

BIOLOŠKA OKSIDACIJA KREZOLA S POMOCU CISTIHI I MJEŠOVITIH BAKTERIJSKIH KULTURA

VIŠNJA ŠTRELOV, MARIJA SAUER I VERA JOHANIDES

Laboratorij za tehničku mikrobiologiju, Tehnološki fakultet, Zagreb

Fenoli i krezoli u otpadnim vodama kemijske industrije neugodno su onečišćenje jer se teško razgrađuju biološkim putem s obzirom na to što su toksični za većinu mikroorganizama. Neke bakterijske vrste mogu rasti u vodama gdje su fenoli i krezoli jedini izvori ugljika, ali potrebno je ispitati njihovu toleranciju prema tim spojevima kao i kinetiku te biooksidacije. U toku proučavanja biološke oksidacije ustanovljeno je da položaj supstituenata u pojedinim krezolima utječe na rast odabranih bakterija odnosno na kinetiku razgradnje orto, meta i para-krezola. Dvije bakterijske vrste (*Pseudomonas aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes sp.*) izolirane iz otpadnih voda brže su oksidirale o-krezol, dok je mješovita bakterijska kultura (koja se sastojala od četiri različite vrste) brže oksidirala p-krezol.

Obrada industrijskih otpadnih voda, koje sadržavaju toksične tvari, npr. fenole i krezole, vrlo je složena. Otrovnost tvari u otpadnoj vodi uvjetuju poremećaj biološke ravnoteže vodnih tokova u koje se ispuštaju.

S obzirom na to što se fenol i krezoli teško razgrađuju biološkim putem zbog svoje toksičnosti za većinu mikroorganizama, teško ih je odstraniti u procesima pročišćavanja otpadnih voda. Otrovnost krezola za mikroorganizme veća je od otrovnosti fenola, pa i neznatno povećanje koncentracije krezola u otpadnoj vodi može uništiti mikrofloru. Zbog toga je za uspješnu obradu fenolnih otpadnih voda važno izdvojiti mikroorganizme s visokom biokemijskom aktivnošću oksidacije krezola.

Fenolne otpadne vode iz kemijskih industrija uz fenol sadržavaju najčešće orto, meta i para-krezol. Mehanizam razgradnje ovih spojeva s pomoću mikroorganizama dobro je proučen, ali je ispitivanje utjecaja strukture različitih aromatskih spojeva na rast mikroorganizama nedovoljno. Na primjeru biološke razgradnje krezola može se uočiti utjecaj položaja supstituenata na prstenu. *Kramer i Doetsch* (1) ustanovili su da mikroorganizmi najbolje razgrađuju para-krezol, a orto i meta-krezol razgrađuju slabije.

Chambers (2) i *Jurovskaja* (3) upozorili su na visoku specifičnost razgradnje aromatskih spojeva s pomoću mikroorganizama. Adicija supstituenata ili uklapanje jednostavnih radikala u aromatski spoj znatno utječe na njihovu razgradnju s pomoću mikroorganizama.

S pomoću odabranih mikroorganizama može se razgraditi 1000 mg/l krezola, što zavisi od strukture samoga spoja, ekoloških faktora te interakcije mikroorganizama u mješovitoj kulturi.

Od parametara koji utječu na biološku oksidaciju krezola s pomoću bakterija ispitali smo: utjecaj položaja supstituenata, orto, meta i para-krezola, te dodatak vitamina B kompleksa mineralnoj podlozi na brzinu razgradnje krezola.

Većina mikrobioloških procesa u prirodi odvija se s mješovitim kulturama, te se takve kulture primjenjuju pri obradi fenolnih otpadnih voda. Podaci o interakciji i ekologiji pojedinačnih sojeva, te mehanizmi djelovanja takvog sistema vrlo su oskudni (4).

Ispitali smo razgradnju orto, meta i para-krezola s većim brojem čistih bakterijskih kultura. Najbolje sojeve odabrale smo za proučavanje parametara pri razgradnji krezola.

U drugoj seriji pokusa ispitali smo razgradnju krezola mješovitom kulturom bakterija i usporedile s rezultatima što su ih dale čiste bakterijske kulture.

Pokusi što smo ih provele u ovom radu izvršeni su na model sistema, gdje je jedini izvor ugljika bio orto, meta i para-krezol. Kako industrijske otpadne vode uz različite krezole sadržavaju i druge fenolne spojeve, zanimljivo je ispitati biološku razgradnju takvih voda, što je bio predmet ovih ispitivanja.

MATERIJALI I METODE

Bakterije koje razgrađuju krezol izolirale smo iz fenolnih otpadnih voda, mulja iz gradske kanalizacije te stajskog gnoja, standardnim mikrobiološkim postupcima.

U toku izolacije i daljnjim pokusima koristile smo se mineralnom podlogom prema *Grayu* i *Thorntonu* (5), uz dodatak krezola kao jedinog izvora ugljika u količini od 1000 mg/l. Temperatura uzgoja bila je 28°C i 34°C. Promjene biomase tokom submerznog uzgoja bakterija pratile smo mjerenjem ekstinkcije, a potrošnju krezola metodom tankoslojne kromatografije.

REZULTATI I TUMAČENJA

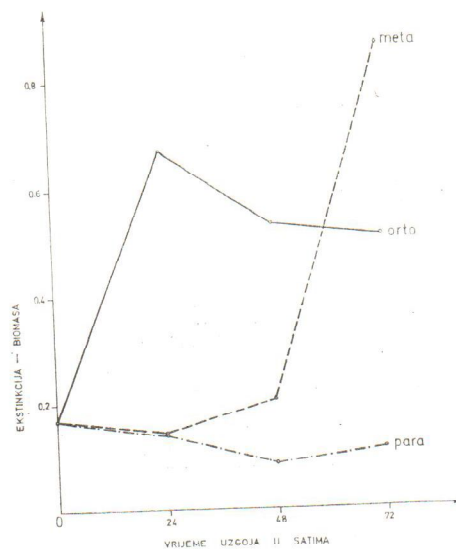
Izolirale smo 24 bakterijska soja od kojih smo 12 ispitali u submerznom uzgoju, jer su pokazali vrlo dobar površinski rast na mineralnoj podlozi uz dodatak para-krezola.

Bakterijske sojeve koji su najjače razgrađivali krezol determinirale smo i odabrale za daljnja ispitivanja. Najbolju razgradnju pokazali su sojevi *Pseudomonas aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes* sp. 3035.

Tablica 1

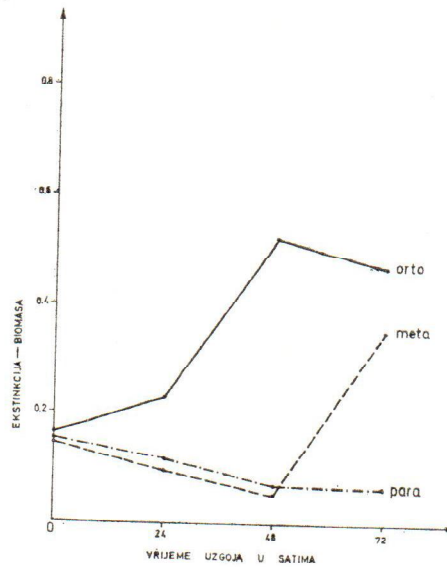
Utjecaj položaja supstituenata orto, meta i para-krezola na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja bakterija *P. aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes* sp. 3035

| Krezol | Oznaka soja | Ekstinkcija Vrijeme uzgoja (sati) | | | |
|--------|-----------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Orto | <i>Alcaligenes</i> sp. 3035 | 0,166 | 0,675 | 0,535 | 0,513 |
| | <i>P. aeruginosa</i> 3005 | 0,166 | 0,229 | 0,522 | 0,471 |
| Meta | <i>Alcaligenes</i> sp. 3035 | 0,169 | 0,145 | 0,204 | 0,862 |
| | <i>P. aeruginosa</i> 3005 | 0,143 | 0,097 | 0,058 | 0,361 |
| Para | <i>Alcaligenes</i> sp. 3035 | 0,169 | 0,139 | 0,085 | 0,111 |
| | <i>P. aeruginosa</i> 3005 | 0,151 | 0,119 | 0,068 | 0,067 |



Sl. 1. Utjecaj položaja supstituenata orto, meta i para-krezola na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja bakterije *Alcaligenes* sp. 3035

Rezultati ispitivanja razgradnje orto, meta i parakrezola odabranim sojevima prikazani u tablici 1 i slikama 1 i 2 pokazuju da se najbrže oksidirao orto-krezol. Dobiveni rezultati su u suprotnosti s podacima *Kramer* i *Doetscha* (1) prema kojima se najbrže oksidirao para-krezol. Međutim, iz rezultata se može vidjeti da oksidacija meta krezola teče uspješno tek nakon 48 sati što upućuje na to da je to vrijeme potrebno za indukciju enzima.



Sl. 2. Utjecaj položaja supstituenata orto, meta i para-krezola na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja bakterije *P. aeruginosa* 3005

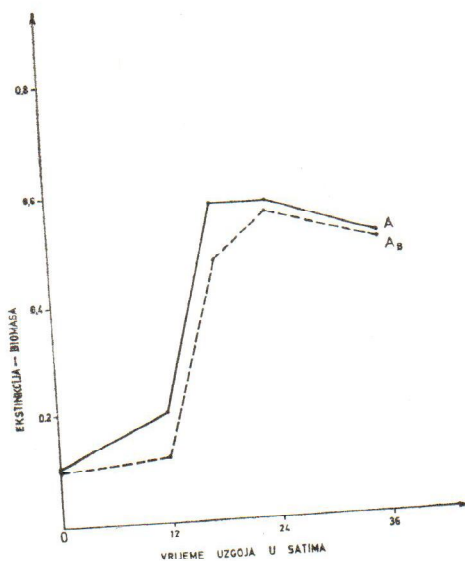
Tablica 2

Utjecaj dodatka vitamina B kompleksa na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes sp. 3035* (A , 3005 — bez dodatka vitamina; A_B 3005_B uz dodatak vitamina)

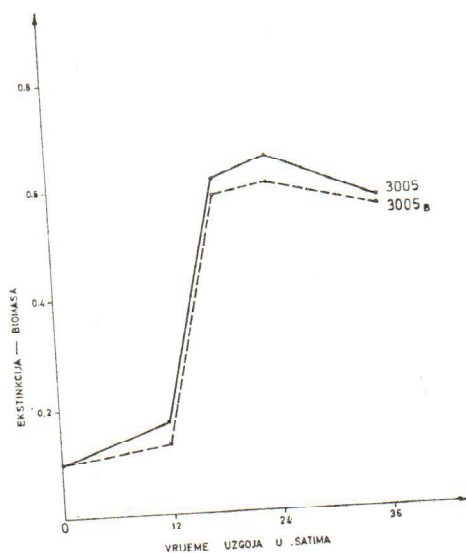
| Oznaka soja | Ekstinkcija | | | | |
|--|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | Vrijeme uzgoja (sati) | | | | |
| | 0 | 12 | 18 | 24 | 36 |
| <i>Alcaligenes sp. 3035</i> (A) | 0,104 | 0,197 | 0,580 | 0,580 | 0,516 |
| <i>Alcaligenes sp. 3035</i> (A_B) | 0,097 | 0,119 | 0,473 | 0,560 | 0,501 |
| <i>P. aeruginosa</i> 3005 | 0,100 | 0,171 | 0,616 | 0,654 | 0,570 |
| <i>P. aeruginosa</i> 3005 _B | 0,100 | 0,132 | 0,586 | 0,602 | 0,557 |

Iz rezultata prikazanih u tablici 2 i slikama 3 i 4 vidi se da dodatak vitamina B kompleksa mineralnoj podlozi nije ubrzao razgradnju krezola ispitanim bakterijskim sojevima.

U drugoj seriji pokusa provele smo ista ispitivanja s mješovitom kulturom bakterija, koja je sastavljena od četiri različite bakterijske vrste iz rodova: *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Corynebacterium* i *Staphylococcus*.



Sl. 3. Utjecaj dodatka vitamina B kompleksa mineralnoj podlozi s orto-krezolom na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja bakterije *Alcaligenes sp.* 3035 (A — bez dodatka vitamina; A_B — uz dodatak vitamina)

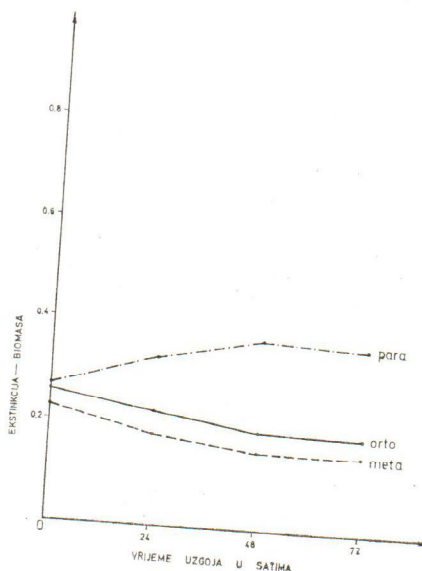


Sl. 4. Utjecaj dodatka vitamina B kompleksa mineralnoj podlozi s orto-krezolom na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja bakterije *P. aeruginosa* 3005 (3005 — bez dodatka vitamina i 3005_B — uz dodatak vitamina)

Tablica 3

Utjecaj položaja supstituenata orto, meta i para-krezola na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja mješovite kulture bakterija

| Vrijeme uzgoja (sati) | Ekstinkcija | | |
|-----------------------|-------------|-------|-------------|
| | orto | meta | para-krezol |
| 0 | | | |
| 24 | 0,260 | 0,229 | 0,276 |
| 48 | 0,225 | 0,179 | 0,331 |
| 72 | 0,190 | 0,152 | 0,373 |
| | 0,185 | 0,153 | 0,360 |

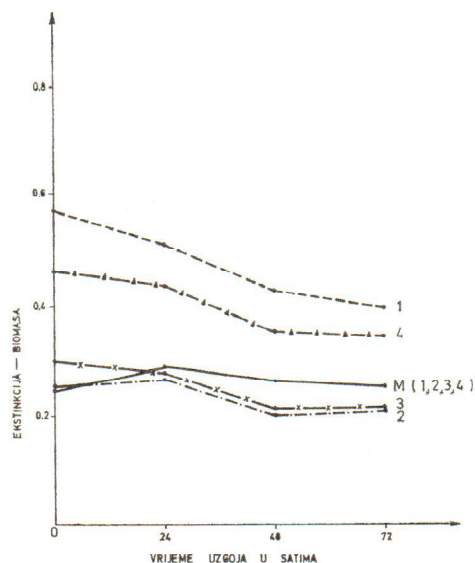


Sl. 5. *Utjecaj položaja supstituenata orto, meta i para-krezola na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja mješovite kulture bakterija*

Kao što se iz ovih rezultata vidi, nešto bolja razgradnja postignuta je s para-krezolom.

Da bismo usporedile aktivnost razgradnje krezola mješovitom bakterijskom kulturom i pojedinačnim članovima te kulture provele smo pokus submerznog uzgoja u mineralnoj podlozi s para-krezolom.

Međusobni odnos pojedinačnih članova tokom submerznog uzgoja nije se mijenjao. Iz rezultata prikazanih na slici 6 može se zaključiti da mješovita kultura vrlo slabo raste na krezolu. Pojedinačni članovi polako ugibaju ako je jedini izvor ugljika krezol.



Sl. 6. Promjena biomase u toku submerznog uzgoja mješovite kulture bakterije (M) i pojedinačnih članova (1, 2, 3 i 4) u mineralnoj podlozi s para-krezolom kao jedinim izvorom ugljika

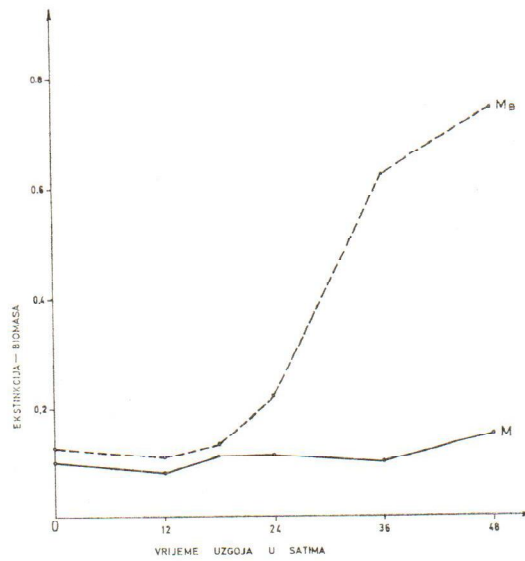
Premda rezultati rada s ovom mješovitom kulturom nisu biti povoljni, ipak smo ispitale kako djeluje dodatak vitamina B-kompleksa na brzinu razgradnje krezola tom mješovitom kulturom. Izvršile smo pokuse pri temperaturi uzgoja 28°C i 34°C.

Tablica 5

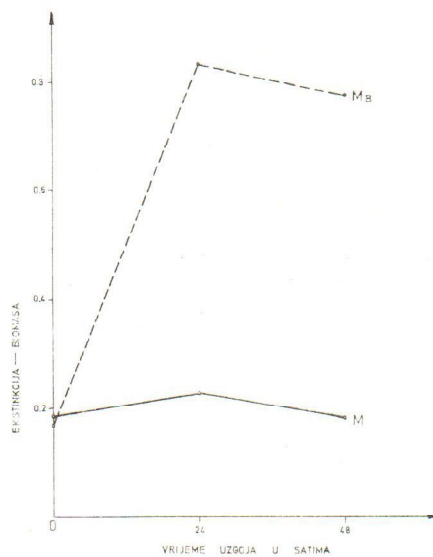
Utjecaj dodatka vitamina B-kompleksa mineralnoj podlozi na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja mješovite kulture bakterija pri temperaturi uzgoja od 28° i 34° C (M — bez dodatka vitamina; M_B — uz dodatak vitamina)

| Temperatura uzgoja | Oznaka soja | Ekstinkcija | | | | | |
|--------------------|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Vrijeme uzgoja (sati) | | | | | |
| | | 0 | 12 | 18 | 24 | 36 | 48 |
| 28° C | M | 0,100 | 0,082 | 0,111 | 0,115 | 0,105 | 0,150 |
| | M _B | 0,126 | 0,109 | 0,135 | 0,223 | 0,624 | 0,740 |
| 34° C | M | 0,185 | | | 0,229 | | 0,181 |
| | M _B | 0,170 | | | 0,834 | | 0,775 |

Kromatografski smo ustanovile da se sav krezol oksidirao nakon 48 sati, kad je temperatura uzgoja bila 28°C. Međutim, pri temperaturi uzgoja od 34°C sav krezol oksidirao je već nakon 24 sata.



Sl. 7. Utjecaj dodatka vitamina B-kompleksa mineralnoj podlozi s para-krezolom na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja mješovite kulture bakterija pri temperaturi uzgoja od 28° C



Sl. 8. Utjecaj dodatka vitamina B-kompleksa mineralnoj podlozi s para-krezolom na promjenu biomase u toku submerznog uzgoja mješovite kulture bakterija pri temperaturi uzgoja od 34° C

Dodatak vitamina mješovitoj kulturi bakterija vrlo povoljno utječe na brzinu razgradnje krezola.

Djelovanje dodatka vitamina B-kompleksa ispitano je zato što su ti vitamini sastavni dijelovi nekih koenzima značajnih u bakterijskom metabolizmu.

Pregled rezultata ovih pokusa:

1 — Iz različitih staništa izolirana su 24 bakterijska soja. U submerznom uzgoju ispitano je 12 i najbolje su oksidirali krezole sojevi bakterija *Pseudomonas aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes* sp. 3035 te mješovita kultura sastavljena od četiri različite bakterijske vrste koje pripadaju rodovima: *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Corynebacterium* i *Staphylococcus*.

2 — Ispitivanjem utjecaja položaja supstituenata orto, meta i para-krezola na rast odabranih sojeva ustanovljeno je da čiste bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes* sp. 3035 najbolje oksidiraju orto-krezol, dok je mješovita kultura pokazala nešto bolju oksidaciju parakrezola.

3 — Sve bakterijske kulture trebaju određeno vrijeme (12—14 sati) da induciraju enzime potrebne pri oksidaciji krezola.

4 — Bakterije *Pseudomonas aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes* sp. 3035 relativno brzo oksidiraju orto-krezol, tek nakon 48 sati meta-krezol, dok para-krezol ne mogu oksidirati.

5 — Dodatak vitamina B-kompleksa mješovitoj kulturi bakterija utjecao je vrlo povoljno na brzinu oksidacije parakrezola, dok isti nije utjecao na brzinu oksidacije krezola s čistim bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* 3005 i *Alcaligenes* sp. 3035.

Literatura

1. Kramer, N., Doetsch, R. H.: Arch. Biochem. Biophys., 26 (1950) 401.
2. Chambers, W. C., Tabak, H. H., Kapler, W. P.: J. Water Polut. Contr. Fed., 35 (1963) 1517.
3. Jurovskaia, E. M., Botvinova, L. E., Jerusalimskaja, L. F.: Mikrobiologija, 4 (1968) 655.
4. Prakasman, T. B. S., Dondero, N. C.: Appl. Microbiol., 19 (1970) 633.
5. Gray, P. H. H., Thornton, H. G.: Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 2., 73 (1928) 74.

Summary

BIOLOGICAL OXIDATION OF CRESOL WITH SINGLE AND MIXED BACTERIAL CULTURES

Phenols and cresols are toxic in low concentrations and must be removed from waste waters. A variety of bacteria can use phenolic substances as a sole carbon source, but the ability to oxidize cresols concerns the substitution position of the substance. In the present study the bacterial oxidation of

ortho, meta and para-cresols was studied. Two bacterial strains isolated from phenolic waste waters (*Pseudomonas aeruginosa* 3005 and *Alcaligenes sp.*) were more efficient in o-cresol oxidation; a mixed bacterial culture (four different strains) oxidized better p-cresol.

Faculty of Technology, University of Zagreb, Zagreb