ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 1966
Seria: INŻYNIERIA SANITARNA z. 9 Nr kol. 159

KAZIMIERZ KLUCZYCKI, EMILIA KUBACZKA

ZAGADNIENIE ZDROŻDŻOWANIA ŚCIEKÓW FENOLOWYCH
II. WPŁYW NIEKTÓRYCH STYMULATORÓW WZROSTU NA ROZWÓJ WYDZIELONYCH SWOISTYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY I ROZKŁAD FENOLU

Zagadnienie biologicznego rozkładu związków fenolowych w ściekach przemysłowych było od dawna tematem prac wielu autorów. Wystarczy wymienić takich, jak MEISSNER [1] PUTILINA [2], BRINGMANN [3] i inni, którzy próbowali stosować do tego procesu czyste kultury różnych drobnoustrojów, uzyskując ich przystosowanie, a nawet pełny rozkład fenoli do stężenia 1600 mg/l, wyjątkowo do 3000 mg/l.

W ostatnich latach przeważa jednak coraz bardziej w technologii ścieków, zwłaszcza przemysłowych, zasada ich równoczesnego z oczyszczaniem wykorzystania. Próbuje się wykorzystywać wartościowe składniki ścieków drogą biosyntezy białka, tłuszczu oraz innych składników odżywczych, jak witaminy. Tą drogą można by też choćby częściowo zaspokoić poważny deficyt pełnowartościowej paszy dla bydła.

Najsilniej rozwinęły się te badania w Niemieckiej Republice Dmokratycznej, przy czym wybitne zasługi w tej dziedzinie położyły dwa ośrodki: jeden w Lipsku pod kierownictwem prof. E. Leibnitza oraz drugi w Berlinie pod kierownictwem prof. A. Riechego.

Poza możliwością bezpośredniego wykorzystania, ewentualnie wzbogaconego w witaminy osadu czynnego ze ścieków fenolowych z wytlewni (LEIBNITZ i inni [4]), starano się wykorzystywać różne ścieki przemysłowe bogate w kwasy tłuszczowe itp. związki węglopochodne, przeważnie zawierające też fenole - drogą ich zdrożdżowania, czyli biosyntezy masy komórkowej drożdży z tych substratów. Powstał więc nowy problem - oznaczenie zdolności przystosowania drożdży do wysokich stężeń fenoli oraz do rozkładu i wykorzystania tych fenoli. Jednym z pierwszych, który badał tę sprawę był ZIMMERMAN [5]. Stwierdził on, że fenol może ulegać przemianie w biomasę komórek drożdżowych w przeciwieństwie

do innych toksycznych związków organicznych, jak na przykład kwas mrówkowy, który podlega głównie utlenianiu w procesach energetycznych.

Szczegółowo badali rozkład fenoli przez drożdże LEIBNITZ, BEHRENS i SEIFERT [6]. Zbadali oni zdolność przyswajania fenoli jako źródła węgla przez szereg szczepów drożdży, zarówno szlachetnych jak Saccharomyces cerevisiae, drożdże winiarskie RK, jak też drożdże nie fermentujące Torulopsis utilis, Rhodotorula glutinis, Torulopsis dattila i drożdże L. Badania swoje przeprowadzili na pożywce syntetycznej Raedera z dodatkiem fenoli jako źródła węgla. Oznaczono optymalne warunki pH i temperatury hodowli. Stwierdzono zdolność zużywania fenoli na pożywce mineralnej przez wszystkie drożdże nie fermentujące do około 500 mg/l, a u drożdży L nawet do 1500 mg/l. Współczynnik ekonomiczny wykorzystania substratu dochodził do 60%.

Autorzy stwierdzili nieprzydatność do biosyntezy pochodnych alkilowanych fenoli (krezoli), różną przyswajalność polifenoli przez drożdże oraz brak dodatniego wpływu substancji wzrostowych na adaptację użytych szczepów drożdży. Stwierdzono, podobnie jak w naszych wcześniejszych badaniach KLUCZYCKI i współpracownicy [7] o wiele lepszą zdolność adaptacyjną do wysokich stężeń fenoli szczepów drożdży swoistych, wyosobnionych ze ścieków fenolowych. Różne szczepy drożdży rozkładały fenol z różną szybkością, najszybciej drożdże L.

LEIBNITZ, BEHRENS i ZDARSA [8] oraz LEIBNITZ, BEHRENS i SIKORA [9] przebadali też w międzyczasie zdolność adaptacyjną szeregu wyosobnionych ze środowisk głównie ściekowych szczepów drożdży i pleśni do wysokich stężeń kwasów tłuszczowych, jak też możliwości ich zdrożdżowania. Stwierdzili oni dobrą przyswajalność kwasów tłuszczowych ze ścieków różnego pochodzenia przez badane drożdże. Półciągłe badania laboratoryjne wykazały dość dobry współczynnik ekonomiczny tego zdrożdżowania, jednak okres hodowli był bardzo długi. Stopień oczyszczenia ścieków przekraczał 90% mimo zawartości substratu do 20 g/l.

Równocześnie badania nad możliwością zdrożdżowania różnych substratów odpadowych prowadził RIECHE i współpracownicy [10]. Przeprowadzali oni zdrożdżowanie kwasów tłuszczowych oraz fenoli z równoczesnym wykorzystaniem tych ostatnich (RIECHE, HILGETAG, MARTINI, LORENZ [11]). Badania te dotyczyły głównie zdolności wykorzystania fenoli przez

produkcyjny szczep Torulopsis utilis. Stwierdzono pozytywnie tę możliwość. Z kolei przeprowadzono próby zdrożdżowania metodą ciągłą mieszaniny kwasów octowego i propionowego (w stosunku 1:1) z rosnącymi dawkami mieszaniny fenoli, głównie polifenoli. Stwierdzono dobre wykorzystanie obu substratów, przy czym przy wspólnym wykorzystywaniu ich wzrósł wyraźnie współczynnik ekonomiczny zdrożdżowania.

Szczegółowo zagadnienie wykorzystanie ścieków przemysłowych drogą zdrożdżowania przedstawili RIECHE i inni [12]. Opisali oni wstępne doświadczenia półtechniczne, charakteryzując stosowane tam kultury drożdży Torulopsis utilis oraz wyosobniony z tych ścieków szczep Oospora lactis, bardziej żywotny od Torulopsis. Główną zaletą tej metody jest oprócz wykorzystania wartościowych składników ścieków, również możność ich oczyszczania w formie skoncentrowanej, bez potrzeby rozcieńczania. Doświadczenia nad zdrożdżowaniem wód po fenosolwanie, zawierających do 1000 mg/l fenoli głównie polifenoli z przeróbki węgla brunatnego, wykazały 100% zużycie kwasów tłuszczowych i około 80% zużycie fenoli, przy ogólnym spadku BZT_5 o około 80%.

Nowsze badania nad wykorzystaniem ścieków zawierających kwasy tłuszczowe wyżej opisaną metodą, lecz przy użyciu głównie szczepu Oospora lactis podają THONKE i LORENZ [13]. Badania te w skali półtechnicznej wykazują pełną realność praktyczną metody zdrożdżowania ścieków przemysłowych, dając około 3 kg biomasy z 1 m^3 1% ścieków z kwasami tłuszczowymi oraz około 70% spadek BZT_5.

Sam problem metabolizmu fenoli przez komórki drożdżowe podjęli HARRIS i RICKETTS [14]. Zbadali oni metabolizm pochodnych fenolowych z rozkładu ligniny na kilku szczepach drożdży z rodzaju Debariomyces, stwierdzając górną granicę stężenia fenoli około 1000 mg/l.

Jak widać z powyższego, nie badano dotąd asymilacji fenoli znajdujących się na przykład w ściekach koksochemicznych i tym podobnych, które występują głównie w Polsce. Jako istotną potrzebę dla rozwiązania sprawy wykorzystania różnych typów ścieków fenolowych drogą zdrożdżowania uznano dwa zagadnienia: adaptację kultur produkcyjnych do możliwie wysokich stężeń fenoli i zdolność wysokiej asymilacji fenoli jako jedynego źródła węgla.

Możliwość przystosowania drożdży do różnych substratów badano już od roku 1942 [15] na przykład drogą pasażowa-

nia, przedłużania czasu hodowli i tym podobnie. Stwierdzono więc, że istnieją w komórce drożdżowej potencjalne możliwości wytwarzania enzymów adaptacyjnych. Z drugiej strony wiadomo, że najodpowiedniejsze do tego celu są szczepy swoiste, wyosobnione z opracowywanych środowisk [7].

Jako dalszą drogę do tego celu uznano działanie czynników stymulujących jak substancje wzrostowe. Jak podają źródła ogólne [16] regulują one nie pojedyncze reakcje chemiczne, lecz kompleksowe procesy fizjologiczne związane z danym środowiskiem. Należą tu substancje typu auksyn i heteroauksyn, których pozytywne działanie na różne procesy enzymatyczne podaje wielu autorów [16, 17, 18]. Różne formy czynników wzrostowych potrzebne są często dla normalnego przebiegu adaptacji, co potwierdza wielu z cytowanych tu autorów. Przypuszczalnie substancje te wywierają wpływ na jakieś kluczowe ogniwo w przemianie materii protoplazmy, wskutek tego efekty, które wywołują są różnorodne. Niektórzy badacze uważają, że na przykład heteroauksyny działają jako aktywatory właściwych katalizatorów wzrostu plazmy to jest auksyn.

Celem niniejszej pracy było poza adaptacją wydzielonych ze ścieków koksochemicznych kilku szczepów drożdży do możliwie wysokich stężeń fenolu - przebadanie wpływu niektórych substancji wzrostowych na proces dalszej adaptacji oraz przyswajanie fenoli jako jedynego źródła węgla.

Część doświadczalna

Do badań użyto szczepy drożdży, wyizolowane z błony biologicznej laboratoryjnego złoża zraszanego fenolowymi ściekami koksochemicznymi, o stężeniu 400 do 600 mg/l fenoli lotnych [7]. Drożdże te rozsiewano na brzeczce agarowej o początkowym dodatku 100 mg/l fenolu. Przeszczepiano je kolejno na brzeczkę ciekłą z dodatkiem fenolu, celem eliminacji drożdży kożuchowych.

Spośród wyosobnionych wielu szczepów użyto do pracy zrazu pięć szczepów znaczonych symbolami A1, B0, B1, C2, C3 oraz czystą kulturę drożdży pastewnych Torulopsis utilis (krajową).

W pierwszym etapie starano się te szczepy zaadaptować stopniowo do coraz to wyższego stężenia fenolu, z równoczesnym przejściem na mineralną pożywkę Raedera z fenolem

jako jedynym źródłem węgla. Robiono to przez podnoszenie stężenia fenolu w pożywce brzeczkowej o 100 mg/l oraz częściowe zastępowanie pożywki naturalnej pożywką mineralną, aż do zupełnego zastąpienia nią pożywki brzeczkowej.

Skład pożywki Raedera był następujący [6, 8]: $(NH_4)_2SO_4$ - 3,00 g, KH_2PO_4 - 1,00 g, K_2HPO_4 - 0,16 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,7 g, NaCl - 0,5 g, zmienna ilość źródła węgla, woda destylowana do 1 l.

Do pożywki tej dla badań adaptacyjnych dodawano jako źródło węgla chemicznie czysty fenol w ilości od 100 mg/l do 1800 mg/l.

Badania prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 ml, które zawierały po 100 ml pożywki. Pożywkę sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 1,0 atn przez 20 minut, po czym przed użyciem kontrolowano w niektórych kolbach stężenie fenolu metodą p-nitroanilinową [19]. Pożywka posiadała odczyn pH około 4,5. Korygowano go niekiedy do tej wielkości kwasem siarkowym.

Adaptację drożdży rozpoczęto od stężenia 100 mg/l fenolu, zaszczepiając pożywkę zawiesiną drożdży, uzyskaną z wymycia czystych kultur na skosach brzeczkowych. Hodowlę prowadzono w termostacie w temperaturze 25 do 27°C przez okres od 3 do 15 dni. Adaptacja drożdży przebiegała na ogół wolno, lecz nie prowadzono badań poza okres 15-dniowy. Przeszczepianie drożdży do wyższego stężenia fenolu można było przeprowadzić dopiero z chwilą uzyskania możliwie dużego zmętnienia pożywki, świadczącego o wyraźnym rozwoju drożdży w danym stężeniu fenolu. Towarzyszył temu zwyczajnie około 50% spadek stężenia fenolu w próbie. Tak zaadaptowane drożdże przeszczepiano do wyższego stężenia w ilości 10 ml zawiesiny na 100 ml świeżej pożywki.

W czasie adaptacji kultur prowadzono makroskopowe obserwacje wyglądu prób, oznaczano przyrost ilości komórek w 1 ml cieczy za pomocą komory Thoma oraz oznaczano analitycznie spadek fenolu metodą paranitroanilinową. Kontrolowano również żywotność kultury drożdży przez barwienie rozcieńczonym roztworem błękitu metylowego. Obserwowany spadek stężenia fenolu korygowano w stosunku do prowadzonych równolegle prób kontrolnych bez drożdży. Adaptacja badanych szczepów drożdży do rozkładu wzrastających stężeń fenolu prowadzona w tych warunkach przebiegała bardzo powoli. Na przejście pierwszego jej stopnia 100 mg/l fenolu

drożdże wymagały 3 do 10 dni, zaś około 15 dni na następny stopień 200 mg/l fenolu. Jedynie szczep C2 odznaczał się szybką adaptacją (tablica I).

Drożdże Torulopsis utilis oraz szczep BO dawały wzrost biomasy tylko wtedy, gdy w pożywce obok fenolu znajdowała się na przykład sacharoza jako źródło węgla. W tych warunkach rozkładały one maksymalną dawkę fenolu u drożdży BO - 500 mg/l, zaś u Torulopsis utilis dochodzącą do 1000 mg/l. Tylko drożdże wyosobnionego szczepu C2 dawały jednakowo dobre wyniki wzrostu na pożywce fenolowej z sacharozą i bez dodatku cukru, jako też wymagały około 2 do 10 dni na adaptację do kolejnych, rosnących stężeń fenolu.

Ponieważ powyższe wyniki adaptacji uznać należało za niewystarczające, przeto opierając się na przesłankach literaturowych, przystąpiono do drugiego etapu badań z zastosowaniem niektórych substancji wzrostowych. Opierając się na pracy PALUCHA [18] użyto 8 różnych substancji wzrostowych uzyskanych z Katedry Techniki Sanitarnej Politechniki Śląskiej i opisanych w powyższej pracy. Były to:

1) - kwas 1-naftylooctowy,

2) - sól sodowa kwasu 1-naftylooctowego,

3) - kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy,

4) - sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego,

5) - kwas p-nitrofenoksyoctowy,

6) - sól sodowa kwasu p-nitrofenoksyoctowego,

7) - kwas β-indolooctowy,

8) - kwas α-naftoksyoctowy.

Nomenklaturę oraz charakterystykę fizykochemiczną przyjęto według BERa [17]. Przytoczona wyżej kolejność numeracji stosowana jest dalej w tablicach i tekście zamiast odpowiednich nazw.

Próby nad zastosowaniem omówionych substancji wzrostowych rozpoczęto dla wszystkich sześciu badanych szczepów drożdży. Dla każdego szczepu przeprowadzono równolegle osiem prób, z których każda otrzymała dodatek innej substancji wzrostowej. Stężenie fenolu ustalono o 100 mg/l wyższe od ostatniego stężenia, do jakiego drożdże zdołały się przystosować w próbach hodowanych bez stymulatorów. Stężenie doświadczalne stymulatorów ustalono zrazu na 1,0 mg/l.

Tablica I

Adaptacja różnych szczepów drożdży do wyższych stężeń fenolu bez stymulatorów, w warunkach statycznych

Stężenie fenolu mg/l	Symbol szczepów drożdży					Uwagi
	A1	B1	C2	C3	Torulopsis utilis	
	Ilość dni potrzebnych do adaptacji					
100	5	5	3	10	5	
200.	15	15	5	brak wzrostu	15	
300	brak wzrostu	brak wzrostu	15		-	

Tablica II

Adaptacja różnych szczepów drożdży do wyższych stężeń fenolu w obecności 2,0 mg/l substancji stymulujących wzrost, w warunkach statycznych

Stężenie fenolu mg/l	Symbol szczepów drożdży				Uwagi
	A1	B1	C2	C3	
	Ilość dni potrzebnych do adaptacji				
300	12 (2)	12 (1)(4)	nb	12 (2)(4)	Liczby w nawiasach określają symbol liczbowy stymulatora, z którym najwcześniej uzyskano około 50% rozkładu fenolu
400	14 (2)	12 (1)	nb	14 (2)	
500	-	17 (1)(2)	6 (2)(1)	-	
600	-	20 (1)(4)	7 (2)	-	
700	-	-	7 (2)	-	
800	-	-	6 (2)(1)		
950	-	-	21 (2)(1)		

Wstępne próby wykazały, że tylko drożdże szczepu C2 rosły dobrze w obecności prawie wszystkich stymulatorów wzrostu; pozostałe szczepy rosły wyraźnie słabiej. Stwierdzono, że na szczepy te tylko kwas 1-naftylooctowy działał dodatnio przez przyspieszenie wzrostu drożdży w pożywce fenolowej.

Przy podwyższonym stężeniu stymulatora do 2 mg/l, najsilniej stymulująco na różne szczepy działał kwas 1-naftylooctowy oraz jego sól sodowa, a także sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego. Niektóre wyniki orientacyjne podaje tablica II.

Przy dawce stymulatora 2 mg/l drożdże szczepu A1 wykazywały również lepszy wzrost z solą sodową kwasu 1-naftylooctowego, zaś drożdże B1 były stymulowane przez wszystkie zastosowane preparaty. Jednakże wzrost tego szczepu był znacznie słabszy od wzrostu szczepu C2, stymulowanego też równomiernie. Szczep C3 stymulowały w tym stężeniu tylko kwas 1-naftylooctowy oraz jego sól, sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego i kwas indolooctowy.

Zwiększenie dawki substancji stymulujących do 5 mg/l nie wpływało jednoznacznie na przyspieszenie wzrostu komórek drożdżowych, a dalsze zwiększanie dawek wywoływało częściową autolizę komórek drożdży. Ustalono zatem, jako optymalną dawkę, 2 mg/l dla dalszych badań nad stymulacją przyswajania fenolu. W tym etapie pracy nie prowadzono prób kontrolnych hodowli drożdży w pożywce bez stymulatora. Próby takie nie stwarzały możliwości porównawczych z próbami stymulowanymi, ponieważ ich czas adaptacji sięgał kilku tygodni.

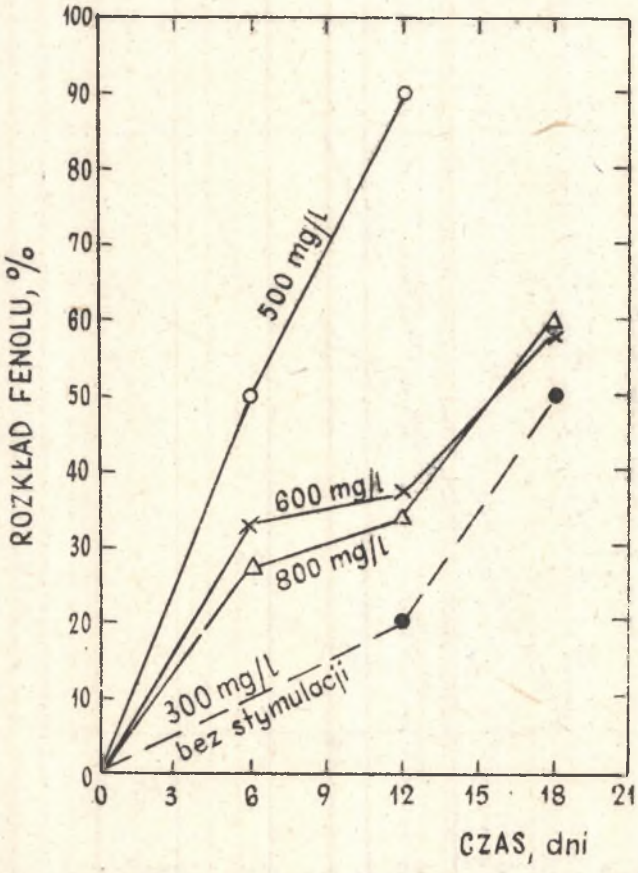
Najlepszy efekt adaptacji oraz rozkład fenolu w stosunkowo krótkim czasie hodowli wykazały drożdże szczepu C2. Już po około 24 godzinach od chwili przeszczepienia tych drożdży do pożywki o wyższym stężeniu fenolu pojawiało się charakterystyczne zmętnienie środowiska, świadczące o rozmnażaniu się drożdży. W omawianych warunkach udawało się przystosować drożdże szczepu C2 do wysokiego stężenia fenolu 950 mg/l fenolu oraz do znacznego rozkładu fenolu, dochodzącego często do 100% dla kilku preparatów (tablica III). Komórki drożdży szczepu C2 bez względu na wzrastające stężenia fenolu były duże, żywotne i prawie wszystkie pączkowały. Przebieg adaptacji tego szczepu w omawianych warunkach obrazują tablica III oraz wykresy na rysunkach 1, 2, 3 i 4 na przykładzie czterech różnych stymulatorów.

Tablica III

Rozkład fenolu przez zarazek drożdży C2 w pożywce syntetycznej w stężeniu fenolu od 500 do 800 mg/l w obecności 0,02 mg/l substancji wzrostowych w warunkach statycznych

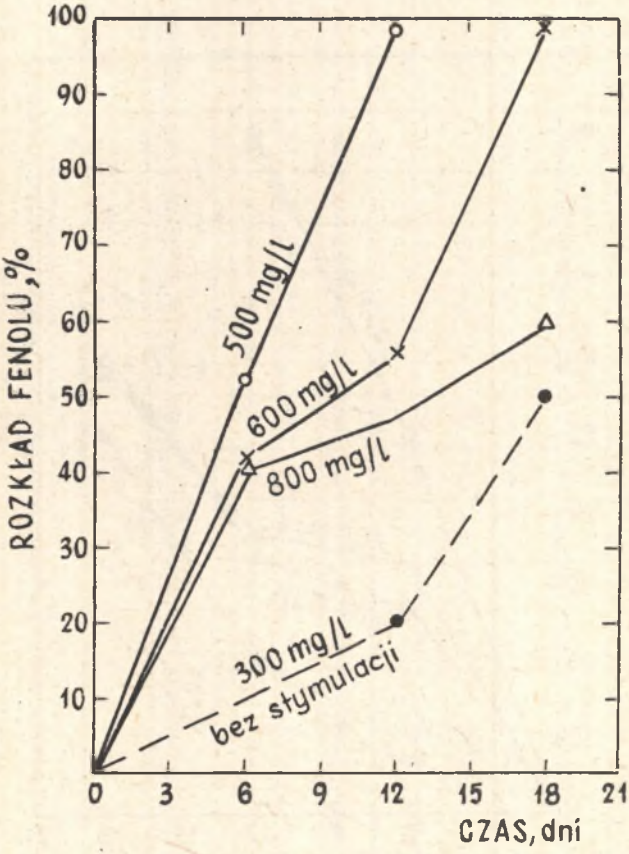
Stężenie wyjściowe fenolu w pożywce mg/l	Substancje wzrostowe nr nr																							
	1			2			3			4			5			6			7			8		
	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu
500	6	250	50,0	6	238	52,5	6	333	33,5	6	308	38,5	6	294	41,0	6	333	33,5	6	377	24,5	6	400	20,0
500	12	10	98,0	12	śl.	100	12	120	76,0	12	śl.	ok.100	12	100	80,0	12	170	66,0	12	180	64,5	12	250	50,0
600	6	400	33,0	6	348	42,0	6	500	16,5	6	500	16,5	6	400	33,3	6	500	16,5	6	527	12,0	6	570	5,0
600	12	378	37,0	12	267	55,5	12	465	22,5	12	500	16,5	12	364	39,5	12	378	37,0	12	500	16,5	12	445	26,0
600	18	250	58,5	18	śl.	ok.100	18	210	65,0	18	364	39,5	18	217	63,8	18	200	66,7	18	267	55,5	18	323	46,5
800	6	607	24,0	6	465	41,7	6	660	17,5	6	770	4,0	6	715	10,5	6	540	32,5	nb	nb	nb	6	650	18,5
800	18	320	60,0	18	320	60,0	18	480	40,0	18	736	8,0	18	600	25,0	18	500	37,5	18	700	13,0	18	560	30,0
300	12	240	20,0	12	240	20,0	12	240	20,0	12	240	20,0	12	240	20,0	12	240	20,0	12	240	20,0	12	240	20,0
Próby kontr.				kontr.			kontr.			kontr.			kontr.			kontr.			kontr.			kontr.		
300	18	150	50,0	18	150	50,0	18	150	50,0	18	150	50,0	18	150	50,0	18	150	50,0	18	150	50,0	18	150	50,0

Drożdże szczepu B1 udało się przystosować do rozkładu fenolu tylko do stężenia 600 mg/l w obecności 2 mg/l kwasu naftylooctowego, jego soli sodowej oraz soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego. Inne substancje stymulujące działały słabo na rozwój komórek tego szczepu. W badanym okresie hodowlanym nie udało się uzyskać rozkładu fenolu wyższego od 60%.



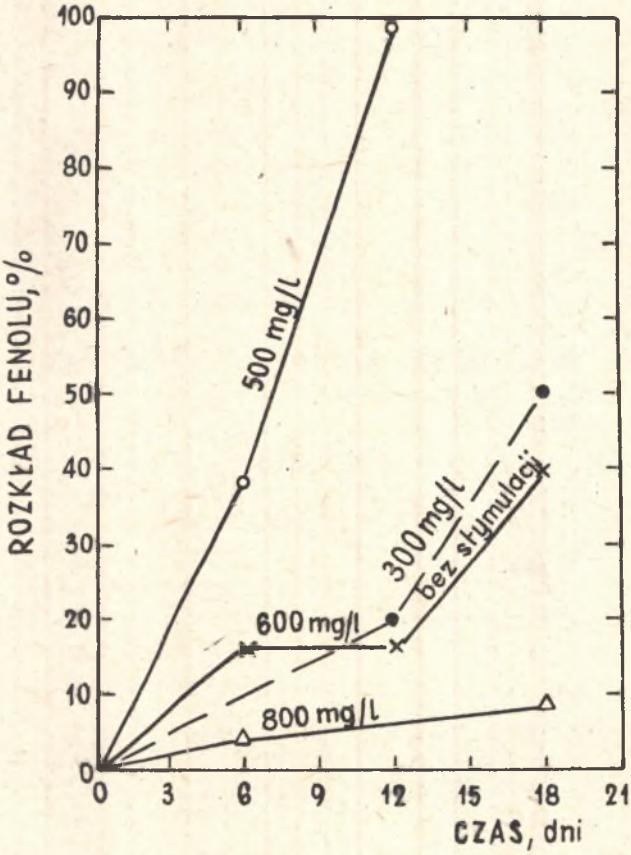
Rys. 1. Wpływ 2,0 mg/l kwasu α-naftylooctowego (preparat 1) na adaptację drożdży szczepu C2 do rozkładu fenolu w stężeniu od 500-800 mg/l

Drożdże szczepu A1 i C3 można było zaadaptować tylko do rozkładu fenolu w stężeniu 400 mg/l w obecności soli sodowej kwasu naftylooctowego. Pozostałe stymulatory działały znacznie słabiej. Tak samo w tych warunkach drożdże szczepów A1 i C3 powodowały najwyżej 60% spadek stężenia fenolu.



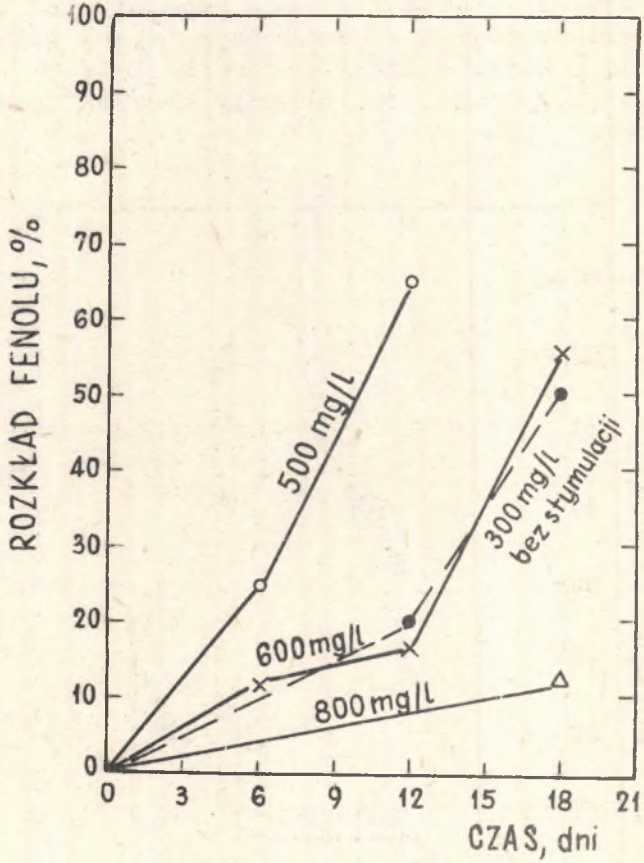
Rys. 2. Wpływ 2,0 mg/l soli sodowej kwasu naftylooctowego (preparat 2) na adaptację szczepu C2 do rozkładu fenolu w stężeniu od 500-800 mg/l

Uwzględniając obserwacje mikroskopowe oraz pomiary liczebności komórek w przeprowadzonych próbach stwierdzono, że najsilniejszy wpływ stymulujący na wzrost ilości komórek użytych szczepów drożdży ma kwas β-indolooctowy. Komórki w tych próbach były jednak znacznie mniejsze, zaś rozkład fenolu w obecności tej substancji wzrostowej, w porównaniu z innymi stymulatorami, był słabszy. Stwierdzono, że wzrost drożdży intensyfikowała podobnie też sól sodowa kwasu naftylooctowego z równoczesnym jednak wpływem na rozkład fenolu. Komórki drożdży w obecności tej substancji stymulującej były duże, zaś zespoły komórek przestrzennie rozgałęzione.



Rys. 3. Wpływ 2,0 mg/l soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego (preparat 4) na adaptację szczepu C2 do rozkładu fenolu w stężeniu od 500-800 mg/l

Porównując ze sobą własności badanych szczepów stwierdzono, że tylko drożdże szczepu C2 miały duże rozmiary komórek i w związku z tym, też dobrze sedymentowały. Uwzględniając dużą zdolność rozkładu fenolu przez drożdże szczepu C2, wytypowano je do dalszych badań.



Rys. 4. Wpływ 2,0 mg/l kwasu β-indolooctowego (preparat 7) na adaptację drożdży szczepu C2 do rozkładu fenolu w stężeniu od 500-800 mg/l

W trzeciej części badań, po przystosowaniu drożdży szczepu C2 do stężenia 1000 mg/l fenolu w pożywce, rozpoczęto próby ze stałym przewietrzaniem pożywki słabo sprężonym

powietrzem. Celowość przewietrzania hodowli drożdży jest ogólnie znana i oczywista, a jak wynika z tablicy IV - przekonywająca. Zmieniono również w tych badaniach sposób zaszczepiania pożywki. Odwirowano połowę objętości próby zaadaptowanej w poprzednim stężeniu. Próby wirowano przez okres 10 minut, stosując 3000 obrotów na minutę. Po przemyciu odwirowanej masy drożdżowej jałowym roztworem soli fizjologicznej, przenoszono całość do świeżej pożywki z wyższym stężeniem fenolu. W ten sposób czas zużywany przez drożdże na rozłożenie danej dawki fenolu skrócono o okres namnażania się hodowli.

W tej części badań adaptowano drożdże szczepu C2 do rozkładu fenolu w stężeniach od 1000 do 1800 mg/l oraz użyto dawkę stymulatorów w ilości 2 mg/l. Przystosowanie to przebiegało sprawnie i bez większych trudności. Poszczególne stopnie, związane ze zwiększeniem stężenia fenolu o 200 mg/l wymagały okresu 3 do 4 dni. Przebieg tego etapu obrazuje tablica V. Równolegle przeprowadzono próbę kontrolną hodowli drożdży szczepu C2 bez stymulatorów. Próbę tę zaszczepiano drożdżami przystosowanymi do wysokich stężeń fenolu w obecności czynnych substancji wzrostowych, ponieważ tylko w tym wypadku hodowla jej przebiegała prawidłowo.

Pomiary przyrostu biomasy drożdży szczepu C2 uzyskanej z rozkładu fenolu przeprowadzono przy wyjściowym stężeniu 1000 mg/l fenolu w pożywce Raedera. Hodowlę drożdży dla tych pomiarów rozwijano od małego inoculum, podobnie jak na początku badań. Po 4 dniach hodowli drożdże po odwirowaniu i przemyciu przenoszono na odważone sączki ilościowe i po wysuszeniu do stałej wagi w 105°C, ważono [19]. Wyniki doświadczeń zestawiono w tablicy VI. Współczynnik ekonomiczny wykorzystania substratu obliczono według LEIBNITZa [8].

W dalszym ciągu przeprowadzono również orientacyjne badanie przyswajalności innych pochodnych fenolu jako jedynego źródła węgla przez szczep drożdży C2. Do badań użyto chemicznie czyste preparaty: para i ortokrezol, hydrochinon, rezorcyna, pirokatechina i floroglucyna. Wyniki tych doświadczeń w przedziale stężeń od 200 mg/l do 1800 mg/l obrazuje tablica VII. W tej części badań nie sprawdzano analitycznie stopnia rozkładu fenoli i kierowano się wyłącznie obserwacjami makro- i mikroskopowymi rozwoju populacji drożdżowej. Jako zaszczepienie stosowano jak na po-

Tablica IV

Rozkład fenolu przez drożdże szczep C2 i B1 w obecności 2,0 mg/l różnych stymulatorów, w hodowlach nieprzewietrzanych i przewietrzanych

Symbol szczepu drożdży	Początkowe stężenie fenolu	Symbol stymulatora	Nieprzewietrzane						Przewietrzane	
			6 dni		14 dni		21 dni		6 dni	
			stężenie fenolu mg/l	% rozkł. fenolu	stężenie fenolu mg/l	% rozkł. fenolu	stężenie fenolu mg/l	% rozkł. fenolu	stężenie fenolu mg/l	% rozkł. fenolu
C2	950	1	760	20	600	37	500	48	190	80
	950	2	760	20	655	31	600	37	śl.	100
	950	3	770	18	650	32	500	48	380	60
	950	4	770	18	635	33	615	35	0	100
	950	5	930	3	715	25	570	40	427	55
	950	6	735	23	665	30	600	37	190	80
	950	8	770	18	570	40	500	48	380	60
	950	X	nb	nb	nb	nb	nb	nb x)	513	46
	950	XX	950	-	950	-	950	-	930	2
B1	700	2	700	0	brak rozwoju				690	1
	700	4	700	0	500	29	-	-	660	6
	700	XX	700	0	-	-	-	-	685	1

X - Próby kontrolne bez stymulatora zaszczepione drożdżami.

XX - Próby kontrolne bez stymulatorów i bez dodatku drożdży.

x) - Próby nieprzewietrzane i bez stymulatora nie rozwijały się.

Tablica VI

Wydajność biomasy drożdży szczepu C2
w czasie hodowli na pożywce Raedera zawierającej fenol
w stężeniu 1000 mg/l z dodatkiem różnych stymulatorów w ilości 2,0 mg/l

Symbol stymulatorów	Nazwa stymulatorów	Ilość rozłożonego fenolu w hodowli po:				Wytworzona biomasa mg/l	Współczynnik ekonomiczny wykorzystania fenolu
		72 godz.		96 godz.			
		mg/l	%	mg/l	%		
1	Kwas naftylooctowy	800	80	1000	100	385	38
2	Sól sodowa kwasu naftylooctowego	600	60	1000	100	447	45
3	Kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy	330	33	1000	100	150	15
4	Sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego	1000	100	-	-	650	65
5	Kwas p-nitrofenoksyoctowy	500	50	1000	100	236	24
6	Sól sodowa kwasu p-nitrofenoksyoctowego	600	60	1000	100	368	37

Tablica VII

Przystosowanie drożdży szczepu C2 do wyższych stężeń kilku pochodnych fenolowych w hodowlach napowietrzanych, częściowo z dodatkiem 0,02 mg/l substancji wzrostowych

Stężenie fenoli mg/l	o-krezol	p-krezol	Hydrochinon	Pirokatechina	Rezorcyna	Floroglucyna	Uwagi
	Ilość dni potrzebnych do wyraźnego rozwoju kultury						
200	2	2	2	2	2	2	
400	brak wzrostu	2	2	2	2	2	Liczby w nawiasach oznaczają symbol stymulatora
600	6(1,2,4)	4(1,2,4)	2	2	2	2	
800	brak wzrostu ze stymulatorem	brak wzrostu ze stymulatorem	4	4	2	2	
1000			5	brak wzrostu ze stymulatorem	2	2(4)	
1200			2(2)		2	3(4)	
1400			2(2)		2	brak wzrostu ze stymulatorem	
1600			4(2)				
1800			brak wzrostu ze stymulatorem		2		

Tablica V

Rozdział fenolu przez szczep drożdży C2 w pożywce syntetycznej Raedera w stężeniu od 1000 do 1800 mg/l w obecności 2,0 mg/l substancji wzrostowych w warunkach aeracji

Stężenie wyjściowe fenolu w pożywce mg/l	Substancje wzrostowe nr nr																		Próby kontrolne bez stymulacji x)		
	1			2			3			4			5			6					
	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas napowietrzania w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu
1000	3	615	38,0	3	550	45,0	5	545	46,0	3	350	65,0	5	555	45,0	5	250	75,0	5	700	30,0
1200	3	473	60,6	4	600	50,0	4	685	43,0	4	715	60,0	4	665	44,5	3	577	53,5	4	577	52,0
1400	2	625	55,5	3	667	52,5	11	500	64,4	3	715	49,0	5	565	60,0	2	745	48,0	3	545	61,0
1600	9	61.	ok.100	9	650	60,0	nb	nb	nb	9	715	55,0	5	835	48,0	9	835	48,0	5	945	41,0
1800	13	1280	29	13	1050	41,0	13	1180	34	13	1200	33,0	13	1200	33,0	13	1370	24,0	13	1560	13,5

x) Próby te każdorazowo zaszczepiano drożdżami uprzednio stymulowanymi za pomocą substancji nr 2.

Tablica VIII

Próby rozkładu fenolu przez szczep drożdży C2 w rozcieńczonych ściekach koksowniczych w obecności 2,0 mg/l substancji wzrostowych w warunkach aeracji

Stężenie wyjściowe fenolu w pożywce mg/l	Substancje wzrostowe nr nr																		Próby kontrolne bez drożdży		
	1			2			3			4			5			6					
	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas rozkładu fenolu w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu	Czas napowietrzania w dobach	Stężenie fenolu mg/l	% rozkładu fenolu
1050	1	710	32,5	1	770	26,5	1	666	36,5	1	727	30,5	1	950	9,5	1	666	36,5	1	1000	5,0
1050	2	666	36,5	2	750	28,5	2	645	38,5	2	727	30,5	2	800	24,0	2	615	41,5	2	950	9,5
1050	3	615	41,5	3	570	46,0	3	520	50,5	3	570	46,0	3	666	36,5	3	550	47,5	3	900	14,0
1050	4	470	55,5	4	533	49,0	4	400	62,0	4	470	55,0	4	570	46,0	4	470	55,0	4	880	16,0
1050	5	344	67,0	5	400	62,0	5	180	83,0	5	244	77,0	5	400	62,0	5	400	62,0	5	850	19,0
1050	6	211	80,0	6	186	82,5	6	180	83,0	6	186	82,5	6	200	81,0	6	180	83,0	6	785	25,0

czątku 1/10 część zawiesiny poprzedniej hodowli drożdży. Próby napowietrzano od początku adaptacji do wyższych stężeń fenoli. Substancje stymulujące wprowadzono dopiero w wypadku wyraźnego spadku aktywności wzrostowej drożdży w danym środowisku. Jako substancje wzrostowe użyto tutaj dawki 2 mg/l kwasu 1-naftylooctowego oraz jego soli sodowej, jako też soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego.

W celu sprawdzenia praktycznej przydatności szczepu C2 do przyswajania fenoli ze ścieków fenolowych zbadano także zachowanie się tych drożdży w środowisku fenolowych ścieków koksochemicznych. Hodowlę prowadzono w warunkach aeracji z dodatkiem 2,0 mg/l stymulatorów, w temperaturze 25°-27°C i przy pH = 4,5 na pożywce Raedera, w której źródło węgla zastąpiono odpowiednią dawką badanych ścieków aż do stężenia 1050 mg/l fenoli. Pożądane pH nastawiono przy użyciu kwasu siarkowego. Świeżą pożywkę w ilości 100 ml zaszczepiano 10 ml zawiesiny drożdży z niższego stopnia stężenia fenoli. Już po około 24 godzinach obserwowano wyraźne zmętnienie pożywki, świadczące o rozwoju drożdży. Po 5 do 6 dniach hodowli, zależnie od użytego stymulatora, stwierdzono rozkład fenoli dochodzący od 80,0 do 83,0% (tablica VIII). Zawiesina drożdży po przerwaniu napowietrzania dobrze osiadała, płyn był klarowny, a charakterystyczne żółtobrunatne zabarwienie ścieków koksowniczych wyraźnie zmalało.

W dalszych badaniach stwierdzono też wybitny wpływ temperatury na proces zdrożdżowania; spadek temperatury nawet do 20°C hamował wyraźnie rozwój drożdży i rozkład fenoli.

Dobre działanie stymulujące wykazały preparaty: kwas 1-naftylooctowy, kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy, sól sodowa tego kwasu oraz sól sodowa kwasu p-nitrofenoksyoctowego.

Omówienie wyników

Wyosobnione ze środowiska naturalnego swoiste szczepy drożdży fenolowych zostały zaadaptowane do możliwie najwyższych stężeń fenolu na pożywce mineralnej Raedera.

Pierwszy etap badań obejmował sprawdzenie możliwości i warunków adaptacji wyselekcjonowanych szczepów drożdży do wysokich stężeń fenoli oraz jego rozkładu w warunkach sta-

tycznych, bez przewietrzania i mieszania. Stwierdzono, że adaptacja ta przebiegała bardzo wolno, dla wyższych stężeń fenoli ponad 15 do 20 dni. Jedynie szczep C2 wykazywał lepsze zdolności adaptacyjne oraz zdolny był do przyswajania fenoli, jako jedynego źródła węgla. W słabszym stopniu tę cechę wykazywały też niektóre inne szczepy swoiste drożdży fenolowych, natomiast użyty do badań produkcyjny szczep Torulopsis utilis wymagał obecności dodatkowego źródła węgla, na przykład w postaci sacharozy.

Użyte do dalszych badań stymulujących preparaty substancji wzrostowych badano w stężeniu optymalnym 2,0 mg/l oraz w tych samych warunkach statycznych jak poprzednio. Chodziło o wyeliminowanie możliwie wszystkich parametrów ubocznych. W badaniach wstępnych stwierdzono słaby wpływ stymulujący na drożdże szczepu A1 i C3 soli sodowej kwasu 1-naftylooctowego i częściowo soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego - do 400 mg/l fenolu. Nieco silniejsze było działanie kwasu 1-naftylooctowego i jego soli sodowej oraz soli sodowej 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego na szczep B1 - do 600 mg/l fenolu. Najsilniej działały kwas 1-naftylooctowy i jego sól sodowa na szczep C2 - do 950 mg/l fenolu (tablica II). Z tego też względu do prób szczegółowych z wszystkimi stymulatorami użyto szczepu drożdży C2, stosując te same warunki co poprzednio (tablica III). W badaniach tych użyto stężeń fenolu do 800 mg/l oraz oznaczano procent rozkładu fenolu dla poszczególnych stymulatorów (tablica III, rysunki 1, 2, 3, 4). Stwierdzono wyraźny wpływ wszystkich stymulatorów w stosunku do próby kontrolnej, która dawała tylko 50% spadek stężenia do 300 mg/l fenolu. Najlepsze działanie wykazywały sól sodowa kwasu 1-naftylooctowego, kwas 1-naftylooctowy i sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego. Inne stymulatory działały rozmaicie w różnych stężeniach fenolu. Ogółem stwierdzono silniejsze działanie stymulujące dla niższych stężeń fenolu, na przykład dla soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego. Kwas 1-naftylooctowy i jego sól sodowa działały jednak stymulująco dość równomiernie przy wszystkich stężeniach.

Po stwierdzeniu wyraźnego wpływu stymulatorów bez przewietrzania, rozpoczęto próby nad działaniem stymulatorów z równoczesnym przewietrzaniem prób. Jak wykazuje tabela IV wpływ przewietrzania był bardzo wyraźny i skracał kilkakrotnie czas adaptacji. Już przy dość słabym przewietrza-

niu uzyskano po około 6 dniach badań 100% rozkład fenolu w obecności soli sodowej kwasu 1-naftylooctowego i soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego, a 80% dla kwasu 1-naftylooctowego i soli sodowej kwasu p-nitrofenoksyoctowego. Natomiast bez przewietrzania jeszcze po 21 dniach rozkład fenolu nie przekraczał 35 do 48%. Odnosiło się to wyraźnie do szczepu C2. Szczep B1 w tych samych warunkach nie wykazywał widocznych tendencji adaptacyjnych.

Systematyczne badania z większością stymulatorów w warunkach aeracji i przy użyciu większych stężeń fenolu przeprowadzono więc tylko na szczepie C2. Działanie stymulatorów, choć wyraźnie widoczne, było bardzo nierównomierne, a także nieproporcjonalne do niższych stężeń fenolu. Jedynie kwas 1-naftylooctowy dawał około 100% rozkład przy stężeniu 1600 mg/l fenolu po około 9 dniach. Inne natomiast nieznacznie przewyższały rozkład fenolu uzyskany przez drożdże bez dodatku stymulatora.

Powyższe wyniki świadczą o tym, że reakcja drożdży na działanie stymulatorów jest w dużym stopniu uzależniona od mało uchwytnych zmian czynników zewnętrznych. Niejednoznaczność działania stymulatorów zaznaczała się i w innych wypadkach. Typowym przykładem była hodowla szczepu B1 gdzie w każdym kolejnym stężeniu inny z działających stymulatorów osiągał maksymalną wydajność.

Stwierdzono, że każdorazowo dodatek substancji wzrostowej do pożywki nie jest konieczny. Badane drożdże zaadaptowane do danych warunków mogły rozwijać się nadal, wykorzystując fenol w wysokich stężeniach. W omawianych warunkach zaobserwowano, że nie stymulowana hodowla następująca po stymulowanej, może dać szybszy rozkład fenolu od hodowli bez przerwy stymulowanej. Wielokrotne przeszczepianie nie stymulowanej kultury doprowadzało jednakże do wstrzymania rozwoju hodowli. Prawdopodobnie tłumaczy się to wyczerpywaniem się zdolności adaptacyjnych przez ciągle rozmnażającą się populację. Rozwój drożdży przeszczepionych po raz trzeci bez stymulatora w stężeniu 1000 mg/l fenolu był hamowany. Stężenie 1800 mg/l fenolu było granicznym stężeniem osiąganym w omawianych warunkach pracy przez szczep C2.

Sprawdzając wpływ stymulatorów na adaptację drożdży szczepu C2 do wyższych stężeń innych fenoli stwierdzono tylko w wypadku hydrochinonu i floroglucyny dodatni wpływ stymulatorów na rozwój populacji drożdży. Graniczne stęże-

nia orto- i parakrezolu oraz pirokatechiny bez stymulacji, a także przy użyciu substancji wzrostowych nie przekroczyło 600 do 800 mg/l. Przy zastosowaniu natomiast rezorcyny jako jedynego źródła węgla w pożywce, drożdże szczepu C2 rozwijały się dobrze do stężenia 1800 mg/l substratu i nie wymagały użycia stymulatorów wzrostu (tablica VII).

Wpływ stymulatorów na proces syntezy masy drożdżowej (biomasy) tylko częściowo pokrywał się z ich wpływem na rozkład fenolu. Sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego dawała zarówno wysoki rozkład fenolu, jak też i wysoki przyrost masy komórkowej - współczynnik ekonomiczny 65%. Gorszy nieco rezultat dawała sól sodowa kwasu naftylooctowego i sam kwas, zaś inne stymulatory powodowały całkowity rozkład fenolu po 96 godzinach, lecz przyrost masy komórkowej był niższy - współczynnik ekonomiczny od 15 do 37% (tablica VI). Wyniki te wskazują na dobre prognozy praktycznego rozwiązania problemu.

Również dalsze badania nad wpływem większości badanych stymulatorów na rozkład fenoli zawartych w ściekach koksochemicznych wykazały dobre wyniki. Przy stężeniu fenoli lotnych do 1050 mg/l w pożywce uzyskano po 5 do 6 dniach hodowli ponad 80% ich rozkład przy dobrych warunkach technicznych produktu (tablica VIII).

Jeśli wziąć pod uwagę konieczność zastosowania w praktyce metody ciągłej, udoskonalonej na przykład przez Riechego [12] a którą zamierzamy jeszcze przepracować, to spodziewane wyniki praktyczne mogą być o wiele lepsze, w szczególności krótszy czas hodowli.

STRESZCZENIE

Wyosobniono szereg szczepów tak zwanych drożdży fenolowych ze ścieków koksochemicznych oraz zaadaptowano je do rozkładu rosnących stężeń fenolu na pożywce Raedera.

Wyosobniony szczep C2 odznaczał się łatwością adaptacji oraz rozwojem na pożywce fenolowej jako wyłącznym źródle węgla. Badany szczep produkcyjny Torulopsis utilis zużywał większe stężenia fenolu tylko w obecności sacharozy.

Do dalszej adaptacji użyto 8 substancji wzrostowych typu auksyn, stosowanych w optymalnej dawce 2,0 mg/l. Optymalne pH wynosiło około 4,5, temperatura hodowli 25 do 27°C. Doświadczenia adaptacyjne prowadzono zrazu statycznie bez mieszania i napowietrzania, a następnie z napowietrzaniem środowiska.

W badaniach bez przewietrzania stwierdzono optymalne działanie stymulujące soli sodowej kwasu naftylooctowego i samego kwasu 1-naftylooctowego. Najlepsze własności rozwojowe i asymilacyjne wykazywał nadal szczep C2, na który stymulująco działała większość użytych substancji wzrostowych.

Napowietrzanie prób bardzo wyraźnie przyspieszało stymulację rozkładu fenolu, przy czym najsilniej stymulowała sól sodowa kwasu naftylooctowego i sól sodowa kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego oraz kwas 1-naftylooctowy i sól sodowa kwasu p-nitrofenoksyoctowego. Wzrastające stężenia fenolu do 1800 mg/l powodowały już nierównomierność stymulacji poszczególnych preparatów.

Tworzenie biomasy u szczepu drożdży C2 nie było współmierne z procentowym rozkładem fenolu i najlepsze wyniki w tym kierunku uzyskano przy zastosowaniu soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego oraz nieco gorsze z solą sodową kwasu naftylooctowego i kwasem 1-naftylooctowym. Współczynnik ekonomiczny dochodził do 65%.

Orientacyjne badania stymulującego działania badanych preparatów na rozkład pochodnych fenolu wykazały bardzo słabe ich działanie na orto- i para-krezol oraz na pirokatechinę, lepsze nieco na floroglucynę i hydrochinon, zaś rezorcyna rozkładana była przez szczep C2 bez stymulacji do stężenia 1800 mg/l.

Badania porównawcze działania stymulatorów na rozkład koksochemicznych ścieków fenolowych jako jedynego źródła węgla w pożywce Raedera przy stężeniu fenoli lotnych 1050 mg/l przez drożdże szczepu C2, wykazały 80 do 83% rozkład fenoli już po 5 do 6 dniach.

Przewiduje się dalsze badania nad skróceniem czasu hodowli drożdży fenolowych przy użyciu metod ciągłych.

Politechnika Śląska
Katedra Biologii Sanitarnej

LITERATURA

[1] MEISSNER B.: "Untersuchungen über die Beseitigung phenolhaltiger Abwässer durch biologische Reinigungsverfahren" - Wasserwirtschaft - Wassertechnik 5, 82 (1955).

[2] PUTILINA N.T.: "Obesfenoliwanije stocznych wod koksochimiczeskich zawodow putiom primenienija czistych kultur fenolrazruszajuszczych mikrobow" - Gigiena i Sanitaria z. 12, 8 (1952).

[3] BRINGMANN G.: "Versuche zum biologischen Abbau von Phenolen im Belüftungsverfahren durch Mikroorganismen d. Gattung Nocardia" - Ges. Ing. 75, 252 (1954).

[4] LEIBNITZ E., BEHRENS U., SATTLER K., KAPITZA I SCHAUER E.: "Einige Aspekte zur Biosynthese von Vitamin B_{12} bei der biologischen Reinigung von Industrieabwässern" - Zeitschr. f. Allg. Mikrobiologie 2, 231 (1962).

[5] ZIMMERMANN R.: "Über phenolspaltende Hefe" - Naturwiss. 45, 165 (1958), (Ref. p. 6: 11).

[6] LEIBNITZ E., BEHRENS U., SEIFERT H.: "Abbau von Phenolen durch Hefe" - Zeitschrift f. Allgem. Mikrobiologie 1, 13 (1960).

[7] KLUCZYCKI K., KARCZEWSKA H., KUBACZKA E.: "Zagadnienie zdrożdżowania ścieków fenolowych. I. Charakterystyka i diagnostyka kilku szczepów drożdży fenolowych wyosobnionych ze ścieków koksochemicznych" - w przygotowaniu do druku.

[8] LEIBNITZ E., BEHRENS U., ZDARSA E.: "Über die mikrobielle Eiweisssynthese mit fettsaurehältigen Abwässern. I. Adaptation von Mikroorganismen an hohe Fettsäurekonzentration und Auswahl geeigneter Organismen" - Wasserwirtschaft-Wassertechnik 9, 167 (1959).

[9] LEIBNITZ E., BEHRENS U., SIKORA M.: "Über die mikrobielle Eiweisssynthese mit Fettsäurehaltigen Abwässern. II. Erste Studie über die Möglichkeit einer Verhefung von Fettsäure-Abwässern" - Wasserwirtschaft-Wassertechnik 9, 342 (1959).

[10] RIECHE A. i in.: "Beiträge zur mikrobiologisch-technischen Zellsubstanzsynthese": Cz. I. Mitt.Acta biol. med. germ. 1, 565 (1958), Cz. II. Mitt Acta biol.med. germ. 3, 20 (1959), Cz. III. Mitt. Acta biol. med. germ. 4, 98 (1960), Cz. IV. Mitt. Acta biol. med.germ. 6, 279 (1961).

[11] RIECHE A., HILGETAG G., MARTINI A., LORENZ M.: "Beiträge zur mikrobiologisch-technische Zellsubstanzsynthese. V. Kultivierung von Wuchshefe (Torula utilis) auf Fettsäuren und Phenole enthaltenden Substraten" - Wasserwirtschaft-Wassertechnik 12, 27 (1962).

[12] RIECHE A., HILGETAG G., MARTINI A., SEEBOTH H., LORENZ M.: "Reinigung und Verwertung industrieller Abwässer" - Akademie Verlag, Berlin (1962).

[13] THONKE H., LORENZ M.: "Versuche zur biologischen Verwertung von Abwässern der Paraffinoxydation" - Wasserwirtschaft-Wassertechnik 13, 227 (1963).

[14] HARRIS G., RICKETTS R.W.: "Metabolism of phenolic compounds by yeasts" - Nature 195, 473 (1962).

[15] LILLY G.V., BARNET H.L.: "Fizjologia grzybów"-Państw. Wyd. Roln. i Leśne, Warszawa (1959).

[16] STRASSBURGER E. i inni: "Botanika" - Państw. Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa (1960).

[17] BER A.: "Hormony wzrostu roślin zielonych, grzybów i bakterii" - Książka i Wiedza, Warszawa (1950).

[18] PALUCH J.: "Niektóre zagadnienia z fizjologii kiełkowania jęczmienia browarnego przy użyciu substancji wzrostowych". Acta Agraria et Silvestria, Ser. roln. 1, 113 (1961).

[19] ŁURIE I., RYBNIKOWA A.: "Metody analizy chemicznej ścieków przemysłowych" - Warszawa PWT (1955).

ДРОЖЖЕОБРАЗОВАНИЕ ИЗ ФЕНОЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД

II. ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА РАЗВИТИЕ ДРОЖЖЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ФЕНОЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД И ИХ МЕТАБУЛИЗМ ФЕНОЛА

Р е з ю м е

Выделено ряд штаммов так называемых фенольных дрожжей из сточных вод коксохимического производства, а также адаптировано их к деградации растущих концентраций фенола на питательной среде Редера.

Полученный штамм С2 отмечался свободной адаптацией и развитием на фенольной питательной среде, как единым источником углерода. Исследуемый производственный штамм Torulopsis utilis употреблял большую концентрацию фенола только в присутствии сахароза.

Для дальнейшей адаптации употреблено 8 субстанции роста типа ауксин, применяемых в оптимальной дозе 2,0 мг/л. Оптимальное pH было ряда 4,5, температура выращивания 25 до 27°С. Адаптационные опыты производились сначала статически без перемешивания и аэрации, затем с аэрацией.

В исследованиях без аэрации обнаружено оптимальное стимулирующее действие натриевой соли нафтилуксусной кислоты и самой 1-нафтилуксусной кислоты. Оптимальные свойства развития и ассимиляции проявлял и в дальнейшем штамм С2, на которую стимулирующе действовало большинство употребленных стимуляторов роста.

Аэрация образцов очень ярко ускоряет стимуляцию деградации фенола, причем, наиболее сильно стимулируют натриевая соль нафтилуксусной кислоты и натриевая соль 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты, а также 1-нафтилуксусная кислота и натриевая соль р-нитрофеноксиуксусной кислоты. Повышающаяся концентрация фенола до 1800 мг/л вызывала уже неравномерность стимуляции отдельных препаратов.

Образование биомассы и штамма С2 не было соразмерно с процентной деградацией фенола и оптимальные результаты в этом направлении получались при применении натриевой соли 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, а также кое что хуже с натриевой солью нафтилуксусной кислоты и 1-нафтилуксусной кислотой.

Экономический коэффициент был близок 65%.

Ориентировочные исследования стимулирующего действия исследуемых препаратов на деградацию производных фенола выявили очень слабые их действия на орто- и пара-крезол, а также на пирокатехин. Кое-что лучшие результаты получались для флороглюцина и гидрохинона, а резорции подвергался деградации посредством штамма С2 без стимуляции к концентрации 1800 мг/л.

Сравнительные исследования действия стимуляторов на деградацию фенольных сточных вод коксохимического производства, как единого источника углерода в питательной среде Редера, при концентрации летучих фенолов 1050 мг/л посредством дрожжей штамма С2 дали 80 до 83% деградации фенолов уже после истечения 5 до 6 дней.

Намечаются дальнейшие исследования по сокращению времени выращивания при применении непрерывного метода культивации дрожжей.

Силезский политехнический институт
Кафедра санитарной биологии

PRODUCTION OF THE YEASTS FROM PHENOLIC WASTE WATERS II. THE INFLUENCE OF SOME STIMULATORS OF THE GROWTH SPECIFIC YEAST STRAINS AND THEIR METABOLISM OF PHENOL

Summary

A serie of the strains of so-called phenolic yeasts has been isolated from cokery waste waters and adapted to the degradation of increasing phenol concentration on the Reader's culture medium.

The isolated strain C2 had a facility of the adaptation and growth on the phenolic culture media as the only source of carbon. The investigated strain of Torulopsis utilis was able to utilise a higher concentrations of phenol only in the presence of sucrose.

For farther acclimation of yeasts 8 growth stimulators of auxine type were used. These subtances were applied in optimal concentration of 2,0 p.p.m. Optimum pH was about 4,5 and the temperature of culture ranged of 25 to 27°C. These adaptation experiments were carried out primarily without mixing and aerating and then with aeration.

The investigations performed with no aeration showed the optimal stimulating effect of natrium salt of naphthylacetic acid and 1-naphthylacetic acid. The best growing and assimilating properties showed the yeast strain C2 which was stimulated by the majority of the applied preparations.

It was observed that the aeration of culture medium accelerated the stimulation of phenol degradation. Strong stimulating effect showed sodium salt of naphthylacetic acid, sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate, 1-naphthylacetic acid and sodium salt of p-nitrophenoxyacetic acid. The increasing concentration of substrate phenol up to 1800 ppm. have caused not equal stimulation of individual preparations.

The cell mass production of the strain C2 was not proportional to the percentage of the decomposition of phenol. The best results of growth were obtained by using of sodium salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, slightly lower with sodium naphthylacetate and with 1-naphthylacetic acid. The economical coefficient reached 65 per cent.

Preliminary trials on the stimulating action of preparation under investigation showed that their action differed accordingly to the individual phenols. It was weak on o- and p-cresol and on catechol, a little better on phloroglucinol and hydroquinone. Resorcinol was decomposed by the yeast strain C2 in the concentration of 1800 p. p.m. without stimulation.

Comparatory studies of the stimulating action of few preparation were carried out with phenolic waste waters in Reader's medium as the only source of carbon. The concentration of volatile phenols was about 1050 p.p.m. The yeast of the strain C2 decomposed those phenols in 80 to 83 per cent during 5 to 6 days.

Further investigations on the shortening of culture time in continuous method of cultivation of phenolic yeasts will be done.

Silesian Technical University
Laboratory of Sanitary Biology