ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

Nr 64 Inżynieria Sanitarn z.4 1962

H.PETRYCKA, K.KLUCZYCKI

CHARAKTERYSTYKA I AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH WYDZIELONYCH Z OSADU CZYNNEGO

z Katedry Biologii Sanitarnej Pol.Sl.[x)]

Wstęp

Jednym z bardzo ważnych zagadnień w procesach biologicznego oczyszczania ścieków przemysłowych, a w szczególności ścieków fenolowych jest bliższe poznanie ich mikroflory, jako też jej działalności biochemicznej. W szczególności chodzi tu o opanowanie procesu szybkiego i efektywnego rozkładu związków fenolowych przez mikroorganizmy.

Pierwsze prace dotyczące rozkładu fenoli przez bakterie pochodzą z początku XX wieku. Z prac nowszych zasługują na uwagę prace Czekanowskiego i Skarżyńskiego (1946, 1948), którzy wyhodowali z gleby szczepy bakterii z rodzaju Achromobacter, mające zdolność wykorzystywania fenoli jedno-, dwu- i trójwodorotlenowych, jako jedynego źródła węgla. Również Bringmann (1954 i 1955), oraz Meissner (1955) pracowali nad mikroorganizmami rozkładającymi fenole w ściekach przemysłowych. Jegorowa (1946) wyhodowała z osadu czynnego bakterie termofilne rozkładające fenole do dwutlenku węgla w temperaturze 55-60°C. Autorka zaznacza, że wyhodowane bakterie termofilne rozkładają fenole pięć razy szybciej aniżeli podobne bakterie mezofilne. Putilina (1952, 1959 a i b) otrzymała czyste kultury pewnych mezofilnych- niechorobotwórczych bakterii z gleby, a rozkładających fenole w ściekach. Wyizolowane przez autorkę kultury znalazły zastosowanie w biologicznym oczyszczaniu ścieków

x) Praca powyższa była częściowo finansowana przez Komitet Mikrobiologiczny PAN.

fenolowych na skalę techniczną, dając w końcowym efekcie oczyszczania bardzo dobre wyniki. Dziesięcioletnie przechowywanie tych bakterii na pożywkach fenolowych wykazało wyraźne zmiany cech morfologicznych i fizjologicznych powyższych szczepów, co potwierdza również nasza obserwacja w tym kierunku.

Z polskich prac wymienić należy pracę Kluczyckiego i Petryckiej (1962) obejmującą charakterystykę mikroflory złóż zraszanych ściekami fenolowymi, dalej pracę Karaskiewicza i Margiela (1959), którzy badali spadek fenoli i krezoli w ściekach przemysłu naftowego na złożach zraszanych, zaszczepionych uprzednio mikroorganizmami zdolnymi rozkładać powyższe związki, jako też Zdybiewskiej (1961), która przeprowadziła charakterystykę drobnoustrojów występujących w błonce biologicznej złóż zraszanych ożywionych ściekami miejskimi, a zasilanych następnie ściekami fenolowymi.

Badania własne

Zadaniem niniejszej pracy było wyizolowanie szczepów czystych kultur bakterii z osadu czynnego otrzymanego ze ścieków fenolowych, oznaczenie ich własności morfologicznych i fizjologicznych, jako też zbadanie ich zdolności rozkładu fenoli oraz możliwości przystosowania się do rosnących ich stężeń. Dalszym zadaniem było oznaczenie czasu potrzebnego bakteriom dla rozłożenia fenoli w różnych stężeniach w pożywkach syntetycznej i naturalnej (ściekowej).

Osad czynny otrzymano w warunkach laboratoryjnych ze ścieków fenolowych Zakładów Koksochemicznych po ich częściowym odfenolowaniu w procesie technologicznym Zakładu. Skład chemiczny otrzymywanych ścieków przedstawiał się następująco:

Fenole ogólne	w mg/l	od	89,5	-	293,8
Fenole lotne	w mg/l	"	73,0	-	232,0
Fenole nielotne	w mg/l	"	16,5	-	61,8
Utlenialność	w mg/l O_2	"	240,0	-	1100,0
BZT_5	w mg/l O_2	"	235,0	-	920,0

Azot amonowy	w mg/l N	od	1,5	-	14,8
Azot organiczny	w mg/l N	"	6,0	-	8,5
Odczyn pH	-	"	7,1	-	10,0

W wypadkach awaryjnych na Zakładzie stężenie fenoli w ściekach dochodziło do 1100 mg/l. Otrzymane ścieki po przesączeniu i oznaczeniu w nich stężenia fenoli metodą kolorymetryczną (Ł u r i e i R y b n i k o w a, 1958) umieszczono w specjalnym zbiorniku napowietrzania o pojemności około 1,5 litra, dodawano fosforanu dwuamonowego w ilości 300 mg/l i poddawano napowietrzaniu przy użyciu silnego napowietrzacza akwaryjnego dającego średnio 6 l powietrza na godzinę. Codziennie przerywano napowietrzanie na okres 1/2 godziny i po odstaniu ścieków odlewano ostrożnie 500 ml. Do pozostałej zawartości wlewano świeże ścieki w ilości 500 ml, o takiej zawartości fenoli, aby po wymieszaniu dawały stężenie fenoli zbliżone do wyjściowego, tj. od 90 - - 130 mg/l. W przypadku większego stężenia fenoli w ściekach surowych, rozcieńczano je wodą wodociągową.

Po 7 dniach od chwili rozpoczęcia doświadczenia, ścieki w zbiorniku silnie zmętniały i pojawiły się liczne drobne kłaczki. W preparatach mikroskopowych stwierdzono silny rozwój mikroflory i mikrofauny. Widoczne były bardzo liczne komórki bakteryjne, głównie cylindryczne, występujące pojedynczo względnie w drobnych skupieniach. Pojawiły się również pierwotniaki takie jak Vorticella sp., Paramaecium sp., oraz wiciowce Polytoma uvella Ehrenberg (?). Spadek ilości fenoli w badanych ściekach dochodził do 99,7% na dobę.

Z chwilą wyraźnego (jak wyżej) wpracowania się osadu czynnego, zwiększano stopniowo stężenie fenoli w zbiorniku do 660 mg/l. Równocześnie prowadzono systematyczną kontrolę ilości fenoli metodą kolorymetryczną z paranitroanaliną, pH i utlenialności (Ł u r i e i R y b n i k o w a, 1958).

Otrzymane wyniki z pracy osadu czynnego zestawiono w tabeli 1. Wysoki procent spadku fenoli w ciągu okresu 24-48 godzin wahający się w granicach 96,9 - 99,8% świadczył o wytworzeniu się swoistej mikroflory osadu czynnego przystosowanej do rozkładania fenolu i jego homologów. Potwierdzały to też obserwacje mikroskopowe. W preparatach stwierdzano stale bardzo liczne komórki bakteryjne, głównie cylindryczne występujące pojedyńczo, podwójnie oraz w łańsuszkach. Bakterie te występowały w kłaczkach osadu obok bakterii

Tablica 1

Rozkład fenoli przez osad czynny przy różnym ich stężeniu w ściekach

Czas rozkładu fenoli w dobach	Stężenie fenoli w ściekach mg/l		% spadku fenoli	pH ścieków		Utlenialność ścieków w mg/l O_2		% spadku utlen.
	surowych	oczyszczonych		surowych	oczyszczonych	surowych	oczyszczonych	
1	125	0,4	99,7	7,3	7,3	240	40	83,3
1	130	0,3	99,8	7,4	7,3	260	45	82,7
1	240	0,3	99,9	7,4	7,2	700	70	90,0
1	304	0,8	99,7	7,1	7,1	680	95	86,0
1	320	6,3	98,0	7,1	6,8	860	140	83,7
1	400	6,0	98,5	7,3	7,1	1040	70	93,3
1	400	8,0	98,0	7,6	7,3	720	80	88,9
1	400	12,4	96,9	7,4	6,7	600	145	75,8
1	440	10,0	97,7	7,3	6,9	800	140	82,5
1	460	12,5	97,3	7,4	7,0	810	140	82,7
2	500	0,8	99,8	7,2	7,1	780	110	85,9
2	500	4,0	99,2	8,0	7,1	1100	140	87,3
4	625	3,4	99,4	8,0	7,8	1100	150	86,4
2	625	3,4	99,4	7,5	7,1	1010	85	91,6
3	660	6,3	99,0	7,3	6,9	1100	100	90,9

zooglealnych oraz w samej cieczy. Występowały również pierwotniaki, a przy dużych stężeniach fenoli dominowały wiciowce Polytoma uvella Ehrenberg (?) oraz wymoczki Glaucoma scintillans.

W celu otrzymania swoistych dla ścieków fenolowych kultur bakteryjnych, wykonano całą serię posiewów z osadu czynnego otrzymanego ze ścieków stężonych fenoli od 400 - 625 mg/l na agar bulionowy z dodatkiem 150 mg/l fenolu. Stosowano rozcieńczenia 10^{-4}, 10^{-5} i 10^{-6}. Ogólna ilość bakterii w 1 ml wahała się w granicach od 1.106.800.000 do 1.574.808.000 kolonii. Do izolacji wybierano kolonie wyraźnie różniące się wyglądem. Wyodrębniono 15 różnych szczepów bakteryjnych. Otrzymane czyste kultury starano się zidentyfikować, badając ich własności morfologiczne jak kształt, wielkość ruch itp., oraz fizjologiczne jak zabarwienie wg Grama, wzrost na agarze bulionowym, żelatynie bulionowej, bulionie mięsnopeptonowym, na mleku z lakmusem i ziemniaku. Badano również ich zdolność fermentacji cukrów takich jak laktoza, glukoza sacharoza, maltoza ksyloza, arabinoza i fruktoza oraz manitolu, jako też zdolność hydrolizy skrobii, wytwarzania indolu, H_2S oraz redukcji azotanów.

Przebadane szczepy identyfikowano wg klucza Bergey'a (1957). Zaliczono je tylko do rodzajów: Achromobacter, Pseudomonas i Micrococcus. Bliższe ich zidentyfikowanie do gatunków byłoby bardzo trudne, ponieważ otrzymane wyniki dla wyodrębnionych szczepów nie pokrywały się w całej pełni z cechami żadnego z opisanych w kluczu gatunków.

Prawdopodobnie otrzymane z powyższego osadu czynnego szczepy zmieniły częściowo niektóre ze swoich własności tak morfologicznych jak i fizjologicznych na skutek dłuższego bytowania w specyficznym środowisku jakim są ścieki fenolowe. Równocześnie mogło też nastąpić przystosowanie ich aparatu enzymatycznego do utleniania fenoli i jego homologów, jako też rozkładu innych substancji organicznych zawartych w ściekach fenolowych.

Do dalszych badań wybrano pięć szczepów bakteryjnych, najczęściej występujących w posiewach. Oznaczono je liczbami: 1,5,6,19 i 30.

Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna wybranych szczepów przedstawia się następująco:

Szczep Nr 1. Bakterie kuliste, Gram (+), wielkości od 0,8 - 1,0 μ. Na agarze bulionowym rosną w postaci kolonii

okrągłych, wypukłych, o równym brzegu, gładkich z połyskiem o zabarwieniu białym. Żelatyny nie upłynniają. Na bulionie tworzą słabe jednolite zmętnienie. Mleka z lakmusem nie zmieniają. Na ziemniaku brak wzrostu. Nie wytwarzają indolu i siarkowodoru. Nie fermentują badanych cukrów. Nie hydrolizują też skrobii. Nie redukują azotanów do azotynów. Zaliczono je do rodzaju Micrococcus.

Szczep Nr 5. Pałeczki Gram (-), ruchliwe, wielkości od 0,5 - 0,7 x 1,5 - 2,2 μ. Na agarze bulionowym rosną wolno w postaci kolonii okrągłych, wypukłych, o równym brzegu, gładkich z połyskiem, bezbarwnych. Do podłoża wytwarzają barwnik brunatny. Żelatyny nie upłynniają. Na bulionie rosną w postaci słabego jednolitego zmętnienia z cienką błonką na powierzchni. Mleko z lakmusem słabo alkalizują. Na ziemniaku rosną w postaci drobnego nalotu, ze zbrunatnieniem podłoża. Indolu i siarkowodoru nie wytwarzają. Nie fermentują badanych cukrów, nie hydrolizują też skrobi. Redukują azotany do azotynów. Zaliczyć je można prawdopodobnie do rodzaju Pseudomonas.

Szczep Nr 6. Pałeczki Gram (-), ruchliwe, wielkości od 1,0 - 1,1 x 2,0 - 3,0. Na agarze bulionowym rosną w postaci kolonii okrągłych o równym brzegu z pępkowatym wgłębieniem w środku, o powierzchni suchej, bezbarwne. Zabarwiają podłoże na kolor zielony. Żelatynę upłynniają kraterowato. Mleko z lakmusem ścinają i peptonizują. Na ziemniaku rosną w postaci silnego, śluzowatego nalotu z połyskiem. Wytwarzają indol, nie wytwarzają jednak siarkowodoru. Nie hydrolizują skrobi. Nie fermentują badanych cukrów. Nie redukują azotanów. Zaliczono je do rodzaju Pseudomonas.

Szczep Nr 19. Pałeczki Gram (-), ruchliwe, wielkości od 0,9 - 1,1 x 1,8 - 2,5 μ. Na agarze bulionowym rosną w postaci kolonii okrągłych, o równym brzegu, wypukłych, gładkich, bezbarwnych, opalizujących pod światło. Wytwarzają barwnik zielony do podłoża. Żelatyny nie upłynniają. Na bulionie rosną w postaci silnego jednolitego zmętnienia z cienką błonką na powierzchni i osadem na dnie, wytwarzając zielony barwnik w pożywce. Mleka nie zmieniają. Na ziemniaku rosną dobrze. Nie wytwarzają indolu i siarkowodoru. Nie hydrolizują skrobi. Z badanych cukrów fermentują: a) glukozę z wytworzeniem kwasu lecz bez gazu po 72 godzinach, b) ksylozę po 5-ciu dniach jak poprzednio. Nie redukują azotanów. Zaliczono je do rodzaju Pseudomonas.

Szczep Nr 30. Pałeczki Gram (-), wielkości od 1,0-1,1 x 3,0 - 3,6μ. Na agarze bulionowym rosną w postaci kolonii okrągłych o równym brzegu, gładkich z połyskiem o zabarwieniu kremowożółtym. Żelatyny nie upłynniają. Na bulionie tworzą słabe zmętnienie z cienką błonką na powierzchni. Mleka z lakmusem nie zmieniają. Na ziemniaku rosną w postaci słabego żółtego nalotu. Indolu i siarkowodoru nie wytwarzają. Skrobi nie hydrolizują. Azotanów nie redukują. Z badanych cukrów fermentują tylko glukozę. Na pożywce mineralnej (patrz dalej) wytwarzają barwnik zielono-brunatny. Zaliczono je do rodzaju Pseudomonas.

Druga część pracy obejmowała badania zdolności adaptacyjnych wyżej wymienionych szczepów do rosnących stężeń fenoli oraz oznaczenia czasu potrzebnego bakteriom do rozłożenia fenoli w różnych stężeniach w pożywkach syntetycznej i naturalnej (ściekowej). Do tego celu sporządzono pożywkę mineralną wg P u t i l i n y (1959 b) o składzie: K_2HPO_4 -0,5g, KH_2PO_4 - 0,5 g, $(NH_4)_2SO_4$ - 2,0 g, $MgSO_4$ - 0,5 g, $FeSO_4$ - w śladach oraz fenol jako jedyne źródło węgla i woda wodociągowa do 1000 ml. Pożywkę naturalną ze ścieków fenolowych przygotowano w sposób następujący: ścieki fenolowe przesączono, podano nadmiar fosforanu amonu w ilości 0,3 g na 1 (podobnie jak w pożywce syntetycznej) i oznaczano w nich stężenie fenoli ogólnych w mg/l i pH.

Pożywkę mineralną i naturalną rozlewano do 300 ml kolbek Erlenmayera po 150 ml i sterylizowano pod ciśnieniem 1,5 atm przez 20 minut. Po sterylizacji do pożywki mineralnej dodawano w warunkach jałowych wymaganą dawkę czystego fenolu, a w pożywce ściekowej kontrolowano ponownie stężenie fenoli.

Kolby z przygotowanymi pożywkami o wyjściowym stężeniu fenoli 250 mg/l dla pożywki mineralnej i ok.150 mg/l dla pożywki ściekowej zaszczepiono zawiesinami kultur bakterii szczepów nr 1, 5, 6, 19 i 30 w soli fizjologicznej, otrzymanymi ze spłukania 24 godz. probówkowych hodowli na skośnych agarach z dodatkiem 150 mg/l fenolu. Powyższe kolby wraz z kolbami kontrolnymi zawierającymi pożywki jałowe poddano napowietrzaniu przy pomocy akwaryjnego urządzenia napowietrzającego w temperaturze pokojowej. Rozwój bakterii w kolbach poznawano po wyraźnym zmętnieniu pożywki w ciągu różnego okresu czasu, zależnie od szybkości rozwoju kultury bakteryjnej.

Spadek fenoli badano po 24-48 godzinach od chwili wystąpienia zmętnienia, pobierając jałowo 20 ml zawiesiny, Sączono ją przez filtr Seitza, po czym oznaczano stężenie fenoli metodą kolorymetryczną paranitroaniliną. Gdy spadek stężenia fenoli wynosił około 93 - 99%, zawiesinę badanego szczepu w ilości 15 ml przesiewano na świeżą pożywkę o kolejnym większym stężeniu fenoli, poddając ją dalszemu napowietrzaniu. W kolbach kontrolnych oznaczano w tych samych okresach samoczynny spadek fenoli, który wahał się w granicach od 2,2 - 15,0%. Otrzymane wyniki z przeprowadzonych doświadczeń zestawiono w tablicach 2 i 3.

Omówienie wyników

Pożywka syntetyczna

Wyniki otrzymane z prób hodowlanych na pożywce syntetycznej zestawione w tabeli 2 potwierdzają znaną już zdolność niektórych gatunków bakterii do wykorzystywania fenolu jako jedynego źródła węgla. Spadek ilości fenolu w tych pożywkach był zawsze ściśle związany z silnym rozwojem bakterii.

Czas potrzebny do rozłożenia fenolu w 98 - 99% wynosił przy jego stężeniach od 250 - 500 mg/l dla wszystkich badanych szczepów 48 godzin, pod warunkiem zachowania optymalnych warunków hodowli, jak wystarczające ilości azotu i fosforu, odpowiednie pH środowiska, stała aeracja oraz temperatura ok. 20 - 22°C (K a ł a b i n a 1934). Ze wzrostem stężenia fenolu, przy zachowaniu tych samych warunków hodowlanych, czas jego rozkładu przez poszczególne szczepy był różny. Uzależniony był on od potrzebnego czasu adaptacji poszczególnych szczepów do wyższego stężenia fenolu, objawiającego się przedłużeniem okresu rozwoju bakterii, w którym spadek fenolu w pożywce był minimalny, a niekiedy nawet bardzo trudny do uchwycenia metodą kolorymetryczną, co wstępnie zbadano. Od chwili jednak wystąpienia intensywnego rozmnażania się kultury bakteryjnej, spadek fenolu w pożywce zachodził bardzo szybko nawet przy bardzo wysokich jego stężeniach, dając niekiedy w ciągu 24 godzin spadek fenolu wynoszący 98 - 99%. Z badanych szczepów najtrudniej przystosowywał się szczep Nr 30, co wyraźnie uwidoczniło się w stężeniach fenolu powyżej 1100 mg/l. Jego zdolność do rozkładania fenolu malała ze wzrostem stężenia jego w pożywce. I tak np. przy stężeniu końcowym 1500 mg/l fenolu w

Tablica 2

Rozkład fenolu przez wyizolowane szczepy bakteryjne na pożywce syntetycznej

Stężenie fenolu w pożywce wyjściowej mg/l	Szczepy kultur bakterii fenolowych nr 1			5			6			19			30			Próby kontrolne bez bakterii		
	Czas rozkładu fenolu w dobach	Spadek fenolu		Czas rozkładu fenolu w dobach	Spadek fenolu		Czas rozkładu fenolu w dobach	Spadek fenolu		Czas rozkładu fenolu w dobach	Spadek fenolu		Czas rozkładu fenolu w dobach	Spadek fenolu		Czas napowietrzania w dobach	Spadek fenolu	
		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%
250	2	246,8	98,7	2	244,8	97,9	2	246,4	98,6	2	246,7	98,7	2	243,4	97,4	2	10	4,0
500	2	496,0	99,2	2	493,7	98,7	2	493,8	98,8	2	496,0	99,2	2	493,8	98,8	2	25	5,0
600	2	594,8	99,1	3	593,5	98,9	2	591,6	98,6	2	594,2	99,0	3	592,4	98,7	3	8	1,3
700	2	694,0	99,1	3	691,6	98,8	2	690,4	98,6	2	693,8	99,1	3	692,0	98,8	3	40	5,7
800	2	792,4	99,1	3	788,6	98,6	2	791,2	98,8	2	793,4	99,2	3	791,8	99,0	3	20	2,5
900	3	892,0	99,1	4	887,0	98,6	3	892,4	99,2	3	892,4	99,2	4	891,6	99,1	4	30	3,3
1000	3	991,6	99,2	4	980,0	98,0	3	992,0	99,2	3	992,0	99,2	4	990,4	99,0	4	35	3,5
1100	4	1091,4	99,2	4	1082,5	98,4	3	1090,4	99,1	4	1091,2	99,2	5	1020,0	92,7	5	40	3,6
1200	3	1188,5	99,0	3	1187,5	98,9	3	1190,0	99,2	3	1188,4	99,0	6	1100,0	91,7	6	50	4,2
1300	3	1280,8	98,5	4	1279,0	98,4	3	1288,5	99,1	3	1288,4	99,1	6	1180,0	90,8	6	65	5,0
1400	3	1393,75	99,6	3	1384,0	98,8	2	1387,5	99,1	2	1388,5	99,2	8	800,0	57,1	8	70	5,0
1500	3	1491,6	99,4	3	1485,5	99,0	3	1490,6	99,4	4	1487,5	99,2	10	530,0	35,3	10	80	5,3

Tablica 3

Rozkład fenoli przez wyizolowane szczepy bakteryjne na pożywce naturalnej

	Szczepy kultur bakterii fenolowych nr															Próby kontrolne bez bakterii		
	1			5			6			19			30					
Stężenie fenoli w pożywce wyjściowej mg/l	Czas rozkładu fenoli w dobach	Spadek fenoli		Czas rozkładu fenoli w dobach	Spadek fenoli		Czas rozkładu fenoli w dobach	Spadek fenoli		Czas rozkładu fenoli w dobach	Spadek fenoli		Czas rozkładu fenoli w dobach	Spadek fenoli		Czas napowietrzania w dobach	Spadek fenoli	
		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%		mg/l	%
144	2	140,0	97,2	2	141,6	98,3	2	140,6	97,6	2	140,0	97,2	2	138,8	96,4	2	19,0	13,2
200	2	195,3	97,6	2	196,4	98,2	1	196,5	98,3	1	196,8	98,4	2	186,6	93,3	2	30,0	15,0
280	3	276,7	98,8	3	275,0	98,2	1	274,3	98,0	1	275,16	98,3	3	275,0	98,2	3	30,0	10,7
370	2	362,9	98,1	2	361,7	97,7	1	366,0	98,9	1	364,8	98,6	2	361,7	97,8	2	8,0	2,2
420	4	412,7	98,3	4	412,0	98,1	2	414,0	98,6	2	414,4	98,7	4	400,0	95,2	4	20,0	4,8
440	3	398,5	90,6	3	398,5	90,6	3	436,0	99,1	3	434,4	98,7	4	412,0	93,6	4	50,0	11,4
500	4	491,5	98,3	4	491,2	98,2	3	493,5	98,7	3	493,5	98,7	4	483,5	96,7	4	20,0	4,0
640	3	630,0	98,4	3	629,5	98,4	2	630,0	98,4	2	630,0	98,4	3	606,0	94,7	3	15,0	2,3
655	2	633,0	96,6	3	640,0	97,7	2	643,0	98,2	2	645,0	98,5	4	600,0	91,6	3	35,0	5,3
665	3	656,0	98,6	3	654,0	98,3	3	655,6	98,6	3	655,6	98,6	3	656,6	98,7	3	40,0	6,0
750	5	620,0	82,7	4	735,0	98,0	4	737,5	98,3	4	738,0	98,4	5	595,0	79,3	5	38,0	5,1
850	5	540,0	63,5	5	830,0	97,6	5	827,0	97,3	4	834,4	98,2	6	560,0	65,9	6	40,0	4,7
940	6	280,0	29,8	6	917,0	97,6	6	922,0	98,1	6	920,0	97,9	6	400,0	42,6	6	40,0	4,3

pożywce po 10 dniach aeracji, spadek fenolu wynosił już tylko 35%, gdy pozostałe szczepy przy tym samym stężeniu rozkładały fenol w ciągu 3 - 4 dni, dając spadek w granicach 99,0 - 99,4% w badanych warunkach.

Pożywka naturalna (ściekowa)

Wyniki hodowlane otrzymane na pożywce naturalnej (ściekowej) podaje tablica 3. Adaptację badanych szczepów celowo rozpoczęto tu od niskich stężeń fenoli (ok.150 mg/l), mając na uwadze możliwość obecności również innych substancji toksycznych zawartych w ściekach naturalnych i mogących działać toksycznie i hamująco na świeżo wprowadzone szczepy bakteryjne. Równocześnie zachowano potrzebne warunki hodowlane- jak dodatek nadmiaru soli fosforowo-amonowej, odpowiednie pH 7,1 - 7,9, ciągłą aerację oraz temperaturę dd ok.20 - 22°C. Ogólny rozkład fenoli w granicach 96,4-98,3% otrzymano dla wszystkich szczepów już po 48 godzinach.

Przy wyższych stężeniach fenoli (200, 280 i 370 mg/l) szczepy nr 6 i 19 rozwijały się wywołując również spadek fenoli w granicach 98,0 - 98,9% w ciągu 24 godzin. Pozostałe szczepy dla tych samych stężeń wymagały czasu 48 - 72 godzin, dając spadek fenoli w granicach 93,3 - 99,7%. Ze wzrostem stężenia fenoli w pożywce naturalnej przedłużał się czas ich rozkładu, podobnie jak w pożywce mineralnej. To przedłużenie czasu rozkładu fenolu występowało w pożywce syntetycznej dopiero przy stężeniach powyżej 1100 mg/l i to tylko dla szczepu nr 30, podczas gdy w pożywce naturalnej już w stężeniach ok.750 mg/l, co mogło być wywołane obecnością również śladów innych substancji toksycznych w ściekach.

Dla stężeń 420 - 665 mg/l fenoli, najkrótszy czas ich rozkładu miały szczepy nr 6 i 19; wahał się on od 48-72 godzin. Szczepy nr 1 i 5 wymagały już czasu 72 - 96 godzin, a spadek fenoli dla wymienionych szczepów nr 1,5,6 i 19 wynosił średnio 98%. Najwolniej adaptował się i rozkładał fenole szczep nr 30, dając spadek w 95% dopiero w ciągu ok.96 godzin, a nawet w nieco dłuższym czasie.

Pożywki o stężeniach 750 - 940 mg/l fenoli działały hamująco na wszystkie szczepy, przedłużając ich rozwój o okres 48-96 godzin, po czym dopiero w następnych 24 - 48 godzinach komórki bakteryjne intensywnie się rozmnażały (występowało

silne zmętnienie pożywki), a spadek fenoli dla szczepów Nr 5, 6 i 19 wahał się w granicach 97,5 - 98,1%. Natomiast szczepy nr 1 i 30 mimo dobrego rozwoju kultury, rozkładały fenole tylko w granicach 29,8 - 42,6%.

Dalszy rozkład fenoli w pożywkach zachodził już bardzo wolno i nie miał praktycznego znaczenia.

Silny rozwój badanych szczepów bakterii w pożywce - zwłaszcza naturalnej, stale nieznacznie obniżał pH środowiska (w granicach kilku dziesiętnych).

Dla wykazania trwałej aktywności wyizolowanych szczepów bakterii fenolowych, sprawdzono ich zdolność rozkładania po ok.2-miesięcznej przerwie i przechowywaniu ich na ciekłej naturalnej pożywce o zawartości 200 mg/l fenoli.

Otrzymane wyniki potwierdziły ich niezmienną aktywność dając np. dla szczepu nr 5 przy stężeniach od 170-360 mg/l fenoli w okresie 2 - 3 dni spadek w granicach 94,1-97,2%, dla szczepów nr 6 i 19 przy stężeniach od 170 - 440 mg/l fenoli w okresie ok.1 dnia spadek w granicach 95,4 - 97,1%, zaś szczep Nr 30 w tych samych stężeniach, lecz w okresie 2 - 6 dni dał spadek fenoli od 80,0 - 72,3%, przy czym ze wzrostem stężenia fenoli w ostatnim wypadku obniżał się procent ich rozkładu.

Jak więc widzimy otrzymane poprzednio wyniki dawały się powtórzyć w praktycznych granicach rozbieżności.

Wnioski

1. Z osadu czynnego otrzymanego z surowych koksochemicznych ścieków fenolowych można wyosobnić aktywne szczepy bakterii rozkładających fenole w wysokim procencie.

2. Czas potrzebny do rozłożenia fenoli przy niskich stężeniach wahał się w granicach 24-72 godzin, zarówno na pożywce syntetycznej jak i naturalnej przy zachowaniu optymalnych warunków hodowli.

3. W celu ewentualnego praktycznego wykorzystania aktywnych szczepów bakteryjnych w procesie biologicznego oczyszczania ścieków na skalę techniczną, powinno się izolować szczepy łatwo i szybko przystosowujące się do wyższych stężeń fenoli oraz zmiennych warunków powstawania ścieków fenolowych w przemyśle. W naszym wypadku tylko szczepy nr 6 i 19, które rozkładały fenole średnio w 98% w pożywce ście-

kowej o stężeniach od 200 - 370 mg/l fenoli w ciągu ok.24 godzin - mogłyby mieć zastosowanie praktyczne.

4. Rozkład fenoli w pożywce ściekowej przy stężeniach powyżej 750 mg/l zachodził znacznie wolniej aniżeli w pożywce mineralnej z czystym fenolem przy tych samych stężeniach.

LITERATURA

[1] B e r g e y s: Manual of Determinative Bacteriology, 1957 - VII Ed. London, Bailliere

[2] B r i n g m a n n G., 1954: Versuche zum biologischen Abbau von Phenolen im Belüftungsverfahren durch Microorganismen der Gattung Nocardia. Ges. Ing. 75: 252

[3] B r i n g m a n n G., 1955: Biologische Reinigung phenolhaltiger Abwässer durch Strahlpilze. Ges Ing, 76: 106.

[4] C z e k a n o w s k i J., S k a r ż y n s k i B., 1946: Utilization of Phenols and Related Compounds by Achromobacter. Nature 158: 304

[5] C z e k a n o w s k i J., S k a r ż y n s k i B., 1948: The Breakdown of Phenols and Related Compounds by Bacteria Journ. Gen.Micr. (1948): 231

[6] J e g o r o w a A.A., 1946: Niekotoryje danyje o fizjołogii bakterii okisłajuszczych fenoł przy wysokich tiemperaturach. Mikrobiologija T.XV: 467

[7] K a ł a b i n a M.M., R o g o w s k a j a C.J., 1934: Usłowia procesa rozpada fenoła. Trudy: "ONTI".

[8] K a r a s k i e w i c z J., M a r g i e l E., 1959: Oczyszczanie ścieków zawierających fenol i krezol metodą biologiczną. Nafta - (1959) 491-494.

[9] K l u c z y c k i K., P e t r y c k a H., 1962: Mikroorganizmy ścieków fenolowych - Część I. Charakterystyka niektórych drobnoustrojów ze złóż zraszanych. Manuskrypt (1962).

[10] Ł u r i e I.I., R y b n i k o w a A.J., 1958: Chimiczeskij analiz proizwodstwiennych stocznych wod, Moskwa, Goschimizdat.

[11] M e i s s n e r B., 1955: Untersuchungen über die Beseitigung phenolhaltiger Abwässer durch biologische Reinigungsverfahren. Wasserwirtschaft Wassertechnik 5: 82

[12] P u t i l i n a N., 1952: Obesfenoliwanije stocznych wod koksochimiczeskich zawodow putiom primienienije czistich kultur fenolorazruszajuszczich mikrobow. Gigiena Sanit. 12 Nr 8.

[13] P u t i l i n a N., 1959: a) O biologiczeskich mietodach oczistki fenolnych stocznych wod. Gigiena Sanit. 24.

[14] P u t i l i n a N., 1959 b): Mikroby primieniajemyje na promyszlennych oczistnych soorużenijach dla obesfenoliwanija stocznych wod. Mikrobiologija 28: 757.

[15] Z d y b i e w s k a M., 1961: Badania nad biologicznym oczyszczaniem ścieków fenolowych na złożach zraszanych. Gaz, Woda i Technika Sanitarna - XXXV s.309.

Zusammenfassung

1. Aus dem aus Kokereiabwasser erhaltenen Belebtschlamm wurden einige aktive Bacterienstämme kultiviert, wolche hohe Phenolkonzentrationen abbauen.

2. Die zum Phenolabbau benötigte Belüftungszeit liegt bei niedrigen Konzentrationen zwischen 24 und 72 Stunden in optimalen Verhältnissen sowohl bei Verwendung synthetischer wie auch natürlicher Nahrlösungen.

3. Bei evtl. praktischer Ausnützugn der aktiven Bakterienstämme zur biologischen Abwasser-reinigung sollten nur solche Kulturen abgesondert werden, welche sich leicht und schnell höheren Phenolkonzentrationen und den veränderlichen Produktions Verhältnissen industrieller Phenolabwässer anpassen. In unserem Fall könnten nur die Kulturen Nr 6 und 19 praktische Anwendung finden. Der Phenolabbau dieser Kulturen betrug durchschnittlich 98% in Abwassernährlösungen bei Konzentrationen zwischen 200 - 370 mg/l Phenol und 24-stündiger Belüftungszeit.

4. Bei Konzentrationen über 750 mg/l Phenol wurde in Abwasser-Nährlösungen ein bedeutend langsamerer Phenolabbau als in synthetischen Mineral-Nährlösungen mit reinem Phenol in gleichen Konzentrationen festgestellt.