

**INSTYTUT INŻYNIERII OCHRONY ŚRODOWISKA
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA**

Raport serii PRE 19 / 99

**Wpływ mikrobiologicznej modyfikacji
osadu czynnego na proces biodegradacji
oleju napędowego w ściekach**

KATARZYNA PIEKARSKA

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Maria Pawlaczyk-Szpilowa

słowa kluczowe :

osad czynny

aktywne szczepy bakterii

szczepionka mikrobiologiczna

olej napędowy

biodegradacja

biosorpcja

bioindykacja

WROCŁAW 1999

Promotorowi

Pani Profesor Marii Pawlaczyk-Szpilowej składam serdeczne podziękowania za życzliwość w kierowaniu moją pracą, cenne rady i stałą opiekę podczas jej realizacji i redakcji.

SPIS TREŚCI

Strona

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.0. Wprowadzenie	7
1.1. Występowanie zanieczyszczeń ropopochodnych w środowisku naturalnym	7
1.2. Działanie zanieczyszczeń ropopochodnych na organizmy żywe	9
1.3. Metody usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych ze środowiska naturalnego	12
1.4. Podatność zanieczyszczeń ropopochodnych na mikrobiologiczny rozkład	15
1.5. Zasady konstruowania i możliwość stosowania szczepionek mikrobiologicznych do oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego	23
1.6. Możliwość mikrobiologicznej modyfikacji osadu czynnego	27
2.0. Cel pracy	27

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.0. Materiały i metody	28
3.1. Pochodzenie i charakterystyka substancji ropopochodnych	28
3.2. Ścieki naturalne stosowane w hodowli osadu czynnego	28
3.3. Ścieki syntetyczne stosowane w badaniach nad biodegradacją oleju napędowego przez osad czynny	28
3.4. Podłoża hodowlane stosowane w badaniach mikrobiologicznych	28
3.5. Izolacja i identyfikacja mikroorganizmów zdolnych do rozkładu oleju napędowego	29
3.6. Ocena intensywności wzrostu i zdolności rozkładu oleju napędowego przez szczepy drobnoustrojów wyizolowanych ze środowiska naturalnego	30
3.7. Określanie wzajemnego antagonistycznego oddziaływania pomiędzy mikroflorą osadu czynnego a wyizolowanymi drobnoustrojami	30
3.8. Przygotowanie szczepionki złożonej z wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów	30
3.9. Hodowla osadów czynnych oczyszczających ścieki z zawartością oleju napędowego	31
3.10. Badanie aktywności dysymilacyjnej mikroflory osadu czynnego i osadu czynnego doszczepionego, w obecności różnych stężeń oleju napędowego, metodą manometryczną Warburga	32
3.11. Badanie biosorpcji oleju napędowego przez osad czynny	32
3.12. Badania makro- i mikroskopowe osadu czynnego hodowanego na ściekach z zawartością oleju napędowego	33
3.13. Badania bakteriologiczne prowadzone w trakcie procesu biodegradacji oleju napędowego	33
3.14. Badania biotoksykologiczne oleju napędowego, ścieków syntetycznych i ścieków oczyszczonych	33

3.14.1 Ocena toksycznego działania oleju napędowego, ścieków syntetycznych i ścieków oczyszczonych na organizm testowy <i>Lemna minor</i> (rzęsa drobna)	33
3.14.2. Ocena toksycznego działania oleju napędowego, ścieków syntetycznych i ścieków oczyszczonych na organizm testowy <i>Chlorella sp.</i>	34
3.14.3. Ocena toksycznego działania oleju napędowego, ścieków syntetycznych i ścieków oczyszczonych na organizmy testowe <i>Daphnia sp.</i> (rozwiłtka) i <i>Lebistes reticulatus</i> (gupik)	35
3.14.4. Ocena toksycznego działania oleju napędowego, ścieków syntetycznych i ścieków oczyszczonych na bakterie	35
3.14.5. Ocena genotoksycznego działania składników oleju napędowego i ścieków oczyszczonych metodą testu Amesa	35
3.15. Badania biotechnologiczne	37
3.15.1. Oznaczanie suchej masy osadu czynnego	37
3.15.2. Oznaczanie objętości osadu	37
3.15.3. Oznaczanie indeksu objętościowego	38
3.15.4. Określanie biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT ₅)	38
3.15.5. Określanie obciążenia osadu czynnego	38
3.15.6. Określanie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT)	38
3.15.7. Oznaczanie ogólnego węgla organicznego (OWO)	39
3.16. Badania biochemiczne	39
3.16.1. Określanie aktywności esterazowej	39
3.16.2. Określanie aktywności dehydrogenazowej	39
3.16.3. Oznaczanie ilości białka w biomasie osadu czynnego	40
3.17. Badania chemiczno-analityczne	40
3.17.1. Oznaczenie ubytku składników oleju napędowego metodą ekstraktu eterowego	40
3.17.2. Analiza zawartości składników oleju napędowego przy pomocy chromatografii gazowej i cieczowej	41
3.18. Analiza statystyczna wyników	42

CZĘŚĆ WYNIKOWA

4.0. Wyniki badań	42
-------------------	----

I. Badania mikrobiologiczne

4.1. Izolacja i określenie przynależności taksonomicznej aktywnych szczepów mikroorganizmów	43
4.2. Określenie możliwości wzrostu i zdolności rozkładu oleju napędowego przez wyizolowane szczepy mikroorganizmów	45
4.3. Dobór szczepów i przygotowanie szczepionki mikrobiologicznej zasilającej osad czynny	52
4.4. Hodowla osadów czynnych oczyszczających ścieki z zawartością oleju napędowego	53
4.5. Badanie aktywności dysymilacyjnej mikroflory osadu czynnego i osadu czynnego doszczepionego, w obecności różnych stężeń oleju napędowego, metodą manometryczną Warburga	54

II. Ocena postępu biodegradacji oleju napędowego metodą osadu czynnego

4.6. Mikroskopowa charakterystyka osadów czynnych podczas procesu biodegradacji.....	58
4.7. Osad czynny niskoobciążony-wyniki pierwszej serii badań.....	59
4.7.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych.....	59
4.7.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego.....	59
4.7.3. Wyniki badań enzymatycznych	69
4.7.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych.....	72
4.8. Osad czynny średnioobciążony-wyniki drugiej serii badań.....	73
4.8.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych.....	73
4.8.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego.....	73
4.8.3. Wyniki badań enzymatycznych	75
4.8.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych.....	79
4.9. Osad czynny wysokoobciążony -wyniki trzeciej serii badań.....	86
4.9.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych.....	86
4.9.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego.....	86
4.9.3. Wyniki badań enzymatycznych	88
4.9.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych.....	98
4.10. Osad czynny pracujący w warunkach zmiennego obciążenia -wyniki czwartej serii badań	99
4.10.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych.....	99
4.10.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego.....	100
4.10.3. Wyniki badań enzymatycznych	101
4.10.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych.....	106
4.11. Wyniki badań statystycznych.....	113

III. Biosorpcja oleju napędowego przez osad czynny

4.12. Wyniki badań nad biosorpcją oleju napędowego przez osad czynny konwencjonalny i doszczepiony	118
--	-----

IV. Ocena biotoksykologiczna oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych

4.13. Wyniki testów biotoksykologicznych	128
4.13.1. Ocena toksycznego działania oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na organizm testowy <i>Lemna minor</i> (rzęsa drobna)	128
4.13.2. Ocena toksycznego działania oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na glony <i>Chlorella sp.</i>	134
4.13.3. Ocena toksycznego działania oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na organizmy testowe <i>Daphnia sp.</i> (rozwiłitka) i <i>Lebistes reticulatus</i> (gupik).....	139
4.13.4. Ocena toksycznego działania oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na bakterie	140

4.13.5. Ocena działania genotoksycznego oleju napędowego i ścieków oczyszczonych metodą testu Amesa	146
5.0. Dyskusja i podsumowanie.....	151
6.0. Wnioski.....	154
7.0. Literatura	155
8.0. Spis schematów, rysunków i tabel	161
9.0. Lista odbiorców	167

Część teoretyczna

1.0. Wprowadzenie

W ciągu ostatnich lat obserwowane jest zwiększające się zainteresowanie problemami antropopresji i ochrony środowiska. W świadomości opinii publicznej wzrasta znaczenie zagadnień ekologicznych a co za tym idzie, kształtowanie właściwej oceny szkodliwego wpływu gospodarczej działalności człowieka na jego przyrodnicze otoczenie [1]. Jednym z najbardziej zagrożonych elementów środowiska jest woda, zarówno powierzchniowa jak i gruntowa. Woda jest absolutnie nieodzowna dla życia roślin, zwierząt i ludzi. Stoi na pierwszym miejscu w hierarchii wszystkich potrzeb życiowych. Jest podstawowym surowcem w życiu codziennym, a w przemyśle jest podstawą wielu procesów produkcyjnych. Również rolnicza działalność człowieka związana jest z obecnością wody. Jednakże człowiek systematycznie zanieczyszcza wodę zarówno podczas jej wykorzystywania jak i wprowadzania do środowiska naturalnego coraz to większej ilości ksenobiotyków. Coraz częściej zanieczyszczenia te dominują i zakłócają naturalne procesy rozkładu, polegające na mikrobiologicznym usuwaniu z wody zanieczyszczeń organicznych i przekształcaniu ich w proste związki mineralne. Mimo tego, iż człowiek buduje dziś coraz to droższe i bardziej skomplikowane urządzenia do uzdatniania wody, pewnych zanieczyszczeń nie można z niej całkowicie usunąć. Niezmiernie ważnym problemem cywilizacyjnym jest więc ochrona wody przed zanieczyszczeniami. Z jednej strony trzeba więc ograniczyć przedostawanie się zanieczyszczeń do środowisk wodnych z drugiej zaś strony poszukiwać nowych, prostych i tanich rozwiązań oczyszczania wód i ścieków mających na celu odwrócenie drastycznych i długotrwałych zmian w ekosystemach [2,3].

1.1. Występowanie zanieczyszczeń ropopochodnych w środowisku naturalnym

Zanieczyszczenie substancjami ropopochodnymi środowiska naturalnego jest powodem degradacji ekosystemów wodno-łądowych. Rosnące zapotrzebowanie na produkty przemysłu naftowego i wynikająca stąd konieczność ich magazynowania i dystrybucji, stwarza stałe zagrożenie środowisk wodnych ciągłym dopływem węglowodorów pochodzących z substancji ropopochodnych [4]. Według R.B. Caim'a [5], na świecie, co roku wydobywa się około $5-10 \times 10^6$ ton ropy naftowej, z czego aż 40% trafia do ekosystemów, jako zanieczyszczenie. Szczególnie groźne i alarmujące wydarzenia to katastrofy wielkich tankowców czy cystern. Równie niebezpieczne są także skażenia substancjami naftowymi pochodzącymi z zakładów rafineryjnych i petrochemicznych, terminalów paliw płynnych, awarii środków transportu, urządzeń i instalacji technologicznych, nieszczelności rurociągów i zbiorników podziemnych i z innych przyczyn wiążących się z niewłaściwym gospodarowaniem przez człowieka tymi produktami. Bardzo często efekty nieszczęśliwych wypadków, ludzkich błędów i nie przemyślanych działań prowadzą do zniszczenia środowiska naturalnego na wiele lat. Zagrożenia związane z rozlewami ropy naftowej i jej pochodnych pojawiają się co jakiś czas na pierwszych stronach gazet w związku z katastrofami ekologicznymi spowodowanymi przez awarie tankowców, morskich platform wydobywczych czy działania wojenne [6]. Tak było w przypadku katastrofy kuwejckiego tankowca „Torrey Canyon” koło Półwyspu Kornwalijskiego w 1967 roku, kiedy 30 tysięcy ton ropy zanieczyściło ponad 650 km² morza. W 1978 roku wypadek

tankowca „Amoco Cadiz” w kanale La Manche spowodował wyciek 230 tysięcy ton ropy zanieczyszczając 160 kilometrów francuskiego wybrzeża, zagrażając także Wyspom Normandzkim. Wypadek spowodował śmierć kilkudziesięciu tysięcy ptaków i milionów ryb oraz innych organizmów morskich. Natomiast na skutek katastrofy tankowca „Exxon Valdez” na Alasce w 1989 roku dużemu zniszczeniu uległy obszary parku narodowego Katmani oraz obszary chronionej dzikiej przyrody dalekiej północy. Wypadek ten zagroził terenom lęgowym i spowodował według M. Holloway’a [7] śmierć 3 milionów ptaków, tysiąca ssaków morskich i zwierząt lądowych takich jak lisów, niedźwiedzi i drobnych ssaków. Świadome i celowe użycie przez Irak ropy naftowej jako broni ekologicznej roku spowodowało skażenie nią wody i gleby na niespotykaną dotąd skalę. W 1991 roku w celu utrudnienia ataku desantu morskiego i działania wojsk lotniczych wylano ropę do wód zatoki Perskiej i podpalono wieże wydobywcze. Na skutek tych poczynań katastrofa ekologiczna objęła wszystkie komponenty środowiska przyrodniczego [8,9].

W Polsce, w ostatnich latach, również mamy do czynienia ze stanem klęski ekologicznej związanej z rozlewami substancji ropopochodnych. Na terenach, które były w posiadaniu wojsk byłej Armii Radzieckiej skażenia tymi substancjami znacznie przekraczają normy. Wojskowa Akademia Techniczna na zlecenie Państwowej Inspekcji Ochrony Środowiska, w latach 1992-1993, prowadziła badania dotyczące identyfikacji i wyceny szkód ekologicznych spowodowanych przez te wojska. Były one rozlokowane głównie w zachodniej i północno-zachodniej części naszego kraju. Według A. Spychały [10] zanieczyszczeniu substancjami ropopochodnymi uległo środowisko wodno-gruntowe; na terenie lotnisk, baz paliw, składów amunicji i portów wojennych, o powierzchni około 406 ha. W wielu rejonach stwierdzono występowanie warstwy pływającego paliwa na powierzchni wód podziemnych o grubości od „filmu” do 5 m. Największe rejony zanieczyszczeń występowały w miejscowościach Krzywa (39,1 ha), Borne Sulinowo (32,7 ha), Kluczewo (37,9 ha), Karczmarska (84,1 ha), Stara Kopernia (41,0 ha) i Raszków (9,9 ha). Nie należy jednak lekceważyć małych i powszechnie występujących źródeł emisji substancji ropopochodnych do środowiska, bowiem to właśnie one mają największy udział w degradacji ekosystemów. J. Siuta [11] twierdzi, że wszędzie tam, gdzie stosuje się produkty naftowe mogą powstać zanieczyszczone nimi ścieki. Na przykład badania prowadzone w USA wykazały, że aż 33% ropy trafiającej do mórz każdego roku pochodzi z rutynowych operacji na tankowcach, takich jak opróżnianie zbiorników z balastu, natomiast 36% to odpady przemysłowe i komunalne. Obciążenie węglowodorami wód powierzchniowych silnie zanieczyszczonych ropą i jej pochodnymi sięga kilkunastu mg/dm^3 , przy poziomie 0,01-1 mg/dm^3 w wodach nieznacznie zanieczyszczonych. Natomiast progowe stężenie produktów ropopochodnych wykrywalnych w wodzie zmysłem smaku wynosi już 0,1 mg/dm^3 a zmysłem zapachu, w zależności od rodzaju produktu, od 0,00005 mg/dm^3 do 2 mg/dm^3 . NDS dla substancji ropopochodnych w polskim ustawodawstwie wynosi 15 mg/dm^3 [12,13].

Źródła emitujące do środowiska przyrodniczego substancje ropopochodne i tym samym powodujące powstawanie zaolejonych ścieków J. Hupka [14] podzielił na trzy grupy:

1. Do pierwszej grupy należą wielkie zakłady przemysłowe, zakłady rafineryjne i petrochemiczne, zakłady przemysłu metalowego, maszynowego i energetycznego. Ścieki powstające w tych zakładach obok substancji ropopochodnych zawierają także szereg innych związków (np. chlorki, siarczyny, siarczki, amoniak, cyjanki, fenole, merkaptany, sulfoniany, kwasy organiczne, aldehydy i alkohole). Zakłady te w przeważającej części posiadają własne oczyszczalnie ścieków.
2. Do drugiej grupy należą zakłady gospodarki produktami naftowymi oraz magazyny dystrybucyjne i stacje benzynowe, przedsiębiorstwa eksploatacji rurociągów naftowych, zakłady regeneracji paliw płynnych, stacje i magazyny technicznej obsługi rolnictwa, bazy transportowe, zakłady naprawcze taboru kolejowego, lokomotywnie, stacje paliw

PKP, stacje obsługi samochodów itp. Zakłady i obiekty wyżej wymienione nie posiadają w przeważającej części oczyszczalni ścieków natomiast ścieki tam powstające zawierają głównie substancje ropopochodne. Oczyszczanie ścieków tam powstających ogranicza się głównie do zastosowania prostych separatorów grawitacyjnych.

3. Do trzeciej grupy należą obiekty pływające, statki oceaniczne i śródlądowe, platformy wiertnicze, pływające magazyny i zbiorniki produktów naftowych. Obiekty te ze względu na ograniczoną ilość miejsca mają małe możliwości w gromadzeniu odpadów naftowych i ograniczoną możliwość wyboru metod odolejania.

Ropa naftowa i jej produkty po dostaniu się do wody rozprzyskają się po jej powierzchni tworząc zanieczyszczenia powierzchniowe. Dzieje się tak na skutek tego iż większość węglowodorów ma gęstość mniejszą od wody. Już litr oleju tworzy na wodzie plamę o powierzchni około 4000 m². Błony powierzchniowe na skutek ruchu laminarnego, burzliwego, falowania i opadów atmosferycznych zamieniają się w emulsję, czyli zanieczyszczenia objętościowe. Substancje ropopochodne mogą się także dostać do wód podziemnych skażając użytkowe poziomy wodonośne, zasadnicze źródła wód pitnych. Dzieje się tak na skutek przedostania się substancji olejowych do gruntu [15]. Początkowo skażeniu ulega wierzchnia warstwa gleby. Następnie węglowodory przemieszczają się pionowo pod wpływem sił grawitacji i sił kapilarnych w strefie aeracji gleby, potem po osiągnięciu strefy wzniosu kapilarnego zaczynają się rozprzyszczać w kierunku poziomym. Dalej migracja pozioma odbywa się w kierunku zgodnym ze spływem wód podziemnych do miejsc nieraz bardzo odległych od miejsca zanieczyszczenia.. Najczęściej mówi się o zanieczyszczeniu poziomu wodonośnego, gdy nad zwierciadłem wody występuje warstwa węglowodorów nierozpuszczalna w wodzie [16].

Produkty olejowe, stanowiące zanieczyszczenia wód, mogą występować w postaci rozpuszczonej, zemulgowanej lub niezemulgowanej. Ponieważ rozpuszczalność tych substancji w wodzie jest niewielka, rzędu 40-80 mg/dm³ i maleje wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w cząsteczce, większe ilości olejów mogą się znajdować w wodach i ściekach tylko w postaci nierozpuszczonej. Oleje niezemulgowane mogą się unosić swobodnie na powierzchni wody w postaci warstwy olejowej lub swobodnie pływających skupisk kropli albo mogą tworzyć zlepy olejowe z zawiesinami o różnych rozmiarach aglomeratów. Oleje zemulgowane mogą tworzyć dwa typy emulsji olejowych: olej w wodzie (emulsja hydrofilowa) i woda w oleju (emulsja hydrofobowa). Emulsje takie mogą być stabilizowane emulgatorami występującymi przypadkowo w ściekach lub dodanymi tam celowo []. Z warstwy oleju znajdującego się na powierzchni wody lżejsze frakcje szybko odparowują do atmosfery, pozostają zaś związki o większej liczbie atomów węgla w cząsteczce, ale też mniejszej rozpuszczalności w wodzie. Podstawowymi właściwościami fizycznymi decydującymi o migracji substancji ropopochodnych w wodzie jest ich gęstość i lepkość. Im większa ich wartość tym bardziej zmniejsza się zdolność węglowodorów do migracji w środowisku wodnym [17,18].

1.2. Działanie zanieczyszczeń ropopochodnych na organizmy żywe

Ropa naftowa i jej pochodne oddziałują toksycznie na organizmy żywe hamując tym samym naturalne procesy rozkładu zachodzące w wodach powierzchniowych i gruntowych, przez co zmniejsza się ich przydatność do celów pitnych, gospodarczych i rekreacyjnych [6]. Niektóre ze składników substancji ropopochodnych, zwłaszcza wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, wykazują nie tylko działanie toksyczne na organizmy żywe, ale mogą być odpowiedzialne za występowanie wielu groźnych mutacji oraz chorób nowotworowych [19].

Złoża ropy naftowej powstały w odległych epokach geologicznych w wyniku beztlenowego rozkładu substancji organicznej pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Prawdopodobnie znaczny udział w tym procesie odegrały bakterie beztlenowe, czerpiące energię potrzebną do życia z redukcji związków organicznych i wydzielające metan jako produkt przemiany materii. Ropa naftowa jest mieszaniną węglowodorów ciekłych, stałych i gazowych. Głównymi jej składnikami są węglowodory parafinowe (alkany – łańcuchowe i rozgałęzione, 27-72%), naftenowe (cykloalkany, 22-67%), aromatyczne (6-14%) i związki heterocykliczne. Udział poszczególnych grup węglowodorów zależy od pochodzenia ropy naftowej. Wieloletnie badania nad ropą naftową pozwoliły na wydzielenie z niej około 300 różnych związków chemicznych. Podstawową metodą przeróbki ropy naftowej jest destylacja, proces polegający na rozdzieleniu ropy na frakcje węglowodorów, według ich temperatury wrzenia, zależnej od wielkości cząsteczek. Pod wpływem ogrzania do temperatury 350-400 °C odparowują z ropy węglowodory, z których składają się tzw. produkty białe: benzyna, nafta i olej napędowy. Natomiast mazut, złożony z węglowodorów o wyższej temperaturze wrzenia, pozostaje w stanie ciekłym. W wyniku destylacji mazutu otrzymuje się destylaty olejowe, które są surowcami do wyrobu olejów smarowych i ciężką pozostałość asfalt i gudron (schemat 1) [20,21].

Olej napędowy jest frakcją ropy naftowej uzyskiwaną podczas jej destylacji i wrzącą w temperaturze 180-350 °C. Pod względem chemicznym stanowi złożoną, wieloskładnikową mieszaninę związków organicznych, głównie węglowodorów zawierających w cząsteczce od 10 do 24 atomów węgla. Głównymi jego składnikami są węglowodory parafinowe (prostolańcuchowe i rozgałęzione), jedno-, dwu- i trójpierścieniowe węglowodory cykloparafinowe, niewielkie ilości węglowodorów aromatycznych głównie naftalenu, antracenu i fenantrenu oraz ślady cięższych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [22]. Stosowany jest głównie do napędzania wysokoprężnych silników Diesla i oprócz bazy olejowej stanowiącej ok. 80%-85% zawiera także pakiet dodatków poprawiających właściwości eksploatacyjne (ok. 10%) oraz wiskozatory (ok. 5%) []. Jest on częstą przyczyną zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Toksyczność olejów silnikowych świeżych jest mniejsza od olejów używanych (przepracowanych), ponieważ podczas pracy silnika dochodzi do procesów utleniania i degradacji związków wchodzących w skład bazy i dodatków. Ostatnio wprowadza się na rynek paliwa reformulowane to jest takie, które charakteryzują się obniżoną zawartością węglowodorów aromatycznych oraz związków siarki i azotu, ponadto zawierają dodatki ekologiczne w postaci alkoholi, estrów metylowych i kwasów tłuszczowych olejów roślinnych. Zabiegi te obniżają emisję związków toksycznych w spalinach przyczyniając się również do obniżenia zawartości najbardziej szkodliwych i opornych na biodegradację węglowodorów aromatycznych co na pewno powinno wpłynąć na zmniejszenie zagrożenia dla środowiska w momencie niekontrolowanego wycieku olejów napędowych [23].

W zależności od względnej zawartości poszczególnych grup węglowodorów w produktach ropopochodnych ich wpływ na organizmy żywe jest różny. Niektóre frakcje węglowodorów otrzymywanych z ropy naftowej są od dziesiątków lat w powszechnym użyciu i nie stwierdzono ich toksycznego i kancerogennego działania. Tymi produktami są np. benzyny ekstrakcyjne, nafty kosmetyczne i apteczne stosowane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Frakcje te zawierają w swoim składzie głównie węglowodory parafinowe [24].

Szkodliwymi i nieobojętnymi dla środowiska i zdrowia są węglowodory aromatyczne mono- i wielopierścieniowe oraz ich alkilowe pochodne. Oleje silnikowe zawierają do 30 µg/dm³ benzo(a)pirenu, niebezpiecznego związku, który uznawany jest za potencjalnie rakotwórczy. Wprowadzenie do wód ścieków nie oczyszczonych, głównie z przemysłu petrochemicznego, powoduje bezpośrednie skażenie środowiska wodnego przez WWA.

Potwierdzają to wysokie stężenia benzo(a)pirenu stwierdzone przez Samoilovicha [25]. W wodach w odległości 3-4 km w dół rzeki od miejsca wprowadzenia zaolejonych ścieków stwierdzono stężenia benzo(a)pirenu rzędu $0,05-3,5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, a w odległości 21 km od tego punktu $0,01-0,6 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Obecność w wodach wykorzystywanych jako źródła wód pitnych nawet śladowych ilości węglowodorów aromatycznych prowadzi do powstawania w procesie uzdatniania (chlorowanie) bardziej toksycznych, mutagennych i rakotwórczych oraz uciążliwych do usunięcia chloroaromatów [26].

Schemat 1. Destylacyjna przeróbka ropy naftowej



W środowisku wodnym zanieczyszczenie substancjami ropopochodnymi jest w pierwszym rzędzie niebezpieczne ze względu na tworzenie się powierzchniowych i objętościowych warstw odcinających dopływ tlenu atmosferycznego i zlepiających organizmy żywe, a tym samym powodujących upośledzenie wielu ich funkcji życiowych, co prowadzi do ich śmierci. Po usunięciu oleju zgromadzonego na powierzchni wody metodami mechanicznymi w środowisku pozostają jeszcze zsedymetowane cięższe frakcje i frakcje rozpuszczalne w wodzie, które mogą oddziaływać toksycznie na florę i faunę przez wiele lat od momentu skażenia [27,28]. J.H. Vandermeulen [29,30] podaje, że substancje ropopochodne uszkadzają błony komórkowe organizmów planktonowych, zmieniając ich przepuszczalność, działają hamująco na system transportu elektronów w oddychaniu komórkowym, a tym samym wpływają na stężenie ATP. Ponadto, upośledzają procesy fotosyntezy i procesy rozmnażania. Toksyczne działanie produktów ropopochodnych w stosunku do organizmów wodnych obserwowano według D.W. Donnell'a [31] przy stężeniach frakcji rozpuszczalnych wynoszących: $0,1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ dla zooplanktonu, $1,4 \text{ mg}/\text{dm}^3$ dla organizmów bentonicznych, $1,2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ dla embrionów ryb, $0,3 - 16,1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ dla dużych ryb.

Natomiast obecność ropy naftowej w glebie prowadzi do licznych zmian w morfologii i budowie anatomicznej roślin – chlorozy organów nadziemnych, odwodnienia i uszkodzenia komórek miększu oraz tkanki okrywającej, porażenia systemu korzeniowego, blokady naczyń przewodzących przez substancje ropopochodne. W konsekwencji dochodzi do deficytu wody w roślinie i jej zamierania [32].

U ssaków na działanie oleju napędowego narażony jest głównie układ oddechowy i skóra. Oleje mogą się wchłaniać do organizmu człowieka z dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i przez nieuszkodzoną skórę. Krople olejowe o średnicy poniżej $6 \mu\text{m}$ mogą przenikać do pęcherzyków płucnych, gdzie są fagocytowane przez białe krwinki, a następnie transportowane do węzłów chłonnych i tkanki tłuszczowej (ze względu na swój lipofilny

charakter), skąd mogą być transportowane do innych narządów organizmu. Większe cząstki olejowe są zwykle przechwytywane przez błonę śluzową w oskrzelach i w większości przedostają się do noso-gardzieli, skąd są połykane i przenoszone do żołądka [33].

Oleje są odporne na rozkład enzymatyczny i dlatego są wolno wydalone z organizmu. W organizmie zachodzi bardzo niewielka przemiana węglowodorów alifatycznych prostych i rozgałęzionych. Jedynie węglowodory aromatyczne ulegają procesom biotransformacji podczas której następuje utlenianie węglowodorów aromatycznych poprzez związki epoksydowe do trans-dwuhydrodioli, które są następnie utleniane do katecholi, co pozwala na enzymatyczne rozszczepienie pierścieni aromatycznych. U zwierząt doświadczalnych pozostaje aż 88-99 % oleju nierozłożonego. Duża ilość wchłoniętych par olejowych wydalaną jest z płuc na zewnątrz, a niewielkie ilości, głównie metabolity powstałe z przemiany węglowodorów aromatycznych, są wydalone z moczem i kałem [34,35].

U ludzi narażonych na mgłę olejową obserwuje się przewlekłe nieżyty górnych dróg oddechowych, zanikowe zmiany w błonie śluzowej nosa i gardła oraz podrażnienia oczu, zaburzenia czynności płuc, zmiany we krwi obwodowej, w immunologicznej reaktywności oraz zmiany na skórze o charakterze podrażnieniowym i alergicznym. W ostrych zatruciach inhalacyjnych obserwowano nudności, wymioty, kaszel, obrzęk płuc, krwioplucie i w następstwie tego zapalenie płuc. Doustne zatrucie, które występuje w przypadku spożycia ponad 1 mg substancji olejowych na kilogram masy ciała (dawka śmiertelna przy doustnym spożyciu substancji olejowych została określona na ok. 10 cm^3) powoduje osłabienie, zawroty głowy, zwolniony i płytki oddech, utratę przytomności, drgawki i zgon [36,37].

W warunkach ekspozycji podostrej i przewlekłej na olej napędowy ujawnia się jego szkodliwe działanie na organizm zwierząt w obrębie układu oddechowego i skóry []. Oleje posiadają właściwości kumulacji, której siła działania jest zróżnicowana w zależności od składu oleju. Po przeniknięciu do płuc oleje działają drażniaco na miąższ płucny i wywołują pojawienie się licznych makrofagów wokół cząstek oleju, powodując wzrost tkanki ziarninowej, a następnie jej zwłóknienie prowadzące do olejowego, przewlekłego zapalenia płuc. Substancje te powodują także rozpuszczanie lipidów ustrojowych, a więc neuronów i błon komórkowych, co prowadzi do uszkodzeń w obrębie układu nerwowego oraz innych układów i narządów takich jak: wątroba, nerki, szpik kostny, układ krążenia czy zaburzenia mechanizmów odpornościowych [38]. Oleje mogą także oddziaływać niekorzystnie na materiał genetyczny wywołując wiele niekorzystnych mutacji prowadzących do powstawania nowotworów. Aktywność rakotwórcza olejów zależy od typu surowego oleju wyjściowego, sposobu i stopnia rafinacji, od rodzaju stosowanych dodatków uszlachetniających, od czasu użytkowania i sposobu podania. Jedynie cięższe frakcje olejowe o temperaturze wrzenia $300-360^\circ\text{C}$ i $385-420^\circ\text{C}$ powodowały u zwierząt doświadczalnych nowotwory złośliwe skóry, białaczkę czy efekty teratogenne. Olej silnikowy świeży na ogół nie wywołuje efektów mutagennych u zwierząt doświadczalnych. Natomiast olej zawierający dodatki (np. naftenian ołowiu) jest przyczyną zmian rakotwórczych skóry u około 50% badanych zwierząt. Olej silnikowy przepracowany wywołuje powstawanie raka skóry, ponieważ podczas używania zwiększa się w nim zawartość węglowodorów aromatycznych [39].

1.3. Metody usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych ze środowiska naturalnego

Zagadnienie oczyszczania środowiska wodno-gruntowego z substancji ropopochodnych jest wciąż nie rozwiązane w sposób zadowalający. Usunięcie tych substancji ze środowiska jest zwykle przedsięwzięciem trudnym i kosztownym, ponieważ wymaga często zastosowania nie jednej lecz wielu metod, po sobie następujących.

Natomiast, w przypadku oczyszczania ścieków stosuje się następujące metody: mechaniczne, flotacyjne, chemiczne, fizykochemiczne, termiczne, elektryczne, magnetyczne i biologiczne [14]. Wybór metody oczyszczania zależy od wielu czynników, takich jak np.: pochodzenie, skład i stężenie węglowodorów w zaolejonych wodach i ściekach, stopień rozdrobnienia fazy olejowej, charakter emulsji olejowej czy też temperatury i odczynu. Często stosuje się kilka metod na raz wykorzystując do tego celu jedno lub kilka urządzeń. Najważniejszymi problemami w usuwaniu zanieczyszczeń olejowych ze środowiska są: jak najszybsze usunięcie warstwy substancji ropopochodnych z powierzchni wody bezpośrednio po awarii oraz usunięcie z wody zarówno fazy węglowodorów nierozpuszczalnych jak i rozpuszczalnych w wodzie, pozostałych tam po szybkim mechanicznym usunięciu tych substancji [40, 41].

Metody mechaniczne

Metody te wykorzystują fakt, że oleje mają małą rozpuszczalność w wodzie i mniejszą od nich gęstość. Stosuje się je do odolejania ścieków zawierających substancje ropopochodne w postaci pływających kropeł lub w postaci zdyspergowanej, grubej i nietrwałej emulsji. W separatorach (odolejaczach) wykorzystuje się siły grawitacyjne, bezwładności i odśrodkowe działające na olej rozproszony w wodzie, w celu uzyskania dwóch niemieszających się ze sobą warstw: olejowej i wodnej. Następnie fazę olejową zbiera się przy pomocy specjalnych urządzeń np. skimmerów.

Metody flotacyjne

W tych metodach doprowadza się powietrze do oczyszczanych ścieków, poprzez napowietrzanie drobnopęcherzykowe, po to aby zdyspergowany olej gromadził się na granicy faz: pęcherzyk powietrza - woda i był wynoszony na powierzchnię cieczy. Często stosuje się metody flotacyjne razem z metodami mechanicznymi.

Metody chemiczne

Metody chemiczne, stosowane są najczęściej do destabilizacji trwałej emulsji olejowej, obejmują koagulację i ekstrakcję. W wielu przypadkach skuteczna jest koagulacja za pomocą soli żelaza i glinu. Wytrącony w wyniku dawkowania koagulantu kłaczkowaty osad wodorotlenku żelazowego lub glinowego sorbuje na swej powierzchni cząstki oleju. Przy ekstrakcji wykorzystuje się lepszą rozpuszczalność substancji olejowych w organicznym rozpuszczalniku niż w wodzie. Metodę ekstrakcji stosuje się przy dużych koncentracjach ropopochodnych w oczyszczanych wodach czy ściekach.

Metody fizykochemiczne

Do metod fizykochemicznych należą: sorpcja, filtracja, ultrafiltracja, hiperfiltracja i koalescencja w złożu. Odolejanie ścieków w procesie sorpcji polega na zetknięciu się zemulgowanych cząstek oleju z ciałem stałym – sorbentem, w wyniku czego dochodzi do procesów adsorpcji i absorpcji. Sorpcję prowadzi się z wykorzystaniem stałego złoża lub rozdrobnionych sorbentów umieszczonych w roztworze wodnym. Oczyszczalnie tego typu osiągają najlepszy stopień usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych gdy w ściekach do nich dopływających pozostanie jeszcze około 40-80 mg ropopochodnych w litrze, po uprzednim mechanicznym usunięciu warstwy tych substancji [42]. Za złożo sorpcyjne służy często węgiel aktywny, syntetyczne szkło, pianki poliuretanowe, wiórki drzewne, granulowana

glinia, piasek kwarcowy, żwir, antracyt, koks czy ziemia krzemkowa. Często po procesie koagulacji stosuje się proces filtracji. Oleje zatrzymują się na materiale filtracyjnym jakim jest piasek kwarcowy, żwir, antracyt, koks, ziemia krzemkowa, wióry drewniane i odpady ze szmat bawełnianych. Ultrafiltracja pozwala na oddzielenie najdrobniejszych kropli emulsji na membranach ceramicznych. Siłą napędową procesu mikrofiltracji jest ciśnienie transmembranowe wytwarzane przez pompę recyrkulacyjną. Przez membranę przepływa woda (permeat), z niewielką ilością rozpuszczonych w niej składników organicznych. Retentat, czyli skoncentrowana emulsja substancji organicznej przepływa nad powierzchnią membrany. Permeat pozostawia na powierzchni membrany zatrzymane krople oleju. Za pomocą hiperfiltracji próbuje się usunąć frakcje olejów rozpuszczone w oczyszczanych wodach lub ściekach. Do usuwania ze ścieków olejów niemal powszechnie stosuje się koalescencję. Proces ten polega na łączeniu się małych cząstek oleju zdyspergowanych w wodzie w większe skupiska wskutek wzajemnych zderzeń. W wyniku tego, następuje zmniejszenie stopnia rozdrobnienia fazy rozproszonej i utworzenie z niej warstwy, możliwej do usunięcia metodami mechanicznymi. Proces koalescencji, przeprowadza się przy pomocy złożów wykonanych z materiałów włóknistych czy ziarnistych, ponieważ zjawisko to znacznie łatwiej przebiega na powierzchni substancji stałej.

Metody termiczne

Metody te mają na celu deemulgację oleju i wydzielenie go ze ścieków. Uzyskuje się ten efekt poprzez podgrzewanie ścieków, ich odparowanie i destylację lub przez wymrażanie i późniejszą krystalizację. Metody te są jednak zbyt kosztowne aby je stosować na dużą skalę.

Metody elektryczne

Oparte są na koalescencji kropli olejowych w polu elektrycznym i na ich dalszej adsorpcji na produktach przebiegającej jednocześnie elektrolizy ścieków. Często proces ten przebiega z elektrolitycznym roztwarzaniem elektrod żelaznych lub glinowych, w wyniku czego powstają wodorotlenki żelazowe lub glinowe oraz tlen i wodór. Następnie następuje proces koagulacji kropli olejowych oraz flotacja powstałych aglomeratów wspomagana przez wydzielające się w procesie elektrolizy gazy.

Metody magnetyczne

Do oczyszczanych ścieków dodaje się substancje ferromagnetyczne, które łączą się z olejem. W ten sposób rozproszona substancja olejowa uzyskuje właściwości magnetyczne i następnie jest usuwana ze ścieków w trakcie przechodzenia przez wypełnienie umieszczone w polu magnetycznym.

Metody biologiczne

Polegają na zastosowaniu drobnoustrojów wykorzystujących substancje olejowe jako źródła węgla i energii. Najczęściej stosuje się osad czynny lub błony biologiczne. Metody te wykorzystywane są powszechnie do końcowego oczyszczania ścieków zaolejonych, czyli do takich ścieków które zawierają substancje olejowe rozpuszczone w wodzie [43].

Oczyszczanie gleby może się odbywać wieloma metodami w zależności od rodzaju i wielkości skażenia. Najczęściej wstępne oczyszczanie odbywa się metodami mechanicznymi, polegającymi na zbieraniu rozlewów z powierzchni terenu, spłukiwaniu ich gorącą wodą o

temperaturze 60 °C lub spalaniu. Stosuje się także metody chemiczne polegające na ekstrakcji zanieczyszczeń z gleby przy pomocy rozpuszczalników, lub ich koagulacji i flokulacji. Ostatnią grupę metod stanowią metody biologiczne opierające się na zapewnieniu mikroorganizmom rozkładającym produkty ropopochodne optymalnych warunków wzrostu i rozmnażania się czyli dążące do przyspieszenia naturalnego procesu samooczyszczania gleby. Uzyskuje się to poprzez wzbogacanie środowiska w składniki pokarmowe w postaci związków azotu i fosforu, poprzez dostarczenie odpowiedniej ilości tlenu oraz poprzez zapewnienie optymalnej temperatury i wilgotności. Przy czym metody biologiczne mogą być oparte na działaniu mikroflory autochtonicznej lub polegać na wprowadzeniu obcych dla danego środowiska mikroorganizmów rozkładających substancje węglowodorowe w postaci tzw. inokulantów [44, 45].

1.4. Podatność zanieczyszczeń ropopochodnych na mikrobiologiczny rozkład

Na przełomie XIX i XX wieku stwierdzono, że drobnoustroje mogą wykorzystywać węglowodory jako źródło węgla i energii. K. Kotełko, L.Sedłaczek i T.M. Lachowicz [46] podają, że tylko ok. 10% gatunków drobnoustrojów posiada zdolność do rozkładu węglowodorów na drodze metabolicznej, niektóre także w procesie kometabolizmu, czyli do zdolności utleniania określonego węglowodoru w obecności innego, łatwiej przyswajalnego substratu. Należą do nich bakterie z rodzaju: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, promieniowce *Nocardia*, *Streptomyces* i drożdże z rodzaju *Candida* i *Rhodotorula* oraz niektóre grzyby: *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Trichoderma* i *Mortierella*. Szczepy o różnej przynależności taksonomicznej specjalizują się w rozkładzie określonych związków węglowodorowych. W toni wodnej, zwłaszcza w warstwach przydennych występują bakterie rozkładające metan, takie jak *Methanomonas methanica* czy *Pseudomonas methanica*. Szczepy z rodzajów *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium* i *Nocardia* asymilują węglowodory płynne o krótkich łańcuchach: etan, propan czy butan. Węglowodory o dłuższych łańcuchach biodegradują szczepy z rodzajów *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia* i *Candida*. W miarę wzrostu długości łańcucha węglowego w tych związkach, rośnie liczba gatunków zdolnych do ich rozkładu. Pewne gatunki bakterii wyspecjalizowały się w rozkładzie określonych węglowodorów, np. niektóre *Bacterium* rozkładają naftalen, inne zaś – fenantren. Natomiast jeszcze inne mogą wykorzystywać wiele organicznych związków węgla, np. *Bacterium aliphaticum* – heksan, oktan, parafinę, *Pseudomonas aeruginosa* wykorzystuje parafinę, benzol, toluol, benzen, ropę naftową i inne [47,48]. Bardzo często rozkład substancji ropopochodnych, stanowiących mieszaninę węglowodorów o różnej długości łańcucha, stopni nasycenia i konfiguracji wymaga współdziałania wielu drobnoustrojów należących do różnych grup taksonomicznych przeprowadzających kolejne etapy degradacji [49]. Ponadto część mikroorganizmów ma zdolność jedynie do kometabolizmu, czyli kooksydacji, tzn. potrafi utleniać węglowodory występujące jako dodatkowe, a nie podstawowe źródło węgla jak to ma miejsce, według R.J. Watkinson'a [50], np. w przypadku rozkładu węglowodorów cykloparafinowych. Niektóre mikroorganizmy mogą się rozwijać przy bardzo małych stężeniach substancji ropopochodnych bowiem jak to stwierdzili Atlas i Bartha [51] niektóre związki wchodzące w ich skład mają działanie toksyczne. Natomiast inne drobnoustroje mogą żyć w środowiskach zawierających bardzo wysokie stężenia tych substancji, wręcz w kroplach olejowych.

Bardzo ciekawym zagadnieniem jest sposób w jaki drobnoustroje bytujące w fazie wodnej atakują nierozpuszczalne w niej węglowodory, ponieważ jedynie związki

rozpuszczone w wodzie są dla nich dostępne. Związki nie rozpuszczone mogą być wykorzystywane przez mikroorganizmy jedynie w stanie zdyspergowanym, gdyż proces biodegradacji zachodzi na granicy fazy wodnej i olejowej. D.M. Falatko [52] podaje, że część drobnoustrojów bytujących w skażonych środowiskach wodnych wykazuje zdolność do wydzielania biosurfaktantów, substancji o charakterze związków powierzchniowo czynnych, posiadających właściwości emulgujące. Związki te to proste lub złożone lipidy i ich pochodne glikolipidy, fosfolipidy, peptydoglikolipidy powstające w komórkach podczas wzrostu. W ten sposób lipopolisacharydowa warstwa na powierzchni ściany komórkowej bakterii degradujących substancje ropopochodne ułatwia łączenie komórek z kropelkami węglowodorów [53,54].

Do tej pory sądzono, że węglowodory są trwałe w warunkach beztlenowych i nie podlegają w nich procesom mikrobiologicznego rozkładu. Okazuje się jednak, że w tych warunkach może także dochodzić do przemian węglowodorów pod warunkiem, że w środowisku będą obecne akceptory wodoru pozwalające na oddychanie beztlenowe lub dostęp światła. W ostatnich latach prowadzone są badania nad wykorzystaniem bakterii beztlenowych do rozkładu substancji olejowych. Najwięcej prac dotyczy możliwości degradacji tych związków w obecności bakterii redukujących siarczany i metanogennych [55], niewiele jest prac o możliwościach bakterii denitryfikacyjnych. Również dużo trzeba jeszcze wyjaśnić jeżeli chodzi o beztlenowy rozkład węglowodorów aromatycznych. A zatem głównym warunkiem ich dostępności dla utleniania mikrobiologicznego jest obecność tlenu cząsteczkowego. Proces biodegradacji węglowodorów wymaga także wysokiej aktywności systemów oksygenaz, dehydrogenaz i hydrolaz. Decydującym etapem przemian biochemicznych towarzyszących rozkładowi węglowodorów wchodzących w skład produktów ropopochodnych jest utlenianie, prostych lub rozgałęzionych alkanów oraz rozrywanie pierścieni aromatycznych. Wszystkie wymienione substancje po wstępnych reakcjach utleniania wchodzą w główne szlaki metaboliczne [56].

Tak więc, biodegradacja substancji ropopochodnych w środowisku wodnym zależy od:

1. Obecności aktywnych mikroorganizmów degradujących substancje węglowodorowe
4. Struktury chemicznej węglowodorów i ich rozpuszczalności w wodzie
5. Stężenia węglowodorów i ich toksyczności w stosunku do drobnoustrojów
6. Obecności substancji biogennych – azotu i fosforu oraz innych makro- i mikroelementów
7. Odpowiednich warunków tlenowych
8. Odpowiedniej temperatury (4 - 30 °C)
9. Właściwego odczynu środowiska (pH 6 - 9)
10. Obecności innych niż węglowodory źródeł węgla dla drobnoustrojów
11. Obecności innych związków toksycznych

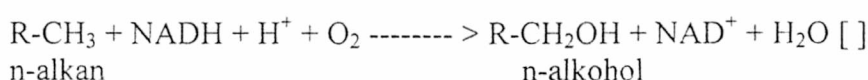
Alkany zawierające w cząsteczce od 1 do 4 atomów węgla występują w postaci gazowej i są wykorzystywane przez niewiele szczepów bakterii. Węglowodory zawierające w cząsteczce od 5 do 10 atomów węgla są najłatwiej rozpuszczalne w wodzie i zarazem najbardziej toksyczne i niechętnie metabolizowane. Biodegradacji mogą ulegać jedynie w niskich stężeniach. Alkany, cykloalkany i węglowodory aromatyczne zawierające od 10 do 18 atomów węgla w cząsteczce są najchętniej degradowane przez mikroorganizmy, natomiast węglowodory o dłuższych łańcuchach węglowych (powyżej C₂₂) są metabolizowane, ale wolniej ze względu na ich niską rozpuszczalność w wodzie i stałą konsystencję. Najmniej informacji o mikrobiologicznej podatności na rozkład jest na temat asfaltenów. Najbardziej odporne na mikrobiologiczny rozkład są związki o łańcuchach rozgałęzionych w porównaniu do tych o łańcuchach prostych. W miejscach rozgałęzień utrudniony jest bowiem proces β -oksydacji. Podatność na mikrobiologiczny rozkład węglowodorów aromatycznych jest natomiast zależna od ilości pierścieni aromatycznych: im więcej tych pierścieni w cząsteczce tym rozkład jest bardziej utrudniony. Mieszaniny węglowodorów znajdujące się w

substancjach ropopochodnych nie ulegają mikrobiologicznemu rozkładowi z taką samą efektywnością w czasie. Na początku procesu biodegradacji obserwuje się szybki ubytek węglowodorów alifatycznych łańcuchowych a potem rozgałęzionych, następnie rozkładane są węglowodory aromatyczne natomiast cykloalkany pozostają w środowisku najdłużej [57,58].

Mikrobiologiczny rozkład alkanów długołańcuchowych

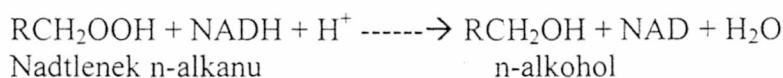
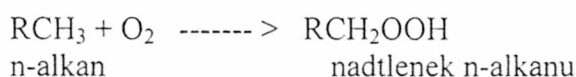
Biodegradacja alkanów długołańcuchowych zachodzi najszybciej i jej mechanizm jest najlepiej poznanym procesem rozkładu węglowodorów. W warunkach tlenowych rozkład alkanów zachodzi na drodze hydroksylacji lub hyperoksydacji, natomiast w warunkach beztlenowych na drodze dehydrogenacji [59,60,61,62].

Utlenianie n-alkanów rozpoczyna się od włączenia cząsteczki tlenu w reakcji hydroksylacji przy udziale systemu enzymatycznego złożonego z monooksygenaz, zgodnie z reakcją:



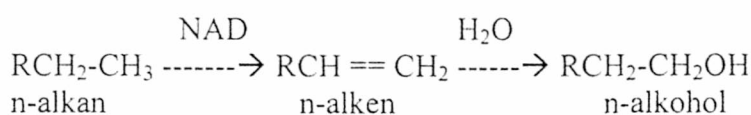
W ten sposób zostaje utleniona końcowa grupa metylowa do grupy alkoholowej i tym samym do odpowiedniego alkoholu. Następnie, za pomocą właściwych dehydrogenaz ulegają one przemianom do aldehydów i kwasów tłuszczowych, te z kolei włączane są w proces β -oksydacji i są degradowane ostatecznie do acetylo-CoA. Czasami może również zachodzić proces ω -hydroksylacji kwasu tłuszczowego, a następnie przekształcenie grupy hydroksylowej w tej pozycji do grupy karboksylowej. Kwasy dikarboksylowe również ulegają procesowi β -oksydacji, tak samo jak kwasy monokarboksylowe (rys 1 i 2) [63].

Natomiast rozkład alkanów na drodze hyperoksydacji zachodzi według reakcji :

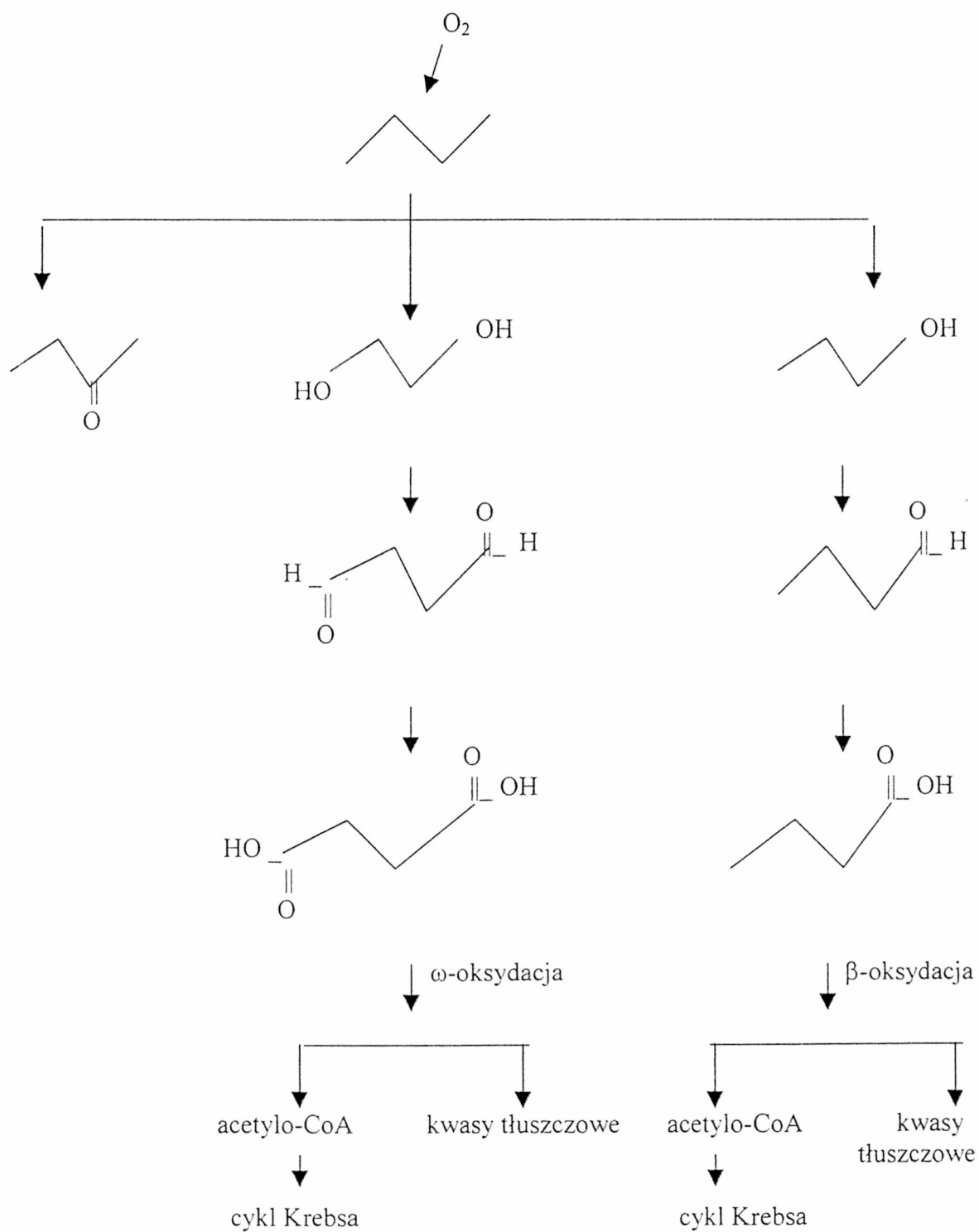


Dalsze przemiany powstających alkoholi zachodzą analogicznie jak w procesie hydroksylacji.

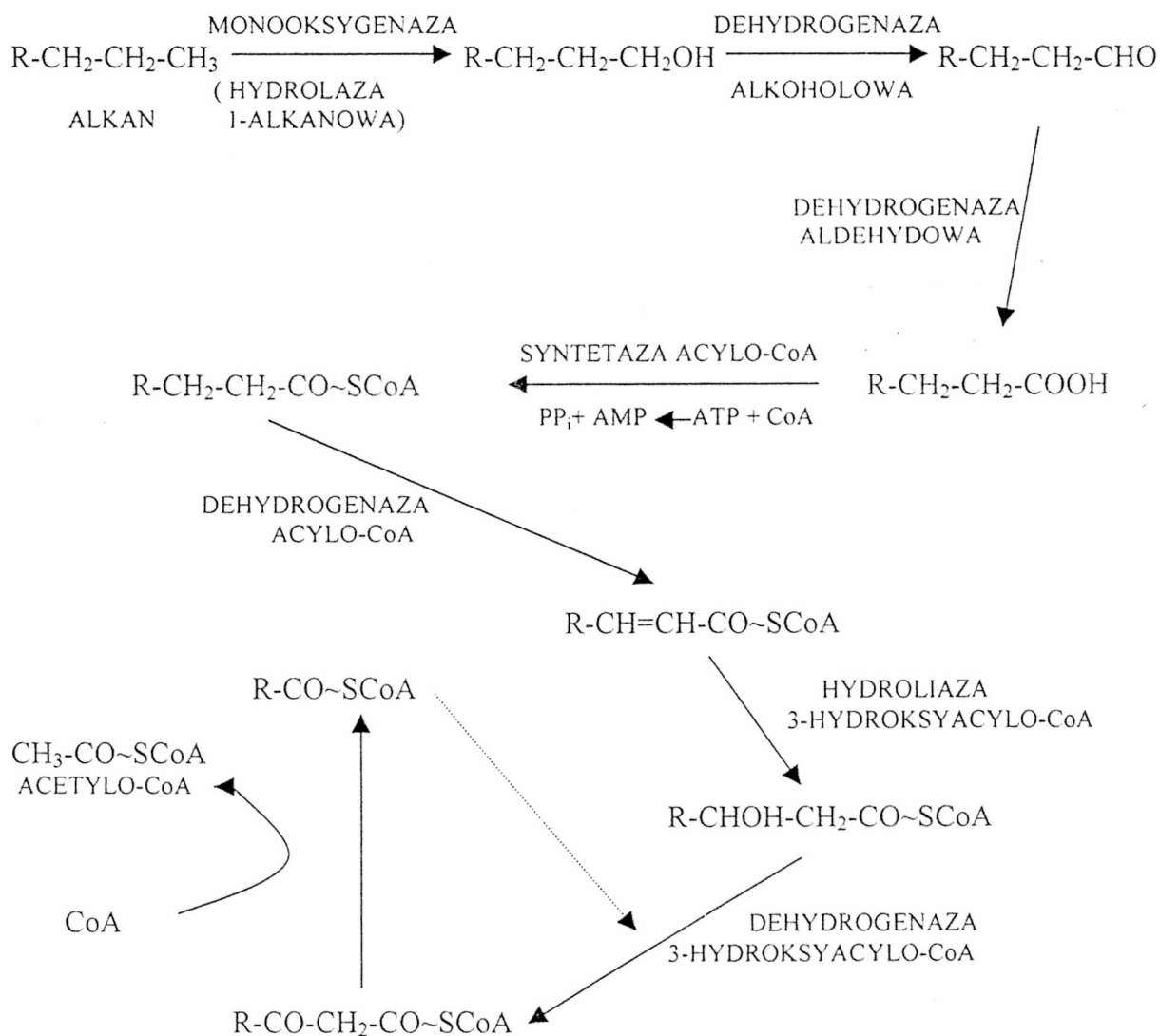
Beztlenowa biodegradacja alkanów polega na procesie dehydrogenacji alkanów do alkenów po którym następuje przyłączenie cząsteczki wody [64]:



Dalsze etapy biodegradacji przebiegają tak jak w procesie hydroksylacji.



Rysunek 1. Biodegradacja węglowodorów alifatycznych



Rysunek 2. Rozkład alkanów przez terminalną oksydację przy współudziale monooksygenazy oraz przez β -oksydację do acetylo-CoA

Mikrobiologiczny rozkład cykloalkanów

Bardzo trudno jest wyizolować drobnoustroje wykorzystujące cykloalkany jako jedyne źródło węgla i energii bowiem są one mniej podatne na mikrobiologiczny rozkład w stosunku do innych grup węglowodorów. Oporność na biodegradację tej grupy węglowodorów wynika z ich małej rozpuszczalności w wodzie oraz wysokiej toksyczności w stosunku do mikroorganizmów cykloalkanów o niskich masach cząsteczkowych, takich jak cykloheksan czy dekalina. Całkowite utlenienie cykloalkanów zachodzi najczęściej w niskich stężeniach na drodze kometabolizmu lub przy współpracy mieszanych kultur drobnoustrojów. Znane są także, nieliczne przykłady wykorzystywania cykloalkanów przez czyste szczepy bakterii np. wzrost bakterii z rodzaju *Nocardia* w obecności metylocykloheksanu lub cykloheksanu.

Według P.W. Trudgill'a [65], w przypadku n-alkilocykloalkanów z nieparzystą liczbą atomów węgla w łańcuchu bocznym, końcowa grupa metylowa podlega procesowi hydroksylacji. W ten sposób związki te zostają utlenione do odpowiadających im kwasów tłuszczowych, tak jak w przypadku n-alkanów, które następnie podlegają procesowi β -oksydacji, poprzez metabolit pośredni jakim jest cykloalkanowy karboksylo-CoA.

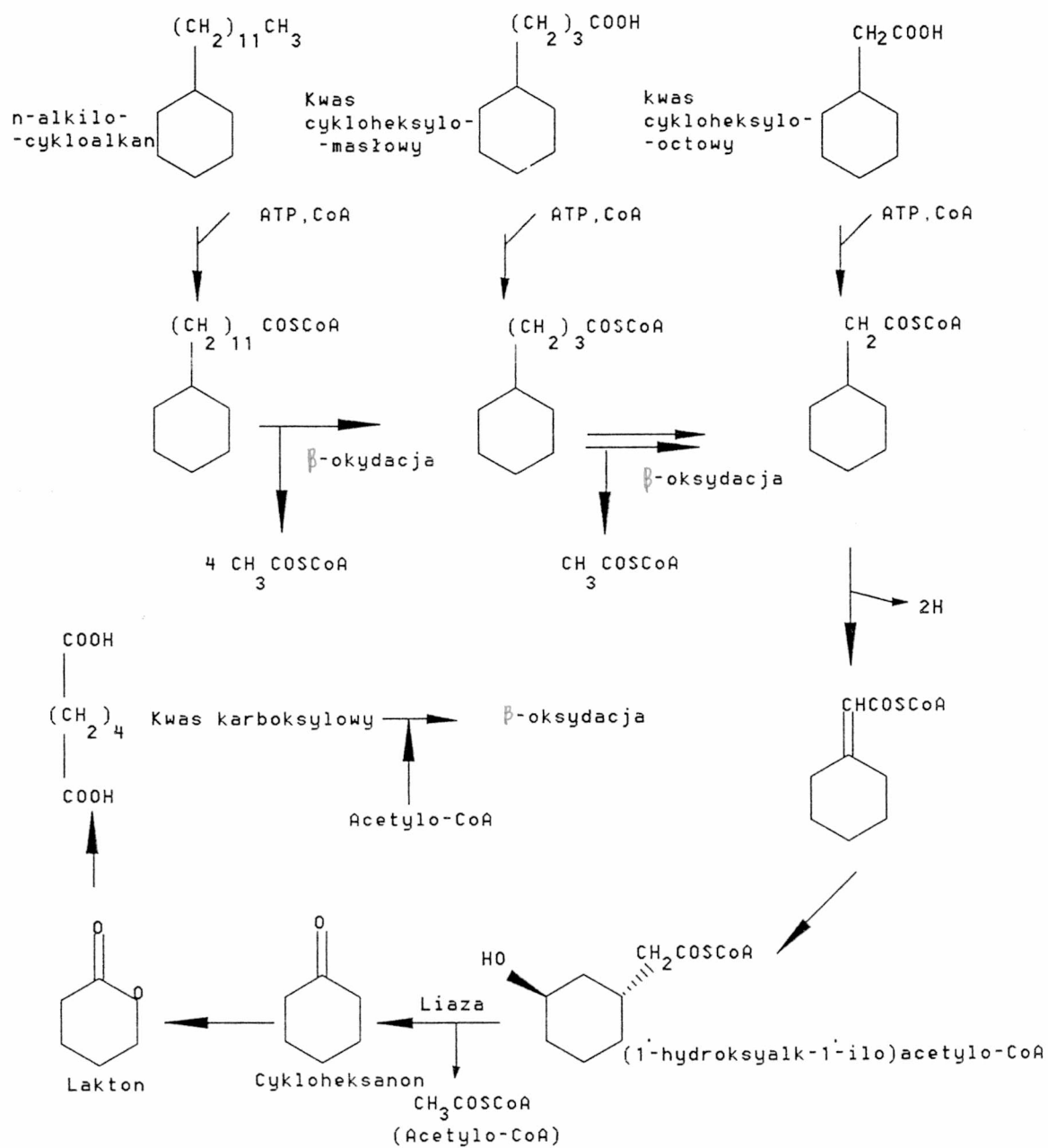
Biodegradacja n-alkilocykloalkanów z parzystą liczbą atomów węgla w łańcuchu przebiega podobnie. W tym przypadku również powstają odpowiednie kwasy tłuszczowe podlegające procesowi β -oksydacji. Proces ten jest jednak zahamowany w momencie powstania (1'-hydroksyalk-1'-il) acetylo-CoA. Późniejszy metabolizm tego związku przebiega z udziałem enzymu z grupy liaz, która katalizuje rozszczepienie wiązania C-C pomiędzy łańcuchem bocznym a pierścieniem w wyniku czego powstaje acetylo-CoA i cykloalkanon.

Powstająca cykliczna ketonowa pochodna jest następnie przekształcana przy udziale monooksygenaz do odpowiedniego laktonu. Tak samo dzieje się z cyklicznym pierścieniem podstawionym grupą metylową. Rozerwanie pierścienia cyklicznego następuje podczas hydrolizy laktonu a potem na skutek dalszego utleniania powstaje metabolit pośredni w postaci kwasu, który łączy się z acetylo-CoA i dalej podlega procesowi β -oksydacji (rysunek 3.).

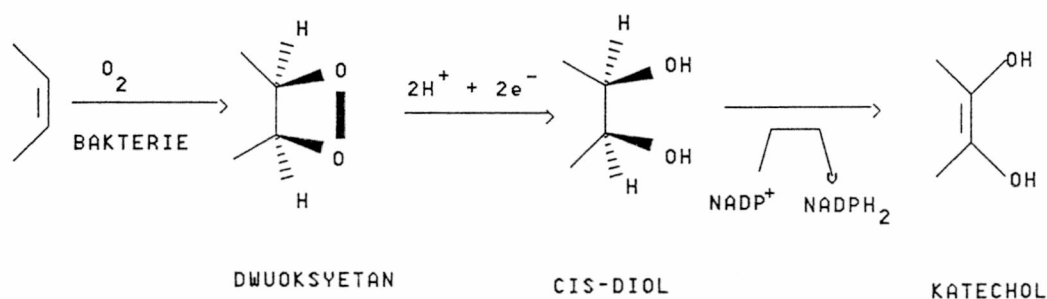
Mikrobiologiczny rozkład węglowodorów aromatycznych

Trwająca miliony lat ewolucja doprowadziła u mikroorganizmów do wykształcenia niezbędnych enzymów, służących do degradacji związków aromatycznych [66]. Mikrobiologiczny rozkład tych związków, w warunkach tlenowych przebiega dwu etapowo. W pierwszym etapie następuje przygotowanie związku do rozszczepienia pierścienia aromatycznego czyli: przekształcenie lub usunięcie podstawników (np. grupy chlorowe, nitrowe i sulfonowe są zastępowane grupami hydroksylowymi) i łańcuchów bocznych (mogą być modyfikowane, skracane lub pozostawać bez zmian). W drugim etapie, przekształceniu ulega pojedynczy pierścień aromatyczny [67,68,69].

Pierwszy etap zazwyczaj, w wyniku dość dużej liczby reakcji, prowadzi do włączenia do pierścienia aromatycznego dwóch atomów tlenu molekularnego powodując powstanie pochodnych cis-dwuhydrodiolowych, które są następnie utleniane do pośredniego metabolitu kluczowego jakim jest katechol (dla pierścieni pojedynczo lub podwójnie podstawionych – 1,2-di-) lub kwas protokatechowy (dla pierścieni podwójnie podstawionych w pozycjach 1,3 i 1,4 oraz dla pierścieni podstawionych wielokrotnie). W ten sposób pierścień aromatyczny przygotowany zostaje na atak dioksygenaz (rysunek 4.).

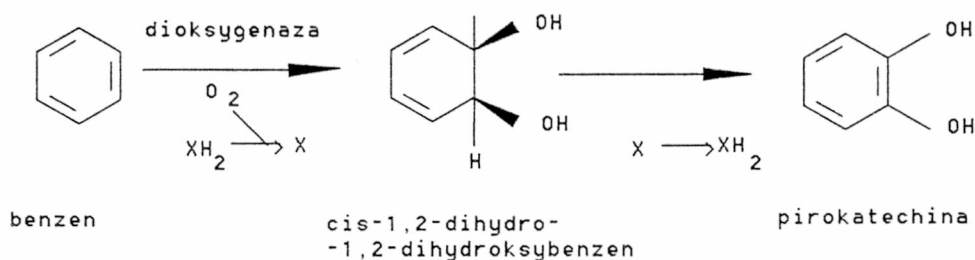


Rysunek 3. Mikrobiologiczny rozkład n-alkilocykloalkanów, kwasu cykloheksylo-masłowego i kwasu cykloheksylooctowego.



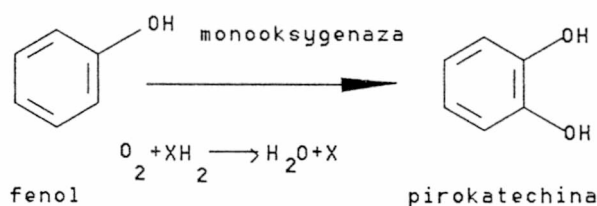
Rysunek 4. Wstępne reakcje utleniania pierścienia aromatycznego przez bakterie.

I tak np. nie podstawiony pierścień benzenu, według Schlegel'a [63], ulega hydroksylacji przy udziale dioksygenazy (podwójnej hydroksylazy) do cis-1,2-dihydro-1,2-dihydroksybenzeny, który ponownie ulega dehydratacji (ponownej aromatyzacji) do pirokatechiny (rysunek 5.).



Rysunek 5. Mikrobiologiczny rozkład benzenu.

W przypadku fenolu, według tego samego autora, pod wpływem monooksygenaz, zostaje wbudowany do pierścienia aromatycznego jeden atom tlenu a drugi atom tlenu atmosferycznego jest redukowany do cząsteczki wody (rysunek 6.).



Rysunek 6. Mikrobiologiczny rozkład fenolu.

W drugim etapie katechol lub kwas protokatecholowy ulega dalszym przemianom biochemicznym poprzez rozszczepienie orto lub meta pierścienia aromatycznego. Proces ten katalizują oksygenazy, enzymy z grupy ferroproteidów.

Rozszczepienie typu orto (intradiolowe) zachodzi pomiędzy dwoma sąsiadującymi, hydroksylowanymi atomami węgla pod wpływem 1,2-dioksygenazy katecholowej. Przypuszczalnie najpierw powstaje cykliczny nadtlenuk na skutek przyłączenia cząsteczki tlenu do atomów węgla obok grupy hydroksylowej. Potem następuje zerwanie wiązania C-C i utworzenie kwasu cis,cis-mukonowego. Związek jest następnie przekształcany do kwasu 3-ketoadypinowego (poprzez mukonolakton i 4-ketoadypinoenolakton), który pod wpływem transferazy-CoA zostaje rozszczepiony na bursztynylo-CoA i acetylo-Co, które są włączane

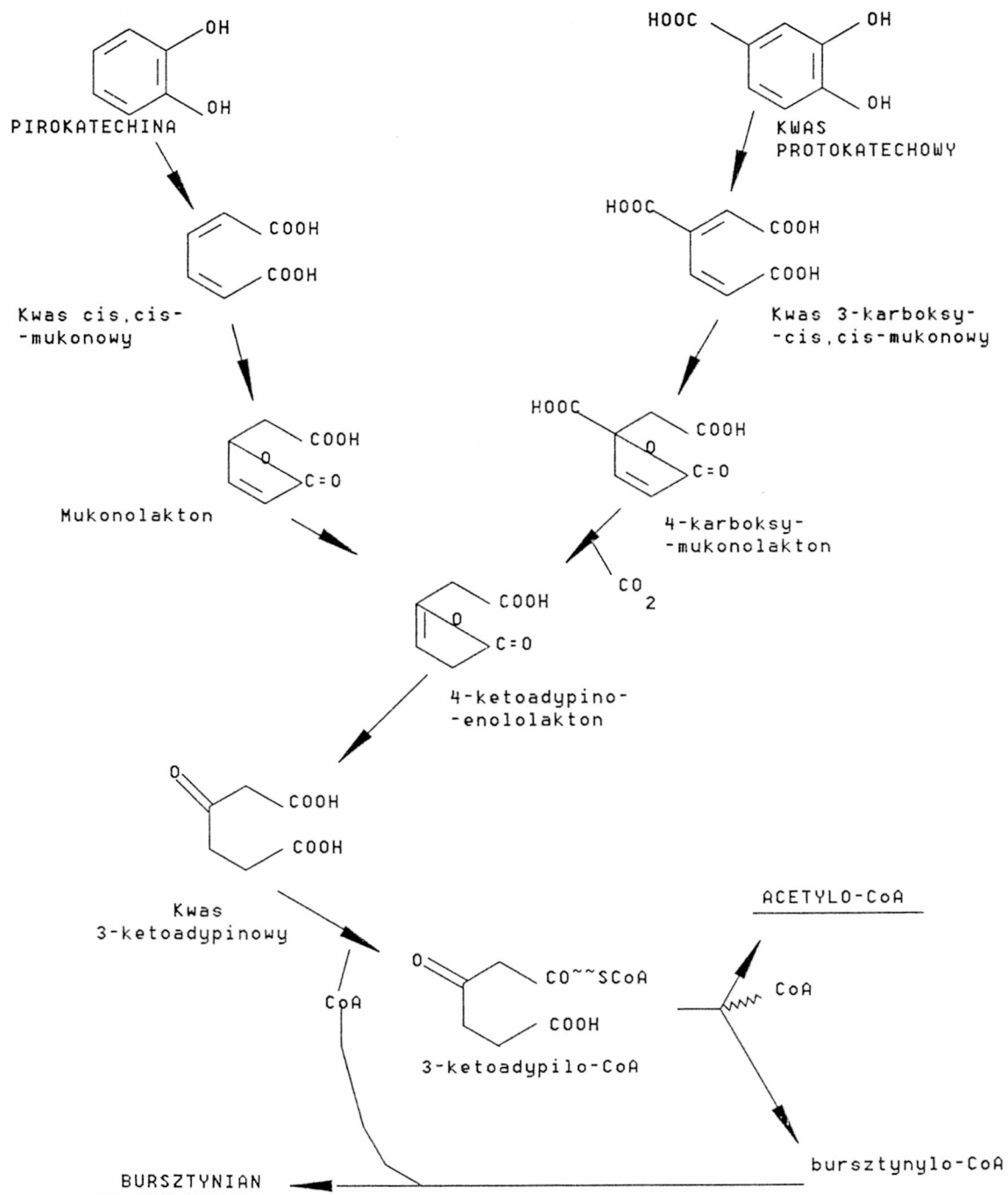
do cyklu Krebsa (rysunek 7.). Taki sam mechanizm ma miejsce w przypadku przemian kwasu protokatecholowego, który także jest metabolizowany do kwasu 3-adypinowego ale poprzez inne produkty pośrednie: kwas 3-karboksy-cis, cis-mukonowy i 4-karboksy-mukonolakton.

Rozszczepienie typu meta (ekstradiolowe) zachodzi pomiędzy hydroksylowanym i niehydroksylowanym atomem węgla. Przy udziale 2,3-dioksygenazy katecholowej. W wyniku tego rozszczepienia powstają semialdehydy kwasu 2-hydroksymukonowego, które następnie mogą być przekształcane, zależnie od typu podstawienia do aldehydu octowego i kwasu pirogronowego włączanych do cyklu Krebsa (rysunek 8.).

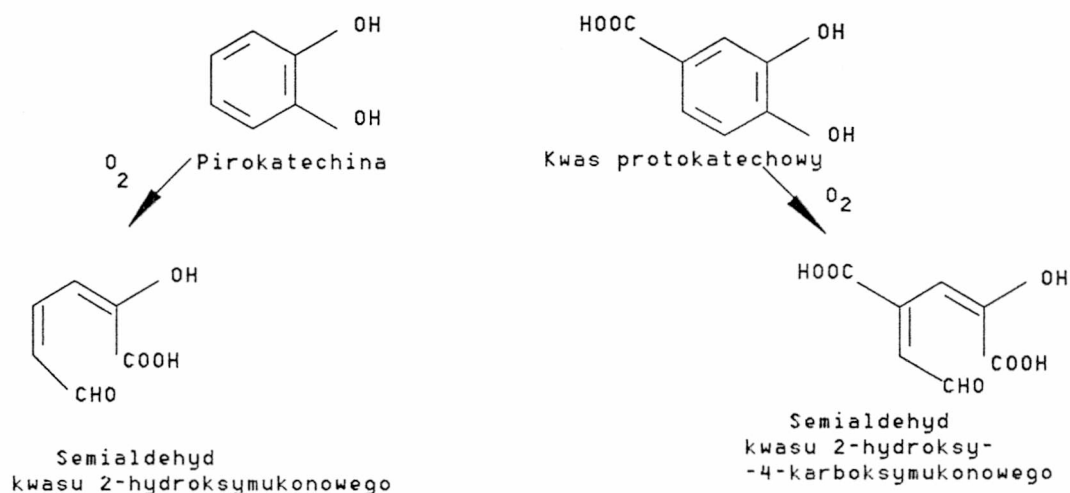
1.5. Zasady konstruowania i możliwość stosowania szczepionek mikrobiologicznych do oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego.

Mikroorganizmy odgrywają ogromną rolę w samooczyszczaniu środowiska naturalnego z zanieczyszczeń dostających się na skutek gospodarczej działalności człowieka. Jednakże proces ten w warunkach naturalnych jest procesem wielostopniowym, trwającym wiele lat. Dlatego też, coraz częściej prowadzi się badania nad przyspieszeniem biodegradacji ksenobiotyków na drodze procesów biotechnologicznych, przy wykorzystaniu aktywnych, czystych kultur drobnoustrojów uprzednio wyizolowanych z silnie skażonych środowisk naturalnych. Z uwagi na stosunkowo niskie koszty oraz dużą skuteczność metody biologiczne znajdują praktyczne zastosowanie na skalę techniczną [70].

W procesach biologicznego oczyszczania ścieków najczęściej stosowane są metody oparte na naturalnym doborze mikroflory, ukształtowanej losowo. Jednakże metody te nie zawsze pozwalają na szybką i skuteczną biodegradację trudno rozkładalnych związków. Oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego napotyka w ostatnich latach na duże trudności, bowiem coraz częściej zdarza się, że miejskie oczyszczalnie ścieków przewidziane do oczyszczania ścieków bytowo-gospodarczych muszą również usuwać niebezpieczne zanieczyszczenia pochodzenia przemysłowego. Wiąże się to ze znacznymi wahaniami zarówno składu jak i stężeń substancji toksycznych zawartych w ściekach dopływających do oczyszczalni. Okazuje się, że nawet niewielkie zmiany ładunków niektórych zanieczyszczeń mogą doprowadzić do zakłóceń eksploatacyjnych. Zwiększona ilość zanieczyszczeń lub obecność substancji toksycznych może doprowadzić do zniszczenia struktury osadu czynnego i obumarcia komórek bakterii. Regeneracja jej jest bardzo trudna lub wręcz niemożliwa. Przeciążenie mikroorganizmów osadu czynnego substancjami toksycznymi może prowadzić do bardzo wielu niekorzystnych zjawisk takich jak: zanik lub zmniejszenie procesów nitryfikacji, obniżenie biochemicznej aktywności drobnoustrojów, zmiany w składzie biocenozy (nadmierny rozwój organizmów nitkowatych), zmiany w strukturze osadu czynnego (gwałtowny rozpad kłaczków tzw. pin-point floc). Wszystkie te zmiany mogą prowadzić do pęcznienia osadu aż do jego wypływu z układu a w efekcie do pogorszenia efektów oczyszczania ścieków. Procesy adaptacyjne mikroflory osadu czynnego do warunków nieustalonych są długotrwałe lub w ogóle nie następują. W ich wyniku powinny powstać nowe zależności pokarmowe w poziomach troficznych biocenozy osadu a bakterie powinny uruchomić produkcję enzymów adaptacyjnych, umożliwiających im rozkład pojawiających się w ściekach ksenobiotyków. Procesy te wymagają często długiego czasu i z tego powodu efekty oczyszczania ścieków nie są zadowalające. Dlatego też rozpoczęto prace nad zwiększeniem wydajności oczyszczania uciążliwych ścieków na drodze wspomagania biologicznego mikroorganizmów osadu czynnego, przez dodawanie do nich biopreparatów bakteryjnych lub bakteryjno-enzymatycznych [71, 72, 73, 74, 75].



Rysunek 7. Roszczerpienie orto- pierścienia aromatycznego.



Rysunek 8. Rozszczepienie meta- pierścienia aromatycznego.

Już w latach 60-tych prowadzono prace nad wprowadzaniem do komory napowietrzania wyselekcjonowanych, najaktywniejszych szczepów bakterii w stosunku do zawartych w ściekach koksowniczych fenoli. Kultury takie przyspieszały procesy biochemiczne zachodzące w osadzie czynnym, a tym samym pozwalały uniknąć długiego okresu adaptacji mikroflory do nowego substratu pokarmowego. Współcześnie metoda ta poprawia efektywność usuwania fenoli i cyjanów zawartych w ściekach koksowniczych o około 20% i 35% [76]. Zjawisko to zapoczątkowało prace nad przyspieszaniem biodegradacji węglowodorów poliaromatycznych z zastosowaniem tzw. reaktorów wzbogacających, używanych do wzrostu komórek bakterii odpowiedzialnych za rozkład tych związków [77]. Opracowano również szereg biopreparatów skutecznie sprawdzających się w oczyszczaniu ścieków zawierających związki organiczne pochodzenia naturalnego, łatwiej podlegające biodegradacji, takie jak tłuszcze, krochmal, węglowodany, białka czy celuloza.

Jednak biologiczne wspomaganie osadu czynnego nie zawsze daje pozytywne rezultaty, ponieważ dominacja mikroorganizmów biopreparatu może być czynnikiem zakłócającym równowagę biologiczną poprzez zmiany zależności pokarmowych pomiędzy organizmami osadu czynnego. I tak np. duża aktywność drobnoustrojów biopreparatu może być przyczyną zmniejszenia się ilości pierwotniaków odżywiających się saprofitycznie lub zwiększenie się ilości tych, które odżywiają się bakteriami. Na skutek tych zmian biocenoza osadu czynnego staje się wrażliwa na wszelkie zmiany bowiem zachwiana zostaje zdolność do utrzymania równowagi w środowisku osadu a uboższa gatunkowo biocenoza nie potrafi jej utrzymać. Dlatego też przygotowanie i zastosowanie w praktyce biopreparatów musi być poprzedzone bardzo dokładną analizą stopnia ich aktywności w stosunku do substratu przeważającego w oczyszczanych ściekach oraz ewentualnych konsekwencji ich stosowania.

Podstawowymi kryteriami doboru tych drobnoustrojów są obok ich uzdolnień do szybkiej adaptacji w skażonym środowisku i możliwości biodegradacji zanieczyszczeń także wytwarzanie przez nie nietoksycznych i niemutagennych produktów biodegradacji oraz brak oddziaływań antagonistycznych pomiędzy nimi a mikroorganizmami zasiedlającymi osad czynny.

Zasada działania biopreparatów polega na wykorzystywaniu substancji organicznych jako źródła węgla i energii przez znajdujące się w nich drobnoustroje, dzięki czemu substancje szkodliwe zawarte w ściekach przekształcane zostają do nieszkodliwych produktów końcowych. Biopreparaty mogą zawierać jedynie mieszaninę bakterii, ewentualnie

wzbogaconą o substraty pokarmowe lub enzymy bądź składać się z samych enzymów. Preparaty mikrobiologiczne mają jednak tą przewagę nad preparatami enzymatycznymi, że zawarte w nich drobnoustroje namnażają się na oczyszczanych ściekach natomiast preparaty enzymatyczne powinny być dodawane w sposób ciągły do układu oczyszczającego. Ponieważ w skład biopreparatów wchodzi organizmy żywe ich stosowanie wymaga zarówno odpowiedniego doboru jak i nadzorowania prowadzonego procesu oczyszczania. Ważną sprawą na przykład jest nieobecność drobnoustrojów chorobotwórczych czy zarodników grzybów. Ponadto przy komponowaniu szczepionki bakteryjnej należy każdorazowo uwzględnić, obok zdolności do rozkładu określonego ksenobiotyku, także oddziaływania antagonistyczne pomiędzy poszczególnymi mikroorganizmami wchodzącymi w skład biopreparatu oraz pomiędzy nimi i mikroflorą autochtoniczną środowiska do którego szczepionka jest wprowadzana. Jest to postępowanie konieczne, ponieważ oddziaływania antagonistyczne mogą stać się przyczyną niskiej efektywności preparatu pomimo wysokiej aktywności poszczególnych szczepów wchodzących w jego skład. Niemożliwe jest więc stosowanie jednego preparatu do oczyszczania różnych rodzajów ścieków. Ponadto większość prowadzonych przez mikroorganizmy procesów rozkładu opiera się na wykorzystaniu enzymów indukcyjnych. Indukcja enzymatyczna uruchamiająca produkcję odpowiedniego enzymu zachodzi jedynie przy odpowiednim stężeniu substratu. Zbyt niskie jego stężenie uniemożliwia ich produkcję a tym samym obniża skuteczność biopreparatu. Z drugiej strony zbyt wysokie stężenie związku, którego chcemy się pozbyć ze ścieków może być toksyczne dla drobnoustrojów. Równocześnie aktywne mikroorganizmy muszą mieć zapewnione optymalne warunki wzrostu i rozmnażania takie jak: temperatura, odczyn pH, zawartość odpowiednich związków biogennych, natlenienie, brak obecności innych związków toksycznych w oczyszczanych ściekach. Jednocześnie należy pamiętać, że w trakcie procesów biodegradacji powstaje szereg metabolitów, które mogą być bardziej niebezpieczne niż związek wyjściowy. Stąd powstające produkty biologicznego rozkładu powinny być poddawane analizie pod względem ich toksycznego lub genotoksycznego działania na organizmy żywe, przy pomocy zestawu biotestów. Istnieje szereg przykładów, że biopreparaty starannie przygotowane, uwzględniające omówione powyżej kryteria, stanowią wsłaniałe narzędzie likwidujące wiele problemów związanych z usuwaniem uciążliwych substancji ze ścieków [78, 79, 80, 81].

Do tej pory metody biologiczne stosuje się powszechnie do końcowej obróbki ścieków zawierających substancje ropopochodne. Większość badaczy prowadzi badania z biodegradacją adsorpcyjną produktów naftowych na węglach aktywnych, syntetycznym szkłe, piankach poliuretanowych, wiórkach drzewnych czy granulowanej glinie. Oczyszczalnie bioadsorbcyjne osiagają najlepszy stopień usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych gdy w ściekach do nich dopływających pozostanie jeszcze około 40-80 mg ropopochodnych w litrze, po uprzednim mechanicznym usunięciu warstwy tych substancji. Natomiast w przypadku oczyszczania ścieków zaolejonych metodą osadu czynnego, obecność 500 mg /l frakcji olejowych w ściekach surowych powoduje obniżenie stopnia oczyszczania tych ścieków i wzrost indeksu objętościowego osadu. Związane jest to z toksycznym działaniem niektórych związków wchodzących w skład produktów naftowych na mikroflorę autochtoniczną osadu oraz zlepianiem się kłaczków osadu pod wpływem frakcji olejowych, co z kolei staje się przyczyną pogarszania warunków tlenowych w osadzie [82, 83, 84]. Dlatego też doszczepienie osadu czynnego szczepami bakterii aktywnie rozkładającymi składniki substancji ropopochodnych mogłoby zwiększyć efektywność procesu oczyszczania ścieków zanieczyszczonych tymi związkami. Zastosowanie takich szczepów w procesach biologicznego oczyszczania pozwoliłoby na uniknięcie długiego okresu adaptacji mikroflory do nowego substratu pokarmowego oraz mogłoby zapobiec pogarszaniu się warunków oczyszczania tych ścieków.

1.6. Możliwość mikrobiologicznej modyfikacji osadu czynnego

Bakterie stanowią główny składnik biocenozy i główną część biomasy osadu czynnego. Podstawową rolę drobnoustrojów w procesie oczyszczania ścieków jest wytwarzanie licznych enzymów, pełniących rolę katalizatorów przemian jakim podlegają związki chemiczne dopływające wraz z ściekami do komory osadu czynnego. Dlatego niezmiernie ważną sprawą jest odpowiedni dobór składu bakteryjnego biomasy osadu do składu chemicznego ścieków. Mikrobiologiczną modyfikację osadu czynnego można uzyskać przez [85]:

- Adaptację enzymatyczną, która pozwoli na dobór składu bakteryjnego osadu na drodze naturalnej. Będzie ona miała miejsce wtedy, gdy poddamy osad czynny systematycznie wzrastającemu stężeniu substratu, który będzie działał jako induktor w procesie biosyntezy enzymów adaptacyjnych.
- Izolację wysokoaktywnych szczepów bakterii-mutantów o utrwalonej genetycznie zdolności biodegradowania określonych substratów. Zaszczepienie tymi szczepami biomasy osadu czynnego pozwoli na rozszerzenie jego możliwości biodegradacyjnych.
- Wyhodowanie osadu czynnego wyłącznie z wysokoaktywnych szczepów drobnoustrojów, co umożliwi biodegradację określonego substratu (utrwaloną genetycznie) przez wszystkie bakterie stanowiące biomasę osadu czynnego.
- Inicjowanie, przy pomocy inżynierii genetycznej, powstawania zdolności biodegradacyjnych u szczepów nieaktywnych (biorcy) przez wprowadzanie do ich komórek obcego DNA pobranego z komórek szczepów aktywnych (dawcy), kodującego wytwarzanie enzymów metabolizujących określone substancje chemiczne.

2.0. Cel pracy

Celem pracy było zwiększenie efektywności biologicznego oczyszczania ścieków zawierających olej napędowy metodą osadu czynnego. Olej napędowy jest wyjątkowo trudnym zanieczyszczeniem, gdyż w jego skład wchodzi bardzo wiele składników o różnej budowie chemicznej i podatności na biodegradację. Każdy z nich może występować w innym stężeniu w porównaniu do pozostałych a ich oddziaływanie na mikroflorę osadu czynnego jest bardzo zróżnicowane.

Do głównych zadań pracy należało:

1. Pozyskanie wysoko aktywnych szczepów drobnoustrojów, które byłyby enzymatycznie przygotowane do rozkładu poszczególnych składników oleju napędowego.
2. Przeprowadzenie wstępnych badań co do możliwości wprowadzenia pozyskanych mikroorganizmów do biomasy osadu czynnego, wyhodowanego w sposób ogólnie stosowany, tak aby aktywne szczepy stały się stałym elementem jego biocenozy.
3. Ocena procesu biodegradacji oleju napędowego w różnych wariantach polegających na zastosowaniu osadu czynnego konwencjonalnego, doszczepianego aktywnymi szczepami oraz wyhodowanego wyłącznie z aktywnych szczepów mikroorganizmów. Określenie postępu biodegradacji prowadzono zarówno w warunkach utrzymywania stałego ładunku zanieczyszczeń obciążających osad czynny, jak i przy zmiennym obciążeniu.
4. Wyjaśnienie zagadnienia dotyczącego biosorpcji oleju napędowego na powierzchni osadu czynnego doszczepianego aktywnymi szczepami i osadu konwencjonalnego w celu poznania zależności pomiędzy procesem biosorpcji i biodegradacji oleju przez te osady.
5. Dokonanie badań bioindykacyjnych w tym genotoksycznych w oparciu o różne testy w celu oceny oddziaływania oleju napędowego i jego metabolitów powstających w procesie oczyszczania na organizmy żywe.

Część doświadczalna

3.0. Materiały i metody

3.1. Pochodzenie i charakterystyka substancji ropopochodnych

Olej napędowy używany do badań nad biodegradacją pochodził z Mazowieckich Zakładów Rafineryjnych i Petrochemicznych i został zakupiony na stacji benzynowej we Wrocławiu. Gęstość tego oleju wynosiła $0,807 \text{ g/cm}^3$. Analizy chromatograficzne wykonane w Instytucie Chemii i Technologii Nafty i Węgla Politechniki Wrocławskiej wykazały iż był on mieszaniną węglowodorów zawierających w cząsteczce od 6 do 24 atomów węgla, przy czym węglowodorów zawierających 16 atomów węgla było w nim najwięcej. Ponadto, na podstawie analiz składu frakcyjnego stwierdzono iż głównymi jego składnikami były węglowodory parafinowe i cykloparafinowe. Pozostałymi składnikami oleju były, stanowiące około 20%, związki aromatyczne o charakterystycznych spektrach sygnałów dla monoaromatów, alkiloaromatów, naftenoalkiloaromatów oraz pochodnych aromatycznych dwupierscieniowych i trójpierscieniowych (rysunek 21).

Pozostałe substancje ropopochodne stosowane do badań pochodziły: ropa naftowa z Rafinerii w Płocku, olej smarowy i silnikowy z Rafinerii Jedlicze.

3.2. Ścieki naturalne stosowane w hodowli osadu czynnego

Hodowlę drobnoustrojów wyprowadzono z surowych ścieków komunalnych pochodzących z przepompowni ścieków „Szczytniki” miasta Wrocławia. Drobnoustroje te stanowiły zaszczerp dodawany do ścieków syntetycznych w dalszej hodowli osadów czynnych.

3.3. Ścieki syntetyczne stosowane w badaniach nad biodegradacją oleju napędowego przez osad czynny

Hodowlę osadów czynnych prowadzono dozując do komór napowietrzania z osadem czynnym ścieki syntetyczne o następującym składzie: CH_3COONa $0,1 \text{ g/dm}^3$; KH_2PO_4 $0,075 \text{ g/dm}^3$; NaHCO_3 $0,05 \text{ g/dm}^3$; NH_4NO_3 $0,025 \text{ g/dm}^3$; MgSO_4 $0,005 \text{ g/dm}^3$; NaCl $0,005 \text{ g/dm}^3$ oraz 200 mg/dm^3 bulionu [86]. Badania nad biodegradacją oleju napędowego prowadzono na ściekach o tym samym składzie, lecz zamiast bulionu dodawano olej napędowy w różnych stężeniach.

3.4. Podłoża hodowlane stosowane w badaniach mikrobiologicznych

Izolacji pojedynczych szczepów drobnoustrojów dokonano przy pomocy następujących podłoży mikrobiologicznych: zagaryzowane podłoże mineralne Siskinej-Trocenka [87], agar odżywczy [88], podłoże Sabourauda [88]. Do wszystkich podłoży izolacyjnych dodawano olej napędowy w postaci filmu rozprowadzonego na powierzchni podłoża.

Oceny intensywności wzrostu poszczególnych szczepów drobnoustrojów dokonywano na zagaryzowanym podłożu mineralnym Siskinej-Trocenka z rozprowadzonym filmem na powierzchni podłoża ropy naftowej, oleju napędowego, oleju smarowego i oleju silnikowego.

Zdolność rozkładu oleju napędowego przez mikroorganizmy badano stosując płynne podłoże mineralne Siskinej-Trocenko z dodatkiem 1g /100 cm³, 5g /100 cm³ i 10g /100 cm³ oleju napędowego.

Badania diagnostyczne wyizolowanych drobnoustrojów prowadzono w oparciu o następujące podłoża: agar odżywczy, agar cytrynianowy Simmonsa, podłoże z fenyloalaniną, agar z octanem ołowiu, podłoże Kliglera, podłoże z mocznikiem wg. Stuarta, podłoże do badania rozkładu cukrów (woda peptonowa z dodatkiem cukrów), podłoże Clarka, podłoże Clarka z kreatyną, podłoże Selenko do wykazania redukcji TTC, podłoże żelatynowe Fraziera, podłoże z kazeiną, bulion tryptofanowy, bulion do próby na redukcję azotanów [89, 90].

3.5. Izolacja i identyfikacja mikroorganizmów zdolnych do rozkładu oleju napędowego.

Mikroorganizmy rozkładające składniki oleju napędowego wyizolowano z wody i gleby skażonej substancjami ropopochodnymi pochodzącej z okolic stacji benzynowych i Centrali Produktów Naftowych na terenie miasta Wrocławia. Do izolacji używano podłoży mikrobiologicznych opisanych w pkt. 3.4. W celu otrzymania czystych hodowli drobnoustrojów stosowano metodę posiewu izolacyjnego [89]. Wyizolowane w ten sposób szczepy mikroorganizmów wielokrotnie pasażowano w celu otrzymania kultur o utrwalonej genetycznie zdolności do utylizacji oleju napędowego.

Oceny przynależności rodzajowej wyizolowanych szczepów dokonano na podstawie cech morfologicznych, hodowlanych, fizjologicznych i biochemicznych przedstawionych w tabeli 1 [91].

Tabela 1. Badane cechy identyfikacyjne mikroorganizmów

Badana cecha	
morfologiczna i hodowlana	fizjologiczna i biochemiczna
Morfologia komórek: kształt, wielkość, ruchliwość, układ, barwienie metodą Grama, kwasooporność, obecność ziarnistości, przetrwalników i otoczek.	Stosunek do tlenu
Morfologia kolonii na podłożach stałych: wielkość, kształt, powierzchnia, brzeg, barwa, konsystencja, przejrzystość, wzniesienie, otoczenie i zapach kolonii.	Fermentacja węglowodanów (laktoza, glukoza, sacharoza, mannitol, maltoza, skrobia, dulcytol, rafinoza, ksyloza, inulina)
Wzrost na podłożach płynnych	Wytwarzanie indolu, wytwarzanie siarkowodoru, wytwarzanie acetoiny
Morfologia i wzrost na agarze skośnym	Redukcja azotanów
Wzrost na słupku agarowym	Wykorzystanie cytrynianu jako jedyne źródła węgla i energii
Wzrost w hodowli kłutej na żelatynie	Trawienie kazeiny i upłynnianie żelatyny
	Hydroliza mocznika
	Dezaminacja fenyloalaniny
	Zdolność produkowania enzymów katalazy i oksydazy

Następnie używając klucza Bergey'a (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) [92] określano rodzaje wyizolowanych drobnoustrojów.

3.6. Ocena intensywności wzrostu i zdolności rozkładu oleju napędowego przez szczepy drobnoustrojów wyizolowanych ze środowiska naturalnego

Badano zdolność wyizolowanych szczepów do wzrostu w obecności różnych frakcji ropy naftowej. W tym celu dokonywano posiewów rysą szczepów drobnoustrojów z uprzednio przygotowanych zawiesin na zagaryzowane podłoże mineralne Siskinej-Trocenka z dodatkiem oleju napędowego, ropy naftowej, oleju smarowego i oleju silnikowego. Płytki inkubowano przez 7 dni w temperaturze pokojowej. Po tym czasie porównywano intensywność wzrostu poszczególnych mikroorganizmów.

Natomiast ocenę zdolności drobnoustrojów do rozkładu oleju napędowego, prowadzono w trakcie 21-dniowej hodowli szczepów na płynnym podłożu mineralnym Siskinej-Trocenka z dodatkiem węglowodorów oleju napędowego, w ilości opisanej w pkt. 3.4. Hodowle prowadzono w sterylnych kolbach Erlenmajera. Całkowita objętość hodowli wynosiła 100 cm³. Do kolb wprowadzano 2 cm³ poszczególnych szczepów mikroorganizmów zawieszonych w podłożu mineralnym o absorbancji 0.2 mierzonej przy długości fali 650 nm. Kontrolę przebiegu procesu chemooksydacji (pozbawioną mikroorganizmów) węglowodorów prowadzono w trzech kolbach zawierających 100 cm³ tego samego podłoża z dodatkiem tego samego stężenia oleju napędowego. Wszystkie badania prowadzono w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem przez 21 dni.

W trakcie badań określano liczbę mikroorganizmów metodą liczenia kolonii bakterii na płytkach agarowych [89] oraz oznaczano po 21 dniach ubytek oleju napędowego metodą ekstraktu eterowego [93].

3.7. Określenie wzajemnego antagonistycznego oddziaływania pomiędzy mikroflorą osadu czynnego a wyizolowanymi drobnoustrojami

Analizowano wzajemne antagonistyczne oddziaływania pomiędzy poszczególnymi wyizolowanymi drobnoustrojami oraz pomiędzy nimi a mikroflorą osadu czynnego konwencjonalnego. Do badań zastosowano metodę krążkową na płytkach Petriego [94]. Wykonywano posiewy szczepów mikroorganizmów oraz osadu czynnego na stałe podłoża agarowe. Po 24 godzinach wycinano z tych podłoży krążki agarowe z dobrze rosnącymi hodowlami i umieszczano na świeżym posiewie badanego drobnoustroju testowego lub mikroflory osadowej. Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej. Po okresie inkubacji obserwowano występowanie lub brak stref zahamowania wzrostu wokół krążków.

3.8. Przygotowanie szczepionki złożonej z wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów

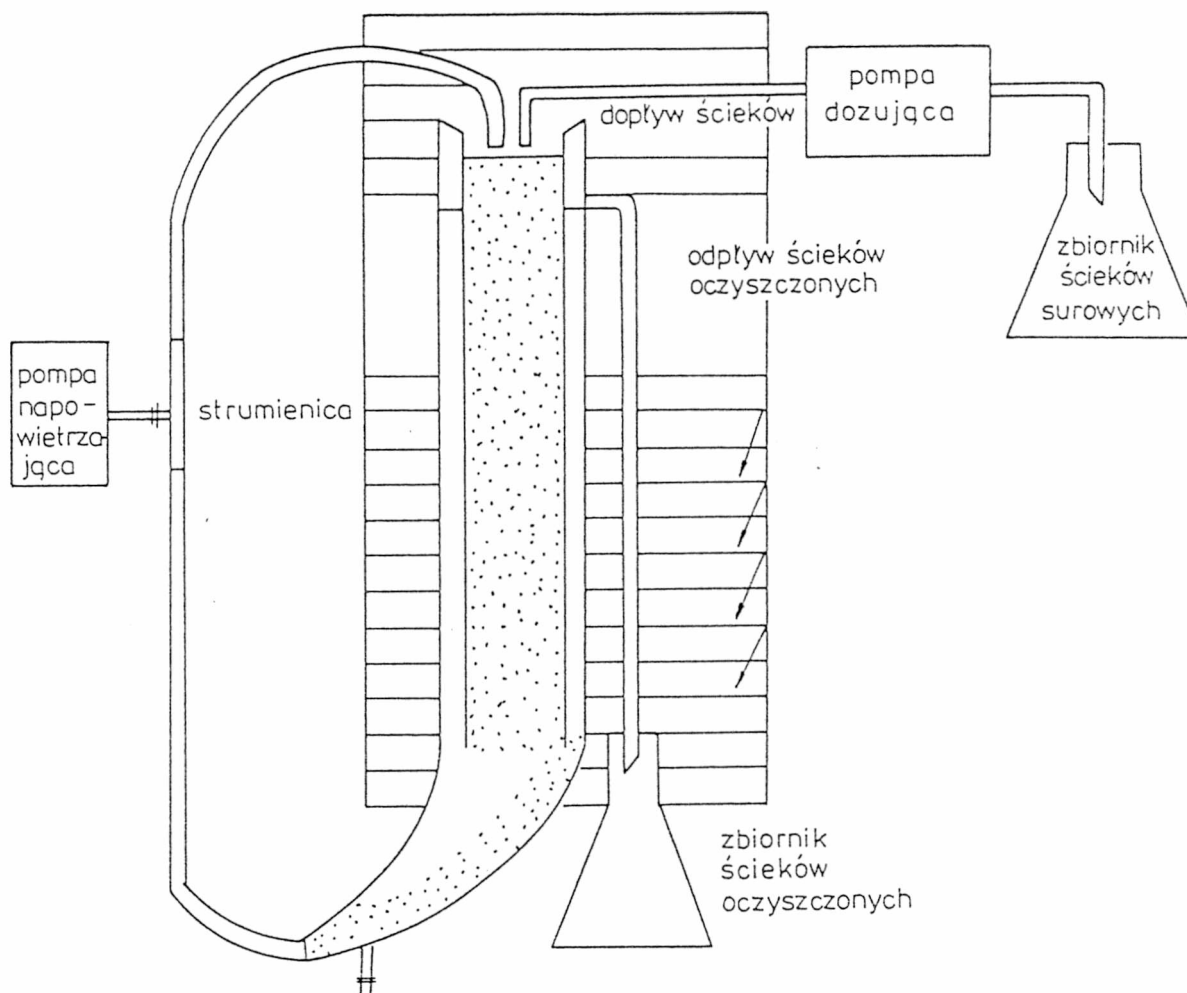
Do namnażania biomasy szczepionki stosowano agar odżywczy z rozproszonym wcześniej filmem oleju napędowego na powierzchni podłoża. Na to podłoże posiewano poszczególne szczepy mikroorganizmów metodą dywanową [89]. Po uzyskaniu obfitego wzrostu zmywano go z płytek Petriego ściekami syntetycznymi i uzyskaną zawiesinę przenoszono do osobnej zlewki. W trakcie tych czynności oznaczano zawartość suchej masy w biomasy drobnoustrojów wg. Hermanowicza. Po zebraniu odpowiedniej ilości zawiesiny pochodzącej ze wszystkich płytek, zawartość zlewki wirowano trzykrotnie przez 10 minut przy 5 tysiącach obrotów na minutę, za każdym razem zawieszając otrzymany osad w nowej

porcji ścieków syntetycznych. Ostatecznie zawieszano drobnoustroje w 100 cm³ ścieków i wprowadzano do komory z osadem czynnym doszczepianym.

3.9. Hodowla osadów czynnych oczyszczających ścieki z zawartością oleju napędowego

Osad czynny stosowany w badaniach nad biodegradacją związków ropopochodnych hodowano w układzie strumienicowym według Gomółki [95, 96] (rysunek 9).

Rysunek 9. Schemat modelu badawczego



W sumie prowadzono hodowlę trzech osadów: konwencjonalnego, wyhodowanego z aktywnych szczepów od podstaw i doszczepianego aktywnymi drobnoustrojami. Po wyhodowaniu odpowiedniej ilości osadów czynnych przystąpiono do właściwego eksperymentu polegającego na obserwacji procesu biodegradacji składników oleju napędowego metodą osadu czynnego. Ubytek oleju napędowego zachodzący na drodze biologicznej obliczano z uwzględnieniem próby kontrolnej prowadzonej bez udziału drobnoustrojów. Badania prowadzono w czterech seriach różniących się obciążeniem osadów czynnych ładunkiem zanieczyszczeń olejowych. Do komór napowietrzania dozowano ścieki syntetyczne zawierające:

- W pierwszej serii, początkowo w ilości 200 mg oleju napędowego/dm³, potem od 22 dnia badań do 42 dnia w ilości 400 mg oleju napędowego/dm³ (0,033-0,1 mg oleju napędowego /mg s.m. /d)

- W drugiej serii, początkowo w ilości 600 mg oleju napędowego/dm³, potem od 22 dnia badań w ilości 800 mg/dm³ a od 43 dnia do 62 dnia w ilości 1000 mg oleju/dm³ (0,092-0,492 mg oleju napędowego /mg s.m. /d)
- W trzeciej serii, początkowo w ilości 1500 mg oleju napędowego/dm³, potem od 22 dnia badań w ilości 2200 mg/dm³ a od 43 dnia do 62 dnia w ilości 3100 mg oleju/dm³ (0,260-8,158 mg oleju napędowego /mg s.m. /d)
- W czwartej serii badań, trwającej 47 dni, stężenie oleju napędowego dopływające do poszczególnych komór zmieniało się w granicach 50-3100 mg/dm³ (0,01-0,803 mg oleju napędowego /mg s.m. /d)

3.10. Badanie aktywności dysymilacyjnej mikroflory osadu czynnego i osadu czynnego doszczepionego w obecności różnych stężeń oleju napędowego, metodą manometryczną Warburga.

Aktywność metaboliczną badanych osadów czynnych określano metodą manometryczną Warburga [97]. W tym celu pobierano z komór napowietrzania osad czynny i wirowano go przez 10 minut przy 5 tysiącach obrotów na minutę. Następnie osad homogenizowano i trzykrotnie przemywano buforem fosforanowym o pH 7. Tak przygotowany osad zawieszano w ściekach syntetycznych. Następnie osad wprowadzano do naczynek reakcyjnych aparatu Warburga w ilości 30 cm³.

W pierwszej serii do naczynek wprowadzano osad czynny konwencjonalny. Do tak przygotowanego osadu dodawano olej napędowy w charakterze jedyne źródła węgla i energii w takich ilościach, aby jego stężenie w naczynkach wynosiło 200, 400, 600 i 800 mg / dm³. Druga seria różniła się od pierwszej jedynie obecnością w naczynkach manometrycznych osadu czynnego wzbogaconego o aktywne szczepy mikroorganizmów. Obserwacje aktywności oddechowej badanych osadów prowadzono w czasie 24 godzin w temperaturze pokojowej.

Aby określić wpływ oleju napędowego na funkcje fizjologiczne komórek mikroflory osadu czynnego, przygotowano zarówno w jednym jak i w drugim przypadku, próby kontrolne zawierające osad czynny z dodatkiem ścieków zawierających bulion, oraz próby na oddychanie endogenne składające się jedynie z drobnoustrojów osadu czynnego zawieszonych w ściekach syntetycznych.

3.11. Badanie biosorpcji oleju napędowego przez osad czynny

Biomasę osadów czynnych oddzielano od płynu pochodzącego metodą wirowania (5 tys. obrotów/ minutę przez okres 10 minut). Następnie osady trzykrotnie przemywano ściekami syntetycznymi pozbawionymi substancji organicznych. Tak przygotowane osady czynne używano do badań procesu biosorpcji oleju napędowego. Eksperyment ten prowadzono w kolbach Erlenmajera w trzech powtórzeniach. Do badań stosowano zawiesinę osadu czynnego w takich ilościach, aby po dodaniu jej do kolb Erlenmajera otrzymać stężenie 5,0 g s.m./dm³. W każdej kolbie znajdowało się 150 cm³ tak przygotowanego osadu do którego dodawano 0,5 cm³ oleju napędowego, co odpowiadało około 400 mg substancji węglowodorowych w nim zawartych. Następnie kolby umieszczano na wytrząsarce i po upływie: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,24, i 120 godzin, badano w poszczególnych próbach (w cieczy pochodzącej i w biomacie osadu) zawartość oleju napędowego metodą ekstraktu eterowego i metodą chromatografii cieczowej i gazowej. Określano także BZT₅ płynu pochodzącego.

3.12. Badania makro- i mikroskopowe osadu czynnego hodowanego na ściekach z zawartością oleju napędowego

Prowadzono obserwację makroskopową osadu czynnego [98] jak i również analizę jakościową na podstawie obserwacji mikroskopowych [99, 100, 101]. Obserwowano kształt kłacek osadu oraz określano pod względem jakościowym i ilościowym zespół mikroorganizmów osadu czynnego, które można oznaczyć na podstawie cech morfologicznych przy zastosowaniu mikroskopu optycznego. Obserwacje makroskopowe polegały na określaniu stopnia zmętnienia cieczy w komorach i zmiany ich barwy, oraz występowania piany.

3.13. Badania bakteriologiczne prowadzone w trakcie procesu biodegradacji oleju napędowego

Badania te polegały na określaniu :

1. Ogólnej liczby wolnopływających bakterii w ściekach oczyszczonych [89]
2. Oznaczaniu miana bakterii rozkładających olej napędowy w biomacie osadów czynnych na płynnym podłożu mineralnym Siskinej-Trocenka z dodatkiem 1g oleju napędowego /100 cm³ [87]

3.14. Badania biotoksykologiczne oleju napędowego, ścieków syntetycznych i oczyszczonych

W grupie badań biotoksykologicznych pozwalających określić toksyczny wpływ trucizn na organizmy wyższe istotną część stanowią testy letalne, tj. takie, w których kryterium szkodliwości związków chemicznych jest moment śmierci organizmu testowego oraz testy fizjologiczne, tj. takie w których ocenie podlegają zmiany świadczące o zakłóceniach funkcji fizjologicznych. W przeprowadzonych badaniach, do oceny toksycznego działania oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych, wykorzystano dwóch przedstawicieli producentów: rzęś wodną *Lemna minor*, glony z rodzaju *Chlorella* oraz przedstawicieli konsumentów: skorupiaka *Daphnia magna* i rybę *Lebistes reticulatus* a także reducentów, bakterie należące do gatunku *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Sphaerotillus natans* [102, 103].

Oprócz tego przeprowadzono badania genotoksykologiczne oleju napędowego i ścieków syntetycznych metodą testu Ames [104].

3.14.1. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na *Lemna minor* (rzęśa drobna)

Klon *Lemna minor* zastosowany w omawianych badaniach wyizolowany został ze stawu w Parku Szczytnickim we Wrocławiu. Test na rzęś (Lemna minor) przeprowadzono w oparciu o metodykę zawartą w opracowaniu IMGW [105]. Hodowlę tej rośliny prowadzono na specjalnym podłożu w temperaturze 20°C i oświetleniu jarzeniowym o natężeniu 3000 luxów z zachowaniem rytmu dobowego dnia i nocy. Hodowlę macierzystą prowadzono w kolbach stożkowych o poj. 500 cm³. Po namnożeniu hodowla stosowana była jako zaszczerp do przeprowadzonego eksperymentu.

Badania toksyczności oleju napędowego przeprowadzono w dwóch testach. W pierwszym zbadano szeroki zakres stężeń oleju napędowego. W drugim teście zawężono zakres stężeń i ustalono je zgodnie z postępowaniem geometrycznym. Początkowo wykonano eksperyment na następujących stężeniach związków wchodzących w skład oleju napędowego: 9, 18, 36, 72, 144, 288 i 576 mg/dm³ pożywki. Wyniki wstępne pierwszego testu pozwoliły na wyznaczenie w drugim następujących szeregów stężeń: 9; 10,8; 12,96; 15,6; 18,6 mg/dm³. Wykonano także badania toksyczności nierozcieńczonych ścieków syntetycznych i oczyszczonych.

Eksperyment przeprowadzono hodując rośliny w szklanych naczyniach o pojemności 200 cm³ do których wprowadzano 100 cm³ podłoża. Następnie podłoża szczepiono rzęsą przenosząc z macierzystej hodowli po pięć roślin zbudowanych z dwu-członowego pędu. Test przeprowadzono w trzech powtórzeniach w porównaniu do próby kontrolnej pozbawionej związku toksycznego. Próby hodowano w ciągu 14 dni. Po tym czasie kończono test określając:

- liczbę roślin
- biomasę roślin
- kondycję roślin (opis morfologiczny)
- zawartości chlorofilu a i b

3.14.2. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na glony *Chlorella sp.*

Ocena zawartości chlorofilu a w biomasie glonów stanowi szybką metodę określania toksyczności różnych substancji dodawanych do hodowli tych organizmów. Metoda ta oparta jest na obserwacji zanikania chlorofilu w organizmach testowych w stosunku do jego zawartości w hodowlach kontrolnych [106].

Hodowlę macierzystą glonów *Chlorella sp.* prowadzono na pożywce Uspeńskiego, w temp. 25°C. Testy na glonach wykonywano w naczyniach szklanych o pojemności 100 cm³. Do naczyń wprowadzono ścieki syntetyczne i ścieki oczyszczone w ilości 50 cm³. Oznaczenie toksycznego wpływu oleju napędowego na zawartość chlorofilu w komórkach glonów, prowadzono poprzez hodowlę glonów wraz z dodanym olejem w zakresie stężeń: 144, 288, 360, 432, 504, 576 i 648 mg/dm³ pożywki. Próby kontrolne prowadzono na pożywce Uspeńskiego. Przygotowano po trzy powtórzenia dla każdego badanego roztworu. Wszystkie próby zaszczerpiono homogeną zawiesiną 10-cio dniowej hodowli glonów. Naczynia umieszczono na wstrząsarce w temperaturze pokojowej. Hodowlę prowadzono przez 14 dni. Po tym czasie zawartość prób sączo przez sączki bibułowe, sączki z glonami umieszczano ponownie w szklanych naczyniach i zalewano 10 ml acetonu. Próby z acetonem wstrząsano przez 24 godziny a następnie sączo ich zawartość do kalibrowanej probówki. Następnie dokonano pomiaru absorpcji ekstraktu acetonowego na spektrofotometrze przy trzech długościach fali świetlnej: 665 nm, 645 nm i 630 nm. Otrzymane rezultaty przedstawiono jako procent zawartości chlorofilu w poszczególnych próbach, w odniesieniu do kontroli, obliczony ze wzoru:

$$X = 100 a / b$$

gdzie:

X- zawartość chlorofilu w badanej próbce

a- absorpcja światła w próbce badanej

b- absorpcja światła w próbce kontrolnej

3.14.3. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych na skorupiaki i ryby

Testy na skorupiakach i rybach prowadzono zgodnie z zaleceniami PN (PN-90/C-04610/03 [107], PN-90/C-04610/04) [108]. W testach toksyczności stosowano rozwielitkę *Daphnia sp.* i ryby z rodzaju *Lebistes reticulatus* (gupik) pochodzące z hodowli własnej. Organizmy te, reprezentujące w łańcuchu troficznym poziom konsumentów, znajdują najczęstsze zastosowanie w testach biotoksykologicznych. Doświadczenia na gupikach prowadzono w krystalizatorach o pojemności 500 cm³, umieszczając po 5 osobników w każdym naczyniu. Doświadczenia na rozwieltkach prowadzono na szalkach Petriego o pojemności 50 cm³, umieszczając na każdej z nich po 20 osobników. Dla oleju napędowego wykonano szereg złożony z 5 stężeń, przy zastosowaniu ilorazu postępu rozcieńczeń 2 (45, 90, 180, 360 i 720 mg oleju/dm³). Badania ścieków syntetycznych i oczyszczonych przeprowadzono na próbach nie rozcieńczonych. W badaniach korzystano z wody akwariowej. Wykonywano po trzy powtórzenia dla każdego stężenia. Doświadczenia prowadzono w temperaturze pokojowej a oceny toksycznego działania substancji dokonywano po 24, 48, 72 i 96 godzinach ekspozycji organizmów testowych na substancje badane. Do organizmów martwych zaliczano wszystkie te organizmy, które charakteryzował brak jakichkolwiek ruchów, mimo mieszania roztworu pręcikiem szklanym.

LC₅₀, w przypadku oleju napędowego, obliczano metodą Reeda czyli metodą kumulacji liczb zwierząt padłych i żywych. Metoda ta zakłada, że jeśli badane zwierzęta przeżyły ekspozycję na dane stężenie, to przeżyją również stężenie niższe i odwrotnie, jeśli padły w jakimś stężeniu badanej trucizny, to padną również przy stężeniach wyższych [89].

3.14.4. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego, ścieków syntetycznych i oczyszczonych na bakterie

Do badań użyto przedstawicieli czterech gatunków bakterii: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sphaerotillus natans* i *Bacillus subtilis*. Badaniom poddano olej napędowy, który wprowadzany był bezpośrednio do testu bądź po rozpuszczeniu 800 mg w wodzie, DMSO lub acetonie oraz ścieki syntetyczne i oczyszczone odpływające z poszczególnych komór. Badania przeprowadzono metodą krążkową na agarze odżywczym [89]. Odczyt polegał na obserwacji strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków bibułowych nasyconych badanymi próbkami. Wyniki badań podano jako średnicę zahamowania wzrostu bakterii.

3.14.5. Ocena genotoksycznego działania składników oleju napędowego oraz ścieków oczyszczonych metodą testu Ames

Oceny potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych składników ścieków syntetycznych i oczyszczonych oraz oleju napędowego dokonano na podstawie testu Amesa przeprowadzanego zgodnie z zaleceniami autora [104, 109]. Test Ames określa wpływ badanych związków na rewersję do prototrofii histydynozależnych mutantów *Salmonella typhimurium*. Do badań stosowano mutanty żywieniowe (his⁻) bakterii *Salmonella typhimurium* LT₂. Charakterystykę genetyczną szczepów TA98 i TA100 uzyskanych z Ames Laboratory Department of Biochemistry of California podano w tabeli 2. Przed przystąpieniem do testowania badanych próbek ścieków oczyszczonych sprawdzono markery genetyczne szczepów, stopień ich spontanicznej rewersji, określono także ich wrażliwość na mutageny.

Test wykonywano zgodnie ze schematem zamieszczonym na rysunku 10, wprowadzając na płytkę próbę ścieków uprzednio wyekstrahowanych zgodnie z punktem 3.17.1. i po odparowaniu rozpuszczalnika rozpuszczonych w 2 cm³ DMSO. Surowy olej napędowy wprowadzano do testu w ilościach: 0,00015; 0,0015; 0,015; 0,03; 0,06 cm³ na płytkę. Test wykonywano z dodatkiem i bez dodatku aktywatora metabolicznego, czyli frakcji S-9 otrzymywanej z homogenatu wątroby szczura aktywowanej Aroclorem 1254, stosowanej do przemiany promutagenów w mutageny.

Tabela 2. Charakterystyka genetyczna szczepów stosowanych w teście Ames.

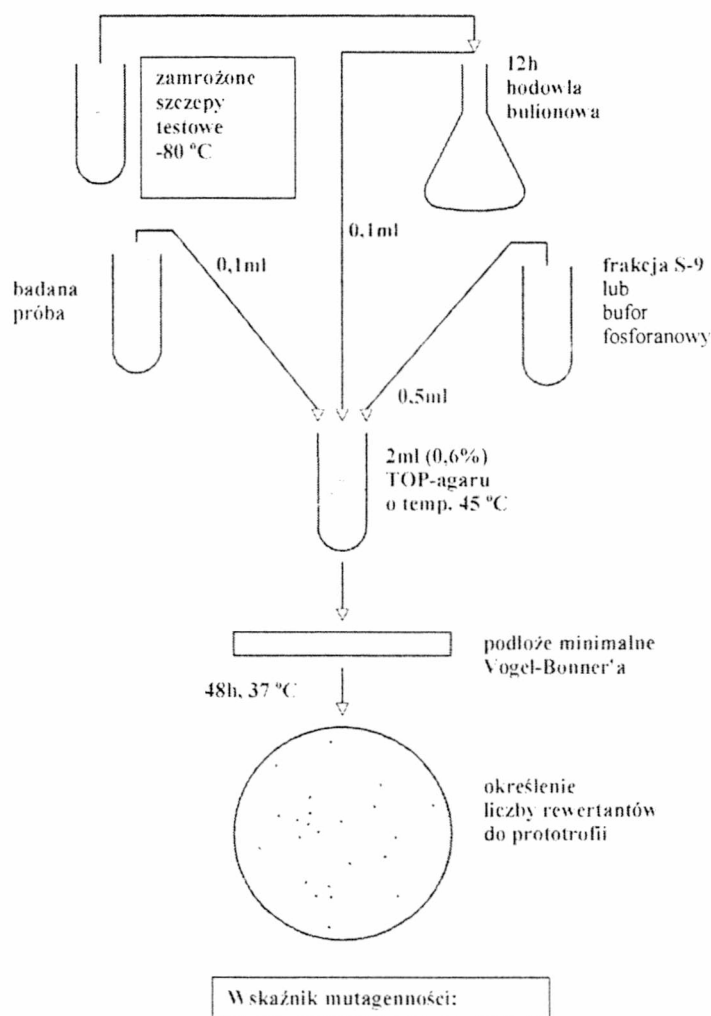
Nazwa gatunkowa		Źródło pochodzenia	Cechy charakterystyczne
Salmonella typhimurium TA 98		Ames Laboratory Department of Biochemistry of California USA	His, rfa, uvrB + R
Salmonella typhimurium TA 100			His, rfa, uvB + R

Nr szczepu		TA 98	TA 100
<u>Wymagania na</u> L-histydynie	Histydyna+biotyna	+++	+++
	Biotyna	---	---
Obecność rfa mutacji		+++ r =1 cm	+++ r = 1 cm
Obecność czynnika R		++	++
Obecność uvrB delecji		+	+
Średni stopień rewersji spontanicznej		26,9 +/- 0,8	165,6 +/- 2,4

Legenda:

- +++ dobry wzrost
- ++ wzrost w obecności ampicyliny
- + brak wzrostu po naświetlaniu promieniami UV
- brak wzrostu
- r promień strefy zahamowania wzrostu

Rysunek 10. Schemat wykonania testu Amesa



$$MR = \frac{\text{liczba rewertantów indukowanych}}{\text{liczba rewertantów spontanicznych}}$$

3.15. Badania biotechnologiczne

3.15.1. Oznaczanie suchej masy osadu czynnego

W celu oznaczenia suchej masy osadu pobierano 10 cm³ zawartości komory napowietrzania i suszono w tyglu kwarcowym w temperaturze 105 °C aż do uzyskania stałej wagi. Następnie oziębiano tygla w eksykatorze i ważono. Odejmując wagę tygla od otrzymanego wyniku otrzymywano wagę suchej masy osadu czynnego. Wyniki podawano w cm³/g [110].

3.15.2. Oznaczanie objętości osadu

Do leja Imhoffa wlewano 1 dm³ zawartości komory napowietrzania i po 30-minutowej sedymentacji określano objętość osadu czynnego. Wyniki podawano w cm³/dm³ [110].

3.15.3. Oznaczanie indeksu objętościowego

Korzystając z wyników objętości osadu czynnego i jego suchej masy obliczano indeks osadu wg. wzoru [110]:

$$I = \frac{\text{objętość osadu w } 1 \text{ dm}^3}{\text{ilość suchej pozostałości osadu w g / dm}^3} \quad [\text{cm}^3 / \text{g}]$$

3.15.4. Określanie biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT₅)

Tlen zawarty w próbach, ściekach odpływających z komór badawczych oraz w ściekach surowych, oznaczano metodą Winklera. Ilość tlenu potrzebną na biologiczne rozłożenie związków organicznych określano stosując metodę rozcieńczeń [110]. Stosowano 200-krotne rozcieńczenie ścieków surowych i oczyszczonych w wodzie do rozcieńczeń. Wartość biochemicznego zapotrzebowania tlenu wyliczano ze wzoru:

$$\text{BZT}_5 = [(a - b) - (c - d) \times M / 1000] \times 1000 / m \quad [\text{mg} / \text{dm}^3]$$

a - zawartość tlenu w rozcieńczonej próbce badanych ścieków przed inkubacją [mg/dm³]

b - zawartość tlenu w rozcieńczonej próbce badanych ścieków po inkubacji [mg/dm³]

c - zawartość tlenu w wodzie do rozcieńczeń przed inkubacją [mg/dm³]

d - zawartość tlenu w wodzie do rozcieńczeń po inkubacji [mg/dm³]

M - objętość wody do rozcieńczeń w 1 dm³ rozcieńczonych ścieków [cm³]

m - objętość badanych ścieków w 1 dm³ rozcieńczenia [cm³]

3.15.5. Określanie obciążenia osadu czynnego.

Obciążenie osadu czynnego określano przeliczając dobowy ładunek BZT₅ ścieków zasilających komorę napowietrzania na 1 mg suchej masy osadu czynnego oraz przeliczając dobowy ładunek oleju napędowego w mg wpływający do komory na 1 mg suchej masy osadu czynnego.

3.15.6. Określanie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT)

ChZT oznaczano metodą dwuchromianową [110]. Utlenianie prowadzono w mineralizatorze typu H-9 wprowadzając do próbki mineralizatora 10 cm³ próby badanej, 15 cm³ H₂SO₄ stężonego zmieszanego z AgSO₄ i 10 cm³ 0.25N K₂Cr₂O₇. Probówkę zamykano chłodnicą zwrotną z szlifem łączącym oba elementy. Próbę grzano w temperaturze wrzenia mieszaniny w ciągu 2 godzin. Po ostudzeniu mieszaniny przemywano chłodnicę i przenoszono zawartość próbki do erlenmajerki. Następnie miareczkowano ją 0,25 N siarczanem żelazowo-amonowym wobec ferroiny. Równocześnie mineralizowano próbę kontrolną w której zamiast badanych ścieków była woda. Wartość ChZT obliczano ze wzoru:

$$\text{ChZT} = (a - b) \times n \times 800 / V \quad [\text{mg} / \text{dm}^3]$$

a - ilość mianowanego roztworu siarczanu żelazowo-amonowego zużytego do miareczkowania próby kontrolnej [cm³]

b - ilość mianowanego roztworu siarczanu żelazowo-amonowego zużytego do zmiareczkowania próby badanej [cm^3]

n - normalność roztworu siarczanu żelazowo-amonowego

V - objętość próbki badanej użytej do oznaczenia [cm^3]

3.15.7. Oznaczanie ogólnego węgla organicznego (OWO)

Oznaczenie ogólnego węgla organicznego pozwala na pełne określenie zawartości wszystkich związków organicznych występujących w ściekach surowych i oczyszczonych [110].

Ogólny węgiel organiczny oznaczano na analizatorze węgla organicznego firmy Shimadzu-TOC 500, metodą spalania w atmosferze tlenu w temperaturze 680°C w obecności katalizatora platynowego. Przed oznaczeniem z próby usunięto CO_2 przez przedmuchiwanie azotem w środowisku kwaśnym.

3.16. Badania biochemiczne

Badania biochemiczne obejmowały oznaczenia aktywności enzymatycznej osadu czynnego. Oznaczano aktywność esterazową i dehydrogenazową osadu czynnego. Aktywność enzymatyczną osadu przeliczano na 1 mg suchej masy zagęszczonego osadu czynnego i na 1 mg białka rozpuszczalnego w 1 N NaOH. Do badań pobierano każdorazowo 20 cm^3 osadu czynnego z komory napowietrzania. Następnie osad homogenizowano w homogenizatorze mechanicznym w temperaturze 10°C w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Tak przygotowany osad czynny stanowił materiał do oznaczania aktywności enzymatycznej. Wszystkie pomiary ekstynkcji dokonywano przy pomocy spektrofotometru UV-VIS 1202 firmy Shimadzu.

3.16.1. Określanie aktywności esterazowej

Ze względu na to, iż w procesie biodegradacji węglowodorów zawartych w oleju napędowym powstaje dużo utlenionych produktów rozkładu, istnieje możliwość powstawania estrów a tym samym zwiększenia aktywności esterazowej biomasy osadu czynnego.

Aktywność esterazową oznaczano wg. metody Jørgensena, Eriksena i Jensena [111]. W metodzie tej zastosowano związek o nazwie FDA (3',6'-diacetylofluoresceina), który pod wpływem esteraz jest hydrolizowany z wydzielaniem fluoresceiny. Ilość wydzielonej fluoresceiny można odczytać spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm.

2.5 cm^3 zagęszczonego i zhomogenizowanego osadu zawieszano w 2.5 cm^3 60 mM roztworu Na_2HPO_4 o pH 7,6. Następnie pobierano 4.5 cm^3 uprzednio przygotowanej zawiesiny osadu i dodawano do niej 0.1 cm^3 EDTA, 25 μl FDA oraz 0.4 cm^3 czynnika inhibującego białko zawierającego cykloheksimid, chloroamfenikol i tetracyklinę. Reakcję prowadzono przez 45 minut z wytrząsaniem. Po tym czasie do próby dodawano 3 cm^3 acetonu i wirowano przez 5 minut przy 12 tys. obr./min. Ekstynkcję frakcji acetonowej odczytywano przy długości fali 490 nm wobec acetonu i znajdowano ilość powstałej fluoresceiny z krzywej standardowej.

3.16.2. Określanie aktywności dehydrogenazowej

Oznaczenie aktywności dehydrogenaz w biomasy osadu czynnego pozwala w sposób szybki i prosty określić aktualny stan fizjologiczny osadu, ponieważ aktywność enzymów oddechowych najszybciej reaguje na zmiany obciążenia mikroflory osadowej.

Aktywność enzymatyczną osadu czynnego oznacza się za pomocą tzw. testu TTC. TTC (chlorek trójfenylotetrazolinowy) jest związkami bezbarwnym. Pełni rolę sztucznego akceptora wodoru, redukując się pod jego wpływem do czerwonego TF (trójfenyloformazanu).

Aktywność dehydrogenazową oznaczano wg zmodyfikowanej metody TTC Klapwijk Drenta i Steenvoordena [112]. Mieszanina reakcyjna zawierała 3 cm³ osadu czynnego, 1 cm³ roztworu zawierającego 92 g/dm³ mleczanu sodu, 1 cm³ TTC (4 g/dm³), 0,5 cm³ chlorku kobaltowego (0,557 g/dm³), 0,5 cm³ siarczynu sodowego (3,6 g/dm³) oraz 2,5 cm³ 0,05 M buforu Tris-HCL o pH 8,4. Reakcję prowadzono w ciemności w temperaturze 37 °C przez 35 minut. Po tym czasie odrzucano płyn z nad osadu i dodawano kroplę absolutnego alkoholu etylowego w celu przerwania reakcji. Następnie pobierano po 2 cm³ osadu i dodawano 2,5 cm³ 96 % alkoholu etylowego i umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 90 °C na czas 6 minut, dla wyekstrahowania z komórek zredukowanego TF. Po tym czasie korygowano objętość etanolu i zawartość próby wirowano przez 5 minut przy 6 tys. obr./min. Ekstynkcję frakcji etanolowej odczytywano przy długości fali 480 nm wobec etanolu i znajdowano ilość powstałego TF z krzywej standardowej.

3.16.3. Oznaczanie ilości białka w biomacie osadu czynnego

Zawartość białka rozpuszczalnego w 1N NaOH oznaczano wg metody Lowry'ego. Do 1 cm³ osadu dodawano 1 cm³ gorącego, 6% roztworu kwasu tróchlorooctowego (TCA). Próbę ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej przez minutę. Następnie wirowano przez 5 minut przy 10 tys. obr./min., odrzucano płyn z nad osadu i dodawano 2 cm³ 1N NaOH. Próbę ogrzewano przez 10 minut na wrzącej łaźni wodnej i ponownie wirowano. W płynie nadosadowym oznaczano białko metodą Lowry'ego [113].

Do próbówki odmierzano 1 ml płynu nadosadowego i dodawano 5ml odczynnika miedziowego. Po zamieszaniu pozostawiano na 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 0,5 ml odczynnika Folina i Ciocalteu. Zawartość próbówki szybko mieszano. Po 30 minutach odczytywano ekstynkcję przy długości fali 750 nm wobec próby kontrolnej (blank), która była próbą przygotowaną identycznie jak próba badana, nie zawierająca jednak białka. Zawartość białka odczytywano z krzywej wzorcowej.

3.17. Badania chemiczno-analityczne

3.17.1. Oznaczenie ubytku składników oleju napędowego metodą ekstraktu eterowego

W celu oznaczenia ubytku oleju napędowego, w badaniach nad biodegradacją, odmierzano 1 dm³ ścieków syntetycznych i oczyszczonych do kolby stożkowej i dodawano do niej 20 cm³ eteru naftowego. Kolbę umieszczano na wytrząsarce i wytrząsano przez okres 30 minut. Następnie zawartość kolby przenoszono do rozdzielacza i zbierano frakcję eterową. Pozostałą frakcję wodną ponownie ekstrahowano 10 cm³ eteru naftowego. Po odwodnieniu bezwodnym siarczanem sodu, ekstrakty eterowe sączono przez suche sączki bibułowe do naczynek wagowych uprzednio wysuszonych i zważonych do stałej wagi. Sączki przemywano kilkakrotnie małymi porcjami eteru naftowego. Następnie eter odpędzano na łaźni wodnej, ogrzewanej do temperatury około 60 °C. Naczynka wagowe oziębiane w eksykatorze nad chlorkiem wapniowym w ciągu 1 godziny i ważono [110].

3.17.2. Analiza zawartości składników oleju napędowego przy pomocy chromatografii gazowej i cieczonej

a) oznaczenia węglowodorów przy pomocy chromatografii gazowej.

Oznaczenia sumy stężeń węglowodorów w ekstraktach wykonano metodą CG (chromatografii gazowej) zgodnie z PN-94/C-04643 [114] obowiązująca od 30 grudnia 1994r oraz normą PN-89 / C-04577 [115] zalecaną do oznaczeń lekkich węglowodorów aromatycznych przy użyciu chromatografii gazowej.

Zgodnie z normą (PN-89 / C-04577), 0,5 dm³ ścieków ekstrahowano n-heptanem przy użyciu kolby stosowanej do mikroekstrakcji. Ekstrakty, z pominięciem etapu zatężania, wprowadzano bezpośrednio do dozownika chromatografu gazowego. Analizy metodą chromatografii gazowej wykonywano na chromatografie N-504 z detektorem FID, z wykorzystaniem 50 m kolumny kapilarnej typu SPB-5 (z fazą SE 54), o średnicy 0,25 mm stosując programowany narost temperatury 8 deg/ min od 30 do 300 °C. Jako podstawę do obliczeń ilościowych przyjęto zmiany intensywności sygnałów względem wzorcowej frakcji oleju napędowego użytego w doswiadczeniach. Wykrywalność pojedynczego węglowodoru wynosiła 2 µg/dm³ , a sumy węglowodorów 25 µg/dm³

b) oznaczenia węglowodorów aromatycznych przy pomocy chromatografii cieczonej.

Równolegle, te same próbki ekstraktów przygotowanych do analiz metodą chromatografii gazowej, analizowano przy użyciu chromatografii cieczonej stosując chromatograf cieczowy (typ LMIM prod. węgierskiej) z kolumną wypełnioną silikazalem typu 15 µsil, o średnicy 4 mm, dł. 25 cm, z detektorem UV (245 nm), pracującą w warunkach izokratycznych z n-heptanem jako eluentem (2 cm³ / min.). Analiza przy pomocy chromatografu cieczonego pozwalała na oznaczenie grup węglowodorów aromatycznych (takich jak monoaromaty, alkiloaromaty i naftenoaromaty) znajdujących się w ekstraktach. Za podstawę do oznaczeń jakościowych i ilościowych przyjęto sygnały (piki) uzyskane od mieszanek wzorcowych sporządzonych w oparciu o użytą w badaniach frakcję oleju napędowego.

W części badań w celu zwiększenia rozdzielczości i możliwości identyfikacji pojedynczych węglowodorów aromatycznych zawartych w ekstraktach, zastosowano zmienione warunki analizy. Zastosowano kolumnę typu ODS firmy KNAUER o średnicy 3mm i długości 20 cm. Analizy wykonywano również w warunkach izokratycznych przy użyciu chromatografu typ LMIM z detektorem UV (254 nm), stosując jako eluent mieszaninę metanol-woda w stosunku 85:15, z szybkością 1 cm³/min . Identyfikację poszczególnych węglowodorów dokonano na podstawie wzorcowych węglowodorów aromatycznych oraz w odniesieniu do wzorcowego oleju napędowego. Z uwagi na brak znacznej ilości wzorców, oprócz lekkich monoaromatów takich jak ; benzen , toluen , etylobenzen i ksyleny, analiza chromatografią cieczową nie pozwalała na ilościowe oznaczenie niezidentyfikowanych węglowodorów. Niemniej, biorąc pod uwagę sygnały (chromatogram) wzorcowego oleju napędowego i chromatogramy ekstraktów, zauważalne były znaczące zmiany intensywności szeregu sygnałów o określonych czasach retencji, co stanowiło podstawę do oceny jakościowych zmian.

W celu oceny stopnia chemooksydacji oleju napędowego analizy chromatograficzne wykonano także dla ekstraktów z komory napowietrzania zawierającej jedynie wodny roztwór oleju napędowego w stężeniu stosowanym w innych komorach.

3.18. Analiza statystyczna wyników

Analiza statystyczna została oparta o wyniki stopnia usuwania zanieczyszczeń w %, przez badane osady czynne, uzyskane na podstawie analiz BZT₅, ChZT, ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i OWO.

Dla danych uzyskanych we wszystkich seriach badań określono wartość średnią, odchylenie standardowe, wariancję oraz wyznaczono dystrybuantę empiryczną i jej liniową aproksymację. W celu zbadania istotności statystycznej różnic między wartościami procentowego usunięcia badanych zanieczyszczeń przez osad konwencjonalny, wyhodowany z aktywnych szczepów i doszczepiany zastosowano test Studenta [116, 117, 118].

Obliczenia zostały wykonane za pomocą programu komputerowego ORIGIN 4.2. na komputerze PC z procesorem Pentium 2.

CZĘŚĆ WYNIKOWA

4.0. Wyniki badań

Proces biodegradacji składników oleju napędowego, znajdującego się w ściekach, wymagał wyhodowania osadu czynnego, który byłby enzymatycznie przygotowany do wykorzystywania różnego rodzaju węglowodorów jako źródeł węgla i energii.

Problem ten postanowiono rozwiązać poprzez wzbogacenie mikroflory osadu czynnego wysoko aktywnymi szczepami drobnoustrojów, które izolowano ze środowiska wodnego i glebowego skażonego substancjami ropopochodnymi. Określono przynależność taksonomiczną wyizolowanych szczepów oraz ich zdolności rozkładu składników substancji ropopochodnych, a w szczególności oleju napędowego. Następnie spośród wszystkich wyizolowanych szczepów wybrano te, które miały szansę stać się trwałym elementem biocenozy osadu czynnego. Pozyskany w ten sposób materiał mikrobiologiczny służył w dalszych eksperymentach nad procesem biodegradacji oleju napędowego.

Z wyselekcjonowanych szczepów skonstruowano szczepionkę bakteriologiczną zasilającą osad konwencjonalny oraz podjęto próbę, zakończoną sukcesem, wyhodowania osadu czynnego wyłącznie z czystych aktywnych szczepów. Pracę tak utworzonych osadów czynnych, oczyszczających ścieki zaolejone, porównywano do pracy osadu czynnego-konwencjonalnego. Proces biodegradacji składników oleju napędowego śledzono powszechnie przyjętymi metodami technologicznymi, chemicznymi, biologicznymi i biochemicznymi.

W grupie badań biochemicznych, obok określania popularnej aktywności dehydrogenazowej, próbowano również zastosować inną aktywność jako wskaźnik pracy osadu, a mianowicie aktywność esterazową. Podyktowane to było tym, iż w procesie biodegradacji węglowodorów powstaje dużo utlenionych produktów rozkładu, istniała więc możliwość powstawania estrów, a tym samym możliwość zmian wartości tej aktywności enzymatycznej w biomasach badanych osadów czynnych.

W trakcie procesu oczyszczania wykonywano także szereg badań bakteriologicznych polegających na wykrywaniu obecności pewnych, wybranych bakterii zarówno w osadzie czynnym jak i w ściekach oczyszczonych. Badano ogólną liczbę wolnopływających bakterii w ściekach oczyszczonych. Podwyższona liczba tych bakterii jest dobrym wskaźnikiem pogarszających się warunków oczyszczania ścieków oraz mogłaby sygnalizować wypływanie szczepionki bakteriologicznej z komory w której znajdował się osad doszczepiany. Natomiast w celu porównania zdolności biodegradacyjnych badanych osadów oznaczano poziom bakterii rozkładających olej napędowy.

Podjęto także próbę wyjaśnienia zagadnienia dotyczącego biosorpcji oleju napędowego na powierzchni osadu czynnego doszczepionego aktywnymi mikroorganizmami w porównaniu do osadu czynnego konwencjonalnego z uwagi na duże znaczenie procesu biosorpcji jako fazy wstępnej warunkującej biodegradację substratów i rzeczywiste ich usunięcie.

Równocześnie z prowadzonymi badaniami oczyszczania ścieków zaolejonych metodą osadu czynnego prowadzono testy bioindykacyjne umożliwiające śledzenie zmian toksyczności i genotoksyczności w odpływie ścieków. Wiadomo bowiem, iż podczas biodegradacji węglowodorów wchodzących w skład oleju napędowego mogą powstać szkodliwe, bliżej nieznane metabolity, które mogą być tak samo lub nawet silniej toksyczne bądź genotoksyczne od związków wyjściowych. W trakcie procesu oczyszczania mogą także pozostać i oddziaływać szkodliwie pewne niezbiodegradowane węglowodory.

I. BADANIA MIKROBIOLOGICZNE

4.1. Izolacja i określenie przynależności taksonomicznej aktywnych szczepów mikroorganizmów

Mikroorganizmy rozkładające składniki oleju napędowego wyizolowano z wody i gleby skażonej substancjami ropopochodnymi pochodzącej z okolic stacji benzynowych i Centrali Produktów Naftowych na terenie miasta Wrocławia. Odważano 10 g gleby i umieszczano w mineralnym podłożu Siskinej-Trocenko a następnie wytrząsano przez około pół godziny. Po tym czasie dekantowano osad i zbierano płyn nadosadowy. Ciecz nadosadową zawierającą mikroorganizmy glebowe i pobrane próby wody wzbogacono w azot i fosfor ($C:N:P = 10:1:0,1$), ustalono odczyn pH na poziomie 6,8-7,2 i całość inkubowano 7 dni w temperaturze 18 °C. Pozwoliło to na namnożenie jedynie tych drobnoustrojów, które zdolne były do biodegradacji węglowodorów obecnych w badanych próbach gleby i wody.

Izolacji pojedynczych szczepów mikroorganizmów dokonano na następujących podłożach izolacyjnych wzbogaconych olejem napędowym rozproszonym na powierzchni podłoż w postaci filmu.:

- zagaryzowanym podłożu mineralnym Siskinej-Trocenko, które służyło do izolacji mikroorganizmów prototroficznych zdolnych do wykorzystywania oleju w charakterze jedyne go źródła węgla i energii,
- agarze odżywczym służącym do izolacji jak największej ilości bakterii saprofitycznych zdolnych do wykorzystywania oleju w obecności innych substratów organicznych,
- podłożu Sabourauda stosowanym do izolacji szczepów drożdży.

Ogółem z gleby i wody zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi wyizolowano 67 szczepów drobnoustrojów zdolnych do rozkładu oleju napędowego. Wyizolowane w ten sposób szczepy mikroorganizmów wielokrotnie pasażowano w celu otrzymania kultur o utrwalonej genetycznie zdolności do utylizacji oleju napędowego. Po dokonaniu wielokrotnych pasażów okazało się, że tylko 33 szczepy posiadają genetycznie utrwaloną zdolność do biodegradacji węglowodorów. Szczepy te poddano dalszym badaniom morfologicznym, fizjologicznym i biochemicznym w celu określenia ich przynależności taksonomicznej. Na podstawie tych badań, korzystając z klucza Bergey'a szczepy zaliczono do następujących rodzajów (tabela 3): *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Candida* i *Rhodotorula*.

Tabela 3. Przynależność rodzajowa badanych szczepów.

Szczepy Gram dodatnie		Szczepy Gram ujemne	
Numer szczepu	Rodzaj	Numer szczepu	Rodzaj
25 26 36 37 47 57	Corynebacterium	13 21 56	Pseudomonas
2 12 17 24 51	Bacillus	59 60	Alcaligenes
18 22 33 46	Candida		
4 8 42 50	Rhodotorula		
7 30 44 45 54 55	Micrococcus		
1	Actinomyces		
29 43	Nocardia		

4.2. Określenie możliwości wzrostu i zdolności rozkładu oleju napędowego przez wyizolowane szczepy mikroorganizmów

Większość z 33 oznaczonych szczepów rosła dobrze na stałych podłożach mineralnych z rozproszonym filmem ropy naftowej, oleju napędowego, oleju smarowego i oleju silnikowego na powierzchni podłoża, w charakterze jedyne go źródła węgla i energii. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 4. Najlepszą zdolność do wzrostu na tych podłożach wykazały następujące szczepy: *Corynebacterium* 25, 26; *Bacillus* 2, 12, 24; *Candida* 18, 22, 33; *Micrococcus* 7, 30; *Nocardia* 29, 43; *Pseudomonas* 56 i *Rhodotorula* 8, 42. Małą zdolnością do wzrostu na tych podłożach odznaczały się szczepy: *Corynebacterium* 57; *Bacillus* 51; *Micrococcus* 55; *Actinomyces* 1; *Alcaligenes* 59, 60 i *Rhodotorula* 50.

W warunkach hodowli wstrząsanej, na podłożu płynnym mineralnym z dodatkiem oleju napędowego w ilości 1g/100cm³, 5g/100cm³ i 10g/100cm³, badane szczepy charakteryzowały się dobrym zużyciem substratu węglowodorowego. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 5. We wszystkich hodowlach obserwowano wyraźny spadek stężenia oleju napędowego zależny od stężenia substancji węglowodorowych w hodowlach po 21 dniach trwania eksperymentu. W przypadku gdy stężenie substratu w hodowli wynosiło 1g / 100cm³ ubytek węglowodorów wahał się w granicach 25%-91%, przy stężeniu oleju napędowego 5g / 100cm³ od 29% do 96,8%, natomiast gdy stężenie oleju w hodowli wynosiło 10g / 100cm³ ubytek ten wahał się w granicach od 15,3% do 64,1%. Jedynie szczep *Corynebacterium* 57 odznaczał się wyraźnie najmniejszą zdolnością do rozkładu substancji węglowodorowych zawartych w oleju napędowym. W tym przypadku zaobserwowano bowiem najmniejszy procentowy ubytek oleju, który wynosił w zależności od wyjściowego stężenia substratu odpowiednio: 15,7%, 21% i 2,2%. Jednocześnie zaobserwowano największy procentowy ubytek oleju napędowego w hodowlach poszczególnych szczepów wówczas gdy początkowe stężenie substratu wynosiło 5g / 100cm³. Najmniejszy zaś ubytek tam gdzie wynosiło ono 10g / 100cm³.

Równocześnie określano zdolność do rozmnażania się szczepów na płynnym podłożu mineralnym z dodatkiem 1g / 100cm³, 5g / 100cm³ i 10g / 100cm³ oleju napędowego w ciągu 21 dni. Wyniki tych badań, w postaci logarytmu liczby bakterii w 1 ml hodowli, przedstawiono w tabelach 6, 7 i 8. Z wyników tych wybrano trzy przykłady szczepów rozmnażających się bardzo dobrze, dobrze i źle w celu zilustrowania ich graficznie (rysunki 11, 12 i 13). Dla prawie żadnej z badanych kultur nie zaobserwowano negatywnego wpływu oleju napędowego na ich liczebność. Przebieg rozwoju populacji drobnoustrojów był typowy dla hodowli statycznej. Dla większości mikroorganizmów ilość komórek wzrastała gwałtownie do około 10-12 dnia badań po czym spadała. Największy spadek liczby bakterii, po tym czasie, obserwowano w hodowlach zawierających 1g / 100 cm³ oleju napędowego i charakteryzujących się bardzo dobrym procentowym ubytkiem substratu węglowodorowego. W hodowlach do których dodano 5g / 100cm³ oleju faza równowagi i zamierania trwała znacznie dłużej, ze względu na powolniejsze wyczerpywanie się substratu z podłoża. W przypadku hodowli zawierających 10g / 100 cm³ oleju napędowego zauważono podobny przebieg rozmnażania się komórek mikroorganizmów, lecz przy znacznie obniżonej ich ilości oraz przy wydłużonej fazie logarytmicznego wzrostu i równowagi (rys.11 i 12). W przypadku szczepu *Corynebacterium* 57, charakteryzującego się najmniejszą zdolnością do rozkładu węglowodorowego substratu, zauważono bardzo wolny wzrost populacji bakteryjnej w obecności największego stężenia oleju w hodowli (rys. 13).

Tabela 4. Ocena wzrostu wyizolowanych szczepów na podłożu mineralnym Siskinej- Trocenko z dodatkiem ropy naftowej i jej produktów.

Numer Szczepu	Rodzaj	Ropa Naftowa	Olej napędowy	Olej smarowy	Olej Silnikowy
25 26 36 37 47 57	Corynebacterium	+++ +++ ++ ++ ++ +	+++ +++ ++ ++ ++ +	++ ++ ++ ++ + +	++ ++ + + + +
2 12 17 24 51	Bacillus	+++ ++ ++ ++ +	++ +++ ++ +++ +	++ ++ ++ ++ +	++ ++ + +++ +
18 22 33 46	Candida	+++ +++ +++ ++	+++ +++ +++ ++	+++ +++ +++ ++	+++ +++ +++ ++
7 30 44 45 54 55	Micrococcus	+++ +++ + + + +	+++ +++ + + ++ +	++ ++ + + + +	++ ++ + + ++ +
29 43	Nocardia	++ ++	+++ +++	++ ++	++ ++
1	Actinomyces	+	+	+	+
13 21 56	Pseudomonas	++ ++ +++	+ ++ +++	+ ++ ++	+ ++ ++
59 60	Alcaligenes	+ +	+ +	+ +	+ +
4 8 42 50	Rhodotorula	++ ++ ++ +	++ +++ +++ +	++ ++ ++ +	++ ++ ++ +

+++ intensywny wzrost , ++ średni wzrost , + słaby wzrost

Tabela 5. Ubytek oleju napędowego w 21 dniowych hodowlach poszczególnych szczepów drobnoustrojów.

Numer Szczepu	Rodzaj	% ubytek oleju napędowego po 21 dniowej hodowli poszczególnych drobnoustrojów z następującymi stężeniami oleju :		
		1 g/100 cm ³	5 g/100 cm ³	10 g/100 cm ³
25	Corynebacterium	85,3	92,0	64,1
26		82,5	95,1	51,5
36		67,1	73,4	48,3
37		72,0	78,8	33,4
47		69,6	76,0	41,0
57		15,7	21,0	2,2
2	Bacillus	71,0	78,0	42,5
12		86,0	94,2	34,1
17		74,1	81,0	35,0
24		88,3	96,0	40,1
51		25,0	29,0	15,4
18	Candida	86,8	88,2	62,0
22		82,8	96,8	58,2
33		91,0	92,0	45,3
46		76,8	80,2	51,0
7	Micrococcus	84,5	86,5	34,2
30		82,0	90,1	41,7
44		61,3	65,0	21,9
45		60,0	64,3	29,0
54		76,8	86,0	35,8
55		63,0	67,3	25,3
29	Nocardia	84,5	85,0	39,4
43		87,0	86,1	35,3
1	Actinomyces	43,2	43,7	19,2
13	Pseudomonas	56,0	66,0	45,0
21		72,1	85,1	54,0
56		88,3	90,0	62,1
59	Alcaligenes	41,0	40,7	17,0
60		48,3	56,2	15,3
4	Rhodotorula	76,0	88,0	45,6
8		89,2	95,3	52,0
42		83,0	88,0	44,7
50		51,2	60,0	23,1

- Wydajność procesu ekstrakcji 83 %

- Niebiologiczny ubytek oleju napędowego w wyniku chemooksydacji 5 %

Tabela 6. Wzrost drobnoustrojów na podłożu mineralnym z dodatkiem 1g oleju napędowego/100cm³.

Numer i rodzaj szczepu	DZIEŃ HODOWLI										
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
	LOGARYTM LICZBY BAKTERII W 1 ml HODOWLI										
Corynebacterium											
25	3,5	13,5	16,0	16,2	16,7	13,5	12	10,7	9,0	7,5	7,1
26	3,4	13,7	16,5	16,7	16,6	14,2	11,2	10,3	8,9	7,7	7,6
36	3,0	10,1	12,4	12,9	13,1	11,1	10,4	9,9	7,8	6,6	6,4
37	3,1	9,8	11,0	12,1	12,0	9,8	9,3	8,6	7,4	6,3	6,0
47	2,7	8,0	9,2	10,5	10,3	8,2	7,8	7,5	6,4	5,8	5,5
57	2,8	4,5	6,9	7,0	7,1	6,5	5,7	4,4	4,1	4,5	4,3
Bacillus											
2	4	5,5	7,5	8,0	8,5	8,0	7,5	7,1	6,8	6,7	6,5
12	3,6	5,8	7,9	8,7	9,5	9,4	9,3	8,8	8,1	7,9	7,5
17	3,7	5,6	7,4	8,3	8,4	8,3	8,1	7,4	6,9	6,3	6,1
24	2,8	5,1	8,1	9,5	9,9	10,0	9,6	9,3	8,8	8,1	7,9
51	1,7	3,6	5,2	6,3	7,2	7,3	6,9	6,2	5,6	4,8	4,3
Candida											
18	3,5	6,9	8,1	9,2	9,8	9,7	9,1	8,5	7,7	6,9	6,7
22	4,2	7,5	8,9	9,5	9,7	9,9	8,8	8,0	7,6	7,0	6,5
33	3,7	6,2	8,5	9,3	9,6	9,5	9,2	8,9	8,5	7,4	6,8
46	2,9	5,9	7,9	8,6	8,8	8,7	8,5	8,1	7,6	6,9	6,4
Micrococcus											
7	4,8	5,2	8,5	10,0	11,7	9,4	9,1	8,6	8,0	7,8	7,6
30	5,2	7,0	8,0	8,7	10,5	12,0	11,5	10,7	9,2	8,6	7,9
44	2,8	4,5	6,2	7,4	7,8	7,6	6,9	6,1	5,9	5,5	4,9
45	2,2	4,1	6,5	7,1	7,5	7,6	7,6	6,9	6,2	5,9	5,1
54	3,3	5,0	8,2	8,4	9,1	9,3	9,2	8,3	7,4	6,9	6,5
55	2,5	4,3	6,7	6,9	7,7	8,1	7,9	6,8	6,1	5,7	5,2
Nocardia											
29	4,0	6,7	7,7	12,0	11,5	10,8	9,8	9,5	8,9	8,4	7,9
43	3,6	4,0	5,8	11,0	11,1	10,2	9,6	9,1	8,7	8,1	7,6
Actinomyces											
1	1,2	3,6	5,7	6,2	5,3	4,9	3,6	3,3	2,9	2,8	2,2
Pseudomonas											
13	3,4	5,8	8,3	9,5	9,4	8,9	8,7	7,9	7,1	6,8	5,9
21	3,5	5,3	8,9	9,8	10,0	9,9	9,8	9,5	8,9	8,5	8,2
56	4,0	6,9	9,8	11,5	12,1	11,9	11,7	11,4	10,4	9,7	9,4
Alcaligenes											
59	2,1	4,7	6,2	6,8	6,5	6,3	5,9	5,4	5,0	4,7	4,5
60	1,9	5,2	6,8	7,1	6,8	6,1	6,0	5,7	4,8	4,5	4,3
Rhodotorula											
4	3,1	6,4	7,5	8,8	8,5	8,1	7,6	7,4	7,0	6,9	6,7
8	2,8	8,4	9,8	9,5	9,2	8,9	8,0	8,8	8,5	8,3	8,0
42	3,5	8,2	9,1	10,0	9,7	9,4	8,8	8,7	8,6	8,6	8,5
50	2,5	4,7	6,2	6,3	5,9	5,5	4,9	4,5	4,3	4,1	3,8

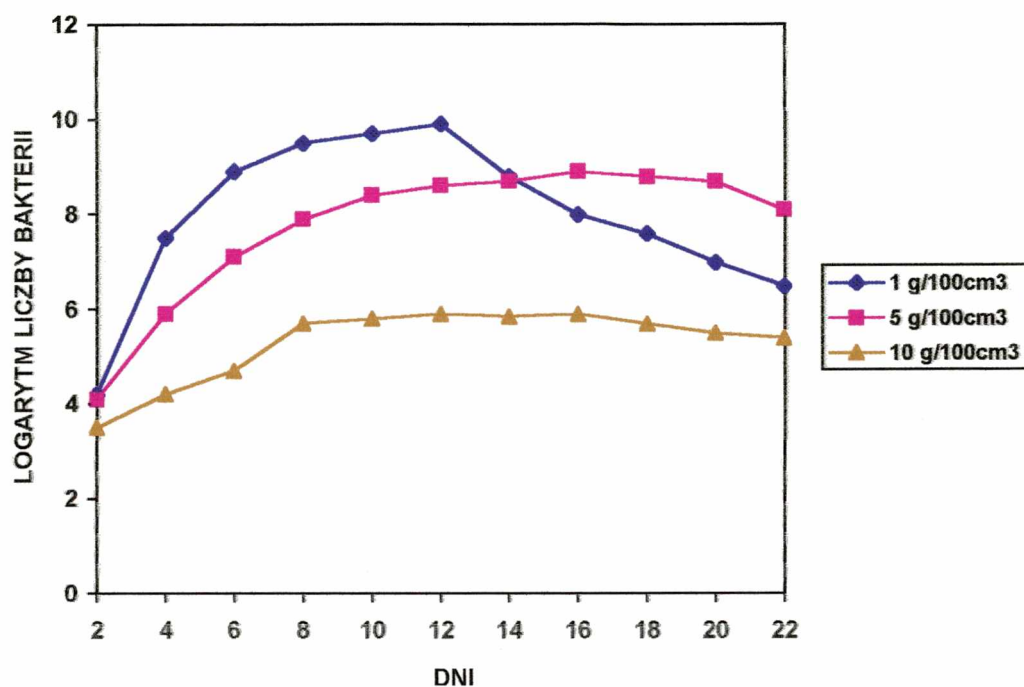
Tabela 7. Wzrost drobnoustrojów na podłożu mineralnym z dodatkiem 5 g oleju napędowego/100 cm³.

Numer i rodzaj szczepu	DZIEŃ HODOWLI										
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
	LOGARYTM LICZBY BAKTERII W 1 ml HODOWLI										
Corynebacterium											
25	2,7	7,8	13,7	14,5	14,0	14,2	14,3	14,1	14,0	12,5	11,7
26	3,0	8,2	14,9	15,1	15,0	14,8	14,8	14,6	13,9	13,1	12,9
36	2,4	5,8	10,2	10,9	10,8	10,7	10,6	10,0	9,5	8,7	8,1
37	2,2	5,5	9,3	11,0	10,9	10,6	10,7	10,2	9,6	9,0	8,6
47	2,2	5,6	9,8	10,5	10,6	10,6	10,5	9,8	9,0	8,3	7,9
57	2,1	4,9	5,7	6,5	7,4	7,5	7,6	7,5	7,3	7,0	6,9
Bacillus											
2	1,9	3,2	5,3	6,9	7,8	7,6	7,7	7,5	7,3	7,3	7,1
12	3,1	5,1	6,7	7,9	8,4	8,5	8,4	8,2	8,0	8,1	8,1
17	2,2	3,5	5,8	6,1	6,9	6,8	6,5	6,6	6,5	6,4	6,3
24	2,9	5,6	7,3	8,8	9,3	9,2	9,1	9,2	9,2	9,0	8,9
51	1,5	2,7	3,9	4,7	5,1	5,0	4,9	4,7	4,5	4,1	3,9
Candida											
18	3,5	5,1	6,7	7,2	7,5	7,9	8,4	8,3	8,1	8,0	7,8
22	4,1	5,9	7,1	7,9	8,4	8,6	8,7	8,9	8,8	8,7	8,1
33	3,8	6,1	7,2	8,1	8,6	8,6	8,7	8,7	8,6	8,5	8,4
46	2,9	3,5	4,6	5,2	5,7	6,2	7,1	6,9	6,7	6,5	6,1
Micrococcus											
7	2,8	5,4	6,4	7,2	8,5	9,4	9,3	9,3	9,2	9,1	8,9
30	3,5	6,3	7,1	7,9	8,8	9,7	10,2	10,1	10,1	9,9	9,8
44	1,5	2,1	2,8	3,6	4,7	5,1	5,0	4,9	4,7	4,5	4,2
45	1,9	2,3	3,1	4,2	5,1	5,6	5,6	5,5	5,2	5,0	4,8
54	3,2	4,5	5,8	6,5	6,9	7,2	7,1	7,0	6,8	6,5	6,2
55	2,1	3,4	4,3	5,8	6,1	6,1	5,9	5,8	5,5	5,1	4,8
Nocardia											
29	2,5	3,0	4,5	8,7	9,0	9,5	9,3	9,1	9,0	8,8	8,7
43	1,5	2,9	5,0	6,8	8,2	10,0	9,8	9,5	9,2	9,1	8,9
Actinomyces											
1	1,3	2,2	2,9	3,4	4,7	5,6	5,4	5,3	5,1	4,9	4,5
Pseudomonas											
13	2,7	3,4	4,1	5,4	7,4	8,2	8,1	8,0	7,8	7,6	7,2
21	3,2	4,7	5,6	7,6	8,8	9,1	9,1	8,9	8,8	8,5	8,1
56	3,5	4,9	7,8	9,3	10,8	10,8	10,7	10,6	10,5	10,4	10,3
Alcaligenes											
59	1,8	2,6	3,1	3,8	4,4	4,9	5,1	5,1	4,9	4,7	4,4
60	2,2	3,2	3,9	4,7	5,1	5,5	5,3	5,3	5,0	4,9	4,5
Rhodotorula											
4	3,1	4,4	5,6	6,7	7,0	7,5	7,4	7,3	7,1	6,9	6,5
8	3,6	4,8	7,8	8,7	9,2	9,2	9,1	9,1	9,0	8,8	8,7
42	2,9	4,9	6,9	7,8	8,1	8,1	8,0	8,1	8,0	7,9	7,8
50	1,7	2,4	3,6	4,4	4,9	5,2	5,0	4,8	4,5	4,3	4,0

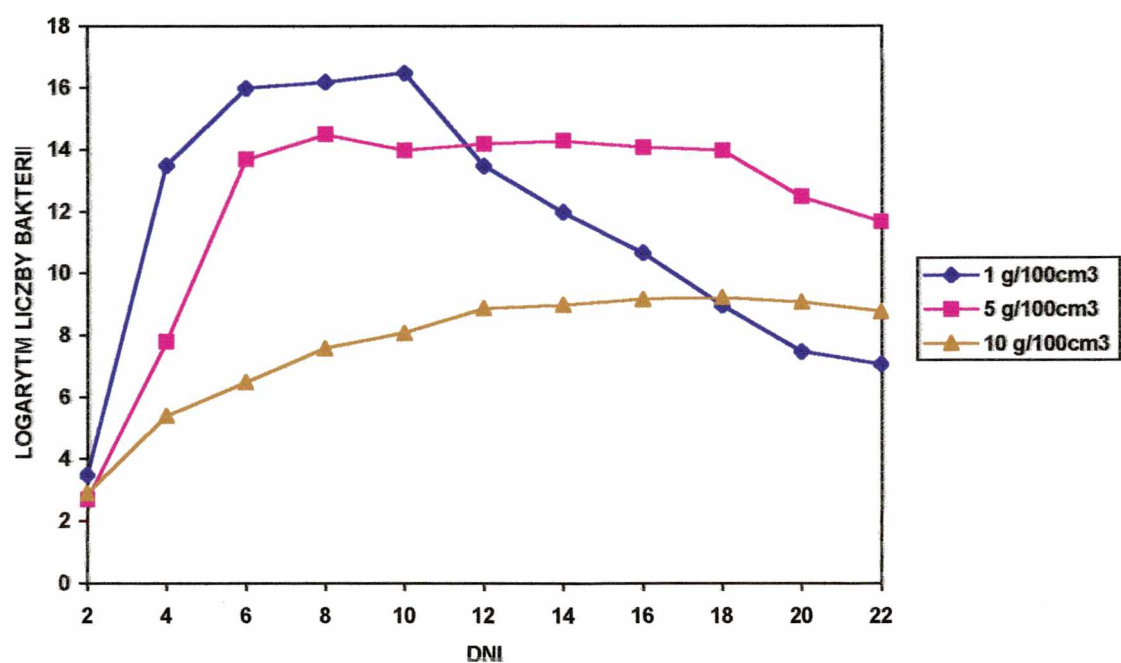
Tabela 8. Wzrost drobnoustrojów na podłożu mineralnym z dodatkiem 10 g oleju napędowego/100 cm³.

Numer i rodzaj szczepu	DZIEŃ HODOWLI										
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
	LOGARYTM LICZBY BAKTERII W 1 ml HODOWLI										
Corynebacterium											
25	2,9	5,4	6,5	7,6	8,1	8,9	9,0	9,2	9,25	9,1	8,8
26	2,5	5,7	6,8	7,1	7,4	8,1	8,2	8,1	8,3	8,1	7,9
36	2,3	4,3	5,1	6,2	6,9	7,5	7,4	7,2	6,8	6,5	6,3
37	2,1	4,8	5,7	6,4	6,7	7,8	7,6	7,3	7,1	6,8	6,5
47	1,9	4,1	4,9	5,9	6,5	7,2	7,4	7,5	7,3	7,0	6,8
57	1,7	1,8	2,4	2,5	2,5	2,7	2,6	2,8	2,65	2,6	2,6
Bacillus											
2	1,6	2,2	2,8	3,4	3,7	4,0	4,4	4,9	4,8	4,5	4,3
12	2,2	2,9	3,5	4,2	4,9	5,3	5,8	5,8	5,7	5,6	5,5
17	1,5	2,4	2,7	3,1	3,8	4,2	4,5	4,9	4,8	4,6	4,3
24	2,0	2,8	3,1	3,9	4,8	5,6	6,1	6,0	6,0	5,9	5,8
51	0,9	1,4	1,7	2,1	2,4	2,9	3,1	3,0	2,8	2,5	2,3
Candida											
18	2,5	3,6	4,1	4,4	4,8	5,0	5,2	5,3	5,2	5,2	5,1
22	3,5	4,2	4,7	5,7	5,8	5,9	5,85	5,9	5,7	5,5	5,4
33	2,7	3,4	3,9	4,7	5,0	5,3	5,5	5,4	5,4	5,3	5,2
46	2,1	2,9	3,2	3,7	4,0	4,4	4,6	4,9	4,7	4,5	4,2
Micrococcus											
7	3,1	4,3	5,5	5,9	6,3	6,7	6,9	6,9	6,8	6,7	6,5
30	3,2	4,7	5,9	6,5	6,9	7,5	7,9	7,9	7,8	7,7	7,6
44	1,2	1,5	2,2	2,8	3,2	3,5	3,4	3,3	3,1	2,8	2,5
45	1,5	1,9	2,5	3,1	3,5	3,9	3,8	3,7	3,5	3,1	2,8
54	2,7	3,4	4,1	4,5	4,9	5,0	5,1	5,0	4,9	4,7	4,6
55	1,0	1,6	2,0	2,8	3,0	3,2	3,1	3,0	2,7	2,5	2,1
Nocardia											
29	2,1	3,7	4,6	5,2	5,9	6,5	6,7	6,9	6,9	6,8	6,7
43	1,9	2,9	3,9	4,8	5,6	7,2	7,8	7,8	7,7	7,5	7,3
Actinomyces											
1	1,2	1,9	2,3	2,7	3,1	3,4	3,7	3,9	3,9	3,6	3,2
Pseudomonas											
13	2,1	2,7	3,1	4,8	5,4	5,8	6,1	6,2	6,5	6,2	6,0
21	2,6	3,1	3,9	5,2	6,4	6,9	7,1	7,3	7,2	7,0	6,7
56	3,1	4,7	5,9	6,7	7,5	8,0	8,1	8,6	8,5	8,5	8,4
Alcaligenes											
59	1,5	1,8	2,5	3,1	3,6	3,9	4,1	4,5	4,3	3,9	3,6
60	1,2	1,5	2,3	2,9	3,4	4,2	4,9	5,1	5,0	4,8	4,7
Rhodotorula											
4	2,1	3,4	3,9	4,5	4,9	5,0	5,1	5,0	4,9	4,7	4,5
8	3,2	4,9	5,7	6,3	6,9	6,9	7,1	7,1	6,9	6,8	6,7
42	3,5	4,5	5,1	5,6	5,8	6,0	6,3	6,5	6,4	6,3	6,2
50	1,7	2,3	3,4	3,5	3,4	3,7	3,8	3,8	3,6	3,4	3,1

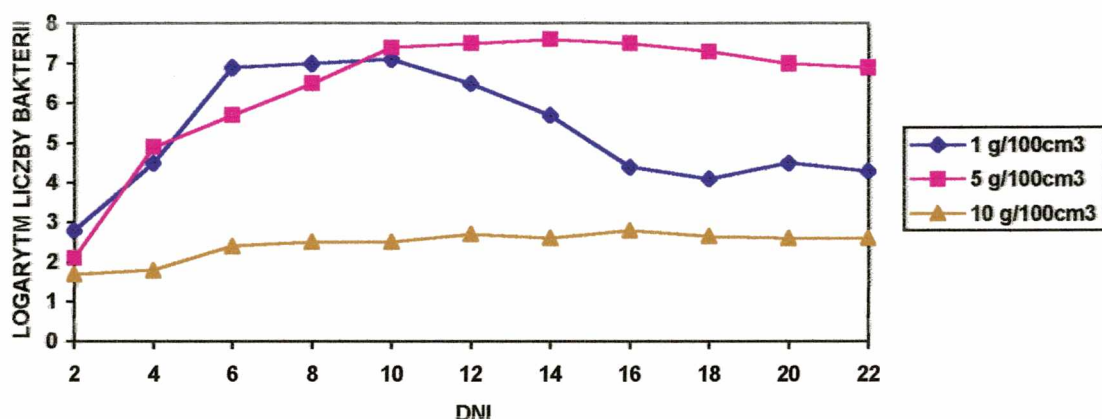
Rysunek 11. Wzrost szczepu z rodzaju *Candida* 22 na podłożu mineralnym z dodatkiem różnych stężeń oleju napędowego.



Rysunek 12. Wzrost szczepu z rodzaju *Corynebacterium* 25 na podłożu mineralnym z dodatkiem różnych stężeń oleju napędowego.



Rysunek 13. Wzrost szczepu z rodzaju *Corynebacterium* 57 na podłożu mineralnym : dodatkiem różnych stężeń oleju napędowego.



4.3. Dobór szczepów i przygotowanie szczepionki mikrobiologicznej zasilającej osad czynny

Jednym z zasadniczych warunków znalezienia własnej niszy ekologicznej przez sztucznie wyselekcjonowany szczep bakterii, którym ma być zaszczipiony osad czynny, jest brak negatywnych oddziaływań między nim a mikroorganizmami zasiedlającymi osad czynny. Należało więc przeanalizować, czy mikroflora osadu nie wydziela do podłoża substancji hamujących wzrost szczepów mogących służyć do aktywacji osadu czynnego. Badaniom poddano wszystkie wyizolowane uprzednio szczepy mikroorganizmów. Analizę wykonano metodą krążkową na płytkach Petriego. Po naniesieniu krążków wyciętych z hodowli szczepów, wchodzących w skład naturalnej mikroflory osadu czynnego, na świeży dywanowy posiew poszczególnych aktywnych drobnoustrojów i po okresie inkubacji, nie zaobserwowano u większości szczepów, stref zahamowania ich wzrostu wokół krążka ze szczepami osadowymi. U nielicznych tylko szczepów obserwowano niewielkie strefy zahamowania rzędu 2-10 mm. Świadczy to o braku lub bardzo małych oddziaływaniach antagonistycznych. Jedynie w przypadku siedmiu szczepów obserwowano strefy zahamowania wzrostu powyżej 10 mm (18mm-31mm). Szczepy te należały do następujących rodzajów: *Corynebacterium* 57, *Bacillus* 51, *Micrococcus* 55, *Nocardia* 29 i 43, *Actinomyces* 1 i *Rhodotorula* 50. Na tej podstawie uznano, że szczepy te nie powinny wchodzić w skład szczepionek bakteryjnych poprawiających efektywność rozkładu substancji zawartych w oleju napędowym metodą osadu czynnego.

Badania te umożliwiły wybór szczepów wchodzących w skład szczepionki mikrobiologicznej zasilającej osad czynny. Szczepionka zawierała więc 26 szczepów drobnoustrojów: cztery z rodzaju *Bacillus* 2, 12, 17 i 24; pięć z rodzaju *Micrococcus* 7, 30, 44, 45 i 54; trzy z rodzaju *Pseudomonas* 13, 21, 56; dwa z rodzaju *Alcaligenes* 59 i 60; pięć z rodzaju *Corynebacterium* 25, 26, 36, 37, 47; cztery z rodzaju *Candida* 18, 22, 33, 46 i trzy z rodzaju *Rhodotorula* 4, 8 i 42. Wszystkie te szczepy namnażano na podłożach mineralnych z rozproszonym na ich powierzchni filmem olejowym. Po uzyskaniu wzrostu zmywano hodowle ściekami syntetycznymi, trzykrotnie wirowano i ostatecznie zawieszano zawiesinę drobnoustrojów w 100 cm³ ścieków i wprowadzano do osadu czynnego. Tak przygotowana szczepionka zawierała około 500 mg suchej masy mikroorganizmów/dm³ (po około 20 mg suchej masy/ dm³ każdego szczepu).

4.4. Hodowla osadów czynnych oczyszczających ścieki z zawartością oleju napędowego

Osad czynny do badań nad biodegradacją oleju napędowego hodowano w układzie strumienicowym według Gomółki [95]. Prowadzono hodowlę trzech osadów czynnych:

1. Osad konwencjonalny, wyhodowano stosując jako zaszczep w komorze napowietrzania niewielkie ilości mikroorganizmów obecne w surowych ściekach komunalnych.
2. Osad złożony z wyselekcjonowanych szczepów zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych, wyhodowano wprowadzając do komory napowietrzania zawierającej 1,5 dm³ ścieków syntetycznych przygotowaną wcześniej szczepionkę o objętości 500 cm³ zawierającą 2500 mg suchej masy aktywnych mikroorganizmów w 1 dm³.
3. Osad doszczepiany powstał z osadu konwencjonalnego wzbogacanego, co siedem dni, w szczepionkę złożoną z wyselekcjonowanych szczepów zawierającą 500 mg suchej masy mikroorganizmów w 1 dm³.

W trakcie hodowli kontrolowano obraz makro- i mikroskopowy osadów, przyrost ich biomasy w leju Imhofa i przyrost zawartości suchej masy. Hodowlę osadów prowadzono przez 30 dni, tj. do momentu w którym zawartość biomasy w komorach aeracyjnych osiągnęła poziom 5000 mg s.m. / dm³.

W efekcie końcowym otrzymano trzy osady z których dwa- konwencjonalny i doszczepiany niewiele się różniły od siebie pod względem makro- i mikroskopowym. Osad konwencjonalny charakteryzował się brązową barwą, dobrą sedymentacją i zapachem glebowym. Kłaczki osadu były typowe- dość luźne ze skupiskami gąbczastymi. Osad doszczepiany był jaśniejszy, również dobrze sedymentował, posiadał jednak zapach glebowo-olejowy i nieco opalizującą ciecz nadosadową. Kłaczki osadu były bardziej luźne. Na podstawie analizy składu biologicznego tych osadów stwierdzono w nich, obecność wszystkich grup mikroorganizmów niezbędnych w procesie biologicznego oczyszczania ścieków. Charakteryzowały się obecnością licznych zooglealnych skupisk bakterii. Spośród pierwotniaków bardzo licznie występowały orzęski osiadłe z rodzaju *Epistylis*, tworząc w polu widzenia duże kolonie, natomiast orzęski osiadłe z rodzaju *Opercularia* występowały w mniejszej ilości. Spośród orzęsków pełzających po kłaczkach licznie były obecne *Euplotes* a spośród orzęsków wolnopływających *Lionotus* i *Colpidium*. Oprócz powyższych organizmów w osadach sporadycznie można było spotkać korzenionózki z rodzaju *Arcella*, nielicznie drobne bezbarwne wiciowce i wrotki z rodzaju *Rotatoria* i *Rotifer*.

Natomiast osad czynny, hodowany z aktywnych szczepów drobnoustrojów, pod względem makroskopowym odznaczał się barwą rudą, dobrą sedymentacją i zapachem olejowo- glebowym. Kłaczki osadu były drobniejsze, w początkowej fazie tworzenia osadu o kształcie gwiazdistym, bardziej rozprzestrzenione z wyraźnie widocznymi kroplami oleju w postaci kulistych form. Ciecz nadosadowa, tak jak w przypadku osadu doszczepianego lekko opalizowała. Analiza mikroskopowa tego osadu ujawniła obecność licznych orzęsków osiadłych z rodzaju *Opercularia* i *Vorticella*, orzęsków wolnopływających z rodzaju *Lionotus* i *Paramaecium*, orzęsków pełzających po kłaczkach z rodzaju *Euplotes*, sporadycznej ilości wrotków z rodzaju *Rotatoria* i *Rotifer* oraz drobnych bezbarwnych wiciowców.

4.5 Badanie aktywności dysymilacyjnej mikroflory osadu czynnego i osadu czynnego doszczepionego, w obecności różnych stężeń oleju napędowego, metodą manometryczną Warburga.

W celu sprawdzenia, czy wyizolowane ze środowiska naturalnego szczepy aktywnych drobnoustrojów będą mogły posłużyć jako mikrobiologiczne szczepionki w osadzie czynnym poprawiające skuteczność oczyszczania ścieków zaolejonych, zbadano intensywność pobierania tlenu przez osad czynny w obecności tych drobnoustrojów oraz oleju napędowego. Aktywność dysymilacyjną tak przygotowanego osadu porównano z aktywnością dysymilacyjną osadu konwencjonalnego w obecności tego samego substratu. Aby określić wpływ oleju napędowego na funkcje fizjologiczne komórek mikroflory osadu czynnego, przygotowano dla jednego i drugiego osadu próby kontrolne zawierające ścieki z dodatkiem łatwo przyswajalnego substratu w postaci bulionu, oraz próby na oddychanie endogenne składające się jedynie z drobnoustrojów osadu czynnego zawieszonych w ściekach syntetycznych pozbawionych związków organicznych.

Wyniki badań respirometrycznych mikroflory osadu czynnego konwencjonalnego oraz doszczepionego aktywnymi szczepami przedstawiono na rysunkach 14, 15, 16 i 17.

Zarówno jeden jak i drugi osad czynny hodowany z dodatkiem łatwo przyswajalnego substratu, jako jedyne źródła węgla i energii, charakteryzował się bardzo dobrą intensywnością pobierania tlenu. Wprowadzenie do osadów czynnych jedynie oleju napędowego spowodowało wyraźny spadek aktywności dysymilacyjnej mikroflory.

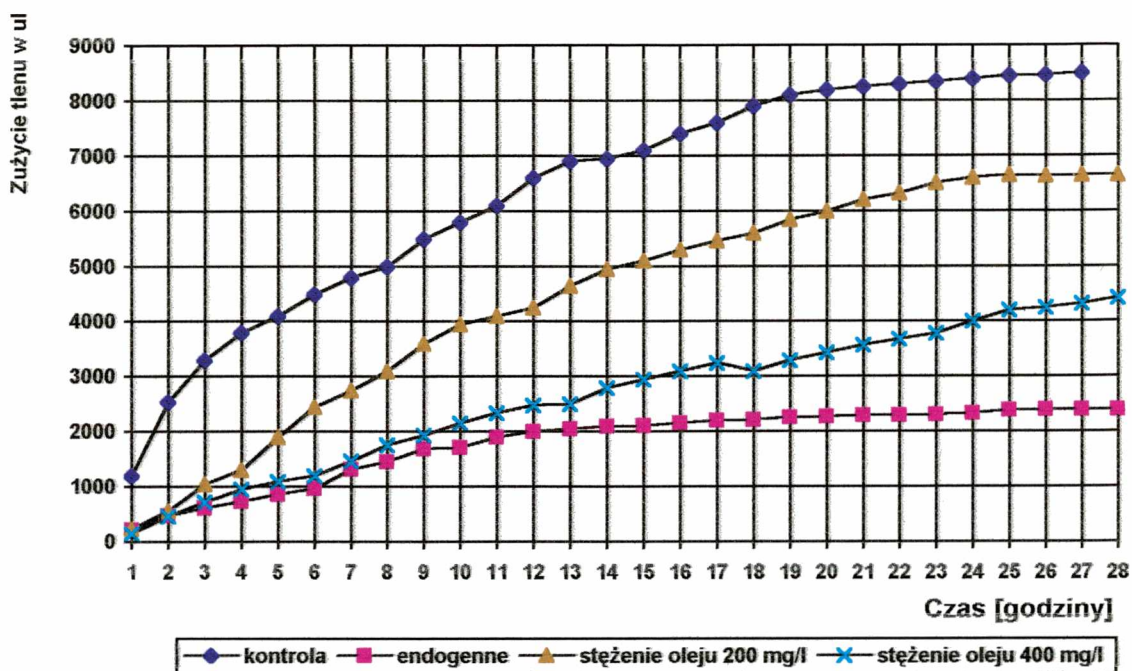
W przypadku stosowania osadu czynnego konwencjonalnego (rys. 14 i 15) spadek ten był wyraźniejszy, zwłaszcza w naczynkach zawierających 600 i 800 mg oleju napędowego/dm³ (rys.15). W przypadku gdy stężenie oleju wynosiło 800 mg/dm³, wartości zużycia tlenu oscylowały wokół aktywności dysymilacyjnych dla próby endogennej. Pozwala to na przypuszczenie, że w tym przypadku badane węglowodory nie były wykorzystywane jako źródło energii i węgla, lecz organizmy osadu czynnego korzystały z własnych wewnątrzkomórkowych substratów.

W drugiej serii badano wpływ oleju napędowego na osad doszczepiony aktywnymi szczepami, wyizolowanymi ze środowisk skażonych substancjami ropopochodnymi. Wyniki tych badań przedstawiono na rysunkach 16 i 17. W tym przypadku osad czynny wykazywał bardzo dobrą intensywność pobierania tlenu gdy stężenie oleju wynosiło 200 mg/dm³. Wartości pobierania tlenu wyraźnie oscylowały wokół aktywności dysymilacyjnej mikroorganizmów osadu z łatwo przyswajalnym źródłem węgla. Również w przypadku stężenia 400 mg oleju / dm³ w naczynkach manometrycznych aktywność dysymilacyjna tak przygotowanego osadu niewiele odbiegała od wartości aktywności kontrolnej (rys.16). Wyraźny spadek aktywności dysymilacyjnej zauważyć jedynie można w przypadku dodania do osadu oleju napędowego w stężeniu 600 i 800 mg / dm³ (rys.17). Spadek ten był jednak dużo mniejszy w porównaniu do poprzedniej serii badań w której obecny był osad czynny konwencjonalny. Obecność oleju napędowego w stężeniu 800 mg / dm³ nie miała także toksycznego działania na osad doszczepiony aktywnymi szczepami, jak to miało miejsce w poprzedniej serii badań.

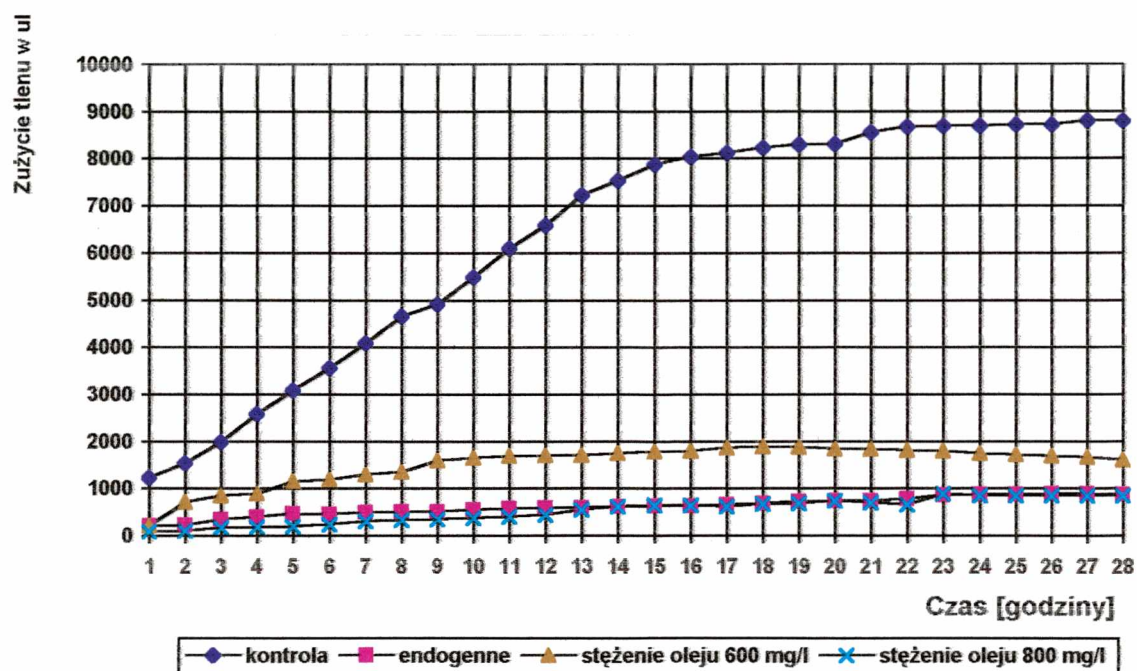
Przeprowadzone badania respirometryczne osadów czynnych wykazały więc korzystny wpływ szczepionki mikrobiologicznej, złożonej z aktywnych wobec oleju napędowego szczepów drobnoustrojów, na aktywność dysymilacyjną mikroflory osadu czynnego oczyszczającego ścieki zaolejone. Zauważono bowiem wyraźny wzrost pobierania tlenu w przypadku osadu doszczepionego w stosunku do osadu pozbawionego aktywnych szczepów. W przypadku niższych stężeń oleju, rzędu 200 i 400 mg /dm³, pobieranie tlenu dla takiego osadu było nawet porównywalne z pobieraniem tlenu w obecności łatwo dostępnego substratu.

Uzyskane wyniki badań pozwalają na przypuszczenie, że wyizolowane ze środowisk zatrutych mikroorganizmy, mogą posłużyć do przygotowania szczepionki aktywizującej wyraźnie, proces biodegradacji oleju napędowego.

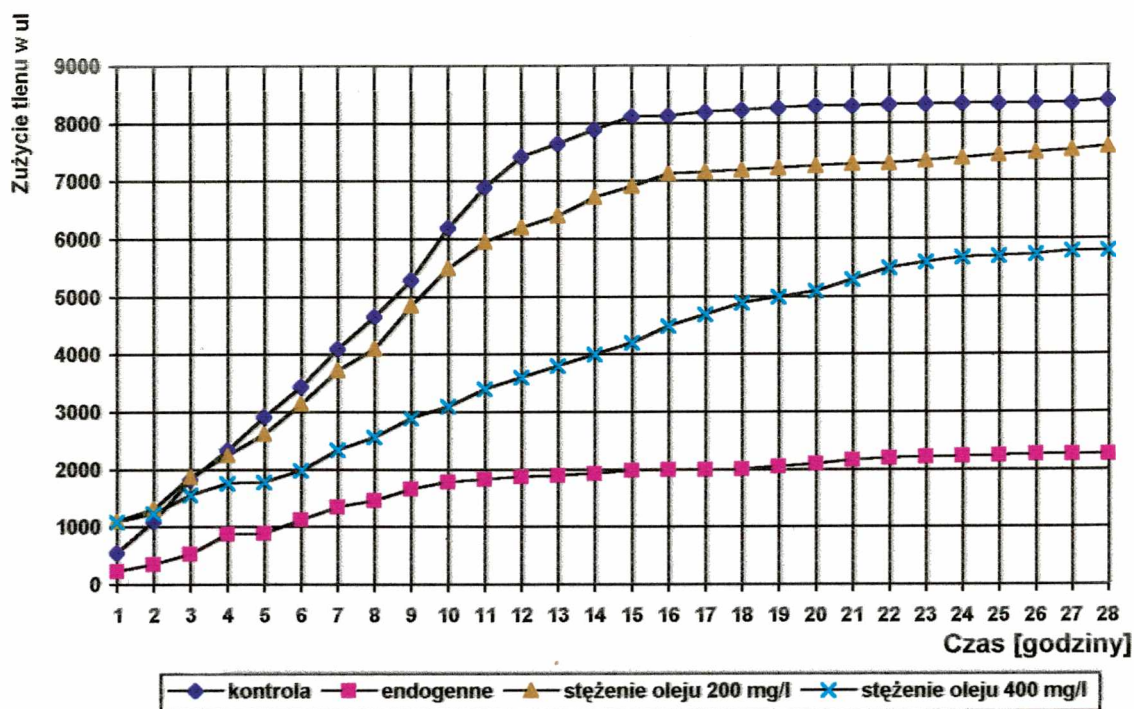
Rys.14 Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny w obecności 200 i 400 mg oleju napędowego/dm³, jako jedynego źródła węgla i energii



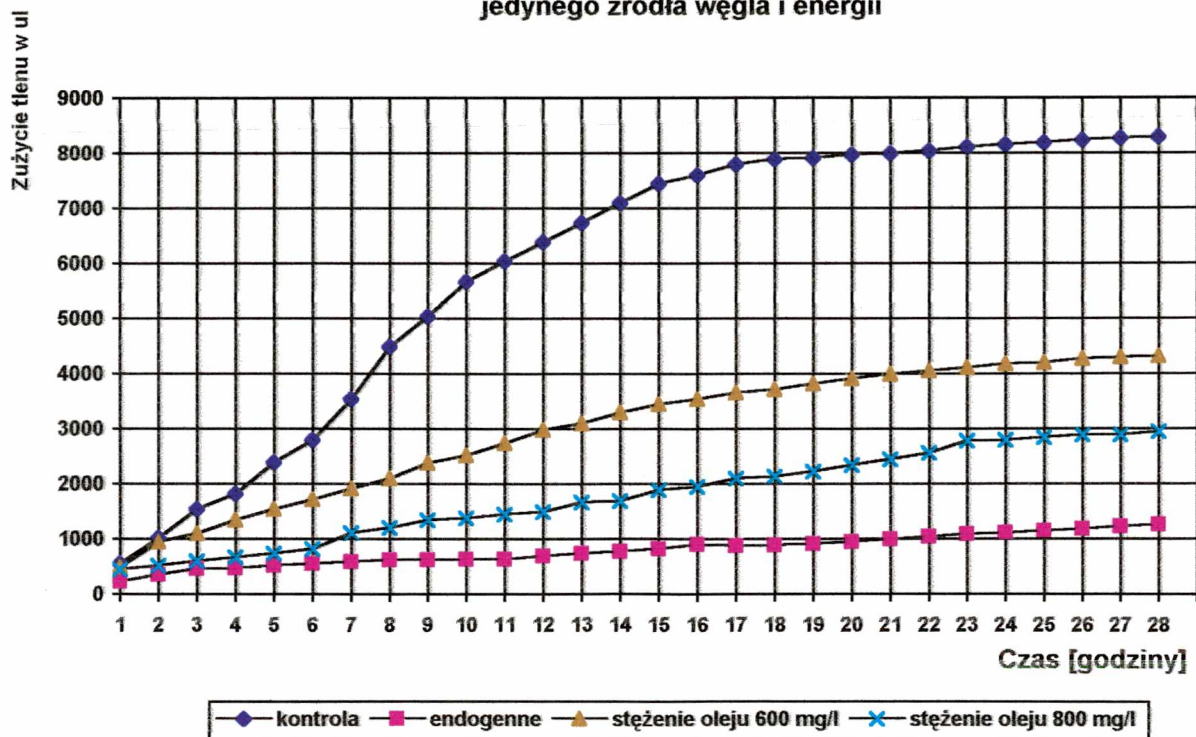
Rys 15. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny w obecności 600 i 800 mg oleju napędowego/dm³, jako jedynego źródła węgla i energii



Rys 16. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny doszczepiany w obecności 200 i 400 mg oleju napędowego/dm³, jako jedyne źródła węgla i energii



Rys 17. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny doszczepiony w obecności 600 i 800 mg oleju napędowego/dm³, jako jedyne źródła węgla i energii



II. Ocena postępu biodegradacji oleju napędowego metodą osadu czynnego

Po wyhodowaniu odpowiedniej ilości osadów czynnych, co opisano w pkt. 4.4., przystąpiono do badań polegających na obserwacji procesu oczyszczania ścieków zawierających olej napędowy przez te osady. Badania prowadzono w układzie strumienicowym na ściekach syntetycznych w czterech seriach różniących się obciążeniem osadów czynnych ładunkiem zanieczyszczeń węglowodorowych. Do pierwszej komory wprowadzono osad czynny konwencjonalny (kontrolny), do drugiej osad czynny wyhodowany wyłącznie z aktywnych szczepów drobnoustrojów a do trzeciej osad czynny doszczepiany (rysunek 18). Na początku każdej serii badań w komorach znajdowało się około 5000 mg suchej masy osadu czynnego w 1dm^3 co odpowiadało stężeniu biomasy od 280 do $330\text{ cm}^3/\text{dm}^3$ w leju Imhofa. Jedynie w komorze trzeciej ilość suchej masy osadu wynosiła $4500\text{ mg}/\text{dm}^3$ ponieważ resztę stanowił zaszczep żywych drobnoustrojów, których ilość w przeliczeniu na suchą masę wynosiła $500\text{ mg}/\text{dm}^3$. Ponadto, w trakcie trwania eksperymentu, co 7 dni, do tej komory dodawano szczepionkę, której przygotowanie opisano w punktach 3.8 i 4.3, w ilości $500\text{ mg s.m.} / \text{dm}^3$ drobnoustrojów.

Rysunek 18. Skład komór napowietrzania

Komora I	Komora II	Komora III
-Osad czynny-konwencjonalny (kontrolny) - O.I. ($5000\text{ mg s.m.} / \text{dm}^3$) -Ścieki syntetyczne z olejem napędowym	-Osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów mikroorganizmów - O.II. ($5000\text{ mg s.m.} / \text{dm}^3$) -Ścieki syntetyczne z olejem napędowym	-Osad czynny-doszczepiany - O.III. ($4500\text{ mg s.m.}/\text{dm}^3$) -Zaszczep bakteryjny co 7 dni ($500\text{ mg s.m.}/\text{dm}^3$) -Ścieki syntetyczne z olejem napędowym

W procesie ciągłym oczyszczania ścieków z zawartością oleju napędowego zastosowano następujące parametry technologiczne:

- pojemność komór 500 cm^3
- pojemność osadników wtórnych 1500 cm^3
- natężenie przepływu ścieków $1200\text{ cm}^3/\text{d}$
- czas zatrzymania ścieków w komorach napowietrzania 10 godzin
- stopień recyrkulacji – w sposób ciągły
- temperatura procesu $20\text{-}23\text{ }^\circ\text{C}$
- napowietrzanie pompami perystaltycznymi

4.6. Makro- i mikroskopowa charakterystyka osadów czynnych podczas procesu biodegradacji oleju napędowego

W każdej z czterech serii badań, nad biodegradacją oleju napędowego, prowadzono obserwacje makro- i mikroskopowe osadów czynnych. Stwierdzono, iż niezależnie od stopnia i sposobu obciążenia osadów ładunkiem zanieczyszczeń olejowych, ich obraz makro- i mikroskopowy ulegał podobnym zmianom. I tak, parametry te dla osadów w komorze I-kontrolnej i III- doszczepianej podczas dozowania ścieków z olejem napędowym zmieniały się podobnie. Zmieniała się barwa osadów na ciemniejszą. Zapach osadów był charakterystyczny - olejowy. Sedymentowały dobrze. Kłaczki osadów zmieniły się na bardziej zbite, łopatomato zakończone z wyraźnym połyskującym zarysem. Wraz ze zwiększającym się stężeniem oleju napędowego, obserwowano zmniejszającą się ilość orzęsków wolnopływających, osiadłych i pojawiającą się niewielką liczbę form nitkowatych bakterii. Natomiast barwa osadów w komorze II-bakteryjnej przez cały czas była jasnobrązowa, kłaczki osadu stawały się coraz bardziej luźniejsze niż na początku badań oraz pogarszały się jego zdolności sedymentacyjne. Obraz mikroskopowy pozwolił na stwierdzenie zmniejszonej liczby orzęsków wolnopływających i osiadłych tego osadu, natomiast stale obserwowano wzrost liczebności drobnych wiciowców i wrotków oraz pojawiające się bakterie nitkowate. Pod koniec doświadczenia we wszystkich komorach do których dozowano olej napędowy brak było orzęsków osiadłych, natomiast mała liczebność pozostałych organizmów sprawiła iż we wszystkich komorach uzyskano biocenozy bakteryjne i bakteryjno-wrotkowe. Ścieki odprowadzane z komór napowietrzania I i III były przejrzyste przez cały czas trwania eksperymentu. Ścieki odpływające z komory II, wraz ze wzrostem stężenia oleju, stawały się coraz mętniejsze. Ścieki odprowadzane z komór, do których był dozowany olej napędowy miały barwę lekko żółtą, czasem opalizującą, zwłaszcza w komorze III- doszczepianej. Nie zauważono również mętnienia bądź pienienia się ścieków odprowadzanych z tej komory.

Podsumowując należy stwierdzić, że dozowanie oleju napędowego do komór z osadem czynnym powodowało wyraźne zlepianie kłaczek osadu, spowodowane adsorpcją kropelek oleju napędowego na powierzchni kłaczek. Ponadto obserwowano także zmiany ilościowe i jakościowe w składzie gatunkowym osadów czynnych, zwłaszcza w najbardziej wrażliwej na zawartość oleju populacji orzęsków. W końcowym efekcie we wszystkich komorach uzyskiwano biocenozy bakteryjne i bakteryjno-wrotkowe.

4.7. Osad czynny niskoobciążony- wyniki pierwszej serii badań

W pierwszej serii porównywano efektywność biologicznego rozkładu ścieków zawierających olej napędowy przez osad czynny konwencjonalny, osad czynny wyhodowany od podstaw z aktywnych szczepów i przez osad czynny doszczepiany. W trakcie tych badań do komór napowietrzania dozowano ścieki syntetyczne zawierające najpierw 200 mg oleju napędowego/dm³, a następnie od 22 dnia badań 400 mg oleju napędowego/dm³.

4.7.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych

Wyniki badań biotechnologicznych osadów czynnych znajdują się w tabeli 9. Parametry te, w poszczególnych komorach, utrzymywały się mniej więcej na stałym poziomie przez cały okres procesu oczyszczania ścieków zaolejonych.

Wyjściowy indeks osadów został ustalony na poziomie 56,0 cm³/g co odpowiadało objętości osadów 280 cm³/dm³ i zawartości suchej masy 5,0 g/dm³.

W pierwszej komorze zawartość suchej masy osadu czynnego wahała się od 4,1 do 5,4 g/dm³, objętość osadu czynnego po 0,5 godzinnej sedimentacji w leju Imhoffa wynosiła 280-410 cm³/dm³ a indeks objętościowy zmieniał się od 56,0 do 91,1 cm³/g. W drugiej komorze analogiczne wartości wahały się następująco: 4,0-5,5 g s.m./dm³, 260-450 cm³/dm³ i 54,9-83,1 cm³/g. Dla komory trzeciej: 5,0-6,3 g s.m./dm³, 260-370 cm³/dm³ i 51,0-66,0 cm³/g.

Obciążenie osadów czynnych ładunkiem BZT₅ zmieniało się: dla I komory od 0,025 do 0,041 mg O₂/mg s.m./d, dla II komory od 0,024 do 0,042 mg O₂/mg s.m./d i dla III komory od 0,021 do 0,03 mg O₂/mg s.m./d. Natomiast obciążenie osadów związkami olejowymi zmieniało się w granicach: dla I komory od 0,04 do 0,093 mg/mg s.m./d., dla II komory od 0,038 do 0,1 mg/mg s.m./d. i dla III komory od 0,033 do 0,068 mg/mg s.m./d.

Odpływy z komór napowietrzania posiadały odczyn alkaliczny w granicach 7,3-8,1.

Zawartość tlenu w komorach wahała się w granicach 2,8-3,2 mg O₂/dm³.

4.7.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego

W tabeli 10 przedstawiono wyniki badań nad ubytkiem oleju napędowego uzyskane metodą wagową (metoda ekstraktu eterowego) oraz za pomocą ilościowych badań chromatograficznych i ogólnego węgla organicznego.

Wyniki badań nad wykorzystaniem substancji zawartych w oleju napędowym wykonane metodą ekstraktu eterowego wskazują na bardzo wysokie usuwanie zanieczyszczeń węglowodorowych przez wszystkie trzy rodzaje osadu czynnego wynoszące średnio dla osadu I- 82,2%, dla osadu II- 90,1% i dla osadu III- 92,2%. W przypadku tych badań zauważalne było przejściowe pogorszenie oczyszczania w momencie zwiększenia stężenia oleju napędowego w ściekach surowych około 22 dnia. Począwszy jednak od 25 doby ubytek substancji olejowych był coraz większy. W 42 dobie trwania procesu oczyszczania usuwanie składników oleju napędowego wyniosło 84,1% dla komory I, 90,4 % dla komory II i 96,1 % dla komory III.

Bardzo podobnie przedstawiają się wyniki badań chromatograficznych. Badania te przeprowadzono w 3, 8, 14, 19, 25, 31 i 38 dobie trwania procesu. W 19 dobie zauważalna była większa skuteczność rozkładu oleju niż w 25 dobie. Różnica ta na pewno była także spowodowana zwiększeniem stężenia oleju napędowego w ściekach surowych. Począwszy jednak od 31 doby ubytek oleju napędowego ponownie zaczął wzrastać. Średnio stopień usuwania składników oleju napędowego w przypadku tych badań wynosił 79,9% dla komory I, 92,6 % dla komory II i 93,7 % dla komory III.

Tak samo przedstawiają się wyniki usuwania zanieczyszczeń olejowych mierzone ubytkiem ogólnego węgla organicznego. Ubytek ten wynosił średnio dla komory I –89,1%, dla komory II- 92,3, natomiast dla komory III-92,7%.

W tabeli 9 i na rysunkach 19 i 20 przedstawiono wyniki dotyczące zawartości zanieczyszczeń organicznych w ściekach dozowanych do układu i oczyszczonych obliczone na podstawie badań BZT₅ i ChZT. Tabela 11 przedstawia natomiast te same wyniki w procentach. Największe obniżenie wartości BZT₅ i ChZT uzyskano w komorze II i III natomiast w komorze I stopień usuwania zanieczyszczeń był wyraźnie niższy. Zauważono także zależność pomiędzy stopniem usuwania zanieczyszczeń a stężeniem oleju napędowego w ściekach syntetycznych. W momencie gdy do komór zaczęto dozować ścieki zawierające 400 mg związków węglowodorowych w dm³ (22 dzień eksperymentu) efektywność oczyszczania pogorszyła się, zwłaszcza w komorze I.

Średni stopień usuwania zanieczyszczeń olejowych mierzony na podstawie badań BZT₅, w pierwszej serii badań, dla komory I wynosił 52,8 %, dla komory II 78,5% a dla komory III 80,5%. Doszczepienie osadu czynnego aktywnymi szczepami poprawiło efektywność oczyszczania ścieków o 27,7% w stosunku do osadu konwencjonalnego. Natomiast osad wyhodowany z aktywnych szczepów oczyszczał lepiej niż osad kontrolny ścieki zaolejone o około 25,7%.

W przypadku badań ChZT, średni stopień usuwania oleju napędowego w ciągu całego eksperymentu wynosił dla I komory 32,3%, dla komory II 66,5% a dla komory III 66,9. Efektywność usuwania zanieczyszczeń olejowych poprawiła się więc o około 34,6% dla osadu doszczepionego i o około 34,2 dla osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów, w stosunku do osadu konwencjonalnego.

Analizę jakościową produktów pobiodegradacyjnych przeprowadzono na podstawie badań chromatografii gazowej i cieczowej po 14, 25 i 38 dobie badań.

W obrazach chromatografii gazowej i cieczowej pochodzących z odpływów ze wszystkich komór widoczny był ubytek, w stosunku do wzorcowej próby oleju napędowego, węglowodorów C₆-C₁₂ (lekkie składniki frakcji oleju) oraz lekkich węglowodorów aromatycznych (BTX). Miało to za pewnie związek z usuwaniem z hodowli lotnych frakcji naftowych na skutek napowietrzania prób. Zostało to potwierdzone w badaniach oceny stopnia chemooksydacji. Niebiologiczny ubytek oleju napędowego wynosił ok. 8%.

Na podstawie badań chromatograficznych stwierdzono że, w początkowym okresie, gdy do komór dozowano mniejszą ilość oleju napędowego, 200 mg/dm³, w odpływach z komory II i III zauważalne było wyraźne zmniejszenie spektrów sygnałów w zakresie węglowodorów C₁₂-C₂₄ oraz duże zmniejszenie i rozmycie sygnałów w całym zakresie retencji struktur aromatycznych. W odpływach z komory I również zauważalne były te same zmiany jakościowe lecz intensywność sygnałów była o wiele większa. W momencie gdy do komór zaczęto dozować większą ilość oleju napędowego, 400 mg/dm³, zauważono w odpływach zwiększenie spektrów sygnałów w zakresie retencji węglowodorów C₁₂-C₂₄ oraz charakterystyczne maksima dla grup lżejszych węglowodorów aromatycznych. Pod koniec badań obserwowano ponownie, w odpływach ze wszystkich komór, mniejsze sygnały w zakresie retencji węglowodorów C₁₂-C₂₄ oraz duże zmniejszenie i rozmycie sygnałów w zakresie retencji związków aromatycznych w porównaniu do analogicznych sygnałów pochodzących od oleju napędowego w ściekach surowych (rysunek 21, 22, 23 i 24). Wyniki te wskazują na podobną efektywność w usuwaniu oleju napędowego ze ścieków przez wszystkie badane osady.

Tabela 9. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (1 seria).

Parametr	Numer komory	D N I :															
		1	3	5	8	11	14	16	19	22	25	28	31	35	38	40	42
Objętość osadu po 0,5 godzinnej sedymencieacji w leju Imhoffa cm ³ /dm ³	1	280	300	300	310	315	360	360	370	390	350	410	300	320	340	330	340
	2	280	280	290	335	320	360	360	360	450	450	410	310	300	270	280	260
	3	280	260	300	330	330	320	320	320	350	330	360	320	326	350	355	370
Sucha masa g/dm ³	1	5.0	4.5	4.1	4.6	4.3	4.4	4.3	4.7	4.4	4.3	4.5	5.1	5.4	5.3	5.2	5.3
	2	5.0	5.1	4.6	4.8	5.2	5.0	5.2	5.1	5.5	5.4	5.2	4.3	4.2	4.2	4.0	4.0
	3	5.0	5.1	5.2	5.6	5.0	5.4	6.0	5.7	5.9	6.3	6.1	5.9	6.1	5.9	6.0	6.1
Indeks osadu cm ³ /g	1	56.0	66.7	73.2	67.4	73.3	81.8	83.7	78.7	88.6	81.4	91.1	58.8	59.3	64.2	63.5	64.2
	2	56.0	54.9	67.4	69.8	61.5	72.0	69.2	70.6	82.4	83.1	78.7	72.8	71.9	63.7	70.0	65.0
	3	56.0	51.0	57.7	58.9	66.0	59.3	53.3	56.1	59.8	52.3	59.0	54.2	53.3	59.4	59.2	60.7
BZT ₅ ścieków surowych mgO ₂ /dm ³		123								176							
BZT ₅ ścieków oczyszczonych mgO ₂ /dm ³	1	54	59	62	67	68	67	65	63	72	92	94	81	69	68	66	66
	2	27	31	28	25	26	28	24	27	41	34	31	34	36	37	39	43
	3	30	27	31	28	27	25	26	25	35	39	25	27	26	25	26	27
Obciążenie osadu ładunkiem BZT ₅ mg O ₂ / mg s.m. / d	1	0.025	0.027	0.03	0.027	0.029	0.028	0.028	0.026	0.04	0.041	0.039	0.035	0.033	0.033	0.034	0.033
	2	0.025	0.024	0.027	0.026	0.024	0.025	0.024	0.024	0.032	0.033	0.034	0.041	0.042	0.042	0.044	0.044
	3	0.025	0.024	0.024	0.022	0.025	0.023	0.021	0.022	0.033	0.028	0.029	0.03	0.029	0.03	0.029	0.029
Obciążenie osadu związkami olejowymi mg oleju napędowego / mg s.m. / d	1	0.04	0.044	0.049	0.043	0.047	0.045	0.047	0.043	0.091	0.093	0.089	0.078	0.074	0.075	0.077	0.075
	2	0.04	0.039	0.043	0.042	0.038	0.04	0.038	0.039	0.073	0.074	0.077	0.093	0.095	0.095	0.1	0.1
	3	0.04	0.039	0.038	0.036	0.04	0.037	0.033	0.035	0.068	0.063	0.066	0.068	0.066	0.068	0.067	0.066
ChZT ścieków surowych mg/dm ³		205								293							
ChZT ścieków oczyszczonych mg/dm ³	1	125	131	138	142	145	147	145	143	198	208	205	195	190	191	193	197
	2	74	74	71	70	65	64	62	60	112	110	101	94	95	96	94	97
	3	79	61	82	79	75	76	74	72	109	105	102	80	76	74	76	73
Odczyn ścieków odpływających	1	7.5	7.5	7.6	7.8	8.0	7.8	7.7	7.5	7.8	7.8	7.7	7.5	7.6	7.7	7.6	7.6
	2	7.5	7.6	7.5	7.5	7.7	7.6	7.5	7.5	7.6	7.7	7.8	7.8	8.0	8.1	8.0	8.0
	3	7.5	7.4	7.5	7.5	7.6	7.6	7.5	7.3	7.5	7.6	7.5	7.6	7.6	7.5	7.5	7.5

Tabela 10. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (O.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (O.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (O.III) (1 seria).

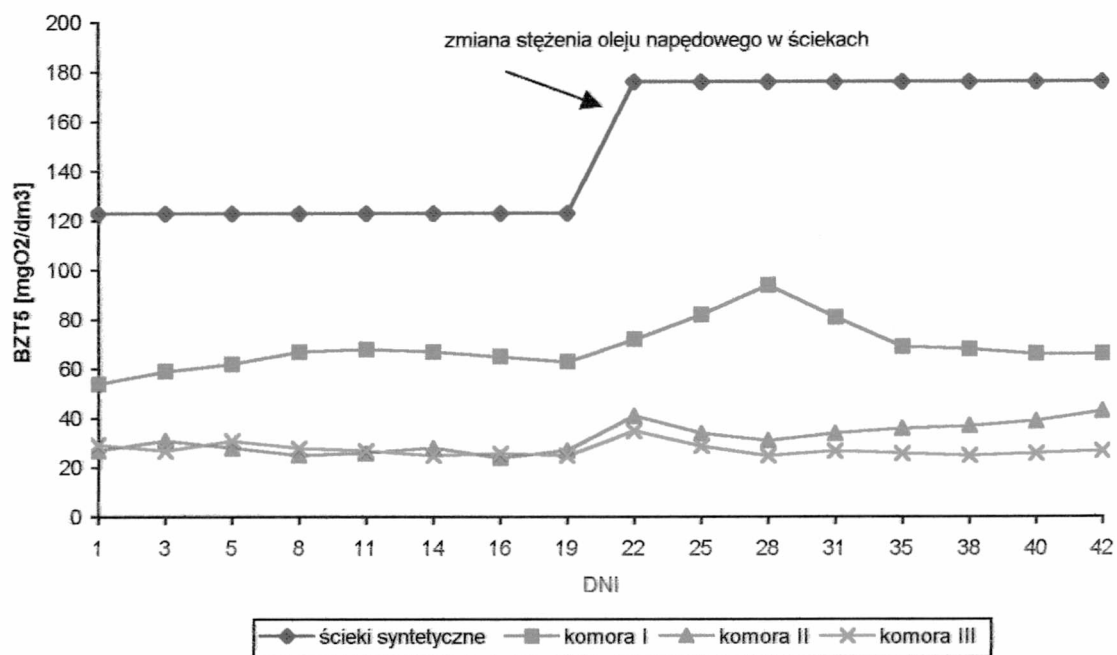
Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :															
Dni	Ekstraktu eterowego					Chromatografii gazowej					OWO				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I
1	82,4	95,7	93,2	13,3	10,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	80,7	93,1	90,7	12,4	10,0	86,2	97,9	99,3	11,7	13,1	93,3	95,3	94,9	2,0	1,6
5	79,2	92,0	92,1	12,8	12,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	80,4	95,7	94,2	15,3	13,8	85,6	96,7	97,9	11,1	12,3	87,4	91,2	90,4	3,8	3,0
11	83,7	90,3	90,8	6,6	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	87,2	91,2	97,1	4,0	9,9	87,8	96,0	95,4	8,2	7,6	90,1	92,7	91,3	2,6	1,2
16	89,1	90,4	90,2	1,3	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	87,2	93,1	95,6	5,9	8,4	85,4	93,2	92,1	7,8	6,7	90,3	97,2	95,7	6,9	5,4
22	71,4	80,2	85,4	8,8	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	75,4	79,3	85,7	3,9	10,3	71,2	87,1	90,4	15,9	19,2	87,3	90,1	94,1	2,8	6,8
28	75,0	81,4	89,0	6,4	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	79,4	94,7	95,2	15,3	15,8	69,5	89,2	91,2	19,7	21,7	85,2	90,0	92,1	4,8	6,9
35	87,1	90,7	93,1	3,6	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	85,2	91,2	92,7	6,0	7,5	73,4	88,1	89,7	14,7	16,3	90,3	89,3	90,4	n.m.p.	0,1
40	87,3	92,1	94,2	4,8	6,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	84,1	90,4	96,1	6,3	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Śred.	82,2	90,1	92,2	7,9	10,0	79,9	92,6	93,7	12,7	13,8	89,1	92,3	92,7	3,2	3,6

n.m.p.- nie można policzyć

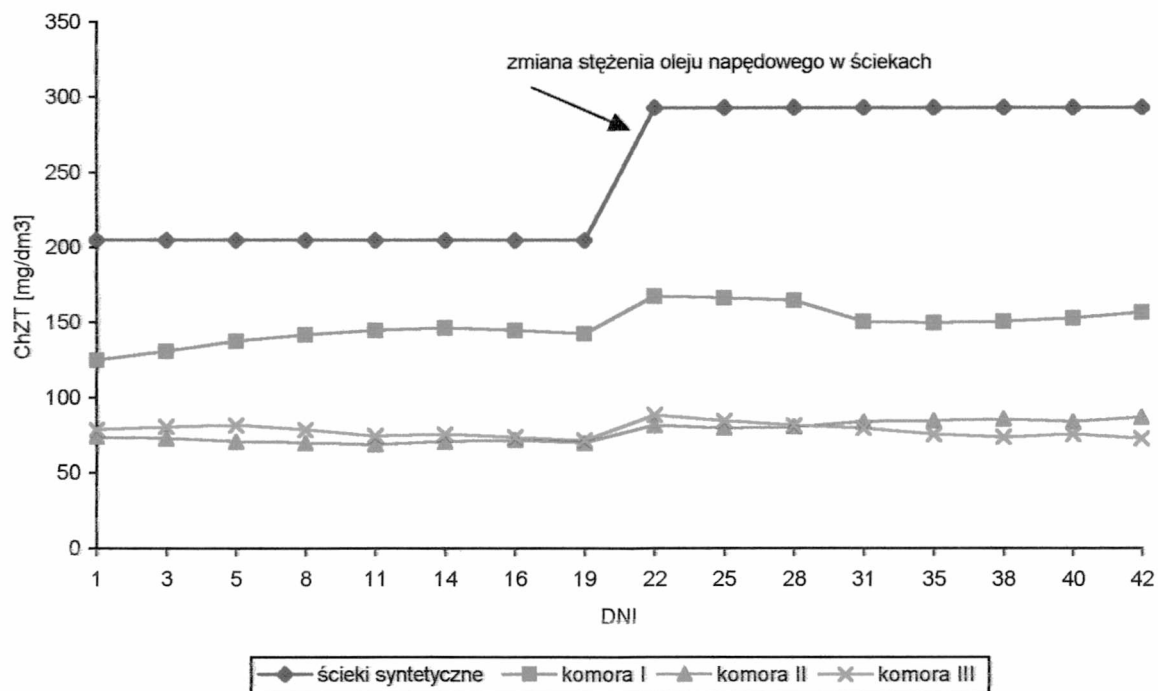
Tabela 11. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań BZT₅ i ChZT, przez osad czynny (0.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III) (1 seria).

Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań:										
	BZT ₅					ChZT				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I
1	56,1	78,0	75,6	21,9	19,5	39,0	63,9	61,5	24,9	22,5
3	52,0	74,8	78,0	22,8	26,0	36,1	63,9	70,2	27,8	34,1
5	49,6	77,2	74,8	27,6	25,2	32,7	65,4	60,0	32,7	27,3
8	45,5	79,7	77,2	34,2	31,7	30,7	65,9	61,5	35,2	30,8
11	44,7	78,9	78,0	34,2	33,3	28,3	68,3	63,4	39,0	34,1
14	45,5	77,2	79,7	31,7	34,2	28,3	68,9	62,9	40,6	34,6
16	47,2	80,5	78,9	33,3	31,7	29,3	69,8	63,8	40,5	34,6
19	48,8	78,0	79,7	29,2	30,9	30,2	70,7	64,9	40,5	34,7
22	59,1	76,7	80,1	17,6	21,0	32,4	61,7	62,8	29,3	30,4
25	48,0	80,7	78,0	32,7	30,0	29,0	62,5	64,2	33,5	35,2
28	46,6	82,4	85,8	35,8	39,2	30,0	65,5	65,2	35,5	35,2
31	54,0	80,7	84,7	26,7	30,7	33,4	67,9	72,6	34,5	39,2
35	60,8	79,5	85,2	18,7	24,4	35,2	67,6	74,1	32,4	39,5
38	61,4	79,0	85,8	17,6	24,4	34,8	67,2	74,7	32,4	39,9
40	62,5	77,8	85,2	15,3	22,7	34,1	67,9	74,1	33,8	40,0
42	62,5	75,6	84,7	13,1	22,2	32,8	66,9	75,1	34,1	42,3
Śred.	52,8	78,5	80,5	25,7	27,7	32,3	66,5	66,9	34,2	34,6

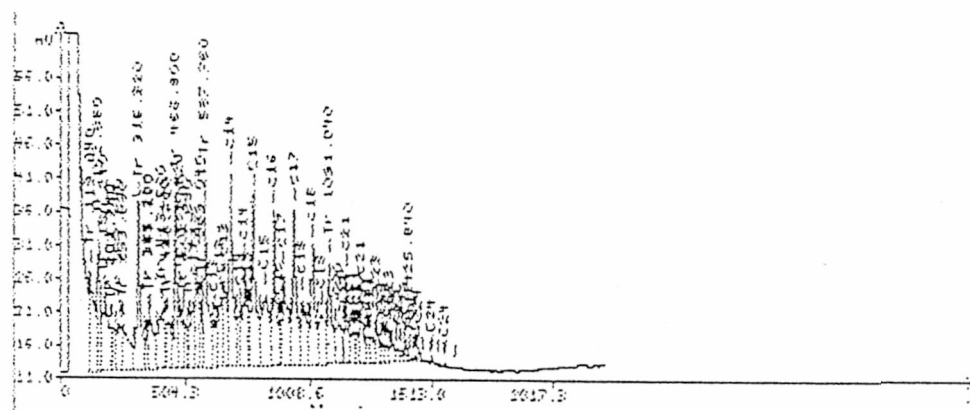
Rys 19. Wartości BZT5 w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (1 seria)



Rys 20. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (1 seria)

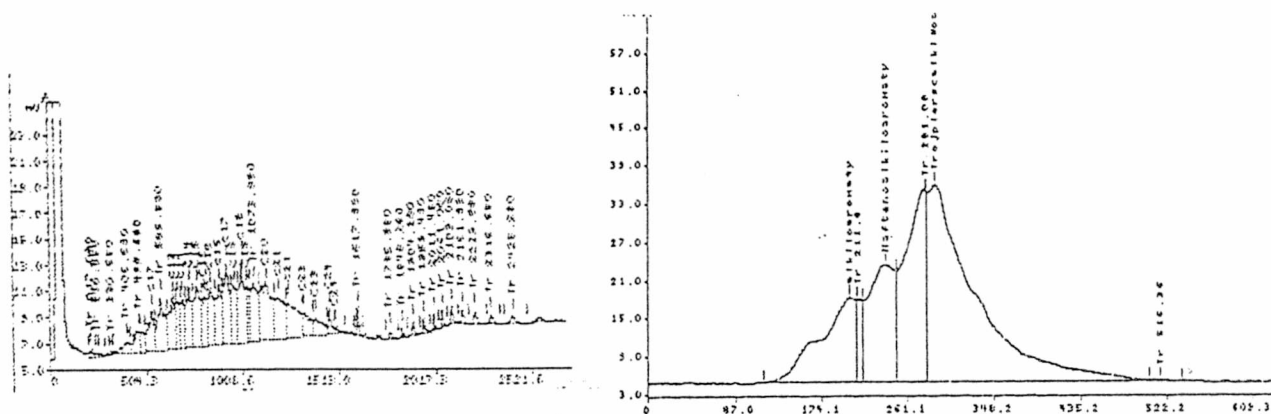


Rysunek 21. Wyniki badań chromatografii gazowej i cieczowej oleju napędowego

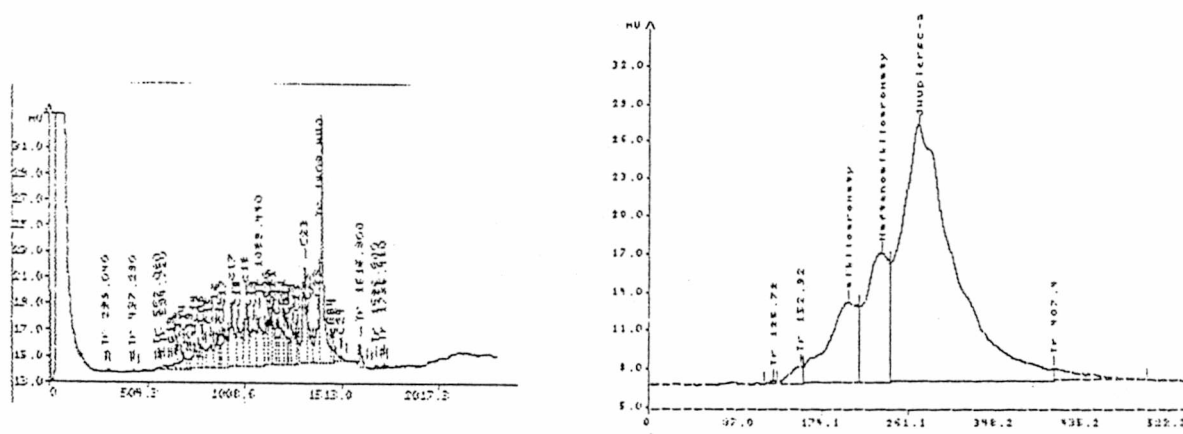


Rysunek 22. Chromatografia gazowa i cieczowa odpywów z komory I po 14, 25 i 38 dniach
(1 seria)

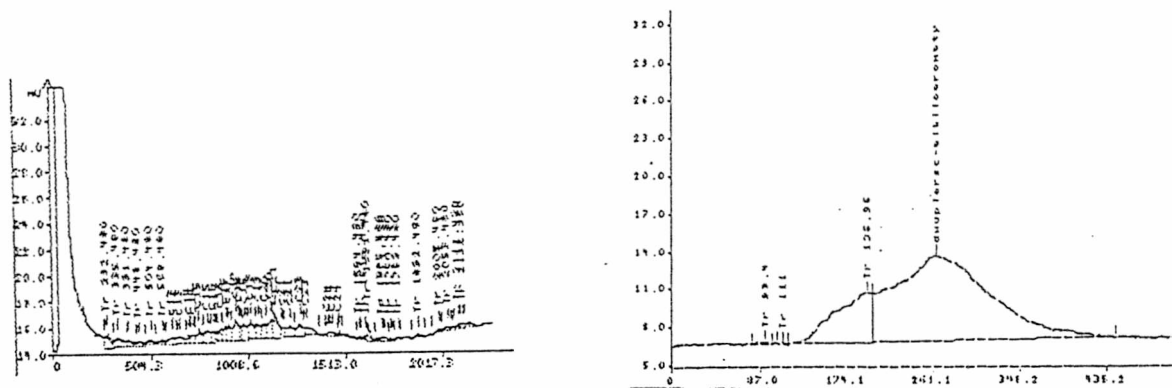
14 dzień



25 dzień

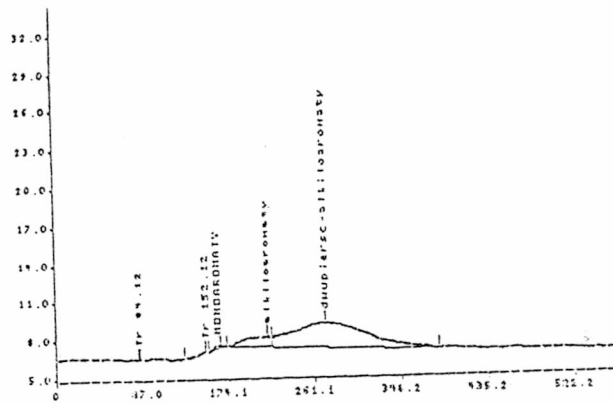
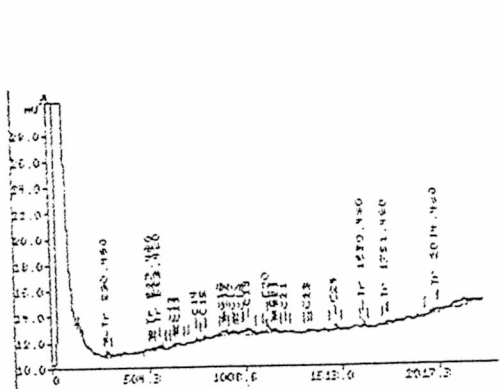


38 dzień

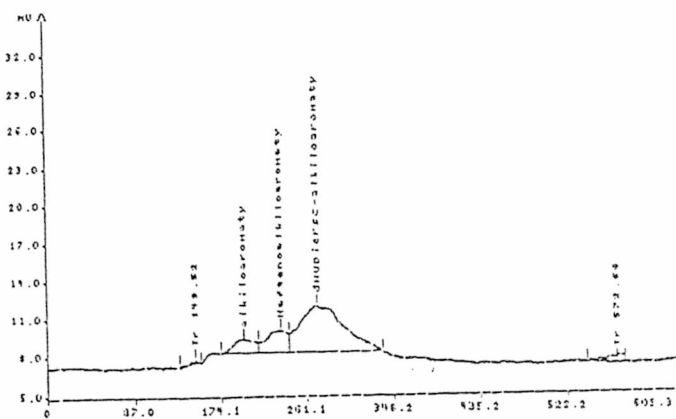
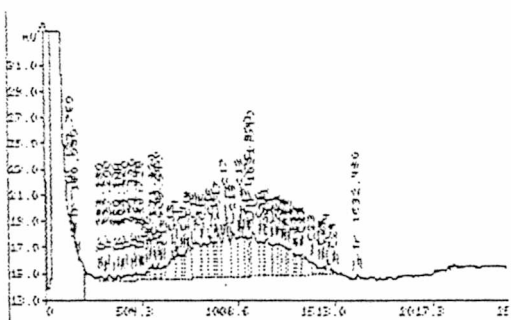


Rysunek 23. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 14, 25 i 38 dniach
(1 seria)

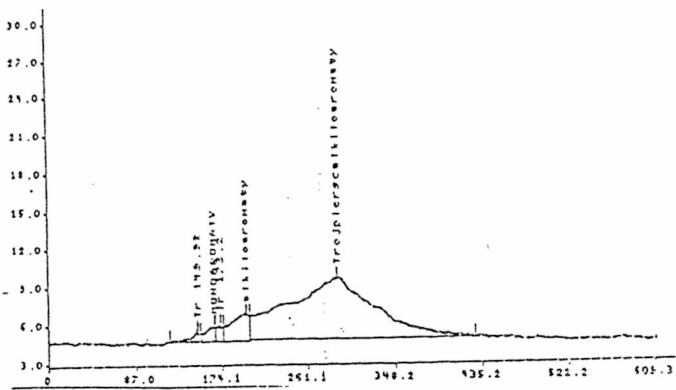
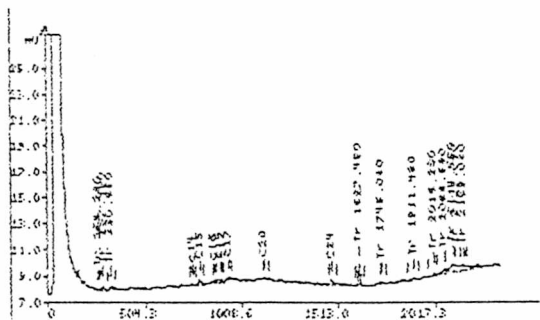
14 dzień



25 dzień

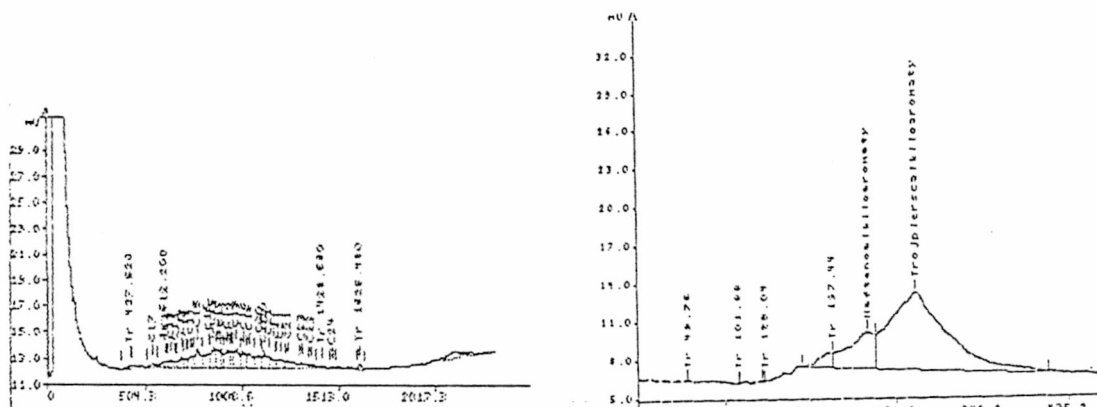


38 dzień



Rysunek 24. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory III po 14, 25 i 38 dniach (1 seria)

14 dzień



4.7.3. Wyniki badań enzymatycznych

Wyniki badań nad aktywnością enzymatyczną biomasy osadu czynnego przedstawiono na rysunkach 25, 26, 27 i 28. Zarówno wartości aktywności dehydrogenazowej (rysunek 25 i 26) jak i aktywności esterazowej (rysunek 27 i 28) były największe dla osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów mikroorganizmów od podstaw na początku trwania eksperymentu. Nieznacznie niższym poziomem aktywności enzymatycznej odznaczał się osad doszczepiany, natomiast aktywność enzymatyczna osadu konwencjonalnego była niższa od pozostałych. Z zamieszczonych rysunków widać iż, w trakcie oczyszczania ścieków z zawartością oleju napędowego, przebieg krzywych dla obu aktywności w przypadku osadu wyhodowanego z aktywnych drobnoustrojów (komora II) i osadu doszczepianego (komora III) był podobny. Wartości aktywności enzymatycznej dla tych osadów systematycznie wzrastały do 21 dnia procesu oczyszczania, po tym czasie obserwowano nieznaczny spadek aktywności a następnie około 22-28 dnia ponowny ich wzrost. Było to związane z pojawieniem się w ściekach większego stężenia oleju napędowego. Po tym czasie obserwowano większe wartości aktywności enzymatycznych dla osadu czynnego doszczepionego w stosunku do osadu czynnego wyhodowanego od podstaw. Najniższą aktywność enzymatyczną obserwowano w komorze pierwszej zawierającej osad konwencjonalny. W pierwszym okresie trwania eksperymentu widoczny był spadek zarówno aktywności dehydrogenazowej jak i aktywności esterazowej tego osadu. Około 8-11 dnia zaobserwowano ich nieznaczny wzrost utrzymujący się do końca badań z wyjątkiem okresu w którym zaczęto do komory dozować większe stężenie oleju napędowego.

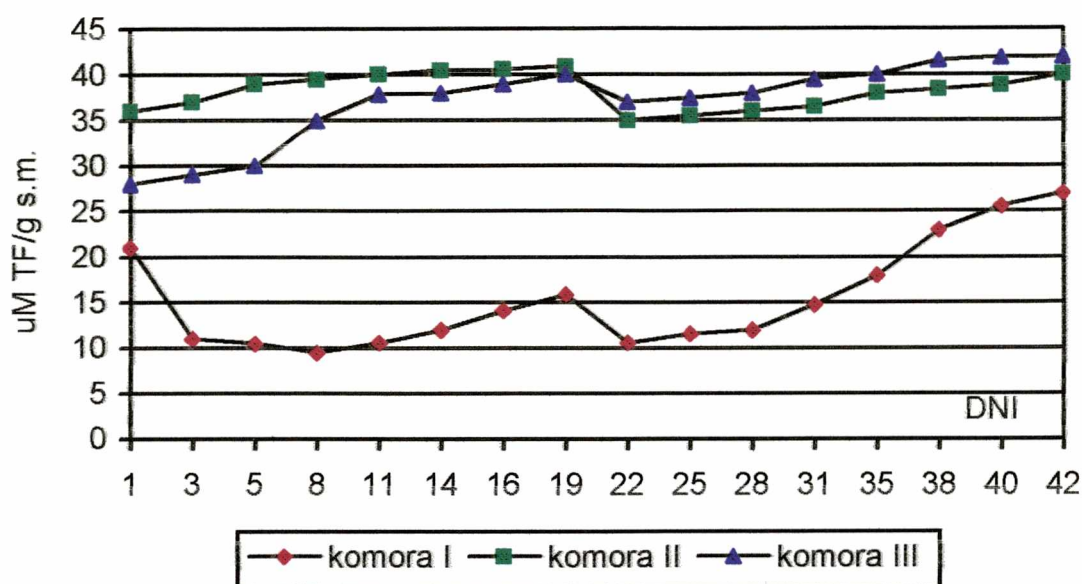
Wartości aktywności dehydrogenazowej, w tej serii badań, w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego (rys.25) zmieniały się w granicach: dla komory I od 9,5 do 27 $\mu\text{M TF/g s.m.}$, dla komory II od 35 do 40 $\mu\text{M TF/g s.m.}$ i dla komory III od 28 do 42 $\mu\text{M TF/g s.m.}$.

Natomiast wartości aktywności dehydrogenazowej w przeliczeniu na zawartość białka w biomase osadu czynnego (rys.26) zmieniały się w granicach: dla komory I od 13 do 21 $\mu\text{M TF/mg}$, dla komory II od 21 do 36 $\mu\text{M TF/mg}$ i dla komory III od 19,7 do 39 $\mu\text{M TF/mg}$.

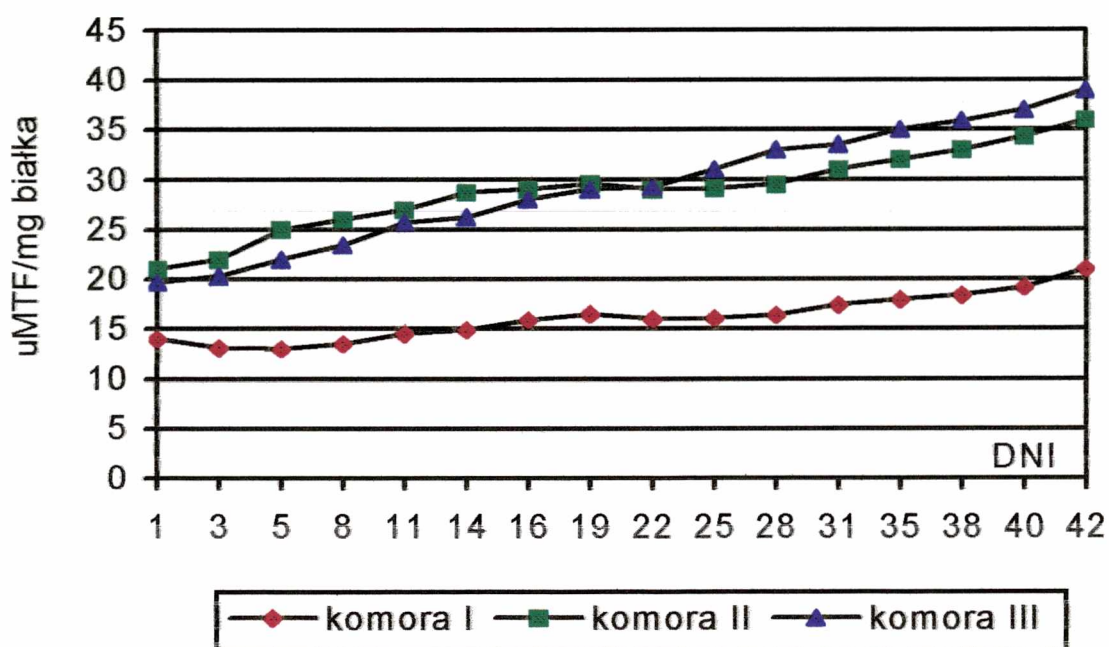
Wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na suchą masę (rys.27) zmieniały się w granicach: dla komory I od 0,5 do 1,6 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$, dla komory II od 1,4 do 2,7 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$ i dla komory III od 1,2 do 2,96 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$

Natomiast wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na zawartość białka (rys.28) zmieniały się w granicach: dla komory I od 2,99 do 10,9 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$, dla komory II od 3,7 do 26,5 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$ i dla komory III od 3,35 do 34,5 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$.

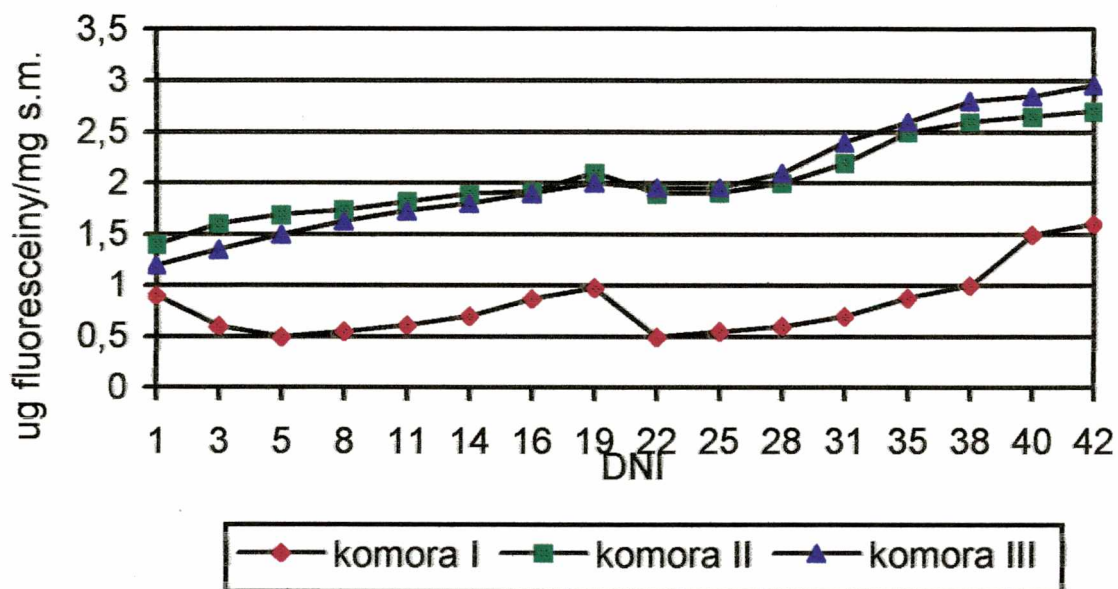
Rys 25. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (1 seria)



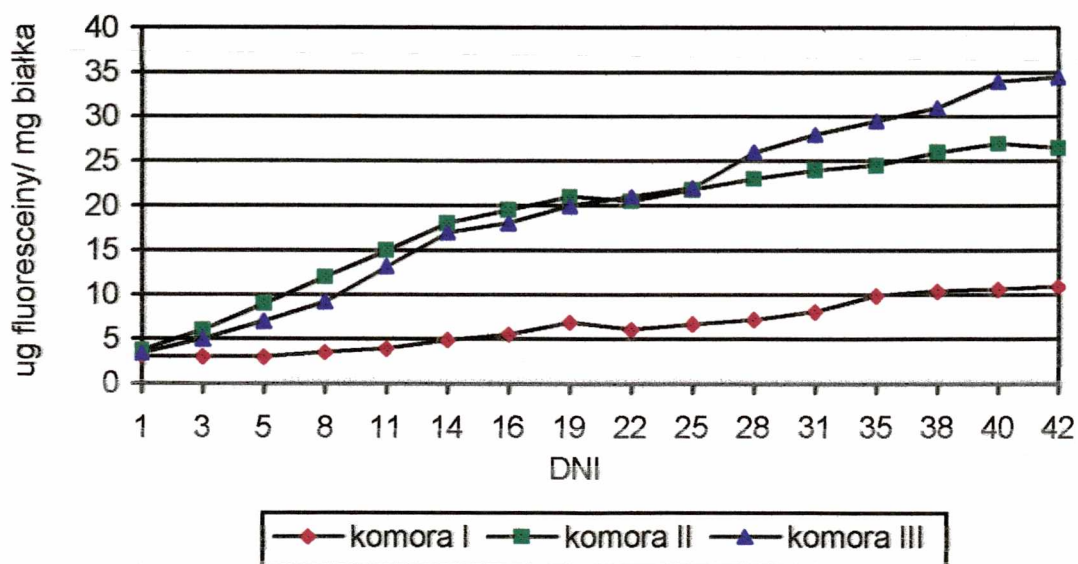
Rys 26. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (1 seria).



Rys 27. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (1 seria).



Rys 28. Zmiany aktywności esterazowej w przeliczeniu na zawartość białka (1 seria).

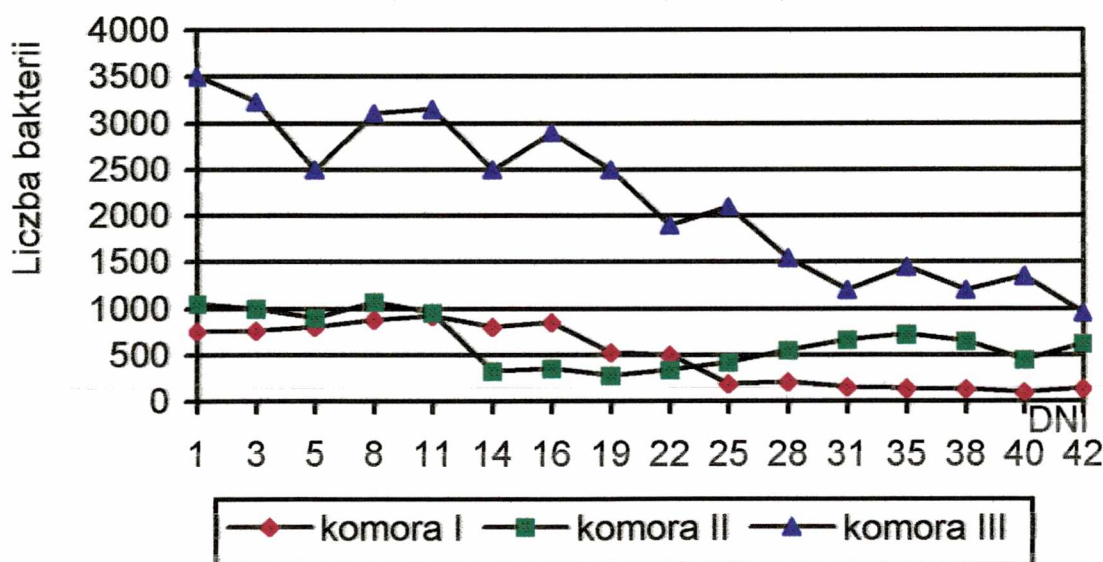


4.7.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnopływających w ściekach oczyszczonych

Miano bakterii rozkładających olej napędowy, w osadzie czynnym, utrzymywało się mniej więcej na tym samym poziomie we wszystkich komorach w czasie trwania badań. Największe rzędu 10^{-7} - 10^{-10} dla osadu w komorze trzeciej, następnie 10^{-7} - 10^{-8} dla osadu w komorze drugiej i 10^{-5} dla osadu konwencjonalnego w komorze pierwszej.

Wyniki badań ogólnej liczby bakterii w odpływach ze wszystkich komór zamieszczono na rysunku 29. W odpływie z komory trzeciej obserwowano największą liczbę bakterii wolnopływających. Jednakże w miarę upływu czasu liczba ich spadała. W odpływach z tej komory zauważono także duże wahania liczby bakterii związane z wprowadzaniem do niej szczepionki bakteryjnej. W odpływach z pozostałych komór liczba bakterii wolnopływających utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie. Ogólna liczba bakterii w odpływie z pierwszej komory wahała się od 102 do 920 w 1 cm^3 . W odpływie z drugiej komory od 273 do 1070 a w odpływie z komory trzeciej od 950 do 3500 w 1 cm^3 ścieków oczyszczonych.

Rys 29. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływających w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm^3 (1 seria).



Podsumowując, tą serię, należy stwierdzić, iż w przypadku dozowania do komór napowietrzania oleju napędowego w stężeniu 200 mg/dm^3 a następnie od 22 dnia w stężeniu 400 mg/dm^3 , obserwowano bardzo podobne efekty oczyszczania w przypadku osadu doszczepianego i wyhodowanego z aktywnych szczepów. Na początku badań osad wyhodowany od podstaw odznaczał się nieco lepszymi efektami w biodegradacji oleju napędowego lecz w miarę upływu czasu sytuacja odwróciła się i trochę lepsze efekty obserwowano dla osadu doszczepianego. Średni stopień usuwania zanieczyszczeń obliczony na podstawie badań pięciu parametrów (obniżenia wartości BZT₅ i ChZT, badań ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i OWO) potwierdza te obserwacje (tabela 22). Osad doszczepiany w komorze III usuwał zanieczyszczenia ze średnią skutecznością 85,2%, natomiast osad wyhodowany z aktywnych drobnoustrojów w komorze II ze średnią

skutecznością 84%. Najmniejszą średnią skutecznością odznaczał się osad konwencjonalny w komorze I. Wynosiła ona 67,3%. Potwierdzeniem tego była również aktywność enzymatyczna stosowanych osadów czynnych, która była znacznie wyższa w osadzie II i III w porównaniu do osadu I. Natomiast niekorzystnym objawem była utrzymująca się duża liczebność bakterii wolnopływających w odpływie ścieków z komory III z osadem doszczepianym.

4.8. Osad czynny średnioobciążony- wyniki drugiej serii badań

W drugiej serii porównywano efektywność biologicznego rozkładu ścieków zawierających olej napędowy przez osad czynny konwencjonalny, osad czynny wyhodowany od podstaw z aktywnych szczepów i przez osad czynny doszczepiany. W trakcie tych badań do komór napowietrzania dozowano ścieki syntetyczne zawierające początkowo 600 mg oleju napędowego /dm³, od 22 dnia badań 800 mg oleju napędowego /dm³, a następnie od 43 dnia badań 1000 mg oleju napędowego /dm³.

4.8.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych

Parametry biotechnologiczne osadów czynnych w poszczególnych komorach przedstawiono w tabeli 12.

Wyjściowy indeks osadów został ustalony na poziomie 61,0-65,9 cm³/g co odpowiadało objętości osadów 300-330 cm³/dm³ i zawartości suchej masy 4,9-5,1 g/dm³. W trakcie badań stwierdzono największy wzrost indeksu objętościowego przy jednoczesnym spadku zawartości biomasy w przypadku osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów, zwłaszcza gdy stężenie oleju napędowego w ściekach wynosiło 1000 mg/dm³. Osad konwencjonalny charakteryzował się niewielkim spadkiem biomasy i wzrostem indeksu objętościowego, natomiast parametry te dla osadu doszczepianego utrzymywały się mniej więcej na stałym poziomie.

W pierwszej komorze zawartość suchej masy osadu czynnego wahała się od 3,0 do 4,9 g/dm³, objętość osadu czynnego po 0,5 godzinnej sedymentacji w leju Imhoffa wynosiła 210-380 cm³/dm³ a indeks objętościowy zmieniał się od 51,6 do 89,8 cm³/g. W drugiej komorze analogiczne wartości wahały się następująco: 2,0-5,9 g s.m./dm³, 200-330 cm³/dm³ i 40,5-118,2 cm³/g. Dla komory trzeciej: 4,7-6,5 g s.m./dm³, 310-390 cm³/dm³ i 52,3-83,2 cm³/g.

Obciążenie osadów czynnych ładunkiem BZT₅ zmieniał się: dla I komory od 0,038 do 0,77 mg O₂/mg s.m./d, dla II komory od 0,031 do 0,15 O₂/mg s.m./d i dla III komory od 0,029 do 0,058 O₂/mg s.m./d. Natomiast obciążenie osadów związkami olejowymi zmieniał się w granicach: dla I komory od 0,121 do 0,329 mg/mg s.m./d., dla II komory od 0,101 do 0,492 mg/mg s.m./d. i dla III komory od 0,092 do 0,195 mg/mg s.m./d.

Odpływy z komór napowietrzania posiadały odczyn w granicach 7,4-8,1.

Zawartość tlenu w komorach wahała się w granicach 1,5-3,1 mg O₂/dm³.

4.8.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego

W tabeli 13 przedstawiono wyniki badań nad ubytkiem oleju napędowego obliczone na podstawie badań ekstraktu eterowego, natomiast w tabeli 14 na podstawie chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego.

Jak widać postęp biodegradacji, określany metodą wagową, był cały czas największy w komorze III z osadem doszczepianym a najmniejszy w komorze I z osadem konwencjonalnym. Jednak w 50 dobie trwania procesu oczyszczania najgorsze wyniki zaczęto uzyskiwać dla komory II zawierającej osad wyhodowany z aktywnych szczepów.

Średni stopień usuwania zanieczyszczeń olejowych, otrzymany w wyniku tych badań, wynosił dla komory I- 63,5%, dla komory II- 74,6% a dla komory III- 85,8%. Wynika z tego więc, iż osad wyhodowany od podstaw rozkładał olej napędowy o 11,1% a osad doszczepiany o 22,3% lepiej niż osad konwencjonalny

Podobnie przedstawiają się wyniki badań chromatograficznych. Badania te przeprowadzono w 2, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 i 57 dobie trwania procesu. W tym przypadku również najlepsze wyniki uzyskano dla osadu czynnego w komorze III a najgorsze dla osadu w komorze I. Średni stopień usuwania składników oleju napędowego, w przypadku tych badań, wynosił 67,9% dla komory I, 73,6 % dla komory II i 83,1 % dla komory III. Otrzymano zatem lepsze wyniki, w stosunku do osadu konwencjonalnego, o 15,2% dla osadu doszczepianego a dla osadu bakteryjnego o 5,7%.

Natomiast wyniki usuwania zanieczyszczeń mierzone ubytkiem ogólnego węgla organicznego wynosiły średnio dla komory I –54,8%, dla komory II- 59,1% (lepsze o około 4,3%) natomiast dla komory III-67,2% (lepsze o około 12,4%).

Różnice w obniżeniu wartości BZT₅ i ChZT pomiędzy ściekami dopływającymi do komór napowietrzania a ściekami oczyszczonymi, ilustrują: tabela 12 i rysunki 30 i 31. W tabeli 13 podano stopień usuwania oleju napędowego przez poszczególne osady w % na podstawie tych badań. Z wyników tych widać iż największe obniżenie wartości BZT₅ i ChZT w stosunku do ścieków syntetycznych uzyskano w komorze III zawierającej osad czynny doszczepiony przy każdym z badanych stężeń oleju napędowego. Natomiast w komorze I i II stopień usuwania zanieczyszczeń olejowych był wyraźnie mniejszy. W komorze I z osadem konwencjonalnym, w czasie gdy ścieki zawierały 600 mg oleju napędowego /dm³, zauważono przejściowe pogorszenie procesu oczyszczania. Ponowne pogorszenie oczyszczania zaobserwowano zarówno około 22 gdy w ściekach pojawił się olej w stężeniu 800 mg/dm³ jak i około 43 dnia gdy zaczęto dozować olej w stężeniu 1000 mg/dm³. Po 43 dniu efektywność oczyszczania w tej komorze zaczęła systematycznie spadać. W komorze II efektywność biodegradacji mierzona na podstawie badań BZT i ChZT utrzymywała się na wysokim poziomie jedynie w pierwszej części badań. Następnie po zwiększeniu stężenia oleju w ściekach malała i osiągnęła wartość zbliżoną do efektywności oczyszczania osadu w komorze I.

Średni stopień usuwania zanieczyszczeń obliczony na podstawie badań BZT₅ dla komory I wynosił 47,8 %, dla komory II 59,0% a dla komory III 69,4%. Doszczepienie osadu czynnego aktywnymi szczepami poprawiło efektywność oczyszczania ścieków olejowych średnio o 21,6% w stosunku do osadu konwencjonalnego. Natomiast osad wyhodowany od podstaw rozkładał olej lepiej niż osad kontrolny o 11,2%.

W przypadku usuwania zanieczyszczeń mierzonych na podstawie badań ChZT, średni stopień usuwania zanieczyszczeń w ciągu całego eksperymentu wynosił dla I komory 32,7%, dla komory II 47,0% a dla komory III 57,7. Poprawiło to efektywność usuwania zanieczyszczeń, w stosunku do osadu konwencjonalnego, o 25,0% dla osadu doszczepionego i o 14,3% dla osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów.

Analizę jakościową produktów pobiodegradacyjnych przeprowadzono na podstawie badań chromatografii gazowej i cieczowej po 20, 38 i 60 dobie badań.

W tym przypadku również w obrazach chromatograficznych pochodzących z odpływów ze wszystkich komór widoczny był ubytek węglowodorów C₆-C₁₂ oraz lekkich węglowodorów aromatycznych (BTX), usuwanych na skutek napowietrzania.

Przez cały okres badań, w odpływach z komory III zauważalne, było największe zmniejszenie spektrów sygnałów w zakresie węglowodorów C₁₂-C₂₄ oraz duże zmniejszenie i rozmycie sygnałów w całym zakresie retencji struktur aromatycznych. W odpływach z komory I i II także zauważalne były te same zmiany jakościowe lecz o nieco większej intensywności sygnałów niż dla komory III. Pod koniec badań pogłębiła się różnica w

intensywności sygnałów pomiędzy komorą III a komorami I i II. W odpływie z komory III obserwowano bowiem dużo mniejsze sygnały w zakresie retencji węglowodorów C_{12} - C_{24} oraz zmniejszenie i rozmycie sygnałów w zakresie retencji związków aromatycznych w porównaniu do analogicznych sygnałów pochodzących z odpływów z komór I i II. Obserwacje te potwierdzają najlepszą skuteczność usuwania oleju w przypadku osadu w komorze III-doszczepianej (rysunek 32, 33 i 34).

4.8.3. Wyniki badań enzymatycznych

Wyniki badań nad aktywnością dehydrogenazową i esterazową mikroflory badanych osadów czynnych zamieszczono na rysunkach 35, 36, 37 i 38. Z zamieszczonych wyników widać iż, obie aktywności enzymatyczne dla osadu czynnego wyhodowanego z aktywnych szczepów i osadu doszczepianego wzrastały od początku doświadczenia do 40 dnia procesu. W tym samym czasie aktywność enzymatyczna osadu czynnego konwencjonalnego malała (8-11 dzień) po czym wyraźnie zaczynała rosnąć. W przypadku tego osadu tendencja wzrostowa aktywności utrzymywała się już do końca badań. Zauważalne były jedynie nieznaczne spadki wartości aktywności enzymatycznych w momencie zwiększania stężenia oleju napędowego w ściekach. Podobny przebieg krzywych aktywności obserwowano w przypadku osadu doszczepianego. Dla tego osadu obserwowano jednak większe wahania wartości aktywności enzymatycznych związane z wprowadzaniem, co pewien czas, szczepionki mikrobiologicznej. Natomiast aktywność dehydrogenazowa i esterazowa osadu czynnego wyhodowanego od podstaw począwszy od 18-40 dnia badań bardzo wyraźnie malała, ale była w dalszym ciągu wyższa niż dla osadu czynnego konwencjonalnego. . Zjawisko to było związane ze wzrostem stężenia oleju w ściekach co doprowadziło do pogorszenia efektów oczyszczania w tej komorze.

Wartości aktywności dehydrogenazowej, w tej serii badań, w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego (rys. 35) zmieniały się w granicach: dla komory I od 10,0 do 23,0 $\mu\text{M TF/g s.m.}$, dla komory II od 24,0 do 36,2 $\mu\text{M TF/g s.m.}$ i dla komory III od 25,0 do 36,0 $\mu\text{M TF/g s.m.}$.

Natomiast wartości aktywności dehydrogenazowej w przeliczeniu na zawartość białka w biomasie osadu czynnego (rys.36) zmieniały się w granicach: dla komory I od 10,5 do 18,5 $\mu\text{M TF/mg}$, dla komory II od 19,5 do 25,1 $\mu\text{M TF/mg}$ i dla komory III od 16,1 do 27,3 $\mu\text{M TF/mg}$.

Wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na suchą masę (rys. 37) zmieniały się w granicach: dla komory I od 0,4 do 1,5 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$, dla komory II od 1,41 do 2,18 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$ i dla komory III od 1,2 do 2,6 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$.

Natomiast wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na zawartość białka (rys. 38) zmieniały się w granicach: dla komory I od 0,3 do 7,8 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$, dla komory II od 5,04 do 13,4 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$ i dla komory III od 2,0 do 15,8 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$.

Tabela 12 . Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (2 seria).

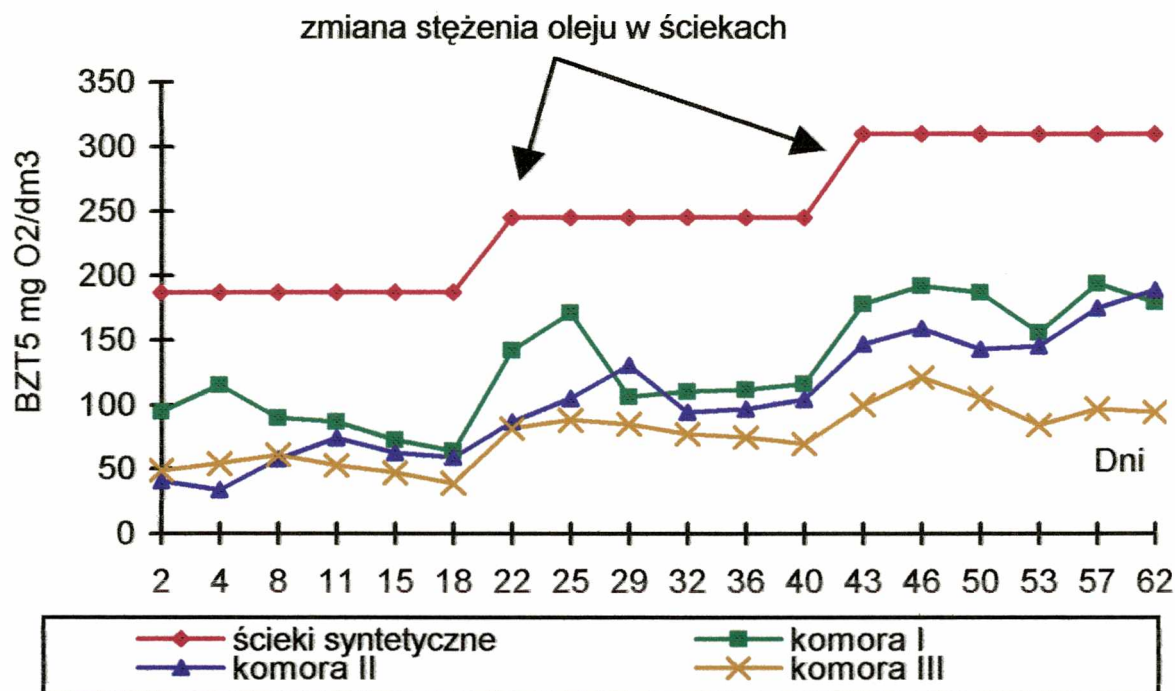
Parametr	Numer komory	D N I :																	
		2	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	40	43	46	50	53	57	62
Objętość osadu po 0,5 godzinnej sedymencie w leju Imhoffa cm ³ /dm ³	1	300	370	380	370	360	350	310	280	230	280	290	250	210	250	210	220	220	210
	2	330	300	300	290	220	250	230	240	200	280	210	290	250	200	270	240	230	250
	3	310	390	390	350	380	370	380	340	360	310	290	330	320	350	310	340	320	310
Sucha masa mg/dm ³	1	4920	4881	4695	4120	4728	4210	3742	3176	3731	3981	4019	4842	3032	3640	3730	3100	3100	3150
	2	5010	5293	5482	5950	5437	5495	4120	4125	4425	4018	3675	3023	2784	2190	2372	2031	2120	2339
	3	5100	4687	6352	6512	6327	6102	5582	6126	6394	5301	4810	5734	5123	6245	5930	6121	5495	5342
Indeks osadu cm ³ /g	1	61,0	75,8	80,9	89,8	76,1	83,1	82,8	69,3	61,6	70,3	72,2	51,6	69,3	68,7	56,3	71,0	71,0	66,6
	2	65,9	56,7	54,7	48,7	40,5	45,5	55,8	58,1	45,1	69,7	57,1	95,9	89,8	91,3	113,8	118,2	108,5	106,9
	3	60,8	83,2	61,4	53,7	60,1	60,6	68,1	55,5	56,3	58,5	60,3	57,6	62,5	56,0	52,3	55,5	58,2	58,0
BZT ₅ ścieków surowych mgO ₂ /dm ³		187						245						310					
BZT ₅ ścieków oczyszczonych mgO ₂ /dm ³	1	95	115	90	87	73	64	142	171	106	110	112	116	178	192	187	156	194	180
	2	41	34	58	74	63	59	87	105	131	94	97	104	147	159	143	146	175	189
	3	49	54	61	53	47	39	82	88	85	77	75	70	100	121	105	84	97	94
Obciążenie osadu ładunkiem BZT ₅ mg O ₂ /mg s.m./d	1	0,038	0,038	0,04	0,045	0,04	0,044	0,065	0,77	0,066	0,062	0,061	0,051	0,10	0,085	0,083	0,10	0,10	0,098
	2	0,037	0,035	0,034	0,031	0,034	0,034	0,059	0,059	0,055	0,061	0,067	0,081	0,11	0,14	0,13	0,15	0,15	0,13
	3	0,036	0,04	0,029	0,029	0,03	0,031	0,044	0,04	0,038	0,046	0,051	0,043	0,06	0,05	0,052	0,05	0,056	0,058
Obciążenie osadu związkami olejowymi mg oleju napędowego /mg s.m. /d	1	0,121	0,123	0,128	0,146	0,127	0,143	0,214	0,252	0,214	0,200	0,199	0,165	0,329	0,275	0,268	0,323	0,323	0,317
	2	0,119	0,113	0,113	0,101	0,110	0,109	0,194	0,194	0,181	0,199	0,218	0,265	0,359	0,457	0,422	0,492	0,492	0,428
	3	0,117	0,128	0,094	0,092	0,095	0,098	0,143	0,131	0,125	0,151	0,166	0,140	0,195	0,16	0,169	0,163	0,182	0,187
ChZT ścieków surowych mg/dm ³		373						485						646					
ChZT ścieków oczyszczonych mg/dm ³	1	192	290	276	279	291	251	355	342	265	220	280	290	445	320	374	520	485	616
	2	136	113	185	202	200	181	255	262	327	235	303	288	367	310	286	365	350	500
	3	186	205	150	152	165	125	195	216	143	205	197	224	270	290	230	270	310	276
Odczyn ścieków odpływających	1	7,5	7,8	7,8	7,9	7,8	7,9	8,0	7,8	7,7	7,7	7,8	7,7	7,8	7,9	7,7	7,7	7,8	7,8
	2	7,4	7,4	7,5	7,6	7,7	7,9	7,7	7,7	7,9	8,0	8,1	8,0	7,9	8,1	8,1	8,0	8,0	8,1
	3	7,5	7,5	7,4	7,5	7,5	7,6	7,6	7,5	7,6	7,7	7,6	7,6	7,7	7,6	7,6	7,7	7,6	7,6

Tabela 13. Różnice w usuwaniu oleju napędowego na podstawie badań BZT₅, ChZT i ekstraktu eterowego, przez osad czynny (0.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III) (2 seria).

Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :															
Dni	BZT ₅					ChZT					Ekstrakt eterowy				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I
2	49,2	78,1	73,8	28,9	24,6	48,5	63,5	50,1	15,0	1,6	74,2	93,1	96,0	18,9	21,8
4	38,5	81,8	71,1	43,3	32,6	22,2	69,7	45,0	47,5	22,8	70,4	90,2	93,2	19,8	22,8
8	51,9	69,0	67,4	17,1	15,5	26,0	50,4	59,8	24,4	33,8	69,1	89,7	92,1	23,0	20,6
11	53,5	60,4	71,7	6,9	18,2	25,2	45,8	59,2	20,6	34,0	71,2	90,3	89,6	19,1	18,4
15	61,0	66,3	74,9	5,3	13,9	22,0	46,4	55,8	24,4	33,8	70,8	88,0	94,0	17,2	23,2
18	65,8	68,4	79,1	2,6	13,3	32,7	51,5	66,5	18,8	33,8	71,3	82,1	90,5	10,8	19,2
22	42,0	64,5	66,5	22,5	24,5	26,8	47,4	59,8	20,6	33,0	64,2	80,3	89,2	16,1	25,0
25	30,2	57,1	64,1	26,9	33,9	29,5	46,0	55,5	16,5	26,0	60,2	78,1	89,7	17,9	29,5
29	56,7	46,5	65,3	n.m.p.	8,6	45,4	32,6	70,5	n.m.p.	25,1	62,1	76,2	87,0	14,1	24,9
32	55,1	61,6	68,6	6,5	13,5	54,6	51,5	57,7	n.m.p.	3,1	65,0	84,4	86,6	21,6	19,4
36	54,3	60,4	69,4	6,1	15,1	42,3	37,5	59,4	n.m.p.	21,9	69,1	82,3	87,1	13,2	18,0
40	52,7	57,6	71,4	4,9	18,7	40,2	40,6	53,8	0,4	13,2	68,3	80,2	89,2	11,9	20,9
43	42,6	52,6	67,7	10,0	25,1	31,1	43,2	58,2	12,1	27,1	52,0	74,0	82,3	22,0	30,3
46	38,1	48,7	61,0	10,6	22,9	50,5	52,0	55,1	1,5	4,6	53,1	67,2	78,4	14,1	25,3
50	39,7	53,9	66,1	14,7	39,7	42,1	55,7	64,4	13,6	22,3	56,5	53,0	72,5	n.m.p.	16,0
53	49,7	52,9	72,9	3,2	23,2	19,5	43,5	58,2	24,0	38,7	55,6	52,0	76,1	n.m.p.	20,5
57	37,4	43,6	68,7	6,2	31,3	24,9	45,8	52,0	20,9	27,1	55,0	41,0	74,1	n.m.p.	19,1
62	41,9	39,0	69,7	n.m.p.	27,8	4,6	22,6	57,3	18,0	52,7	55,6	42,3	77,3	n.m.p.	21,7
Śred.	47,8	59,0	69,4	11,2	21,6	32,7	47,0	57,7	14,3	25,0	63,5	74,6	85,8	11,1	22,3

n.m.p. – nie można policzyć

Rys. 30. Wartości BZT₅ w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (2 seria)



Rys. 31. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (2 seria)

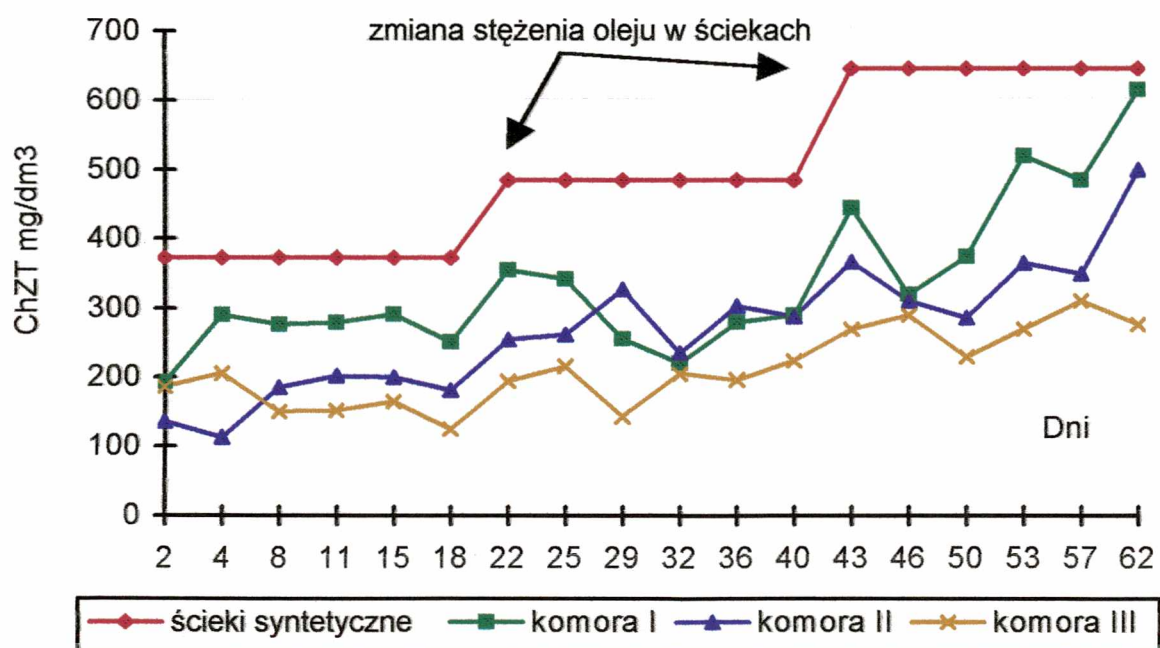


Tabela 14. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (0.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III) (2seria).

Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :										
Dni	Chromatografia gazowa					OWO				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I
2	58,5	64,0	72,0	5,5	13,5	31,0	35,0	32,0	4,0	1,0
8	65,0	72,0	88,5	7,0	23,5	45,0	40,0	52,0	n.m.p.	7,0
15	78,0	87,0	94,5	9,0	16,5	67,0	72,0	84,0	5,0	17,0
22	79,0	86,0	91,0	7,0	12,0	65,0	71,5	86,0	6,5	21,0
29	75,0	81,0	87,0	6,0	12,0	61,0	69,5	82,0	8,5	21,0
36	67,5	70,0	85,0	2,5	17,5	58,0	65,0	78,0	7,0	20,0
43	69,0	72,0	80,5	3,0	11,5	59,0	62,0	67,0	3,0	8,0
50	63,5	69,0	75,0	5,5	11,5	55,0	59,0	62,0	4,0	7,0
57	55,5	61,0	74,0	5,5	18,5	52,0	57,0	61,5	5,5	9,6
Śred	67,9	73,6	83,1	5,7	15,2	54,8	59,1	67,2	4,3	12,4

n.m.p.- nie można policzyć

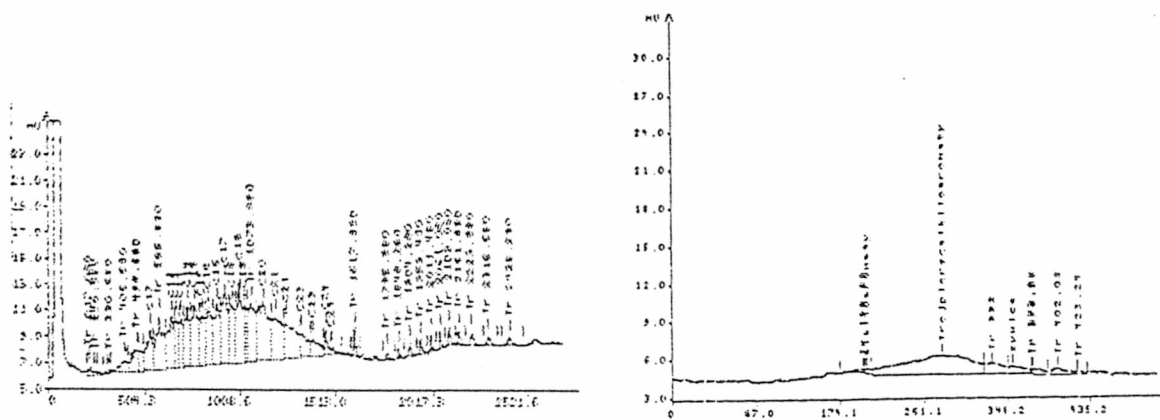
4.8.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych.

Miano bakterii rozkładających olej napędowy w biomase osadu czynnego utrzymywało się mniej więcej na tym samym poziomie w dwóch komorach. W komorze drugiej zawierającej osad bakteryjny wynosiło od 10^{-7} do 10^{-9} , natomiast w komorze trzeciej zawierającej osad doszczepiany od 10^{-6} do 10^{-10} . Dla osadu konwencjonalnego w komorze pierwszej miano bakterii wykorzystujących olej napędowy w charakterze jedyne źródła węgla i energii było bardzo niskie na początku eksperymentu rzędu 10^{-2} , jednak w rezultacie stałej obecności oleju w ściekach zwiększyło się do 10^{-6} .

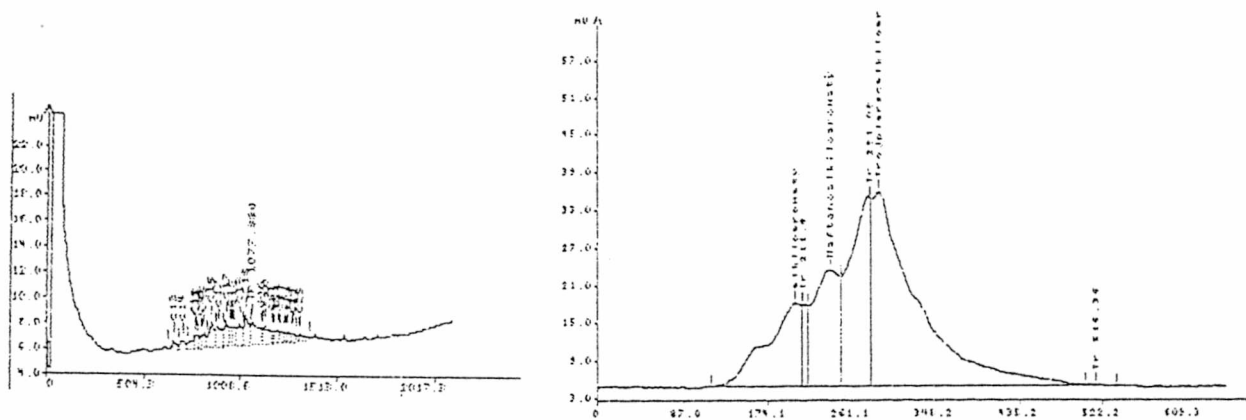
Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnożyjących w odpływach z poszczególnych komór zamieszczono na rysunku 39. W odpływie z komory trzeciej-doszczepianej obserwowano największą liczbę bakterii wolnożyjących. Liczba ta wahała się w granicach 2310-3870 w 1 cm^3 . Jednocześnie w odpływie z tej komory obserwowano największe wahania liczby bakterii związane z wprowadzaną, co pewien czas, szczepionką bakteryjną. Równocześnie w miarę upływu czasu liczba bakterii w ściekach oczyszczonych nieznacznie spadała. W odpływach z pozostałych komór liczba bakterii wolnożyjących utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie. Ogólna liczba bakterii w odpływie z pierwszej komory wahała się od 600 do 1670 w 1 cm^3 a w odpływie z drugiej komory od 880 do 1630 w 1 cm^3 ścieków oczyszczonych.

Rysunek 32. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory I po 20, 38 i 60 dniach (2 seria)

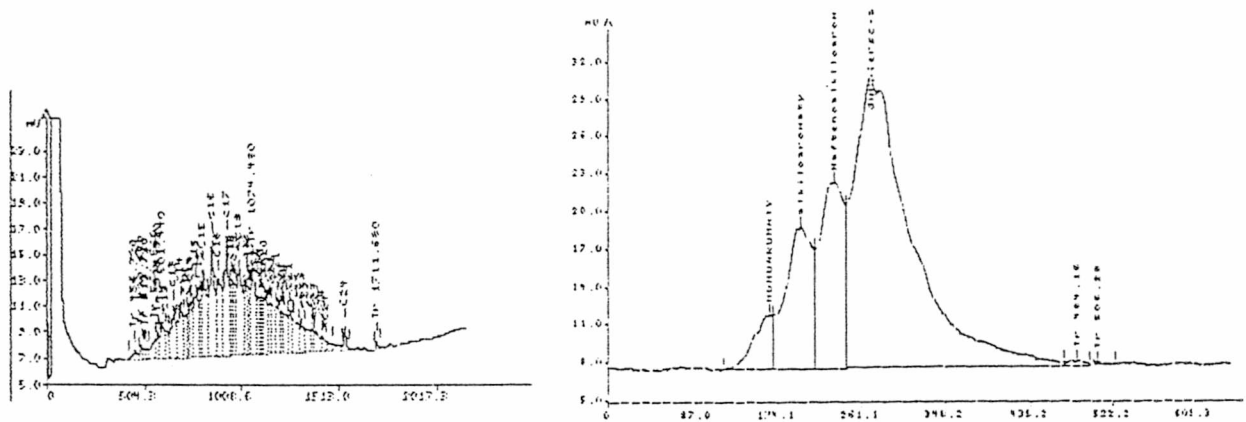
20 dzień



38 dzień

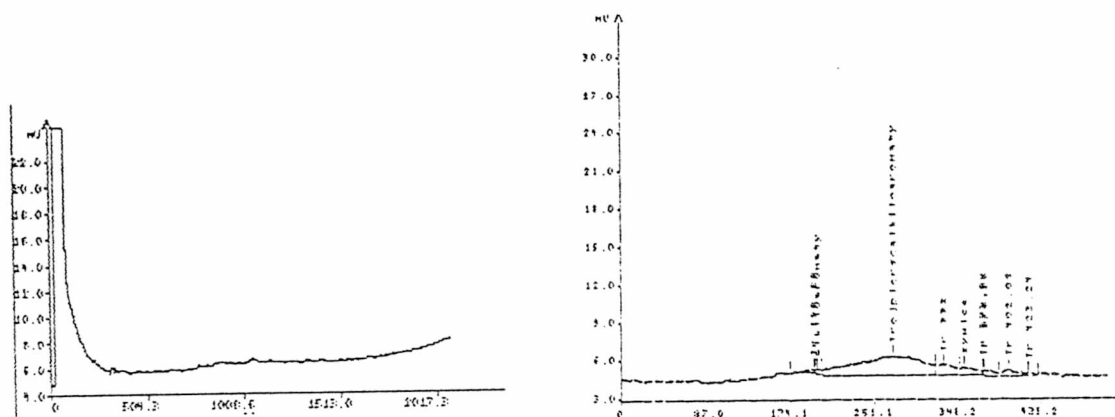


60 dzień

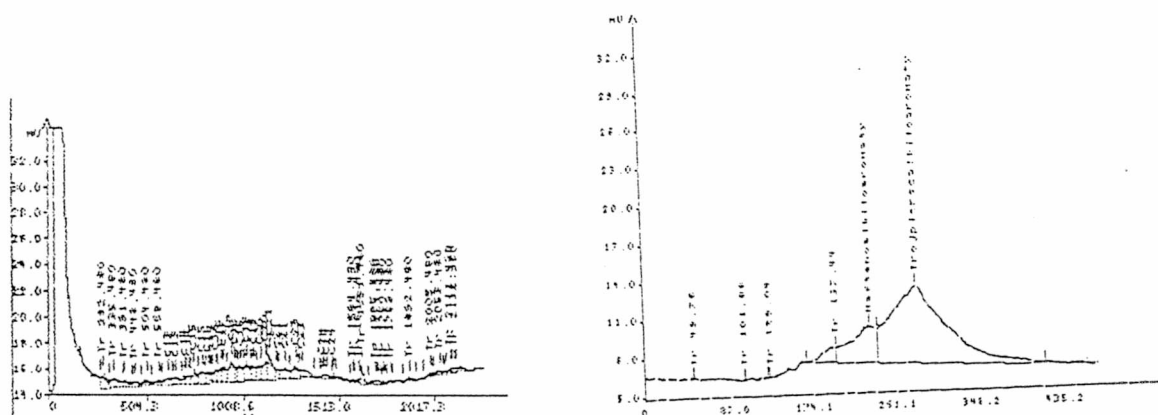


Rysunek 33. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 20, 38 i 60 dniach (2 seria)

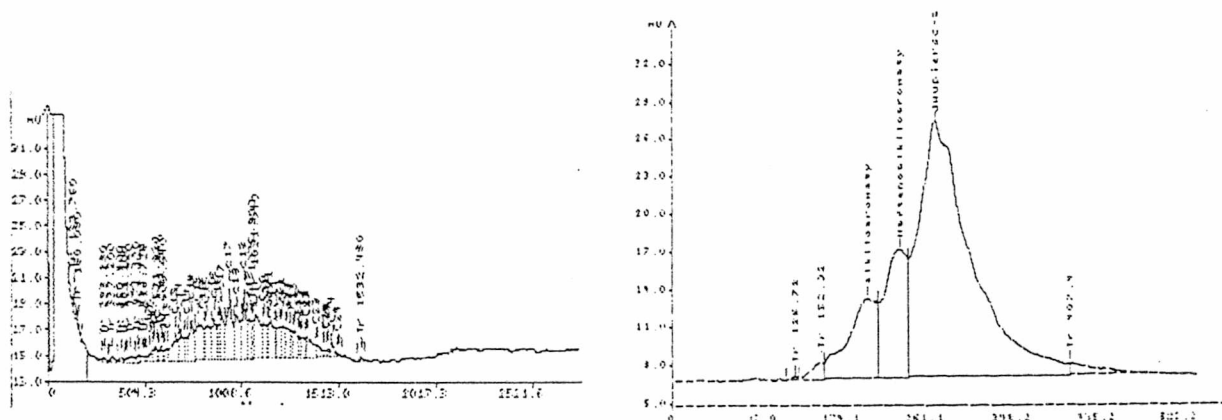
20 dzień



38 dzień

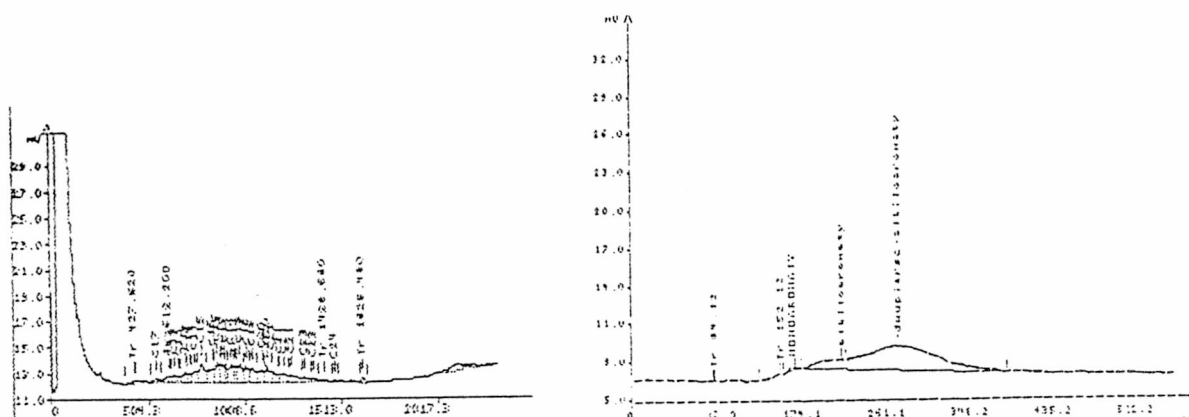


60 dzień

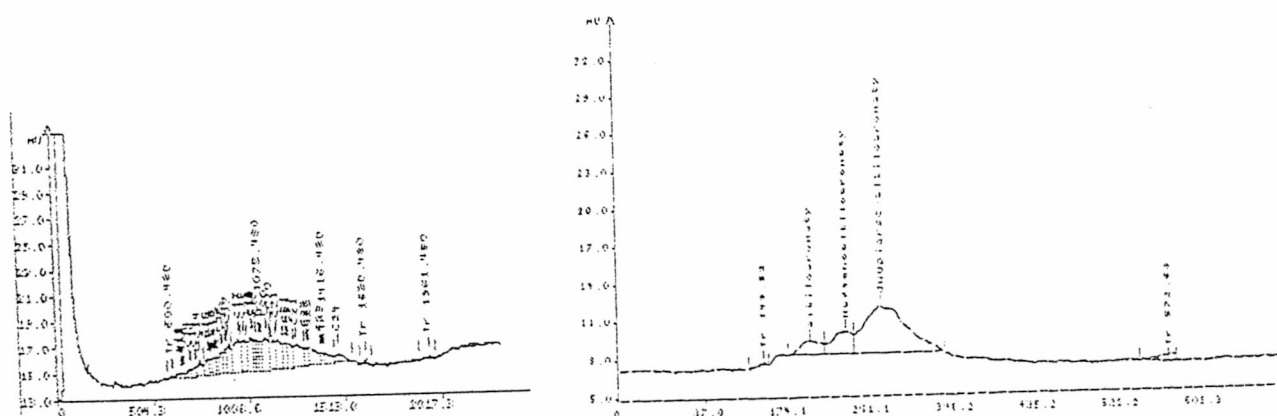


Rysunek 34. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory III po 20, 38 i 60 dniach (2 seria)

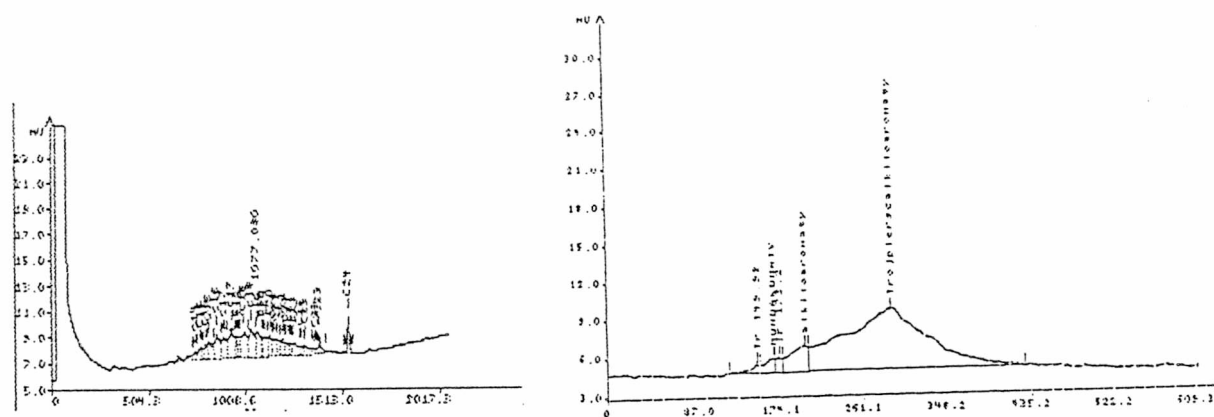
20 dzień



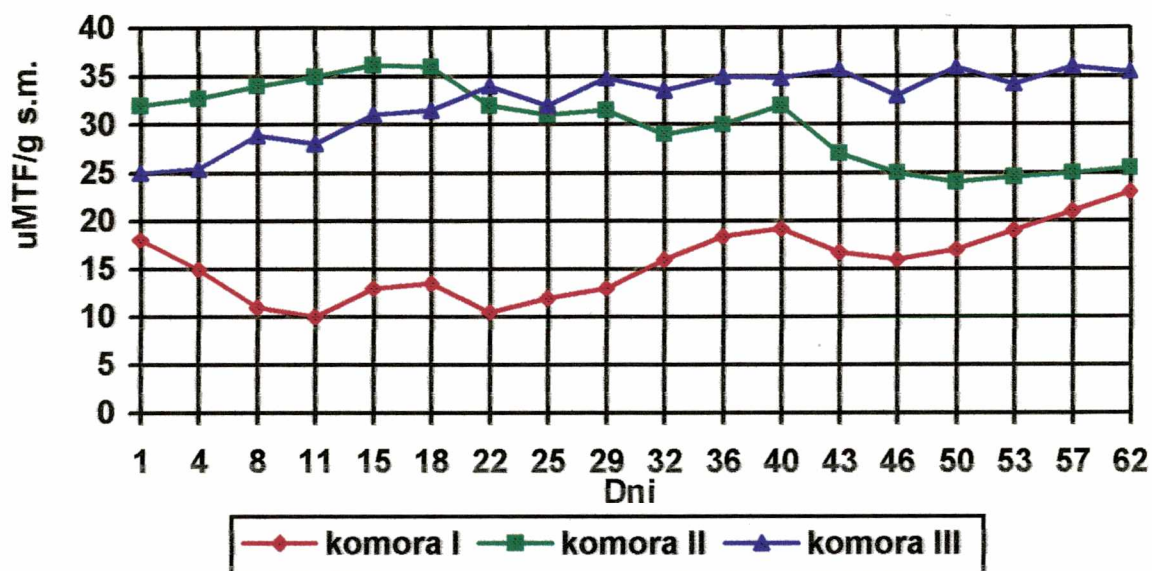
38 dzień



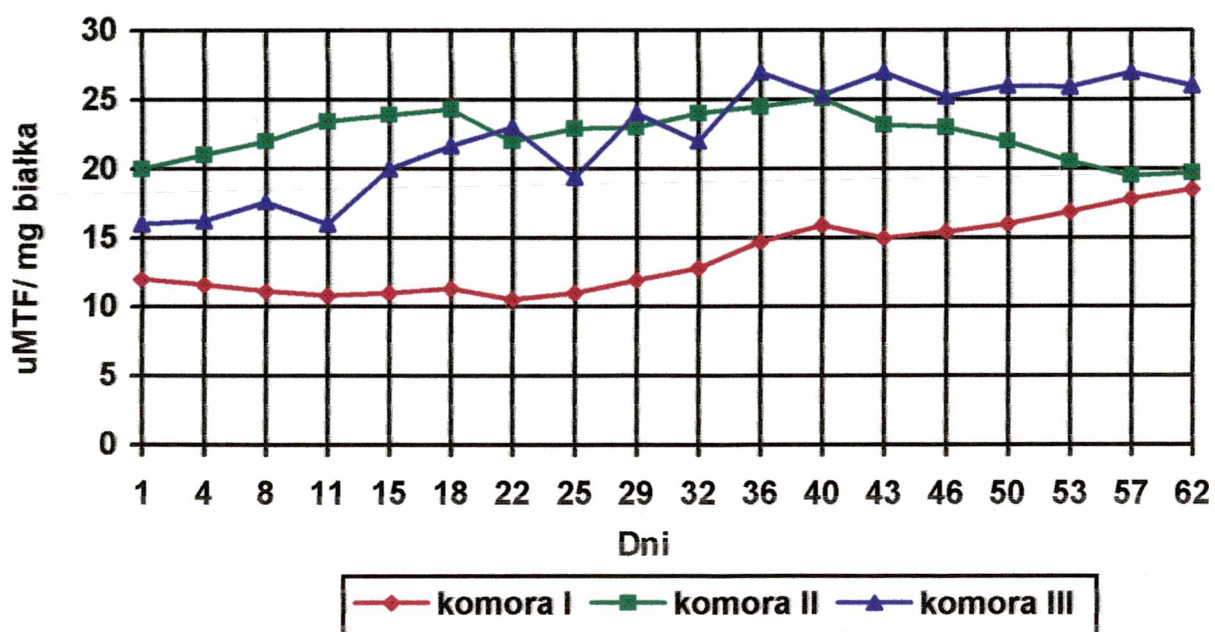
60 dzień



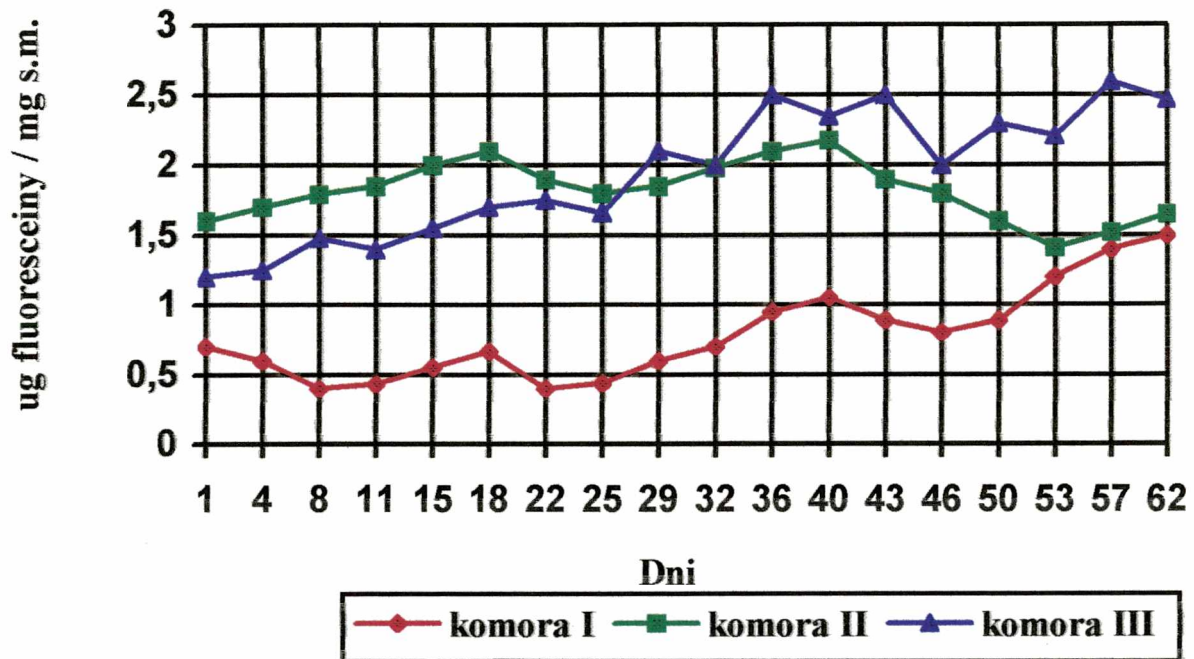
Rys.35.Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (2 seria).



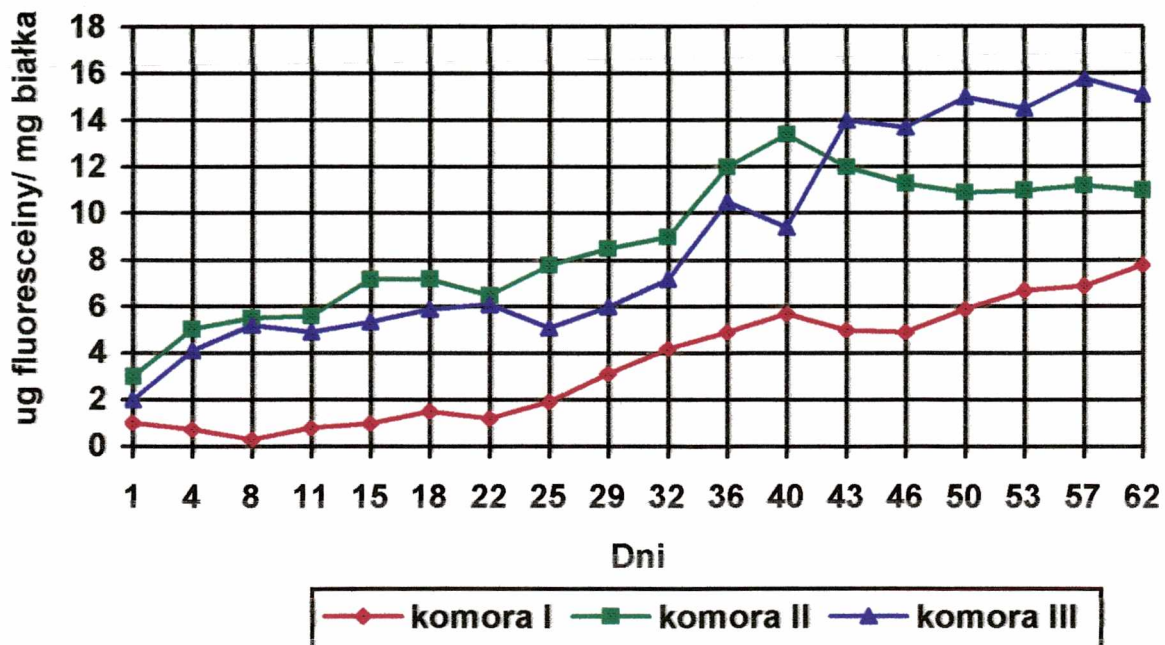
Rys.36.Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (2 seria).



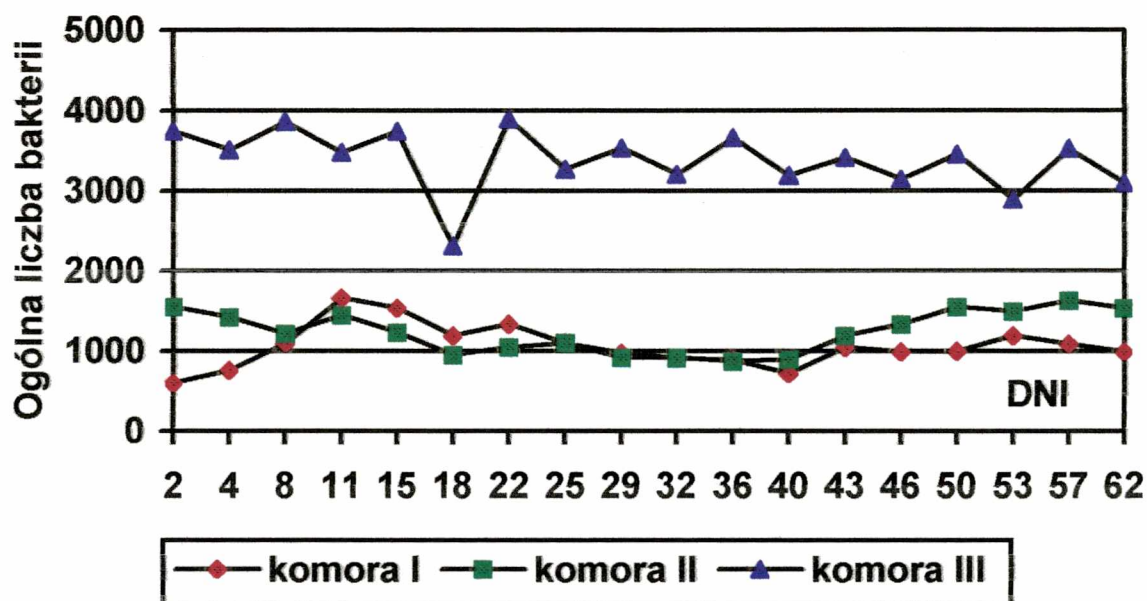
Rys.37. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (2 seria).



Rys.38. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (2 seria).



**Rys.39.Zmiany ogólnej liczby bakterii
wolnopływających w odpływach z
poszczególnych komór w 1 cm³ (2 seria)**



Podsumowując, tą serię badań, należy stwierdzić, iż w przypadku dozowania do komór napowietrzania ścieków syntetycznych zawierających początkowo 600 mg oleju napędowego/dm³, następnie od 22 dnia badań 800 mg oleju napędowego/dm³, a od 43 dnia badań 1000 mg oleju napędowego/dm³, najlepsze efekty oczyszczania obserwowano w przypadku osadu doszczepianego znajdującego się w komorze III. Od początku badań osad ten odznaczał się najlepszymi wynikami biodegradacji oleju napędowego. W pierwszej części badań, gdy do komór dozowano 600 mg oleju napędowego/dm³, skuteczność rozkładu węglowodorów przez ten osad była niewiele lepsza od skuteczności rozkładu uzyskiwanego przez osad wyhodowany z aktywnych szczepów w komorze II. Jednak w miarę upływu czasu i zwiększenia stężenia oleju różnica pomiędzy tymi dwiema komorami pogłębiła się. Średni stopień usuwania zanieczyszczeń obliczony na podstawie badań pięciu parametrów (obniżenia wartości BZT₅ i ChZT, badań ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i OWO) dla osadu doszczepianego w komorze III wynosił 72,6%, a dla osadu wyhodowanego od podstaw w komorze II 62,7%. Najmniejszą średnią skutecznością rozkładu składników oleju napędowego odznaczał się osad konwencjonalny w komorze I. Wynosiła ona 53,3% (tabela 22). Jednak pod koniec badań, gdy do komór dozowano ścieki zawierające 1000 mg oleju napędowego/dm³, obserwowano pogorszenie warunków oczyszczania dla osadu w komorze II. Od 50 dnia badań efekty oczyszczania ścieków zaolejonych przez ten osad były nieco gorsze w porównaniu do efektów uzyskiwanych w komorze I zawierającej osad konwencjonalny.

4.9. Osad czynny wysokoobciążony- wyniki trzeciej serii badań

W trzeciej serii porównywano efektywność biologicznego rozkładu ścieków zawierających olej napędowy przez osad czynny konwencjonalny, osad czynny wyhodowany od podstaw z aktywnych szczepów i przez osad czynny doszczepiany. W trakcie tych badań do komór napowietrzania dozowano ścieki syntetyczne zawierające początkowo 1500 mg oleju napędowego/dm³, od 22 dnia badań 2200 mg oleju napędowego/dm³, a następnie od 43 dnia badań 3100 mg oleju/dm³.

4.9.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych

Parametry biotechnologiczne osadów czynnych, podczas trwania tej serii badań, zamieszczono w tabeli 15.

W tym przypadku wyjściowy indeks osadów został ustalony na poziomie 58,1-60,8 cm³/g co odpowiadało objętości osadów po 0,5 godzinnej sedimentacji w leju Imhoffa 280-310 cm³/dm³ i zawartości suchej masy 4,8-5,15 g/dm³. W trakcie badań stwierdzono największy wzrost indeksu objętościowego przy jednoczesnym spadku zawartości biomasy w przypadku osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów. Największą zmianę tych wartości obserwowano gdy do komory dozowano ścieki zawierające 3100 mg oleju w dm³. W 62 dniu badań indeks objętościowy tego osadu wynosił 289,5 cm³/g a zawartość suchej masy 380 mg/dm³. Natomiast w przypadku osadu konwencjonalnego widoczny był także, choć nie tak drastyczny, postępujący wraz ze zwiększającym się stężeniem oleju w ściekach, spadek biomasy i wzrost indeksu objętościowego. W ostatnim dniu badań zanotowano, dla tego osadu ilość suchej masy o połowę mniejszą niż na początku badań i wynoszącą 2300 mg/dm³, natomiast indeks objętościowy tego osadu, w tym samym czasie wynosił 121,7 cm³/g. Te same parametry dla osadu doszczepianego utrzymywały się mniej więcej na stałym poziomie przez cały okres trwania eksperymentu.

W pierwszej komorze zawartość suchej masy osadu czynnego wahała się od 2,3 do 4,9 g/dm³, objętość osadu czynnego wynosiła od 220-300 cm³/dm³ a indeks objętościowy zmieniał się od 51,8 do 121,7 cm³/g. W drugiej komorze analogiczne wartości wahały się następująco: 0,38-4,8 g s.m./dm³, 110-350 cm³/dm³ i 60,2-289,5 cm³/g. Dla komory trzeciej: 4,1-5,5 g s.m./dm³, 260-360 cm³/dm³ i 59,8-65,5 cm³/g.

Obciążenie osadów czynnych ładunkiem BZT₅ zmieniało się: dla I komory od 0,086 do 0,298 mg O₂/mg s.m./d, dla II komory od 0,074 do 0,221 O₂/mg s.m./d i dla III komory od 0,077 do 0,163 O₂/mg s.m./d. Natomiast obciążenie osadów związkami olejowymi zmieniało się w granicach: dla I komory od 0,305 do 1,348 mg/mg s.m./d., dla II komory od 0,260 do 8,158 mg/mg s.m./d. i dla III komory od 0,273 do 0,752 mg/mg s.m./d.

Odpływy z komór napowietrzania posiadały odczyn w granicach 7,4-8,1. Największą alkalizację ścieków oczyszczonych uzyskiwano w odpływie z komory zawierającej osad wyhodowany z aktywnych szczepów, zwłaszcza pod koniec badań.

Zawartość tlenu w komorach wahała się w granicach 0,9-2,9 mg O₂/dm³. Najmniejsze ilości tlenu zanotowano pod koniec badań w komorach zawierających osad wyhodowany od podstaw i konwencjonalny.

4.9.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego

Tabela 16 ilustruje wyniki badań nad ubytkiem oleju napędowego obliczone na podstawie badań ekstraktu eterowego a tabela 17 na podstawie badań chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego.

Postęp biodegradacji, określany metodą wagową ekstraktu eterowego, był na początku badań największy dla komory z osadem wyhodowanym od podstaw. Jednak od 15 dnia zauważono systematyczne obniżanie się zdolności do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych w tej komorze. W tym czasie najlepszą efektywność oczyszczania ścieków obserwowano w komorze III zawierającej osad doszczepiany. Średni stopień usuwania zanieczyszczeń olejowych wynosił dla komory I- 49,7%, dla komory II- 57,7% a dla komory III- 78,3%. Najlepiej więc biodegradował olej napędowy osad doszczepiany, poprawiając efektywność procesu o 28,6% w stosunku do osadu konwencjonalnego. Osad wyhodowany od podstaw był w tych badaniach lepszy tylko o 8,0% w stosunku do osadu kontrolnego.

Bardzo podobnie przedstawiają się wyniki badań chromatograficznych. Badania te przeprowadzono w 2, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 i 57 dobie trwania procesu. W tym przypadku również najlepsze wyniki uzyskano dla osadu czynnego doszczepianego w komorze III. Osad w komorze I! usuwał zanieczyszczenia olejowe lepiej od osadu konwencjonalnego tylko do 29 dnia badań. Po tym czasie efektywność oczyszczania w tej komorze zaczęła wyraźnie spadać. Średnio stopień usuwania składników oleju napędowego, w przypadku tych badań, wynosił 46,9% dla komory I, 50,5 % dla komory II i 70,3 % dla komory III. Średni stopień oczyszczania, w stosunku do osadu konwencjonalnego, okazał się lepszy dla osadu doszczepianego o 23,4% a dla osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów o 3,6%.

Wyniki usuwania zanieczyszczeń mierzone ubytkiem ogólnego węgla organicznego potwierdzają poprzednie badania. Ubytek ten wynosił średnio dla komory I –36,1%, dla komory II- 31,2%, natomiast dla komory III-55,8%.

Wyniki procesu oczyszczania ścieków zawierających olej napędowy, określane na podstawie zmian wartości BZT₅ i ChZT ścieków syntetycznych i oczyszczonych, ilustruje tabela 15 i rysunki 40 i 41, natomiast te same wyniki przedstawione w procentach podano w tabeli 16. W pierwszej części badań, gdy do komór dozowano ścieki o stężeniu oleju napędowego 1500 mg/dm³, obniżenie wartości BZT i ChZT w odpływach z komory II i III było na podobnym poziomie, a w odpływie z komory I wyraźnie mniejsze. Natomiast w drugiej połowie okresu badań największe obniżenie wartości BZT₅ i ChZT uzyskano w komorze III zawierającej osad czynny doszczepiony. W tym samym czasie w pozostałych komorach stopień usuwania zanieczyszczeń był wyraźnie mniejszy. Najmniejszy stopień rozkładu oleju napędowego, określany tymi metodami, uzyskano dla komory z osadem wyhodowanym od podstaw. W ostatnim dniu badań stopień usuwania zanieczyszczeń w procentach mierzony na podstawie badań BZT₅ wynosił: dla komory I- 40,4%, dla komory II- 11,8% , dla komory III- 65,3%. Natomiast w przypadku badań ChZT: dla komory I-26,4%, dla komory II-3,0% i dla komory III-52,4%.

Średni stopień usuwania zanieczyszczeń mierzony na podstawie badań BZT₅ dla komory I wynosił 36,5 %, dla komory II 45,2% a dla komory III 62,0%. Doszczepienie osadu czynnego aktywnymi szczepami poprawiło obniżenie wartości BZT₅ średnio o 25,5% w stosunku do osadu konwencjonalnego. Natomiast osad wyhodowany z aktywnych szczepów oczyszczał lepiej niż osad kontrolny ścieki zaolejone o 8,7%.

W przypadku usuwania zanieczyszczeń mierzonych na podstawie badań ChZT, średni stopień usuwania zanieczyszczeń w ciągu całego eksperymentu wynosił dla I komory 25,0%, dla komory II 30,4% a dla komory III 52,4. Poprawiło to efektywność usuwania zanieczyszczeń, w stosunku do osadu konwencjonalnego, o 27,4% dla osadu doszczepionego i o 5,4% dla osadu wyhodowanego od podstaw.

Analizę jakościową produktów pobiodegradacyjnych przeprowadzono na podstawie badań chromatografii gazowej i cieczowej po 20, 38 i 60 dobie badań.

W obrazach chromatograficznych, pochodzących z odpływów ze wszystkich komór, brak było węglowodorów C₆-C₁₂ oraz lekkich węglowodorów aromatycznych (BTX). Badania chromatograficzne wykazały w odpływach ze wszystkich komór zmniejszenie spektrów

sygnałów w zakresie węglowodorów C_{12} - C_{24} oraz zmniejszenie i rozmycie sygnałów w całym zakresie retencji struktur aromatycznych. Sygnały te różniły się tylko intensywnością w zależności od etapu badań i pochodzenia odpływu. Gdy do komór dozowano olej w stężeniu 1500 mg/dm^3 , najmniejszą intensywność sygnałów obserwowano w odpływach z komory II i III. W okresie gdy w ściekach surowych znajdowało się stężenie oleju 2200 mg/dm^3 , zaobserwowano najmniejszą intensywność sygnałów w odpływach z komory III, natomiast w odpływach z komory I i II intensywność sygnałów była podobna i większa od intensywności sygnałów pochodzących z odpływu z komory III. Natomiast gdy do komór dozowano największe stężenie oleju napędowego, 3100 mg/dm^3 , najmniejszą intensywność sygnałów zanotowano dla odpływów z komory III a nieco większą dla odpływów z komory II. W odpływie z komory I intensywności sygnałów były niewiele mniejsze niż dla sygnałów pochodzących z ekstraktów oleju napędowego (rysunek 42, 43 i 44). Obserwacje te wskazują na to iż osad w komorze III doszczepianej najlepiej usuwał olej napędowy ze ścieków. Natomiast efektywność oczyszczania pozostałych osadów, wraz ze wzrostem stężenia oleju, systematycznie malała. Wynika z tego, że osady czynne w komorach I-ej i II-ej jako pierwsze zaszygnały zmiany degeneracyjne spowodowane nadmiernym obciążeniem olejem napędowym.

4.9.3. Wyniki badań enzymatycznych

Wyniki badań nad aktywnością dehydrogenazową i esterazową biomasy osadów czynnych, podczas trwania procesu oczyszczania ścieków z dużą zawartością oleju napędowego, przedstawiają rysunki 45, 46, 47 i 48.

Osad konwencjonalny odznaczał się najniższymi wartościami obu aktywności enzymatycznych w trakcie trwania eksperymentu. Na początku procesu aktywności te nieznacznie spadły, natomiast od 8-22 dnia zaczęły wzrastać. Od 43 dnia, gdy do komory dozowano największe stężenie oleju napędowego zaobserwowano ponowny spadek aktywności enzymatycznych dla tego osadu. Pod koniec badań zauważono wzrost aktywności dehydrogenazowej, natomiast aktywność esterazowa ustabilizowała się mniej więcej na jednym poziomie.

Osad wyhodowany z aktywnych szczepów, w komorze II, na początku badań charakteryzował się największymi wartościami aktywności enzymatycznych. Wartości te, na wysokim poziomie, utrzymały się jedynie w pierwszej części badań. Gdy stężenie oleju napędowego w ściekach surowych znacznie się zwiększyło ($2200 \text{ mg oleju/dm}^3$) zaczęto obserwować spadek aktywności enzymatycznych dla tego osadu. Pod koniec eksperymentu, gdy do komory dozowano olej w stężeniu 3100 mg/dm^3 , zaobserwowano bardzo gwałtowny spadek zarówno aktywności dehydrogenazowej jak i aktywności esterazowej tego osadu. Związane to było z pogarszającymi się warunkami oczyszczania w tej komorze, objawiającymi się ucieczką biomasy z układu.

Dla osadu doszczepianego, w komorze III, wartości obu aktywności posiadały wyraźnie tendencję wzrostową na początku badań. Tendencja ta utrzymywała się już do końca badań. W 62 dni eksperymentu osad ten nadal odznaczał się bardzo wysokim poziomem aktywności dehydrogenazowej i esterazowej. W przypadku tego osadu obserwowano również pewne wahania wartości aktywności enzymatycznych związane z wprowadzaniem, co pewien czas, szczepionki mikrobiologicznej do komory i w momentach zwiększania stężenia oleju napędowego w ściekach surowych.

W przypadku wszystkich osadów obserwowano także wyraźne wahania ich aktywności esterazowej. Być może miało to związek z okresowym nagromadzeniem się w komorach utlenionych produktów rozkładu węglowodorów.

Tabela 15. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (3 seria).

Parametr	Numer komory	D N I :																	
		2	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	40	43	46	50	53	57	62
Objętość osadu po 0,5 godzinnej sedymencie w leju Imhoffa cm ³ /dm ³	1	280	270	240	250	260	270	260	250	220	230	240	260	250	280	270	290	300	280
	2	310	330	330	350	340	340	320	310	290	300	280	250	260	270	250	210	150	110
	3	310	320	320	330	360	350	330	340	340	340	320	330	300	310	290	280	260	260
Sucha masa mg/dm ³	1	4820	4700	4630	4520	4830	4920	4500	4250	3530	3700	3830	3900	3650	3130	2920	2500	2550	2300
	2	5150	5220	5360	5750	5500	5620	5100	4850	4500	4100	3980	3620	3100	2500	2120	850	520	380
	3	5100	5350	5300	5420	5500	5470	5100	5250	5300	5220	5100	5300	4950	4820	4700	4550	4200	4120
Indeks osadu cm ³ /g	1	58,1	57,4	51,8	55,3	53,8	54,9	57,7	58,8	62,3	56,1	62,7	66,6	68,4	89,5	92,4	116,0	117,6	121,7
	2	60,2	63,2	61,6	60,9	61,8	60,5	62,7	63,9	64,4	73,2	70,4	69,1	83,9	108,0	117,9	247,1	288,5	289,5
	3	60,8	59,8	60,3	60,9	65,5	64,0	64,7	64,8	64,2	65,1	62,7	62,3	60,6	64,3	61,7	61,5	61,9	63,1
BZT ₅ ścieków surowych mg O ₂ /dm ³		421						580						685					
BZT ₅ ścieków oczyszczonych mg O ₂ /dm ³	1	223	269	293	289	266	273	405	408	398	358	338	346	445	471	423	403	393	408
	2	125	146	130	163	154	161	289	282	303	315	336	300	410	437	520	587	615	604
	3	147	138	150	172	144	131	231	243	260	237	215	220	308	279	246	260	266	238
Obciążenie osadu ładunkiem BZT ₅ mg O ₂ /mg s.m./d	1	0,088	0,09	0,092	0,094	0,088	0,086	0,129	0,136	0,164	0,157	0,151	0,149	0,189	0,219	0,235	0,274	0,269	0,298
	2	0,083	0,08	0,079	0,074	0,077	0,076	0,114	0,12	0,129	0,141	0,146	0,16	0,221	0,274	0,323	0,806	1,317	1,803
	3	0,083	0,79	0,08	0,078	0,077	0,078	0,114	0,11	0,109	0,111	0,114	0,109	0,138	0,142	0,146	0,151	0,163	0,166
Obciążenie osadu związkami olejowymi mg oleju napędowego /mg s.m. /d	1	0,311	0,319	0,324	0,332	0,311	0,305	0,489	0,518	0,623	0,595	0,574	0,564	0,849	0,99	1,062	1,24	1,216	1,348
	2	0,291	0,287	0,280	0,260	0,273	0,267	0,431	0,454	0,489	0,537	0,553	0,61	1,0	1,24	1,462	3,647	5,962	8,158
	3	0,294	0,280	0,283	0,277	0,273	0,274	0,431	0,419	0,415	0,421	0,431	0,415	0,626	0,643	0,66	0,681	0,738	0,752
ChZT ścieków surowych mg/dm ³		937						1290						1630					
ChZT ścieków oczyszczonych mg/dm ³	1	558	672	837	802	831	780	1013	1074	995	873	966	910	1171	1239	1208	1007	1034	1200
	2	357	345	325	407	405	435	722	940	977	984	1120	1034	1323	1457	1625	1600	1580	1581
	3	420	363	394	430	351	374	660	715	765	677	614	667	906	872	724	743	782	700
Odczyn ścieków odpływających	1	7,4	7,6	7,6	7,7	7,6	7,8	7,7	7,7	7,6	7,8	7,7	7,6	7,8	7,8	7,9	7,8	7,9	7,7
	2	7,5	7,5	7,6	7,6	7,8	7,7	7,8	7,9	7,9	8,0	8,0	7,9	8,1	8,1	8,0	8,1	8,0	8,0
	3	7,6	7,7	7,6	7,5	7,4	7,5	7,4	7,6	7,5	7,6	7,6	7,5	7,6	7,5	7,6	7,7	7,6	7,5

Tabela 16. Różnice w usuwaniu oleju napędowego na podstawie badań BZT, ChZT i ekstraktu eterowego, przez osad czynny (0.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III) (3seria).

Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :															
Dni	BZT ₅					ChZT					Ekstrakt eterowy				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I
2	47,1	70,2	65,2	23,1	18,1	40,4	61,8	55,2	21,4	14,8	41,3	80,1	72,1	38,8	30,8
4	36,1	65,3	67,3	29,2	31,2	28,3	63,5	61,3	35,2	33,0	40,2	83,4	70,3	43,2	30,1
8	30,3	69,1	64,3	38,3	34,0	10,7	65,3	58,0	54,6	47,3	39,8	82,1	74,8	42,3	35,0
11	31,2	61,2	59,1	30,0	27,9	14,4	56,6	54,1	42,2	39,7	42,1	79,4	78,7	37,3	36,6
15	36,7	63,4	65,7	26,7	29,0	11,3	56,8	62,5	45,5	51,2	45,7	80,3	84,5	34,6	38,8
18	35,2	61,7	68,9	26,5	33,7	16,8	53,6	60,1	36,8	43,3	46,3	81,2	82,1	34,9	35,8
22	30,1	50,1	60,1	20,0	30,0	21,5	43,0	48,8	21,5	27,3	40,7	70,4	80,3	29,7	39,6
25	29,7	51,3	58,1	21,6	28,4	16,7	27,1	44,6	10,4	27,9	39,1	73,1	81,4	34,0	42,3
29	31,4	47,8	55,2	16,4	23,8	22,9	24,3	40,7	1,4	17,8	42,7	69,2	79,3	26,5	36,6
32	38,2	45,7	59,1	17,5	30,9	32,3	23,7	47,5	n.m.p.	15,2	48,9	55,1	83,1	6,2	34,2
36	41,7	42,1	63,0	0,4	21,3	25,1	13,2	52,4		27,3	57,3	57,1	82,7	n.m.p.	25,4
40	40,3	48,3	62,1	8,0	21,8	29,5	20,1	48,2		18,8	61,2	54,3	85,3		24,1
43	35,1	40,1	55,1	5,0	20,0	28,2	18,8	44,4		16,2	55,3	50,7	75,2		19,9
46	31,2	36,2	59,3	5,0	23,1	24,0	10,6	46,5		22,5	60,4	42,1	74,1		13,7
50	38,3	24,1	64,1	n.m.p.	25,8	25,9	0,3	55,6		29,7	61,3	36,0	76,3		15,0
53	41,1	14,3	62,1		47,8	38,2	1,8	54,4		16,2	57,3	21,7	73,7		16,4
57	42,7	10,2	61,1		18,4	36,6	3,1	52,0		15,4	56,7	14,3	77,1		20,4
62	40,4	11,8	65,3		24,9	26,4	3,0	57,0		30,6	59,1	9,5	79,2		20,1
Śred.	36,5	45,2	62,0	8,7	25,5	25,0	30,4	52,4	5,4	27,4	49,7	57,7	78,3	8,0	28,6

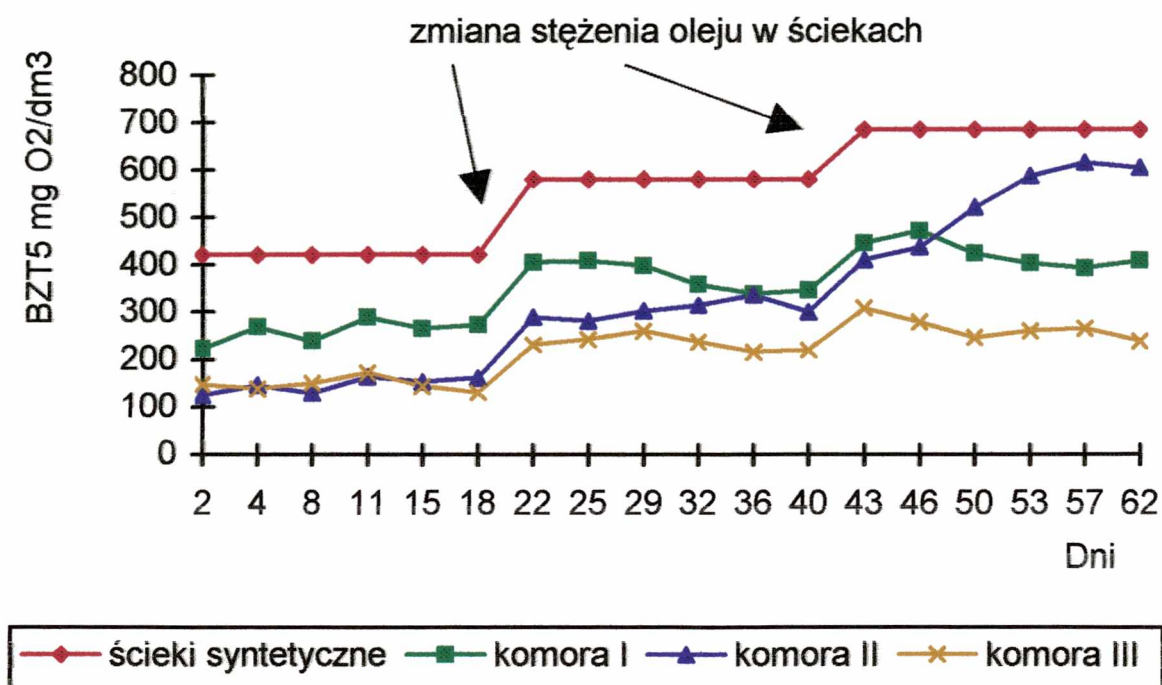
n.m.p.- nie można policzyć

Tabela 17. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego przez osad czynny (0.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III) (3 seria).

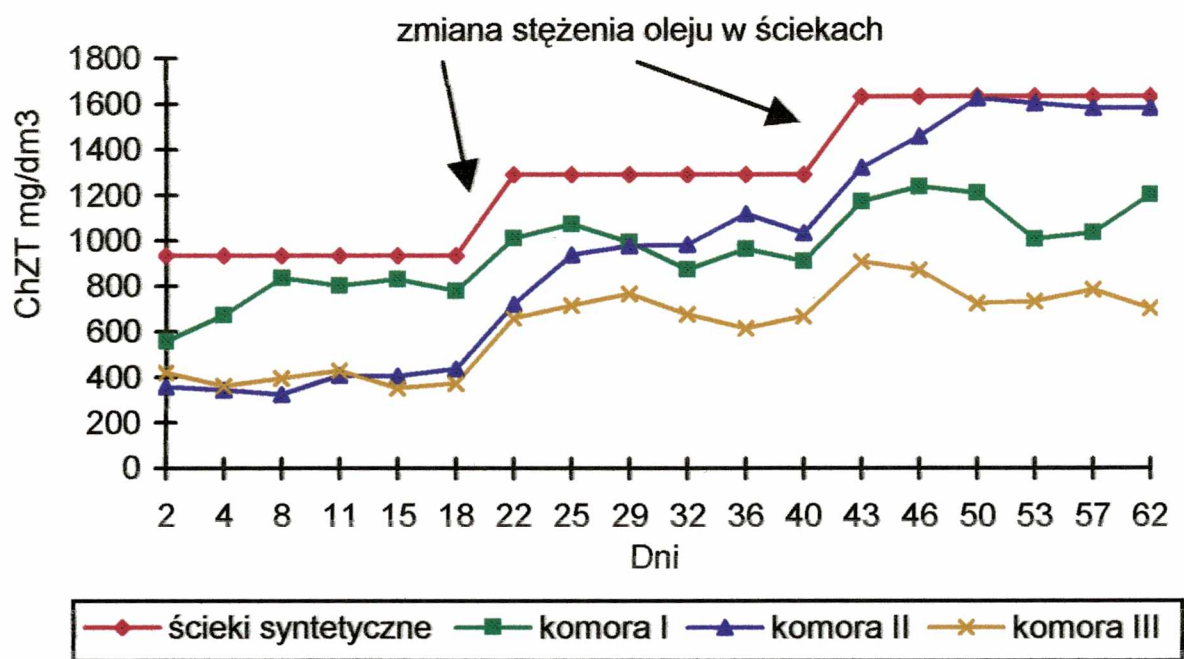
Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :										
Dni	Chromatografia gazowa					OWO				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.II-0.I	Różnica 0.III-0.I
2	51,2	78,5	69,2	27,3	18,0	38,1	47,1	40,3	9,0	2,2
8	49,7	79,4	71,4	29,7	21,7	27,3	40,7	50,7	13,4	23,4
15	55,4	74,1	76,7	18,7	21,3	35,3	45,2	54,3	9,9	19,0
22	41,3	64,1	72,3	22,8	31,0	30,7	37,6	50,8	6,9	20,1
29	49,4	54,2	74,2	4,9	24,8	28,7	21,8	47,2	n.m.p.	18,5
36	51,3	41,3	70,3	n.m.p.	19,0	37,2	29,4	64,1		26,9
43	41,2	32,7	68,3		28,1	41,4	19,3	71,2		29,8
50	39,8	21,2	65,1		25,3	40,0	15,7	59,3		19,3
57	43,1	9,3	65,0		21,9	45,8	24,3	64,2		18,4
Śred	46,9	50,5	70,3	3,6	23,4	36,1	31,2	55,8	9,8	19,7

n.m.p. - nie można policzyć

Rys. 40. Wartości BZT₅ w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (3 seria)



Rys. 41. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (3 seria)



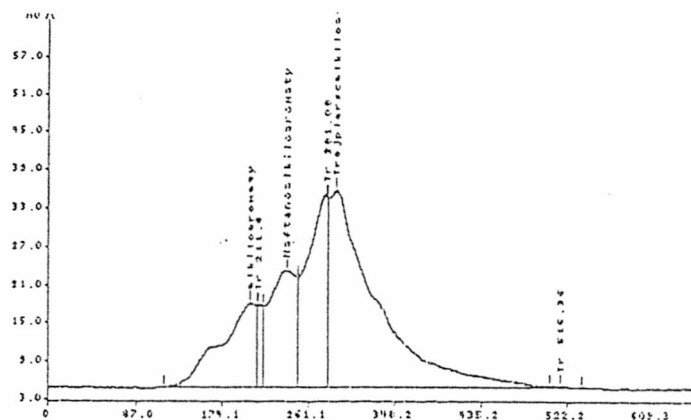
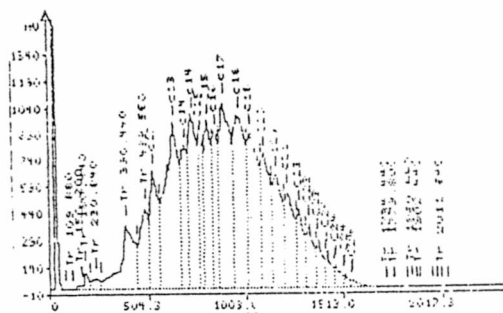
Wartości aktywności dehydrogenazowej, w tej serii badań, w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego (rys. 45) zmieniały się w granicach: dla komory I od 17,1 do 23,2 $\mu\text{M TF/g s.m.}$, dla komory II od 9,5 do 39,5 $\mu\text{M TF/g s.m.}$ i dla komory III od 27,1 do 38,4 $\mu\text{M TF/g s.m.}$.

Natomiast wartości aktywności dehydrogenazowej w przeliczeniu na zawartość białka w biomase osadu czynnego (rys. 46) zmieniały się w granicach: dla komory I od 13,5 do 16,7 $\mu\text{M TF/mg}$, dla komory II od 7,2 do 26,1 $\mu\text{M TF/mg}$ i dla komory III od 19,1 do 26,2 $\mu\text{M TF/mg}$.

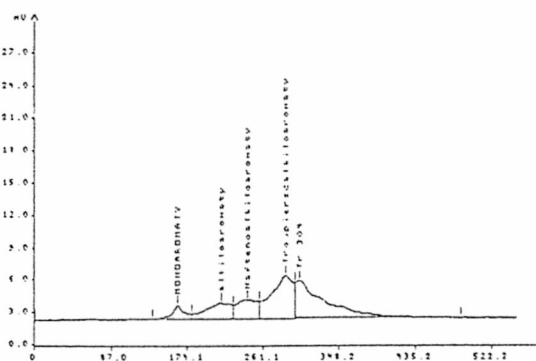
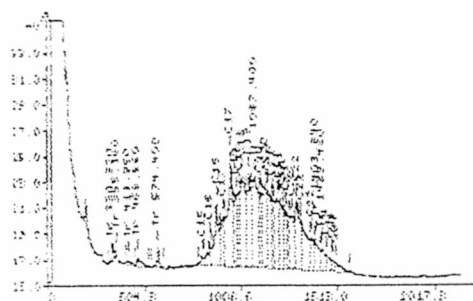
Wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na suchą masę (rys. 47) zmieniały się w granicach: dla komory I od 0,2 do 1,21 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$, dla komory II od 0,35 do 1,6 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$ i dla komory III od 0,91 do 1,73 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$

Natomiast wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na zawartość białka (rys. 48) zmieniały się w granicach: dla komory I od 1,8 do 5,3 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$, dla komory II od 1,0 do 5,1 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$ i dla komory III od 3,5 do 8,9 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$.

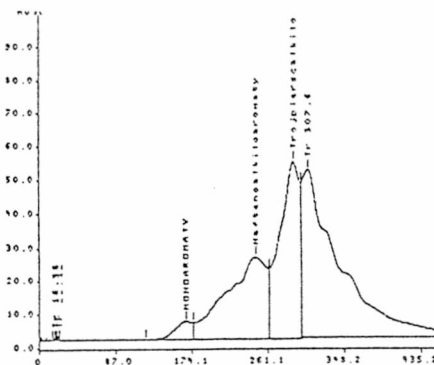
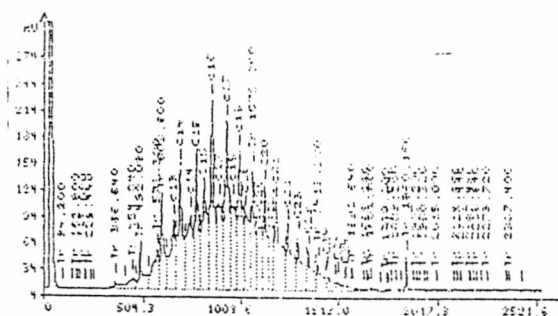
20 dzień



38 dzień

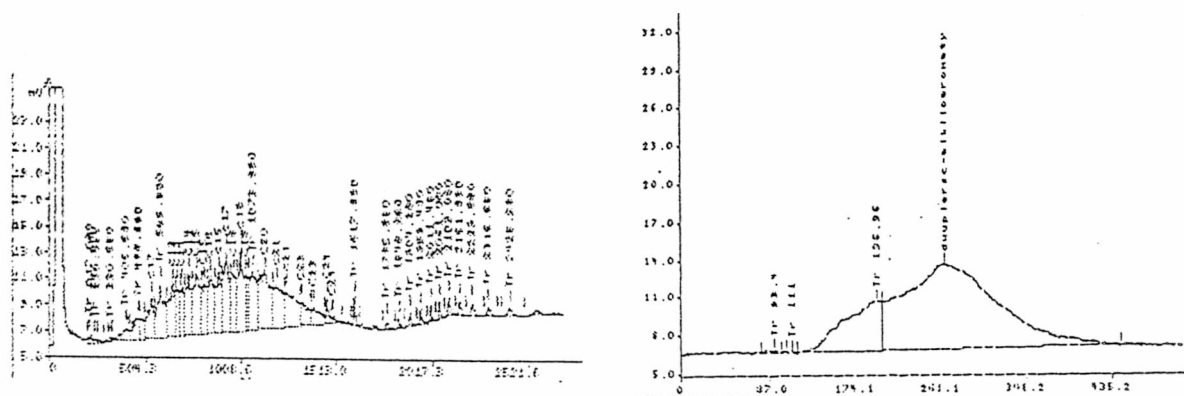


60 dzień

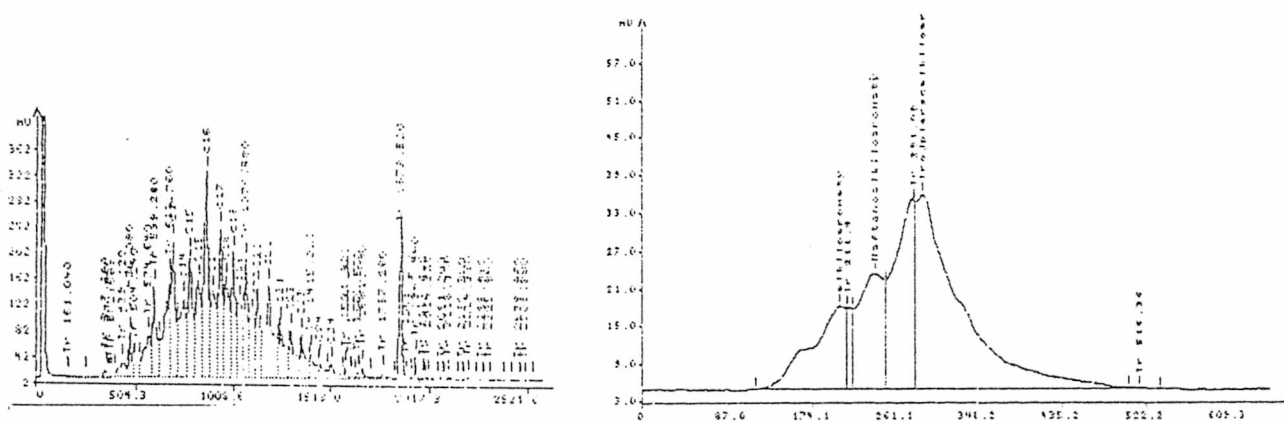


Rysunek 43. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 20, 38 i 60 dniach (3 seria).

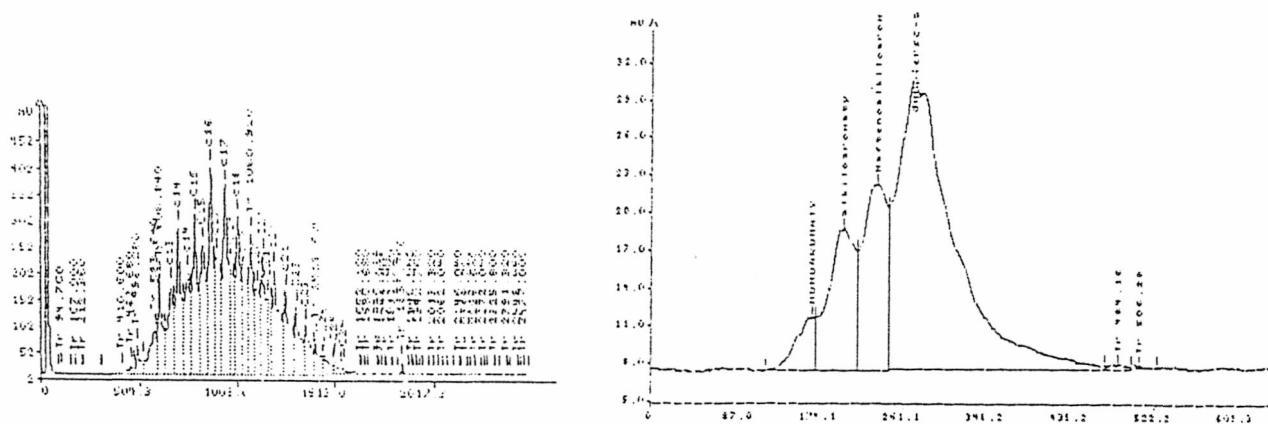
20 dzień



38 dzień

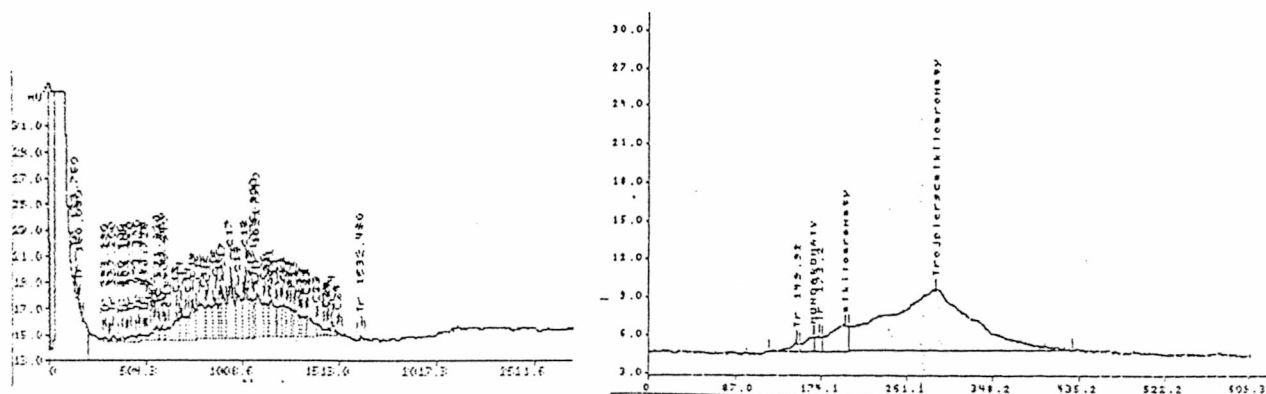


60 dzień

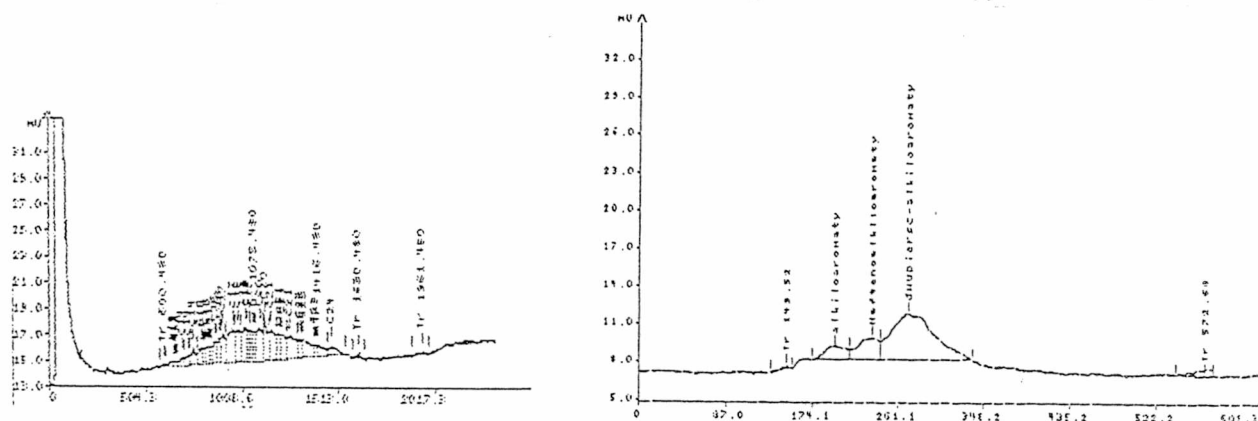


Rysunek 44. Chromatografia gazowa i cieczowa odplywów z komory III po 20, 38 i 60 dniach (3 seria).

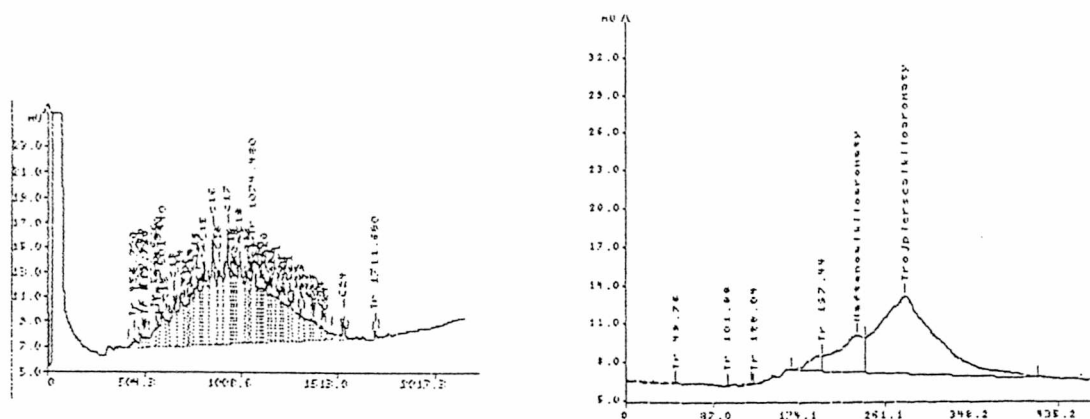
20 dzień



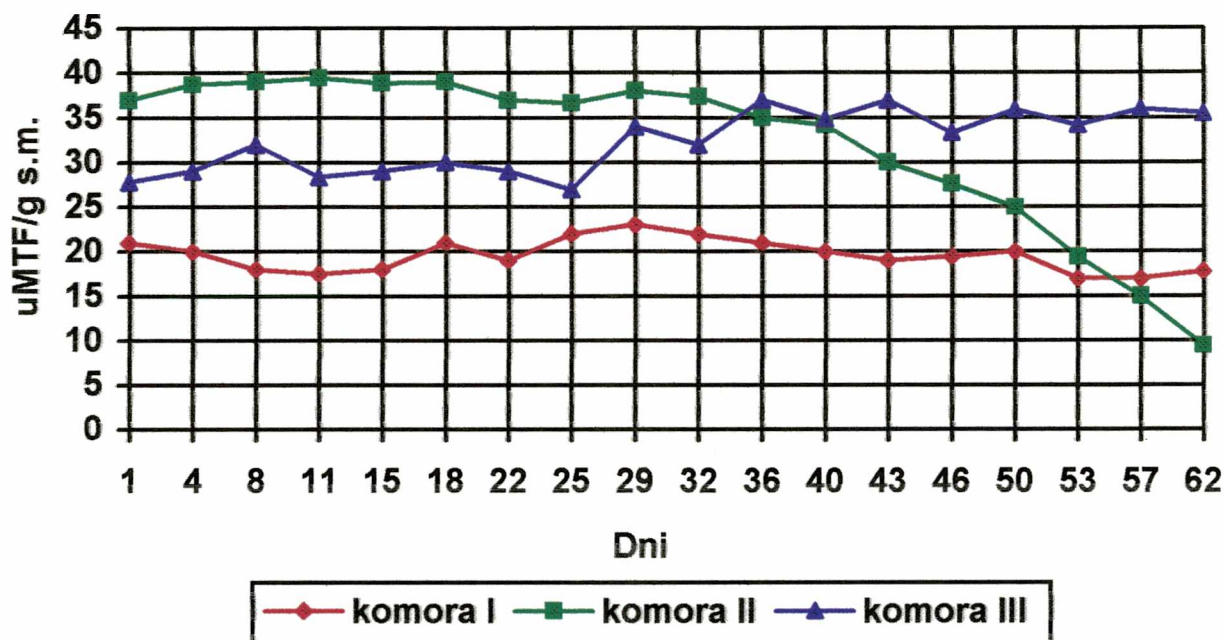
38 dzień



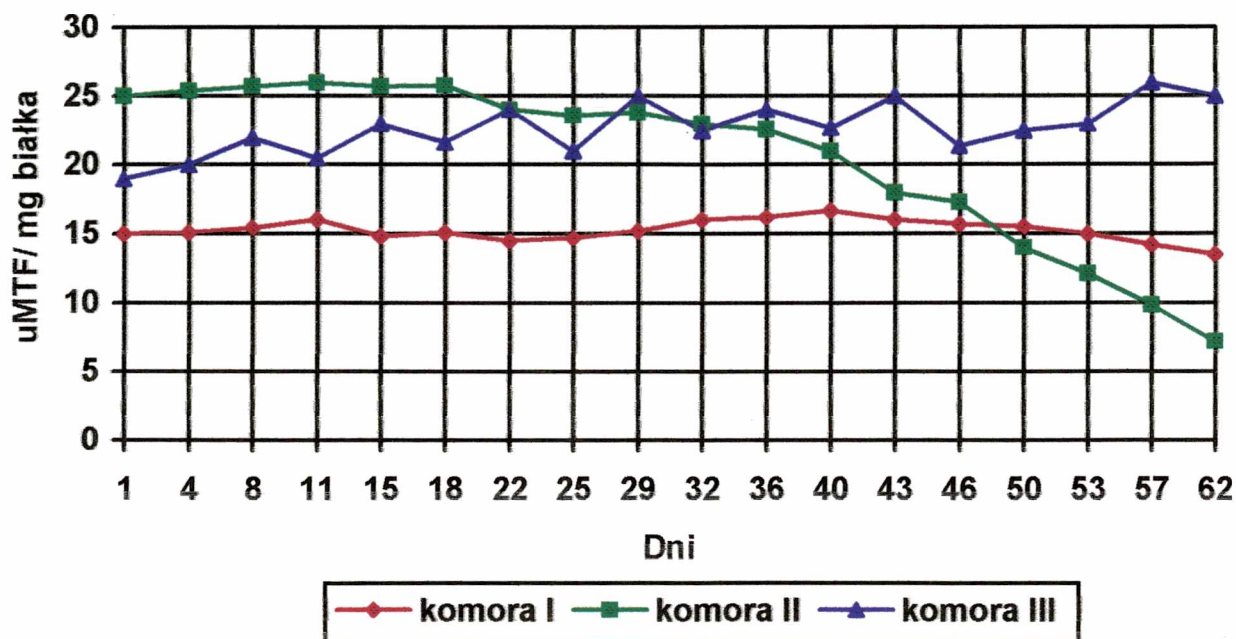
60 dzień



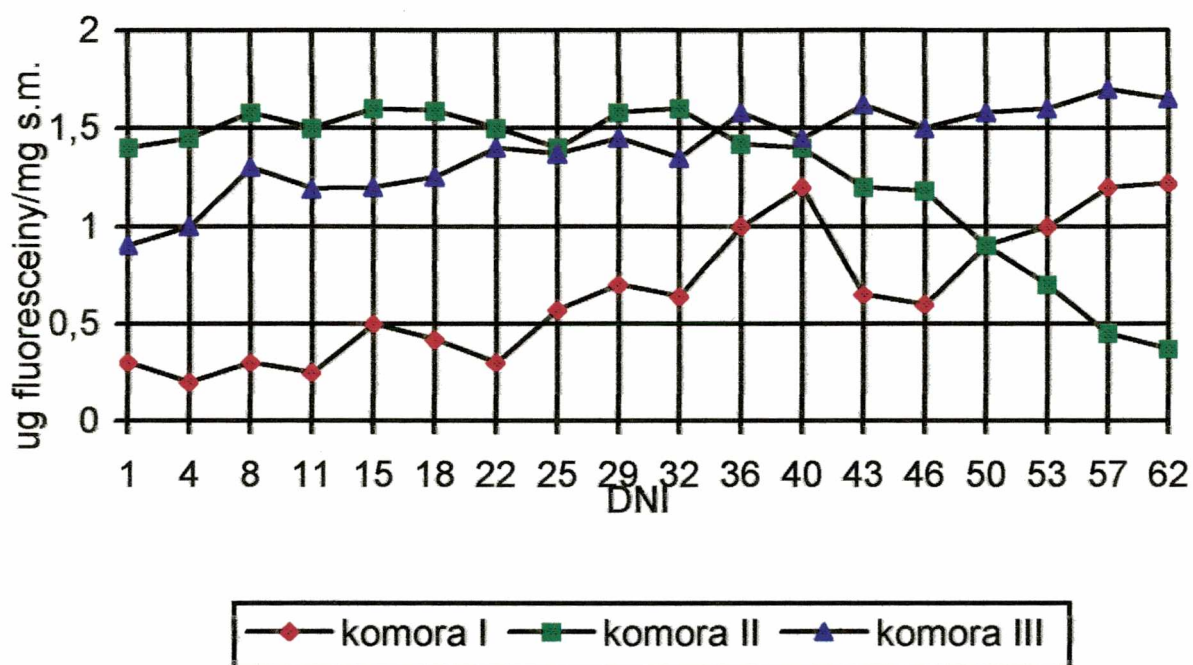
Rys.45. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (3 seria)



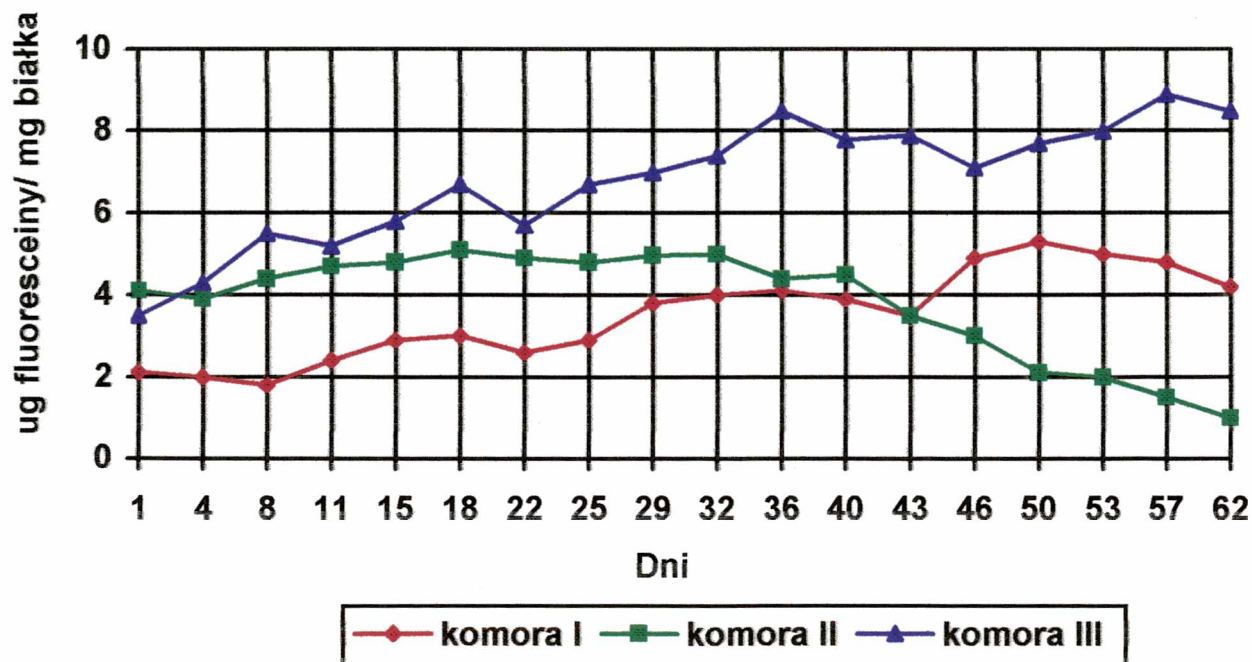
Rys.46. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (3 seria).



Rys 47. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (3 seria).



Rys.48.Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (3 seria).

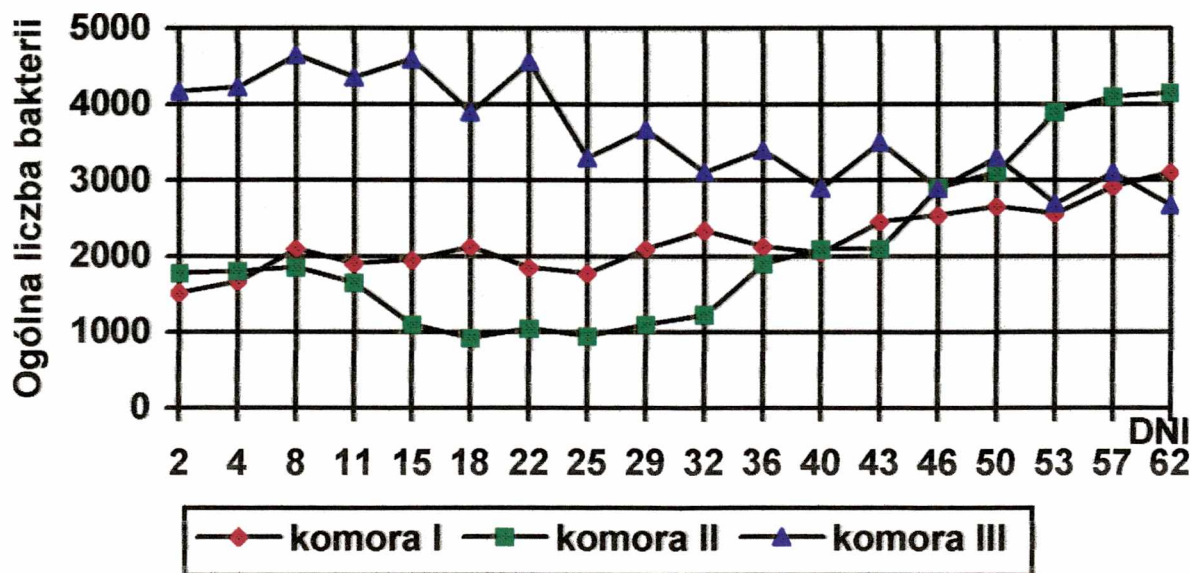


4.9.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnopływakających w ściekach oczyszczonych

W przypadku osadu konwencjonalnego obserwowano, na początku badań, znaczny przyrost drobnoustrojów rozkładających olej napędowy. Następnie miano tych bakterii utrzymywało się na mniej więcej stałym poziomie do około połowy badań, a potem zaczęło spadać. W przypadku osadu wyhodowanego od podstaw stały, wysoki poziom tych bakterii utrzymywał się do około połowy badań a potem, podobnie jak w przypadku osadu kontrolnego, zaczął bardzo wyraźnie spadać. Natomiast dla osadu doszczepianego, po nieznacznym wzroście ilości bakterii wykorzystujących olej napędowy w charakterze jedyne źródła węgla i energii na początku badań, obserwowano w dalszym etapie badań stały, wysoki poziom tych drobnoustrojów. Miano bakterii rozkładających substancje węglowodorowe kształtowało się na poziomie rzędu 10^{-1} - 10^{-5} dla osadu w komorze pierwszej-konwencjonalnej, 10^{-2} - 10^{-7} dla osadu w komorze drugiej-bakteryjnej i 10^{-8} - 10^{-10} dla osadu doszczepianego w komorze trzeciej.

Liczba bakterii wolnopływakających w ściekach oczyszczonych (rys.49) pochodzących z pierwszej komory zawierającej osad konwencjonalny oraz z komory drugiej zawierającej osad wyhodowany od podstaw, utrzymywała się na niskim poziomie do 36-43 dnia badań, po czym zaczęła wzrastać. Było to za pewnie wynikiem pogarszających się zdolności sedymentacyjnych tych osadów. Natomiast w odpływie z komory trzeciej-doszczepianej obserwowano największą liczbę bakterii wolnopływakających oraz największe wahania ich liczby w 1 cm^3 . Jednakże w miarę upływu czasu liczba tych mikroorganizmów systematycznie spadała. Ogólna liczba bakterii w odpływie z tej komory wahała się w granicach 2670-4657 w 1 cm^3 . Ogólna liczba bakterii w odpływie z pierwszej komory wahała się od 1520 do 3100 w 1 cm^3 a w odpływie z drugiej komory od 920 do 4150.

Rys.49. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływakających w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm^3 (3seria)



Podsumowując, tą serię badań, należy stwierdzić, iż najlepsze efekty usuwania oleju napędowego ze ścieków obserwowano w przypadku osadu doszczepianego znajdującego się w komorze III. W pierwszej części badań, gdy do komór dozowano 1500 mg oleju napędowego/dm³, skuteczność rozkładu węglowodorów przez ten osad była nieco gorsza od skuteczności rozkładu uzyskiwanego przez osad wyhodowany z aktywnych szczepów w komorze II. Jednak od około 15 dnia eksperymentu osad doszczepiany zaczął uzyskiwać najlepsze wyniki w usuwaniu zanieczyszczeń olejowych. Natomiast efekty oczyszczania osadu w komorze II systematycznie pogarszały się wraz ze zwiększeniem stężenia oleju napędowego w ściekach. Od około 40 dnia badań osad ten usuwał zanieczyszczenia olejowe gorzej od osadu konwencjonalnego w komorze I, nawet o 50% w przypadku badań ekstraktu eterowego. W tej serii badań, średni stopień usuwania zanieczyszczeń obliczony na podstawie badań pięciu parametrów (obniżenia wartości BZT₅ i ChZT, badań ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i OWO) dla osadu doszczepianego w komorze III wynosił 63,8%, dla osadu wyhodowanego od podstaw w komorze II 43,0% a dla osadu konwencjonalnego w komorze I 38,8% (tabela 22).

Prawdopodobnie osad czynny II jako pierwszy ulegał toksycznemu działaniu składników oleju napędowego, gdyż z jednej strony posiadał on inną- od pozostałych- strukturę kłaczkowatych skupień. Były one drobniejsze, a zatem możliwa była szybsza penetracja oleju do wnętrza komórek. Z drugiej strony posiadały one delikatniejszą warstwę śluzu, który działa jako warstwa ochronna. Natomiast osad czynny konwencjonalny I, był w ciągu całego okresu badań znacznie mniej aktywny, zwłaszcza pod względem enzymatycznym i dlatego jego ogólna kondycja fizjologiczna była słabsza tak jak i oporność na działanie czynników szkodliwych.

4.10. Osad czynny pracujący w warunkach zmiennego obciążenia olejem napędowym - wyniki czwartej serii badań

W czwartej serii badań porównywano efektywność biologicznego rozkładu ścieków zawierających olej napędowy przez osad czynny konwencjonalny, osad czynny wyhodowany od podstaw z aktywnych szczepów i przez osad czynny doszczepiany. W trakcie tych badań do komór napowietrzania dozowano ścieki syntetyczne zawierające zmienne stężenie oleju napędowego w granicach 50-3200 mg/dm³.

4.10.1. Charakterystyka parametrów biotechnologicznych osadów czynnych

Parametry biotechnologiczne osadów czynnych przedstawiono w tabelach 18 i 19. W tej serii badań wyjściowy indeks osadów został ustalony na poziomie 56,0-60,0 cm³/g co odpowiadało objętości osadów po 0,5 półgodzinnej sedymentacji w leju Imhoffa 280-300 cm³/dm³ i zawartości suchej masy 5,0 g/dm³.

Parametry technologiczne w komorze I z osadem czynnym konwencjonalnym i w komorze III z osadem czynnym doszczepianym utrzymywały się mniej więcej na stałym poziomie przez cały okres procesu oczyszczania ścieków zaolejonych. Dopiero pod koniec badań zaobserwowano nieznaczny wzrost indeksu tych osadów. Zupełnie inaczej kształtowały się te parametry dla komory drugiej, w której znajdował się osad wyhodowany z aktywnych wobec oleju napędowego szczepów drobnoustrojów. W komorze tej, obserwowano największe wahania objętości, suchej masy i indeksu osadowego w zależności od stężenia oleju napędowego w ściekach. Do 37 dnia osad ten stosunkowo dobrze znosił ścieki zawierające zmienne stężenie oleju napędowego. Dopiero po tym czasie zaobserwowano znaczny wzrost indeksu objętościowego tego osadu połączony ze spadkiem zawartości biomasy przy niewiele zmienionej objętości osadu w 1 dm³. Sytuacja ta utrzymywała się do końca badań.

W pierwszej komorze zawartość suchej masy osadu czynnego wahała się od 4,2 do 5,1 g/dm³, objętość osadu czynnego wynosiła od 270 do 390 cm³/dm³ a indeks objętościowy zmieniał się od 54,5 do 89,4 cm³/g. W drugiej komorze analogiczne wartości wahały się następująco: 1,8-5,4 g s.m./dm³, 260- 350 cm³/dm³ i 56,0-143 cm³/g, a dla komory trzeciej: 4,5-5,7 g s.m./dm³, 290-420 cm³/dm³ i 58,0-85,0 cm³/g.

Obciążenie osadów czynnych ładunkiem BZT₅ zmieniało się: dla I komory od 0,011 do 0,136 mg O₂/mg s.m./d, dla II komory od 0,011 do 0,233 O₂/mg s.m./d i dla III komory od 0,011 do 0,132 O₂/mg s.m./d. Natomiast obciążenie osadów związkami olejowymi zmieniało się w granicach: dla I komory od 0,01 do 0,618 mg/mg s.m./d., dla II komory od 0,01 do 0,803 mg/mg s.m./d. i dla III komory od 0,01 do 0,596 mg/mg s.m./d.

Odpiływy z komór napowietrzania, do których dozowano ścieki z olejem napędowym, posiadały odczyn alkaliczny w granicach 7,3-8,3. Wzrost wartości pH obserwowano w ściekach oczyszczonych opuszczających komorę I i II.

Zawartość tlenu w komorach wahała się w granicach 1,5-3,2 mg O₂/dm³.

4.10.2. Ocena postępu procesu biodegradacji oleju napędowego

W tabelach 20 i 21 znajdują się wyniki badań nad ubytkiem oleju napędowego obliczone na podstawie ekstraktu eterowego, badań chromatograficznych oraz ogólnego węgla organicznego. Jak widać wyniki te wskazują na najlepsze efekty oczyszczania dla komory III z osadem doszczepianym. W komorze tej obserwowano największą średnią skuteczność rozkładu która wynosiła w przypadku substancji ekstrahujących się eterem 88,9 %, w przypadku badań chromatograficznych 80,2% a w przypadku badań ogólnego węgla organicznego 71,5 %. W przypadku komory II zawierającej osad wyhodowany od podstaw wartości te przedstawiały się następująco: 61,5%, 51,0%, 46,1%, natomiast w przypadku komory I z osadem konwencjonalnym- 68,8%, 67,2% i 52,4%. Tak więc stopień usuwania oleju napędowego badany metodą substancji ekstrahujących się eterem naftowym był dla osadu III średnio lepszy o 20,4% w stosunku do osadu I i około 26,9% w stosunku do osadu II, w przypadku badań chromatograficznych o 24,3% i 26,1% a w przypadku badań ogólnego węgla organicznego o 21,6% i 26,0%.

We wszystkich komorach uzyskano dobre rezultaty usuwania zanieczyszczeń olejowych mierzone za pomocą obniżenia wartości BZT₅ i ChZT w odpływach z poszczególnych komór w stosunku do ścieków syntetycznych (Tabele 18, 19 i 20 oraz rysunki 50 i 51). Średnio stopień usuwania oleju napędowego (tabela 20) wyrażony w procentach redukcji BZT₅ w ciągu 47 dni trwania procesu oczyszczania wynosił dla komory I-64,8 %, dla komory II – 62,1% a dla komory III – 86,6% natomiast wyrażony w procentach redukcji ChZT komory I- 49,1%, dla komory II – 45,0% a dla komory III – 69,9%. Z wyników tych widać iż najlepsze rezultaty w obniżaniu wartości BZT i ChZT uzyskano w przypadku komory III zawierającej osad doszczepiany aktywnymi drobnoustrojami. Skuteczność biodegradacji obliczona na podstawie obniżenia wartości BZT dla tej komory była lepsza średnio o 21,8 % w stosunku do I komory zawierającej osad konwencjonalny i zmieniała się od 5,6-33,2% w trakcie badań. Natomiast w stosunku do II komory średnia skuteczność była lepsza o 24,5 % i zmieniała się w ciągu 47 dni w przedziale od 1,0-59,0%. W przypadku obniżenia wartości ChZT sytuacja przedstawiała się podobnie: średnia lepsza skuteczność III komory w stosunku do I komory wynosiła 20,8 % i zmieniała się od 4,8 do 38,4 %, natomiast w stosunku do II komory 24,9% i zmieniała się od 4,1 do 58,2%.

Analizę jakościową produktów pobiorczych przeprowadzono na podstawie badań chromatografii gazowej i cieczowej po 5, 16, i 40 dobie badań.

W obrazach chromatografii gazowej i cieczowej pochodzących z odpływów ze wszystkich komór widoczny był ubytek, w stosunku do wzorcowej próby oleju napędowego, węglowodorów C₆-C₁₂ (lekkie składniki frakcji oleju) oraz lekkich węglowodorów aromatycznych (BTX), usuwanych na skutek napowietrzania. Na podstawie badań chromatograficznych można stwierdzić

iż, w początkowym okresie badań, w odpływach ze wszystkich trzech komór zauważalne było znaczące zmniejszenie spektrów sygnałów w zakresie węglowodorów C_{12} - C_{24} oraz duże zmniejszenie i rozmycie sygnałów w całym zakresie retencji struktur aromatycznych. W momencie gdy do komór zaczęto dozować zmienną ilość oleju, zauważono w odpływach ze wszystkich komór ponowne zwiększenie spektrów sygnałów w zakresie retencji węglowodorów C_{12} - C_{24} oraz charakterystyczne maksima dla grup lżejszych węglowodorów aromatycznych. Pod koniec badań małe sygnały w zakresie retencji węglowodorów C_{12} - C_{24} oraz zmniejszenie i rozmycie sygnałów w zakresie retencji związków aromatycznych obserwowano jedynie dla odpływów z komory III. W odpływie z komory I i II sygnały te były wyraźnie zauważalne, choć były oczywiście mniejsze i bardziej rozmyte niż analogiczne sygnały pochodzące od oleju napędowego w ściekach surowych (rysunek 52, 53 i 55). Analiza powyższych wyników wskazuje na najlepszą skuteczność w usuwaniu węglowodorów oleju napędowego ze ścieków w przypadku osadu doszczepianego znajdującego się w komorze III.

4.10.3. Wyniki badań enzymatycznych

Wyniki badań nad aktywnością enzymatyczną biomasy osadów czynnych przedstawiono na rysunkach 55, 56, 57 i 58. Z zamieszczonych wyników widać iż, wykresy dla obu aktywności mają bardzo podobny przebieg. Na początku doświadczenia największą aktywnością odznaczał się osad w komorze II wyhodowany z aktywnych szczepów drobnoustrojów od podstaw, natomiast najniższą aktywnością odznaczał się osad w komorze I (konwencjonalny). W trakcie trwania badań, wraz z dozowaniem ścieków o różnej zawartości oleju napędowego, zaobserwowano powolny spadek aktywności enzymatycznej osadu w komorze II związany z pogarszaniem się warunków oczyszczania w tej komorze. W tym samym czasie osad konwencjonalny uzyskiwał coraz to większą aktywność enzymatyczną wraz z adaptacją jego mikroflory do węglowodorów oleju napędowego. To samo zjawisko, wzrostu aktywności enzymatycznej, zaobserwowano dla osadu doszczepianego. W efekcie końcowym największą aktywnością enzymatyczną odznaczał się osad doszczepiany następnie osad konwencjonalny a najniższą aktywność posiadał osad wyhodowany z aktywnych szczepów. Zaobserwowano także pewne wahania wartości aktywności enzymatycznej, większe dla aktywności esterazowej, związane ze zmieniającym się stężeniem oleju napędowego w ściekach.

Wartości aktywności dehydrogenazowej, w tej serii badań, w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego (rys. 55) zmieniały się w granicach: dla komory I od 0,5 do 38,2 $\mu\text{M TF/g s.m.}$, dla komory II od 10,1 do 42,3 $\mu\text{M TF/g s.m.}$ i dla komory III od 30,2 do 54,4 $\mu\text{M TF/g s.m.}$.

Natomiast wartości aktywności dehydrogenazowej w przeliczeniu na zawartość białka w biomacie osadu czynnego (rys. 56) zmieniały się w granicach: dla komory I od 4,1 do 17,3 $\mu\text{M TF/mg}$, dla komory II od 7,3 do 22,3 $\mu\text{M TF/mg}$ i dla komory III od 17,2 do 22,4 $\mu\text{M TF/mg}$.

Wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na suchą masę (rys.57) zmieniały się w granicach: dla komory I od 0,55 do 1,19 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$, dla komory II od 0,2 do 1,5 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$ i dla komory III od 0,85 do 1,58 $\mu\text{g fluoresceiny/mg s.m.}$

Natomiast wartości aktywności esterazowej w przeliczeniu na zawartość białka (rys.58) zmieniały się w granicach: dla komory I od 1,0 do 3,9 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$, dla komory II od 0,9 do 4,7 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$ i dla komory III od 2,0 do 6,8 $\mu\text{g fluoresceiny/mg}$.

Tabela 18. Parametry technologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (4 seria).

Parametr	Numer komory	D N I :																		
		1	2	3	5	7	9	11	12	14	16	18	19	21	23	25	26	28	30	32
Objętość osadu po 0,5 godzinnej sedymentacji w leju Imhofa cm ³ / dm ³	1	300	290	290	290	270	280	290	290	310	300	310	310	300	300	300	310	300	320	320
	2	280	290	300	310	320	310	310	310	300	290	280	280	290	290	300	300	310	310	300
	3	290	295	310	320	340	320	320	330	350	370	380	350	340	340	320	360	350	350	370
Sucha masa mg / dm ³	1	5000	4900	4850	4720	4527	4400	4550	4690	4900	4850	4900	4920	5010	5030	5000	4970	4850	5090	5120
	2	5000	5030	5150	5238	5400	5179	5220	5290	5100	4900	4850	4700	4800	4850	4780	4700	4550	4500	4480
	3	5000	5050	5200	5279	5450	5300	5350	5300	5700	5640	5500	5350	5450	5400	5200	5500	5550	5430	5341
Indeks osadu cm ³ / g	1	60,0	59,2	59,8	61,4	59,6	54,5	63,7	61,8	63,3	61,9	63,3	63,0	59,9	59,6	60,0	62,4	61,9	62,9	62,5
	2	56,0	57,7	58,3	59,2	59,3	59,9	59,4	58,6	58,8	59,2	57,7	59,6	60,4	59,8	62,8	63,8	68,1	68,9	67,0
	3	58,0	58,4	59,6	60,6	62,4	60,4	59,8	62,3	61,4	65,6	69,1	65,4	62,4	63,0	61,5	65,5	63,1	64,5	69,3
BZT ₅ ścieków surowych mg O ₂ / dm ³		54	126	176	225	160	244	187	176	450	563	421	495	310	231	421	580	402	495	525
BZT ₅ ścieków oczyszczonych mg O ₂ / dm ³	1	18	36	62	55	61	71	69	67	162	197	131	110	68	38	109	166	109	77	200
	2	5	21	28	24	22	40	37	41	104	122	118	144	96	54	147	197	125	95	257
	3	2	12	18	21	14	23	21	22	59	51	42	50	28	16	34	57	36	50	87
Obciążenie osadu ładunkiem BZT ₅ Mg O ₂ / mg s.m. / d	1	0,011	0,026	0,036	0,048	0,035	0,055	0,041	0,038	0,092	0,11	0,086	0,1	0,062	0,046	0,084	0,117	0,083	0,097	0,102
	2	0,011	0,025	0,034	0,048	0,03	0,047	0,036	0,033	0,088	0,11	0,087	0,105	0,065	0,048	0,088	0,123	0,088	0,11	0,117
	3	0,011	0,025	0,034	0,043	0,029	0,046	0,035	0,033	0,079	0,095	0,077	0,093	0,057	0,043	0,081	0,105	0,072	0,091	0,098
Obciążenie osadu związkami olejowymi mg oleju napędowego / mg s.m. / d	1	0,01	0,061	0,082	0,159	0,12	0,18	0,132	0,085	0,327	0,433	0,306	0,346	0,19	0,139	0,3	0,443	0,289	0,334	0,352
	2	0,01	0,06	0,078	0,143	0,101	0,154	0,115	0,076	0,314	0,429	0,309	0,361	0,208	0,144	0,314	0,468	0,31	0,377	0,402
	3	0,01	0,059	0,077	0,14	0,1	0,151	0,112	0,075	0,281	0,372	0,273	0,318	0,183	0,13	0,288	0,4	0,252	0,313	0,337
ChZT ścieków surowych mg/dm ³		72	207	293	461	320	488	373	293	970	1150	937	990	646	492	937	1290	820	990	1050
ChZT ścieków oczyszczonych mg/dm ³	1	31	107	152	241	177	216	172	185	631	681	485	491	260	164	343	417	312	410	462
	2	27	81	123	160	121	166	124	114	407	403	431	614	373	217	457	553	451	439	734
	3	19	64	91	141	102	137	93	73	262	299	253	324	194	141	250	316	254	248	326
Odczyn ścieków odpływających pH	1	7,6	7,8	7,8	7,7	7,7	7,6	7,7	7,6	7,7	7,6	7,5	7,6	7,5	7,6	7,5	7,6	7,7	7,6	7,6
	2	7,5	7,5	7,6	7,5	7,6	7,5	7,6	7,5	7,5	7,6	7,6	7,6	7,7	7,6	7,7	7,7	7,7	7,6	7,8
	3	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,3	7,4	7,5	7,4	7,3	7,5	7,6	7,6	7,6	7,5	7,5	7,5	7,5

Tabela 19. Parametry technologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (4 seria cd.).

Parametr	Numer komory	D N I :							
		33	35	37	39	40	44	46	47
Objętość osadu po 0,5 godzinnej sedymencie w leju Imhoffa cm ³ / dm ³	1	340	340	360	370	380	390	380	380
	2	320	340	350	350	330	300	290	260
	3	380	390	410	420	400	410	390	380
Sucha masa mg / dm ³	1	4850	4950	5020	4720	4600	4670	4500	4250
	2	4300	4150	3860	3490	2850	2120	2050	1820
	3	5100	5150	5200	4950	4760	4890	4680	4470
Indeks osadu cm ³ / g	1	70,1	68,7	71,7	78,4	82,6	83,5	84,4	89,4
	2	74,4	81,9	90,7	100	116	142	142	143
	3	74,5	81,9	78,8	84,8	84,0	83,8	83,3	85,0
BZT ₅ ścieków surowych mg O ₂ / dm ³		563	669	685	525	421	495	396	123
BZT ₅ ścieków oczyszczonych mg O ₂ / dm ³	1	225	301	305	250	209	251	218	71
	2	287	401	437	357	306	379	329	107
	3	81	112	151	123	96	87	103	37
Obciążenie osadu ładunkiem BZT ₅ Mg O ₂ / mg s.m. / d	1	0,116	0,135	0,136	0,111	0,091	0,106	0,088	0,029
	2	0,131	0,161	0,177	0,15	0,148	0,233	0,193	0,068
	3	0,110	0,129	0,132	0,106	0,088	0,101	0,085	0,028
Obciążenie osadu związkami olejowymi mg oleju napędowego / mg s.m. / d	1	0,515	0,586	0,618	0,381	0,326	0,364	0,267	0,047
	2	0,581	0,699	0,803	0,516	0,526	0,802	0,585	0,11
	3	0,49	0,563	0,596	0,364	0,315	0,348	0,256	0,045
ChZT ścieków surowych mg/dm ³		1250	1520	1630	1050	937	990	792	205
ChZT ścieków oczyszczonych mg/dm ³	1	588	725	823	578	485	538	473	129
	2	875	1046	1226	832	753	838	709	189
	3	438	534	595	418	304	274	260	69
Odczyn ścieków odpływających pH	1	7,7	7,8	7,8	7,9	7,7	7,8	7,9	7,8
	2	8,3	7,9	8,0	8,0	8,0	8,3	8,3	8,2
	3	7,5	7,5	7,5	7,5	7,6	7,6	7,3	7,3

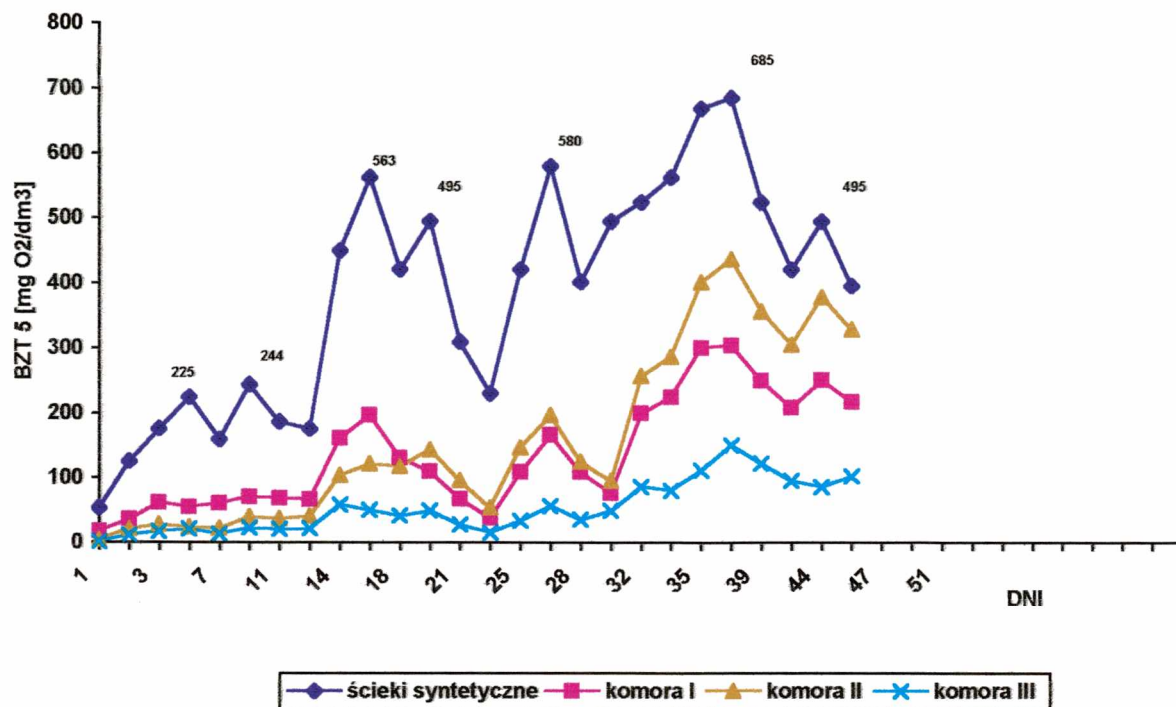
Tabela 20. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań BZT₅, ChZT i ekstraktu eterowego, przez osad czynny (0.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III) (4 seria).

Dni	Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :														
	BZT ₅					ChZT					Ekstrakt eterowy				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.III-0.I	Różnica 0.III-0.II	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.III-0.I	Różnica 0.III-0.II	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.III-0.I	Różnica 0.III-0.II
1	66,7	83,3	92,6	25,9	9,3	57,0	62,0	73,0	16,0	11,0	-	-	-	-	-
2	71,5	83,3	90,7	19,9	7,4	48,3	61,0	69,0	20,7	8,0	81,0	88,0	95,0	14,0	7,0
3	65,0	84,0	90,0	25,0	6,0	48,0	58,0	69,0	21,0	11,0	-	-	-	-	-
5	75,7	89,5	90,5	14,8	1,0	47,8	65,3	69,4	21,6	4,1	83,2	90,0	92,0	6,8	2,0
7	62,0	86,0	91,0	29,0	5,0	44,7	62,3	68,0	23,3	5,7	-	-	-	-	-
9	70,9	83,6	90,5	19,6	6,9	55,8	66,0	72,0	16,2	6,0	82,1	84,5	91,5	9,4	7,0
11	63,0	80,0	89,0	26,0	9,0	54,0	66,7	75,0	21,0	8,3	-	-	-	-	-
12	61,9	76,6	87,5	25,6	10,9	37,5	61,0	75,0	37,5	14,0	77,0	90,4	95,2	18,2	4,9
14	64,0	77,0	87,0	23,0	10,0	35,0	58,0	73,4	38,4	15,4	-	-	-	-	-
16	65,0	78,3	91,0	26,0	12,7	40,8	65,0	74,0	33,2	9,0	72,2	83,1	94,1	21,9	11,0
18	69,0	72,0	90,0	21,0	18,0	48,2	54,0	73,0	24,8	19,0	-	-	-	-	-
19	77,8	71,0	90,0	12,2	19,0	50,4	38,0	67,3	16,9	29,3	76,0	77,2	90,5	14,5	13,3
21	78,0	69,0	91,0	13,0	22,0	59,7	42,3	70,0	10,3	27,7	-	-	-	-	-
23	83,5	76,5	93,0	9,5	16,5	66,6	55,8	71,4	4,8	15,6	80,1	80,9	92,4	12,3	11,5
25	74,0	65,0	92,0	18,0	27,0	63,4	51,2	73,3	9,9	22,1	-	-	-	-	-
26	71,4	66,0	90,2	18,8	24,2	67,7	57,1	75,5	7,8	18,4	77,2	67,3	92,2	15,0	24,9
28	73,0	65,0	92,0	19,0	27,0	62,0	45,0	69,0	7,0	24,0	-	-	-	-	-
30	84,4	80,8	90,0	5,6	9,2	58,6	55,7	75,0	16,4	19,3	72,1	62,2	90,1	18,0	27,9
32	62,0	51,0	83,5	21,5	32,5	56,0	30,1	69,0	13,0	38,9	60,3	43,5	87,6	27,3	44,1
33	60,1	49,0	85,6	25,5	36,6	53,0	30,0	65,0	12,0	35,0	-	-	-	-	-
35	55,0	40,0	83,2	28,2	43,2	52,3	31,2	64,3	12,0	33,1	56,7	35,0	85,2	28,5	50,2
37	55,5	36,2	78,0	22,5	41,8	49,5	24,8	63,5	14,0	38,7	-	-	-	-	-
39	52,3	32,0	76,5	24,2	44,5	45,0	20,8	60,2	15,2	39,4	51,2	30,2	80,4	29,2	50,2
40	50,4	27,3	77,1	26,7	49,8	48,2	19,6	67,6	19,4	48,0	-	-	-	-	-
44	49,2	23,4	82,4	33,2	59,0	45,7	15,4	72,3	26,6	56,9	49,2	21,7	80,1	30,9	58,4
46	45,0	17,0	74,0	29,0	57,0	40,3	10,5	67,2	26,9	56,7	-	-	-	-	-
47	42,1	13,2	70,0	27,9	56,8	37,2	8,0	66,2	29,0	58,2	38,3	12,3	76,3	38,0	64,0
Śred	64,8	62,1	86,6	21,8	24,5	49,1	45,0	69,9	20,8	24,9	68,3	61,9	88,7	20,4	26,9

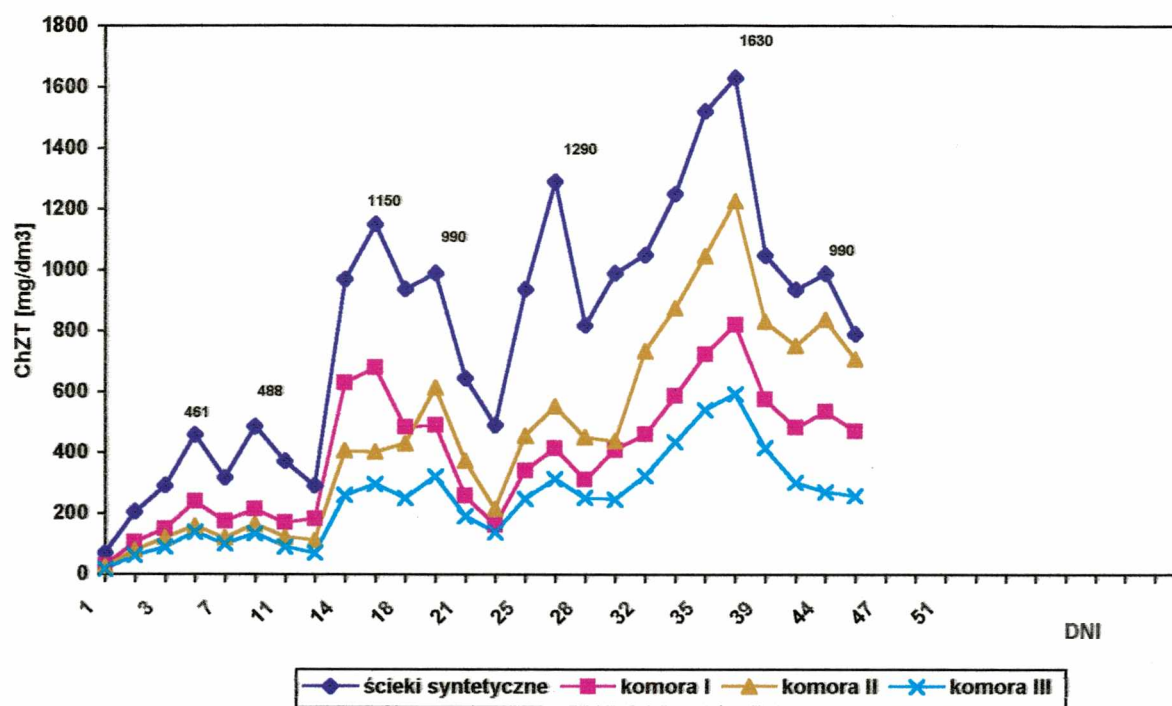
Tabela 21. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (O.I), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (O.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (O.III).

Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań :										
Dni	Chromatografia gazowa					OWO				
	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.III-0.I	Różnica 0.III-0.II	0.I	0.II	0.III	Różnica 0.III-0.I	Różnica 0.III-0.II
2	65,5	90,0	94,7	19,2	4,7	63,1	85,1	87,5	24,4	2,4
5	66,0	91,5	95,4	18,4	3,9	62,7	78,0	86,0	23,3	8,0
12	66,5	89,0	94,3	16,8	5,3	63,0	74,1	85,3	22,3	11,2
16	67,0	84,0	95,8	18,8	11,8	69,4	72,3	88,7	19,3	16,4
19	73,0	80,5	92,2	19,2	11,7	71,3	70,4	85,1	13,8	14,7
23	75,5	71,0	94,5	19,0	23,5	67,5	55,7	86,1	18,6	30,4
28	72,0	70,0	90,3	18,3	20,3	63,1	53,2	84,3	21,2	31,1
33	70,0	48,0	87,8	17,8	39,8	50,2	40,1	79,0	28,8	38,9
37	62,4	36,2	85,2	22,8	49	52,3	38,5	75,1	22,8	36,6
44	54,1	23,2	80,4	26,3	57,2	53,1	28,9	74,3	21,2	45,4
47	50,3	19,2	79,1	28,8	59,9	50,2	21,3	71,5	21,3	50,2
Śred	65,7	63,9	89,97	24,3	26,1	60,5	56,1	82,1	21,6	26,0

Rys.50. Wartości BZT5 w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (4 seria).



Rys.51. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (4 seria).



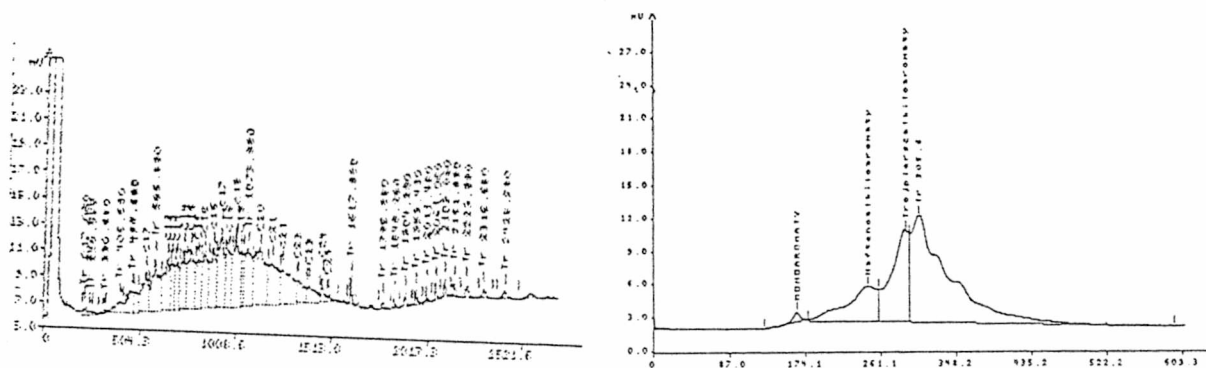
4.10.4. Liczebność bakterii rozkładających węglowodory w osadach czynnych i bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych

Miano bakterii rozkładających olej napędowy utrzymywało się mniej więcej na tym samym poziomie we wszystkich osadach w czasie trwania badań. Największe rzędu 10^{-7} - 10^{-10} dla osadu w komorze trzeciej-doszczepianej, następnie 10^{-6} - 10^{-7} dla osadu w komorze drugiej, dalej 10^{-3} - 10^{-5} dla osadu konwencjonalnego w komorze pierwszej.

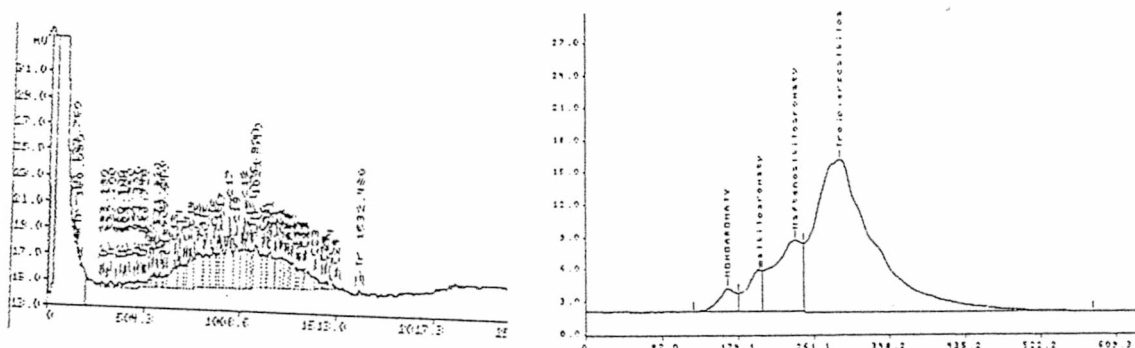
Rysunek 59 przedstawia zmiany ogólnej liczby bakterii wolnożyjących w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm^3 . Na początku badań w odpływie z komory trzeciej-doszczepianej zauważono największą liczbę bakterii wolnożyjących. Jednakże w miarę upływu czasu liczba ich ustabilizowała się na podobnym poziomie. Obserwowano jedynie pewne wahania liczby bakterii, w stałym zakresie wartości, związane z wprowadzaniem szczepionki bakteryjnej do osadu co siedem dni. Natomiast liczba bakterii wolnożyjących w ściekach oczyszczonych pochodzących z drugiej komory od początku badań systematycznie wzrastała. Było to za pewnie wynikiem pogarszających się zdolności sedymentacyjnych tego osadu. W odpływach z komory pierwszej liczba bakterii do 30 dnia badań utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie. Po tym czasie obserwowano wzrost liczby bakterii w odpływach z tej komory. Ogólna liczba bakterii w odpływie z pierwszej komory wahała się od 3100 do 4900 w 1 cm^3 . W odpływie z drugiej komory od 3500 do 6000, a w odpływie z komory trzeciej od 3300 do 4800 w 1 cm^3 .

Rysunek 52. Chromatografia gazowa i cieczowa odplywów z komory I po 5, 16 i 40 dniach (4 seria)

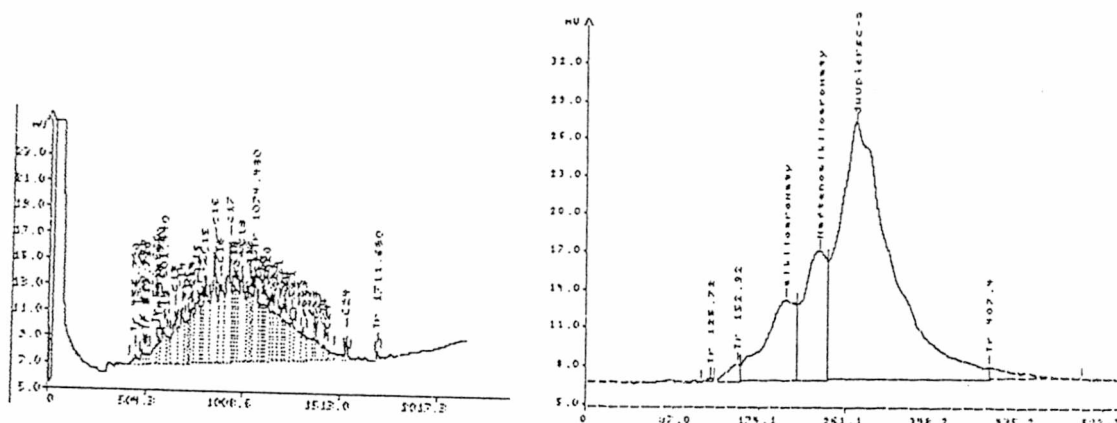
5 dzień



16 dzień

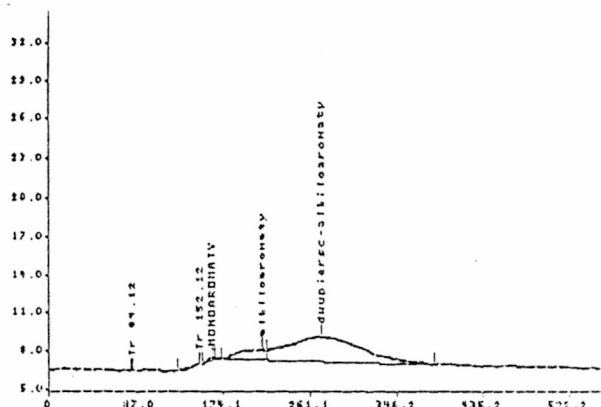


40 dzień

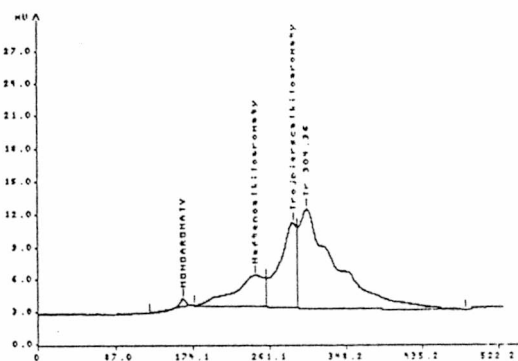


Rysunek 53. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 5, 16 i 40 dniach (4 seria)

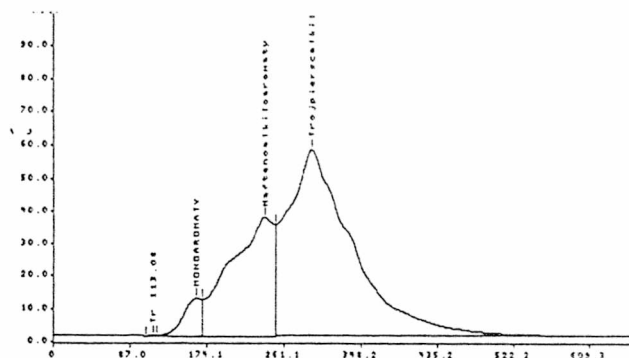
5 dzień



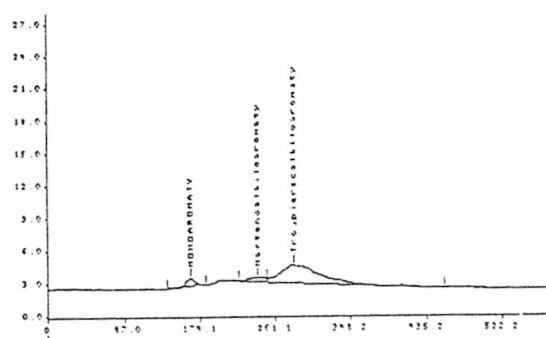
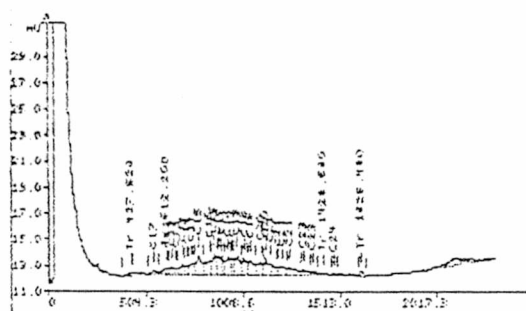
16 dzień



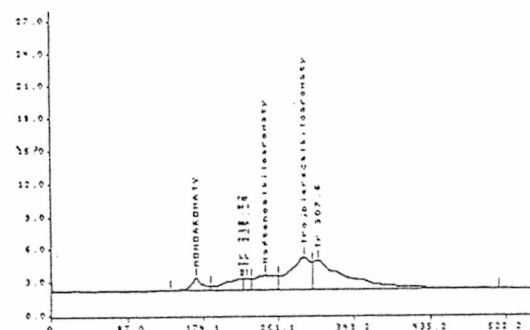
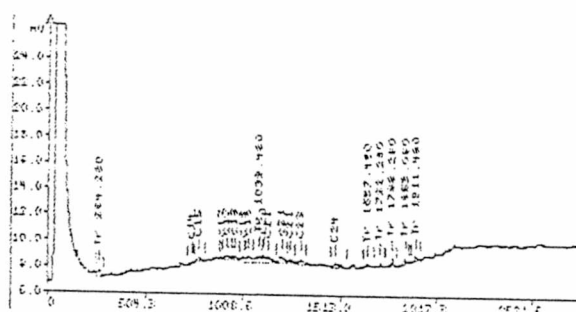
40 dzień



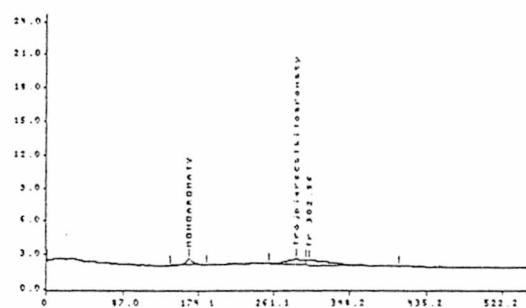
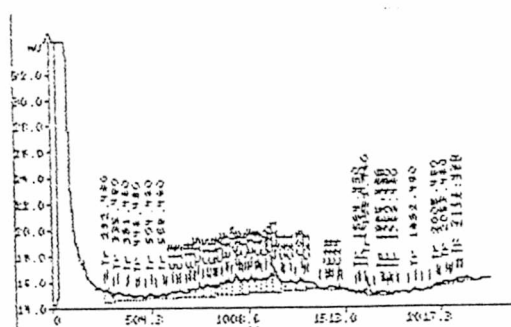
5 dzień



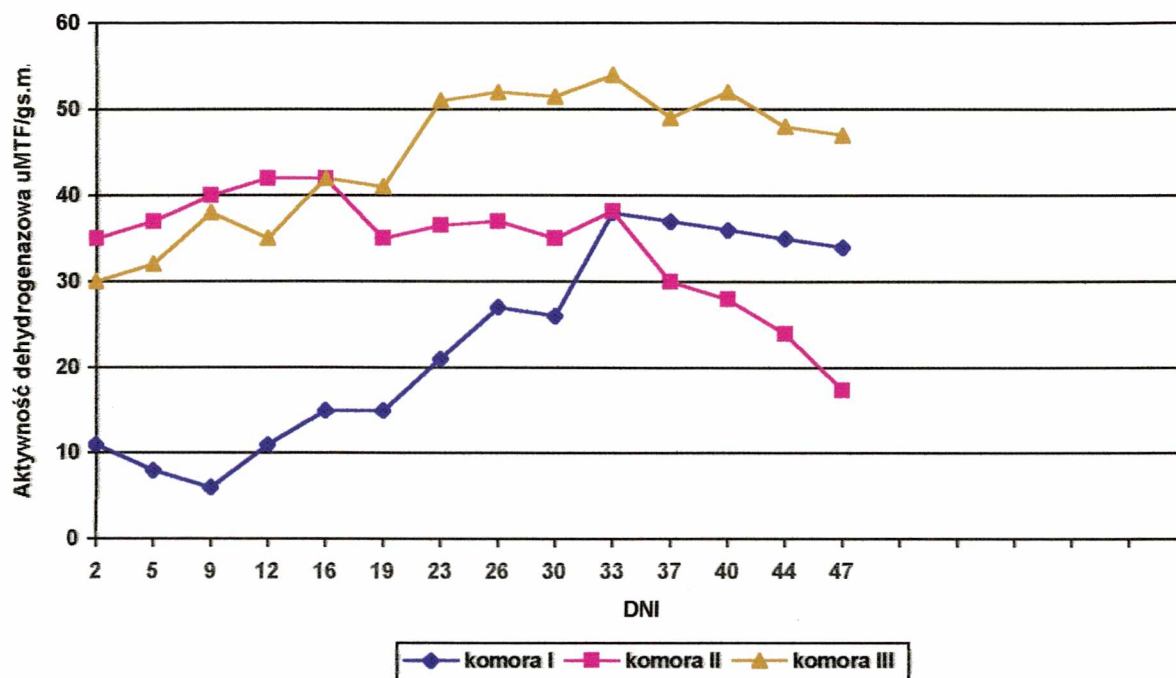
16 dzień



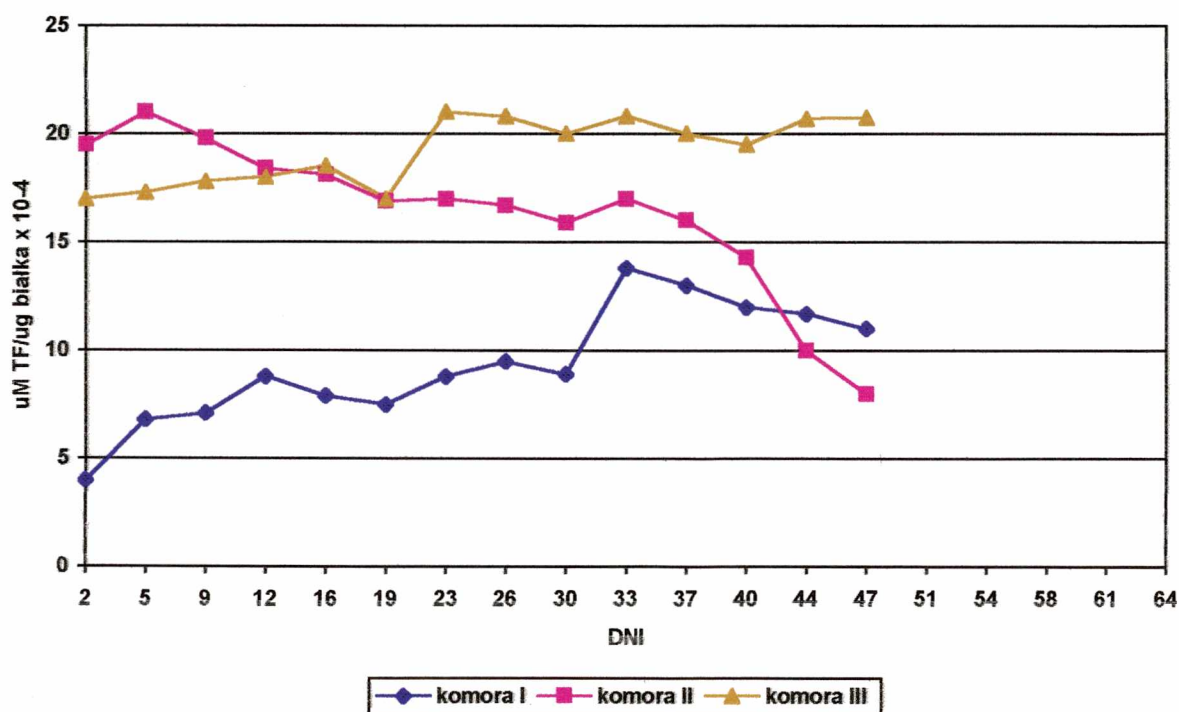
40 dzień



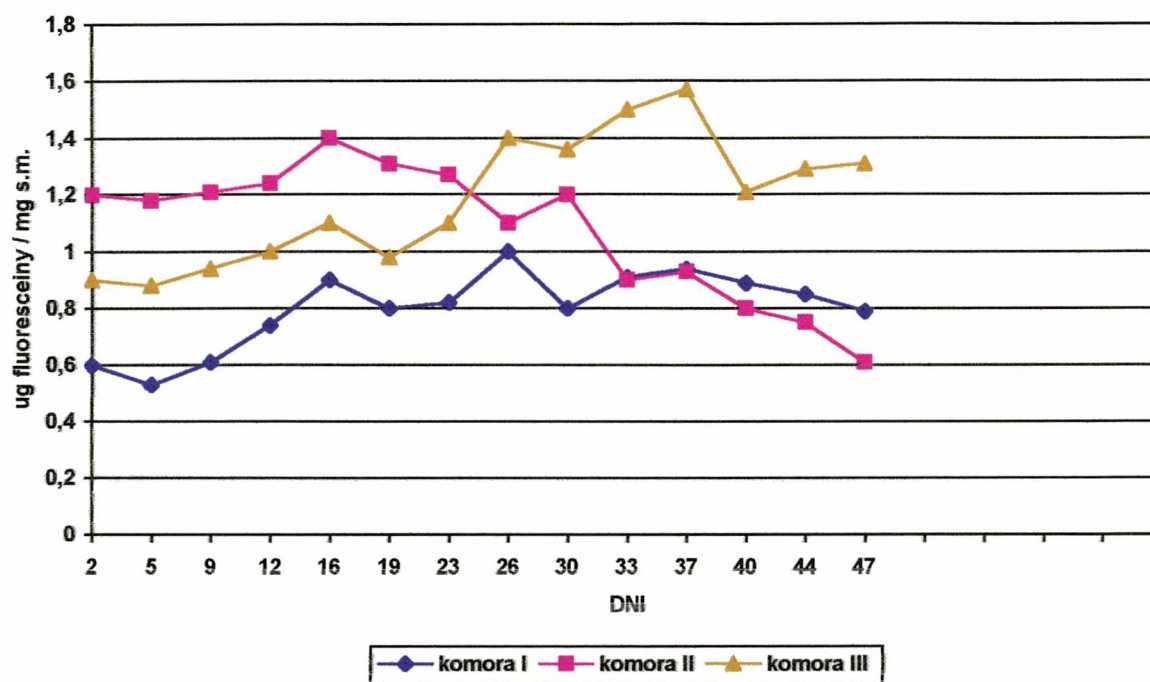
Rys.55. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (4 seria).



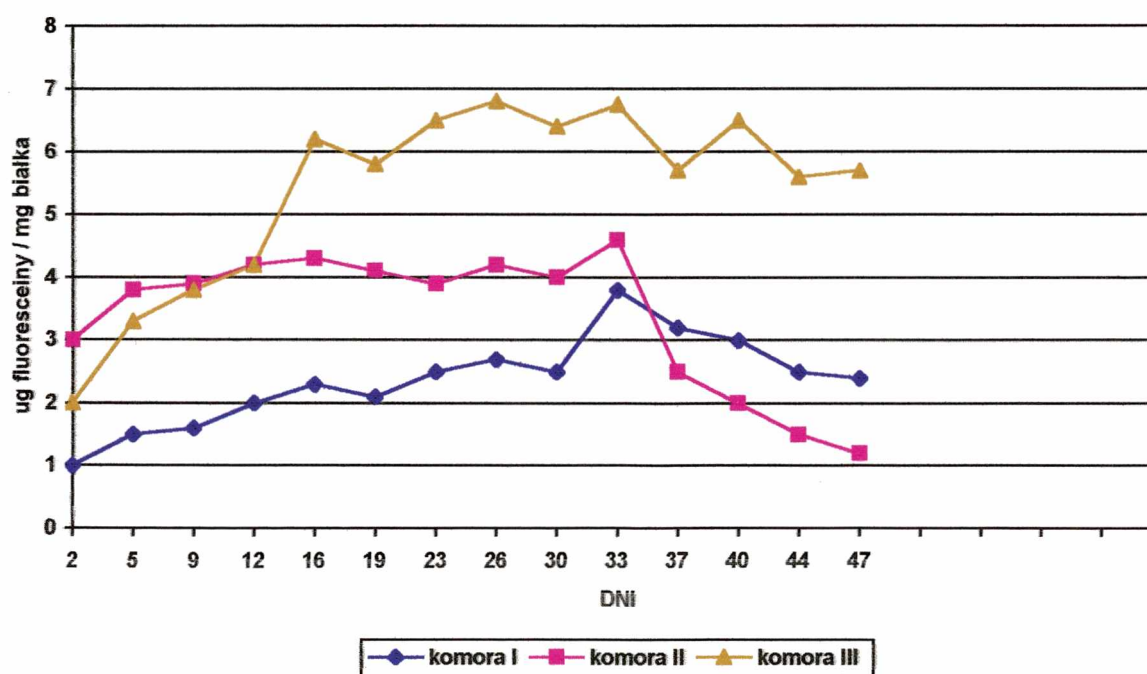
Rys.56. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (4 seria).



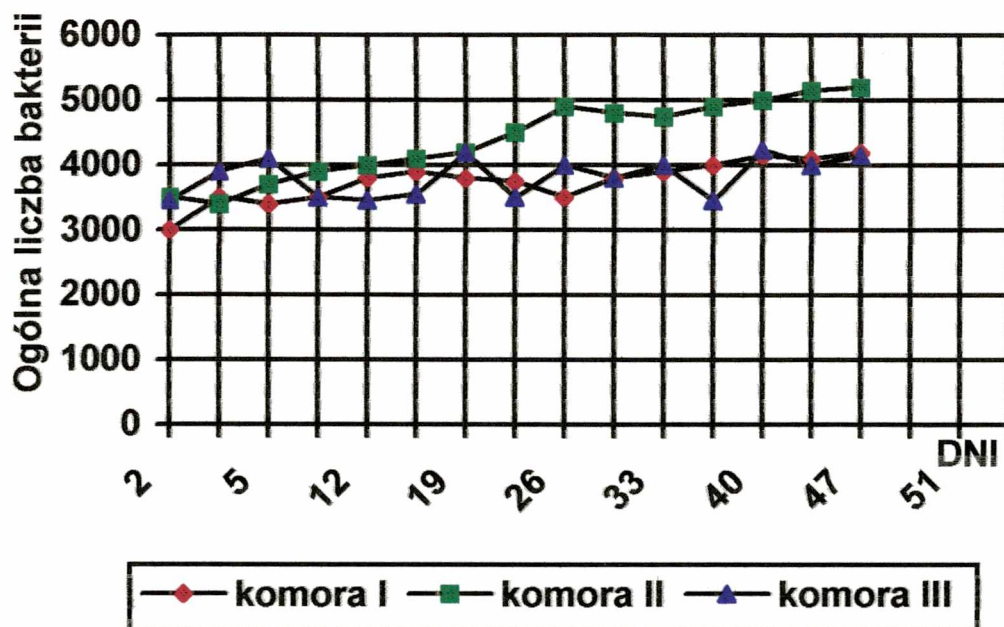
Rys.57. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (4 seria).



Rys. 58. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (4 seria).



Rys.59. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływających w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm³ (4 seria).



Podsumowując, tą serię badań, należy stwierdzić, iż w przypadku dozowania do komór napowietrzania zmiennego stężenia oleju napędowego w granicach od 50 do 3100 mg/dm³ obserwowano najlepsze efekty oczyszczania, tak samo jak w poprzednich seriach badań, w przypadku osadu doszczepianego znajdującego się w komorze III. Przez cały czas badań osad ten odznaczał się najlepszymi wynikami biodegradacji oleju napędowego. Stopień usuwania zanieczyszczeń olejowych ze ścieków zmieniał się w zależności od aktualnego stężenia oleju w komorze, jednak przez cały czas trwania badań był wysoki w przypadku tego osadu. W ostatecznym efekcie, średni stopień usuwania zanieczyszczeń obliczony na podstawie badań pięciu parametrów (obniżenia wartości BZT₅ i ChZT, badań ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i OWO) dla osadu doszczepianego wyniósł 83,5%. Natomiast osad wyhodowany z aktywnych szczepów w komorze II bardzo źle znosił skokowe zmiany stężenia oleju napędowego w ściekach. Po pierwszym okresie skutecznego usuwania tych zanieczyszczeń nastąpiło stopniowe i systematyczne pogorszenie warunków oczyszczania w tej komorze. To samo zjawisko, nie tak gwałtowne jednak jak dla osadu bakteryjnego, obserwowano dla osadu konwencjonalnego w komorze I i to dopiero pod koniec badań. W wyniku tej serii badań średni stopień usuwania zanieczyszczeń olejowych ze ścieków dla osadu konwencjonalnego wyniósł 61,7%. Natomiast średni stopień oczyszczania dla osadu wyhodowanego od podstaw w komorze II był najgorszy i wyniósł 57,8% (tabela 22).

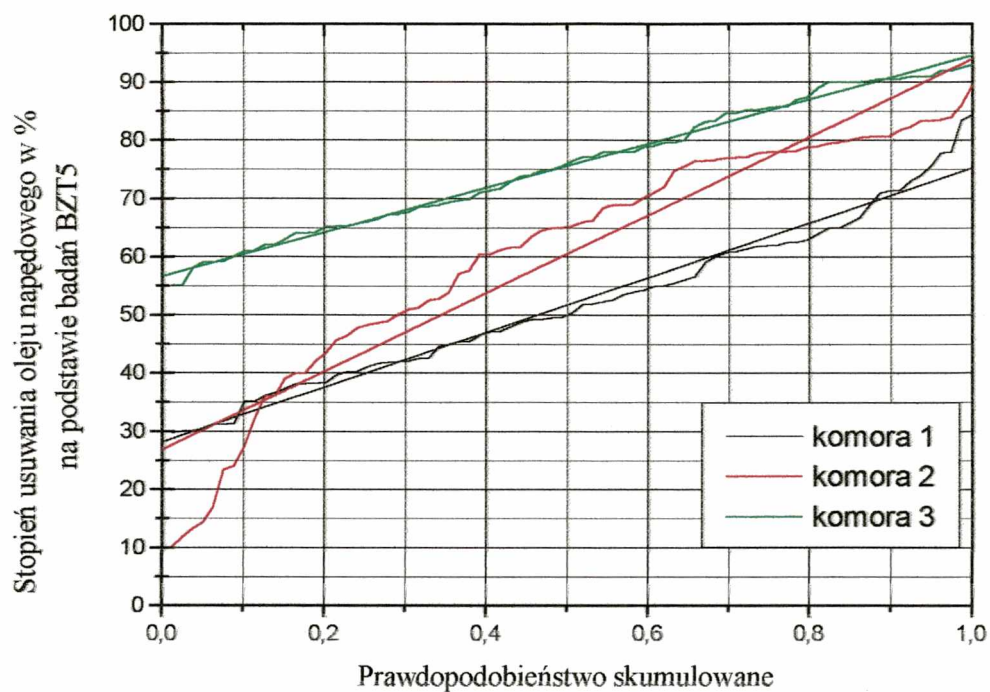
Tabela 22. Procentowe obniżenie zawartości oleju napędowego w czasie biodegradacji przez osad czynny konwencjonalny I, przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów II i przez osad doszczepiany III.

Seria badań	Numer komory	Średni stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań:					Średnio
		BZT ₅	ChZT	Ekstraktu eterowego	Chromatografii gazowej	OWO	
1	I	52,8	32,3	82,2	79,9	89,1	67,3
	II	78,5	66,5	90,1	92,6	92,3	84,0
	III	80,5	66,9	92,2	93,7	92,7	85,2
	II-I	25,7	34,2	7,9	12,7	3,2	16,7
	III-I	27,7	34,6	10,0	13,8	3,6	17,9
	III-II	2,0	0,4	2,1	1,1	0,4	1,2
2	I	47,8	32,7	63,5	67,9	54,8	53,3
	II	59,0	47,0	74,6	73,6	59,1	62,7
	III	69,4	57,7	85,8	83,1	67,2	72,6
	II-I	11,2	14,3	11,1	5,7	4,3	9,3
	III-I	21,6	25,0	22,3	15,2	12,4	19,3
	III-II	10,4	10,7	11,2	9,5	8,1	9,98
3	I	36,5	25,0	49,7	46,9	36,1	38,8
	II	45,2	30,4	57,7	50,5	31,2	43,0
	III	62,0	52,4	78,3	70,3	55,8	63,8
	II-I	8,7	5,4	8,0	3,6	-	6,4
	III-I	25,5	27,4	28,6	23,4	19,7	24,9
	III-II	16,8	22,0	20,6	19,8	24,6	20,8
4	I	64,8	49,1	68,3	65,7	60,5	61,7
	II	62,1	45,0	61,9	63,9	56,1	57,8
	III	86,6	69,9	88,7	90,0	82,1	83,5
	III-I	21,8	20,8	20,4	24,3	21,6	21,8
	III-II	24,5	24,9	26,9	26,1	26,0	25,7
Średnia z czterech Serii	I	55,3					
	II	61,9					
	III	76,3					
	II-I	6,6					
	III-I	21,0					
	III-II	14,4					

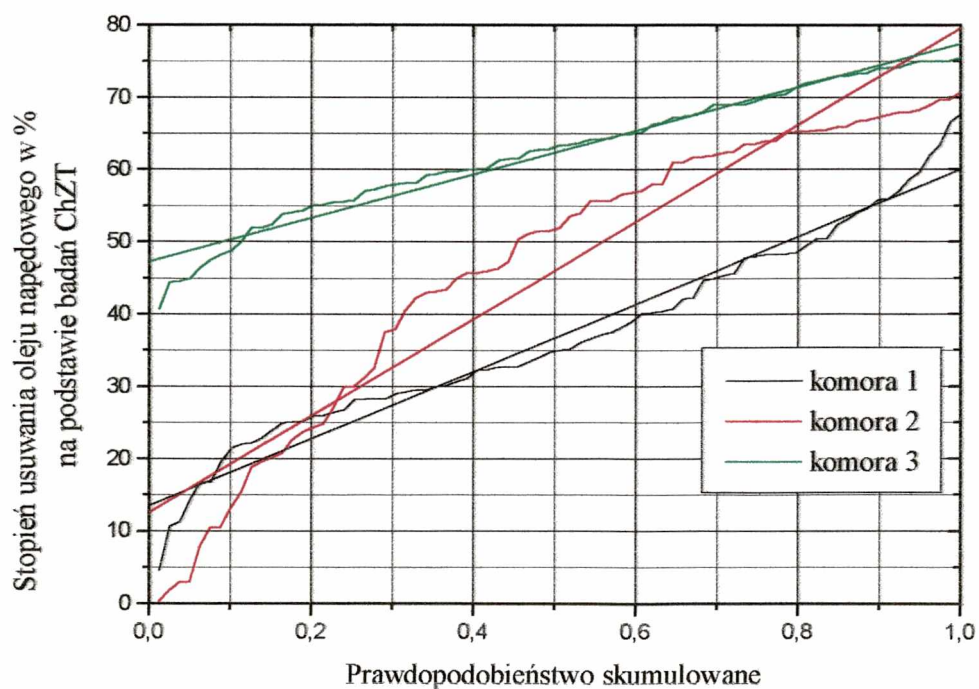
4.11. Wyniki badań statystycznych

Analiza statystyczna oparta została o wyniki stopnia usuwania zanieczyszczeń w %, przez badane osady czynne, uzyskane we wszystkich seriach badań na podstawie analiz BZT₅, ChZT, ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i OWO. Wyniki analiz statystycznych przedstawiono w tabeli 23. Rysunki 60-64 stanowią ilustrację graficzną odwróconych dystrybuant empirycznych (to znaczy, że osie tych wykresów zostały zamienione miejscami).

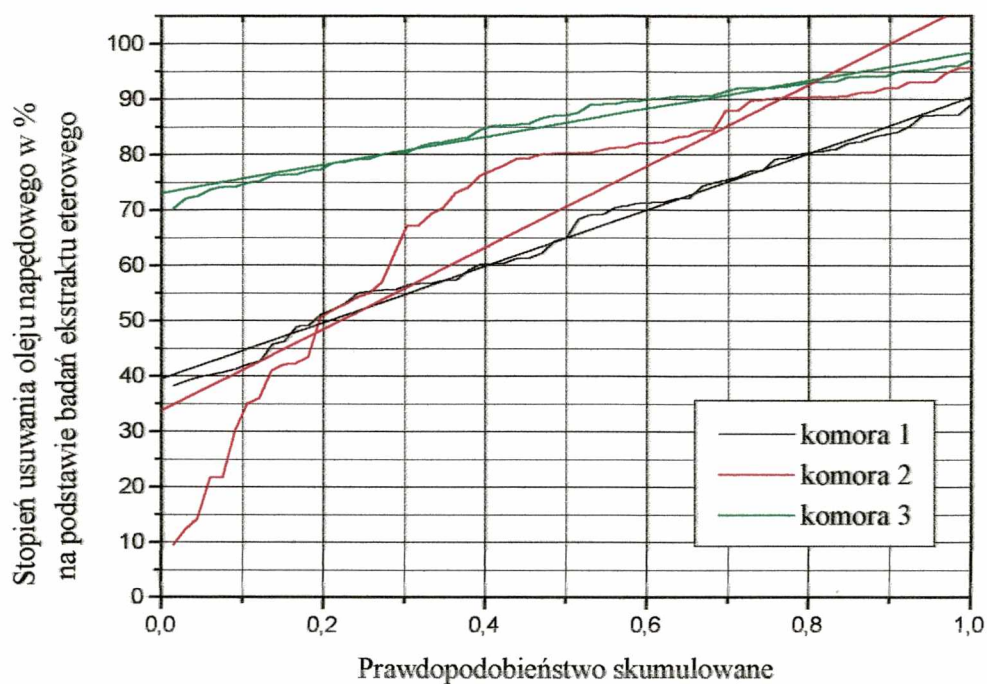
Rys. 60. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań BZT₅ w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego



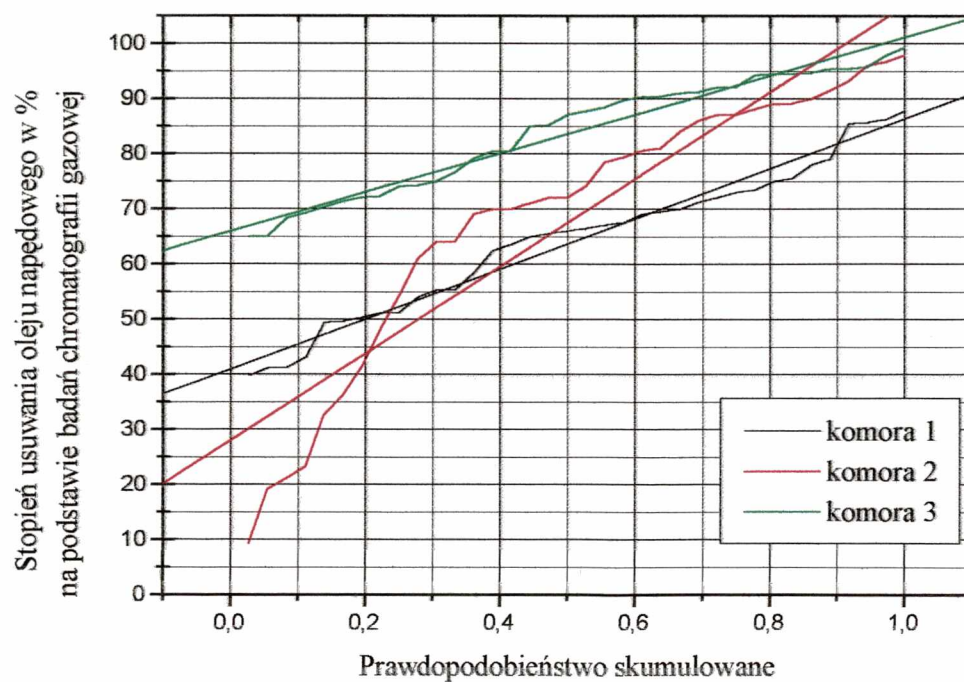
Rys. 61. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań ChZT w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego



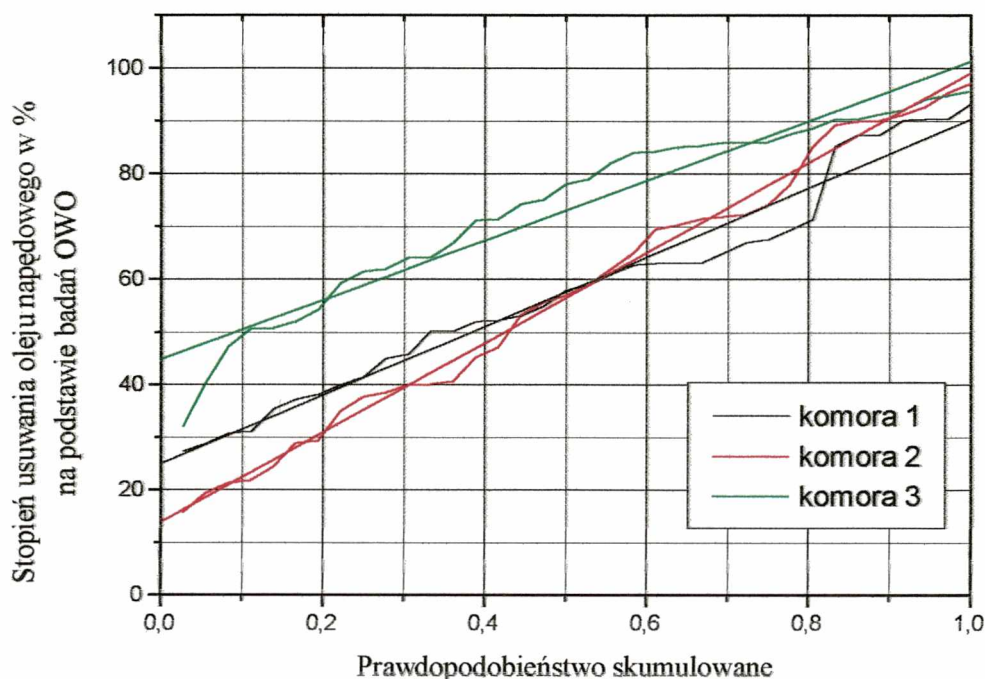
Rys. 62. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań ekstraktu eterowego w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego



Rys. 63. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań chromatografii gazowej w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego



Rys. 64. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań OWO w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego



Współczynniki korelacji, bliskie jedności, oraz małe wartości odchylenia standardowego otrzymane z liniowej aproksymacji każdej dystrybucyj empirycznej świadczą o wysokiej zależności liniowej pomiędzy prawdopodobieństwem skumulowanym a stopniem usuwania oleju napędowego we wszystkich przypadkach.

W celu zbadania istotności statystycznej różnic między wartościami procentowego usunięcia badanych zanieczyszczeń przez poszczególne osady, zastosowano test Studenta. Badania prowadzono na dwóch poziomach istotności: 0,01 i 0,05. W większości przypadków wykazano istotność statystyczną różnic pomiędzy średnimi stopniami usuwania oleju napędowego w poszczególnych komorach. Jedynie w trzech przypadkach, różnica w stopniu usuwania oleju w % na podstawie badań: ekstraktu eterowego, badań chromatograficznych i badań OWO pomiędzy komorą I i II, okazała się nieistotna. Nieistotność tych różnic wynika prawdopodobnie z dwóch przyczyn: pierwszą przyczyną mogła być zbyt mała liczba pomiarów dla tych trzech metod badawczych, a drugą może bardziej istotniejszą, było pogarszanie się warunków oczyszczania w komorze II na skutek toksycznego wpływu wysokich stężeń oleju na kłaczki osadu czynnego.

Wyniki tych badań potwierdzają najlepszą średnią skuteczność biodegradacji oleju napędowego przez osad doszczepiany a najgorszą przez osad konwencjonalny w całym zakresie stosowanych stężeń. Stopień usuwania oleju ze ścieków w przypadku osadu czynnego wyhodowanego z aktywnych szczepów od podstaw był zależny od koncentracji oleju. Przy niskich stężeniach osad ten usuwał zanieczyszczenia olejowe z dużą skutecznością, przewyższającą skuteczność osadu doszczepianego, a przy wysokich stężeniach z bardzo niską skutecznością, poniżej skuteczności osadu konwencjonalnego.

Tabela 23. Zestawienie parametrów statystycznych

Parametry Statystyczne	Stopień usuwania oleju napędowego w % przez badane osady (w komorach: I, II i III) na podstawie badań:														
	BZT ₅			ChZT			Ekstrakt eterowy			Chromatografia gazowa			OWO		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Liczba pomiarów	79	79	79	79	79	79	66	66	66	36	36	36	36	36	36
Wartość średnia	52,02	60,86	75,88	37,04	46,47	62,53	65,31	71,09	85,95	64,3	68,54	84,05	58,54	57,65	73,84
Odchylenie standardowe	13,83	20,46	11,07	13,77	20,32	8,89	14,88	23,42	7,49	13,45	24,54	10,49	19,43	25,02	17,08
Liniowa aproksymacja dystrybuanty empirycznej															
Y=A+BX															
A	28,20272	26,83563	56,63388	13,46738	12,53535	47,25725	39,48494	33,75156	73,06266	40,98619	28,01778	65,95317	24,93444	13,85587	44,82349
B	47,04463	67,19964	38,00309	46,55942	67,02019	30,17192	50,88041	73,57006	25,39894	45,36741	78,8627	35,21004	65,38703	85,22641	56,4732
Współczynnik korelacji	0,98809	0,95402	0,99686	0,98223	0,95818	0,98597	0,99481	0,91377	0,98641	0,98716	0,94042	0,98236	0,98494	0,9967	0,96736
Odchylenie standardowe	2,14	6,17	0,88	2,60	5,85	1,49	1,52	9,59	1,24	2,18	8,47	1,99	3,41	2,06	4,39
Test t-Studenta dla dwóch wartości średnich w komorach:															
	I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III
Wartość funkcji Studenta, $\alpha=0,01$															
T	3,18056	11,9652	5,73598	3,41394	13,82418	6,438	1,69355	10,06991	4,91049	0,90999	6,94651	3,48514	-0,16729	3,55016	3,2062
P	0,00177	$8,0 \times 10^{-24}$	$4,9 \times 10^{-8}$	$8,16 \times 10^{-4}$	$6,91 \times 10^{-29}$	$1,42 \times 10^{-9}$	0,9275	$5,5 \times 10^{-18}$	$2,68 \times 10^{-6}$	0,36595	$1,56 \times 10^{-9}$	$8,53 \times 10^{-4}$	0,86762	$6,93 \times 10^{-4}$	0,00203
Wartość funkcji Studenta, $\alpha=0,05$															
T	3,18056	11,96562	5,73598	3,41394	13,82418	6,438	1,69355	10,06991	4,91049	0,90999	6,94651	3,48514	-0,16729	3,55016	3,2062
P	0,00177	$8,0 \times 10^{-24}$	$4,9 \times 10^{-8}$	$8,16 \times 10^{-4}$	$6,91 \times 10^{-29}$	$1,42 \times 10^{-9}$	0,09275	$5,5 \times 10^{-18}$	$2,68 \times 10^{-6}$	0,36595	$1,56 \times 10^{-9}$	$8,53 \times 10^{-4}$	0,86762	$6,93 \times 10^{-4}$	0,00203
Istotność różnicy średnich $\alpha=0,01$															
$\alpha=0,05$	Istotna	Istotna	Istotna	Istotna	Istotna	Istotna	Nieistotna	Istotna	Istotna	Nieistotna	Istotna	Istotna	Nieistotna	Istotna	Istotna

X- prawdopodobieństwo, że $Y < Y_0$

Y- Stopień usuwania oleju napędowego w %

 α - poziom istotności

t- parametr t-Studenta

p-prawdopodobieństwo, że $t > t_{\alpha}$, gdy $p < \alpha$, to różnica w wartościach średnich jest istotnie różna

III. Biosorpcja oleju napędowego przez osad czynny

4.12. Wyniki badań nad biosorpcją oleju napędowego przez osad czynny konwencjonalny i doszczepiany

Do badań nad biosorpcją oleju napędowego na kłaczkach osadu czynnego wybrano stężenie osadu 5,0 g s.m./dm³ oraz stężenie oleju napędowego 0,5 cm³ (400mg substancji węglowodorowych / 150 cm³ hodowli). Podyktowane to było wcześniejszymi badaniami nad poprawą efektywności oczyszczania ścieków zaolejonych, w których stężenie osadu 5,0 g s.m./dm³ było stężeniem początkowym wszystkich eksperymentów, natomiast w stężeniach oleju napędowego powyżej 3000 mg/dm³ obserwowano już gwałtowne pogorszenie stanu fizjologicznego osadów czynnych.

Wyniki badań zmian stężeń oleju napędowego, podczas jego kontaktu z biomasa osadów czynnych, oparte na analizie ekstraktów eterowych, przedstawione zostały w tabelach 24 i 25 oraz na rysunkach 65 i 66. Wydajność procesów ekstrakcji wahała się w granicach 72,4-83,5 %. Najszybszy i największy spadek stężenia oleju napędowego w cieczy nadosadowej, zaobserwowano w hodowlach zawierających osad czynny doszczepiony aktywnymi drobnoustrojami (tabela 25, rysunek 66). W tym przypadku nie wykryto obecności substancji ekstrahujących się eterem naftowym już po siedmiu godzinach trwania eksperymentu. Podczas gdy, w tym samym czasie, w hodowlach w których znajdował się osad czynny kontrolny-konwencjonalny zaobserwowano jeszcze około 60 mg tych substancji, a po czasie 120 godzin około 10 mg (tabela 24, rysunek 65). Jednakże już godzinny kontakt osadu czynnego-doszczepionego ze ściekami zawierającymi olej napędowy pozwolił na usunięcie z nich 64,2% substancji ekstrahujących się eterem naftowym. W przypadku osadu czynnego-kontrolnego podobny efekt był widoczny dopiero po upływie 3 godzin (67,2%). Podobne wyniki uzyskano badając ekstrakty pochodzące z biomasy osadów czynnych. W przypadku osadu czynnego-doszczepionego ilość substancji olejowych zaadsorbowana na jego biomacie wzrastała do 5 godziny trwania badań i osiągnęła wartość około 351 mg, a następnie zaczęła maleć. Po 120 godzinach nie zaobserwowano już w biomacie tego osadu substancji ekstrahujących się eterem naftowym. Natomiast w hodowlach z osadem czynnym-kontrolnym obserwowano maksimum substancji olejowych zaadsorbowanych również po 5 godzinach, około 222 mg, natomiast po 120 godzinach w biomacie znajdowało się jeszcze około 38 mg związków węglowodorowych. W trakcie tego doświadczenia obserwowano więc szybszy ubytek oleju napędowego znajdującego się w cieczy hodowlanej, a co za tym idzie większą adsorpcję oleju na kłaczkach i tym samym lepsze usuwanie substancji węglowodorowych dla osadu czynnego-doszczepionego. Po 120 godzinach badań w hodowlach z tym osadem widoczna była 100% redukcja zanieczyszczeń olejowych, podczas gdy w hodowlach z osadem czynnym-kontrolnym redukcja ta sięgnęła 88%.

Obserwacje te potwierdzone zostały badaniami opartymi o analizę chromatograficzną. Ich wyniki przedstawiono w tabelach: 26 dla osadu-kontrolnego i 27 dla osadu-doszczepionego. W tych badaniach również zaobserwowano spadek stężenia oleju napędowego w cieczy nadosadowej w kolejnych godzinach trwania eksperymentu. Po 120 godzinach w płynie pohodowlanym pochodzącym z hodowli z osadem czynnym-doszczepionym znajdowało się jeszcze 2,3 mg substancji węglowodorowych a w płynie pohodowlanym pochodzącym z hodowli z osadem-kontrolnym 37,2 mg. W tym samym czasie na kłaczkach osadu czynnego-doszczepionego znajdowało się 15,2 mg substancji olejowych, podczas gdy w biomacie osadu-kontrolnego 73,2. Osad czynny doszczepiony aktywnymi szczepami usunął z hodowli w tym czasie 95,6% oleju napędowego, a osad-kontrolny 72,4%.

Rysunek 67 przedstawia zmiany wartości BZT₅ płynów pohodowlanych podczas kontaktu biomasy osadów czynnych z olejem napędowym. Natomiast na rysunku 68 zestawiono zmiany

wartości BZT₅ w % z ogólnym efektem oczyszczania wyrażonym jako zawartość oleju napędowego w cieczy nadosadowej w % dla obu osadów. Wyniki tych badań również potwierdzają lepszy adsorpcyjny wpływ osadu czynnego-doszczepionego na ścieki zawierające olej napędowy. Już godzinny kontakt osadu czynnego-doszczepionego z tymi ściekami pozwolił na usunięcie 55,7 % zanieczyszczeń oznaczonych jako BZT₅, a 4-godzinny 90 %. W przypadku osadu czynnego-kontrolnego po upływie 1 godziny usuniętych zostało 31,2% zanieczyszczeń oznaczonych jako BZT₅, natomiast po upływie 4 godzin 64,2%.

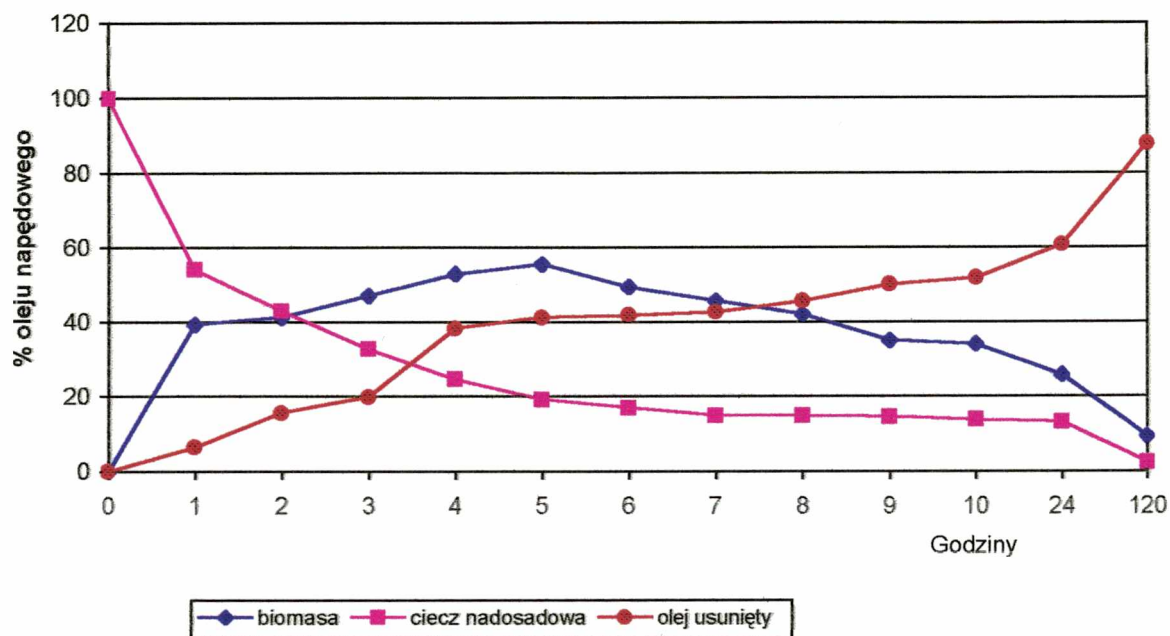
Tabela 24. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego konwencjonalnego na podstawie badań ekstraktu eterowego.

Godziny	Zawartość oleju napędowego w :					
	Biomasie osadu czynnego		Cieczy nadosadowej		Olej napędowy usunięty	
	%	mg	%	mg	%	mg
0	0	0	100	400	0	0
1	39,4	157,6	54,1	216,4	6,5	26
2	41,3	165,2	43	172	15,7	62,8
3	47,2	188,8	32,8	131,2	20	80
4	52,9	211,6	24,7	98,8	22,4	89,6
5	55,6	222,1	19,3	77,2	25,1	100,4
6	49,5	198	17,1	68,4	33,4	133,6
7	45,8	183,2	15,01	60,04	39,2	156,8
8	42,2	168,8	15	60	42,8	171,2
9	35,1	140,4	14,7	58,8	50,2	200,8
10	34,2	136,8	13,9	55,6	51,9	207,6
24	25,9	103,6	13,3	53,2	60,8	243,2
120	9,5	38	2,5	10	88	352

Tabela 25. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego doszczepianego na podstawie badań ekstraktu eterowego.

Godziny	Zawartość oleju napędowego w :					
	Biomasie osadu czynnego		Cieczy nadosadowej		Olej napędowy usunięty	
	%	mg	%	mg	%	mg
0	0,0	0,0	100,0	400,0	0,0	0,0
1	57,2	228,8	35,8	143,2	7,0	28,0
2	64,1	256,4	13,5	54,0	22,4	89,6
3	67,3	269,2	6,03	24,1	34,7	106,7
4	73,7	294,8	3,7	14,7	22,6	90,5
5	87,9	351,6	0,8	3,2	11,3	45,2
6	73,1	292,4	0,6	2,4	26,3	105,2
7	28,1	112,3	0,0	0,0	71,9	287,7
8	24,3	97,2	0,0	0,0	75,7	302,8
9	17,4	69,4	0,0	0,0	82,7	330,6
10	11,3	45,2	0,0	0,0	88,7	354,8
24	9,03	36,1	0,0	0,0	91,0	363,9
120	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	400,0

Rysunek 65. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu konwencjonalnego.



Rysunek 66. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu doszczepianego.

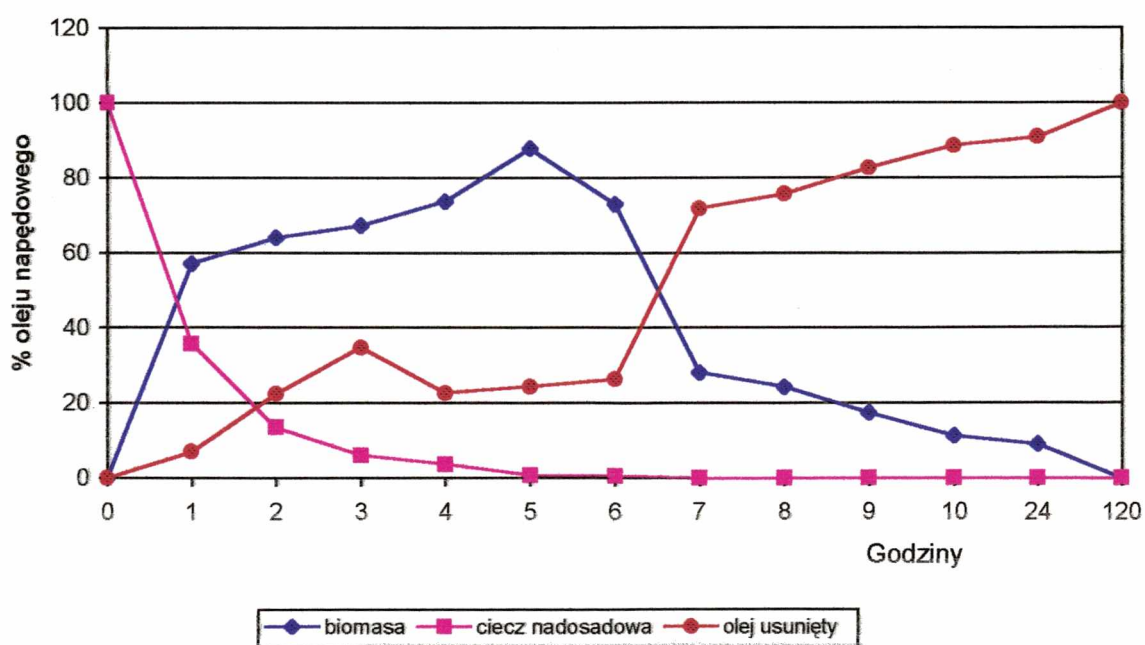


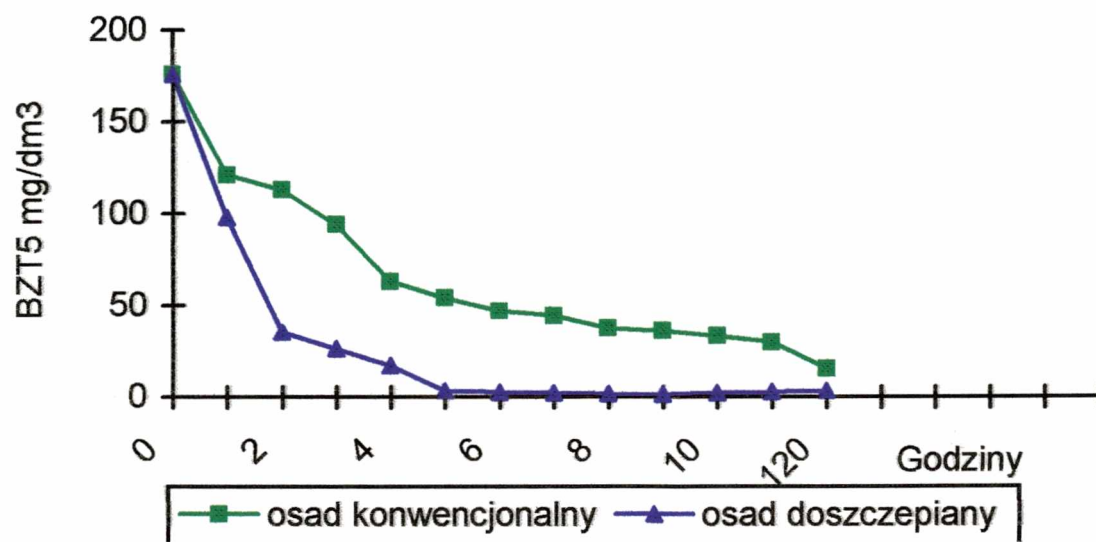
Tabela 26. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego konwencjonalnego na podstawie badań chromatograficznych.

Godziny	Zawartość oleju napędowego w :					
	Biomase osadu czynnego		Cieczy nadosadowej		Olej napędowy usunięty	
	%	mg	%	mg	%	mg
1	9,8	39,2	57,8	231,2	32,4	129,6
2	22,4	89,6	38,7	154,8	38,9	155,6
5	38,6	154,4	15,2	60,8	46,2	184,8
10	38,4	153,6	12,2	48,8	49,4	197,6
24	34,3	137,2	10,5	42,0	55,2	220,8
120	18,3	73,2	9,3	37,2	72,4	289,6

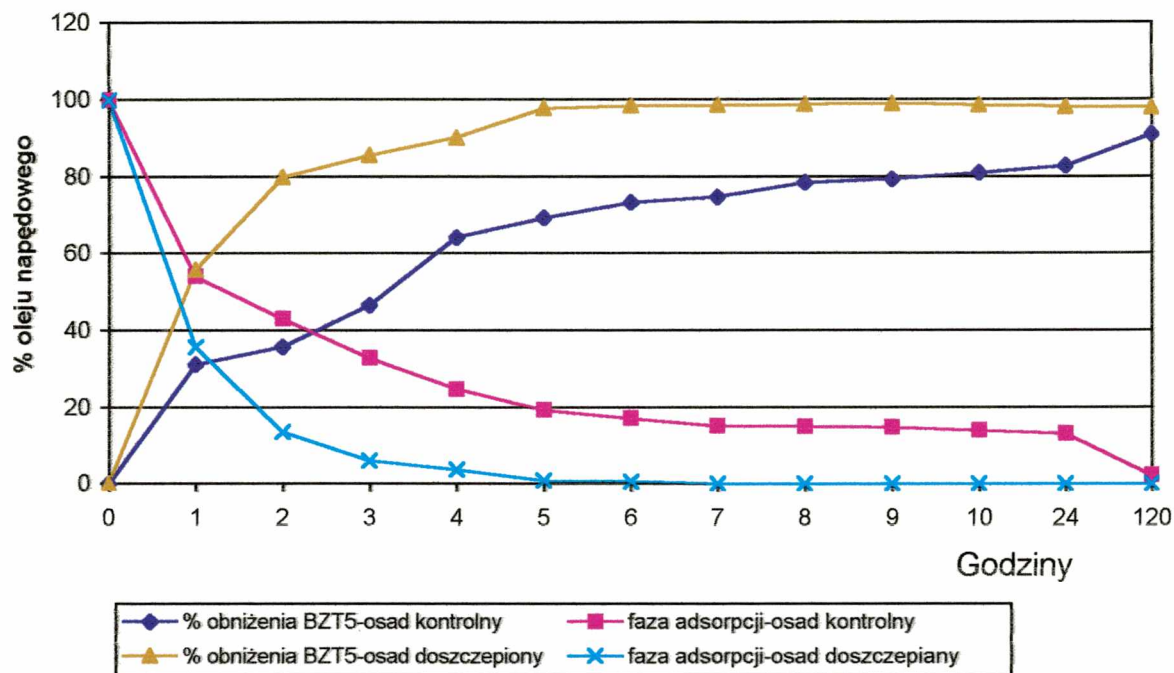
Tabela 27. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego doszczepianego na podstawie badań chromatograficznych.

Godziny	Zawartość oleju napędowego w :					
	Biomase osadu czynnego		Cieczy nadosadowej		Olej napędowy usunięty	
	%	mg	%	mg	%	mg
1	15,6	62,42	13,6	54,59	70,8	283,0
2	12,7	50,9	10,5	42,0	76,8	307,1
5	9,7	38,9	11,3	45,1	79,0	316,0
10	9,65	38,6	4,9	19,5	85,5	341,9
24	6,4	25,6	3,85	15,4	89,8	359,0
120	3,8	15,2	0,6	2,3	95,6	382,5

Rys 67. Zmiany wartości BZT5 płynów pochodzących z olejem napędowym.



Rysunek 68. Krzywe adsorpcji zanieczyszczeń olejowych.



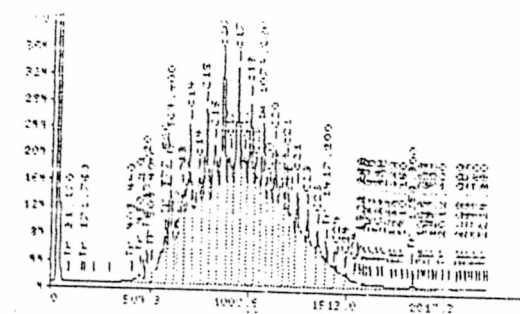
Dokonano także analizy jakościowej ekstraktów z biomasy i cieczy nadosadowej, w trakcie trwania badań nad bipsorpcją oleju napędowego przez osad czynny-kontrolny i osad czynny – doszczepiony, po upływie 1,2,5,10,24 i 120 godzin. Analizę przeprowadzono na podstawie badań chromatograficznych.

W obrazach chromatografii gazowej, we wszystkich badanych próbach, zauważalny był ubytek, w stosunku do wzorcowej próby, węglowodorów C_6 - C_{12} lekkich składników frakcji oleju napędowego. Miało to za pewnie związek z usuwaniem z hodowli lotnych frakcji naftowych na skutek napowietrzania prób. W pierwszych dwóch godzinach badań, w przypadku ekstraktów pochodzących z biomasy osadów czynnych zauważalne było duże spektrum sygnałów w zakresie retencji węglowodorów C_{12} - C_{24} , składników charakterystycznych dla frakcji oleju napędowego. W tym samym czasie na chromatogramach ukazujących obraz ekstraktów cieczy nadosadowej obecne były także te same sygnały lecz o widocznie mniejszej intensywności. W piątej godzinie badań sytuacja była podobna jedynie dla chromatogramów pochodzących z ekstraktów z hodowli dla osadu czynnego-kontrolnego. Chromatogramy obrazujące przebieg procesu w hodowli osadu-doszczepionego ujawniły znaczny spadek sygnałów charakterystycznych dla oleju napędowego zarówno w przypadku biomasy jak i cieczy nadosadowej. W przypadku tej hodowli tendencja ta utrzymywała się już do końca badań. Wraz z tą tendencją w 5 i 10 godzinie badań, w przypadku ekstraktu z biomasy, zauważono pojawienie się pojedynczego intensywnego sygnału w zakresie retencji C_{25} - C_{26} , nie obserwowanego w próbce wzorcowej oleju. W 24 godzinie badań na chromatogramie ekstraktu z biomasy widoczny był większy spadek intensywności sygnałów w zakresie wysokoprężnych węglowodorów C_{12} - C_{15} , ponadto w tej samej godzinie doświadczenia na chromatogramie ekstraktu z cieczy nadosadowej zauważono pojedyncze, względnie większe sygnały w zakresie retencji węglowodorów C_{16} i C_{26} , powodujące bardzo znaczne zróżnicowanie obrazu chromatograficznego w porównaniu do obrazu oleju napędowego oraz spadek intensywności sygnałów względem siebie, nie wynikający z ogólnego zmniejszenia się stężenia węglowodorów w ekstrakcie. Widoczny spadek stężenia oleju napędowego w hodowlach z osadem czynnym-kontrolnym odnotowano dopiero w 10 godzinie badań. Spadek ten utrzymywał się jeszcze w 24 godzinie badań. W tym czasie zauważono także, podobny do hodowli osadu-doszczepianego

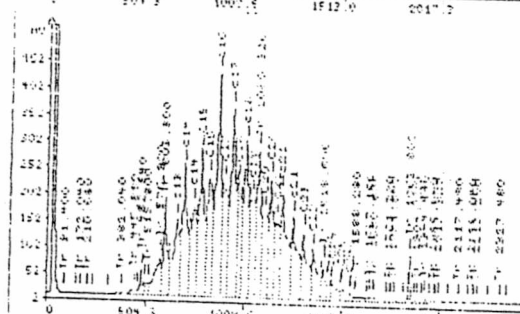
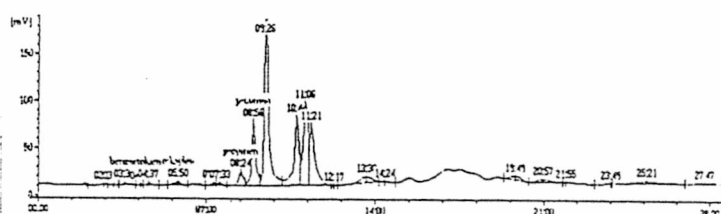
lecz mniej wyraźny sygnał w zakresie retencji C_{25} - C_{26} . W 120 godzinie badań w hodowlach osadu czynnego doszczepianego, zarówno w ekstraktach z biomasy jak i z cieczy nadosadowej, widoczne były bardzo małe, śladowe sygnały w szerokim zakresie retencji węglowodorów C_{12} - C_{24} . Natomiast w hodowli osadu-kontrolnego widoczne jeszcze były wyraźne sygnały w zakresie retencji węglowodorów C_{12} - C_{24} i pojedyncze, większe sygnały w zakresie retencji węglowodorów C_{16} i C_{26} .

W obrazach chromatografii cieczowej, we wszystkich badanych próbach, zauważalne było zmniejszenie, w stosunku do wzorcowej próby, intensywności sygnałów w zakresie retencji lekkich węglowodorów aromatycznych (BTX) związane z napowietrzaniem badanych hodowli. W przypadku chromatografii cieczowej, podobnie jak w badaniach chromatografii gazowej, w pierwszych pięciu godzinach trwania eksperymentu przebieg sygnałów był bardzo zbliżony, lecz mniej intensywny, do sygnałów oleju napędowego, zarówno w ekstrakcie z cieczy nadosadowej jak i w ekstrakcie z biomasy. W 10 i 24 godzinie badań, w przypadku ekstraktów z biomasy osadu czynnego-doszczepianego zauważono najpierw wyraźne zmiany w intensywnościach sygnałów pochodzących od pochodnych alkiloaromatycznych benzenu i naftalenu a potem śladowe sygnały w zakresie wysokomolekularnych połączeń aromatycznych wraz ze zmniejszaniem się sygnałów od węglowodorów aromatycznych posiadających powyżej 9 atomów węgla w cząsteczce. W 120 godzinie badań zarówno w ekstraktach z biomasy jak i cieczy nadosadowej osadu-doszczepionego widoczny był wyraźny spadek intensywności sygnałów wynikający z dużego zmniejszenia się ilości węglowodorów w ekstraktach. W przypadku osadu kontrolnego dopiero po 120 godzinach badań zauważono zmiany jakościowe w chromatogramach ekstraktów z biomasy, objawiające się, podobnie jak w przypadku osadu-doszczepianego, w zmianach w intensywnościach sygnałów pochodzących od pochodnych alkiloaromatycznych benzenu i naftalenu.

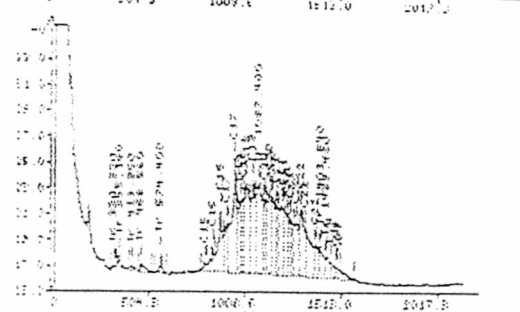
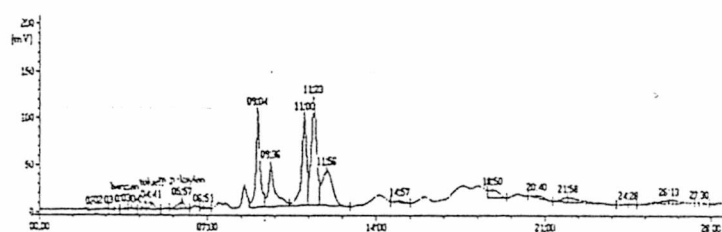
Rys. 69. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z biomasy osadu czynnego konwencjonalnego po 2, 5, 10, 24 i 120 godzinach badań.



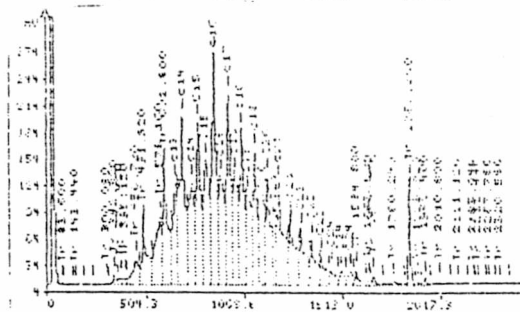
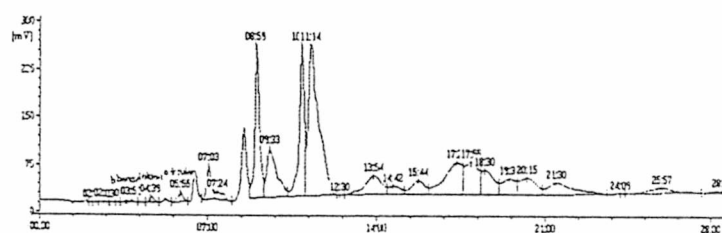
2 godziny



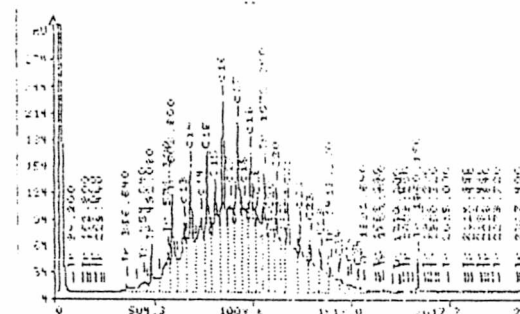
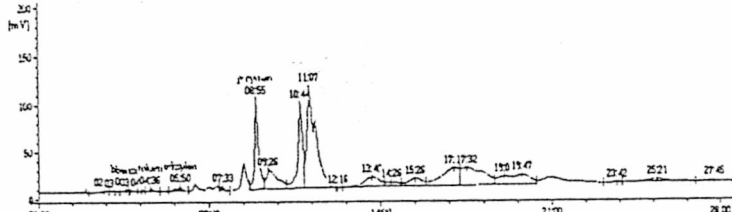
5 godzin



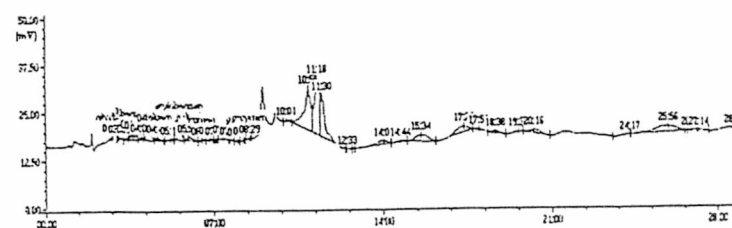
10 godzin



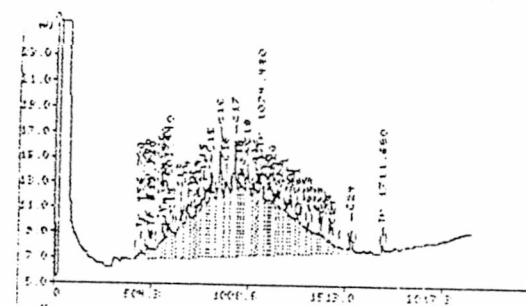
24 godziny



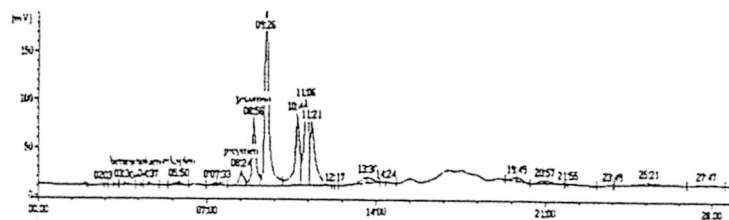
120 godzin



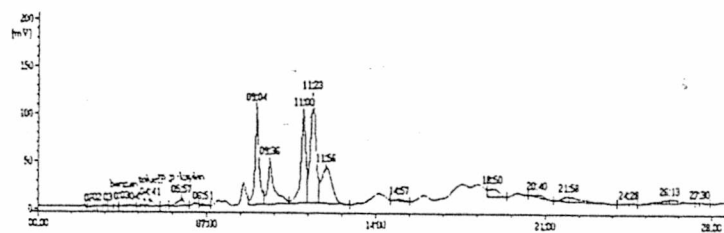
Rys. 70. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z cieczy nadosadowej osadu czynnego konwencjonalnego po 2, 5, 10, 24 i 120 godzinach badań.



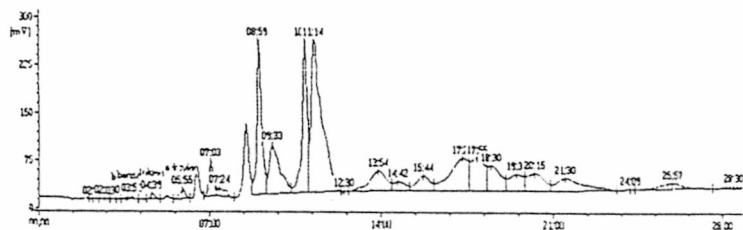
2 godziny



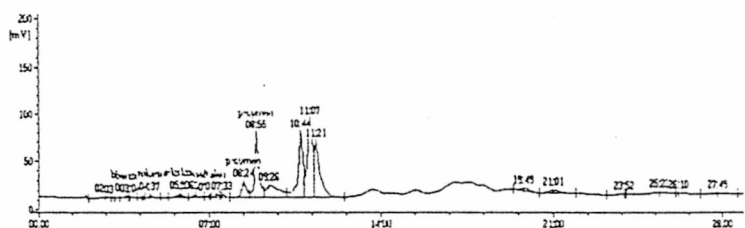
5 godzin



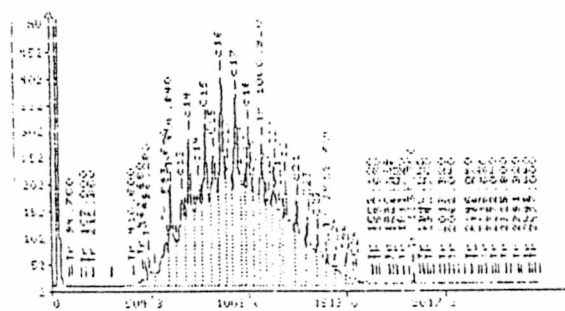
10 godzin



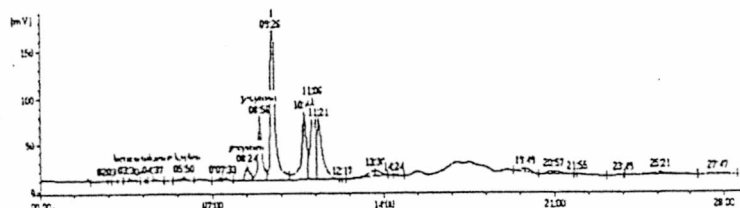
24 godziny



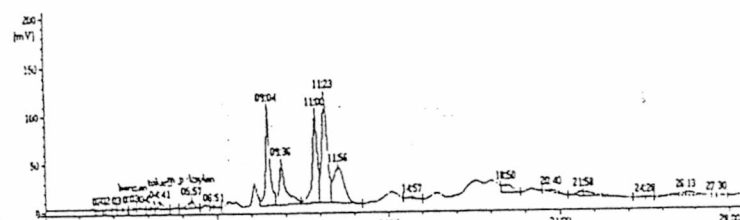
Rys. 71. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z biomasy osadu czynnego doszczepianego po 2, 5, 10, 24 i 120 godzinach badań.



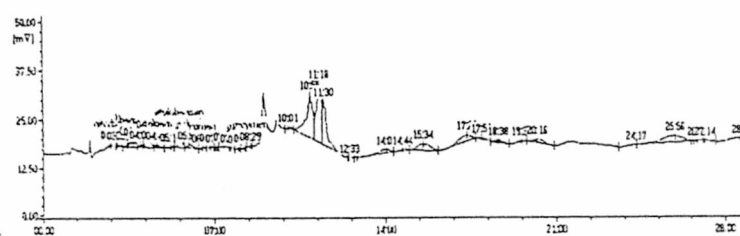
2 godziny



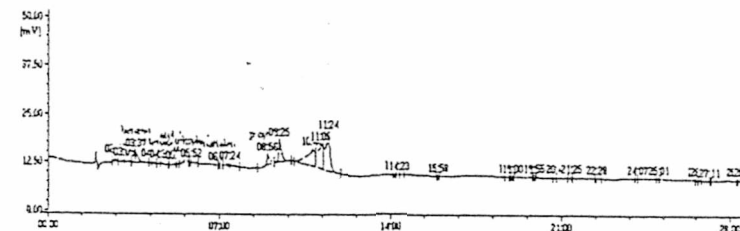
5 godzin



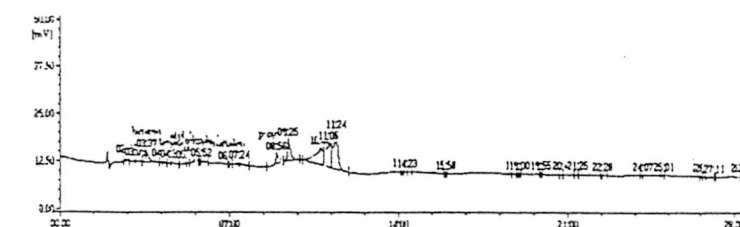
10 godzin



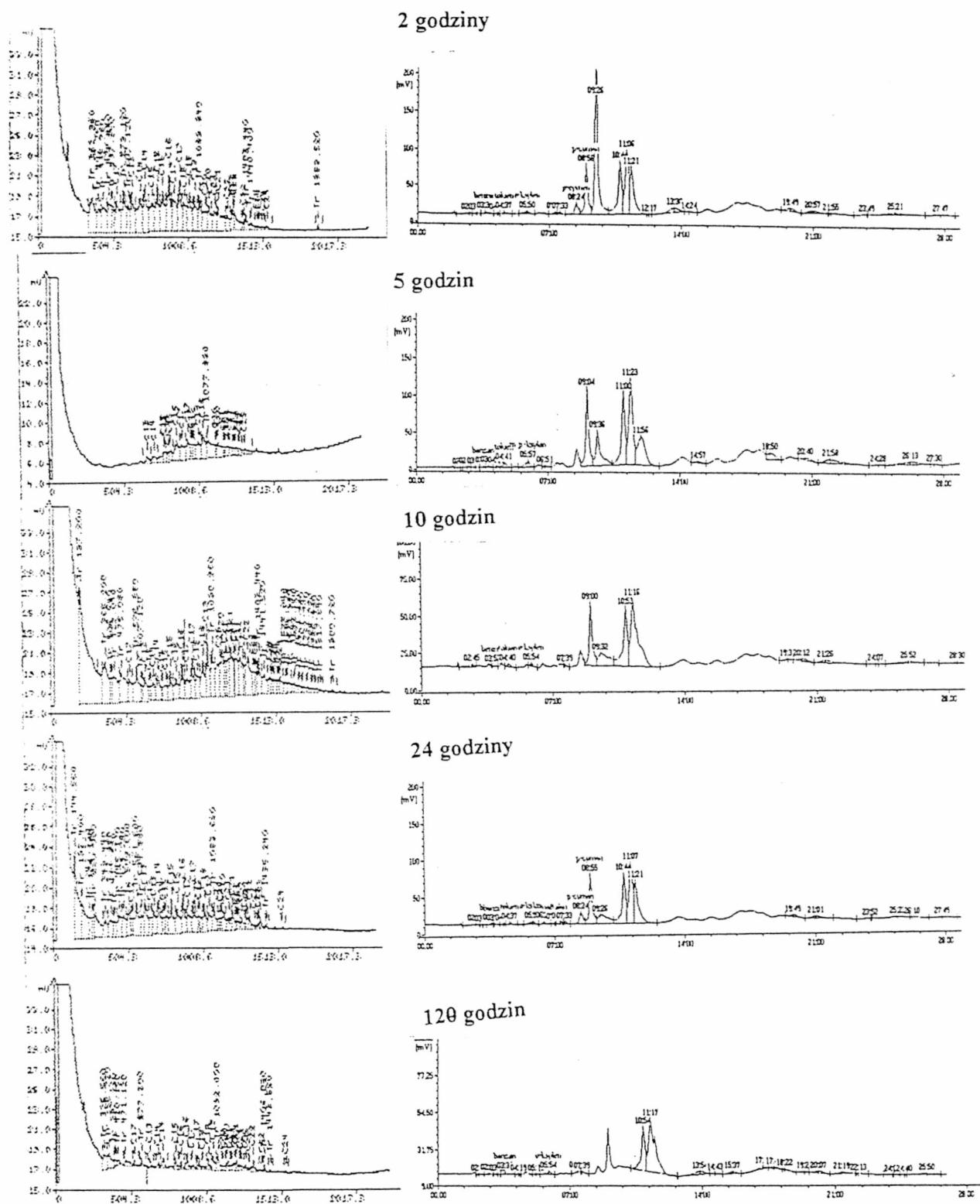
24 godziny



120 godzin



Rys. 72. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z cieczy nadosadowej osadu czynnego doszczepianego po 2, 5, 10, 24 i 120 godzinach badań.



IV. Ocena biotoksykologiczna oleju napędowego oraz ścieków syntetycznych i oczyszczonych

4.13. Wyniki testów toksykologicznych

4.13.1. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego, ścieków surowych i oczyszczonych na *Lemna minor* (rzęsa drobna)

Wyniki badań dotyczących oceny toksycznego wpływu oleju napędowego na *Lemna minor* przedstawiono w tabelach 28, 29 i 30. Przeprowadzone testy wykazały, że olej napędowy jest przyczyną zmian morfologicznych oraz fizjologicznych u *Lemna minor*. Objawiały się one chlorozą liści, ograniczeniem przyrostu biomasy rośliny i liczby członów w pędzie oraz ograniczeniem zdolności do fotosyntezy poprzez obniżenie zawartości chlorofilu. W wyższych stężeniach oleju napędowego (tab.28), obserwowano duży spadek liczby członów w pędach roślin w porównaniu do hodowli kontrolnej. Wynosił on przykładowo dla stężenia 288mg oleju/dm³ aż 87%. W tym samym stężeniu obserwowano obniżenie biomasy rzędu 77%, natomiast spadek zawartości ogólnej chlorofilu wynosił 98%. Zjawisko to w wyższych stężeniach substancji olejowych objawiało się zaawansowaną chlorozą widoczną w postaci wybielonych roślin. Natomiast liczba członów w pędzie roślin, w drugim teście (tab. 29), zmniejszyła się o 41 % w stosunku do kontroli przy stężeniu składników oleju napędowego 18,6 mg/dm³. Podobne zmniejszenie wartości, rzędu 46 %, obserwowano w biomase rzęsy. Równie wrażliwy na obecność tego typu związków był chlorofil *a* (tab.30). W tym samym stężeniu zaobserwowano 66 % spadek jego wartości w stosunku do kontroli. W testach obserwowano także wzrost liczby członów rzęsy w pędzie, biomasy rośliny i zawartości chlorofilu w stosunku do kontroli przy stężeniu substancji olejowych 9 mg/dm³. Stężenie to było więc stężeniem podprogowym dla *Lemna minor*.

Tabela 28. Wpływ oleju napędowego na rozwój *Lemna minor* (1)

Badany parametr	Stężenie oleju napędowego w pożywce [mg/dm ³]							
	0	9	18	36	72	144	288	576
Liczba wszystkich członów roślin	238	309	142	54	30	15	10	10
Zmiany morfologiczne	Brak	Brak	Chloroza w 11 członach	Chloroza w 34 członach	Rośliny wybielone we wszystkich członach			
Zawartość biomasy [mg]	104,0	214,0	107,0	54,0	24-28			
Zawartość chlorofilu przy $\lambda=640\text{nm}$ [μg]	55,8	90,0	21,0	9,5	1,0-1,2			

Tabela 29. Wpływ oleju napędowego na rozwój *Lemna minor* (2)

Stężenie oleju napędowego [mg/dm ³]	Cechy wskaźnikowe testu				
	Liczba członów	Procent liczby członów w stosunku do kontroli [%]	Biomasa [mg]	Procent biomasy w stosunku do kontroli [%]	Zmiany Morfologiczne roślin
Kontrola	245	100	196	100	b.z
9	253	103,3	220,6	112,6	Człony zielone Bardzo drobne Słaba chloroza
10,8	140	57,14	114,4	58,36	
12,96	128	52,24	101,0	51,53	
15,6	127	51,83	101,6	51,83	
18,6	101	41,22	90,8	46,32	

Tabela 30. Zmiany zawartości chlorofilu a i b u *Lemna minor* w obecności różnych stężeń oleju napędowego.

Stężenie oleju napędowego [mg/dm ³]	Zawartość chlorofilu [ug/dm ³]		% ubytku w stosunku do kontroli	
	a $\lambda = 665$	a $\lambda = 645$	a $\lambda = 665$	b $\lambda = 645$
Kontrola	2,21	6,81	100 %	100 %
9	2,69	1,04	118	84,88
10,8	1,10	0,77	50,23	88,70
12,96	0,97	0,47	56,11	93,10
15,6	0,87	0,27	60,64	96,04
18,6	0,75	0,06	66,07	99,92

Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie na ściekach syntetycznych oraz ściekach oczyszczonych odpływających z poszczególnych komór przedstawiono w tabelach: 31 (1 seria), 32 (2 seria), 33 (3 seria) i 34 (4 seria).

W przypadku hodowli na ściekach syntetycznych zaobserwowano bardzo wyraźne zmiany morfologiczne roślin, zmiany w liczbie ich członów w pędach, zawartości biomasy oraz chlorofilu a, b i c w zależności od stężenia oleju napędowego. Już w stężeniach oleju napędowego od 50 do 400 mg/dm³ zauważono człony wyraźnie mniejsze ze zmianami chlorotycznymi w porównaniu do roślin kontrolnych. Powyżej tych stężeń człony roślin były całkowicie wybielone a ich liczba była na poziomie i poniżej liczby członów zaszczepu. Zawartość biomasy spadała natomiast prawie dziesięciokrotnie w stężeniu oleju 3100 mg/dm³. To samo dotyczyło zawartości wszystkich form chlorofilu. Już w stężeniu 200 mg/dm³ ubytek tego barwnika kształtował się na poziomie 72,0-91,6 %, a w stężeniach powyżej 400 mg/dm³ 99,8-99,9 %.

Badania testu toksykologicznego na rzęsie wskazują na związek pomiędzy stopniem biodegradacji oleju napędowego a efektem toksycznym substancji zawartych w ściekach oczyszczonych na *Lemna minor*. Wraz ze zwiększaniem się stężenia oleju napędowego i pogarszaniem warunków oczyszczania w badanych komorach widoczne były bowiem zmiany w wymiarach członów, pojawiająca się chloroza oraz spadek liczby i biomasy roślin. Również widoczne były zmiany w zawartości chlorofilu. Najbardziej wrażliwymi na obecność substancji toksycznych okazały się formy barwnika b i c. Najwcześniej efekty toksyczne obserwowano w hodowlach założonych na odpływach z komór I i II, a najpóźniej na odpływach z komory III.

Tabela 31. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (1 seria).

Dzień badań	Numer komory	Liczba członów	Biomasa [mg]	Zawartość chlorofilu w próbce [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]			Ubytek chlorofilu w próbce w stosunku do kontroli [%]		
				A	B	C	A	B	C
5	1	153	80,1	8,5	5,1	4,3	47,5	46,3	41,9
	2	192	155,6	9,6	6,2	5,5	40,7	34,7	28,4
	3	184	129,0	11,9	5,8	5,6	26,5	38,9	24,3
11	1	142	74,3	8,1	3,5	2,7	50,5	63,2	63,5
	2	182	115,3	11,2	5,5	4,3	30,9	42,1	41,9
	3	180	109,4	11,7	5,7	4,1	27,8	40,0	44,6
16	1	135	69,5	7,6	3,1	2,3	53,1	67,4	68,9
	2	189	142,6	12,7	6,8	4,5	26,6	28,4	39,2
	3	178	123,9	11,5	5,5	4,6	29,0	42,1	37,8
22	1	115	60,4	6,3	2,8	2,2	61,1	70,5	70,3
	2	172	119,1	11,5	5,4	4,2	29,0	43,2	43,2
	3	170	120,0	11,4	5,6	4,6	29,6	41,1	37,8
28	1	101	52,3	5,2	2,5	1,9	67,9	73,7	74,3
	2	168	93,1	9,8	3,7	3,2	39,5	61,0	56,8
	3	171	115,8	11,2	5,1	3,9	30,9	46,3	47,3
35	1	93	45,2	5,4	2,0	1,7	66,6	82,1	77,0
	2	155	78,3	8,5	4,4	2,1	47,5	77,9	71,6
	3	175	115,3	11,6	5,4	4,1	28,4	43,2	44,6
40	1	85	35,4	1,5	0,9	0,8	90,7	90,5	89,2
	2	142	79,6	8,7	4,5	2,8	46,3	52,6	62,2
	3	180	102,1	10,4	5,1	4,6	35,8	46,3	37,8
42	1	125	60,6	6,7	3,1	2,9	58,6	67,4	60,8
	2	162	90,3	9,7	3,4	2,8	40,1	64,2	62,2
	3	173	105,4	11,6	5,7	4,3	28,4	40,0	41,9
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm^3	0	195	156	16,2	9,5	7,4	0,0	0,0	0,0
	200	54	36,2	2,1	0,8	0,6	87,0	91,6	72,0
	400	40	21,1	0,2	0,09	0,06	98,8	99,1	99,2

Tabela 32. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (2 seria).

Dzień badań	Numer komory	Liczba członów	Biomasa [mg]	Zawartość chlorofilu w próbce [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]			Ubytek chlorofilu w próbce w stosunku do kontroli [%]		
				A	B	C	A	B	C
2	1	164	97,2	12,4	6,9	4,8	23,5	27,4	35,1
	2	184	148,1	13,9	8,1	5,3	14,2	14,7	28,4
	3	180	140,0	13,6	8,0	5,1	16,0	50,6	31,1
4	1	151	86,1	9,6	4,8	3,7	40,7	49,5	50,0
	2	181	114,3	11,4	5,8	4,6	29,6	38,9	37,8
	3	176	115,7	11,2	5,4	4,1	30,9	43,2	44,6
8	1	148	78,6	8,9	4,6	2,5	45,1	51,5	66,2
	2	187	144,3	14,4	8,3	5,5	12,7	12,6	25,7
	3	171	111,3	10,4	5,1	3,9	35,8	46,3	47,3
11	1	147	90,3	8,5	4,0	2,9	47,5	57,9	60,8
	2	183	144,3	13,6	7,8	5,0	16,0	17,9	32,4
	3	169	101,4	12,8	7,1	5,3	21,0	25,3	28,4
15	1	149	81,6	8,9	4,5	3,6	45,1	52,6	51,4
	2	179	117,2	11,6	5,8	4,5	28,4	38,9	39,2
	3	172	112,0	10,8	5,4	4,2	33,3	43,2	43,2
18	1	144	75,3	8,2	3,5	2,8	49,4	63,2	62,2
	2	180	143,4	13,2	7,8	4,7	81,5	17,9	36,5
	3	174	113,7	10,6	5,8	4,2	34,6	38,9	43,2
22	1	135	74,1	8,6	4,1	3,2	46,9	56,8	56,8
	2	171	121,3	11,8	5,7	4,7	27,2	40,0	36,5
	3	168	92,3	9,7	3,5	3,0	40,1	63,2	59,5
25	1	140	79,2	8,4	4,6	2,4	48,1	51,6	67,6
	2	165	93,2	11,1	5,4	3,3	31,5	43,2	55,4
	3	167	91,3	11,5	5,8	3,1	29,0	38,9	58,1
29	1	138	77,2	8,9	4,6	3,4	45,1	51,6	54,1
	2	160	89,2	9,6	3,3	3,9	40,7	65,3	47,3
	3	170	109,3	10,2	4,9	3,5	37,0	48,4	52,7
32	1	141	72,1	8,0	3,1	2,4	50,6	67,4	67,6
	2	159	91,3	9,4	4,7	3,2	42,0	50,5	56,8
	3	165	97,1	9,9	5,1	3,7	38,8	46,3	50,0
36	1	142	81,4	8,8	4,9	2,8	45,7	48,4	62,2
	2	161	90,2	10,8	5,1	3,0	33,3	46,3	59,5
	3	167	92,1	11,8	5,5	3,6	27,2	42,1	51,3
40	1	144	77,2	8,5	3,6	2,7	47,5	62,1	63,5
	2	160	88,3	9,4	3,1	3,6	42,0	67,4	51,4
	3	168	93,2	11,7	5,6	3,8	27,8	41,1	48,6
43	1	121	61,7	6,5	3,3	2,1	59,9	65,3	71,6
	2	149	78,9	9,1	4,7	2,7	43,8	50,5	63,5
	3	160	89,3	9,4	4,8	3,7	42,0	49,5	50,0
46	1	127	62,3	6,9	3,8	2,9	57,4	60,0	60,8
	2	145	78,4	8,7	4,4	2,3	46,3	53,7	68,9
	3	159	89,0	9,3	4,7	3,4	42,6	50,5	54,1
50	1	120	61,4	6,3	3,0	1,9	61,1	68,4	74,3
	2	132	76,0	8,1	4,0	2,4	50,0	57,9	67,6
	3	155	84,6	9,2	4,5	3,3	43,2	52,6	55,4
53	1	128	63,1	7,1	4,2	3,4	56,2	55,8	54,0
	2	121	61,7	6,8	3,3	2,4	58,0	65,3	67,6
	3	157	84,9	9,7	4,8	3,6	40,1	49,5	51,4
57	1	125	61,1	6,0	2,9	1,7	63,0	69,5	77,0
	2	119	54,1	5,3	2,1	1,1	67,3	77,9	85,1
	3	154	84,7	9,0	4,3	3,2	44,4	54,7	56,8
62	1	131	76,1	8,0	4,1	2,9	50,6	56,8	60,8
	2	124	60,2	6,3	2,9	2,7	61,1	69,5	63,5
	3	156	84,9	9,8	4,8	3,9	39,5	49,5	47,3
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm^3	0	195	156,0	16,2	9,5	7,4	0,0	0,0	0,0
	600	44	20,7	0,21	0,1	0,08	95,6	98,9	98,9
	800	42	14,4	0,07	0,04	0,03	98,7	99,6	99,6
	1000	39	16,2	0,03	0,02	0,009	99,8	99,8	99,9

Tabela 33. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (3 seria).

Dzień badań	Numer komory	Liczba członów	Biomasa [mg]	Zawartość chlorofilu w próbce [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]			Ubytek chlorofilu w próbce w stosunku do kontroli [%]		
				A	B	C	A	B	C
2	1	155	85,1	9,3	4,6	3,7	42,6	51,6	50,0
	2	169	94,2	10,1	4,1	3,9	37,7	56,8	47,3
	3	161	90,3	9,6	3,8	3,5	40,7	60,0	52,7
4	1	141	79,4	8,7	4,9	2,8	46,3	48,4	62,2
	2	165	97,3	9,8	4,0	3,6	39,5	57,8	51,4
	3	164	94,2	9,3	3,8	3,6	42,6	60,0	51,4
8	1	136	72,3	8,2	3,4	2,3	49,4	64,2	68,9
	2	160	89,3	9,5	3,4	3,6	41,4	64,2	51,4
	3	162	91,4	10,0	4,0	3,6	38,3	57,8	51,4
11	1	145	76,1	9,1	3,7	2,9	43,8	61,1	60,8
	2	164	95,1	9,7	3,6	3,3	40,1	62,1	55,4
	3	160	90,8	9,9	3,8	3,5	38,9	60,0	52,7
15	1	150	81,7	8,3	3,1	2,9	48,8	67,4	60,8
	2	163	91,2	9,5	3,4	3,0	41,4	64,2	59,5
	3	168	95,0	10,2	4,3	3,8	37,0	54,7	48,6
18	1	152	82,1	8,9	4,2	3,5	45,1	55,8	52,7
	2	167	92,3	11,9	5,7	3,8	26,5	40,0	48,6
	3	172	109,3	10,3	5,9	4,1	24,1	37,9	44,6
22	1	150	82,1	8,5	3,4	3,0	47,5	64,2	59,5
	2	158	90,4	9,3	4,6	3,1	42,6	51,6	58,1
	3	160	91,4	10,1	3,9	3,7	37,7	58,9	50,0
25	1	145	77,2	9,3	3,8	3,0	42,6	60,0	59,5
	2	132	74,1	8,0	3,9	2,3	50,6	58,9	68,9
	3	158	89,8	9,1	4,4	3,1	43,8	53,7	58,1
29	1	149	78,2	9,7	3,9	3,3	40,1	58,9	55,4
	2	114	68,4	5,6	2,7	1,8	65,4	69,5	75,7
	3	159	90,2	9,2	4,6	3,2	43,2	51,6	56,8
32	1	138	76,2	8,3	4,1	2,4	48,8	56,8	67,6
	2	91	44,7	5,2	2,0	1,6	67,9	78,9	78,4
	3	147	79,3	9,8	3,8	3,9	39,5	60,0	47,3
36	1	145	76,8	9,2	3,5	3,1	43,2	63,2	58,1
	2	89	42,3	2,7	1,8	1,1	83,3	81,1	85,1
	3	155	88,7	8,9	4,1	3,9	45,1	56,8	47,3
40	1	147	77,2	9,1	3,3	3,7	43,8	65,3	50,0
	2	94	48,5	5,6	2,7	1,8	65,4	71,6	75,7
	3	159	91,4	9,8	4,7	3,6	39,5	50,5	51,4
43	1	121	69,8	5,8	2,9	1,9	64,2	69,5	74,3
	2	58	35,7	1,8	0,9	0,6	88,8	90,5	91,9
	3	143	83,1	8,8	3,1	2,7	45,7	67,4	63,5
46	1	105	62,4	6,1	2,9	1,9	62,3	69,5	74,3
	2	52	33,2	1,6	0,7	0,4	90,1	92,6	94,6
	3	139	76,8	8,7	4,6	2,8	46,3	51,6	62,2
50	1	111	67,1	5,4	2,5	1,6	66,7	73,7	78,4
	2	48	24,9	0,9	0,4	0,2	94,4	95,8	97,3
	3	135	74,2	8,5	4,4	2,6	47,5	53,7	64,9
53	1	109	64,1	6,3	2,8	1,7	61,1	79,5	77,0
	2	45	23,2	0,8	0,5	0,2	95,1	94,7	97,3
	3	142	79,3	8,6	4,8	2,6	46,9	49,5	65,3
57	1	110	66,3	5,2	2,1	1,2	87,0	77,9	83,8
	2	50	35,1	1,4	0,6	0,3	96,3	93,7	95,9
	3	140	75,2	8,5	4,6	2,4	47,5	51,6	67,6
62	1	113	68,2	5,6	2,7	1,8	65,4	71,6	75,7
	2	47	28,4	1,9	0,9	0,6	88,3	90,5	91,9
	3	141	76,7	8,6	4,8	2,6	46,9	49,5	64,9
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego [mg]	0	195	156	16,2	9,5	7,4	0,0	0,0	0,0
	1500	35	15,1	0,01	0,005	0,003	99,9	99,9	99,9
	2200	31	14,0	0,01	0,005	0,003	99,9	99,9	99,9
	3100	29	13,2	0,01	0,005	0,003	99,9	99,9	99,9

Tabela 34. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (4 seria).

Dzień badań	Numer komory	Liczba członów	Biomasa [mg]	Zawartość chlorofilu w próbce [µg/l]			Ubytek chlorofilu w próbce w stosunku do kontroli [%]		
				A	B	C	A	B	C
1	1	188	142,5	11,2	6,4	3,7	30,9	32,6	50,0
	2	192	153,8	15,3	7,3	4,9	5,6	23,2	33,8
	3	187	134,3	12,6	6,9	4,1	22,2	56,8	44,6
9	1	153	84,6	9,4	4,4	3,1	42,0	53,7	58,1
	2	165	97,3	10,1	4,9	3,7	37,7	48,4	50,0
	3	178	123,7	11,7	5,7	4,1	27,8	40,0	44,6
14	1	143	82,1	9,1	4,3	2,9	43,8	54,7	60,8
	2	141	79,3	8,6	4,8	2,6	46,9	49,5	65,3
	3	165	94,4	9,9	3,9	3,1	38,9	59,0	58,7
19	1	146	80,9	8,7	4,2	3,1	46,3	55,8	58,7
	2	132	76,1	8,2	4,1	2,6	49,4	56,8	65,3
	3	164	95,3	11,3	5,7	3,5	30,2	40,0	53,3
23	1	135	72,3	8,1	3,8	2,8	50,0	60,0	62,7
	2	121	61,5	6,4	3,1	2,0	60,5	67,4	73,3
	3	154	87,1	8,9	4,3	2,9	45,1	54,7	61,3
28	1	136	71,5	7,6	3,1	2,4	53,1	67,4	68,0
	2	109	62,2	6,0	2,8	1,8	63,0	70,5	76,0
	3	148	78,4	8,6	4,7	2,1	46,9	50,5	72,0
37	1	104	52,8	5,3	2,7	1,8	67,3	71,6	76,0
	2	92	49,3	3,7	1,6	1,4	77,2	83,2	81,3
	3	121	60,2	6,3	2,9	2,4	61,1	69,5	68,0
47	1	112	67,4	5,4	2,9	1,9	66,7	69,5	74,7
	2	82	41,3	2,3	1,1	0,8	85,8	88,4	89,3
	3	104	54,1	5,7	2,6	1,7	64,8	72,6	77,3
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	195	156	16,2	9,5	7,4	0,0	0,0	0,0
	50	97	55,4	3,1	1,7	0,9	80,9	82,1	88,0
	200	54	36,2	2,1	0,8	0,6	87,0	91,6	72,0
	400	40	21,1	0,2	0,09	0,06	98,8	99,1	99,2
	1200	40	19,4	0,05	0,01	0,009	99,7	99,9	99,9
	1600	40	16,2	0,01	0,005	0,003	99,9	99,9	99,9
	3200	40	18,7	0,01	0,005	0,003	99,9	99,9	99,9

4.13.2. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego, ścieków syntetycznych i oczyszczonych na glony *Chlorella* sp.

W tabeli 35 zamieszczono wyniki badań dotyczące toksycznego wpływu oleju napędowego na glony *Chlorella*. Z wyników tych widać, że w żadnym z badanych stężeń oleju nie uzyskano spadku zawartości chlorofilu poniżej 50%. Największy spadek tej wartości uzyskano w stężeniu związków olejowych 648 mg/dm^3 i wynosił on 48%. Natomiast zawartość chlorofilu w komórkach glonów *Chlorella* spadała wraz ze wzrostem stężenia węglowodorów w pożywce.

Tabela 35. Wpływ oleju napędowego na glony *Chlorella*

Zawartość chlorofilu [%]	Stężenie oleju napędowego w pożywce [mg/dm^3]							
	0	144	288	360	432	504	576	648
	100	84	75	73	72	53	58	52

Wyniki badań testu fizjologicznego z udziałem glonów *Chlorella* wykonanego na ściekach syntetycznych i oczyszczonych, pochodzących z poszczególnych serii badań, przedstawiono w tabelach 36, 37, 38 i 39.

Badania ubytku chlorofilu w organizmach testowych pod wpływem ścieków syntetycznych wykazały wszędzie, powyżej stężenia 200 mg oleju napędowego/ dm^3 , ponad 50% ubytek wszystkich form tego barwnika. W stężeniu 200 mg/dm^3 spadek stężenia tego typu obserwowano jedynie dla chlorofilu b. W zależności od stężenia oleju napędowego w ściekach wahał się on dla chlorofilu a od 34,3% do 91,7 %, dla chlorofilu b od 35,7% do 88,4% i dla chlorofilu c od 30,2% do 94,3 %.

W hodowlach glonów założonych na odpływach z poszczególnych komór widoczny był również tak jak i w przypadku testu na rzęsie wyraźny związek pomiędzy efektem toksycznym a sprawnością oczyszczania. W hodowlach glonów założonych na odpływach uzyskanych ze wszystkich komór w pierwszej serii badań, nie obserwowano nigdzie ponad 50% ubytku chlorofilu. Taką zmianę w stężeniu tego barwnika zaczęto obserwować dopiero od drugiej serii badań, najpierw dla odpływów z komory II a potem dla odpływów z komory I. Odpływy z komory III nie wykazały efektów toksycznych w żadnym z przeprowadzanych testów.

Tabela 36 . Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie Chlorella przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (1 seria).

Dzień badań	Numer komory	Zawartość chlorofilu w próbie %			Ubytek chlorofilu w próbie %		
		A	B	C	A	B	C
5	1	72,4	62,4	68,4	27,6	37,6	31,6
	2	91,2	81,2	87,2	8,8	18,8	12,8
	3	89,1	75,4	81,2	10,9	24,6	18,8
11	1	71,4	60,4	65,2	28,6	39,6	34,8
	2	92,3	84,2	88,0	7,7	15,8	12,0
	3	90,0	77,4	83,2	10,0	22,6	16,8
16	1	78,2	66,4	69,5	21,8	33,6	30,5
	2	90,4	80,4	87,1	9,6	16,0	12,9
	3	91,2	79,2	85,2	8,8	20,8	14,8
22	1	68,5	56,3	57,2	31,5	43,7	42,8
	2	87,0	67,3	84,1	13,0	32,7	15,9
	3	90,1	75,3	83,1	9,9	24,7	16,9
28	1	65,0	54,0	54,1	35,0	46,0	45,9
	2	86,4	65,3	83,1	13,6	34,7	16,9
	3	89,1	73,0	80,2	10,9	27,0	19,8
35	1	64,5	53,1	50,9	35,5	46,9	49,1
	2	87,9	67,8	86,0	12,1	32,2	14,0
	3	90,7	76,0	85,1	9,3	24,0	14,9
40	1	67,2	57,1	55,3	32,8	42,9	44,7
	2	90,6	73,6	89,2	9,4	26,4	10,8
	3	91,4	78,9	86,1	8,6	21,1	13,9
42	1	69,6	61,9	57,0	30,4	38,1	43,0
	2	87,0	70,2	85,1	13,0	29,8	14,9
	3	90,4	74,3	84,4	9,6	25,7	15,6
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	95,4	88,9	93,3	4,6	11,1	6,7
	200	50,3	49,7	54,3	49,1	50,3	45,7
	400	38,9	39,7	41,4	61,1	60,3	58,6

Tabela 37. Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie *Chlorella* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (2 seria).

Dzień badań	Numer komory	Zawartość chlorofilu w próbce % :			Ubytek chlorofilu w próbce % :		
		A	B	C	A	B	C
2	1	80,1	70,3	75,4	19,9	29,7	26,4
	2	93,1	86,4	88,7	6,9	13,6	11,3
	3	89,2	79,4	82,3	10,8	20,6	17,7
4	1	75,2	64,3	69,1	24,8	35,7	30,9
	2	91,3	81,4	87,2	8,7	18,6	12,8
	3	89,3	79,2	84,1	10,7	20,8	15,9
8	1	79,2	64,1	70,3	20,8	35,9	29,7
	2	92,7	78,3	84,2	7,3	21,7	15,8
	3	90,4	75,1	80,3	9,6	24,9	19,7
11	1	83,1	70,2	75,4	16,9	29,8	24,6
	2	90,7	77,3	81,4	9,3	22,7	18,6
	3	90,9	84,0	83,7	9,1	16,0	16,3
15	1	84,7	70,2	75,6	15,3	29,8	24,4
	2	91,8	83,1	84,7	8,2	16,9	15,3
	3	92,1	85,7	84,2	7,9	14,3	15,8
18	1	80,2	67,2	71,3	19,8	32,8	28,7
	2	85,3	69,4	74,2	14,7	30,6	25,8
	3	89,7	74,3	80,3	10,3	25,7	19,3
22	1	83,2	70,8	74,2	16,8	29,2	25,8
	2	73,4	68,3	66,7	26,6	31,7	33,3
	3	90,4	79,2	84,1	9,6	20,8	15,9
25	1	85,7	70,2	74,3	14,3	29,8	25,7
	2	78,1	64,2	70,4	21,9	35,8	29,6
	3	89,2	83,1	81,3	10,8	16,9	18,7
29	1	80,4	67,2	71,4	19,6	32,8	28,6
	2	72,1	60,4	68,4	27,9	39,6	31,6
	3	85,7	70,2	78,9	14,3	29,8	21,1
32	1	79,7	73,1	71,3	20,3	26,9	28,7
	2	69,3	59,8	63,1	30,7	40,2	36,9
	3	80,3	64,2	72,1	19,7	35,8	27,9
36	1	78,4	69,1	70,4	21,6	30,9	29,6
	2	70,4	65,4	63,1	29,6	34,6	36,9
	3	82,6	70,2	75,4	17,4	29,8	24,6
40	1	75,2	65,3	69,1	24,8	34,7	30,9
	2	68,3	65,2	63,7	31,7	34,8	36,3
	3	80,4	70,5	74,2	19,6	29,5	25,8
43	1	70,4	60,4	63,7	29,6	39,6	36,3
	2	42,7	30,8	37,8	57,3	69,2	62,2
	3	72,1	61,4	68,3	27,9	38,6	31,7
46	1	65,2	52,1	59,7	34,8	47,9	40,3
	2	35,1	25,1	30,3	64,9	74,9	69,7
	3	69,4	58,9	60,4	30,6	41,1	39,6
50	1	64,1	55,2	59,1	35,9	44,8	40,9
	2	31,3	20,1	28,3	68,7	79,9	71,7
	3	71,3	66,7	65,4	28,7	33,3	33,3
53	1	60,2	53,2	55,7	39,8	46,8	44,3
	2	30,4	24,3	27,3	69,6	75,7	72,7
	3	72,7	67,2	65,7	27,3	32,8	34,3
57	1	61,3	51,1	55,4	38,7	48,9	44,6
	2	33,3	20,4	26,3	66,7	79,6	73,7
	3	69,8	57,3	60,4	30,2	42,7	39,6
62	1	59,1	50,8	52,7	40,9	49,2	47,3
	2	32,4	23,1	26,7	67,6	76,9	73,3
	3	70,4	60,7	64,3	29,6	39,3	35,7
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	95,4	88,9	93,3	4,6	11,1	6,7
	600	35,4	37,4	29,3	64,0	62,6	70,7
	800	32,7	35,7	26,8	67,3	64,3	73,2
	1000	30,8	32,1	24,2	69,2	67,9	75,8

Tabela 38 . Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie Chlorella przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (3 seria).

Dzień badań	Numer komory	Zawartość chlorofilu w próbce %			Ubytek chlorofilu w próbce w stosunku %		
		A	B	C	A	B	C
2	1	58,7	45,3	49,7	41,3	54,7	50,3
	2	71,2	65,1	64,3	28,8	34,9	35,7
	3	66,7	54,1	59,8	33,3	45,9	40,2
4	1	55,1	53,2	50,4	44,9	46,8	49,6
	2	70,3	59,7	61,4	29,7	40,3	38,6
	3	69,1	57,3	60,7	30,9	42,7	39,3
8	1	54,3	45,7	50,7	45,7	54,3	49,3
	2	69,4	58,4	63,7	30,6	41,6	36,3
	3	74,3	65,2	67,8	27,9	34,8	32,2
11	1	59,2	51,4	50,3	40,8	48,6	49,7
	2	72,1	63,4	67,4	27,9	36,6	32,6
	3	75,7	65,3	69,4	24,3	34,7	30,6
15	1	61,3	53,1	57,3	38,7	46,9	42,7
	2	68,3	57,1	60,4	31,7	42,9	39,6
	3	74,1	65,4	67,3	25,9	34,6	32,7
18	1	60,4	51,4	53,4	39,6	48,6	46,6
	2	69,2	60,4	63,4	30,8	39,6	36,6
	3	77,3	65,1	69,8	22,7	34,9	30,2
22	1	58,3	53,2	51,7	41,7	46,8	48,3
	2	50,3	47,1	48,4	49,7	52,9	51,6
	3	70,7	59,3	63,4	29,3	40,7	36,6
25	1	60,4	50,8	54,7	39,6	49,2	45,3
	2	48,7	39,3	41,3	51,3	60,7	58,7
	3	75,2	63,4	68,4	24,8	36,6	31,6
29	1	55,1	49,1	50,7	44,9	50,9	49,3
	2	35,1	25,7	29,7	64,9	74,3	70,3
	3	78,4	64,3	70,4	91,6	35,7	29,6
32	1	58,7	47,2	51,5	41,3	52,8	48,5
	2	41,3	34,8	37,4	58,7	65,2	62,6
	3	74,3	64,7	68,7	25,7	35,3	31,3
36	1	54,3	41,7	50,3	45,7	58,3	49,7
	2	45,7	35,1	40,3	54,3	65,9	59,7
	3	77,7	65,2	70,8	22,3	34,8	29,2
40	1	58,7	50,7	53,1	41,3	49,3	46,9
	2	40,1	27,8	31,7	59,9	72,2	68,3
	3	75,3	64,3	69,4	24,7	35,7	30,6
43	1	40,2	30,4	34,2	59,8	69,6	65,8
	2	19,3	8,8	10,7	80,7	91,2	89,3
	3	65,7	51,3	58,2	34,3	48,7	41,8
46	1	48,3	37,2	41,3	51,7	62,8	58,7
	2	18,4	9,4	11,4	81,6	90,6	88,6
	3	60,2	51,4	55,2	39,8	48,6	44,8
50	1	50,9	45,7	47,1	49,1	54,3	52,9
	2	11,3	7,4	9,2	88,7	92,6	90,8
	3	63,1	53,1	59,8	36,9	46,9	40,2
53	1	51,8	40,7	45,1	48,2	59,3	54,9
	2	10,8	6,7	8,2	89,2	93,3	91,8
	3	62,7	53,2	55,7	37,3	46,8	44,3
57	1	45,1	30,7	35,2	54,9	69,3	64,8
	2	8,8	7,2	6,4	91,2	92,8	93,6
	3	60,7	54,7	54,2	39,3	45,3	45,8
62	1	40,3	33,4	31,4	59,7	66,6	68,6
	2	9,1	7,8	6,1	90,9	92,2	93,9
	3	59,8	52,4	51,4	40,2	47,6	48,6
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego [mg]	0	94,5	88,9	93,3	5,5	11,1	6,7
	1500	30,7	17,8	23,8	69,7	82,2	76,2
	2200	21,4	15,4	11,3	78,6	84,6	88,7
	3100	9,2	12,0	6,8	90,8	8,8	93,2

Tabela 39. Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie *Chlorella* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (4 seria).

Dzień badań	Numer komory	Zawartość chlorofilu w próbce %			Ubytek chlorofilu w próbce w stosunku %		
		A	B	C	A	B	C
1	1	91,2	84,5	89,5	8,8	15,5	10,5
	2	87,3	81,2	88,0	12,7	18,8	12,0
	3	92,3	87,3	89,6	7,7	12,7	10,4
9	1	87,9	71,1	63,4	12,1	28,9	36,6
	2	68,2	66,1	80,6	31,8	33,9	19,4
	3	63,1	47,9	80,2	36,9	42,1	18,8
14	1	83,2	69,4	72,3	16,8	30,6	27,7
	2	69,2	65,4	73,4	30,8	34,6	26,6
	3	73,1	71,1	75,6	26,9	28,4	24,4
19	1	80,4	65,2	69,4	19,6	34,8	30,6
	2	63,2	62,1	64,3	36,8	37,9	35,7
	3	72,0	69,3	72,8	28,0	30,7	27,2
23	1	55,4	59,3	76,2	44,6	20,7	23,8
	2	70,1	47,9	62,1	29,9	52,1	37,9
	3	80,3	70,2	77,5	19,7	19,8	22,5
28	1	57,8	55,4	61,2	42,2	44,6	38,8
	2	67,8	60,4	69,4	32,2	39,6	30,6
	3	79,4	70,4	80,1	20,6	59,6	19,9
37	1	62,4	52,1	74,0	37,6	47,9	26,0
	2	44,6	41,3	54,2	55,4	58,7	45,8
	3	58,0	51,2	63,4	42,0	48,8	36,6
47	1	73,6	56,7	75,6	26,4	43,3	24,4
	2	64,0	51,2	60,1	36,0	48,8	39,9
	3	69,8	55,6	67,8	30,2	44,4	32,2
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	95,4	88,9	93,3	4,6	11,1	6,7
	50	65,7	64,3	69,8	34,3	35,7	30,2
	200	50,3	49,7	54,3	49,1	50,3	45,7
	400	38,9	39,7	41,4	61,1	60,3	58,6
	1200	29,4	38,8	26,4	70,6	61,2	73,6
	1600	30,0	13,2	20,7	70,0	86,8	79,3
	3200	8,3	11,6	5,7	91,7	88,4	94,3

4.13.3. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego, ścieków syntetycznych i oczyszczonych na organizmy testowe *Daphnia sp.*(rozwiłtka) i *Lebistes reticulatus* (gupik)

Wyniki testów toksyczności ostrej wskazują, że olej napędowy okazał się silnie toksyczną substancją w stosunku do rozwiłtki (tabela 40 i 42). Wartości LC_{50} dla tych organizmów zostały policzone już po 24 godzinach i wynosiły dla oleju napędowego 76,2 mg/dm³. Po 48 godzinach nie obserwowano już żywych organizmów *Daphnia sp.* w badanych stężeniach. Natomiast dużo niższą toksyczność zaobserwowano w stosunku do gupika (tabela 41). Po 24 godzinach trwania testu zaobserwowano organizmy martwe jedynie w najwyższym badanym stężeniu. Dopiero po upływie następnej doby można już było wyznaczyć LC_{50} , które wynosiło 582 mg/dm³ (tabela 42). Natomiast po upływie 72 godzin zaobserwowano już wyraźnie toksyczny wpływ badanych związków na gupiki. LC_{50} dla wodnej frakcji olejowej wynosiło: po 72 godzinach 269 mg/dm³; po 96 godzinach 142,5 mg/dm³.

Wyniki testów toksyczności ostrej przeprowadzone na rozwiłtce *Daphnia sp.* hodowanej w obecności ścieków syntetycznych z zawartością oleju napędowego wskazują, że w skład oleju wchodzi toksyczne substancje. Już w stężeniu 400 mg/dm³ obserwowano 100% śmiertelność rozwiłtek po 24 godzinach (tabela 43) a ryb po 48 godzinach (tabela 44).

Wyniki badań prowadzonych na rozwiłtkach i rybach na odpływach z poszczególnych komór, w pierwszej serii badań, przedstawiono w tabelach 43 i 44. We wszystkich badaniach nie zauważono wpływu, z dwoma wyjątkami, substancji zawartych w ściekach oczyszczonych, na śmiertelność organizmów testowych po 24 godzinach. Największą śmiertelność rozwiłtek obserwowano po 48, 72 i 96 godzinach w drugiej części badań dla odpływów z komory I-konwencjonalnej. W tym przypadku, pod koniec badań, zauważalna była ponad 50% śmiertelność organizmów po 96 godzinach. W odpływach z pozostałych komór, w tym samym czasie, liczba żywych organizmów była mniejsza tylko o około 20-25%. Ryby były mniej wrażliwe na substancje węglowodorowe zawarte w ściekach oczyszczonych. W hodowlach tych obserwowano śmierć pojedynczych osobników po 48, 72 i 96 godzinach. Najwięcej dla odpływów z komory I po 96 godzinach a najmniej dla odpływów z komory III.

Śmiertelność rozwiłtek i ryb w odpływach z poszczególnych komór w drugiej serii badań przedstawiono w tabelach 45 i 46. W przypadku dozowania większej ilości oleju napędowego do komór napowietrzania, obserwowano większą toksyczność ścieków z nich odpływających w stosunku do organizmów testowych. Już po 24 godzinach, zwłaszcza w odpływach pochodzących z ostatnich dni procesu oczyszczania, zauważono śmierć rozwiłtek. Największą śmiertelność organizmów badanych utrzymywała się w odpływie z komory II. W ściekach oczyszczonych pochodzących z tej komory już od 43 dnia, po 24 godzinach obserwowano 25-63% śmiertelność testowanych rozwiłtek a po 96 godzinach 88-95% śmiertelność. Najmniejszą śmiertelność organizmów testowych obserwowano w odpływie z komory III i niewiele większą z komory I. Nie przekraczała ona 50%. Ryby były dużo mniej wrażliwe na substancje zawarte w ściekach oczyszczonych. Różnice w śmiertelności tych organizmów w odpływach z poszczególnych komór przedstawiały się podobnie lecz nigdzie nie przekroczyły 30 %.

W testach założonych na odpływach pochodzących z trzeciej serii badań (tabela 47 i 48) również rozwiłtki okazały się bardziej wrażliwe niż ryby. Do 29 dnia badań nie obserwowano żadnej śmiertelności rozwiłtek po 24 godzinach. W przypadku ryb aż do 43 dnia badań. Największą śmiertelność obserwowano dla rozwiłtek w ściekach oczyszczonych pochodzących z komory II. W 57 dniu, po 96 godzinach wyniosła ona 100%. Następnie dla odpływów z komory I a najmniej śmiertelność była w odpływach z komory

III. Bardzo podobne wyniki otrzymano w przypadku gupików. Z tym iż, śmiertelność ryb w odpływach z komory I nie przekroczyła nigdzie 50%, jak to miało miejsce dla rozwielitek. Obserwowano natomiast także 100% śmiertelność tych organizmów testowych w ściekach oczyszczonych pochodzących z komory II, w 57 dniu oczyszczania, po 72 i 96 godzinach trwania testu.

W tabelach 49 i 50 przedstawiono wyniki badań toksykologicznych wykonanych na ściekach oczyszczonych w czwartej serii badań. W tej serii do komór dozowano zmienne stężenie oleju napędowego. W żadnym odpływie, do 47 dnia procesu oczyszczania, nie zauważono śmiertelności rozwielitek po upływie 24. Dopiero po upływie następnej doby, czyli po 48 godzinach trwania testu, można było dostrzec pierwsze toksyczne skutki przebywania rozwielitek w badanych roztworach. Największa śmiertelność była obserwowana w odpływach z komory II i I, w miarę jak pogarszały się efekty oczyszczania ścieków w tych komorach, a najmniejsza w odpływach z komory III. Podobnie sytuacja przedstawiała się w testach na gupiku. W ściekach oczyszczonych, pochodzących z komór II i II obserwowano, pod koniec badań, największą śmiertelność ryb. Wyjątek stanowił dzień 37. W odpływach, pochodzących z tego dnia, ze wszystkich komór zauważono, po 48, 72 i 96 godzinach testu, 100% śmiertelność organizmów. Wyniki te odbiegały od wyników testów przeprowadzonych na rozwielitkach. W tym wypadku musiały w ściekach oczyszczonych znajdować się substancje bardziej toksyczne dla ryb niż dla *Daphni*.

4.13.4. Ocena toksycznego wpływu oleju napędowego, ścieków surowych i oczyszczonych na bakterie

Przeprowadzone badania, metodą krążkową na agarze odżywczym, wykazały małą wrażliwość badanych szczepów bakterii na olej napędowy. Oznacza to także może, że tylko nieznaczna część węglowodorów ulegała rozpuszczeniu w poszczególnych rozpuszczalnikach i nie były to węglowodory o właściwościach toksycznych. Szczepem, który okazał się szczególnie przydatny do tego, typu badań toksykologicznych był izolat kliniczny *Pseudomonas aeruginosa*. Badania wykonane na tym szczepie wykazały toksyczność frakcji oleju napędowego rozpuszczalnego w DMSO, dla której strefa zahamowania wzrostu wynosiła 15 mm. Natomiast badania dotyczące toksycznego działania ścieków oczyszczonych, pochodzących z poszczególnych komór, w kolejnych seriach, na bakterie nie przyniosły w żadnym wypadku efektów pozytywnych. Oznacza to, że w odpływach nie było substancji hamujących wzrost szczepów testowych bakterii.

Tab 40. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji i w różnych stężeniach oleju napędowego.

Badany związek	Badane stężenie mg/l	Śmiertelność rozwielitek w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
Olej napędowy	0	0	0	0	0
	45	46,5	100	100	100
	90	66,7	100	100	100
	180	80	100	100	100
	360	80	100	100	100
	720	90	100	100	100

Tab. 41. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji i w różnych stężeniach oleju napędowego.

Badany związek	Badane stężenie mg/l	Śmiertelność ryb w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
Olej napędowy	0	0	0	0	0
	45	0	0	20	20
	90	0	0	20	40
	180	0	0	40	60
	360	0	20	40	60
	720	20	60	80	100

Tab. 42. Wartości LC₅₀ wodnej emulsji oleju napędowego uzyskane w różnym czasie ekspozycji dla rozwielitki i gupika.

Testowany Organizm	Związek	LC ₅₀ mg / l			
		po 24 godz.	Po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
Rozwielitka	olej napędowy	76,2	45	45	45
Ryba	olej napędowy	Nie można obliczyć	582	269	142,5

Tabela 43. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach poszczególnych komór (1 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność rozwielitek w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	Po 72 godz.	po 96 godz.
5	1	0	0	0	7
	2	0	0	0	3
	3	0	0	0	5
11	1	0	0	2	9
	2	0	0	0	2
	3	0	0	1	3
16	1	0	1	5	10
	2	0	0	1	4
	3	0	0	2	4
22	1	0	3	12	18
	2	0	2	6	9
	3	0	1	5	7
28	1	0	7	15	21
	2	0	3	7	13
	3	0	1	4	9
35	1	0	7	19	25
	2	0	5	13	16
	3	0	3	9	10
40	1	2	10	16	23
	2	0	7	11	21
	3	0	4	10	14
42	1	1	7	15	22
	2	0	5	7	11
	3	0	4	8	10
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	1	2
	200	32	37	40	40
	400	40	40	40	40

Tabela 44. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (1 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność ryb w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
5	1	0	0	0	1
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
11	1	0	0	0	2
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
16	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
22	1	0	2	3	3
	2	0	0	1	1
	3	0	0	0	1
28	1	0	1	3	4
	2	0	0	1	1
	3	0	0	0	0
35	1	0	2	2	2
	2	0	0	1	1
	3	0	0	0	1
40	1	0	1	1	2
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
42	1	0	1	1	2
	2	0	1	2	2
	3	0	0	0	1
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	0	0
	200	5	5	7	10
	400	8	10	10	10

Tabela 45. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach poszczególnych komór (2 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność rozwielitek w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	Po 72 godz.	po 96 godz.
2	1	1	4	6	8
	2	0	0	0	2
	3	0	0	0	1
8	1	2	6	9	13
	2	0	0	1	2
	3	0	0	0	1
15	1	1	2	4	7
	2	0	0	1	2
	3	0	0	0	1
22	1	2	4	9	12
	2	1	2	5	9
	3	0	1	2	3
29	1	2	3	9	15
	2	3	6	7	11
	3	1	1	1	3
36	1	2	3	6	7
	2	5	9	17	22
	3	0	1	2	4
43	1	3	6	13	16
	2	10	17	28	35
	3	1	4	5	6
50	1	5	7	11	12
	2	12	19	27	38
	3	2	4	8	9
57	1	4	5	6	9
	2	15	21	29	36
	3	2	2	3	4
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	1	2
	600	32	37	40	40
	800	40	40	40	40
	1000	40	40	40	40

Tabela 46. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (2 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność ryb w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
2	1	1	2	3	4
	2	0	0	0	1
	3	0	0	0	1
8	1	2	2	3	4
	2	0	0	0	1
	3	0	0	0	1
15	1	2	3	4	4
	2	0	0	0	1
	3	0	0	0	1
22	1	3	3	4	4
	2	1	2	3	4
	3	0	0	0	1
29	1	1	1	2	3
	2	3	4	5	5
	3	0	1	1	1
36	1	1	2	3	3
	2	3	5	5	5
	3	0	0	1	1
43	1	2	3	4	4
	2	4	6	6	7
	3	1	2	2	3
50	1	2	2	3	4
	2	4	4	5	6
	3	0	1	1	2
57	1	2	2	3	3
	2	4	5	7	7
	3	1	1	1	2
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	0	0
	600	5	5	7	10
	800	8	10	10	10
	1000	10	10	10	10

Tabela 47. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach poszczególnych komór (3 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność rozwielitek w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	Po 72 godz.	po 96 godz.
2	1	0	0	1	9
	2	0	0	2	11
	3	0	0	0	4
8	1	0	1	4	11
	2	0	0	2	9
	3	0	0	1	2
15	1	0	1	7	14
	2	0	2	5	16
	3	0	0	2	5
22	1	0	3	12	18
	2	0	2	6	9
	3	0	1	5	7
29	1	0	4	17	26
	2	0	8	19	25
	3	0	3	5	8
36	1	1	12	22	29
	2	2	15	28	36
	3	0	4	8	9
43	1	4	12	19	27
	2	8	19	32	35
	3	2	5	10	12
50	1	9	12	19	27
	2	24	32	37	39
	3	5	8	9	11
57	1	11	16	27	34
	2	34	37	39	40
	3	5	8	9	14
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	1	2
	1500	29	40	40	40
	2200	40	40	40	40
	3100	40	40	40	40

Tabela 48. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (3 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność ryb w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
2	1	0	0	1	1
	2	0	0	1	1
	3	0	0	0	0
8	1	0	0	1	2
	2	0	0	1	1
	3	0	0	0	0
15	1	0	0	2	2
	2	0	0	1	1
	3	0	0	0	0
22	1	0	2	2	3
	2	0	3	4	4
	3	0	0	1	1
29	1	0	1	2	3
	2	0	2	3	4
	3	0	0	0	1
36	1	0	1	1	2
	2	0	3	3	4
	3	0	0	1	1
43	1	0	2	3	4
	2	0	4	6	7
	3	0	0	1	2
50	1	2	4	4	5
	2	4	7	8	9
	3	1	2	2	2
57	1	3	4	5	7
	2	7	9	10	10
	3	1	1	2	3
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	0	0
	1500	7	9	10	10
	2200	10	10	10	10
	3100	10	10	10	10

Tabela 49. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach poszczególnych komór (4 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność rozwielitek w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	Po 72 godz.	po 96 godz.
1	1	0	0	0	5
	2	0	0	0	4
	3	0	0	0	6
9	1	0	10	10	12
	2	0	10	15	18
	3	0	0	5	10
14	1	0	3	10	12
	2	0	1	15	16
	3	0	1	5	7
19	1	0	2	6	13
	2	0	3	11	17
	3	0	1	5	9
23	1	0	0	10	18
	2	0	10	14	17
	3	0	0	10	10
28	1	0	7	12	18
	2	0	6	15	16
	3	0	3	9	10
37	1	0	10	18	27
	2	0	19	24	29
	3	0	10	13	17
47	1	0	16	19	24
	2	0	19	28	32
	3	0	5	8	10
Ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³ —	0	0	0	1	2
	50	15	21	34	38
	200	32	37	40	40
	400	40	40	40	40
	1200	40	40	40	40
	1600	40	40	40	40
	3200	40	40	40	40

Tabela 50. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (4 seria).

Dzień badań	Numer komory	Śmiertelność ryb w %			
		po 24 godz.	po 48 godz.	po 72 godz.	po 96 godz.
1	1	0	2	3	3
	2	0	1	1	2
	3	0	0	1	1
9	1	0	0	1	1
	2	0	1	3	3
	3	0	1	2	2
14	1	0	1	5	5
	2	0	0	2	3
	3	0	0	1	2
19	1	0	2	2	3
	2	0	2	3	4
	3	0	1	1	1
23	1	0	3	3	4
	2	0	1	2	3
	3	0	2	2	2
28	1	0	4	4	5
	2	0	4	4	5
	3	0	2	2	3
37	1	0	10	20	30
	2	0	20	30	40
	3	0	10	10	10
47	1	2	4	5	5
	2	3	5	7	8
	3	0	1	1	2
Woda akwariowa z dodatkiem oleju napędowego mg/dm ³	0	0	0	0	0
	50	2	2	3	5
	200	5	5	7	10
	400	8	10	10	10
	1200	10	10	10	10
	1600	10	10	10	10
	3200	10	10	10	10

4.13.5. Ocena działania genotoksycznego oleju napędowego i ścieków oczyszczonych metodą testu Ames

Ocenę potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych składników oleju napędowego oraz jego metabolitów powstających w czasie procesu biodegradacji, a mogących się znajdować w ściekach oczyszczonych, przeprowadzono z zastosowaniem testu Ames. Wyniki testu Ames dla oleju napędowego przedstawiono w tabeli 51. Do testu wprowadzano olej w ilościach 0,06; 0,03; 0,015; 0,0015 i 0,00015 cm³ na płytkę. Aktywność mutagenną substancji w nim zawartych badano przy zastosowaniu szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100. Test przeprowadzany był z dodatkiem frakcji S9, a także bez frakcji S9. Szczepy testowe nie wykazały potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych mieszaniny związków wchodzących w skład oleju napędowego. Rewersja do prototrofii tych szczepów, w obecności zastosowanych stężeń oleju napędowego, była mniejsza niż wartości uzyskane dla rewersji spontanicznej. Zauważono, w wyższych stężeniach wprowadzanych na płytkę, obniżoną liczbę rewertantów do prototrofii. Zjawisko to był spowodowane toksycznym oddziaływaniem mieszaniny oleju napędowego. Podobne wyniki otrzymano w teście przeprowadzany z dodatkiem frakcji S9 jak i bez jej dodatku.

Natomiast wyniki testu Ames przeprowadzanego w każdej serii badań, bezpośrednio na odpyłkach z poszczególnych komór przedstawiono w tabelach: 52, 53, 54 i 55. W żadnym przypadku nie stwierdzono właściwości mutagennych, gdyż dla wszystkich badanych prób średnia liczba rewertantów nie była dwukrotnie większa od rewersji spontanicznej. Obserwowano jedynie spadek wartości współczynnika mutagenności poniżej jedności w momencie pogorszenia warunków oczyszczania. W niektórych przypadkach współczynnik mutagenności zbliżał się do wartości 1,6, ale nigdy nie przekroczył 2,0. Oznacza to, że w trakcie oczyszczania ścieków zaolejonych żaden z badanych osadów nie wytworzył mutagennych metabolitów.

Tabela 51. Wyniki testu Ames dla oleju napędowego.

Numer szczepu	Obecność frakcji	Rewersja spontaniczna	Objętość oleju wprowadzonego na płytkę [cm ³]				
			0,06	0,03	0,015	0,0015	0,00015
			Średnia liczba rewertantów do prototrofii				
TA 98	- S9	21,3 +/-0,3	5,0 +/-1,4	5,8 +/-0,8	7,0 +/-0,9	19,0 +/-0,7	22,8 +/-0,9
TA 98	+S9	32,5 +/-1,0	6,5 +/-1,2	13,0 +/-1,0	21,5 +/-0,7	31,5 +/-0,7	32,5 +/-0,9
TA 100	-S9	170,8 +/-1,7	49,5 +/-0,7	65,0 +/-1,5	72,8 +/-2,0	134,8 +/-2,2	165,8 +/-1,6
TA 100	+S9	160,3 +/-3,0	42,5 +/-1,2	114,5 +/-2,3	153,0 +/-1,8	154,5 +/-1,4	155,0 +/-0,8

-TA 98 Salmonella typhimurium TA 98
 -TA100 Salmonella typhimurium TA100
 -+S9 test prowadzony z frakcją S-9
 --S9 test prowadzony bez frakcji S-9

Tabela 52 . Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Amesa dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (1 seria).

Dzień badań	Numer komory	Współczynnik mutagenności			
		- S9		+ S9	
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100
5	1	1,21	1,24	1,02	1,23
	2	1,10	1,22	1,21	1,14
	3	1,30	1,21	1,12	1,00
11	1	1,11	1,12	1,34	1,10
	2	1,00	1,01	1,12	1,22
	3	1,32	1,20	1,10	1,14
16	1	1,22	1,23	1,22	1,20
	2	1,30	1,06	1,21	1,21
	3	1,14	1,21	1,03	1,11
22	1	0,96	0,84	0,90	1,08
	2	1,13	1,24	1,30	1,14
	3	1,34	1,13	1,12	1,11
28	1	0,80	0,75	1,00	0,95
	2	1,27	0,99	1,23	0,93
	3	1,34	1,02	1,24	1,14
35	1	0,96	0,90	1,07	1,04
	2	1,00	1,28	1,14	1,11
	3	1,18	1,39	1,27	1,40
40	1	0,75	0,84	0,84	1,36
	2	0,90	0,96	0,94	1,11
	3	1,20	1,10	1,00	1,15
42	1	0,91	1,03	1,20	1,12
	2	0,80	1,28	1,13	1,31
	3	1,10	1,13	1,20	1,10

Tabela 53. Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Amesa dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (2 seria badań).

Dzień badań	Numer komory	Współczynnik mutagenności			
		- S9		+ S9	
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100
2	1	1,32	1,24	1,22	1,03
	2	1,40	1,14	1,31	1,10
	3	1,27	1,12	1,16	1,00
8	1	1,41	1,32	1,31	1,20
	2	1,37	1,21	1,22	1,19
	3	1,31	1,18	1,10	1,17
15	1	1,42	1,33	1,32	1,23
	2	1,40	1,36	1,35	1,25
	3	1,20	1,14	1,09	1,15
22	1	1,34	1,28	1,16	1,12
	2	1,56	1,34	1,27	1,20
	3	1,29	1,17	1,11	1,00
29	1	1,22	1,20	1,14	1,10
	2	1,46	1,34	1,22	1,23
	3	1,07	1,10	1,05	1,00
36	1	1,26	1,18	1,19	1,07
	2	1,32	1,23	1,23	1,16
	3	1,19	1,21	1,14	1,05
43	1	1,22	1,02	1,17	1,12
	2	1,23	0,99	0,97	1,10
	3	1,00	1,13	1,00	1,12
50	1	0,98	1,12	1,0	1,02
	2	0,82	0,7	0,9	1,10
	3	1,23	1,14	1,19	1,0
57	1	0,96	1,10	1,2	1,0
	2	0,70	0,89	0,8	0,9
	3	1,10	1,18	1,08	1,04

Tabela 54 . Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Amesa dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (3 seria badań).

Dzień badań	Numer komory	Współczynnik mutagenności			
		- S9		+ S9	
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100
2	1	1,11	1,20	1,0	1,20
	2	1,23	1,13	1,15	1,03
	3	1,30	1,0	1,20	1,2
8	1	1,34	1,25	1,23	1,21
	2	1,27	1,3	1,21	1,27
	3	1,14	1,24	1,0	1,17
15	1	1,53	1,42	1,42	1,28
	2	1,43	1,21	1,34	1,18
	3	1,32	1,3	1,28	1,21
22	1	1,08	0,94	0,98	1,0
	2	1,32	1,14	1,30	1,04
	3	1,28	1,23	1,02	1,21
29	1	0,90	0,95	1,10	1,1
	2	1,37	1,1	1,03	1,23
	3	1,44	1,37	1,34	1,28
36	1	0,76	0,80	1,17	1,08
	2	0,9	1,1	1,24	1,21
	3	1,28	1,49	1,17	1,30
43	1	0,95	1,04	0,1	1,06
	2	0,70	0,86	0,82	0,91
	3	1,30	1,50	1,20	1,25
50	1	0,83	0,92	0,89	1,02
	2	0,60	0,76	0,72	0,81
	3	1,20	1,33	1,12	1,22
57	1	0,74	0,7	0,78	0,86
	2	0,49	0,54	0,51	0,65
	3	1,34	1,24	1,23	1,11

Tabela 55. Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Amesa dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (4 seria badań).

Dzień badań	Numer komory	Współczynnik mutagenności			
		- S9		+ S9	
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100
1	1	1,32	1,20	1,22	1,13
	2	1,20	1,21	1,25	1,11
	3	1,31	1,11	1,10	1,00
9	1	1,21	1,02	0,84	1,00
	2	1,30	1,11	1,12	0,92
	3	1,52	1,20	1,10	1,13
14	1	1,12	1,13	1,12	1,00
	2	1,00	1,36	0,98	1,24
	3	1,15	1,13	1,03	1,10
19	1	1,23	1,00	1,19	1,08
	2	1,16	1,24	0,95	1,19
	3	1,04	1,13	0,80	1,14
23	1	1,30	0,75	1,17	0,95
	2	1,37	0,99	1,23	0,94
	3	1,44	0,92	1,24	1,17
28	1	1,24	1,40	1,08	1,03
	2	1,32	1,28	1,16	1,10
	3	1,18	1,39	0,95	0,85
37	1	0,75	0,84	0,84	1,76
	2	0,60	0,76	0,94	1,10
	3	0,85	0,93	0,98	1,16
40	1	0,91	1,23	1,20	1,14
	2	0,70	1,18	1,14	1,32
	3	0,82	1,14	0,97	1,11
44	1	1,12	1,05	1,09	1,20
	2	1,17	1,16	1,07	1,10
	3	1,14	0,92	1,24	1,25
47	1	1,04	1,04	1,19	1,20
	2	1,01	1,01	1,10	1,07
	3	1,24	1,24	1,70	1,04

5.0. Dyskusja i podsumowanie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad możliwością biologicznego oczyszczania ścieków z zawartością oleju napędowego, oraz zwiększania efektywności tego procesu przez działania modyfikujące skład mikrobiologiczny osadu czynnego.

Osad czynny wyhodowany w sposób konwencjonalny ze ścieków komunalnych, jest zawiesiną bakterii losowo dobranych i dlatego posiada ograniczone możliwości enzymatyczne w stosunku do trudnorozkładalnych substratów pochodzenia antropogennego.

Do takich zanieczyszczeń należy także olej napędowy, będący mieszaniną bardzo wielu różnych węglowodorów alifatycznych, cyklicznych i aromatycznych. Te ostatnie a zwłaszcza wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne znane są poza słabą podatnością na rozkład enzymatyczny- ze swego działania toksycznego a nawet genotoksycznego.

Poszukiwana- w niniejszej pracy- możliwość mikrobiologicznej modyfikacji osadu czynnego przy stosowaniu go do biodegradacji oleju napędowego zawartego w ściekach, wydawała się uzasadniona i celowa.

Praca nad tym zagadnieniem polegała na izolacji ze środowisk silnie skażonych ropą naftową i produktami ropopochodnymi bakterii, które były zdolne do wykorzystywania oleju napędowego jako jedynego źródła węgla i energii, bez wcześniejszej adaptacji. Bakterie te były prawdopodobnie mutantami, gdyż ich cechy biodegradacyjne były w stosunku do oleju napędowego trwałe i nie podlegały deadaptacji.

Z gleby i wody, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi wyizolowano ogółem 67 szczepów wysokoaktywnych drobnoustrojów. Po dokonaniu wielokrotnych pasażów okazało się, że tylko 33 z nich posiada genetycznie utrwaloną zdolność do biodegradacji węglowodorów. Następnie po wstępnym sprawdzeniu czy otrzymane czyste szczepy drobnoustrojów można wprowadzić do osadu czynnego wyhodowanego w sposób konwencjonalny bez wywołania wzajemnych, antagonistycznych oddziaływań, wybrano ostatecznie, do dalszych badań, 26 szczepów. Po przeprowadzeniu badań diagnostycznych zaliczono je do następujących rodzajów: *Bacillus* (cztery szczepy), *Micrococcus* (pięć szczepów), *Pseudomonas* (trzy szczepy), *Alcaligenes* (dwa szczepy), *Corynebacterium* (pięć szczepów), *Candida* (cztery szczepy), *Rhodotorula* (trzy szczepy).

Do badań nad biodegradacją oleju napędowego wyhodowano trzy rodzaje osadów czynnych:

- osad czynny konwencjonalny* (I) wyhodowany na ściekach komunalnych pochodzących z przepompowni Szczytniki. Stanowił on jednocześnie osad kontrolny.
- osad czynny* (II) wyhodowany wyłącznie z czystych szczepów drobnoustrojów, na ściekach syntetycznych z dodatkiem bulionu i oleju napędowego. Po otrzymaniu odpowiedniej ilości biomasy osadu i rozpoczęciu biodegradacji, bulion został wycofany.
- osad czynny doszczepiany* (III) hodowany początkowo na ściekach komunalnych a w momencie rozpoczęcia procesu biodegradacji dozowano do niego wyłącznie ścieki syntetyczne z dodatkiem oleju napędowego i wprowadzano co siedem dni szczepionkę złożoną z 26 aktywnych szczepów.

Postęp procesu biodegradacji oleju napędowego badano w czterech różnych seriach, w których każda prowadzona była na trzech różnych osadach czynnych (I,II i III). Poszczególne serie różniły się stężeniem dozowanego oleju napędowego do ścieków syntetycznych (tabela 56).

Wydajność procesu biodegradacji oceniana była w oparciu o wyniki otrzymane z badań technologicznych (indeks osadu czynnego, biochemiczne zapotrzebowanie tlenu, chemiczne zapotrzebowanie tlenu, ogólny węgiel organiczny, badanie ilości substancji ekstrahujących się eterem naftowym), biologicznych (ogólna liczba bakterii rozkładających olej napędowy w biomacie osadu) i biochemicznych (aktywność esterazowa i

dehydrogenazowa biomasy osadu). Stężenie oleju napędowego w ściekach surowych i oczyszczonych określano również przy pomocy chromatografii gazowej i cieczowej. Badania chromatograficzne były także podstawą do analizy jakościowej produktów pobiodegradacyjnych.

W tabeli 56 przedstawiono wyniki biodegradacji oleju napędowego wykonane metodą wagową, za pomocą ekstrakcji eterem naftowym ścieków syntetycznych i oczyszczonych. Jak widać, wszystkie badane osady czynne usuwały składniki oleju napędowego ze stosunkowo dobrą skutecznością, jednak była ona najniższa w układzie z osadem czynnym konwencjonalnym (I). Maksymalne usunięcie oleju ze ścieków, zawierających 200 mg oleju/dm³, wynosiło 83,4% a minimalne 42,6% (stężenie oleju w ściekach 1500 mg/dm³). Osad czynny II (otrzymany wyłącznie z czystych szczepów) biodegradował odpowiednio olej napędowy z 92,7% (stężenie oleju w ściekach 200 mg/dm³) i z 29,1% (stężenie oleju w ściekach 3100 mg/dm³) skutecznością. Osad czynny III, doszczepiany aktywnymi szczepami usuwał najlepiej olej napędowy w stężeniu 200 mg/dm³ – 93%. Najniższa wydajność tego procesu wynosząca 75,9% została stwierdzona w stężeniu oleju napędowego w ściekach wynoszącym 3100 mg/dm³.

W sumie można stwierdzić, że enzymatyczny rozkład oleju napędowego zachodził w szerokim zakresie stężeń wynoszącym od 200 do 3100 mg oleju/dm³. Znacznie lepsze wyniki uzyskano wówczas, gdy stosowano osad czynny modyfikowany (II i III) w porównaniu do osadu kontrolnego (I) wyhodowanego w sposób konwencjonalny. Różnica pomiędzy wydajnością procesu biodegradacji wskazywała na kilkunastokrotne zwiększenie efektywności oczyszczania ścieków w przypadku wzbogacania osadu czynnego nowymi, aktywnymi szczepami drobnoustrojów. Również próba hodowli osadu czynnego wyłącznie ze sztucznie dobranych aktywnych szczepów powiodła się, a osad czynny otrzymany w ten sposób, podczas eksploatacji okazał się lepszy od osadu konwencjonalnego. Potwierdziło to celowość mikrobiologicznej modyfikacji osadu czynnego, zwłaszcza wtedy gdy służy on do usuwania ze ścieków trudnorozkładalnych rodzajów zanieczyszczeń.

Tabela 56. Wydajność procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne

Seria badań	Dzień	Stężenie oleju napędowego w ściekach syntetycznych [mg/dm ³ /dobę]	Ilość oleju napędowego dodanego do komory [mg/dm ³]	Ilość oleju napędowego usuniętego ze ścieków syntetycznych [mg/dm ³] przez następujące osady:			Ilość oleju napędowego usuniętego ze ścieków syntetycznych [%] przez następujące osady:		
				O.I.	O.II.	O.III.	O.I.	O.II.	O.III.
1	1-21	200	1600	1329,2	1483,2	1488,0	83,7	92,7	93,0
	22-42	400	3200	2579,2	2800,0	2924,8	80,6	87,5	91,4
2	1-21	600	3600	2563,2	3200,4	3333,6	71,2	88,9	92,6
	22-42	800	4800	3110,4	3854,4	4228,8	64,8	80,3	88,1
	43-62	1000	6000	3276,0	3294,0	4608,0	54,6	54,9	76,8
3	1-21	1500	9000	3834,0	7299,0	6939,0	42,6	81,1	77,1
	22-42	2200	13200	6375,6	8342,4	10824,0	48,3	63,2	82,0
	43-62	3100	18600	10862,4	5412,6	14117,4	58,4	29,1	75,9
4	1-47	50-3100	20650	14042,0	12782,4	18316,6	68,3	61,9	88,7

Analizując z kolei przebieg biodegradacji oleju napędowego na podstawie wyników badań chromatograficznych można stwierdzić, że w pierwszej kolejności były wykorzystywane węglowodory n-parafinowe, natomiast znacznie wolniej ulegały rozkładowi

pozostałe grupy węglowodorów, w tym węglowodory aromatyczne, zwłaszcza wielopierścieniowe, charakteryzujące się skomplikowaną budową chemiczną i szkodliwym oddziaływaniem na organizmy żywe.

Uzupełnieniem badań nad biodegradacją oleju napędowego była ocena procesu biosorpcji, który wpływając na usuwanie omawianych zanieczyszczeń nie powoduje rzeczywistego ich rozkładu. Wyniki tych badań wskazują jednoznacznie na ścisłe powiązanie obu procesów. Z jednej strony biosorpcja zapewnia stały transport substratów energetycznych do wnętrza komórek bakterii z drugiej, intensywność procesu dysymilacji i wynikające stąd zapotrzebowanie i pobór tych substancji wpływa na stałe odnawianie się powierzchni sorpcyjnej. Proces biosorpcji jest zatem znaczący w usuwaniu zanieczyszczeń ze ścieków, co w pełni potwierdziły przeprowadzone badania. Stwierdzono wyraźny spadek stężenia oleju napędowego podczas jego kontaktu z biomasą badanych osadów czynnych w zależności od czasu kontaktu. Najszybszy i największy spadek stężenia oleju napędowego w cieczy nadosadowej, zaobserwowano w hodowlach zawierających osad czynny doszczepiony aktywnymi drobnoustrojami. Godzinny kontakt osadu czynnego-doszczepionego ze ściekami zawierającymi olej napędowy pozwolił na usunięcie z nich 64,2% substancji ekstrahujących się eterem naftowym. W przypadku osadu czynnego-kontrolnego podobny efekt był widoczny dopiero po upływie 3 godzin (67,2%). Uzyskane wyniki badań pozwalają przypuszczać, że zjawisko biosorpcji oleju napędowego na kłaczkach osadu czynnego najszybciej zachodzi w ciągu pierwszych pięciu godzin kontaktu. Po tym czasie dochodzą, najprawdopodobniej w dużym stopniu, do głosu procesy biodegradacji, gdyż po tym czasie obserwowano największy ubytek oleju z hodowli potwierdzony zmianami jakościowymi w obrazach chromatograficznych. Zmiany jakościowe w obrazach widmowych zaczęły się uwidaczniać dopiero w 5 godzinie badań dla osadu-doszczepianego a w 10-24 godzinie dla osadu-kontrolnego. Głównie obserwowano spadek intensywności w zakresie wysokowrzących węglowodorów C_{12} - C_{15} , pojawianie się pojedynczego, intensywnego sygnału w zakresie retencji C_{25} - C_{26} oraz wyraźne zmiany w intensywnościach sygnałów pochodzących od pochodnych alkiloaromatycznych benzenu i naftalenu, a także zmniejszanie się sygnałów od węglowodorów aromatycznych posiadających powyżej 9 atomów węgla w cząsteczce.

Ostatnim zagadnieniem, które wiązało się z procesem biodegradacji oleju napędowego była ocena toksyczności i genotoksyczności jego składników, oraz produktów biologicznego rozkładu. Ponieważ w trakcie przemian metabolicznych tak wielu związków wchodzących w skład badanego oleju napędowego mogły powstać związki o charakterze toksycznym lub mutagennym zdecydowano się na wykonanie szeregu testów toksykologicznych i testu na mutagenność na ściekach oczyszczonych. W wyniku tych testów nie stwierdzono obecności związków o działaniu mutagennym oraz, w większości przypadków, nie stwierdzono obecności substancji toksycznych w ściekach oczyszczonych. Negatywny wpływ odpływów na organizmy testowe obserwowano jedynie, w przypadku osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów i rzadziej osadu konwencjonalnego, gdy pogarszały się warunki oczyszczania, polegające na wzroście obciążenia ładunkiem zanieczyszczeń. Badania te potwierdziły najlepszą skuteczność oczyszczania ścieków zaolejonych w przypadku osadu doszczepianego aktywnymi mikroorganizmami. Najbardziej wrażliwymi na działanie substancji węglowodorowych zawartych w oleju napędowym i w ściekach oczyszczonych okazała się rześa drobna i rozwielitka. Mniejszą wrażliwością wykazały się ryby i glony. Najbardziej odporne na działanie substancji naftowych były bakterie.

Uzyskane wyniki potwierdziły przyjętą koncepcję usuwania zanieczyszczeń olejowych ze ścieków przy pomocy osadu czynnego doszczepianego aktywnymi szczepami, a tym samym wzbogaconego w odpowiednie enzymy. Osad taki znosił wysokie stężenia substancji olejowych zachowując przy tym stosunkowo dobre cechy biologiczne i enzymatyczne, posiadał prawidłową strukturę i indeks oraz poprawiał skuteczność usuwania

oleju napędowego średnio, w czterech seriach badań, o około 20% w stosunku do osadu konwencjonalnego. Systematyczne wprowadzanie szczepionki mikrobiologicznej pozwoliło na stworzenie z kłaczkami osadu stabilnego układu biologicznego charakteryzującego się zwiększoną liczbą bakterii rozkładających substancje węglowodorowe. Przeprowadzone badania wykazały również iż doszczepienie osadu czynnego poprawiało proces biosorpcji, a co za tym idzie również proces biodegradacji. Natomiast osad czynny wyhodowany na bazie aktywnych drobnoustrojów bardzo dobrze oczyszczał ścieki w warunkach stałego, niskiego i średniego obciążenia. Natomiast w momencie gdy do komory z tym osadem dozowano ścieki zawierające wysokie stężenia oleju napędowego lub gdy stężenie węglowodorów zmieniało się skokowo od małego do dużego, zaobserwowano gwałtowne pogorszenie warunków oczyszczania. Efektywność oczyszczania w takich momentach spadała nawet o 50%-70% w stosunku do osadu konwencjonalnego i doszczepianego. Zjawisko to było zapewne związane z małą stabilnością procesów biochemicznych wynikającą z braku w tym osadzie większości drobnoustrojów zapewniających trwałą flokulację kłaczek.

6.0. Wnioski

1. Olej napędowy znajdujący się w ściekach syntetycznych jako jedyne źródło węgla i energii, był wykorzystywany przez drobnoustroje osadu czynnego.
2. Z gleby i wody skażonej produktami ropopochodnymi, można wyizolować drobnoustroje aktywnie metabolizujące węglowodory alifatyczne, cykliczne i aromatyczne zawarte w oleju napędowym.
3. Osad czynny systematycznie doszczepiany aktywnymi szczepami, oraz osad wyhodowany wyłącznie z tych drobnoustrojów, wykorzystywał olej napędowy znacznie intensywniej niż osad czynny konwencjonalny.
4. Najwyższą wydajność procesu biodegradacji przy zastosowaniu osadu czynnego konwencjonalnego osiągnięto podczas dozowania ścieków zawierających 200 mg oleju napędowego/dm³. Wynosiła ona średnio 83,4%. Dla osadu wyhodowanego wyłącznie z czystych szczepów mikroorganizmów, przy takim samym stężeniu oleju, wartość ta wynosiła 92,4% i nawet gdy stężenie oleju wynosiło 1500 mg/dm³ wynosiła 81,1% tj. prawie dwukrotnie więcej niż w poprzednim układzie (osad czynny konwencjonalny). Najlepsze wyniki uzyskano podczas stosowania osadu czynnego doszczepianego aktywnymi szczepami bakterii. Najwyższa intensywność biodegradacji została stwierdzona w stężeniu 200 mg oleju napędowego/dm³ i wynosiła ona 93% ale była jeszcze nadal bardzo wysoka w stężeniu najwyższym, wynoszącym 3100 mg oleju/dm³ - 88,7%.
5. Doszczepianie osadu czynnego aktywnymi drobnoustrojami, a tym samym wzbogacenie jego mikroflory w odpowiednie enzymy, poprawiło nie tylko proces biodegradacji oleju napędowego ale limitowało także proces biosorpcji na kłaczkach osadu czynnego.
6. Badania chromatograficzne wykazały, że spośród licznych węglowodorów wchodzących w skład oleju napędowego najwcześniej były usuwane węglowodory izoparafinowe.
7. W odpływie ścieków zawierających olej napędowy oczyszczonych osadem czynnym mogą znajdować się niezbiodegradowane węglowodory aromatyczne i nieznane produkty

- metabolizmu drobnoustrojów, istnieje więc potencjalne zagrożenie działaniem toksycznym lub genotoksycznym w przypadku kierowania ich do środowiska naturalnego.
8. W większości przypadków nie stwierdzono obecności substancji toksycznych w ściekach oczyszczonych. Negatywny wpływ odpływów na organizmy testowe obserwowano jedynie dla osadu wyhodowanego z aktywnych szczepów i osadu konwencjonalnego oczyszczających ścieki z dużą zawartością oleju napędowego. W tym czasie osady te usuwały olej ze ścieków z mniejszą skutecznością. Najbardziej wrażliwymi na działanie substancji węglowodorowych zawartych w oleju napędowym i w ściekach oczyszczonych okazała się rzęsa drobna i rozwielitka. Mniejszą wrażliwością wykazały się ryby i glony. Najbardziej odporne na działanie substancji naftowych były bakterie.
 9. Nie stwierdzono obecności związków o działaniu mutagennym w ściekach surowych i w ściekach odpływających ze wszystkich komór w wyniku badań testem Ames.

7.0. Literatura

1. S.F. Zakrzewski: Podstawy toksykologii środowiska. PWN, Warszawa 1995.
2. J.H. Duffus, J.I. Waddington et.al: Environmental toxicology. World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen 1983.
3. M. Hafner: Ochrona Środowiska. Polski Klub Ekologiczny, Kraków 1993.
4. J.R. Cooke, R.F. Haycock: Lubricant additives and environment; The Petroleum Industry Faces the Environmental Problems. Congres International Proceedings, Brussels, October 21 st-22 nd 1993.
5. R.B. Caim: Biodegradation of lubricants in Biodeterioration and biodegradation. Ed. by H.W. Rossemore, Elsevier applied science, Proceedings of the 8 th International Biodeterioration and biodegradation, Symposium, Windsor, Ontario, Canada, 26-31 August 1990.
6. E. Gomółka: Usuwanie i unieszkodliwianie zanieczyszczeń olejowych zawartych w ściekach. Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska PWr., Monografie nr 19, Wrocław 1987.
7. M. Holloway: Zaplamione brzegi. Świat Nauki (Scientific American- wyd. polskie), No.4, grudzień 1991.
8. S.Czaja: Ekologiczne skutki wojny nad Zatoką Perską. Aura 17, 1992.
9. N. Sorkhoh et. all.: Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of Rhodococcus rhodococcus isolated from soil and marine environments in Kuwait. Environmental Pollution 65, 1-17, 1989.
10. A. Spychała: Ocena szkód ekologicznych spowodowanych przez wojska Federacji Rosyjskiej. Biotechnologia 2(25), 1994.
11. J. Siuta: Podstawy biologicznego rozkładu ropopochodnych składników w glebach i odpadach. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowego: Związki ropopochodne- kryteria i metodyka oceny skażenia , Karwice 13-15 kwiecień 1994 r.
12. S. Kościelniak, A. Adamski., J. Bil., B. Hac, W. Sobczyk, M. Ulman-Bortnowska: Wskazówki metodyczne do oceny zanieczyszczenia gruntów i wód podziemnych produktami ropopochodnymi i innymi substancjami chemicznymi. Wydawnictwo TRIO, W- wa 1994.
13. W. Stelmaszczuk: Wpływ zanieczyszczeń ropą naftową na jakość wody i organizmy wodne. XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin 1991.
14. J. Hupka, S. Mydlarczyk, G. Ostrowska: odolejanie ścieków przemysłowych. Przemysł

Chemiczny 59/1, 1980.

15. H. Gurgul, W. Stochmal, W. Staroń: Wpływ wybranych czynników fizycznych na dyspergowanie i koagulację emulsji substancji ropopochodnych w wodzie. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowego: Związki ropopochodne-kryteria i metodyka oceny skażenia, Karwice 13-15 kwiecień 1994 r.
16. M. Błażejowski, K. Grocholski: Zachowanie się substancji ropopochodnych w warstwie wodonośnej. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowego: Związki ropopochodne-kryteria i metodyka oceny skażenia, Karwice 13-15 kwiecień 1994 r.
17. Th. Dracos: Immiscible transport of hydrocarbons infiltrating in unconfined aquifers. Oil in freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology. Pergamon Press, New York 1987
18. H. Gurgul, R. Kurowska-Łazarz: Koncentracja zawiesin nieorganicznych i emulsji substancji ropopochodnych w wodach zachodniej Odry. Gospodarka Wodna, nr 1, s. 7-10, 1994.
19. V.M.F. Vargas, V.E.P. Motta, J.A.P. Henriques: Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. Mutation Research 319, 31-45, 1993.
20. J.R. Grzechowiak: Chemia ropy naftowej. Politechnika Wrocławska 1987 r.
21. W. Kuczyński: Technologia chemiczna gazu ziemnego i ropy naftowej z elementami petrochemii. Cz. 1. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Poznań 1972.
22. C. Kajdas: Chemia i fizykochemia ropy naftowej WTN, W-wa, 1979.
23. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowego: Związki ropopochodne-kryteria i metodyka oceny skażenia, Karwice 13-15 kwiecień 1994 r.
24. J.L. Epler, A.A. Young, A.A. Hardigree, T.K. Rao, M.R. Guerin, J.B. Rubin, C.H. Ho, B.R. Clark: Analytical and biological analyses of test materials from the synthetic fuel technologies. Mutation Research 57, 265-276, 1978.
25. R. Samoilovich: 3,4-benzopiren pollution of the river Sunzha caused by the petrochemical industry in Grozny. Water Res., 9, 331-346, 1975.
26. T. Dudkiewicz i inni: Wielopierścieniowe węglowodory w środowisku przyrodniczym. Instytut Kształtowania Środowiska, PWN, Warszawa 1988.
27. J. Dojlido, A. Draszkiewicz, B. Słomczyńska: Acute toxicity of petrochemical wastes from mazovian refining and petrochemical plant on aquatic organisms. Archiwum Ochrony Środowiska, 1978, nr1, ss.39-56.
28. W. Wang: Toxicity testing and biomonitoring using aquatic plants. Aquaphyte 10.2.1990.
29. J.H. Vandermeulen, S.E. Hrude: Proceedings of the symposium of oil pollution in freshwater. Edmonton, Alberta, Canada. Reprinted from Oil in freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology 231-250, 1991.
30. J.H. Vandermeulen: Toxicity and sublethal effects of petroleum hydrocarbons in freshwater biota. Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology, 267-303, 1991.
31. K.C. Donnelly, K.W. Brown, B.R. Scott: Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste II Eucaryotic bioassay of wood-preserving bottom sediment. Mutation Research 180, 43-53, 1987.
32. R.L. Raymond, J.O. Hudson, V.W. Jamison: Oil degradation in soil. Applied and Environmental Microbiology 31,4, 522-535, 1976.
33. B. Barański, J. Gromiec, J. Krajewski: Biologiczne działanie olejów mineralnych. Med.Pr., 31, 135-142, 1980.
34. J. Adamiak-Zięba: Ekspozycja zawodowa na substancje rakotwórcze związana ze stosowaniem olejów mineralnych w przemyśle. Bromat. 13, 179-184, 1980.

35. A. Malczewska i inni: Substancje rakotwórcze w środowisku pracy. Tom II: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Instytut Medycyny pracy w Łodzi, Łódź 1987.
36. Health effects of exposure to diesel exhaust. National Research Council, National Academy Press, Washington D.C., 1981.
37. D.H.Goldstein, J.N.Benoit, H.A.Tyroler: An epidemiologic study of an oil mist exposure. Arch. Environ Health, 21, 600-603, 1970.
38. M. Greenberg: A proportional study of a group of newspaper workers. Br. J. Ind. Med., 29, 15-20, 1972.
39. A. Gradiski, A. Blachere, J.Vinot, D.Zissu, J.C.Limaaset, M.Lafontaine: The carcinogenic effect of a series of petroleum-derived oils on the skin of mice. Environ. Res., 1983.
40. J. Piwowarczyk, M. Demczak, E. Biber : Zagrożenie rozlewami naftowymi i sposoby ich likwidacji. Aura 1, 11-13, 1993.
41. G. Malina, A. Szczepański: Likwidacja zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi w środowisku wodno-gruntowym. Biblioteka Monitoringu Środowiska W-wa, 1994.
42. W. Walczyk, H. Mazur, W. Wichowski, W. Herman, R. Popiołkiewicz : Badania nad adsorpcyjnym oczyszczaniem wody z ropopochodnych. Gaz, Woda i Technika Sanitarna nr1 LIX, 1992.
43. M. Łebkowska: Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów ropopochodnych. Materiały konferencyjne z Międzynarodowego Sympozjum Szkoleniowego pt. Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntów i wód podziemnych. Poznań, czerwiec 1994.
44. International Workshop: Innovative Potential of Advanced Biological Systems for Remediation. Technical University Hamburg-Harburg, 1998.
45. E.L. Madsen: Determining in situ biodegradation. Environ. Sci. Technol., Vol.25, No.10, 1991.
46. K. Kotelko, L. Sedlaczek, T.M. Lachowicz : Biologia bakterii, PWN, Warszawa 1978, wydanie II.
47. R.M. Atlas: Petroleum Microbiology. Ed.; Macmillan, New York, 1984.
48. J.G. Leahy, R.R. Colwell: Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews, vol.54, No 3, 303-315, 1990.
49. A.Jobson, F.D.Cook, D.W. S. Westlake: Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. 23, 1082-1089, 1972.
50. R.J. Watkinson: Developments in Biodegradation of Hydrocarbons. Appl. Sci. Publishers, London 1978.
51. R.M..Atlas, R. Bartha: Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan Bay. Envir. Pollut. 4, 291-300, 1973.
52. D.M. Falatko, J.T. Novak: Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. Water Environmental Research 64, 2, 163-169, 1992.
53. M. Rosenberg: Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: Water interface. Critical Reviews in Microbiol. 18, 159-173, 1991.
54. M. Rosenberg, D. Gutnik, E. Rosenberg: Simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters 9, 29-33, 1980.
55. J.J. Conney: The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems in Petroleum Microbiology, Ed. Atlas R.M., Macmillan Publ. Co., New York, 399, 1984.
56. A.L. Reeves: The metabolism of foreign compounds. In: Toxicology: Principles and Practices, vol.1. Ed. Reeves, New York: John Wiley.
57. H. Kabayashi, B.E. Rittman: Microbial removal of hazardous organic compounds. Environ. Sci. Technol. 16, 3, 171A-183A, 1982.

58. D.W.S. Westlake, A. Jobson, R. Philippe, F.D. Cook: Biodegradability and crude oil composition. *Can. J. Microbiol.* 20, 915-928, 1974.
59. H.J. Rehm, I. Reiff: Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Advances in Biochemical Engineering*, 19, 1775-215, 1981.
60. L.N. Britton: Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In *Microbial degradation of organic compounds*; D.T. Gibson, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York 1984.
61. M.E. Siruger, W.R. Finnerty: Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes in *Petroleum Microbiology*, Ed. Atlas R.M., Macmillan Publ. Co., New York, 160, 1984.
62. M. Malicka: Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów ropopochodnych. Materiały konferencyjne z Międzynarodowego Sympozjum Szkoleniowego pt. Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntów i wód podziemnych. Poznań, czerwiec 1994.
63. H.G. Schlegel: *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa 1996.
64. E. Bauer, C. Pennerstorfer, P. Holuber, C. Plas, P. Braun: Microbial activity measurement in soil a comparison of methods. *Journal of Microbiological Methods* 14, 109-117, 1991.
65. P.W. Trudgill: Microbial degradation of alicyclic ring. In *Microbial degradation of organic compounds*; D.T. Gibson, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York 1984.
66. M. R. Smith: The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1, 191, 1990.
67. S. Łabużek: Biodegradacja struktury aromatycznej fenoli przez drobnoustroje. *Biotechnologia*, nr 3-4(13-14), 1991.
68. D.T. Gibson, V. Subramanian: Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In *Microbial degradation of organic compounds*; D.T. Gibson, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York 1984.
69. H. Kiyohara, K. Nagao: The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *Journal of General Microbiology* 105, 69-75, 1978.
70. B. Chmiel: *Biotechnologia. Procesy biochemiczne i mikrobiologiczne*. PWN, Warszawa 1991.
71. A.B. Shah, D.I. Angelbeck: Laboratory studies on optimization of the activated sludge process. *JWPCF*, 5, 944, 1978.
72. L. Hanel: *Biological treatment of sewage by the activated sludge process*. Ellis Horwood, Chichester, U.K., 1988.
73. G. Buraczewski: *Biotechnologia osadu czynnego*. PWN, Warszawa 1994.
74. H. Kościelniak, K. Barbusiński: Wpływ zanieczyszczeń przemysłowych na zmiany struktury osadu czynnego. Międzynarodowa Konferencja Naukowo Techniczna: Współczesne problemy gospodarki wodno – ściekowej, Koszalin-Kołobrzeg, 1997.
75. H. Kościelniak, K. Barbusiński: Badania własności osadu czynnego w warunkach skokowych przeciążeń substratowych. Materiały III Sympozjum Naukowo-Technicznego: *Biotechnologia Środowiskowa. Ustroń-Jaszowiec*, s. 83, 1995.
76. R. Kocwa-Haluch: Korzystny wpływ szczepionki z *Rhodotorula glutinis* na pracę osadu czynnego oczyszczającego ścieki koksownicze. *Politechnika Krakowska, Monografia* 110, 1991 r.
77. Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process. *Research Journal WPCF*, vol 63, no 7, pp. 950, 1991.
78. H. Bauman-Kaszuńska, B. Ciarcńska: Zastosowanie biopreparatów z własnych hodowli oraz biopreparatów handlowych-reasumacja Sympozjum. Materiały II Sympozjum Naukowego: Zastosowanie biopreparatów bakteryjnych do oczyszczania wody, ścieków i gruntu, Płock listopad 1997.
79. G. Buraczewski, E. Rataj, R. Szlachta: Zastosowanie biopreparatu bakteryjnego BIO-

- TREAT GTS(LBC) dla poprawy efektywności oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego w warunkach przeciążenia substratowego.
80. A.D. Venosa, J.R. Haines, W. Nisamanepong, R. Govind, S. Pradhan, B. Seddique: Screening commercial inocula for efficacy in stimulating oil biodegradation in closed laboratory system. *Journal of Hazardous Materials*. Vol.28, 131-134, 1991.
 81. F.G. Gaudy, E.T. Gaudy: *Microbiology for environmental scientists and engineers*. New York: McGraw-Hill, 1980.
 82. R. Mycielski, E. Bieszkiewicz, H. Boszczyk-Maleszak, K. Łopatowska : Badania nad oczyszczaniem ścieków rafineryjno-petrochemicznych prowadzone przez Zakład Mikrobiologii Środowisk Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego. „Mazowieckie Zakłady Rafineryjne i Petrochemiczne w Płocku a Środowisko” pod redakcją W. Lenarta, PAN Komitet Inżynierii Środowiska, Biuletyn nr 1, Warszawa 1985.
 83. E. Bieszkiewicz, H. Boszczyk-Maleszak, R. Mycielski: Wpływ frakcji olejowej pochodzącej ze ścieków rafineryjno-petrochemicznych na parametry procesu osadu czynnego. *Materiały II Sympozjum Naukowo-Technicznego: Biotechnologia Środowiskowa*. Ustroń-Jaszowiec.
 84. J.T. Dibble, R. Bartha: Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Envir. Microbiol.*, 37, No4, pp. 729-739, 1979.
 85. M. Pawlaczyk-Szpilowa: *Biologia i Ekologia*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997.
 86. A. Zajączkowska-Stemplowska: Wpływ wybranych związków toksycznych miedzi, niklu i kadmu na przebieg procesu oczyszczania ścieków za pomocą osadu czynnego w warunkach konwencjonalnych. *Praca doktorska, Politechnika Warszawska*, Warszawa 1969.
 87. W.N. Sziszkina, J.A. Trocenko: Swojstwa novogo sztanma Hyphomierobium ispolzujuszczego odnouglerodnyje sojedinienija. *Mikrobiologija T. XLIII Wyp.5*. s.765-770, 1974.
 88. A. Rodina: *mikrobiologiczne metody badania wód*. PWRiL W-wa, 1968.
 89. M. Pawlaczyk-Szpilowa : *Ćwiczenia z mikrobiologii wody i ścieków*. PWN, Warszawa 1980.
 90. E. Kocwowa: *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej*, PWN Warszawa, 1984.
 91. W. Kędzia: *Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie*, PZWL, Warszawa 1990.
 92. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, Eight Edition Buchanan R.E. and Gibbons N.E. the Wilkins Company 1974.
 93. PN-78/C-04573/ 01, Woda i ścieki. Badania zawartości substancji ekstrahujących się rozpuszczalnikami organicznymi. Oznaczanie całkowitej zawartości substancji organicznych ekstrahujących się eterem naftowym, metodą wagową.
 94. H. Sztajer, E. Zboińska: *Metody badawcze w mikrobiologii technicznej*. Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1989.
 95. E. Gomółka, E. Biały: *Urządzenie do laboratoryjnych badań osadu czynnego*. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, nr 1, tom XLV, luty 1971.
 96. E. Gomółka: *Urządzenie do fizykochemicznego oczyszczania wody i ścieków*. Patent nr 119207, 1983.
 97. W. Brzeski, Z. Kaniuga: *Praktikum z biochemii*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1968.
 98. M. Hul : *Biologiczne kryteria oceny osadu czynnego*. *Człowiek i Środowisko*, 10(2), 1986
 99. H. Klimowicz : *Znaczenie mikrofauny przy oczyszczaniu ścieków osadem czynnym*. Instytut Kształtowania Środowiska, Warszawa 1983.
 100. D.H. Eikelboom, H.J.J. van Buijsen: *Podręcznik mikroskopowego badania osadu czynnego*. Wydanie pierwsze. Wydawnictwo Seidel-Przywecki sp. z.o.o. Szczecin, 1998.
 101. M.G. Richard: *Activated sludge microbiology*. Published by The Water Pollution

- Control Federation, Alexandria, Virginia 1989.
102. Z. Kańska, M. Łebkowska : Badania toksykologiczne dla kontroli jakości wód. *Biotechnologia* 2(25) 1994.
 103. G.Bitton, J.B. Dutka : Toxicity Testing Using Microorganisms. CrC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1986.
 104. B. N. Ames, J. Mc Cann, E. Yamashi: Methods for detecting carcinoges and mutagens with Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364, 1975.
 105. A. Solski i inni: Metodyka biotoksykologiczna w środowisku wodnym. Maszynopis. Prace IMGW oddz. Wrocław.
 106. J. Wardas i inni. Toksyczność wybranych węglowodorów względem glonów Chlorella w hodowlach laboratoryjnych. *Roczniki PZH*, 37, 6, 1, 1987.
 107. Polska Norma- PN-90/ C-04610/ 03. Woda i ścieki. Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczanie toksyczności ostrej na rozwielitce dużej (*Daphnia magna*).
 108. Polska Norma- PN-90/C-04610/ 04. Woda i ścieki. Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczanie toksyczności ostrej na gupiku (*Lebistes reticulatus*).
 109. D. M. Maron, B.N. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat.Res.*,113,173-215, 1983.
 110. W. Hermanowicz i inni: Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1976.
 111. P.E. Jorgensen, T. Eriksen, B.K. Jensen: Estimation of viable in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utylization rate and FDA hydrolysis. *Wat. Res.* vol 26, no.11, pp 1495-1501, 1992.
 112. A. Klapwijk, J. Drent, J.H.A. Steenvoorden : A modified procedure for the TTC- dehydrogenasa test in activated sludge. *Water Research*, No. 8, pp. 121-125, 1974.
 113. J.O.H. Lawry, N.J. Rosenbrough, A.L. Fari, R.J. Randall : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
 114. Polska Norma-PN-94/ C-04643. Oznaczanie sumy węglowodorów C₇-C₃₀ metodą chromatografii gazowej.
 115. Polska Norma-PN-89/ C-04577. Badania zawartości węglowodorów aromatycznych. Oznaczanie benzenu, m-ksylenu, p-ksylenu, o-ksylenu oraz styrenu metodą Chromatografii gazowej.
 116. Origin User's Manual Version 4.1., ed. Microcal Software, Inc., 1997.
 117. J.Greń: Modele i zadania statystyki matematycznej. PWN, Warszawa 1970.
 - 118.K. Zając: Zarys metod statystycznych. PWE, Warszawa 1988.
 119. B. Kołwzan, A. Czarny: Bioindication of diesel oil microbial degradation. Process in Towards hybrid membrane and biotechnology solutions for polish environmental problems. Ed. Howell J.A., Noworyta A., Wrocław 1995.
 120. O.David Cooney: Adsorption design for wastewater treatment. Boca Raton: Lewis Publ. 1998.

8.0. Spis schematów, rysunków i tabel

Schematy:

1. Destylacyjna przeróbka ropy naftowej

Rysunki:

1. Biodegradacja węglowodorów alifatycznych
2. Rozkład alkanów przez terminalną oksydację przy współudziale monooksygenazy oraz przez β -oksydację do acetylo-CoA
3. Mikrobiologiczny rozkład n-alkilocykloalkanów, kwasu cykloheksylomasłowego i kwasu cykloheksylomasłowego
4. Wstępne reakcje utleniania pierścienia aromatycznego przez bakterie
5. Mikrobiologiczny rozkład benzenu
6. Mikrobiologiczny rozkład fenolu
7. Rozszczepienie orto- pierścienia aromatycznego
8. Rozszczepienie meta- pierścienia aromatycznego
9. Schemat modelu badawczego
10. Schemat wykonania testu Ames
11. Wzrost szczepu z rodzaju *Candida* 22 na podłożu mineralnym z dodatkiem różnych stężeń oleju napędowego
12. Wzrost szczepu z rodzaju *Corynebacterium* 25 na podłożu mineralnym z dodatkiem różnych stężeń oleju napędowego
13. Wzrost szczepu z rodzaju *Corynebacterium* 57 na podłożu mineralnym z dodatkiem różnych stężeń oleju napędowego
14. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny w obecności 200 i 400 mg/dm³ oleju napędowego, jako jedyne źródła węgla i energii.
15. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny w obecności 600 i 800 mg/dm³ oleju napędowego, jako jedyne źródła węgla i energii.
16. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny doszczepiany w obecności 200 i 400 mg/dm³ oleju napędowego, jako jedyne źródła węgla i energii.
17. Intensywność wykorzystywania tlenu przez osad czynny doszczepiany w obecności 600 i 800 mg/dm³ oleju napędowego, jako jedyne źródła węgla i energii.
18. Skład komór napowietrzania
19. Wartości BZT₅ w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (1 seria)
20. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (1 seria)
21. Wyniki badań chromatografii gazowej i cieczowej oleju napędowego.
22. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory I po 14, 25 i 38 dniach badań (1 seria)
23. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 14, 25 i 38 dniach badań (1 seria)
24. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory III po 14, 25 i 38 dniach badań (1 seria)
25. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (1 seria)
26. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (1 seria)
27. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (1 seria)

28. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (1 seria)
29. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływających w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm³ (1 seria badań)
30. Wartości BZT₅ w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (2 seria)
31. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (2 seria)
32. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory I po 20, 38 i 60 dniach badań (2 seria)
33. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 20, 38 i 60 dniach badań (2 seria)
34. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory III po 20, 38 i 60 dniach badań (2 seria)
35. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (2 seria)
36. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (2 seria)
37. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (2 seria)
38. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (2 seria)
39. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływających w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm³ (2 seria)
40. Wartości BZT₅ w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (3 seria)
41. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (3 seria)
42. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory I po 20, 38 i 60 dniach badań (3 seria)
43. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 20, 38 i 60 dniach badań (3 seria)
44. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory III po 20, 38 i 60 dniach badań (3 seria)
45. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (3 seria)
46. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (3 seria)
47. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (3 seria)
48. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (3 seria)
49. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływających w odpływach z poszczególnych komór w 1 cm³ (3 seria)
50. Wartości BZT₅ w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (4 seria)
51. Wartości ChZT w przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne (4 seria)
52. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory I po 5, 16 i 40 dniach badań (4 seria)
53. Chromatografia gazowa i cieczowa odpływów z komory II po 5, 16 i 40 dniach badań (4 seria)

54. Chromatografia gazowa i cieczowa odpliwów z komory III po 5, 16 i 40 dniach badań (4 seria)
55. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (4 seria)
56. Zmiany aktywności dehydrogenazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (4 seria)
57. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na suchą masę (4 seria)
58. Zmiany aktywności esterazowej osadów czynnych w przeliczeniu na zawartość białka (4 seria)
59. Zmiany ogólnej liczby bakterii wolnopływających w odpliwach z poszczególnych komór w 1 cm^3 (4 seria)
60. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań BZT₅ w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego
61. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań ChZT w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego
62. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań ekstraktu eterowego w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego
63. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań chromatograficznych w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego
64. Stopień usuwania oleju napędowego w % na podstawie badań OWO w funkcji prawdopodobieństwa skumulowanego
65. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego konwencjonalnego na podstawie badań ekstraktu eterowego
66. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego doszczepianego na podstawie badań ekstraktu eterowego
67. Zmiany wartości BZT₅ płynów pochodowlanych podczas kontaktu biomasy osadów czynnych z olejem napędowym
68. Krzywe adsorpcji zanieczyszczeń olejowych
69. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z biomasy osadu czynnego konwencjonalnego po 2, 10, 24 i 120 godzinach badań.
70. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z cieczy nadosadowej osadu czynnego konwencjonalnego po 2, 10, 24 i 120 godzinach badań.
71. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z biomasy osadu czynnego doszczepianego po 2, 10, 24 i 120 godzinach badań.
72. Chromatografia gazowa i cieczowa ekstraktów z cieczy nadosadowej osadu czynnego doszczepianego po 2, 10, 24 i 120 godzinach badań.

Tabele:

1. Badane cechy identyfikacyjne mikroorganizmów
1. Charakterystyka genetyczna szczepów stosowanych w teście Ames
2. Przynależność rodzajowa badanych szczepów
3. Ocena wzrostu wyizolowanych szczepów na podłożu mineralnym Siskinej-Trocenko z dodatkiem ropy naftowej i jej produktów
4. Ubytek oleju napędowego w 21 dniowych hodowlach poszczególnych szczepów drobnoustrojów
5. Wzrost drobnoustrojów na podłożu mineralnym z dodatkiem 1g oleju napędowego / 100cm^3
6. Wzrost drobnoustrojów na podłożu mineralnym z dodatkiem 5g oleju napędowego / 100cm^3

7. Wzrost drobnoustrojów na podłożu mineralnym z dodatkiem 10g oleju napędowego /100cm³
8. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (1 seria)
9. Różnice w usuwaniu oleju napędowego, mierzone na podstawie badań ekstraktu eterowego, chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (1 seria)
10. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań BZT₅ i ChZT, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (1 seria badań)
11. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (2 seria)
12. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań BZT₅, ChZT i ekstraktu eterowego przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (2 seria)
13. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (2 seria)
14. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (3 seria)
15. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań BZT₅, ChZT i ekstraktu eterowego, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (3 seria)
16. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań, chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (3 seria)
17. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (4 seria)
18. Parametry biotechnologiczne stosowane podczas biodegradacji oleju napędowego przez osad czynny (4 seria c.d.)
19. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań BZT₅, ChZT i ekstraktu eterowego, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (4 seria badań)
20. Różnice w usuwaniu zanieczyszczeń, mierzone na podstawie badań, chromatografii gazowej i ogólnego węgla organicznego, przez osad czynny (0.I.), przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów od podstaw (0.II) i przez osad czynny doszczepiany aktywnymi szczepami (0.III.) (4 seria badań)
21. Procentowe obniżenie zawartości oleju napędowego w czasie biodegradacji przez osad czynny I, przez osad czynny wyhodowany z aktywnych szczepów II i przez osad czynny doszczepiany III.
22. Zestawienie parametrów statystycznych
23. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasa osadu czynnego konwencjonalnego na podstawie badań ekstraktu eterowego

24. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego doszczepianego na podstawie badań ekstraktu eterowego
25. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego konwencjonalnego na podstawie badań chromatograficznych
26. Zmiany zawartości oleju napędowego w trakcie jego kontaktu z biomasą osadu czynnego doszczepianego na podstawie badań chromatograficznych
27. Wpływ oleju napędowego na rozwój *Lemna minor* (1)
28. Wpływ oleju napędowego na rozwój *Lemna minor* (2)
29. Zmiany zawartości chlorofilu a i b u *Lemna minor* w obecności różnych stężeń emulsji oleju napędowego
30. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzanego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (1 seria)
31. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzanego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (2 seria)
32. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzanego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (3 seria)
33. Wyniki badań testu toksykologicznego na rzęsie *Lemna minor* przeprowadzanego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (4 seria)
34. Wpływ oleju napędowego na glony *Chlorella sp.*
35. Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie *Chlorella sp.* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (1 seria)
36. Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie *Chlorella sp.* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (2 seria)
37. Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie *Chlorella sp.* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (3 seria)
38. Wyniki badań testu toksykologicznego na glonie *Chlorella sp.* przeprowadzonego na ściekach odpływających z poszczególnych komór (4 seria)
39. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w różnych stężeniach oleju napędowego
40. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w różnych stężeniach oleju napędowego
41. Wartości LC₅₀ oleju napędowego uzyskane w różnym czasie ekspozycji rozwielitek i gupików
42. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (1 seria)
43. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (1 seria)
44. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (2 seria)
45. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (2 seria)
46. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (3 seria)
47. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (3 seria)
48. Śmiertelność rozwielitek testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (4 seria)
49. Śmiertelność ryb testowanych w różnym czasie ekspozycji w odpływach z poszczególnych komór (4 seria)
50. Wyniki testu Ames dla oleju napędowego

51. Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Ames dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (1 seria)
52. Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Ames dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (2 seria)
53. Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Ames dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (3 seria)
54. Wartości współczynnika mutagenności uzyskane metodą Ames dla ścieków odpływających z poszczególnych komór osadu czynnego (4 seria)
56. Wydajność procesu biodegradacji oleju napędowego przez badane osady czynne

9.0. Lista odbiorców

1. Promotor	1 egz.
2. Recenzenci	2 egz.
3. Biblioteka Główna PWr	1 egz.
4. Biblioteka I-15	1 egz.
5. Autor	1 egz.

Razem	6 egz.
--------------	---------------

JEDN. ARCHIWIZUJĄCA			ROK ARCH.		KOD ARCH.	NR ARCH.			RODZAJ	DONA
I	1	5	9	9	P	0	1	9	N	
Zas	CHP	Roz	Pdd	Rok Zal.		Data zdokumentowania				
N	S	7	N							
CPBR / GRANT				Nr Kierunku Badań				Nr Zlecenia		
				15001						
Kody Inst. (Kat. Zakt. ...)				Kody Wydziałów				Klasyfikacja APIN		
T15				W07				1002 1017		
Opis bibliograficzny										
335620 Piekarska, Katarzyna										
Wpływ mikrobiologicznej modyfikacji osadu czynnego na proces biodegradacji oleju napędowego w ściekach. Raporty Inst. Inż. Ochr. Śr. PWroc. 1999 Ser. PRE nr 19, 167 s. 3 rys. 56 tab. 70 wyk. bibliogr. 120 poz. maszyn. Rozprawa doktorska Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Wrocław. Promotor: prof. dr hab. 047522 Pawlaczyk-Szpilowa, Maria										

c.d. opis bibliograficzny (uwagi)

Analiza

Przedstawiono wyniki badań nad zwiększeniem efektywności biologicznego oczyszczania ścieków z zawartością oleju napędowego poprzez działania modyfikujące skład mikrobiologiczny osadu czynnego. Podjęto próbę wyjaśnienia biosorpcji oleju na powierzchni osadu czynnego. Przeprowadzono testy bioindykacyjne na ściekach oczyszczonych. Enzymatyczny rozkład oleju zachodził w szerokim zakresie stężeń- od 2000 do 31000 mg/dm sześć. Znacznie lepsze wyniki uzyskano stosując osad czynny modyfikowany. Doszczepianie osadu aktywnymi drobnoustrojami limitowało proces biosorpcji na kłaczkach. W większości przypadków nie stwierdzono obecności substancji toksycznych i genotoksycznych.

AUTOR ANALIZY: Katarzyna Piekarska

PODPIS:

Słowa kluczowe

osad czynny, aktywne szczepy bakterii, szczepionka mikrobiologiczna, olej napędowy, biodegradacja, biosorpcja, bioindykacja.

Podpisy i potwierdzenia

WYPEŁNIA INSTYTUT		WYPEŁNIA BIBLIOTEKA GŁÓWNA I OINT	
Redaktor naukowy	Asyst. ds badań nauk.	Zgłoszenie uzupełnień	Przyjęcie karty