### *Wpływ stężenia początkowego TPH w wodzie na proces bioremediacji*

Wykazano, że zawartość TPH w wodzie w badanych interwałach czasowych dla próbek inkubowanych w temperaturze 38°C obniża się wraz z czasem. Taka sama tendencja pojawiła się dla próbek pozostających w temperaturze pokojowej 25°C. Po pierwszym tygodniu nastąpiło największe ilościowe zmniejszenie stężenia TPH dla wszystkich początkowych stężeń TPH w próbkach. Dla próbek o początkowym stężeniu 2,50 mg/l, 5,00 mg/l i 7,50 mg/l inkubowanych w temperaturze 38°C wynosiło odpowiednio: 1,87 mg/l, 3,88 mg/l i 6,02 mg/l. Stanowi to redukcję na poziomie 74,8, 77,6 i 80,3% dla próbek o początkowym stężeniu TPH 2,50 mg/l, 5,00 mg/l i 7,50 mg/l.

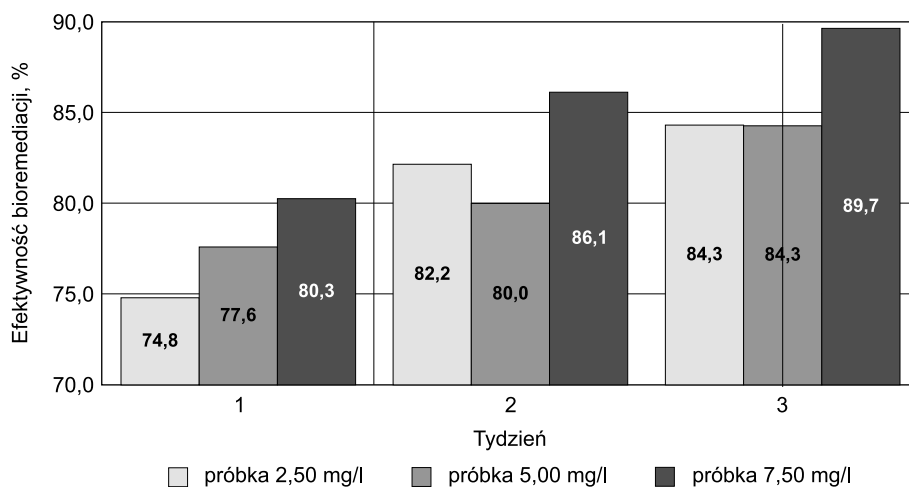
Po drugim tygodniu nastąpiło mniej intensywne obniżanie stężeń TPH. Sumarycznie z pierwszym tygodniem zmniejszenie stężenia dla próbek zawierających początkowo 2,50 mg/l, 5,00 mg/l i 7,50 mg/l TPH wyniosło odpowiednio: 2,05 mg/l, 4,00 mg/l i 6,46 mg/l. Procentowo redukcja ta wyraża się następująco: 82,0, 80,0 i 86,1%. Najniższe wartości zawartości TPH w wodzie zanotowano po trzecim tygodniu inkubacji. Sumaryczne obniżenie TPH w wodzie po trzech tygodniach wynosiło: 2,11 mg/l, 4,21 mg/l i 6,72 mg/l dla próbek o początkowej zawartości TPH odpowiednio: 2,50 mg/l, 5,00 mg/l i 7,50 mg/l. Procentowe obniżenie zawartości TPH po 21 dniach inkubacji znalazło się na poziomie: 84,3, 84,3 i 89,7% dla początkowych stężeń TPH w przedstawionej poprzednio kolejności (od najmniejszego do największego). Najniższą zawartość TPH po trzech tygodniach eksperymentu otrzymano dla próbki o początkowym stężeniu 2,50 mg/l. Wyniki zawartości TPH zaprezentowano w tabeli 17. Procentową efektywność bioremediacji TPH w próbkach w kolejnych tygodniach badania przedstawiono na rys. 42.

Obserwując skuteczność oczyszczania wody w kolejnych tygodniach dla badanych stężeń początkowych TPH, widać, że dla każdej z próbek skuteczność oczyszczania w miarę upływu czasu rosła. Na podstawie wyników przeprowadzonego eksperymentu zauważyć można, że najniższą skuteczność oczyszczania

**Tabela 17.** Zawartość TPH w wodzie w czasie poddania próbek działaniu *Pseudomonas aeruginosa*

Stężenie początkowe TPH próbki, mg/l		Tydzień			
		Wartości początkowe	1	2	3
Zawartość TPH w wodzie, mg/l	2,5	2,50	0,630	0,446	0,392
Obniżenie stężenia TPH, mg/l		–	1,87	2,05	2,11
Zawartość TPH w wodzie, mg/l	5,0	5,00	1,12	1,00	0,786
Obniżenie stężenia TPH, mg/l		–	3,88	4,00	4,21
Zawartość TPH w wodzie, mg/l	7,5	7,50	1,48	1,04	0,776
Obniżenie stężenia TPH, mg/l		–	6,02	6,46	6,72

Źródło: badania własne.

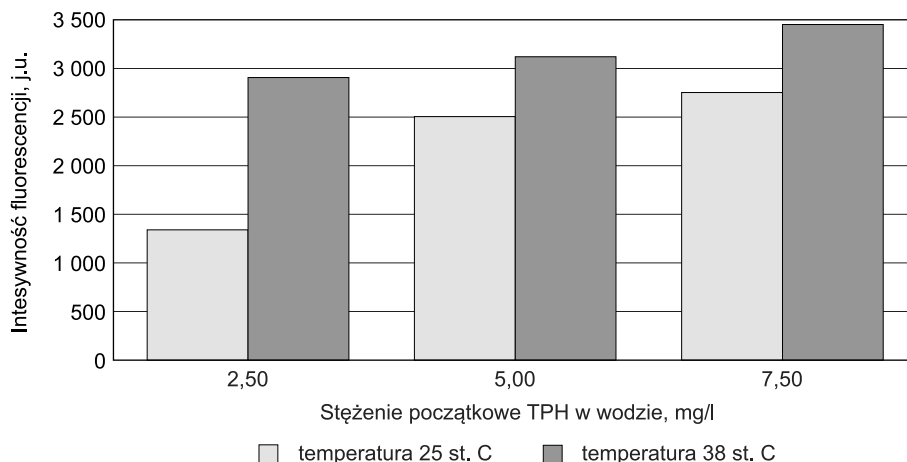
**Rysunek 42.** Skuteczność bioremediacji dla różnych początkowych stężeń TPH

Źródło: badania własne.

miały próbki o najniższym stężeniu początkowym, natomiast najwyższą – te o najwyższym początkowym stężeniu. Wykazano, że w badanym zakresie stężeń im większe stężenie substancji ropopochodnych, tym skuteczniejsze oczyszczanie próbek z TPH. Najwyższą skuteczność bioremediacji w każdym z badanych okresów odnotowano dla początkowego stężenia 7,50 mg/dm<sup>3</sup> (80,3, 86,1 i 89,7%). Dla początkowego stężenia TPH 5,00 mg/dm<sup>3</sup> skuteczność bioremediacji była niższa niż dla stężenia 2,50 mg/dm<sup>3</sup> w 14 dniu eksperymentu (odpowiednio 80,0 i 82,2%). W 21 dniu eksperymentu skuteczność bioremediacji dla tych roztworów znalazła się na tym samym poziomie (84,3%). Wyniki eksperymentu pokazały, że w trakcie trzech tygodni najlepszy efekt uzyskano dla najbardziej stężonej próbki TPH (7,50 mg/l); wynosiła ona 89,7%.

### **Wpływ temperatury inkubacji na proces bioremediacji**

Porównanie intensywności fluorescencji pochodzącej od *Pseudomonas aeruginosa* w temperaturze 25 i 38°C dla trzech początkowych stężeń TPH po trzech tygodniach procesu bioremediacji przedstawiono na rys. 43. Maksymalna fluorescencji przypadały na długość fali 460 nm. Za pomocą metod spektrofotometrycznych dla opisanych wyżej warunków stwierdzono największy wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa* dla temperatury 38°C i stężenia 7,50 mg/l.



**Rysunek 43.** Intensywność fluorescencji pochodzącej od *Pseudomonas aeruginosa* po 21 dniach bioremediacji

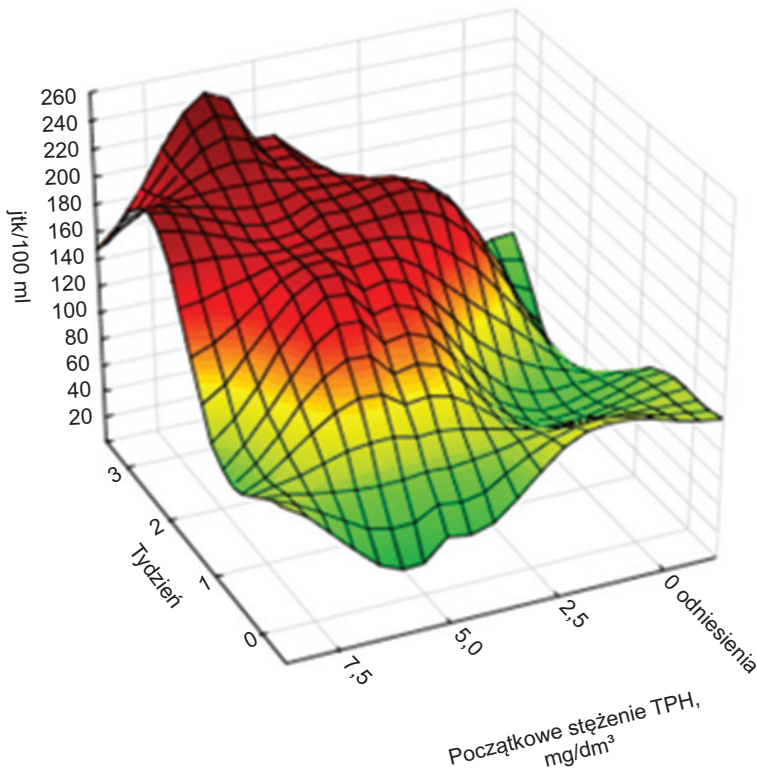
Źródło: badania własne.

Przedstawione dane pokazują, że zarówno temperatura, jak i początkowe stężenie substancji ropopochodnych mają wpływ na wzrost liczby kolonii *Pseudomonas aeruginosa*. Trzy najwyższe wartości intensywności fluorescencji pojawiły się dla bakterii inkubowanych w temperaturze 38°C. Niższe wartości intensywności fluorescencji pochodzącej od bakterii *Pseudomonas aeruginosa* występują dla temperatury inkubacji 25°C. W obu badanych temperaturach inkubacji korelacja wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* i wzrostu stężenia początkowego TPH wyrażona przez intensywność fluorescencji jest dodatnia.

### **Wpływ stężenia początkowego TPH w wodzie na przyrost jtk *Pseudomonas aeruginosa***

Równoległe do badań zawartości związków ropopochodnych w trakcie trwania eksperymentu przeprowadzono analizę zmian zawartości liczby jednostek tworzących kolonię bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w czasie. Obliczona metodą Najbardziej Prawdopodobnej Liczby Drobnoustrojów (MPN) liczba

jednostek tworzących kolonię została przedstawiona na rys. 44. Wartość początkowa dla wszystkich zadanych stężeń substancji ropopochodnych oraz wody bez dodatku jakiegokolwiek pożywki wynosiła 101,3 jtk/100ml. Liczba jtk dla próbki niezawierającej żadnej pożywki obniżyła się w stosunku do wartości początkowej i utrzymywała się na poziomie 83,1 jtk/100 ml od pierwszego do trzeciego tygodnia eksperymentu. Dla stężeń 5,00 mg/l i 7,50 mg/l przyrost jtk odbywał się przez pełne trzy tygodnie do końca eksperymentu. W przypadku stężenia 2,50 mg/l po pierwszym tygodniu przyrost jtk był najmniejszy spośród badanych stężeń i wynosił 109,1 jtk/100 ml. Po drugim tygodniu oszacowano wzrost jtk do 200,5 jtk/100 ml, natomiast po trzecim tygodniu nastąpiło obniżenie jtk do 144,5 jtk/100 ml.

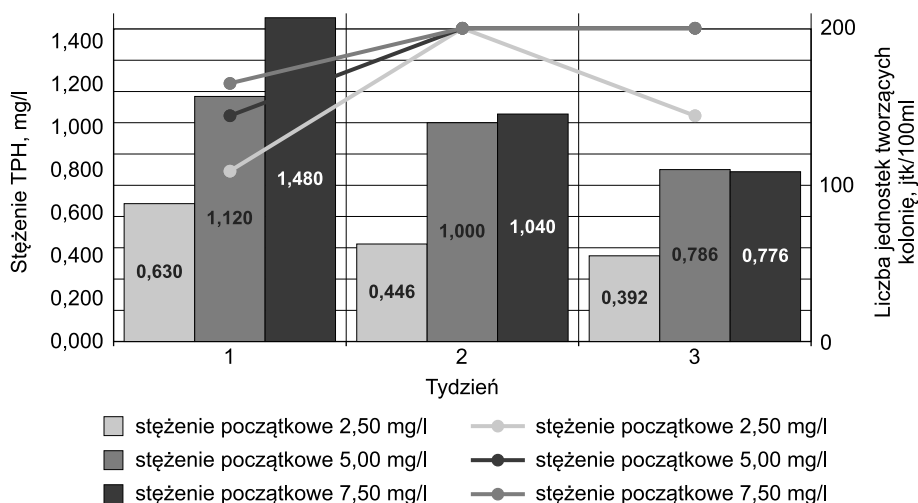


**Rysunek 44.** Zależność wzrostu kolonii bakterii od stężenia początkowego TPH i tygodnia trwania eksperymentu

Źródło: opracowanie własne.

Wyniki wzrostu jtk uzyskane dla poszczególnych próbek w czasie trwania eksperymentu można odnieść do wyników badań zawartości TPH w próbkach w tym czasie. Dla początkowego stężenia TPH w próbce wynoszącego 2,50 mg/l po drugim tygodniu zawartość TPH zmniejszyła się do poziomu

0,446 mg/l. W kolejnych tygodniach następowało jedynie niewielkie obniżenie TPH; ostatecznie po trzecim tygodniu wynosiło 0,392 mg/l. Po pierwszym tygodniu przyrost jtk dla tej próbki był najmniejszy spośród badanych stężeń i wynosił 109,1 jtk/100 ml. Po drugim tygodniu oszacowano wzrost jtk do 200,5 jtk/100 ml, natomiast po trzecim tygodniu nastąpiło zmniejszenie jtk do 144,5 jtk/100 ml. Można wnioskować, że optymalny poziom składników odżywczych w wodzie obniżył się do tego stopnia, że spowodował redukcję ilości bakterii i obniżenie skuteczności bioremediacji, co wyraziło się obniżeniem zawartości TPH oraz jednoczesną redukcją jtk *Pseudomonas aeruginosa*. Graficznie zostało to wyrażone na rys. 45. Wykresy liniowe przedstawiają zmiany zawartości jtk bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, natomiast wykresy kolumnowe – zmiany zawartości TPH w próbkach.



**Rysunek 45.** Zawartość TPH oraz liczba jtk w próbkach w kolejnych tygodniach bioremediacji *Pseudomonas aeruginosa*

Źródło: badania własne.

W przypadku stężeń początkowych TPH w badanych próbkach wynoszących 5,00 mg/l i 7,50 mg/l stężenie TPH po dwóch tygodniach było zbliżone w obu próbkach (1,000 mg/l oraz 1,040 mg/l). Po trzech tygodniach stężenie TPH nadal się obniżało i wyniosło odpowiednio: 0,786 mg/l i 0,776 mg/l. Dla stężeń 5,00 mg/l i 7,50 mg/l przyrost jtk po pierwszym tygodniu wynosił odpowiednio 165,2 jtk/100 ml i 144,5 jtk/100 ml, następnie w kolejnych tygodniach powyżej 200,5 jtk/100 ml dla obu stężeń.

Wyniki badań wskazują na korelację pomiędzy zawartością substancji ropopochodnych w próbkach w trakcie trwania procesu i wzrostem liczby jtk w próbkach.

**Wpływ saponin z *S. mukorossi* na proces bioremediacji**

Kolejne badania dotyczyły wpływu stężenia naturalnych surfaktantów: saponin z *S. mukorossi* na biodegradację mieszaniny węglowodorów ropopochodnych. Próbkę podzielono na dwie grupy – pierwszą z dodatkiem ekstraktów roślinnych z łupin owoców drzewa *S. mukorossi*, drugą bez tego dodatku. Ekstrakt dodano w stężeniu 0,05 g/dm<sup>3</sup>. Wyróżniała go wysoka zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego roztworów wodnych, co przedstawiono w tabeli 18. Badania prowadzono w temperaturze 38°C.

**Tabela 18.** Napięcie powierzchniowe w badanych grupach

	<b>Grupa pierwsza (z dodatkiem ekstraktu)</b>	<b>Grupa druga (bez dodatku ekstraktu)</b>
Napięcie powierzchniowe, N/m	40·10 <sup>-3</sup>	70·10 <sup>-3</sup>

Źródło: badania własne.

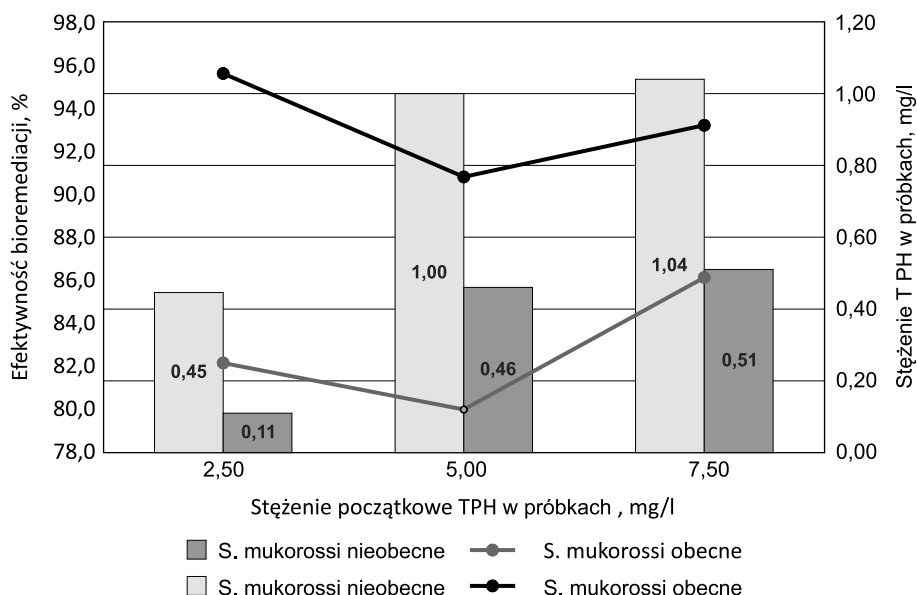
Obliczona metodą Najbardziej Prawdopodobnej Liczby Drobnoustrojów (MPN) liczba jednostek tworzących kolonię po pierwszym, drugim i trzecim tygodniu była bardzo wysoka: powyżej 200,5 jtk/100 ml dla wszystkich badanych stężeń. Już po drugim tygodniu eksperymentu zawartość TPH w próbkach o początkowym stężeniu roztworu substancji ropopochodnych 2,50 mg/l, 5,00 mg/l i 7,50 mg/l inkubowanych w 38°C zawierających ekstrakt saponin została mocno obniżona do odpowiednio: 0,11 mg/l, 0,46 mg/l i 0,51 mg/l. Zostało to przedstawione na rys. 46 za pomocą wykresu kolumnowego. Po trzecim tygodniu eksperymentu nie zarejestrowano zmian w ilości TPH (zmierzone różnice stężeń mieściły się w zakresie niepewności standardowej metody). Skuteczność bioremediacji była najwyższa dla stężenia 2,50 mg/l (95,6%), natomiast dla stężeń 5,00 mg/l i 7,50 mg/l odpowiednio wynosiła 90,8 i 93,2% (wykres liniowy).

W próbkach bez dodatku ekstraktu zarejestrowano niższą skuteczność bioremediacji, która wynosiła dla początkowych stężeń TPH 2,50 mg/l, 5,00 mg/l i 7,50 mg/l odpowiednio: 82,2, 80,0 i 86,1% (wykres liniowy). Natomiast stężenie TPH obniżyło się do odpowiednio: 0,45 mg/l, 1,00 mg/l i 1,04 mg/l (wykres kolumnowy).

Dane otrzymane na podstawie przeprowadzonego eksperymentu oraz wiedzy literaturowej mogą prowadzić do wniosku, że dla każdego początkowego stężenia substancji ropopochodnych w zakresie 2,50 mg/l–7,50 mg/l dodatek ekstraktu z łupin owoców drzewa *Sapindus mukorossi* wspomagał aktywność metaboliczną szczepów bakteryjnych *Pseudomonas aeruginosa*. Efektywność bioremediacji znacząco wzrosła dla próbek z dodatkiem zastosowanych saponin w porównaniu z tymi bez dodatku surfaktantu.

Uzyskane wyniki pozwoliły zaobserwować podatność związków z grupy węglowodorów ropopochodnych, określonych jako TPH, na biologiczne

usuwanie. Bakterie występujące naturalnie w badanym zbiorniku wodnym, *Pseudomonas aeruginosa*, były w stanie skutecznie przeprowadzić bioremediację substancji ropopochodnych w modelowej postaci (olej półsyntetyczny:benzyna w stosunku 1:25). Wzrost bakterii w pożywce płynnej spreparowanej do celów badawczych tej pracy, zawierającej substancje ropopochodne, wskazuje na zdolność przyswajania węgla z substancji ropopochodnych przez bakterie. Potwierdzają to wyznaczone liczby bakterii dla wód bez dodatku substancji ropopochodnych, które są niższe w porównaniu z wodami z dodatkiem substancji ropopochodnych (odpowiednio: 83,1 jtk/100 ml oraz 109,1 jtk/100 ml do 200,5 jtk/100 ml i powyżej). O przebiegu procesu bioremediacji świadczy również obniżenie stężenia TPH podczas trwania eksperymentu. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* występujące naturalnie w zbiorniku wodnym były w stanie skutecznie przeprowadzić bioremediację substancji ropopochodnych w różnych warunkach: temperaturze 25 i 38°C, pH w zakresie 5–6, czasie 1–3 tygodni oraz przy napięciu powierzchniowym 0,04 N/m i 0,07 N/m.



**Rysunek 46.** Skuteczność bioremediacji i stężenie TPH po drugim tygodniu eksperymentu – próbki z dodatkiem oraz bez dodatku *S. mukorossi*

Źródło: badania własne.

Określono podatność TPH na rozkład biologiczny w obecności *S. mukorossi* dla dwóch temperatur panujących w układzie w obecności *Pseudomonas aeruginosa*. Założone stężenia miały na celu odzwierciedlenie przewidywanych wielkości stężeń TPH znajdujących się w środowisku wodnym oraz zbadanie wpływu początkowego stężenia TPH na efektywność ich rozkładu. Analizując ogólną



liczbę bakterii, zaobserwowano, że w wariancie z dodatkiem saponin z *S. mukorossi* liczba bakterii już po pierwszym tygodniu eksperymentu aż do końca trzeciego tygodnia osiągnęła maksymalną, możliwą do stwierdzenia poprzez zastosowaną metodę, wartość, co wskazuje na zachodzenie procesu biodegradacji węglowodorów, które były podstawowym substratem w hodowli. W wariancie bez dodatku saponin liczba bakterii rosła, jednak wolniej niż w próbkach z saponinami. Obserwacje te wskazują, że saponiny wpływały korzystnie na proces biodegradacji węglowodorów ropopochodnych poprzez obniżenie napięcia powierzchniowego układu i zwiększenie solubilizacji węglowodorów. Bakterie w trakcie trwania eksperymentu musiały uruchomić własne mechanizmy ułatwiające im pobieranie hydrofobowego substratu. Potwierdzeniem tego może być analizowane równoległe stężenie TPH w próbkach. Mniejsza skuteczność bioremediacji wnioskowana na podstawie badanych stężeń TPH w doświadczeniu bez saponin wraz z mniejszym przyrostem mikroorganizmów wskazuje, że proces biodegradacji związków ropopochodnych przebiegał wolniej w porównaniu z hodowlą z saponinami.

Wprowadzenie do hodowli bakteryjnych ekstraktu z łupin owoców *Sapindus mukorossi* pozwoliło na obniżenie napięcia powierzchniowego wody i zwiększenie efektywności biodegradacji przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. W obecności ekstraktu już po dwóch tygodniach eksperymentu o ponad 10% wzrastała biodegradacja TPH przy stężeniach początkowych 2,50 mg/l i 5,00 mg/l i niecałe 10% dla stężenia 7,50 mg/l. Badania te wykazały, że badane *Pseudomonas aeruginosa* skuteczniej rozkładały TPH w obecności *S. mukorossi*. Uzyskany stopień biodegradacji w obecności saponin po dwóch tygodniach eksperymentu był lepszy niż w przypadku braku ekstraktu z saponin po trzech tygodniach.

Na podstawie analizy przeprowadzonych badań wyznaczono najskuteczniejsze warunki oczyszczania wód w obecności *Pseudomonas aeruginosa* bez dodatku ekstraktu obniżającego napięcie powierzchniowe: temperatura inkubacji 38°C, czas trwania procesu: 3 tygodnie, stężenie początkowe roztworu substancji ropopochodnych 7,50 mg/l. Najlepsze warunki dla oczyszczania wód w obecności *Pseudomonas aeruginosa* przy obniżonym napięciu powierzchniowym do 0,04 N/m przez ekstrakt roślinny z łupin owoców *Sapindus mukorossi* przedstawiają się następująco: temperatura inkubacji 38°C, czas trwania procesu 2 tygodnie, stężenie początkowe roztworu substancji ropopochodnych 2,50 mg/l.

Należy zwrócić uwagę, że właściwości powierzchniowo czynne oraz wpływ na aktywność metaboliczną szczepów bakteryjnych w przypadku ekstraktów stanowią interesującą alternatywę dla syntetycznych surfaktantów. Wyniki badań wskazały, że poziom mierzonych TPH obniża się wraz z czasem trwania procesu biodegradacji. Wyniki te są istotne z perspektywy planowania procesów bioremediacji. W zależności od oczekiwanych efektów można przeprowadzać bioremediację, zadając początkowe wyższe lub niższe stężenia TPH.

## 6. Modelowe układy hybrydowe

Odpowiedni dobór metod usuwania związków ropopochodnych ze środowiska wodnego pozwala na opracowanie efektywnych układów oczyszczania. Czynnikiem decydującymi o ostatecznej skuteczności całego systemu hybrydowego są ponadto:

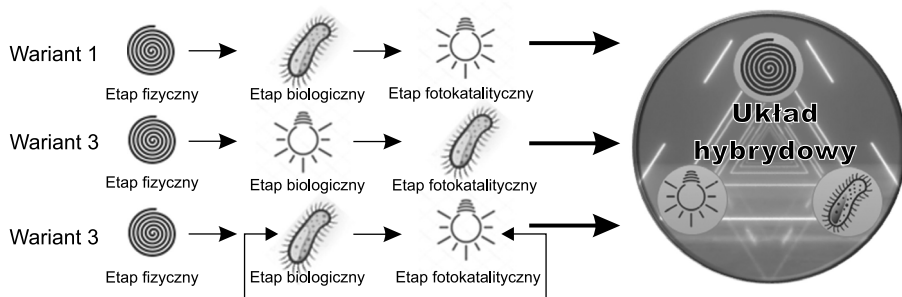
- zoptymalizowanie kolejności procesów;
- regulacja parametrów technologicznych (tj. temperatury, czasu trwania procesu, pH, napięcia powierzchniowego środowiska wodnego, stężenia substancji wspomagających oczyszczanie, rodzaju mikroorganizmów);
- konfiguracja odpowiedniej sekwencji i powtórzeń poszczególnych procesów oczyszczania.

Podstawowym celem przy projektowaniu układu hybrydowego jest osiągnięcie najlepszej wydajności, współdziałania poszczególnych procesów i maksymalizacja ich sprawności.

W tej książce na podstawie wyników badań w skali laboratoryjnej przeanalizowano procesy: separacji mechanicznej z użyciem wirówki, fotochemicznej degradacji oraz bioremediacji. Możliwe lokalizacje etapów fizykochemicznego oraz biologicznego zilustrowano na rys. 47. Spirala oznaczono wirowanie, symbolem insekta oznaczono etap mikrobiologiczny, natomiast za pomocą symbolu źródła światła przedstawiono etap AOP. Dwa warianty to zintegrowane rozwiązania szeregowe, natomiast trzeci jest wariantem z recyrkulacją oczyszczanych wód. Symbolem trójkąta po prawej stronie oznaczono model układu hybrydowego.

W każdym z trzech modeli (rys. 47) na początkowym etapie układu hybrydowego umieszczono proces separacji mechanicznej z użyciem wirówki. Metoda ta jest najprostszą i wysoko skuteczną metodą separacji substancji ropopochodnych z wody. W trakcie wirowania trwającego 30 min. w temperaturze pokojowej i przy prędkości obrotowej 2700 obr./min. można osiągnąć, jak wykazano w badaniach, 99% skuteczność oczyszczenia wody z TPH. Supernatant należy oddzielać w ilości 80% objętości z górnej części odseparowanej wody ze względu na możliwość przypadkowego zmieszania części odwirowanej. Na

podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że woda o zawartości TPH 8,75 mg/l po odwirowaniu zawiera ich 0,063 mg/l. Takie stężenie znajduje się znacznie poniżej dopuszczalnych wartości granicznych stężeń związków ropopochodnych mogących pozostawać w wodzie (Dz.U. z 2016 r. poz. 1187). Pozostaje jednak pozostała część wody wraz z sedymenem, która przeznaczona zostaje do kolejnych etapów oczyszczania.



**Rysunek 47.** Warianty schematu technologicznego dla oczyszczania wód ze związków ropopochodnych tworzące układy hybrydowe

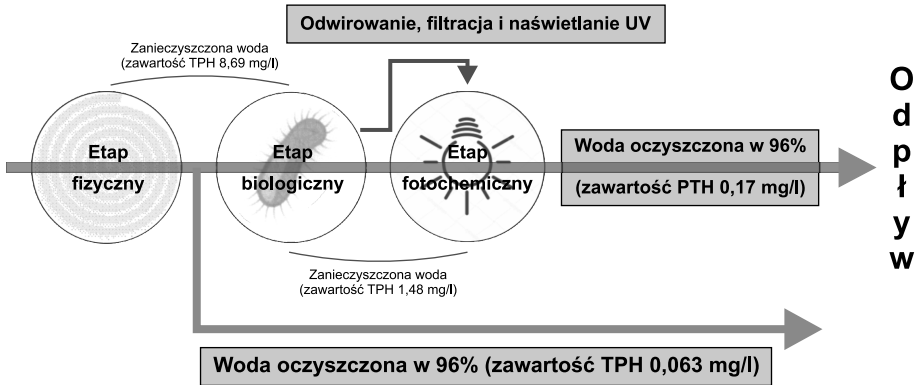
Źródło: opracowanie własne.

### **Wariant pierwszy**

W pierwszym modelu układu hybrydowego drugim etapem jest proces bioremediacji (rys. 48). W związku z wysoką zawartością TPH w sedymencie należy rozpatrywać bioremediację podobną do przeprowadzonej na modelowych próbkach o stężeniu wyjściowym 7,50 mg/l. W przypadku związków TPH degradowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* proces bioremediacji prowadzony w temperaturze 38°C, w obecności 0,05 g/dm<sup>3</sup> ekstraktów roślinnych z łupin owoców drzewa *S. mukorossi* oraz pH utrzymywanym w granicach 5–6, po pierwszym tygodniu, w zależności od początkowego stężenia TPH, doprowadził do usunięcia 75–80% węglowodorów ropopochodnych. Kolejne dwa tygodnie przyniosły zmianę jedynie o niecałe 10%, obniżając średnio stężenie TPH do poziomu 0,776 mg/l. Takie stężenie TPH w wodzie nie jest jednak wartością oczekiwaną, gdyż wartością krytyczną zgodną z rozporządzeniem (Dz.U. z 2016 r. poz. 1187) jest 0,2 mg/l.

Poziomy stężenie TPH po każdym tygodniu bioremediacji i odpowiadające im efektywności bioremediacji przedstawiono w tabeli 19. Najwyższą skuteczność oczyszczania wody w badanych okresach wykazano dla czasu trzech tygodni (niespełna 90%). W warunkach laboratoryjnych, ze względu na konieczność utrzymywania podwyższonej temperatury podczas bioremediacji, proces ten okazał się kosztowny. Zauważyć jednak należy, że w skali przemysłowej zbiorniki wodne przeznaczone do oczyszczania wód z udziałem

mikroorganizmów byłyby znacznie większe. Dzięki temu utrzymanie stałej temperatury staje się łatwiejsze i tańsze. Dodatkowo zastosowanie odpowiedniego płaszcza izolacyjnego również przyczyniłoby się do zmniejszenia kosztów procesu.



**Rysunek 48.** Schemat pierwszego wariantu technologicznego oczyszczania wód z TPH

Źródło: opracowanie własne.

**Tabela 19.** Średnie wartości zawartości TPH w wodzie po kolejnych tygodniach bioremediacji

Stężenie początkowe, mg/l	1 tydzień		2 tydzień		3 tydzień	
	Stężenie TPH, mg/l	Efektywność bioremediacji, %	Stężenie TPH, mg/l	Efektywność bioremediacji, %	Stężenie TPH, mg/l	Efektywność bioremediacji, %
7,50	1,480	80,3	1,040	86,1	0,776	89,7

Źródło: opracowanie własne.

Trzecim etapem pierwszego modelu hybrydowego był proces fotokatalityczny. Może on być potencjalnie korzystnym rozwiązaniem rozkładu związków TPH z wody, jeśli zużycie energii w takim procesie będzie niższe niż dla procesu biologicznego przy tych samych efektach oczyszczania. Biorąc pod uwagę warunki prowadzenia procesu bioremediacji, a przede wszystkim temperaturę podwyższoną do 38°C w celu szybszego namnożenia bakterii, można stwierdzić, że pierwsze siedem dni bioremediacji dają wystarczającą efektywność degradacji TPH z wody w aspekcie zużycia energii potrzebnej do podtrzymywania tego procesu. Wniosek ten ma swoje źródło w wynikach badań otrzymanych dla procesów fotochemicznych, gdyż znacznie lepsze efekty dalszej degradacji

uzyska się w procesie fotokatalitycznym. Wówczas celowe jest zastosowanie rozwiązania polegającego na wprowadzeniu procesu fotokatalizy jako końcowego etapu oczyszczania wód.

W zintegrowanych układach biologiczno-chemicznych można wykorzystać fotokatalizę z użyciem  $\text{TiO}_2$  lub chemiczne utlenianie z dodatkiem  $\text{H}_2\text{O}_2$ , które byłyby stosowane do rozkładu bardzo toksycznych lub trudno degradowalnych zanieczyszczeń. Należy mieć na uwadze to, w jakim stopniu dobór utleniacza może zwiększyć stopień degradacji zanieczyszczeń. Spośród badanych fotochemicznych układów degradacji TPH ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , UV oraz ich kombinacji) najkorzystniejszy okazał się układ  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  przy stężeniu początkowym  $10 \text{ mgTiO}_2/\text{dm}^3$  w zawiesinie reakcyjnej.

Efektywność reakcji fotodegradacji związków TPH z wody w procesie fotokatalizy z rozproszonym w układzie  $\text{TiO}_2$  osiągnęła 96% po 7 min., co odpowiadało końcowemu stężeniu TPH w wodzie  $0,166 \text{ mg/l}$ . Wartość ta jest mniejsza od dopuszczalnej przez Rozporządzenie (Dz.U. z 2016 r. poz. 1187). Ostatecznie uzyskano więc efekt zamierzony, czyli usunięcie związków ropopochodnych reprezentowanych przez TPH ze środowiska wodnego i oczyszczenie go w stopniu dopuszczalnym przez Ustawodawcę.

Zgodnie z przedstawioną powyżej analizą okazuje się, że proces fotokatalizy z użyciem  $\text{TiO}_2$  jest dużo szybszą i skuteczniejszą metodą usuwania substancji ropopochodnych z wody. W warunkach laboratoryjnych koszty generowane przez wysokociśnieniową lampę UV o dużej mocy są znikome w porównaniu z energią potrzebną do długotrwałego procesu bioremediacji. Jednak próbki użyte do badań laboratoryjnych miały niewielką objętość, więc proces fotolizy mógł zajść bardzo szybko. Rozważając natomiast skalę przemysłową, trzeba odpowiedzieć sobie na pytanie, jakie koszty generowałoby takie źródło światła użyte do bardzo dużych objętości wód. Po pierwsze, proces fotokatalizy zachodzi w warstwach przypowierzchniowych, a więc zbiorniki musiałyby być bardzo rozległe i płytkie. Liczba lamp UV potrzebnych do naświetlenia dużej powierzchni wody wzrosłaby, przez co generowane byłyby większe koszty, nawet przy krótkim czasie naświetlania. Po drugie, należy zwrócić uwagę na zawartość w wodach dodatku fotokatalizatora – ditlenku tytanu (IV). Woda po procesie fotokatalizy musi być również oczyszczona z tego związku. Należy więc uwzględnić dodatkowe koszty separacji, np. mechanicznej z użyciem membran. Powoduje to kolejne dodatkowe koszty.

### ***Wariant drugi***

W drugim wariantcie modelu hybrydowego zmieniono kolejność procesów bioremediacji i fotokatalizy. Zgodnie z takim schematem postępowania woda po procesie odwirowania trafia do zbiorników, w których zostaje poddana promieniowaniu UV w obecności  $\text{TiO}_2$ . Nie zbadano wpływu ditlenku tytanu (IV)

na skuteczność procesu bioremediacji. W rozważaniach dotyczących drugiego modelu układu hybrydowego należy przyjąć, że woda po procesie fotokatalizy zostaje oczyszczona z dodatku fotokatalizatora. Tak więc zarówno w tym wariantcie, jak i w poprzednim należy zwrócić uwagę na dodatkowe koszty związane z procesami separacji użytego związku. Proces bioremediacji również nie jest wolny od tego typu problemów. Woda, która zostaje oczyszczona przez mikroorganizmy, zwiera dużą ich liczbę w swojej objętości. Badane *Pseudomonas aeruginosa*, mimo że wykazują doskonałą skuteczność degradacji związków ropopochodnych, są równocześnie bardzo szkodliwe dla ludzi, szczególnie z obniżoną odpornością.

### **Wariant trzeci**

W trzecim wariantcie przedstawiono model hybrydowy z recyrkulacją oczyszczanych wód. Powstał on na bazie pierwszego modelu. Woda, która nie została oczyszczona w sposób odpowiadający regulacjom prawnym, wracałaby w trybie ciągłym do etapu procesu bioremediacji. Wariant ten okazuje się o tyle niekorzystny, że woda po procesie naświetlania musiałaby zostać oczyszczona z obecności fotokatalizatora, a dopiero w dalszej kolejności być przekazana do zbiorników, gdzie prowadzona jest degradacja zanieczyszczeń przez mikroorganizmy. Biorąc pod uwagę warunki laboratoryjne, nie jest to wariant opłacalny. Stężenie TPH po procesie fotokatalizy znajdowało się poniżej wartości dopuszczalnych. Jednak w warunkach przemysłowych sytuacja może wyglądać inaczej. Jak wykazano w badaniach, podczas przebiegu procesów fotokatalitycznych może dochodzić do powstania związków pośrednich. Te uboczne produkty procesów fotolitycznych mogą pojawiać się w większej ilości podczas przemysłowego oczyszczania wód. Dodatkowo wiele z węglowodorów ropopochodnych jest trudno degradowalnych dla bakterii. Dzięki systemowi z recyrkulacją wody po procesie fotokatalizy związki te zostają przekształcone w inne, które mogą okazać się lepiej przyswajalne przez mikroorganizmy. Zawracając wodę do etapu biologicznego, uzyskać można zatem lepszą efektywność całego układu.

Opisane powyżej trzy modele układów hybrydowych są układami niewielkich rozmiarów, rozważanymi w skali laboratoryjnej. Należy zwrócić uwagę, że w procesach oczyszczania skala ma istotne znaczenie. Badania laboratoryjne dają obraz możliwości wykorzystania poszczególnych metod – pojedynczych lub połączonych w układy – jednak w skali przemysłowej mogą pojawić się dodatkowe problemy. Nie podważa to jednak istotności badań w małym zakresie, które zawsze stają się przyczynkiem do rozwiązania olbrzymich problemów, wśród których niewątpliwie znajduje się kwestia czystości i jakości wód. W ramach podsumowania w tabeli 20 przedstawiono zalety oraz wady poszczególnych etapów procesów oczyszczania wód, które omówione zostały w tej książce.

Tabela 20. Zestawienie wad i zalet procesów oczyszczania wód






Proces	Wady	Zalety
Wirowanie 	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wzrost kosztów wraz ze wzrostem prędkości obrotowej</li> <li>– wzrost kosztów w przypadku długotrwałego wirowania</li> <li>– możliwość pojawienia się dyspersji wtórnej w wyniku ścinania cząstek oleju</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysoka skuteczność oddzielania substancji olejowych</li> <li>– rozdzielane substancje mogą niewiele różnić się gęstością</li> <li>– zazwyczaj krótki czas wirowania</li> <li>– proces szybszy od sedimentacji</li> <li>– prosta zasada działania</li> <li>– najwyższa efektywność wśród technologii separacji mechanicznej</li> <li>– w porównaniu z innymi separatorami zajmują mało miejsca</li> </ul>
Fotokataliza 	<ul style="list-style-type: none"> <li>– w reakcjach z użyciem niskociśnieniowych lamp rtęciowych efektywność degradacji jest bardzo niska</li> <li>– wysoka cena generowania promieniowania UV (mniej znacząca przy ogólnie rosnących kosztach oczyszczania)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– możliwość usuwania zanieczyszczeń, a nawet pełnej ich mineralizacji, bez przenoszenia ich do innej fazy</li> <li>– przebiegają w warunkach temperatury i ciśnienia panujących w otoczeniu</li> <li>– mogą być stosowane nawet w przypadku niewielkich stężeń toksycznych substancji</li> <li>– generowane reaktywne cząsteczki tlenowe mają też udział w samooczyszczaniu środowiska wodnego drogami niebiologicznymi</li> </ul>
Fotokataliza 	<ul style="list-style-type: none"> <li>– mogące się pojawiać produkty odpadowe w przypadku zbyt krótkiego czasu naświetlania</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– szybkość degradacji pod wpływem promieniowania UV związków niepolarnych, jak WWA, w małym stopniu zależy od pH środowiska</li> <li>– szybka i skuteczna degradacja związków ropopochodnych w obecności <math>\text{TiO}_2</math></li> </ul>
Bioremediacja 	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Pseudomonas aeruginosa</i> znane są ze swej zjadliwości i stanowią zagrożenie dla osób o obniżonej odporności</li> <li>– ograniczenie tylko do tych substancji, które są rozkładalne przez mikroorganizmy</li> <li>– mogą powstać produkty odporne na rozkład oraz toksyczne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– proces naturalny, ekonomiczny, tańszy niż stosowane dotychczas metody oczyszczania wód</li> <li>– proces likwidacji skażenia może być prowadzony <i>in situ</i> (co prowadzi do znacznego obniżenia kosztów)</li> <li>– w procesie likwidacji skażenia nie są wytwarzane szkodliwe związki wydzielane do wód (bakterie rozkładają</li> </ul>

Tabela 20 – cd.

Proces	Wady	Zalety
Bioremediacja 	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wymaga odpowiedniej populacji mikroorganizmów</li> <li>– trudno ocenić warunki funkcjonowania procesu w dużej skali</li> <li>– czas przebiegu jest zazwyczaj dłuższy niż w innych technologiach</li> <li>– potrzeba utrzymania wysokiej temperatury (optymalna dla wzrostu drobnoustrojów wynosi blisko 40°C)</li> </ul>	składniki zanieczyszczeń do obojętnych dla środowiska dwutlenku węgla i wody) <ul style="list-style-type: none"> <li>– technologia ta nie wymaga stosowania kosztownej i skomplikowanej aparatury</li> <li>– metoda nie wymaga wprowadzenia do środowiska przyrodniczego żadnych związków chemicznych, które mogłyby wchodzić w reakcje czy też ulegać akumulacji w glebie, przez co proces ten jest przyjazny dla środowiska</li> <li>– <i>Pseudomonas aeruginosa</i> występują naturalnie w zbiornikach wodnych użytkowanych przez ludzi i zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi</li> <li>– <i>Pseudomonas aeruginosa</i> jest jednym z niewielu gatunków bakterii, których skuteczność w bioremediacji substancji ropopochodnych została udowodniona</li> </ul>

Źródło: opracowanie własne.

Biorąc pod uwagę zbliżone warunki prowadzenia procesów pojedynczych metod oraz wybranego wariantu metody hybrydowej (wariant pierwszy, który w skali laboratoryjnej okazał się najlepszy), badania wykazały następującą skuteczność oczyszczania wód ze związków ropopochodnych (tabela 21):

Tabela 21. Porównanie skuteczności oczyszczania wód ze związków ropopochodnych

Proces oczyszczania wód ze związków ropopochodnych	Skuteczność procesu, %
Odzirowanie	99,3 tylko dla supernatanta
Bioremediacja	83,0
AOP	88,8
Modelowy układ hybrydowy	98,1

Źródło: opracowanie własne.

Najwyższą skuteczność wykazał proces mechanicznego odzirowania substancji ropopochodnych, jednak należy podkreślić, że skuteczność ta opisuje 80% wody supernatanta. W sedymencie pozostaje nadal wysoka zawartość



związków ropopochodnych. Metoda ta pozwala na szybką separację części wód i zatężenie drugiej części przeznaczoną do dalszego oczyszczania.

Woda oczyszczana w zakładach uzdatniania wody jest ujmowana z cieków podziemnych lub powierzchniowych. W zależności od rodzaju i składu jakościowo-ilościowego wody do jej oczyszczania i uzdatniania są stosowane różne procesy jednostkowe i układy technologiczne. Wykorzystanie informacji płynących z badań dotyczących opisanej metody hybrydowej może intensyfikować procesy usuwania związków ropopochodnych ze środowiska wodnego. W porównaniu z klasycznymi pojedynczymi procesami zapewnia bardziej efektywną i szybszą mineralizację związków TPH zawartych w wodzie. Efektywność opisanych metod zależy od początkowego stężenia zanieczyszczeń. Układy hybrydowe, takie jak opracowany w tej książce, mogą być szczególnie przydatne i ekonomicznie uzasadnione w przypadku oczyszczania wód o złożonym składzie, zawierających wielorakie zanieczyszczenia toksyczne i trudno rozkładalne, ale też łatwo degradowalne metodami biologicznymi. W książce przedstawiono prosty układ technologiczny dotyczący wód powierzchniowych. W praktyce rzeczywiste układy są rozbudowywane przez lata w zależności od wymagań i możliwości ekonomicznych zakładów oczyszczania. Wyznaczone i omówione w tej książce parametry mogą być wykorzystane do modelowania procesów w pracach projektowych przy ewentualnym zastosowaniu metod hybrydowych do oczyszczania wód na skalę przemysłową.

Poruszane w opisach trzech wariantów układów hybrydowych zagadnienie usunięcia bakterii obecnych w wodzie po procesie bioremediacji nie było objęte badaniami. Jednak w zaproponowanym schemacie technologicznym w celu oczyszczenia wody z *Pseudomonas aeruginosa* można rozważyć zastosowanie filtrów o odpowiednich porach. Ze względu na rozmiary bakterii musiałyby one mieć wielkość poniżej 0,5  $\mu\text{m}$ . Dodatkowo zastosowanie promieniowania UV bardzo często wykorzystywanego w sterylizatorach biologicznych pozwoli na dezynfekcję wody. W celu optymalizacji całego procesu do usunięcia mikroorganizmów można zastosować lampę ksenonową wykorzystywaną w procesie fotokatalizy. W ciągu 1 min. w modelowym układzie lampa ta wytwarza dawkę promieniowania odpowiadającą powierzchniowej gęstości energii 2,7 J/cm<sup>2</sup>, co kilkakrotnie przewyższa wartość graniczną dla usunięcia *Pseudomonas aeruginosa* oszacowaną na 0,63 J/cm<sup>2</sup> (Kashi 2015).

Inne aspekty procesu oczyszczania, również niezwiązane bezpośrednio z tematyką tej książki, to m.in. powstawanie toksycznych, pośrednich produktów degradacji. Produkty niewykazujące fluorescencji nie mogły zostać wykryte w trakcie prowadzenia badań, co nie znaczy, że nie występowały w wodzie. Zaproponowany model technologiczny oczyszczania wody dotyczy substancji ropopochodnych wykrywanych na podstawie całkowitej liczby węglowodorów TPH.

## Wnioski

Przeprowadzone badania i analiza otrzymanych wyników pozwoliły na sformułowanie licznych wniosków. Odwirowanie jest skuteczną i prostą w stosowaniu metodą oczyszczania wód zawierających zanieczyszczenia organiczne w postaci węglowodorów ropopochodnych. W wyniku zastosowania odwirowania do oczyszczania wód uzyskano wysoki stopień obniżenia zawartości TPH: 99%. Większość separowanych związków znalazła się w sedymencie.

W wyniku działania pojedynczych czynników, takich jak nadtlenek wodoru, ditlenek tytanu (IV) lub promieniowanie UV, na substancje TPH praktycznie nie zaobserwowano ich rozkładu. Przy udziale promieniowania UV zarówno  $\text{TiO}_2$ , jak i  $\text{H}_2\text{O}_2$  mogą być skutecznie wykorzystane do degradacji węglowodorów ropopochodnych występujących w środowisku wodnym. Stosowanie nadtlenu wodoru oraz  $\text{TiO}_2$  w postaci cząstek rozproszonych w układzie powoduje rozkład związków z grupy TPH. Połączenie nadtlenu wodoru i promieniowania UV skutkuje obniżeniem stężenia badanych zanieczyszczeń organicznych w roztworze wodnym. Najskuteczniejszym utleniaczem spośród badanych substancji jest  $\text{TiO}_2$  działający synergicznie z promieniowaniem UV. Stosowanie do usuwania TPH ze środowiska wodnego samego nadtlenu wodoru jest procesem mniej skutecznym (wydajność do 16%) niż fotokataliza z użyciem ditlenku tytanu (96%). Zmiany stężenia TPH są najszybsze dla układu  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ , przy czym nie osiągnięto całkowitej mineralizacji tej substancji. Porównanie kosztów procesu fotochemicznego ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ) i fotokatalitycznego ( $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ) wykazało, że ten drugi jest bardziej ekonomiczny. Ze względu na krótszy czas trwania procesu fotokatalitycznej degradacji TPH w porównaniu z procesem w układzie  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  można oszacować niższe koszty związane z energią zużywaną przez wysokociśnieniowe lampy UV. Na podstawie wyników badań można również wnioskować, że fotokataliza jest procesem, podczas którego wydzielana jest mniejsza ilość produktów pośrednich.

Przeprowadzone badania terenowe oraz laboratoryjne pozwoliły na stwierdzenie, że bakterie *Pseudomonas aeruginosa* w naturalnie występujących konsorcjach bakteryjnych w zbiorniku Bagry Wielkie mają potencjał do prowadzenia

procesów bioremediacji zanieczyszczeń węglowodorowych i przewidywać można ich obiecujące zastosowania w przemyśle petrochemicznym i ochronie środowiska. Dzięki nim w warunkach tlenowych następuje rozkład zgromadzonych w wodach zanieczyszczeń węglowodorowych. Mikroorganizmy przetwarzają je do ditlenku węgla i biomasy. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* były zdolne do prowadzenia procesu bioremediacji TPH w środowisku wodnym bez dodatkowego natleniania środowiska. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że o skuteczności usuwania TPH metodą bioremediacji z użyciem bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w największym stopniu decyduje początkowa zawartość związków ropopochodnych. Zastosowanie naturalnego surfaktantu *S. mukorossi* oraz utrzymywanie temperatury 38°C w trakcie prowadzenia procesu znacząco podnosi skuteczność biodegradacji TPH. Analiza wpływu stężenia naturalnych surfaktantów: saponin z *S. mukorossi*, na biodegradację mieszaniny węglowodorów ropopochodnych wykazała, że testowane surfaktanty zwiększają szybkość rozkładu substancji ropopochodnych przez badane mikroorganizmy. Uzyskano dziesięcioprocentowy wzrost degradacji substancji ropopochodnych w stosunku do układu bez związku powierzchniowo czynnego. Uwzględniając sumaryczną zawartość oznaczanych węglowodorów, efektywność bioremediacji znajdowała się w zakresie od 82 do 86%. Przy obniżonym napięciu powierzchniowym do 0,04 N/m efektywność usuwania substancji ropopochodnych była największa i sięgała niemal 96%. Zastosowanie naturalnych surfaktantów w bioremediacji środowiska skażonego substancjami ropopochodnymi jest zatem jednym ze sposobów zwiększenia jej efektywności. Jednocześnie nie wpływa to negatywnie na stan środowiska wodnego, gdyż nie wprowadza się do niego substancji szkodliwych.

Metoda bioremediacji opisana w tej książce może być uznana za proekologiczną ze względu na brak stosowania w niej szkodliwych związków chemicznych, lecz wykorzystanie naturalnych procesów biologicznych. Biodegradacja jest procesem tanim, pozwalającym na obniżenie stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych w środowisku.

Jak pokazały badania do bioremediacji toksycznych związków, jakimi są substancje ropopochodne, można zastosować szczepy bakterii i ich konsorcja występujące naturalnie w zanieczyszczonym środowisku wodnym. Metoda ta w swych założeniach opiera się na pewnego rodzaju prostocie, gdyż dzięki niej unika się stosowania inżynierii genetycznej. Nie ma potrzeby zwiększenia wydajności katabolicznej mikroorganizmów allochtonicznych, ponieważ te autochtoniczne wykształciły odpowiednie mechanizmy pozyskiwania energii naturalnie. Nie stosuje się tutaj zatem rekombinacji genów katabolicznych z różnych organizmów w celu tworzenia unikatowych szlaków metabolicznych toksycznych związków. Mimo że modyfikacje genetyczne mikroorganizmów niosą ze sobą możliwość zwiększenia specyficzności substratowej szlaku katabolicznego, uzupełnienia częściowych szlaków lub nawet skonstruowania

nowych szlaków niespotykanych w naturze (przypuszczalnie pozwalających na mineralizację wysoce opornych związków i uniknięcie akumulacji toksycznych produktów końcowych), należy pamiętać o dalekosiężnych konsekwencjach. Na etapie wprowadzania do środowiska nowego gatunku organizmu są one niemożliwe do przewidzenia. Zarówno wypuszczenie takich modyfikowanych mikroorganizmów do środowiska, jak i namnażanie mikroorganizmów znanych ze swojej zjadliwości i oporności na dezynfekcję jest bardzo kontrowersyjne. Konieczne jest dokładne sprawdzenie i możliwie jak najlepsze oszacowanie wywoływanych ich obecnością w środowisku jakichkolwiek niepożądanych skutków ubocznych. Ponadto należy się upewnić, czy są bezpieczniejsze, tańsze i bardziej wydajne warianty. Informacje zawarte w tej książce mogą przyczynić się do otwarcia nowych możliwości dla procesów bioremediacji oraz łączonych procesów wykorzystujących bioremediację opartą na bakteriach bytujących w danym środowisku naturalnie. Wyniki badań potwierdzają skuteczność autochtonicznych mikroorganizmów w zbiorniku wodnym Bagry Wielkie do degradacji związków ropopochodnych i mogą sugerować istnienie innych naturalnie występujących mikroorganizmów, które skutecznie usuwają zanieczyszczenia występujące w ich środowisku.

Podczas procesów mikrobiologicznych oraz fotochemicznych obserwuje się nie tylko degradację, ale również przekształcenie związków ropopochodnych w produkty pośrednie. Ograniczeniem stosowania badanych procesów utleniania jest możliwość powstawania pochodnych związków wyjściowych, które mogą charakteryzować się większą toksycznością, a które muszą być wykrywane innymi technikami analitycznymi ze względu na brak zdolności do fluorescencji. Wysoka skuteczność usuwania badanych substancji uzyskana w trakcie fotochemicznego rozkładu nie musi więc świadczyć o kompletnej mineralizacji produktów wyjściowych. Ze względu na możliwość powstawania produktów pośrednich hybrydowe metody wymagają doboru odpowiednich parametrów procesów w celu zminimalizowania ryzyka wytworzenia bardziej toksycznych substancji. Spektrofluorymetria UV-Vis okazała się metodą pozwalającą potwierdzić występowanie w wodach (na podstawie obecności TPH w ekstrakcie n-heksanu) węglowodorów ropopochodnych. Potwierdziła obniżanie się stężenia TPH w wyniku degradacji w czasie trwania eksperymentu, jednak nie dała odpowiedzi na szczegółowe pytania dotyczące budowy chemicznej węglowodorów.

W książce przedstawiono kilka kluczowych technologii oczyszczania środowiska wodnego. Zaprezentowano zalety i wady separacji mechanicznej, chemicznego utleniania, fotokatalizy, oczyszczania biologicznego. Podstawowym założeniem tych technologii jest redukcja zanieczyszczeń i oddanie do środowiska jak najczystszej wody. Efektywny i ekonomiczny proces separacji i remediacji jest fundamentem opłacalnego otrzymywania dobrej jakości wody i zachowania czystości środowiska. W zależności od przeznaczenia wód po

oczyszczaniu można wykorzystać tańsze, prostsze, ale mniej efektywne metody lub metody bardziej kosztowne, ale zapewniające najwyższą jakość oczyszczonych wód. Jakość systemu oczyszczania wód zależy od jakości jego części składowych oraz ich optymalnego dopasowania. Jednostkowe procesy oczyszczania ścieków pozwalają na uzyskanie bardzo dobrych wyników w zakresie usunięcia substancji ropopochodnych, ale nie gwarantują eliminacji ich metabolitów.

Przedstawione w tej książce badania nad oczyszczaniem wód z substancji ropopochodnych dają podstawę do podjęcia działań chroniących przyrodę poprzez identyfikację najskuteczniejszych i najbardziej ekonomicznych procesów likwidacji zanieczyszczeń oraz zarządzanie nimi. Badania przyczyniły się do lepszego poznania skuteczności procesów mechanicznego oczyszczania, degradacji fotochemicznej i bioremediacji zainicjowanych w środowisku wodnym, a jednocześnie umożliwiły ocenę przydatności stosowanych metod do praktycznego usuwania groźnych zanieczyszczeń ze środowiska wodnego. Zaproponowany hybrydowy układ oczyszczania wody oparty na procesie odwirowania, heterogenicznej fotokatalizy oraz bioremediacji przy użyciu bakterii *Pseudomonas aeruginosa* pozwolił na bardzo znaczącą eliminację związków TPH. Otrzymane wyniki będą mogły posłużyć do opracowania projektów technologicznych niezbędnych w projektowaniu nowoczesnych oczyszczalni lub modernizacji obiektów już funkcjonujących w świetle wymagań dotyczących eliminacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

Uzyskane wyniki badań nie wyczerpują jednak całej problematyki związanej z zastosowaniem hybrydowych metod oczyszczania wód. W książce przeanalizowano jedynie kilka wybranych metod oczyszczania wody i podjęto próbę opracowania efektywnej i ekonomicznie uzasadnionej hybrydy dającej efekty próśrodo-wiskowe. Dalsze badania mogłyby obejmować:

- 1) Sprawdzenie efektywności działania innych nadtlenków, np. nadtlenku wapnia, magnezu.
- 2) Sprawdzenie efektywności działania modyfikowanego ditlenku tytanu, który można wykorzystać w świetle widzialnym.
- 3) Prowadzenie dalszych badań nad wykorzystaniem innych, mniej zjadliwych gatunków bakterii bytujących w zbiornikach wodnych, w których równocześnie znaleźć można substancje ropopochodne.
- 4) Rozszerzenie badań dotyczących opracowanej metody hybrydowej na inne związki ropopochodne i/lub inne toksyczne związki organiczne.
- 5) Przeprowadzenie badań w zintegrowanych chemiczno-biologicznych układach utleniania zanieczyszczeń w większej niż laboratoryjna skali.

W XXI w. należy skupić się na metodach pozwalających na odzysk czystej i dobrej jakości wody ze względu na jej wysoki koszt oraz wartość jako dobro ponadczasowe. Zintegrowanie procesów oczyszczania wód wraz z wtórnym wykorzystaniem odzyskanej wody jest właściwie jedynym słusznym rozwiązaniem aprobowanym w aspektach ekonomii i ochrony środowiska. Ponad to,

co zostało zbadane i opisane w tej książce, najważniejszą metodą zachowania dobrej jakości wody jest ograniczenie do minimum przedostawania się substancji ropopochodnych i innych toksycznych związków do środowiska. Należy zdecydowanie zrezygnować ze środków, które są dla niego szkodliwe. Migrując z jednego ekosystemu do drugiego, stanowią one zagrożenie dla zdrowia i życia zwierząt i ludzi. Niektóre zanieczyszczenia raz wprowadzone do środowiska mogą pozostać w nim na zawsze.

## Załącznik. Tabela MPN

Liczba dołków dających fluorescencję	MPN dla próbek 100 ml	95% poziom ufności	
		Wartości minimalne	Wartości maksymalne
0	< 1,0	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5

## Załącznik

30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	nieskończoność



## Bibliografia

- Abdel-Shafy H.I., Al-Sulaiman A.M., Mansour M.S.M. (2014). *Greywater treatment via hybrid integrated systems for unrestricted reuse in Egypt*, „Journal of Water Process Engineering”, nr 1, s. 101–107.
- Abdel-Shafy H.I., Mansour M.S.M. (2013). *Removal of selected pharmaceuticals from urine via fenton reaction for agriculture reuse*, „Sustainable Sanitation Practice”, nr 17, s. 20–29.
- Abreu-Mota M.A. de, Moura Barboza C.A. de, Bicego M.C., Martins C.C. (2014). *Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability*, „Chemosphere”, t. 103, s. 156–163.
- Aitken M.D., Stringfellow W.T., Nagel R.D., Kazunga C., Chen S.H. (1998). *Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Canadian Journal of Microbiology”, nr 44, s. 743–752.
- Aislabie J., Foght J., Saul D. (2000). *Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base*, „Polar Biology”, nr 23, s. 183–188, <https://doi.org/10.1007/s003000050025>.
- Alebic-Juretic A., Cvitas T., Klasinc L. (1990). *Heterogeneous polycyclic aromatic hydrocarbon degradation with ozone on silica gel carrier*, „Environmental Science & Technology”, nr 24, s. 62–66.
- Ambrosoli R., Petruzzelli L., Minati J.L., Marsan F.A. (2005). *Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions*, „Chemosphere”, nr 60(9), s. 1231–1236.
- Amor C., Marchão L., Lucas M.S., Peres J.A. (2019). *Application of advanced oxidation processes for the treatment of recalcitrant agro-industrial wastewater: A review*, „Water”, nr 11(2), s. 205–233.
- Anielak A.M. (2021). *Wysokoefektywne metody oczyszczania wody*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Anielak A.M., Jaworska E., Pitrus K. (2012). *Wybrane substancje organiczne występujące w wodach powierzchniowych, będące prekursorami UPUD*, „Technologia Wody”, nr 4(18), s. 33–38.
- Atkins P.W. (2002). *Chemia fizyczna*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Atlas R.M., Bartha R. (1973). *Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum*, „Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology and Serology”, nr 39, s. 257–271.

- Atlas R.M., Bartha R. (1992). *Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation*, „Advances in Microbial Ecology”, s. 12, nr 287–338.
- Auffret M., Yergeau E., Labbe D., Fayolle-Guichard F., Greer C.W. (2015). *Importance of Rhodococcus strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and a diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis*, „Applied Microbiology and Biotechnology”, nr 99, s. 2419–2430, <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6159-8>.
- Badowska-Kozakiewicz A.M. (2013). *Patofizjologia człowieka*, Warszawa: PZWL.
- Bajkiewicz-Grabowska E., Mikulski Z. (2013). *Hydrologia ogólna*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Baker A. (2001). *Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers*, „Environmental Science & Technology”, nr 35(5), s. 948–953.
- Baker A. (2002). *Fluorescence properties of some farm wastes: Implications for water quality monitoring*, „Water Research”, nr 36, s. 189–195.
- Baker A., Inverarity R. (2004). *Protein-like fluorescence intensity as a possible tool for determining river water quality*, „Hydrological Processes”, nr 18(15), s. 2927–2945.
- Ballerini D. (1978). *IFP process for protein production from paraffins*, „Revue de l'Institut Français du Pétrol”, nr 33, s. 101–110.
- Bandowe B.A., Bigalke M., Boamah L., Nyarko E., Saalia F.K., Wilcke W. (2014). *Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment*, „Environment International”, nr 65, s. 135–146.
- Banerjee S., Pillai S.C., Falaras P., O'Shea K.E., Byrne J.A., Dionysiou D.D. (2014). *New insights into the mechanism of visible light photocatalysis*, „Journal of Physical Chemistry Letters”, nr 5(15), s. 2543–2554.
- Barbusiński K. (2001). *Oczyszczanie ścieków przemysłowych metodami katalitycznymi z wykorzystaniem nadtlenu wodoru*, „Chemik”, nr 2, s. 31–36.
- Bąkowski W., Bodzek D. (1998). *WWA w naturalnym środowisku człowieka, pochodzenie, występowanie, toksyczność, oszacowania emisji w Polsce*, „Archiwum Ochrony Środowiska”, nr 197(3–4), s. 157–215.
- Beal R., Betts W.B. (2000). *Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in Pseudomonas aeruginosa*, „Journal of Applied Microbiology”, nr 89, s. 158–168.
- Behymer T.D., Hites R.A. (1985). *Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on simulated atmospheric particulates*, „Environmental Science & Technology”, nr 19, s. 1004–1006.
- Beran E. (2008). *Wpływ budowy chemicznej bazowych olejów smarowych na ich biodegradowalność i wybrane właściwości eksploatacyjne*, „Prace Naukowe Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej”, nr 5, s. 16–18.
- Bewley R.J.F., Webb G. (2001). *In situ bioremediation of groundwater contaminated with phenols, BTEX and PAHs using nitrate as electron acceptor*, „Land Contamination and Reclamation”, nr 9, s. 335–347.
- Billiard S.M., Meyer J.N., Wassenberg D.M., Hodson P.V., Di Giulio R.T. (2008). *Non-additive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment*, „Toxicological Sciences”, nr 105(1), s. 5–23.

- Biloò P.Z., Ngassoum M.B. (2013). *Treatment of conditioned oily sludge from Cameroon petroleum refinery by centrifugation*, „International Journal of Environmental Sciences”, nr 3(5), s. 1373–1382.
- Binet P., Portal J.M., Leyval C. (2000). *Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass*, „Soil Biology and Biochemistry”, nr 32, s. 2011–2017.
- Biń A. (1998). *Zastosowanie procesów pogłębionego utleniania do uzdatniania wody*, „Ochrona Środowiska”, nr 1(68), s. 3–6.
- Biń A. (2011). *Pogłębione utlenianie w oczyszczaniu ścieków*, „Ecomanager”, nr 5(14), <http://ecomanager.pl/poglebione-utlenianie-w-oczyszczaniu-ściekow> (dostęp: 24.11.2018).
- Biń A., Zieliński J. (2000). *Chemiczna degradacja zanieczyszczeń w ściekach przemysłowych*, „Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska”, nr 2, s. 383–405.
- Blough N.V., Zepp R.G. (1995). Reactive oxygen species in natural waters, w: C.S. Foot, J. Silverstone Valentine, A. Greenberg, J.F. Liebman (red.), *Active Oxygen in Chemistry* (s. 280–333), London: Chapman & Hall.
- Błaszczak M.K. (2009). *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN
- Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. (2005). *Rhamnolipids mediate detachment of Pseudomonas aeruginosa from biofilms*, „Molecular Microbiology”, nr 57, nr 1210–1223.
- Bolton J.R. (1999). *Ultraviolet applications handbook*, „Bolton Photoscience”, Ontario, Canada, ss. 31.
- Boving T.B., Meritt D.L., Boothroyd J.C. (2004). *Fingerprinting sources of bacterial input into small residential watersheds: Fate of fluorescent whitening agents*, „Environmental Geology”, nr 46, s. 228–232.
- Bregnard T., Hoehener P., Haener A., Zeyer J. (1996). *Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms*, „Environmental Toxicology and Chemistry”, nr 15, s. 299–307.
- Brette F., Machado B., Cros C., Incardona J.P., Scholz N.L., Block B.A. (2014). *Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish*, „Science”, nr 343(6172), s. 772–776.
- Brette F., Shiels H.A., Galli G.L., Cros C., Incardona J.P., Scholz N.L., Block B.A. (2017). *A novel cardiotoxic mechanism for a pervasive global pollutant*, Scientific Reports”, nr 7, s. 41476.
- Brown D.R., Thompson J., Chernick M., Hinton D.E., Di Giulio R.T. (2017). *Later life swimming performance and persistent heart damage following sublethal PAH mixture exposure in the Atlantic killifish (Fundulus heteroclitus)*, „Environmental Toxicology and Chemistry”, nr 36(12), s. 3246–3253.
- Brown J.K., Ladner W.R. (1960). *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”, nr 39(1), s. 87–96.
- Burczynski M.E., Lin H.K., Penning T.M. (1999). *Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: Implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase*, „Cancer Research”, nr 59(3), s. 607–614.

- Burns D.A., Ciurczak E.W. (2001). *Handbook of Near-infrared Analysis*, 2 wyd., New York: Marcel Dekker Inc.
- Caiazza N.C., Shanks R.M., O'Toole G.A. (2005). *Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of Pseudomonas aeruginosa*, „Journal of Bacteriology”, nr 187, nr 7351–7361.
- Calvert J.G., Atkinson R., Becker K.H., Kamens R.M., Seinfeld J.H., Wallington T.H., Yarwood G. (2002). *The Mechanisms of Atmospheric Oxidation of the Aromatic Hydrocarbons*, Oxford: Oxford University Press.
- Cao H., Wang C., Liu H. i in. (2020). *Enzyme activities during Benzo[a]pyrene degradation by the fungus Lasiodiplodia theobromae isolated from a polluted soil*, „Scientific Reports”, nr 10, s. 865, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57692-6>.
- Carmona M., Zamarro M.T., Blázquez B., Durante-Rodríguez G., Juárez J.F., Valderrama J.A., Barragán M.J.L., García J.L., Díaz E. (2009). *Anaerobic catabolism of aromatic compounds: A genetic and genomic view*, „Microbiology and Molecular Biology Reviews”, nr 73(1), s. 71–133, DOI: 10.1128/MMBR.00021-08.
- Carp O., Huisman C.L., Reller A. (2004). *Photoinduced reactivity of titanium dioxide progress in solid state*, „Chemistry”, nr 32(1–2), s. 33–177.
- Cataldo F., Keheyan Y. (2006). *Gamma-radiolysis and ozonolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in solution*, „Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry”, nr 267(3), s. 679–683.
- Cerniglia C.E. (2003). *Recent advances in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Mycobacterium species*, w: V. Sasek (red.), *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions* (s. 51–73), Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- Chaerun S.K., Tazaki K., Asada R., Kogure K. (2004). *Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria*, „Environment International”, nr 30, s. 911–922, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.007>.
- Champagnat A. (1964). *Proteins from petroleum fermentations: A new source of food*, „Impact”, nr 14, s. 119–133.
- Champagnat A., Llewelyn D.A.B. (1962). *Protein from petroleum*, „New Scientist”, nr 16, s. 612–613.
- Chebbi A., Hentati D., Zaghden H., Baccar N., Rezgui F., Chalbi M., Sayadi S., Chamkha M. (2017). *Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated Pseudomonas sp. strain from used motor oil-contaminated soil*, „International Biodeterioration and Biodegradation”, nr 122, s. 128–140, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.006>.
- Chen D.H. (2016). *Sustainable Water Technologies*, Boca Raton: CRC Press.
- Chen S.H., Aiken M.D. (1999). *Salicylate stimulates the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Pseudomonas saccharophila P15*, „Environmental Science & Technology”, nr 33, s. 435–439.
- Chlebowski A.C., Garcia G.R., La Du J.K., Bisson W.H., Truong L., Massey Simovich S.L., Tanguay R.L. (2017). *Mechanistic investigations into the developmental toxicity of nitrated and heterocyclic PAHs*, „Toxicological Sciences”, nr 157(1), s. 246–259.

- Choi Y.J., Kim Y.J., Nam K. (2009). *Enhancement of aerobic biodegradation in an oxygen-limiting environment using a saponin-based microbubble suspension*, „Environmental Pollution”, nr 157(8–9), s. 2197–2202.
- Christensen J., Norgaard L., Bro R., Engelsen S.B. (2006). *Multivariate autofluorescence of intact food systems*, „Chemical Reviews”, nr 106, s. 1979–1994.
- Clark C.D., De Bruyn W.J., Jones J.G. (2009). *Photochemical production of hydrogen peroxide in size-fractionated Southern California coastal waters*, „Chemosphere”, nr 76, s. 141–146.
- Clerge A., Le Goff J., Lopez C., Ledauphin J., Delepee R. (2019). *Oxy-PAHs: Occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health*, „Critical Reviews in Toxicology”, nr 49(4), s. 302–328.
- Coates J.D., Anderson R.T., Lovley D.R. (1996). *Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 62, s. 1099–1101.
- Coates J.D., Anderson R.T., Woodward J.C., Phillips E.J.P., Lovley D.R. (1996). *Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions*, „Environmental Science & Technology”, nr 30, s. 2764–2769.
- Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philp P., Lovley D.R. (1997). *Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 63, s. 3589–3593.
- Coon M.J. (2005). *Omega oxygenases: Nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes*, „Biochemical and Biophysical Research Communications”, nr 338, s. 378–385.
- Cooney C.L., Rha C., Tannenbaum S.R. (1980). *Single cell protein: Engineering, economics and utilization in foods*, „Advances in Food Research”, nr 26, s. 1–52.
- Cordeiro D.S., Corio P. (2009). *Electrochemical and photocatalytic reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons investigated by Raman spectroscopy*, „Journal of the Brazilian Chemical Society”, nr 20(1), s. 80–87.
- Cortes J.E., Suspes A., Roa S., González C., Castro H.E. (2012). *Total petroleum hydrocarbons by gas chromatography in Colombian waters and soils*, „American Journal of Environmental Sciences”, t. 8, nr 4, s. 396–402.
- Cubitto M.A., Morán A.C., Commendatore M., Chiarello M.N., Baldini M.D., Siñeriz F. (2004). *Effects of Bacillus subtilis O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils*, „Biodegradation”, nr 15, s. 281–287.
- Cunha V., Vogs C., Le Bihanic F., Dreij K. (2020). *Mixture effects of oxygenated PAHs and benzo[a]pyrene on cardiovascular development and function in zebrafish embryos*, „Environment International”, t. 143, s. 1–12.
- Czechowski F., Kołwzan B. (2008). *Biodegradacja ropy naftowej z otworu Radoszyn-1 przez mikroorganizmy glebowe*, w: B. Kołwzan, K. Grabas (red.), *Ekotoksykologia w ochronie środowiska* (s. 69–74), Wrocław: PZITS Oddział Dolnośląski.
- Czerniak J., Gacek A., Szopa P. (2011). *Determination of quinine content in tonic waters by molecular fluorescence spectroscopy*, „Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu”, nr 214, s. 61–69.
- Dandie C.E., Thomas S.M., Bentham R.H., McClure N.C. (2004). *Physiological characterization of Mycobacterium sp. Strain 1B isolated from a bacterial culture able*

- to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Journal of Applied Microbiology”, nr 97, s. 246–255.
- Dąbek L., Ozimina E. (2009). *Usuwanie zanieczyszczeń organicznych z roztworów wodnych metodą pogłębianego utleniania*, „Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych”, nr 41, s. 369–376.
- Del Vecchio R., Blough N.V. (2004). *On the origin of the optical properties of humic substances*, „Environmental Science & Technology”, nr 38(14), s. 3885–3891.
- Diddi S., Maitra S. (2017). *Studies on the ability of aqueous extract of Sapindus Mukorossi to solubilize polyaromatic hydrocarbons and complex hydrocarbon mixtures*, „International Journal of Applied Environmental Sciences”, nr 12(7), s. 1387–1399.
- Dugay A., Herrenknecht C., Czok M., Guyon F., Pages N. (2002). *New procedure for selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants for gas chromatographic-mass spectrometric analysis*, „Journal of Chromatography A”, nr 958, s. 1–7.
- Dunmur R., Murray M. (2008). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, red. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, 2 wyd., Stuttgart–New York–Delhi–Rio de Janeiro: Thieme Verlagsgruppe.
- Eastcott L., Shiu W.Y., Mackay D. (1988). *Environmentally relevant physical-chemical properties of hydrocarbons: A review of data and development of simple correlations*, „Oil and Chemical Pollution”, nr 4, s. 191–216.
- Ehrhardt M., Petrick G. (1985). *The sensitized photo-oxidation of n-pentadecane as a model for abiotic decomposition of aliphatic hydrocarbons in seawater*, „Marine Chemistry”, nr 16(3), s. 227–238.
- Elumalai P., Parthipan P., Karthikeyan O.P. i in. (2017). *Enzyme-mediated biodegradation of long-chain n-alkanes (C32 and C40) by thermophilic bacteria*, „3 Biotech”, nr 7(116), <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0773-y>.
- Esplugas S., Bila D.M., Krause L.G.T., Dezotti M. (2007). *Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents*, „Journal of Hazardous Materials”, nr 149, s. 631–642.
- Evans W.C. (1977). *Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments*, „Nature”, nr 270, s. 17–22.
- Fall R.R., Brown J.L., Schaeffer T.L. (1979). *Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by Pseudomonas citronellolis*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 38, s. 715–722.
- Farrell R.L., Rhodes P.L., Aislabie J. (2003). *Toluene-degrading antarctic Pseudomonas strains from fuel-contaminated soil*, „Biochemical and Biophysical Research Communications”, nr 312, s. 235–240, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.163>.
- Fąfara Z., Jewulski J., Kaszycki P., Kołoczek H., Rychlicki S., Solecki T., Stopa J., Twardowski K., Wojnarowski P., Zagrajczuk D. (2006). *Metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych ze środowiska gruntowo-wodnego*, S. Rychlicki (red.), Kraków: AGH Uczelniane Wydawnictwa Naukowo-Dydaktyczne.
- Fedorak P.M., Westlake D.W.S. (1981). *Degradation of aromatics and saturates in crude oil by soil enrichments*, „Water Air Soil Pollut”, nr 16, s. 367–375.
- Ferrari G.M., Dowell M.D., Grossi S., Targa C. (1996). *Relationship between the optical properties of chromophoric dissolved organic matter and total concentration of*

- dissolved organic carbon in the southern Baltic Sea region*, „Marine Chemistry”, nr 55(3–4), s. 299–316.
- Finlayson-Pitts B.J. Jr, Pitts J.N. (1997). *Tropospheric air pollution: Ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles*, „Nature”, nr 276, s. 1045–1052.
- Pittalis D., Iocola I., Fiorani L., Menicucci I., Palucci A., Lugliè A., Ghiglieri G., Iannetta M. (2012). *Fluorescence spectroscopy techniques for water quality monitoring*, w: G.F. Greppi, S. Mura (red.), *Biosensors and Biotechnology for Environmental Monitoring Edition* (s. 39–53), <https://www.yumpu.com/it/document/read/15003604/download-pdf-449mb-laboratorio-di-bionanotecnologie> (dostęp: 13.06.2019).
- Foster J.W. (1962a). *Bacterial oxidation of hydrocarbons*, w: O. Hayaishi (red.), *Oxygenases* (s. 241–271), New York: Academic Press.
- Foster J.W. (1962b). *Hydrocarbons as substrates for microorganisms*, „Antonie van Leeuwenhoek”, „Journal of Microbiology and Serology”, nr 28, s. 241–274.
- Fredslund L., Sniegowski K., Wick L.Y., Jacobsen C.S., De Mot R., Springael D. (2008). *Surface motility of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading mycobacteria*, „Research in Microbiology”, nr 159, s. 255–262.
- Fuchs G., Mohamed M.E.S., Altenschmidt U., Koch J., Lack A., Brackmann R., Lochmeyer C., Oswald B. (1994). *Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds*, w: C. Ratledge (red.), *Biochemistry of Microbial Degradation* (s. 513–553), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Fuentes S., Barra B., Caporaso J.G., Seeger M. (2016). *From rare to dominant: A fine-tuned soil bacterial bloom during petroleum hydrocarbon bioremediation*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 82, s. 888–896.
- Fujishima A., Zhang X. (2006). *Titanium dioxide photocatalysis: Present situation and future approaches*, „Comptes Rendus Chimie”, nr 9, s. 750–760.
- Gacek A., Czerniak J. (2019). *Potencjał bioremediacyjny mikroorganizmów bytujących w wodach śródlądowych na przykładzie zbiornika Bagry w Krakowie*, w: R. Salerno-Kochan (red.), *Nauki o zarządzaniu i jakości wobec wyzwań zrównoważonego rozwoju* (s. 75–86), Radom: Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy.
- Gacek A., Gajewski A. (2015). *Threats to the aquatic environment and human health with oil derivatives (part one)*, „Towaroznawcze Problemy Jakości”, nr 4, s. 30–41.
- Gacek A., Szopa P., Czerniak J. (2013). *Zanieczyszczenia zbiorników wodnych bakterią Pseudomonas aeruginosa na obszarze Krakowa*, „Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie”, nr 912, s. 17–28.
- Gacek A., Szopa P., Czerniak J. (2014). *The study of bioindicators as proxies of environmental pollution. Commodity Science in Research and Practice*. Achievements and challenges of commodity science in the age of globalization. Polish Society of Commodity Science, Cracow, s. 77–86.
- Gacek A., Szopa P., Czerniak J. (2017). *Removal of petroleum pollutants from river water by centrifugation*, „Economic and Environmental Studies”, t. 17, nr 4(44), s. 1121–1133.
- Gacek A., Szopa P., Czerniak J., Gajewski A. (2012). *Spektroskopia fluorescencyjna w badaniach wybranych barwnych związków azowych wykorzystywanych w przemyśle*

- spożywczym, w: *Selected Aspects of Food Quality Evaluation* (s. 28–37), Radom: Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy.
- Gai Z., Zhang Z., Wang X., Tao F., Tang H., Xu P. (2012). *Genome sequence of Pseudomonas aeruginosa DQ8, an efficient degrader of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Journal of Bacteriology”, nr 194, s.6304–6305, <https://doi.org/10.1128/JB.01499-12>.
- Galushko A., Minz D., Schink B., Widdel F. (1999). *Anaerobic degradation of naphthalene by pure culture of novel type of marine sulfate-reducing bacterium*, „Environmental Microbiology”, nr 1, s. 1–23.
- Gaya U.I., Abdullah A.H. (2008). *Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: A review of fundamentals, progress and problems*, „Journal of Photochemistry and Photobiology C”, nr 9, s. 1–12.
- Geier M.C., Chlebowski A.C., Truong L., Massey Simonich S.L., Anderson K.A., Tanguay R.L. (2018). *Comparative developmental toxicity of a comprehensive suite of polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Archives of Toxicology”, nr 92(2), s. 571–586.
- Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y. (2016). *Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review*, „Frontiers in Microbiology”, t. 7, s. 1369, doi.10.3389/fmicb.2016.01369.
- Gierak A. (1995). *Zagrożenie środowiska produktami ropopochodnymi*, „Ochrona Środowiska”, nr 2(57), s. 31–34.
- Glaze W.H., Kang J.W., Chapin D.H. (1987). *The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation*, „Ozone: Science & Engineering”, nr 9, s. 335–352.
- Goodale B.C., La Du J., Tilton S.C., Sullivan C.M., Bisson W.H., Waters K.M., Tanguay R.L. (2015). *Ligand-specific transcriptional mechanisms underlie aryl hydrocarbon receptor-mediated developmental toxicity of oxygenated PAHs*, „Toxicological Sciences”, nr 147(2), s. 397–411.
- Gros J., Reddy C.M., Aepplig C., Nelson R.K., Carmichael C.A., Arey J.S. (2014). *Resolving biodegradation patterns of persistent saturated hydrocarbons in weathered oil samples from the Deepwater Horizon disaster*, „Environmental Science & Technology”, nr 48(3), s. 1628–1637.
- Gudin C., Syrratt W.J. (1975). *Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination*, „Environmental Pollution”, nr 8, s. 107–112.
- Guermouche M'rassi A., Bensalah F., Gury J., Duran R. (2015). *Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Environmental Science and Pollution Research”, nr 22, s. 15332–15346, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4343-8>.
- Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M., Kaczorek E. (2010). *Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych*, *Nafta-Gaz*”, nr 66(11), s. 1019–1027.
- Hamacher C., Brito A.P.X., Andrade Brüning I.M.R. de, Wagener A., Moreira I. (2000). *The determination of PAH by UV-Fluorescence Spectroscopy in water of Guanabara Bay*, „A Revista Brasileira de Oceanografia”, nr 48(2), s. 167–170.
- Hamme J.D. van, Singh A., Ward O.P. (2003). *Recent advances in petroleum microbiology*, „Microbiology and Molecular Biology Reviews”, nr 67, s. 503–549.



- Hara A., Syutsubo K., Harayama S. (2003). *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation, „Environmental Microbiology”, nr 5, s. 746–753.
- Harayama S., Kok M., Neidle E.L. (1992). *Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases*, „Annual Review of Microbiology”, nr 46, s. 565–601.
- Haritash A.K., Kaushik C.P. (2009). *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review*, „Journal of Hazardous Materials”, nr 169, s. 1–15.
- Harms G., Rabus R., Widdel F. (1999). *Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria*, „Archives of Microbiology”, nr 172, s. 303–312.
- Hassan S.S.M., El Azab W.I.M., Ali H.R., Mansour M.S.M. (2015). *Anthracene removal from wastewater using green nanotechnology*, w: The 18th International conference on petroleum, mineral resources and development, EPRI, Cairo, Egypt, 8–10 February.
- Hatch R.T. (1975). *Fermenter design*, w: S.R. Tannenbaum, D.I.C. Wang (red.), *Single Cell Protein II* (s. 46–68), Cambridge, MA: MIT Press.
- Hautala K., Peuravuori J., Pihlaja K. (2000). *Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analysis*, „Water Research”, nr 34(1), s. 246–258.
- Hernandez D., Plaza C., Polo A. (2003). *Consideraciones generales sobre la contaminación y restauración de suelos*, „Revista técnica”, nr 12(67), s. 126–134.
- Higgins I.J., Gilbert P.D. (1978). *The biodegradation of hydrocarbons*, w: K.W.A. Chater, H. Somerville (red.), *The Oil Industry and Microbial Ecosystems* (s. 80–117), London: Hayden.
- Hill T. (2003). *Microbial growth in aviation fuels Opinion paper*, „Aircraft Engineering and Aerospace Technology”, nr 75(5), s. 497–502.
- Hommel R.K. (1990). *Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms*, „Biosurfactants in Hydrocarbon Utilization. Biodegradation” nr 1, s. 107–119.
- Hopper D.J. (1978). *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*, w: J.R. Watkinson (red.), *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons* (s. 85–112), London: Applied Science.
- Hounslow A.W. (1995). *Water Quality Data: Analysis and Interpretation*, Boca Raton: CRC Press.
- Huang Q., Han X., Mao F., Chi Y., Yan J. (2011). *A model for predicting solid particle behaviour in petroleum sludge during centrifugation*, „Fuel”, nr 117(A), s. 95–102.
- Hudson N., Baker A., Reynold D. (2007). *Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters – a review*, „River Research and Applications”, nr 23, s. 631–649.
- Idowu O., Semple K.T., Ramadass K., O'Connor W., Hansbro P., Thavamani P. (2019). *Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Environment International”, nr 123, s. 543–557.
- Iess L., Stevenson D.J. i in. (2014). *The Gravity Field and Interior Structure of Enceladus*, „Science”, nr 344(6179), s. 78–80, doi: 10.1126/science.1250551.
- Incardona J.P., Carls M.G., Teraoka H., Sloan C.A., Collier T.K., Scholz N.L. (2005). *Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development*, „Environmental Health Perspectives”, nr 113(12), s. 1755–1762.

- Incardona J.P., Collier T.K., Scholz N.L. (2004). *Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Toxicology and Applied Pharmacology”, nr 196(2), s. 191–205.
- Incardona J.P., Linbo T.L., Scholz N.L. (2011). *Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development*, „Toxicology and Applied Pharmacology”, nr 257(2), s. 242–249.
- International Agency for Research on Cancer (1983). *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1*, „Chemical, Environmental and Experimental Data”, nr 32, Lyon, za: A. Sapota (2002). *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (substancje smołowe rozpuszczalne w cykloheksanie). Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego*, „Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy”, nr 2(32), s.79–208.
- IPBES (2019). *Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*, Brondizio ES, J. Settele, S. Díaz, H.T. Ngo (red.), Bonn: IPBES secretariat.
- Jamroz T., Ledakowicz S., Miller J., Sencio B. (2002). *Toksyczność wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych i produktów ich rozkładu*, „Inżynieria i Aparatura Chemiczna”, nr 3, s. 45–46.
- Janda K. (2005). *Mikrobiologiczne skażenie paliw*, „Postępy Mikrobiologii”, nr 44(2), s. 157–169.
- Jarvis I.W., Dreij K., Mattsson Å., Jernström B., Stenius U. (2014). *Interactions between PAHs in complex mixtures and implications for cancer risk assessment*, „Toxicology”, nr 321, s. 27–39.
- Jayasena S., Perera M. (2021). *Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbons*, w: D.G. Panpatte, Y.K. Jhala (red.), *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment. Microorganisms for Sustainability*, t. 25, Singapore: Springer, [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7447-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7447-4_11), s. 263–292.
- Jeannot R. (1994). *Preservation techniques for analysis of organic compounds in water samples – a review*, „International Journal of Environmental Analytical Chemistry”, nr 57(3), s. 231–236.
- Jones T., Egerton T.A. (2000). *Titanium compounds, inorganic*, w: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (s. 225–274), New York: John Wiley & Sons.
- Jorfi S., Rezaee A., Mohebbali G., Jaafarzadeh N. (2013). *Pyrene removal from contaminated soils by modified Fenton oxidation using iron nano-particles*, „Journal of Environmental Health Sciences & Engineering”, nr 11(1), s. 17–25.
- Kaas H., Henriksen P. (2000). *Saxitoxins (PSP toxins) in Danish Lakes*, „Water Research”, nr 34, s. 2089–2097.
- Kaczorek E., Chrzanowski Ł., Pijanowska A., Olszanowski A. (2008). *Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins*, „Bioresource Technology”, nr 10(99), s. 4285–4291.
- Kashi G. (2015). *Pseudomonas aeruginosa removal from water using electrophotocatalytic method*, „International Journal of Microbiology and Immunology Research”, nr 3(2), s. 011–019.

- Kęcki Z. (1998). *Podstawy spektroskopii molekularnej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Khan I.A. (2000). In-situ aquifer denitrification using a daisy well system, praca doktorska na University of Nebraska.
- King D.R., Perry J.J. (1975). *The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism, Mycobacterium vaccae*, „Canadian Journal of Microbiology”, nr 21, s. 85–89.
- Klofutar B., Golob J. (2007). *Microorganisms in diesel and in biodiesel fuels*, „Acta Chimica Slovenica”, nr 54, s. 744–748.
- Kniemeyer O. i in. (2007). *Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria*, „Nature”, nr 449, s. 898–901.
- Kobayashi T., Kaminaga H., Navarro R.R., Iimura Y. (2012). *Application of aqueous saponin on the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil*, „Journal of Environmental Science and Health, Part A”, nr 47(8), s. 1138–1145.
- Kohtani S., Kawashima A., Miyabe H. (2017). *Reactivity of trapped and accumulated electrons in titanium dioxide photocatalysis*, „Catalysts”, nr 7(10), s. 303–318.
- Koźwzan B. (2005). *Bioremediation of soils contaminated with petroleum products and their ecotoxicological assessment*, w: „Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej: Monographies”, t. 77(44), Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej.
- Korfmacher W.A., Wehry E.L., Mamanto G., Natusch D.F.S. (1980). *Resistance to photochemical decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons vapor-adsorbed on coal fly ash*, „Environmental Science and Technology”, nr 14(9), s. 1094–1099.
- Kos L., Perkowski J., Ledakowicz S. (2001). *Pogłębione utlenianie ścieków włókienniczych z procesu barwienia bawełny, poliestru i poliuretanu*, „Gaz, Woda i Technika Sanitarna”, nr 12, s. 16–18.
- Kot A., Morawska M., Namieśnik J. (2001). *Konserwacja i przechowywanie próbek wody*, „Chemia i Inżynieria Ekologiczna”, nr 8(2–3), s. 177–196.
- Kot-Wasik A., Dąbrowska D., Namieśnik J. (2003). *Degradacja związków organicznych w środowisku*, w: J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek (red.), *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym* (s. 700–722), Gdańsk: Wydawnictwo Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM).
- Kowal A.L. (1996). *Zastosowanie wody utlenionej w procesach oczyszczania wody i ścieków*, „Gaz, Woda i Technika Sanitarna”, nr 1, s. 3–5.
- Köhler T., Curty L.K., Barja F., Delden C. van, Péchère J.C. (2000). *Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili*, „Journal of Bacteriology”, nr 182, s. 5990–5996.
- Kuang Y., Li Y., Li J. i in. (2014). *Temporal patterns and potential sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in xylem of Pinus kwangtungensis*, „Atmospheric Pollution Research”, nr 5, s. 520–527.
- Kursheva A.V., Litvinenko I.V., Petrova V.I., Galishev M.A. (2009). *Spectrofluorometric studies of the aromatic hydrocarbons in the bottom sediments and water mass of the western sector of the Arctic Region*, „Oceanology”, nr 49(5), s. 655–662.
- Kwapisz E. (2006). *Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej*, „Biotechnologia”, nr 2(73), s. 166–188, za: E.T. Premuzic, M.S. Lin, L.K. Racaniello, B. Manowitz (1993), *Chemical markers of induced microbial transformation in*

- crude oil*, „Developments in Petroleum Science” (Microbial Enhancement of Oil Recovery: Recent Advances), nr 39, s. 37–54.
- Kwiatkowska D., Wichary H. (2000). *Korozja mikrobiologiczna występująca w zbiornikach paliw*, „Ochrona przed Korozją”, nr 5, s. 118–121.
- Kwiatkowska D., Wichary H. (2001). *Korozja mikrobiologiczna w systemach technicznych*, „Ochrona przed Korozją”, nr 6, s. 148–151.
- La Nafie N. (2014). *The chemical processes occurred in the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on the soil by Fenton's reagent International*, „Journal of Pharma and Bio Sciences”, nr 5(2), s. 106–112.
- Lagenhoff A., Zehnder A., Schraa G. (1996). *Behaviour of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment column*, „Biodegradation”, nr 7, s. 267–274.
- Lakowicz J.R. (2010). *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3 wyd., Boston, MA: Springer.
- Lasocki J., Karwowska E. (2010). *Wpływ mikroorganizmów bytujących w środowisku oleju napędowego i biodiesla na układ paliwowy pojazdów napędzanych silnikami o zapłonie samoczynnym*, „Archiwum Motoryzacji”, nr 3, s.167–183.
- Le Bihanic F., Sommard V., Perrine L. de, Pichon A., Grasset J., Berrada S., Budzinski H., Cousin X., Morin B., Cachot J. (2015). *Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae*, „Ecotoxicology and Environmental Safety”, nr 113, s. 321–328.
- Legrini O., Oliveros E., Braun A.M. (1993). *Photochemical processes for water treatment*, „Chemical Reviews”, nr 93, s. 671–698.
- Leirda D. (2009). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet*, Geel, Belgium: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements.
- Lin D., Zhu L., He W., Tu Y. (2006). *Tea plant uptake and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons from water and around air*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry”, nr 54, s. 3658–3662.
- Lin M., Hu X., Chen W., Wang H., Wang C. (2014). *Biodegradation of phenanthrene by Pseudomonas sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil*, „International Biodeterioration and Biodegradation”, nr 94, s. 176–181, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.011>.
- Liu X., Yan Y., Da Z., Shi W., Ma C., Lv P., Tang Y., Yao G., Wu Y., Huo P. (2014). *Significantly enhanced photocatalytic performance of CdS coupled WO<sub>3</sub> nanosheets and the mechanism study*, „Chemical Engineering Journal”, nr 241, s. 243–250.
- Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S. (2009). *Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment – physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review*, „Science of the Total Environment”, nr 407, s. 731–748.
- Lo Giudice A., Casella P., Caruso C., Mangano S., Bruni V., De Domenico M., Michaud L. (2010). *Occurrence and characterization of psychrotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria from surface seawater along the Victoria Land coast (Antarctica)*, „Polar Biology”, nr 33, s. 929–943, <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0770-7>.

- Lundstedt S., Haglund P., Oberg L. (2003). *Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil*, „Environmental Toxicology and Chemistry”, nr 22, s. 1413–1420, doi: 10.1002/etc.5620220701.
- Maher W.A. (1983). *Use of fluorescence spectroscopy for monitoring petroleum hydrocarbon contamination in estuarine and ocean waters*, „Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology”, nr 30, s. 413–419.
- Manahan S. (1994). *Environmental Chemistry*, Boca Raton: CRC Press Inc.
- Manariotis I.D., Karapanagioti K.H., Chrysikopoulou C.Y. (2011). *Degradation of PAHs by high frequency ultrasound*, „Water Research”, nr 45, s. 2587–2594.
- Manoli E., Samara C. (1999). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: Sources, occurrence and analysis*, „Trends in Analytical Chemistry”, nr 18(6), s. 417–428.
- Markovetz A.J., Kallio R.E. (1971). *Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms*, „Critical Reviews in Microbiology”, nr 1(2), s. 225–237.
- Martin T., Germain R.S. (2008). *Direct Push Site Characterization of NAPL with Laser-Induced Fluorescence (LIF)*, North American Environmental Field Conference & Exposition, Tampa, FL.
- Martín-Torres F.J., Zorzano M.P., Valentín-Serrano P., Harri A.M., Genzer M. (2015). *Transient liquid water and water activity at Gale crater on Mars*, „Nature Geoscience”, nr 8(5), 357–361, doi:10.1038/ngeo2412.
- Mastalerz P. (2000). *Chemia organiczna*, Wrocław: Wydawnictwo Chemiczne.
- Matthew M. (2009). *A Comparison Study of Gravimetric and Ultraviolet Fluorescence Methods for the Analysis of Total Petroleum Hydrocarbons in Surface Water* [M.S. thesis], Boston MA: Northeastern University.
- McCarrick S., Cunha V., Zapletal O., Vondracek J., Dreij K. (2019). *In vitro and in vivo genotoxicity of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Environmental Pollution”, nr 246, s. 678–687.
- McKenna E.J., Kallio R.E. (1964). *Hydrocarbon structure: Its effect on bacterial utilization of alkanes*, w: H. Heukelian, N.C. Dondero (red.), *Principles and Applications in Aquatic Microbiology* (s. 1–14), New York: Wiley.
- McKenna E.J., Kallio R.E. (1965). *The biology of hydrocarbons*, „Annual Review of Microbiology”, nr 19, s. 183–208.
- McKenna E.J., Kallio R.E. (1971). *Microbial metabolism of the isoprenoid alkane, pristane*, „Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America”, nr 68, s. 1552–1554.
- McNally D.L., Mihelcic J.R., Lueking D.R. (1998). *Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions*, „Environmental Science & Technology”, nr 32, s. 2633–2639.
- Meckenstock R.U., Boll M., Mouttaki H., Koelschbach J.S., Cunha Tarouco P., Weyrauch P., Dong X., Himmelberg A.M. (2016). *Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology”, nr 26, s. 92–118.
- MeeKyung K., O’Keefe P.W. (2000). *Photodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in aqueous solutions and in organic solvents*, „Chemosphere”, nr 41(6), s. 793–800.

- Miano T.M., Sposito G., Martin J.P. (1988). *Fluorescence spectroscopy of humic substances*, „Soil Science Society of America Journal”, nr 52, s. 1016–1019.
- Mill T.M. (1989). *Structure-activity relationships for photooxidation processes in environment*, „Environmental Toxicology and Chemistry”, nr 8, s. 31–43.
- Miller J.S. (2011). *Kinetyka degradacji wybranych ksenobiotyków w roztworach wodnych metodami fotochemicznymi*, „Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej”, nr 1083.
- Miller T.L., Johnson M.J. (1966). *Utilization of normal alkanes by yeasts*, „Biotechnology and Bioengineering”, nr 8, s. 549–565.
- Mittal A., Singh P. (2009). *Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills*, „Indian Journal of Experimental Biology”, nr 47, s. 760–765.
- Miyoshi M. (1895). *Die Durch bohrung von membranen durch Philzfaden*, „Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik”, nr 28, s. 269–289.
- Moberg L., Robertsson G., Karlberg B. (2001). *Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and pheopigments using parallel factor analysis*, „Talanta”, nr 54, s. 161–170.
- Moneti A., Cernicharo J., Carrión J.R.P. (2001). *Cold H<sub>2</sub>O and CO ice and gas toward the Galactic Center*, „The Astrophysical Journal”, nr 549(2), DOI: 10.1086/319168.
- Morel A., Berthon J.F. (1989). *Surface pigments, algal biomass profiles, and potential production of the euphotic layer: Relationship reinvestigated in view of remotesensing applications*, „Limnology and Oceanography”, nr 34(8), s. 1545–1562.
- Moursy A.S., Abdel-Shafy H.I. (1983). *Removal of hydrocarbons from Nile water*, „Environment International”, nr 9(3), s. 165–171.
- Murakami M., Abe M., Kakumoto Y., Kawano H., Fukasawa H., Saha M., Takeda H. (2012). *Evaluation of ginkgo as a biomonitor of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Atmospheric Environment”, nr 54, s. 9–17.
- Musat F., Vogt C., Richnow H.H. (2016). *Carbon and hydrogen stable isotope fractionation associated with the aerobic and anaerobic degradation of saturated and alkylated aromatic hydrocarbons*, „Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology”, nr 26, s. 211–226.
- Nadarajah N., Van H.J., Pannu J., Singh A., Ward O. (2002). *Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants*, „Applied Microbiology and Biotechnology”, nr 59, s. 540–544.
- Naffrechoux E., Chanoux S., Petrier C., Suptil J. (2000). *Sonochemical and photochemical oxidation of organic matter*, „Ultrasonics Sonochemistry”, nr 7(4), s. 255–259.
- Nagao S., Matsunaga T., Suzuki Y., Ueno T., Amano H. (2003). *Characteristics of humic substances in the Kuji River waters as determined by high-performance size exclusion chromatography with fluorescence detection*, „Water Research”, nr 37(17), s. 4159–4170.
- Nakamiya K., Furuichi T., Ishii K., Souda I. (2004). *Degradation of chlorinated dioxin in denitrifying activated sludge from leachate treatment plant of a landfill*, „Journal of Material Cycles and Waste Management”, nr 6, s. 35–40.
- National Academy of Sciences (1975). *Petroleum in the Marine Environment*, Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Nawrocki J. (1999). *Zaawansowane procesy utleniania w oczyszczaniu wody*, „Ochrona Środowiska”, nr 3(74), s. 31.

- Netzer F. von, Kuntze K., Vogt C., Richnow H.H., Boll M., Lueders T. (2016). *Functional gene markers for fumarate-adding and dearomatising key enzymes in anaerobic aromatic hydrocarbon degradation in terrestrial environments*, „Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology”, nr 26, s. 180–194.
- Neu T.R. (1996). *Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces*, „Microbiology Reviews”, nr 60, s. 151–166.
- Nisbet I.C.T., LaGoy P.K. (1992). *Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*, „Regulatory Toxicology and Pharmacology”, nr 16(3), s. 290–300.
- Niu J., Sun P., Schramm K.W. (2007). *Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with fly ash particles under simulated sunlight irradiation*, „Journal of Photochemistry und Photobiology A: Chemistry”, nr 186, s. 93–98.
- Nogueira R.F.P., Guimarães J.R. (2000). *Photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol by ferrioxalate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system*, „Water Research”, nr 34, s. 895–901.
- Noordman W.H., Janssen D.B. (2002). *Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by Pseudomonas aeruginosa*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 68, nr 4502–4508.
- Noordman W.H., Wachter J.H.J., De Boer G.J., Janssen D.B. (2002). *The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by Pseudomonas aeruginosa varies with substrate availability*, „Journal of Biotechnology”, nr 94(2), s. 195–212.
- Nwinyi O.C., Ajayi O.O., Amund O.O. (2016). *Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of Pseudomonas*, „Brazilian Journal of Microbiology”, nr 47(3), s. 551–562, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.026>.
- Odukkathil G., Vasudevan N.L. (2013). *Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil*, „Reviews in Environmental Science and Bio/Technology”, nr 12, s. 421–444.
- Ojha L., Wilhelm M.B., Murchie S.L., McEwen A.S., Wray J.J., Hanley J., Massé M., Chojnacki M. (2015). *Spectral evidence for hydrated salts in recurring slope lineae on Mars*, „Nature Geoscience”, nr 8(11), s. 829–832, doi:10.1038/ngeo2546.
- Okparanma R.N., Mouazen A.M. (2013). *Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: A review of spectroscopic and nonspectroscopic techniques*, „Applied Spectroscopy Reviews”, t. 48, nr 6, s. 458–486.
- Oleszczuk P., Baran S. (2005). *Polycyclic aromatic hydrocarbons content in shoots and leaves of willow (Salix viminalis) cultivated on the sewage sludge-amended soil*, „Water, Air, & Soil Pollution”, nr 168, s. 91–111.
- Onianwa P.C. (1995). *Petroleum hydrocarbon pollution of urban topsoil in Ibadan City, Nigeria*, „Environment International”, t. 21, nr 3, s. 341–343.
- Oppenländer T. (2003). *Photochemical Purification of Water and Air*, Weinheim: Wiley-VCH.
- Oudot J., Merlin F.X., Pinvidic P. (1998). *Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in eustarine sediments*, „Marine Environmental Research”, nr 45, s. 113–125.
- Paganini L., Villanueva G.L., Roth L. i in. (2020). *A measurement of water vapour amid a largely quiescent environment on Europa*, „Nature Astronomy”, nr 4, s. 266–272, <https://doi.org/10.1038/s41550-019-0933-6>.

- Pajares A., Bregliani M., Montaña M.P., Criado S., Massad W., Gianotti J., Gutiérrez I., García N.A. (2010). *Visible-light promoted photoprocesses on aqueous gallic acid in the presence of riboflavin. Kinetics and mechanism*, „Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry”, nr 209, s. 89–94.
- Pawlak Z., Rauckyte T., Oloyede A. (2008). *Oil, grease and used petroleum oil management and environmental economic issues*, „Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering”, nr 26(1), s. 11–17.
- Pehkonen S.O., Zhang Q. (2002). *The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: A critical review*, „Critical Reviews in Environmental Science and Technology”, nr 131, s. 17–72.
- Pelaez M., Nolan N.T., Pillai S.C., Seery M.K., Falaras P., Kontos A.G., Dunlop P.S.M., Hamilton J.W.J., Byrne J.A., O’Shea K., Entezari M.H., Dionysiou D.D. (2012). *A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications*, „Applied Catalysis B: Environmental”, nr 125, s. 331–349.
- Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Fu X.Y., Gao F., Zhao W., Tian Y.S., Yao Q.H. (2008). *Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons*, „FEMS Microbiology Review”, nr 32, s. 927–955.
- Perera F., Wang S., Vishnevetsky J., Zhang B., Cole K.J., Tang D. (2011). *Polycyclic aromatic hydrocarbons–aromatic DNA adducts in cord blood and behavior scores in New York City children*, „Environ Health Perspect”, nr 119(8), s. 1176–1181.
- Perrichon P., Le Bihanic F., Bustamante P., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J., Cousin X. (2014). *Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (Danio rerio) and Japanese medaka (Oryzias latipes) embryo-larval assays*, „Environmental Science and Pollution Research”, nr 21(24), s. 13703–13719.
- Perry J.J. (1977). *Microbial metabolism of cyclic hydrocarbons and related compounds*, „Critical Reviews in Microbiology”, nr 5, s. 387–412.
- Perry J.J. (1979). *Microbial cooxidations involving hydrocarbons*, „Microbiology Reviews”, nr 43, s. 59–72.
- Pigoń K., Ruziewicz Z. (2007). *Chemia fizyczna*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Pijanowska A., Kaczorek E., Chrzanowski Ł., Olszanowski A. (2007). *Cell hydrophobicity of Pseudomonas spp and Bacillus spp bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillaya saponin*, „World Journal of Microbiology and Biotechnology”, nr 23(5), s. 677–682.
- Pirnik M.P. (1977). *Microbial oxidation of methyl branched alkanes*, „Critical Reviews in Microbiology”, nr 5, s. 413–422.
- Pirnik M.P., Atlas R.M., Bartha R. (1974). *Hydrocarbon metabolism by Brevibacterium erythrogenes: Normal and branched alkanes*, „Journal of Bacteriology”, nr 119, s. 868–878.
- Plant L., Jeff M. (1994). *Hydrogen peroxide: A potent force to destroy organics in wastewater*, „Chemical Engineering”, nr 101, s. 16–25.
- Platt J., Bell B. (2014). *NASA Space Assets Detect Ocean inside Saturn Moon*, NASA/JPL, 3 kwietnia, <https://web.archive.org/web/20170714031155/https://www.jpl.nasa.gov/news/news.php?release=2014-246&2> (dostęp: 12.03.2019).
- Prajapati S.K., Tripathi B.D. (2008). *Biomonitoring seasonal variation of urban air polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using Ficus benghalensis leaves*, „Environmental Pollution”, nr 151, s. 543–548.



- Prokop A., Sobotka H. (1975). *Insoluble substrate and oxygen transport in hydrocarbon fermentation*, w: S.R. Tannenbaum, D.I.C. Wang (red.), *Single Cell Protein II* (s. 127–157), Cambridge, MA: MIT Press.
- Prousek J. (1996a). *Advanced oxidation processes for water treatment – chemical processes*, „Chemicke Listy”, nr 90, s. 229–237.
- Prousek J. (1996b). *Advanced oxidation processes for water treatment – photochemical processes*, „Chemicke Listy”, nr 90, s. 307–315.
- Rabus R., Widdel F. (1995). *Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria*, „Archives of Microbiology”, nr 163, s. 96–103.
- Rabus R., Wilkes H., Behrends A., Armstroff A., Fischer T., Pierik A.J., Widdel F. (2001). *Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl) succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism*, „Journal of Bacteriology”, nr 183, s. 1707–1715.
- Rakowska J., Radwan K., Ślosorz Z., Pietraszek E., Łudzik M., Suchorab P. (2012). *Usuwanie substancji ropopochodnych z dróg i gruntów*, Józefów: Państwowy Instytut Badawczy.
- Rao K.J., Chaudhuri R.G., Paria S. (2014). *Naphthalene degradation in the presence of natural-synthetic surfactants mixture by mixed bacterial cultures*, „Journal of Environmental Chemical Engineering”, nr 2(2), s. 826–831.
- Rarata G., Surmacz P. (2009). *Nadtlenek wodoru klasy HTP jako uniwersalne medium napędowe oraz utleniacz*, „Prace Instytutu Lotnictwa”, nr 7(202), s. 125–158.
- Ratledge C. (1978). *Degradation of aliphatic hydrocarbons*, w: J.R. Watkinson (red.), *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons-1* (s. 1–46), London: Applied Science.
- Revill A.T., Carr M.R., Rowland S.R. (1992). *Use of oxidative degradation followed by capillary gas chromatography-mass spectrometry and multi-dimensional scaling analysis to fingerprint unresolved complex mixtures of hydrocarbons*, „Journal of Chromatography A”, t. 589, nr 1–2, s. 281–286.
- Ridgeway H.F., Safarik J., Phipps D., Carl P., Clark D. (1990). *Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degrading bacteria and a contaminated aquifer*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 56, s. 3565–3575.
- Robertson P.K.J. (1996). *Semiconductor photocatalysis: An environmentally acceptable alternative production technique and effluent treatment process*, „Journal of Cleaner Production”, nr 4(3–4), s. 203–212.
- Rogoff M.H. (1961). *Oxidation of aromatic compounds by bacteria*, „Advances in Applied Microbiology”, nr 3, s. 193–221.
- Rojo F. (2009). *Degradation of alkanes by bacteria*, „Environmental Microbiology”, nr 11(10), s. 2477–2490.
- Romero M.C., Cazau M.C., Giorgieri S., Arambarri A.M. (1998). *Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream*, „Environmental Pollution”, nr 101, s. 355–359.
- Ron E.Z., Rosenberg E. (2001). *Natural roles of biosurfactants*, „Environmental Microbiology”, nr 3, s. 229–236.
- Ron E.Z., Rosenberg E. (2002). *Biosurfactants and oil bioremediation*, „Current Opinion in Biotechnology”, nr 13, s. 249–252.

- Rosenberg E., Ron E.Z. (1999). *High- and low-molecular-mass microbial surfactants*, „Applied Microbiology and Biotechnology”, nr 52, s. 154–162.
- Sadecka J., Tothova J. (2007). *Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification – a review*, „Czech Journal of Food Sciences”, nr 25, s.159–173.
- Sakari M., Hsia B.S., Tahir R. i in. (2014). *Estuary and sea-associated wetlands as final sink for organic pollutants: A case study in Sabah, Malaysia*, „International Journal of Environment and Bioenergy”, t. 9, nr 1, s. 1–16.
- Salam S.B. (2016). *Metabolism of waste engine oil by Pseudomonas species*, „3 Biotech”, nr 6(1):98, s. 1–10, <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0419-5>.
- Sammarie A.I.A., Akela A.A. (2011). *Distribution of injected pesticides in date palm trees*, „Agriculture and Biology Journal of North America”, nr 12, s. 1416–1426.
- Schaeffer T.L., Cantwell S.G., Brown J.L., Watt D.S., Fall R.R. (1979). *Microbial growth on hydrocarbons: Terminal branching inhibits biodegradation*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 38, s. 742–746.
- Schippers C., Geßner K., Müller T., Scheper T. (2000). *Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture*, „Journal of Biotechnology”, nr 83(3), nr 189–198.
- Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). *Environmental Organic Chemistry*, New York: John Wiley and Sons.
- Scotter C.N.G. (1997). *Non-destructive spectroscopic techniques for the measurement of food quality*, „Trends in Food Science and Technology”, nr 8, s. 285–292.
- Scott J.P., Ollis D.F. (1995). *Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: Review and recommendations*, „Environmental Progress”, nr 14, s. 88–110.
- Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunetti G. (1991). *Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy*, „Soil Science”, nr 152(4), s. 259–271.
- Shankar P., Geier M.C., Truong L., McClure R.S., Pande P., Waters K.M., Tanguay R.L. (2019). *Coupling genome-wide transcriptomics and developmental toxicity profiles in zebrafish to characterize polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) hazard*, „International Journal of Molecular Sciences”, nr 20(10), s. 2570.
- Shen L., Ji H.F. (2010). *The mechanisms of ROS-photogeneration by berberine, a natural isoquinoline alkaloid*, „Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology”, nr 99, s. 154–156.
- Shennan L. (1984). *Hydrocarbons as substrates in industrial fermentation*, w: R.M. Atlas (red.), *Petroleum Microbiology* (s. 643–683), New York: Macmillan Co.
- Sierra M.M.D., Donard O.F.X., Etcheber Ch., Soriano-Sierrad E.J., Ewald M. (2001). *Fluorescence and DOC contents of pore waters from coastal and deep-sea sediments in the Gulf of Biscay*, „Organic Geochemistry”, nr 32, s. 1319–1328.
- Sikorska E. (2008). *Metody fluorescencyjne w badaniach żywności*, Poznań: Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu.
- Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J. (2007). *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, przeł. S. Jankowski, M. Potrzebowski, M. Sochacki, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Singleton D.R., Richardson S.D., Aitken M.D. (2011). *Pyrosequence analysis of bacterial communities in aerobic bioreactors treating polycyclic aromatic*

- hydrocarbon-contaminated soil*, „Biodegradation”, nr 22, s. 1061–1073, doi: 10.1007/s10532-011-9463-3.
- Sinkkonen S., Paasivirta J. (2000). *Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling*, „Chemosphere”, nr 40(9–11), s. 943–949.
- Sivonen K., Jones G. (1999). *Cyanobacterial toxins*, w: I. Chorus, J. Bartram J. (red.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management* (s. 41–111), London: E & FN Spon, London.
- Smolik E. (2001). *Wielopięścieniowe węglowodory aromatyczne*, Sosnowiec: Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Materiały ze szkolenia zorganizowanego przez Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego „Teoria i praktyka ocen oddziaływania środowiska na zdrowie”, s. 79–86.
- Smulek W., Kaczorek E. (2015). *Wykorzystanie surfaktantów naturalnych w biodegradacji oleju napędowego*, „Nafta-Gaz”, nr 2, s. 104–109.
- Soeder C.J., Papaderos A., Kleespies M., Kneifel H., Haegel F.H., Webb L. (1996). *Influence of phytogetic surfactants (quillaya saponin and soya lecithin) on bioelimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria*, „Applied Microbiology and Biotechnology”, nr 44(5), s. 654–659.
- Solano-Serena F., Marchal R., Heiss S., Vandecasteele J.P. (2004). *Degradation of isooctane by Mycobacterium austroafricanum IFP 2173: Growth and catabolic pathway*, „Journal of Applied Microbiology”, nr 97, s. 629–639.
- Solecki T. (2005). *Techniki i technologie usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntu i wód gruntowych*, w: *Bezpieczeństwo w transporcie drogowym towarów niebezpiecznych* (s. 21–42), praca zbiorowa, Kraków: Wydawnictwo SAPSP.
- Speight J.G. (1970). *A structural investigation of the constituents of Athabasca bitumen by proton magnetic resonance spectroscopy*, „Fuel”, nr 49(1), s. 76–90.
- Speight J.G. (2014). *The Chemistry and Technology of Petroleum*, vol. 137 of Chemical Industries, Boca Raton: CRC Press.
- Srogi K. (2007). *Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review*, „Environmental Chemistry Letters”, nr 5, s. 169–195.
- Staal Y.C.M., Hebels D.G.A.J., Herwijnen M.H.M. van, Gottschalk R.W.H., Schooten F.J. van, Delft J.H.M. van (2007). *Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation*, „Carcinogenesis”, nr 28(12), s. 2632–2640.
- Stirling L.A., Watkinson R.J., Higgins I.J. (1977). *Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: Isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium*, „Journal of General Microbiology”, nr 99, s. 119–125.
- Straube W.L., Nestler C.C., Hansen L.D., Ringleberg D., Pritchard P.H., Meehan J.J. (2003). *Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation*, „Acta Biotechnologica”, nr 23, s. 179–196, doi: 10.1002/abio.200390025.
- Strother T., Lowry S., Bravo B. (2013). *Measurement of dispersed oil in water using an infrared analysis method*, Application Note 52439, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Stuart B. (2004). *Infrared Spectroscopy Fundamentals and Applications. Analytical Techniques in the Sciences*, Hoboken: John Wiley & Sons.

- Suegara J., Lee B.D., Espino M., Nakai S., Hosomi M. (2005). *Photodegradation of pentachlorophenol and its degradation pathways predicted using density functional theory*, „Chemosphere”, t. 61, nr 3, s. 341–346.
- Suryaman D., Hasegawa K., Kagaya S., Yoshimura T. (2009). *Continuous mineralization of concentrated phenol dissolved in an electrolyte containing tap water by integrating biological–photocatalytic treatment with TiO<sub>2</sub> separation: utilization of sunlight and reuse of TiO<sub>2</sub>*, „Environmental Technology”, nr 30, s. 215–224.
- Surygała J. (red.) (2006). *Vademecum rafinera. Ropa naftowa: Właściwości, przetwarzanie, produkty*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
- Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z., Stepnowski P. (2010). *Monitoring i analityka zanieczyszczeń w środowisku*, Gdańsk: Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego.
- Szabo A.G. (2000). *Fluorescence principles and measurement*, w: M.G. Gore (red.), *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry* (s. 33–37), New York–Oxford: Oxford University Press.
- Szopa P., Czerniak J., Gacek A. (2013). *Zastosowanie pomiarów dwuwymiarowej barwy w towaroznawstwie*, „Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie”, nr 924, s. 59–74.
- Śliwka E. (2000). *Oznaczenie zanieczyszczeń naftowych w glebie*, w: J. Surygała (red.), *Zanieczyszczenia naftowe w gruncie* (s. 113–160), Poznań: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej.
- Śliwka E., Kołwzan B., Kołodziej K. (2015). *Zastosowanie spektroskopii <sup>1</sup>H NMR do oceny przebiegu biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych*, „Ochrona Środowiska”, nr 37(2), s. 55–60.
- Śliwka E., Surygała J. (1994). *The chemical structure of low temperature tars obtained from Polish low rank coals*, „Polish Journal of Applied Chemistry”, nr 38(1), s. 101–111.
- Tang Y., Ali Z., Zou J., Jin G., Zhu J., Yang J., Dai J. (2017). *Detection methods for Pseudomonas aeruginosa: History and future perspective*, „Royal Society of Chemistry Advances”, nr 7, s. 51789–51800.
- Tarcau D., Cucu-Man S., Boruvkova J. i in. (2013). *Organochlorine pesticides in soil, moss and tree-bark from North-Eastern Romania*, „Science of the Total Environment”, nr 456–457, s. 317–324.
- Tayade R.J., Surolia P.K., Kulkarni R.G., Jasra R.V. (2007). *Photocatalytic degradation of dyes and organic contaminants in water using nanocrystalline anatase and rutile TiO<sub>2</sub>*, „Science and Technology of Advanced Materials”, nr 8, s. 455–462.
- Tedesco S.A. (1995). *Surface Geochemistry in Petroleum Exploration*, New York: Chapman Hall.
- The Global Risks Report (2020). 15th Edition, [http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_Global\\_Risk\\_Report\\_2020.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_Global_Risk_Report_2020.pdf) (dostęp: 2.02.2021).
- The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPFL) (2012). *Sampling and monitoring of marine oil spills*, „Technical Information Paper”, nr 14, <http://www.environmentalunit.com/Documentation/08%20Sampling/ITOPF%20Sampling%20and%20Monitoring.pdf> (dostęp: 12.01.2019).
- Thominette F., Verdu J. (1984). *Photo-oxidative behaviour of crude oils relative to sea pollution: Part I Comparative study of various crude oils and model systems*, „Marine Chemistry”, nr 15(2), s. 91–104.

- Thorsen W.A., Gregory C.W., Damian S. (2004). *Bioavailability of PAHs: Effects of soot carbon and PAH source*, „Environmental Science & Technology”, nr 38, s. 2029–2037.
- Trudgill P.W. (1978). *Microbial degradation of alicyclic hydrocarbons*, w: J.R. Watkinson (red.), *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons-I* (s. 47–84), London: Applied Science.
- Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P. (1995). *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil*, „Canadian Journal of Microbiology”, nr 41, s. 470–476.
- Van der Linden A., Thijsse G.J.E. (1965). *The mechanisms of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons*, „Advances in Enzymology”, nr 27, s. 469–546.
- Van Eyk J., Bartels J. (1968). *Paraffin oxidation in Pseudomonas aeruginosa. I. Induction of paraffin oxidation*, „Journal of Bacteriology”, nr 96, s. 706–712.
- Van Gerven T., Mul G., Moulijn J., Stankiewicz A. (2007). *A review of intensification of photocatalytic processes*, „Chemical Engineering and Processing”, nr 46(9), s. 781–789.
- Van Tiem L.A., Di Giulio R.T. (2011). *AHR2 knockdown prevents PAH-mediated cardiac toxicity and XRE- and ARE-associated gene induction in zebrafish (Danio rerio)*, „Toxicology and Applied Pharmacology”, nr 254(3), s. 280–287.
- Verrhiest G.J., Clement B., Volat B., Montuelle B., Perrodin Y. (2002). *Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and microbial communities in a natural freshwater sediment*, „Chemosphere”, nr 46, s. 187–196.
- Walton B.T., Anderson T.A. (1988). *Structural properties of organic chemicals as predictors of biodegradation and microbial toxicity in soils*, „Chemosphere”, nr 17, s. 1501–1507.
- Wang C., Sun H., Li J., Li Y., Zhang Q. (2009). *Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus Phanerochaete chrysosporium in soils*, „Chemosphere”, nr 77, s. 733–738.
- Wang S., Mulligan C.N. (2004). *An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil*, „Chemosphere”, nr 57, s. 1079–1089.
- Wang W., Wang L., Shao Z. (2018). *Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation pathways of the obligate marine PAH degrader Cycloclasticus sp. strain P1*, „Applied and Environmental Microbiology”, <https://doi.org/10.1128/AEM.01261-18>.
- Wang X.K., Chen G.H., Yao Z.Y. (2003). *Sonochemical degradation of polychlorinated biphenyls in aqueous solution*, „Chinese Chemical Letters”, nr 14, s. 205–208.
- Wang Z., Fingas M.F. (2003). *Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques*, „Marine Pollution Bulletin”, t. 47, nr 9–12, s. 423–452.
- Wang Z., Fingas M., Sergy G. (1994). *Study of 22-year-old arrow oil samples using biomarker compounds by GC/MS*, „Environmental Science and Technology”, nr 28(9), s. 1733–1746.
- Wąsowski J., Piotrowska A. (2002). *Rozkład organicznych zanieczyszczeń w procesach pogłębionego utleniania*, „Ochrona Środowiska”, nr 85, s. 27–32.
- Weisman W. (red.) (1998). *Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media (Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series)*, t. 1, Amherst, MA: Amherst Scientific Publishers.

- Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.K., Zotchev S.B., Throne-Holst M. (2007). *Bacterial metabolism of longchain n-alkanes*, „Applied Microbiology and Biotechnology”, nr 76, s. 1209–1221.
- Whyte L.G., Bourbonniere L., Greer C.W. (1997). *Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychotrophic Pseudomonas strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways*, „Applied and Environmental Microbiology”, nr 63, s. 3719–3723.
- Widdel F., Rabus R. (2001). *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons*, „Current Opinion in Biotechnology”, nr 12, s. 259–276.
- Wigger P.E., Torkelson B.E. (1997). *Petroleum hydrocarbon fingerprinting: Numerical interpretation developments*, Proceedings of the International Petroleum Environmental Conference, San Antonio, TX.
- Wilkes H., Schwarzbauer J. (2010). *Hydrocarbons: An introduction to structure, physico-chemical properties and natural occurrence*, w: K.N. Timmis (red.), *Handbook of Hydrocarbons and Lipid Microbiology* (s. 1–48), Berlin: Springer.
- Wincent E., Le Bihanic F., Dreij K. (2016). *Induction and inhibition of human cytochrome P4501 by oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Toxicological Research (Camb)”, nr 5(3), s. 788–799.
- Witek J. (2011). Wpływ ramnolipidu otrzymanego z *Pseudomonas aeruginosa* BI na biodegradację produktów naftowych w układach rozproszonych, praca doktorska, Politechnika Wroclawska.
- Witze A. (2014). *Icy Enceladus hides a watery ocean*, „Nature”, doi:10.1038/nature.2014.14985.
- Włodarczyk-Makuła M. (2011). *Zmiany ilościowe WWA w ściekach oczyszczonych podczas utleniania*, „Rocznik Ochrona Środowiska”, nr 13(2), s. 1093–1104.
- Włodarczyk-Makuła M., Obstój A. (2013). *Fotodegradacja wybranych ksenobiotyków organicznych*, „LAB Laboratoria, Aparatura, Badania”, nr 18(3), s. 20–27.
- Włodarczyk-Makuła M., Wierzbicka M. (2013). *Warunki biodegradacji WWA w środowisku wodnym*, „LAB Laboratoria Aparatura Badania”, nr 3, s. 28–32.
- Wongnapapan P., Wattayakorn G., Snidvongs A. (1999). *Petroleum hydrocarbon in seawater and some sediments of the South China Sea, Area I: Gulf of Thailand and East Coast of Peninsular Malaysia*, w: *Proceedings of the 1st Technical Seminar on Marine Fishery Resources Survey in the South China Sea*, s. 105–110, <https://core.ac.uk/reader/195382989> (dostęp: 23.03.2019).
- Wu C., Liu X., Wei D., Fan J., Wang L. (2001). *Photosonochemical degradation of Phenol in water*, „Water Research”, nr 35(16), s. 3927–3933.
- Wu Y., Kim S.J., Weyand E.H. (1994). *Bioavailability of manufactured gas plant residue (MPG) components in mice following ingestion: Comparison of adulterated powder and gel diets*, „Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, nr 7, s. 175–182.
- Xia W., Du Z., Cui Q., Dong H., Wang F., He P., Tang Y.C. (2014). *Biosurfactant produced by novel Pseudomonas sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons*, „Journal of Hazardous Materials”, nr 276, s. 489–498, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.062>.
- Xia X., Li G., Yang Z., Chen Y., Huang G.H. (2009). *Effects of fulvic concentration and origin on photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution: Importance of active oxygen*, „Environmental Pollution”, nr 157, s. 1352–1359.

- Xie J., Wang P., Liu J., Lv X., Jiang D., Sun C. (2011). *Photodegradation of lambda-cyhalothrin and cypermethrin in aqueous solution as affected by humic acid and/or copper: Intermediates and degradation pathways*, „Environmental Toxicology and Chemistry”, nr 30(11), s. 2440–2448.
- Xue N., Xu X., Jin Z. (2005). *Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir*, „Chemosphere”, nr 61, s. 1594–1606.
- Yang J., Cui S., Qiao J.-Q., Lian H.-Z. (2014). *The photocatalytic dehalogenation of chlorophenols and bromophenols by cobalt doped nano TiO<sub>2</sub>*, „Journal of Molecular Catalysis A: Chemical”, nr 395, s. 42–51.
- Yin H., Tan Q., Chen Y. i in. (2011). *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution recorded in annual rings of ginkgo (Gingko biloba L): Determination of PAHs by GC/MS after accelerated solvent extraction*, „Microchemical Journal”, nr 97, s. 138–143.
- Zawadzki P., Kudlek E., Dudziak M. (2017). *Wpływ rodzaju fotokatalizatora i odczynu roztworu na efektywność fotokatalitycznego rozkładu Bisfenolu A*, „Proceedings of ECOpole”, t. 11 nr 2, s. 661–669.
- Zepp R.G., Schlotzhauer P.F. (1983). *Influence of algae on photolysis rates of chemicals in water*, „Environmental Science & Technology”, nr 17(8), s. 462–468.
- Zhan M., Yang X., Xian Q., Kong L. (2006). *Photosensitized degradation of bisphenol a involving reactive oxygen species in the presence of humic substances*, „Chemosphere”, nr 63, s. 378–386.
- Zhang L., Li P., Gong Z., Li X. (2008). *Photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil surfaces using TiO<sub>2</sub> under UV light*, „Journal of Hazardous Materials”, nr 158, s. 478–484.
- Zhang Z., Hou Z., Yang C., Ma C., Tao F., Xu P. (2011). *Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8*, „Bioresource Technology”, nr 102, s. 4111–4116.
- Zhou W., Zhu L. (2007a). *Enhanced desorption of phenanthrene from contaminated soil using anionic/nonionic mixed surfactant*, „Environmental Pollution”, nr 147, s. 350–357.
- Zhou W., Zhu L. (2007b). *Efficiency of surfactant-enhanced desorption for contaminated soils depending on the component characteristics of soil surfactant PAHs system*, „Environmental Pollution”, nr 147, s. 66–73.
- Zieliński W., Rajca A. (2000). *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
- ZoBell C.E. (1950). *Assimilation of hydrocarbons by microorganisms*, „Advances in Enzymology”, nr 10, s. 443–486.

### Akty prawne i normatywne

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbon, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, USA, 1999.
- British Columbia Ministry of Environment (BCME) (2002). Aliphatic/aromatic separation of extractable petroleum hydrocarbons in solids or water by silica gel fractionation, in Analytical Method 7 for Contaminated Sites, Version 2.1, s. 3–11.

- COM/2018/337 final – 2018/0169 (COD) Wniosek. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie minimalnych wymogów dotyczących ponownego wykorzystania wody, Document 52018PC0337, Bruksela 2018.
- COM (2007). 414 Sprawozdanie Komisji dla Rady i Parlamentu Europejskiego – Sprawozdanie uzupełniające komunikat w sprawie rozwiązania problemu dotyczącego niedoboru wody i susz w Unii Europejskiej, Document 52008DC0875, Bruksela 2008.
- COM (2015). 614 Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów, Zamknięcie obiegu – plan działania UE dotyczący gospodarki o obiegu zamkniętym, Bruksela 2015.
- Dyrektywa Rady 98/83/WE z dnia 3 listopada 1998 r. W sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, Document 31998L0083.
- Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej.
- Dyrektywa 2006/7/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 15 lutego 2006 r. dotycząca zarządzania jakością wody w kąpieliskach i uchylająca dyrektywę 76/160/EWG, Document 32006L0007.
- Dyrektywa Komisji 2014/101/UE z dnia 30 października 2014 r. zmieniająca dyrektywę 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiającą ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej, Document 32014L0101.
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE z dnia 16 grudnia 2008 r. W sprawie środowiskowych norm jakości w dziedzinie polityki wodnej, zmieniająca i w następstwie uchylająca dyrektywy Rady 82/176/EWG, 83/513/EWG, 84/156/EWG, 84/491/EWG i 86/280/EWG oraz zmieniająca dyrektywę 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, Document 32008L0105.
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE zmieniająca dyrektywy 2000/60/WE i 2008/105/WE w zakresie substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej, Document 32013L0039.
- Federal Water Pollution Control Act (33 U.S.C. 1251 et seq.) (2002), <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-08/documents/federal-water-pollution-control-act-508full.pdf> (dostęp: 6.10.2018).
- GIOŚ (2018). Stan środowiska w Polsce. Raport 2018, [https://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/raporty/Stan\\_srodowiska\\_w\\_Polsce-Raport\\_2018.pdf](https://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/raporty/Stan_srodowiska_w_Polsce-Raport_2018.pdf) (dostęp: 3.02.2021).
- GIOŚ (2019). Syntetyczny raport z klasyfikacji i oceny stanu jednolitych części wód powierzchniowych wykonanej za 2019 rok na podstawie danych z lat 2014–2019, [https://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/monitoring\\_wod/Synteza\\_ocena\\_stanu\\_wod\\_powierzchniowych\\_2014-2019.pdf](https://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/monitoring_wod/Synteza_ocena_stanu_wod_powierzchniowych_2014-2019.pdf) (dostęp: 3.02.2021).
- GIOŚ (2020). *Stan środowiska w województwie małopolskim. Raport 2020*, [https://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/raporty/Stan\\_srodowiska\\_2020\\_malopolskie.pdf](https://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/raporty/Stan_srodowiska_2020_malopolskie.pdf) (dostęp: 3.02.2021).
- Główny Urząd Statystyczny, Urząd Statystyczny w Białymstoku, Wskaźniki zielonej gospodarki w Polsce 2019, Warszawa, Białystok, grudzień 2020, s. 18.
- IUPAC (2007). *Glossary of Terms Used in Photochemistry*, 3rd edition, [https://goldbook.iupac.org/src/src\\_PAC200779293.html](https://goldbook.iupac.org/src/src_PAC200779293.html) (dostęp: 10.10.2018).
- Norma PN-EN ISO 9377–2: Jakość wody.



- Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 13 kwietnia 2018 r. W sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o zapobieganiu szkodom w środowisku i ich naprawie (Dz.U. z 2018 r. poz. 954).
- PN-EN ISO 14001. Systemy zarządzania środowiskowego. Wymagania i wytyczne stosowania.
- PN-EN ISO 14004. Systemy zarządzania środowiskowego. Ogólne wytyczne dotyczące zasad, systemów i technik wspomagających.
- Prüss-Ustün A., Wolf J., Corvalán C., Bos R., Neira M. (2016). *Preventing disease through healthy environments: A global assessment of the burden of disease from environmental risks*, Geneva: World Health Organization, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204585/1/9789241565196\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204585/1/9789241565196_eng.pdf?ua=1) (dostęp: 18.12.2017).
- Review of World Water Resources by Country Water Reports 23 (2003), *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej w sprawie form i sposobu prowadzenia monitoringu jednolitych części wód powierzchniowych i jednolitych części wód podziemnych (Dz.U. z 2019 r. poz. 2147).
- Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 r. w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych (Dz.U. z 2019 r. poz. 1311).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 r. W sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego (Dz.U. z 2014 r. poz. 1800).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 19 lipca 2016 r. W sprawie form i sposobu prowadzenia monitoringu jednolitych części wód powierzchniowych i podziemnych (Dz.U. z 2016 r. poz. 1178).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 2 lutego 2011 r. W sprawie profilu wody w kąpielisku (Dz.U. z 2011 r. Nr 36, poz. 191).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 21 grudnia 2015 r. W sprawie kryteriów i sposobu oceny stanu jednolitych części wód podziemnych (Dz.U. z 2016 r. poz. 85).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 21 lipca 2016 r. W sprawie sposobu klasyfikacji stanu jednolitych części wód powierzchniowych oraz środowiskowych norm jakości dla substancji priorytetowych (Dz.U. z 2016 r. poz. 1187).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. W sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia (Dz.U. z 2002 r. Nr 204, poz. 1728).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 maja 2016 r. W sprawie wykazu substancji priorytetowych (Dz.U. z 2016 r. poz. 681).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 28 kwietnia 2011 r. W sprawie ewidencji kąpielisk oraz sposobu oznakowania kąpielisk i miejsc wykorzystywanych do kąpeli (Dz.U. z 2011 r. Nr 91, poz. 527).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. W sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. z 2017 r. poz. 2294).

- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 8 kwietnia 2011 r. W sprawie prowadzenia nadzoru nad jakością wody w kąpielisku i miejscu wykorzystywanym do kąpielii (Dz.U. z 2011 r. Nr 86, poz. 478).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 listopada 2015 r. W sprawie wymagań, jakim powinna odpowiadać woda na pływalniach (Dz.U. z 2015 r. poz. 2016).
- Standard Test Method for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Water and Wastewater with Solvent Extraction using Mid-IR Laser Spectroscopy, ASTM Standard D7678-11, „QuantaRed Technologies GmbH”, <https://www.astm.org/d7678-11.html> (dostęp: 26.06.2019).
- Systemy zarządzania środowiskowego: Norma Europejska EN ISO 14001: 2004.
- Toxicological Profile for Polycyclic Hydrocarbons, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995, Washington, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf> (dostęp: 23.11.2018).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), Analytical method guidance for EPA method 1664a implementation and use (40 CFR part 136), Office of Water 4303, 2000 (EPA-821-R-98-002).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2003. Method 8015C (SW-846): Nonhalogenated Organics Using GC/FID, Revision 4. Washington, DC.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA): Method 8100, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons 1986, <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8100.pdf> (dostęp: 5.09.2018).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), Methods for the Chemical Analysis of Water and Wastes (MCAWW) (EPA/600/4-79/020).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable.
- Ustawa wodna z dnia 19 września 1922 r. (Dz.U. z 1922 r. Nr 102, poz. 936).
- Ustawa z dnia 11 lipca 2014 r. O zmianie ustawy – Prawo ochrony środowiska oraz niektórych innych ustaw (Dz.U. z 2014 r. poz. 1101).
- Ustawa z dnia 13 kwietnia 2007 r. o zapobieganiu szkodom w środowisku i ich naprawie z późn. zm. (Dz.U. z 2007 r. Nr 75, poz. 493).
- Ustawa z dnia 14 marca 1985 r. O Państwowej Inspekcji Sanitarnej (Dz.U. z 1985 r. Nr 12, poz. 49).
- Ustawa z dnia 18 lipca 2001 r. Prawo wodne (Dz.U. z 2001 r. Nr 115, poz. 1229).
- Ustawa z dnia 18 sierpnia 2011 r. O bezpieczeństwie osób przebywających na obszarach wodnych (Dz.U. z 2011 r. Nr 208, poz. 1240).
- Ustawa z dnia 20 lipca 2017 r. – Prawo wodne (Dz.U. z 2017 r. poz. 1566).
- Ustawa z dnia 24 października 1974 r. Prawo wodne (Dz.U. z 1974 r. Nr 38, poz. 230).
- Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska (Dz.U. z 2001 r. Nr 62, poz. 627).
- Ustawa z dnia 30 maja 1962 r. Prawo wodne (Dz.U. z 1962 r. Nr 34, poz. 158).
- Ustawa z dnia 31 stycznia 1961 r. O ochronie wód przed zanieczyszczeniem (Dz.U. z 1961 r. Nr 5, poz. 33).
- Ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. O zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków (Dz.U. z 2001 r. Nr 72, poz. 747).

- World Health Organization, 1958, International standards for drinking-water: Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization, 1963, International standards for drinking-water: Geneva, World Health Organization, Second edition.
- World Health Organization, 1971, International standards for drinking-water: Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization, 1984, Guidelines for Drinking-water Quality, First edition.
- World Health Organization, 1993, Guidelines for Drinking-water Quality, Second edition.
- World Health Organization, 1998, Guidelines for Drinking-water Quality, Second edition. Addendum to Volume 2: Health Criteria and Other Supporting Information.
- World Health Organization, 2003, Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality: Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/59).
- World Health Organization, 2005, Petroleum products in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality: Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/05.08/123).
- World Health Organization, 2008, Guidelines for Drinking-water Quality, 3th edition.
- World Health Organization, 2011, Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition.
- World Health Organization, 2013, The World Health Report. Research for Universal Health Coverage.
- World Health Organization, 2017, Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum

### **Netografia**

- [www2.chemia.uj.edu.pl](http://www2.chemia.uj.edu.pl) (dostęp: 10.10.2018)
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (dostęp: 10.10.2018)
- [www.idexx.com](http://www.idexx.com) (dostęp: 8.06.2020)
- <http://maps.google.com> (dostęp: 12.05.2019)
- <https://astrobiology.nasa.gov/news/excited-states-of-pahs/> (dostęp: 1.04.2019)

## Spis rysunków i tabel

### Spis rysunków

Rysunek 1.	Wskaźnik dostępności wód powierzchniowych na 1 mieszkańca w Polsce w latach 2000–2019 .....	10
Rysunek 2.	Pochodzenie różnych grup węglowodorów .....	27
Rysunek 3.	Ogólny podział węglowodorów wielopierścieniowych...	28
Rysunek 4.	Nazwy i struktury WWA monitorowane zgodnie z zaleceniami Komitetu Naukowego UE ds. Żywności (SCF), Unii Europejskiej (UE) i Agencji Ochrony Środowiska USA (EPA) .....	29
Rysunek 5.	Zależność rozpuszczalności wybranych WWA w wodzie od liczby atomów węgla w cząsteczce .....	31
Rysunek 6.	Wartości względnych współczynników kancerogenności dla najbardziej rakotwórczych WWA .....	35
Rysunek 7.	Przejście elektronowe z podstawowego stanu oscylacyjnego do leżącego nad nim stanu oscylacyjnego cząsteczki wzbudzonej elektronowo. ....	49
Rysunek 8.	Uproszczony diagram Jabłońskiego ukazujący kolejne etapy prowadzące do fluorescencji. ....	53
Rysunek 9.	Przejścia elektronowe w cząsteczkach związków organicznych. ....	53
Rysunek 10.	Przejście $\pi \rightarrow \pi^*$ podwójnego wiązania C=C .....	54
Rysunek 11.	Absorpcyjne widmo UV benzenu w n-heksanie .....	57
Rysunek 12.	Charakterystyczne zakresy długości fali wzbudzenia dla węglowodorów aromatycznych .....	60
Rysunek 13.	Widma UV/VIS przykładowych węglowodorów aromatycznych .....	60

Rysunek 14.	Widmo emisji dla różnych frakcji ropy naftowej przy fali wzbudzenia 308 nm . . . . .	61
Rysunek 15.	Względne tempo degradacji węglowodorów . . . . .	70
Rysunek 16.	Drugi tlenowej degradacji n-alkanów poprzez utlenianie terminalne (po lewej) i subterminalne (po prawej). . . . .	73
Rysunek 17.	Beztlenowa degradacja alkanów. . . . .	75
Rysunek 18.	Zakresy długości fal i odpowiadające im procesy fotolizy	83
Rysunek 19.	Fazy procesu degradacji fenolu w roztworach wodnych .	83
Rysunek 20.	Klasyfikacja metod oczyszczania środowiska wodnego na podstawie zaawansowanych procesów utleniania (AOP). . . . .	86
Rysunek 21.	Ścieżka fotodegradacji benzenu . . . . .	90
Rysunek 22.	Schemat postępowania badawczego . . . . .	96
Rysunek 23.	Probówki z wodą po odwirowaniu . . . . .	104
Rysunek 24.	Reaktor do badań fotochemicznych . . . . .	106
Rysunek 25.	Hydrolyza substratu w odczynniku Pseudalert®: enzym rozszczepia podłoże w odczynniku w celu generowania fluorescencji w świetle ultrafioletowym . . . . .	113
Rysunek 26.	Stężenia TPH przed wirowaniem i po wirowaniu (T = 20°C, n = 1700 obr./min., t = 10 min) oraz skuteczność odwirowania. . . . .	114
Rysunek 27.	Skuteczność odwirowania substancji ropopochodnych z wody przy różnych prędkościach obrotowych (t = 10 min., T = 20°C) . . . . .	115
Rysunek 28.	Stężenie TPH w wodzie przed wirowaniem i po wirowaniu (n = 2700 obr./min., t = 10 min., T = 20°C i T = 55°C). . .	116
Rysunek 29.	Porównanie przykładowych efektywności odwirowania substancji ropopochodnych w zależności od prędkości i czasu wirowania . . . . .	117
Rysunek 30.	Stężenie TPH przed odwirowaniem i po odwirowaniu (czas 30 min., temperatura próbek 20°C) . . . . .	118
Rysunek 31.	Efektywność odwirowania TPH z próbek wody rzecznej przy różnych prędkościach obrotowych, czas wirowania 30 min. i T = 20°C . . . . .	118
Rysunek 32.	Stężenie TPH w próbkach pod wpływem zmian czasu ekspozycji na działanie promieniowania UV. . . . .	121
Rysunek 33.	Stężenie TPH w próbkach, w których obecny był TiO <sub>2</sub> , naświetlanych światłem naturalnym . . . . .	122

Rysunek 34.	Zależność czasu naświetlania promieniami UV i stężenia związków TPH obecnych w roztworze z $\text{TiO}_2$ .....	122
Rysunek 35.	Zestawienie efektywności rozkładu związków ropopochodnych i stężenia TPH po procesie fotokatalizy pod wpływem promieniowania UV z udziałem $\text{TiO}_2$ ....	123
Rysunek 36.	Zmiany stężenia TPH w roztworach z $\text{H}_2\text{O}_2$ poddanych działaniu światła naturalnego.....	124
Rysunek 37.	Stężenie TPH w roztworach z $\text{H}_2\text{O}_2$ poddanych działaniu promieniowania UV.....	125
Rysunek 38.	Intensywność fluorescencji przy różnych długościach fali wzbudzenia dla próbek przed procesem utleniania.....	126
Rysunek 39.	Intensywność fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 310 nm dla próbek przed procesem utleniania (linia ciągła) i po nim (linia przerywana).....	126
Rysunek 40.	Skuteczność badanych fotochemicznych metod degradacji TPH z roztworów wodnych.....	128
Rysunek 41.	Intensywność fluorescencji pochodzącej od <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	129
Rysunek 42.	Skuteczność bioremediacji dla różnych początkowych stężeń TPH.....	131
Rysunek 43.	Intensywność fluorescencji pochodzącej od <i>Pseudomonas aeruginosa</i> po 21 dniach bioremediacji.....	132
Rysunek 44.	Zależność wzrostu kolonii bakterii od stężenia początkowego TPH i tygodnia trwania eksperymentu... ..	133
Rysunek 45.	Zawartość TPH oraz liczba jtk w próbkach w kolejnych tygodniach bioremediacji <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	134
Rysunek 46.	Skuteczność bioremediacji i stężenie TPH po drugim tygodniu eksperymentu – próbki z dodatkiem oraz bez dodatku <i>S. mukorossi</i> .....	136
Rysunek 47.	Warianty schematu technologicznego dla oczyszczania wód ze związków ropopochodnych tworzące układy hybrydowe.....	139
Rysunek 48.	Schemat pierwszego wariantu technologicznego oczyszczania wód z TPH.....	140

### Spis tabel

Tabela 1.	Dopuszczalne stężenia wybranych substancji ropopochodnych w wodach powierzchniowych, $\mu\text{g/l}$ ....	17
-----------	---	----

Tabela 2.	Wartości graniczne wskaźników jakości wody, mg/l. . . . .	19
Tabela 3.	Podsumowanie statystyczne wskaźników chemicznych jakości wód analizowanych na potrzeby oceny wykonanej za 2019 r. dla jednolitych części wód rzecznych. . . . .	20
Tabela 4.	Charakterystyka i zastosowanie poszczególnych frakcji ropy naftowej. . . . .	25
Tabela 5.	Właściwości wybranych węglowodorów aromatycznych. . . . .	30
Tabela 6.	Podstawowe właściwości światła w zakresie od podczerwieni do nadfioletu. . . . .	48
Tabela 7.	Dane absorpcyjne izolowanych grup chromoforowych (przejścia o najniższej energii) . . . . .	55
Tabela 8.	Pasma absorpcji przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ w polienach. . . . .	56
Tabela 9.	Zakresy rodzaju przejść elektronowych i przykładowe długości fal w zależności od rodzaju związku . . . . .	59
Tabela 10.	Maksyma absorpcji dla wybranych węglowodorów aromatycznych . . . . .	61
Tabela 11.	Metody i narzędzia badawcze na poszczególnych etapach badań . . . . .	97
Tabela 12.	Błąd metody fluorymetrycznej przy prawdopodobieństwie $P = 95\%$ . . . . .	100
Tabela 13.	Zakresy przepuszczalności filtrów dla urządzenia FLUORAT®-02 . . . . .	102
Tabela 14.	Stężenia TPH w próbkach wody poddanych procesom AOP . . . . .	106
Tabela 15.	Warunki prowadzenia procesu bioremediacji . . . . .	110
Tabela 16.	Efektywność wirowania w dwóch temperaturach (prędkość wirowania 2700 obr./min., czas 10 min.) . . . . .	116
Tabela 17.	Zawartość TPH w wodzie w czasie poddania próbek działaniu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	131
Tabela 18.	Napięcie powierzchniowe w badanych grupach . . . . .	135
Tabela 19.	Średnie wartości zawartości TPH w wodzie po kolejnych tygodniach bioremediacji . . . . .	140
Tabela 20.	Zestawienie wad i zalet procesów oczyszczania wód . . . . .	143
Tabela 21.	Porównanie skuteczności oczyszczania wód ze związków ropopochodnych . . . . .	144

## Indeks nazwisk

- Abdel-Shafy H.I. – 63, 93, 154, 167  
Abdullah A.H. – 85, 161  
Abe M. – 167  
Abreu-Mota M.A. de – 42, 154  
Aepplic C. – 161  
Ahn Y. – 161  
Aiken M.D. – 65, 157  
Aislabie J. – 154, 159  
Aitken M.D. – 76, 154  
Ajayi O.O. – 36, 168  
Akela A.A. – 34, 171  
Alebic-Juretic A. – 93, 154  
Ali H.R. – 162  
Ali Z. – 173  
Allen J. – 158  
Al-Sulaiman A.M. – 63, 154  
Altenschmidt U. – 160  
Amano H. – 167  
Ambrosoli R. – 65, 75, 154  
Amor C. – 86, 154  
Amund O.O. – 36, 168  
Anderson K.A. – 161  
Anderson R.T. – 75, 158  
Anderson T.A. – 32, 174  
Andrade Brüning I.M.R. de – 161  
Anielak A.M. – 11, 32, 154  
Arambarri A.M. – 170  
Arey J.S. – 161  
Armstroff A. – 170  
Asada R. – 157  
Atkins P.W. – 48, 49, 154  
Atkinson R. – 157  
Atlas R.M. – 69, 70, 72, 154, 155, 169, 171  
Auffret M. – 77, 155  
Baccar N. – 157  
Badowska-Kozakiewicz A.M. – 8, 155  
Baeyer J.V.W.A. von – 73  
Bajkiewicz-Grabowska E. – 9, 155  
Baker A. – 45, 155, 162  
Baldini M.D. – 158  
Ballerini D. – 68, 155  
Bandowe B.A. – 34, 155  
Banerjee S. – 89, 155  
Baran S. – 34, 168  
Barboza C.A. de – 154  
Barbusiński K. – 84, 155  
Barja F. – 164  
Barra B. – 160  
Barragán M.J.L. – 157  
Bartels J. – 72, 174  
Bartha R. – 69, 70, 72, 154, 155, 169  
Bartram J. – 172  
Bąkowski W. – 34, 155  
Beal R. – 155  
Becker K.H. – 157  
Beer A. – 51  
Behrends A. – 170  
Behymer T.D. – 155  
Bell B. – 7, 169  
Bensalah F. – 161  
Bentham R.H. – 158  
Beran E. – 101, 155  
Berrada S. – 165  
Berthon J.F. – 46, 167  
Betts W.B. – 155  
Bewley R.J.F. – 66, 155  
Bícego M.C. – 154  
Bigalke M. – 155



- Bila D.M. – 159  
 Billiard S.M. – 34, 155  
 Bilò P.Z. – 103, 156  
 Binet P. – 34, 156  
 Biń A. – 84, 92, 156  
 Bisson W.H. – 157, 161  
 Blázquez B. – 157  
 Block B.A. – 156  
 Blough N.V. – 46, 85, 93, 156, 159  
 Błaszczuk M.K. – 67–70, 74, 156  
 Boamah L. – 155  
 Bodzek D. – 34, 155  
 Boles B.R. – 72, 156  
 Boll M. – 166, 168  
 Bolton J.R. – 79, 156  
 Boothroyd J.C. – 156  
 Boruvkova J. – 173  
 Bourbonniere L. – 175  
 Boving T.B. – 45, 156  
 Brackmann R. – 160  
 Braun A.M. – 84, 165  
 Bravo B. – 39, 40, 172  
 Bregliani M. – 169  
 Bregnard T. – 75, 156  
 Brette F. – 34, 36, 156  
 Brito A.P.X. – 161  
 Bro R. – 158  
 Brown D.R. – 34, 156  
 Brown J.K. – 39, 43, 156  
 Brown J.L. – 72, 159, 171  
 Brunetti G. – 171  
 Bruni V. – 165  
 Budzinski H. – 165, 169  
 Burczynski M.E. – 34, 156  
 Burns D.A. – 40, 157  
 Bustamante P. – 169  
 Byrne J.A. – 155, 169  
  
 Cachot J. – 165, 169  
 Caiazza N.C. – 72, 157  
 Calvert J.G. – 125, 157  
 Cantwell S.G. – 171  
 Cao H. – 36, 157  
 Caporaso J.G. – 160  
 Carl P. – 170  
 Carls M.G. – 162  
  
 Carmichael C.A. – 161  
 Carmona M. – 36, 157  
 Carp O. – 88, 157  
 Carr M.R. – 42, 170  
 Carrión J.R.P. – 167  
 Caruso C. – 165  
 Casella P. – 165  
 Castro H.E. – 158  
 Cataldo F. – 92, 157  
 Cazau M.C. – 170  
 Cernicharo J. – 167  
 Cerniglia C.E. – 65, 157  
 Chaerun S.K. – 77, 157  
 Chalbi M. – 157  
 Chamkha M. – 157  
 Champagnat A. – 68, 157  
 Chanoux S. – 167  
 Chapin D.H. – 85, 161  
 Chater K.W.A. – 162  
 Chaudhuri R.G. – 170  
 Chebbi A. – 77, 157  
 Chen D.H. – 90, 157  
 Chen G.H. – 93, 174  
 Chen S.H. – 65, 154, 157  
 Chen W. – 165  
 Chen Y. – 175, 176  
 Chernick M. – 156  
 Chi Y. – 162  
 Chiarello M.N. – 158  
 Chlebowski A.C. – 34, 157, 161  
 Choi Y.J. – 81, 158  
 Chojnacki M. – 168  
 Chorus I. – 172  
 Christensen J. – 43, 158  
 Chrysikopoulo C.Y. – 93, 166  
 Chrzanowski Ł. – 163, 169  
 Chrzanowski W. – 164  
 Ciurczak E.W. – 40, 157  
 Clark C.D. – 93, 158  
 Clark D. – 170  
 Clement B. – 174  
 Clerge A. – 34, 158  
 Coates J.D. – 75, 158  
 Cole K.J. – 169  
 Collier T.K. – 162, 163  
 Commendatore M. – 158

- Condon E. – 49, 51, 52  
 Coon M.J. – 73, 158  
 Cooney C.L. – 68, 158  
 Cordeiro D.S. – 125, 158  
 Corio P. – 125, 158  
 Cortes J.E. – 38, 40–42, 158  
 Cousin X. – 165, 169  
 Criado S. – 169  
 Cros C. – 156  
 Cubitto M.A. – 81, 158  
 Cucu-Man S. – 173  
 Cui Q. – 175  
 Cui S. – 176  
 Cunha Tarouco P. – 166  
 Cunha V. – 34, 158, 166  
 Curty L.K. – 164  
 Cvitas T. – 93, 154  
 Czechowski F. – 69, 70, 158  
 Czerniak J. – 26, 34, 44, 52, 129, 158, 160,  
 173  
 Czok M. – 159  
  
 Da Z. – 165  
 Dai J. – 173  
 Damian S. – 65, 174  
 Dandie C.E. – 65, 158  
 Dąbek L. – 92, 159  
 Dąbrowska D. – 33, 36, 68, 82, 84, 164  
 De Boer G.J. – 168  
 De Bruyn W.J. – 93, 158  
 De Domenico M. – 165  
 De Mot R. – 160  
 Del Vecchio R. – 46, 159  
 Delden C. van – 164  
 Delepee R. – 158  
 Delft J.H.M. van – 172  
 Dezotti M. – 159  
 Di Giulio R.T. – 36, 155, 156, 174  
 Díaz E. – 157  
 Díaz S. – 163  
 Diddi S. – 81, 159  
 Dionysiou D.D. – 155, 169  
 Donard O.F.X. – 171  
 Dondero N.C. – 166  
 Dong H. – 175  
 Dong X. – 166  
  
 Dowell M.D. – 159  
 Dreij K. – 158, 163, 166, 175  
 Du Z. – 175  
 Dudziak M. – 176  
 Dugay A. – 92, 159  
 Dunlop P.S.M. – 169  
 Dunmur R. – 55, 56, 60, 61, 159  
 Duran R. – 161  
 Durante-Rodríguez G. – 157  
 Dutta T.K. – 161  
  
 Eastcott L. – 71, 159  
 Egerton T.A. – 89, 163  
 Ehrhardt M. – 125, 159  
 El Azab W.I.M. – 162  
 Ellingsen T.E. – 175  
 Elumalai P. – 69, 78, 159  
 Engelsen S.B. – 158  
 Entezari M.H. – 169  
 Espino M. – 173  
 Esplugas S. – 85, 159  
 Etcheber Ch. – 171  
 Evans W.C. – 76, 159  
 Ewald M. – 171  
  
 Falaras P. – 155, 169  
 Fall R.R. – 72, 159, 171  
 Fan J. – 175  
 Farrell R.L. – 78, 159  
 Fayolle-Guichard F. – 155  
 Fąfara Z. – 24, 159  
 Fedorak P.M. – 70, 159  
 Ferrari G.M. – 46, 159  
 Fingas M. – 39, 41, 43, 174  
 Finlayson-Pitts B.J. Jr – 90, 160  
 Fiorani L. – 160  
 Fischer T. – 170  
 Foght J. – 154  
 Foot C.S. – 156  
 Foster J.W. – 72, 160  
 Franck J. – 49, 51, 52  
 Fredslund L. – 65, 160  
 Fu X.Y. – 169  
 Fuchs G. – 76, 160  
 Fuentes S. – 76, 77, 160  
 Fujishima A. – 90, 160

- Fukasawa H. – 167  
 Furuichi T. – 167
- Gacek A. – 25, 26, 34, 44, 52, 129, 158, 160, 173  
 Gai Z. – 77, 161  
 Gajewski A. – 25, 160  
 Galishev M.A. – 164  
 Galli G.L. – 156  
 Galushko A. – 76, 161  
 Gao F. – 169  
 Garcia G.R. – 157  
 García J.L. – 157  
 García N.A. – 169  
 Gaya U.I. – 85, 161  
 Geier M.C. – 34, 161, 171  
 Genzer M. – 166  
 Germain R.S. – 61, 62, 125, 166  
 Geßner K. – 171  
 Ghiglieri G. – 160  
 Ghosal D. – 36, 161  
 Ghosh S. – 161  
 Gianotti J. – 169  
 Gierak A. – 26, 161  
 Gilbert P.D. – 69, 162  
 Giorgieri S. – 170  
 Glaze W.H. – 85, 161  
 Golob J. – 69, 71, 164  
 Gong Z. – 176  
 González C. – 158  
 Goodale B.C. – 34, 161  
 Gore M.G. – 173  
 Gottschalk R.W.H. – 172  
 Grabas K. – 158  
 Grasset J. – 165  
 Greenberg A. – 156  
 Greer C.W. – 155, 175  
 Gregory C.W. – 65, 174  
 Greppi G.F. – 160  
 Gros J. – 41, 161  
 Grossi S. – 159  
 Gschwend P.M. – 82, 171  
 Gudin C. – 69, 161  
 Guermouche M'rassi A. – 77, 161  
 Guimarães J.R. – 84, 168  
 Gury J. – 161
- Gutiérrez I. – 169  
 Guyon F. – 159  
 Guzik U. – 69, 70, 161
- Haegel F.H. – 172  
 Haener A. – 156  
 Haglund P. – 166  
 Hamacher C. – 103, 161  
 Hamilton J.W.J. – 169  
 Hamme J.D. van – 73, 161  
 Han X. – 162  
 Hanley J. – 168  
 Hansbro P. – 162  
 Hansen L.D. – 172  
 Hara A. – 73, 162  
 Harayama S. – 73, 75, 162  
 Haritash A.K. – 65, 75, 76, 162  
 Harms G. – 75, 162  
 Harri A.M. – 166  
 Hasegawa K. – 173  
 Hassan S.S.M. – 93, 162  
 Hatch R.T. – 68, 162  
 Hautala K. – 46, 162  
 Hayaishi O. – 160  
 He P. – 175  
 He W. – 165  
 Hebels D.G.A.J. – 172  
 Heiss S. – 172  
 Henriksen P. – 46, 163  
 Hentati D. – 157  
 Hernandez D. – 66, 162  
 Herrenknecht C. – 159  
 Herwijnen M.H.M. van – 172  
 Hesse M. – 159  
 Heukelian H. – 166  
 Higgins I.J. – 69, 162, 172  
 Hill T. – 69, 71, 162  
 Himmelberg A.M. – 166  
 Hinton D.E. – 156  
 Hites R.A. – 155  
 Hodson P.V. – 155  
 Hoehener P. – 156  
 Hommel R.K. – 72, 162  
 Hopper D.J. – 69, 162  
 Hosomi M. – 173  
 Hou Z. – 176

- Hounslow A.W. – 98, 162  
 Hsia B.S. – 171  
 Hu X. – 165  
 Huang G.H. – 175  
 Huang Q. – 103, 162  
 Hudson N. – 46, 162  
 Hugh R. – 78  
 Huisman C.L. – 88, 157  
 Huo P. – 165
- Iannetta M. – 160  
 Idowu O. – 34, 162  
 Iess L. – 7, 162  
 Imura Y. – 164  
 Imboden D.M. – 82, 171  
 Incardona J.P. – 34, 36, 156, 162, 163  
 Inverarity R. – 45, 155  
 Iocola I. – 160  
 Ishii K. – 167
- Jaafarzadeh N. – 163  
 Jabłoński A. – 52, 53  
 Jacobsen C.S. – 160  
 Jamroz T. – 92, 163  
 Janda K. – 69, 163  
 Jankowski S. – 171  
 Janssen D.B. – 72, 168  
 Jarvis I.W. – 34, 163  
 Jasra R.V. – 173  
 Jaworska E. – 32, 154  
 Jayasena S. – 65, 163  
 Jeannot R. – 63, 163  
 Jeff M. – 84, 169  
 Jernström B. – 163  
 Jewulski J. – 159  
 Jhala Y.K. – 163  
 Ji H.F. – 94, 171  
 Jiang D. – 176  
 Jin G. – 173  
 Jin Z. – 83, 176  
 Johnson M.J. – 72, 167  
 Jones J.G. – 46, 93, 158, 172  
 Jones T. – 89, 163  
 Jorfi S. – 127, 163  
 Juárez J.F. – 157
- Kaas H. – 46, 163  
 Kaczorek E. – 81, 161, 163, 169, 172  
 Kaczyński Z. – 173  
 Kagaya S. – 173  
 Kakumoto Y. – 167  
 Kallio R.E. – 68, 69, 72, 166  
 Kamens R.M. – 157  
 Kaminaga H. – 164  
 Kang J.W. – 85, 161  
 Kanjo Y. – 85, 165  
 Kaplan Ch. – 67  
 Karapanagioti K.H. – 93, 166  
 Karlberg B. – 167  
 Karthikeyan O.P. – 159  
 Karwowska E. – 71, 165  
 Kashi G. – 79, 145, 163  
 Kaszycki P. – 159  
 Kaushik C.P. – 65, 75, 76, 162  
 Kawano H. – 167  
 Kawashima A. – 90, 164  
 Kazunga C. – 154  
 Keheyang Y. – 92, 157  
 Kęcki Z. – 59, 164  
 Khan I.A. – 79, 164  
 Kiemle D.J. – 171  
 Kim S.J. – 28, 175  
 Kim Y.J. – 158  
 King D.R. – 72, 164  
 Kitts Ch. – 67  
 Klasinc L. – 93, 154  
 Kleespies M. – 172  
 Klofutar B. – 69, 71, 164  
 Kneifel H. – 172  
 Kniemeyer O. – 74, 164  
 Kobayashi T. – 81, 164  
 Koch J. – 160  
 Koelschbach J.S. – 166  
 Kogure K. – 157  
 Köhler T. – 72, 164  
 Kohtani S. – 90, 164  
 Kok M. – 75, 162  
 Kołoczek H. – 159  
 Kołodziej K. – 42, 173  
 Kołwzan B. – 42, 69, 70, 77, 158, 164, 173  
 Kong L. – 176  
 Kontos A.G. – 169

- Korfmacher W.A. – 91, 92, 164  
 Kos L. – 84, 164  
 Kot A. patrz Kot-Wasik A.  
 Kotlar H.K. – 175  
 Kot-Wasik A. – 33, 36, 68, 82, 84, 98, 164  
 Kowal A.L. – 84, 164  
 Krause L.G.T. – 159  
 Krysiak M. – 161  
 Kuang Y. – 34, 164  
 Kudlek E. – 176  
 Kulkarni R.G. – 173  
 Kuntze K. – 168  
 Kursheva A.V. – 60, 164  
 Kwapisz E. – 71, 74, 164  
 Kwiatkowska D. – 69, 165  
  
 La Du J.K. – 157, 161  
 La Nafie N. – 127, 165  
 Labbe D. – 155  
 Lack A. – 160  
 Ladner W.R. – 39, 43, 156  
 Lagenhoff A. – 75, 165  
 LaGoy P.K. – 34, 35, 168  
 Lakowicz J.R. – 52, 165  
 Lambert J.H. – 51  
 Lasocki J. – 71, 165  
 Le Bihanic F. – 34, 158, 165, 169, 175  
 Le Goff J. – 158  
 Le Menach K. – 169  
 Ledakowicz S. – 84, 163, 164  
 Ledauphin J. – 158  
 Lee B.D. – 173  
 Legrini O. – 84, 165  
 Leifson E. – 78  
 Lerda D. – 29, 165  
 Leyval C. – 34, 156  
 Li G. – 175  
 Li J. – 164, 174  
 Li P. – 176  
 Li X. – 176  
 Li Y. – 164, 174  
 Lian H.-Z. – 176  
 Liebman J.F. – 156  
 Lin D. – 34, 165  
 Lin H.K. – 34, 156  
 Lin M. – 76, 165  
  
 Lin M.S. – 164  
 Linbo T.L. – 163  
 Litvinenko I.V. – 164  
 Liu H. – 36, 157  
 Liu J. – 176  
 Liu X. – 88, 165, 175  
 Liu Z. – 34, 85, 165  
 Llewelyn D.A.B. – 68, 157  
 Lo Giudice A. – 78, 165  
 Lochmeyer C. – 160  
 Lopez C. – 158  
 Lovley D.R. – 75, 158  
 Lowry S. – 39, 40, 172  
 Lucas M.S. – 154  
 Lueders T. – 168  
 Lueking D.R. – 76, 166  
 Lugliè A. – 160  
 Lundstedt S. – 66, 166  
 Lv P. – 165  
 Lv X. – 176  
  
 Łudzik M. – 170  
  
**Ma C.** – 165, 176  
 Machado B. – 156  
 Mackay D. – 159  
 Maher W.A. – 45, 166  
 Maitra S. – 81, 159  
 Mamanto G. – 164  
 Manahan S. – 82, 166  
 Manariotis I.D. – 93, 166  
 Mangano S. – 165  
 Manoli E. – 98, 166  
 Manowitz B. – 164  
 Mansour M.S.M. – 63, 93, 154, 162  
 Mao F. – 162  
 Marchal R. – 172  
 Marchão L. – 154  
 Markovetz A.J. – 69, 72, 166  
 Marsan F.A. – 154  
 Martin J.P. – 61, 62, 125, 167  
 Martin T. – 166  
 Martins C.C. – 154  
 Martín-Torres F.J. – 7, 166  
 Martl – 39–41, 47  
 Massad W. – 169

- Massé M. – 168  
 Massey Simonich S.L. – 157, 161  
 Mastalerz P. – 24, 166  
 Matsunaga T. – 167  
 Matthew M. – 38, 47, 166  
 Mattsson Å. – 163  
 McCarrick S. – 34, 166  
 McClure N.C. – 158  
 McClure R.S. – 171  
 McEwen A.S. – 168  
 McKenna E.J. – 68, 72, 166  
 McNally D.L. – 76, 166  
 Meckenstock R.U. – 75, 166  
 Meehan J.J. – 172  
 MeeKyung K. – 32, 166  
 Meier H. – 159  
 Menicucci I. – 160  
 Meritt D.L. – 156  
 Merlin F.X. – 70, 168  
 Meyer J.N. – 155  
 Miano T.M. – 45, 167, 171  
 Michaud L. – 165  
 Mihelcic J.R. – 76, 166  
 Mikulski Z. – 9, 155  
 Mill T.M. – 83, 167  
 Miller J. – 163  
 Miller J.S. – 29, 83, 91, 167  
 Miller T.L. – 72, 167  
 Minati J.L. – 154  
 Minz D. – 161  
 Mittal A. – 77, 167  
 Miyabe H. – 90, 164  
 Miyoshi M. – 68, 167  
 Mizutani S. – 85, 165  
 Moberg L. – 46, 167  
 Mohamed M.E.S. – 160  
 Mohebbali G. – 163  
 Moneti A. – 7, 167  
 Montaña M.P. – 169  
 Montuelle B. – 174  
 Morán A.C. – 158  
 Morawska M. – 98, 164  
 Moreira I. – 161  
 Morel A. – 46, 167  
 Morgan – 73  
 Morin B. – 165  
 Mouazen A.M. – 39, 168  
 Moulijn J. – 174  
 Moursy A.S. – 93, 167  
 Mouttaki H. – 166  
 Mul G. – 174  
 Müller T. – 171  
 Mulligan C.N. – 81, 174  
 Mura S. – 160  
 Murakami M. – 34, 167  
 Murchie S.L. – 168  
 Murray M. – 55, 56, 60, 61, 159  
 Musat F. – 75, 167  
 Nadarajah N. – 63, 167  
 Naffrechoux E. – 83, 167  
 Nagao S. – 46, 167  
 Nagel R.D. – 154  
 Nakai S. – 173  
 Nakamiya K. – 91, 167  
 Nam K. – 158  
 Namieśnik J. – 33, 36, 68, 82, 84, 98, 164  
 Natusch D.F.S. – 164  
 Navarro R.R. – 164  
 Nawrocki J. – 84, 167  
 Neidle E.L. – 75, 162  
 Nelson R.K. – 161  
 Nestler C.C. – 172  
 Netzer F. von – 75, 168  
 Neu T.R. – 72, 168  
 Ngassoum M.B. – 103, 156  
 Ngo H.T. – 163  
 Nisbet I.C.T. – 34, 35, 168  
 Niu J. – 91, 92, 168  
 Nogueira R.F.P. – 84, 168  
 Nolan N.T. – 169  
 Noordman W.H. – 72, 80, 168  
 Norgaard L. – 158  
 Nwinyi O.C. – 36, 168  
 Nyarko E. – 155  
 O'Connor W. – 162  
 O'Keefe P.W. – 32, 166  
 O'Shea K.E. – 155, 169  
 O'Toole G.A. – 157  
 Oberg L. – 166  
 Obstój A. – 92, 175

- Odukkathil G. – 34, 168  
 Ojha L. – 7, 168  
 Okparanma R.N. – 39, 168  
 Oleszczuk P. – 34, 168  
 Oliveros E. – 84, 165  
 Ollis D.F. – 84, 171  
 Oloyede A. – 103, 169  
 Olszanowski A. – 163, 169  
 Onianwa P.C. – 40, 168  
 Oppenländer T. – 85, 89, 168  
 Oswald B. – 160  
 Oudot J. – 70, 168  
 Ozimina E. – 92, 159  
  
**Paasivirta J.** – 94, 172  
 Paganini L. – 7, 168  
 Pages N. – 159  
 Pajares A. – 94, 169  
 Palucci A. – 160  
 Pande P. – 171  
 Pannu J. – 167  
 Panpatte D.G. – 163  
 Papaderos A. – 172  
 Paria S. – 170  
 Parthipan P. – 159  
 Pawlak Z. – 103, 169  
 Péchère J.C. – 164  
 Pehkonen S.O. – 32, 169  
 Pelaez M. – 89, 169  
 Peng R.H. – 65, 169  
 Penning T.M. – 34, 156  
 Perera F. – 63, 169  
 Perera M. – 65, 163  
 Peres J.A. – 154  
 Perkowski J. – 84, 164  
 Perrichon P. – 34, 169  
 Perrine L. de – 165  
 Perrodin Y. – 174  
 Perry J.J. – 69, 72, 164, 169  
 Petrick G. – 125, 159  
 Petrier C. – 167  
 Petrova V.I. – 164  
 Petruzzelli L. – 154  
 Peuravuori J. – 162  
 Phillips E.J.P. – 158  
 Philp P. – 158  
  
 Phipps D. – 170  
 Pichon A. – 165  
 Pierik A.J. – 170  
 Pietraszek E. – 170  
 Pigoń K. – 53, 59, 169  
 Pihlaja K. – 162  
 Pijanowska A. – 108, 163, 169  
 Pillai S.C. – 155, 169  
 Pinvidic P. – 70, 168  
 Piotrowska A. – 87, 129, 174  
 Pirnik M.P. – 69, 72, 169  
 Pitrus K. – 32, 154  
 Pittalis D. – 45, 160  
 Pitts J.N. – 90, 160  
 Planck M. – 54, 58  
 Plant L. – 84, 169  
 Platt J. – 7, 169  
 Plaza C. – 66, 162  
 Polo A. – 66, 162  
 Popek M. – 12  
 Portal J.M. – 34, 156  
 Potrzebowski M. – 171  
 Prajapati S.K. – 34, 169  
 Premuzic E.T. – 164  
 Pritchard P.H. – 172  
 Prokop A. – 68, 170  
 Prousek J. – 84, 170  
 Provenzano M.R. – 171  
  
**Qiao J.-Q.** – 176  
  
**Rabus R.** – 74, 75, 162, 170, 175  
 Racaniello L.K. – 164  
 Radwan K. – 170  
 Rajca A. – 40, 52, 53, 55, 56, 176  
 Rakowska J. – 25, 170  
 Ramadass K. – 162  
 Rao K.J. – 81, 170  
 Rarata G. – 86, 170  
 Ratledge C. – 72, 170  
 Rauckyte T. – 103, 169  
 Reddy C.M. – 161  
 Reller A. – 88, 157  
 Revill A.T. – 42, 170  
 Reynold D. – 162  
 Rezaee A. – 163

- Rezgui F. – 157  
 Rha C. – 158  
 Rhodes P.L. – 159  
 Richnow H.H. – 75, 167, 168  
 Ridgeway H.F. – 76, 170  
 Ringleberg D. – 172  
 Ritter P. – 39–41, 47  
 Roa S. – 158  
 Robertson P.K.J. – 89, 170  
 Robertsson G. – 167  
 Rogoff M.H. – 68, 170  
 Rojo F. – 71, 73, 75, 170  
 Romero M.C. – 78, 170  
 Ron E.Z. – 72, 80, 170, 171  
 Rosenberg E. – 72, 80, 170, 171  
 Roth L. – 168  
 Rowland S.R. – 42, 170  
 Ruziewicz Z. – 53, 59, 169  
 Rychlicki S. – 159  
  
 Saalia F.K. – 155  
 Sadecka J. – 43, 171  
 Safarik J. – 170  
 Saha M. – 167  
 Sakari M. – 42, 171  
 Salam S.B. – 77, 171  
 Salerno-Kochan R. – 160  
 Samara C. – 98, 166  
 Sammarie A.I.A. – 34, 171  
 Sapota A. – 163  
 Sasek V. – 157  
 Saul D. – 154  
 Sayadi S. – 157  
 Schaeffer T.L. – 72, 159, 171  
 Scheper T. – 171  
 Schink B. – 161  
 Schippers C. – 80, 171  
 Schlotzhauer P.F. – 94, 176  
 Scholz N.L. – 156, 162, 163  
 Schooten F.J. van – 172  
 Schraa G. – 75, 165  
 Schramm K.W. – 91, 92, 168  
 Schwarzbauer J. – 74, 175  
 Schwarzenbach R.P. – 82, 171  
 Scott J.P. – 84, 171  
 Scotter C.N.G. – 43, 171  
  
 Seeger M. – 160  
 Seery M.K. – 169  
 Seinfeld J.H. – 157  
 Semple K.T. – 162  
 Sencio B. – 163  
 Senesi N. – 44, 171  
 Sergy G. – 39, 41, 43, 174  
 Settele J. – 163  
 Shankar P. – 34, 171  
 Shanks R.M. – 157  
 Shao Z. – 36, 174  
 Shen L. – 94, 171  
 Shennan L. – 68, 171  
 Shi W. – 165  
 Shiels H.A. – 156  
 Shiu W.Y. – 159  
 Sierra M.M.D. – 59, 171  
 Sikorska E. – 12, 44, 171  
 Silverstein R.M. – 40, 171  
 Silverstone Valentine J. – 156  
 Siñeriz F. – 158  
 Singh A. – 161, 167  
 Singh P. – 77, 167  
 Singh P.K. – 72, 156  
 Singleton D.R. – 66, 171  
 Sinkkonen S. – 94, 172  
 Sivonen K. – 46, 172  
 Sloan C.A. – 162  
 Smolik E. – 35, 172  
 Smułek W. – 81, 172  
 Snidvongs A. – 38, 42, 175  
 Sniegowski K. – 160  
 Sobotka H. – 68, 170  
 Sochacki M. – 171  
 Soeder C.J. – 81, 172  
 Solano-Serena F. – 73, 172  
 Solecki T. – 23, 26, 159, 172  
 Somerville H. – 162  
 Sommard V. – 165  
 Soriano-Sierrad E.J. – 171  
 Souda I. – 167  
 Speight J.G. – 38, 39, 43, 172  
 Sposito G. – 167  
 Springael D. – 160  
 Srogi K. – 26, 172  
 Staal Y.C.M. – 34, 172



- Stankiewicz A. – 174  
 Stenius U. – 163  
 Stepnowski P. – 173  
 Stevenson D.J. – 162  
 Stirling L.A. – 69, 172  
 Stopa J. – 159  
 Straube W.L. – 66, 172  
 Stringfellow W.T. – 154  
 Strother T. – 39, 40, 172  
 Stuart B. – 40, 172  
 Suchorab P. – 170  
 Suegara J. – 90, 173  
 Sullivan C.M. – 161  
 Sun C. – 176  
 Sun H. – 174  
 Sun P. – 91, 92, 168  
 Suptil J. – 167  
 Surmacz P. – 86, 170  
 Surolia P.K. – 173  
 Suryaman D. – 89, 173  
 Surygała J. – 24, 39, 43, 173  
 Suspes A. – 158  
 Suzuki Y. – 167  
 Synak E. – 27, 29, 32, 34, 173  
 Syratt W.J. – 69, 161  
 Syutsubo K. – 73, 162  
 Szabo A.G. – 54, 57, 173  
 Szafranek B. – 173  
 Szopa P. – 12, 26, 34, 44, 52, 129, 158, 160, 173  
 Szpinek P. – 164  
  
 Śliwka E. – 39, 41–43, 173  
 Ślosorz Z. – 170  
  
 Tahir R. – 171  
 Takeda H. – 167  
 Tan Q. – 176  
 Tang D. – 169  
 Tang H. – 161  
 Tang Y. – 111, 165, 173  
 Tang Y.C. – 175  
 Tanguay R.L. – 157, 161, 171  
 Tannenbaum S.R. – 158, 162, 170  
 Tao F. – 161, 176  
 Tarcau D. – 34, 173  
  
 Targa C. – 159  
 Tayade R.J. – 89, 173  
 Tazaki K. – 157  
 Tedesco S.A. – 59, 173  
 Teraoka H. – 162  
 Thavamani P. – 162  
 Thijsse G.J.E. – 68, 72, 174  
 Thoendel M. – 72, 156  
 Thomas S.M. – 91, 158  
 Thominette F. – 125, 173  
 Thompson J. – 156  
 Thorsen W.A. – 65, 174  
 Throne-Holst M. – 175  
 Tian Y.S. – 169  
 Tilton S.C. – 161  
 Timmis K.N. – 175  
 Torkelson B.E. – 42, 175  
 Tothova J. – 43, 171  
 Tripathi B.D. – 34, 169  
 Trudgill P.W. – 69, 174  
 Truong L. – 157, 161, 171  
 Trzesicka-Mlynarz D. – 78, 174  
 Tu Y. – 165  
 Twardowski K. – 159  
  
 Ueno T. – 167  
  
 Valderrama J.A. – 157  
 Valentín-Serrano P. – 166  
 Van der Linden A. – 68, 72, 174  
 Van Eyk J. – 72, 174  
 Van Gerven T. – 89, 174  
 Van H.J. – 167  
 Van Tiem L.A. – 36, 174  
 Vandecasteele J.P. – 172  
 Vasudevan N.L. – 34, 168  
 Verdu J. – 125, 173  
 Verrhiest G.J. – 79, 174  
 Villanueva G.L. – 168  
 Villiger V. – 73  
 Vishnevetsky J. – 169  
 Vogs C. – 158  
 Vogt C. – 75, 167, 168  
 Volat B. – 174  
 Vondracek J. – 166

- Wachter J.H.J. – 168  
 Wagener A. – 161  
 Wallington T.H. – 157  
 Walton B.T. – 32, 174  
 Wang – 34, 39, 43  
 Wang C. – 36, 157, 165, 174  
 Wang D.I.C. – 162, 170  
 Wang F. – 65, 175  
 Wang H. – 165  
 Wang L. – 174, 175  
 Wang L. C. – 36  
 Wang P. – 176  
 Wang S. – 81, 169, 174  
 Wang W. – 36, 174  
 Wang X. – 161  
 Wang X.K. – 93, 174  
 Wang Z. – 41, 174  
 Ward O. – 167  
 Ward O.P. – 78, 161, 174  
 Wassenberg D.M. – 155  
 Waters K.M. – 161, 171  
 Watkinson J.R. – 69, 73, 162, 170, 172,  
 174  
 Watt D.S. – 171  
 Wattayakorn G. – 38, 42, 175  
 Wąsowski J. – 87, 129, 174  
 Webb G. – 66, 155  
 Webb L. – 172  
 Webster F.X. – 171  
 Wehry E.L. – 164  
 Wei D. – 175  
 Weisman W. – 41, 47, 174  
 Wentzel A. – 72, 73, 175  
 Westlake D.W.S. – 70, 159  
 Weyand E.H. – 28, 175  
 Weyrauch P. – 166  
 Whyte L.G. – 76, 175  
 Wichary H. – 69, 165  
 Wick L.Y. – 160  
 Widdel F. – 74, 75, 161, 162, 170, 175  
 Wierzbicka M. – 75, 175  
 Wigger P.E. – 42, 175  
 Wilcke W. – 155  
 Wilhelm M.B. – 168  
 Wilkes H. – 74, 170, 175  
 Wincent E. – 34, 175  
 Witek J. – 81, 175  
 Witze A. – 7, 175  
 Włodarczyk-Makuła M. – 75, 92, 127,  
 175  
 Wojcieszewska D. – 161  
 Wojnarowski P. – 159  
 Wongnapapan P. – 38, 42, 175  
 Woodward J. – 158  
 Woodward J.C. – 158  
 Wray J.J. – 168  
 Wu C. – 175  
 Wu Y. – 28, 165, 175  
 Xia W. – 77, 175  
 Xia X. – 92, 175  
 Xian Q. – 176  
 Xie J. – 91, 176  
 Xiong A.S. – 169  
 Xu P. – 161, 176  
 Xu X. – 83, 176  
 Xue N. – 83, 176  
 Xue Y. – 169  
 Yan J. – 162  
 Yan Y. – 165  
 Yang C. – 176  
 Yang J. – 89, 173, 176  
 Yang X. – 176  
 Yang Y. – 34  
 Yang Z. – 175  
 Yao G. – 165  
 Yao Q.H. – 169  
 Yao Z.Y. – 93, 174  
 Yarwood G. – 157  
 Yergeau E. – 155  
 Yin H. – 34, 176  
 Yoshimura T. – 173  
 Zaghden H. – 157  
 Zagrajczuk D. – 159  
 Zamarro M.T. – 157  
 Zapletal O. – 166  
 Zawadzki P. – 105, 176  
 Zeeh B. – 159  
 Zehnder A. – 75, 165  
 Zepp R.G. – 85, 93, 94, 156, 176

Zeyer J. – 156  
Zhan M. – 94, 176  
Zhang B. – 169  
Zhang L. – 93, 176  
Zhang Q. – 32, 169, 174  
Zhang X. – 90, 160  
Zhang Z. – 77, 161, 176  
Zhao W. – 169  
Zhou W. – 81, 176

Zhu J. – 173  
Zhu L. – 81, 165, 176  
Zieliński J. – 92, 156  
Zieliński W. – 40, 52, 53, 55, 56, 176  
ZoBell C.E. – 72, 176  
Zorzano M.P. – 166  
Zotchev S.B. – 175  
Zou J. – 173

