

Helena PETRYCKA

WPLYW PIRYDyny NA BIODEGRADACJĘ FENOLU
PRZEZ OOSPORA sp. A₁

Streszczenie. Przeprowadzone doświadczenia przedstawiają wpływ wzrastającego stężenia pirydyny na szybkość rozkładu fenolu przez Oospora sp. A₁.

Badania wykazały, że dawki pirydyny poniżej 1000 mg/dm³ nie hamowały rozkładu fenolu, zwalniały jednak szybkość jego wykorzystania w stężeniach powyżej 600 mg/dm³.

Pirydyna jest związkiem heterocyklicznym o silnym drażniącym zapachu. Występuje jako substancja towarzysząca fenolom w wodach poprodukcyjnych z termicznej przeróbki węgla. Ma ona również szerokie zastosowanie jako surowiec w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym, skórzanym i gumowym. W odbiornikach powoduje zmiany organoleptyczne wody i działa inhibitująco na różne procesy życiowe mikroorganizmów czynnych w procesie samoozyszczenia wód. Świadczą o tym badania [1,2], które wykazały, że w ściekach miejskich dawka pirydyny powyżej 200 mg/dm³ całkowicie eliminowała proces nitryfikacji, a porcja powyżej 400 mg/dm³ hamowała rozkład związków organicznych. Z tych względów istotne wydaje się przebadanie wpływu pirydyny na rozkład fenolu, ponieważ od zawartości pirydyny, cyjanków, rodanek i innych związków występujących w wodach termicznej przeróbki węgla zależy przetwarzanie w urządzeniach biologicznego oczyszczania wód fenolowych w biomasę mikroorganizmów, zasobną w składniki odżywcze.

Zadaniem pracy było przebadanie wpływu szerokiego zakresu stężeń pirydyny na szybkość wykorzystywania fenolu jako głównego źródła węgla i energii, przez Oospora sp. A₁.

Część doświadczalna

Metodyka badań

W badaniach użyto szczep Oospora sp. A₁ wyizolowany z błony biologicznej złoża oczyszczającego poprodukcyjne wody koksownicze. Wyizolowany czysty szczep Oospora, zidentyfikowany rodzajowo [7], przechowywano na skosach brzoški słodowej.

Rozkład fenolu oraz fenolu w obecności pirydyny prowadzono na pożywce mineralnej o składzie (w g/dm³): K₂HPO₄ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,5; MgSO₄·7H₂O - 0,5; (NH₄)₂SO₄ - 0,5 oraz 1000 cm³ wody destylowanej [5] i 1 cm³ wodnego roztworu mikroelementów, zawierającego w g/dm³: FeCl₃·6H₂O - 1,7; H₃BO₃ - 0,1; ZnSO₄·7H₂O - 0,1; Co(NO₃)₂·6H₂O - 0,05; CuSO₄·5H₂O - 0,005; MnCl₂·6H₂O - 0,005; [6]. Pożywka posiadała pH = 7,0.

Tak przygotowaną pożywkę rozlewano do kolbek stożkowych o pojemności 750 cm³ w ilości po 300 cm³. Przed posianiem zawiesziny grzyba do pożywek dodawano fenol i pirydynę z roztworów przygotowanych uprzednio na wodzie destylowanej, zawierających w 1 dm³ po 20 g świeżo przedestylowanego fenolu lub pirydyny.

Adaptacja szczepu *Oospora* sp. A₁ do fenolu przy wzrastających dawkach pirydyny

Zawiesinę komórek *Oospora* sp. A₁ sporządzoną w roztworze soli fizjologicznej z 72-godzinnej hodowli na brzośnie sledowej zaszczipiano równolegle trzy pożywki zawierające po 200 mg/dm³ fenolu i trzy pożywki zawierające 200 mg/dm³ fenolu i 50 mg/dm³ pirydyny. Piesiwy hodowano metodą półciąglą, przy stałym napowietrzaniu, w temperaturze pokojowej. Po zaadaptowaniu populacji do wstępnej dawki fenolu i fenolu z pirydyną oraz po uzyskaniu około 100% ubytku fenolu z poszczególnych hodowli pobierano po 100 cm³ podłoża hodowlanego. W pobranym podłożu po odwirowaniu komórek oznaczone stężenie fenolu i pirydyny oraz pH pożywki. Natomiast do hodowli wprowadzano po 100 cm³ świeżej pożywki z odpowiednio wyższą dawką fenolu lub fenolu i pirydyny. Stężenie fenolu podwyższano przeważnie o 200 mg/dm³ aż do uzyskania stężenia 1600 mg/dm³ w obu zestawach pożywek, a dawki pirydyny stopniowo podnoszono o 100 mg/dm³ od 50-100 do 1000 mg/dm³.

Czystość mikrobiologicznego szczepu kontrolowano metodą obserwacji mikroskopowych populacji w preparatach bezpośrednich i trwałych oraz metodą posiewu na zestaloną agarem pożywkę mineralną z odpowiednią dawką fenolu.

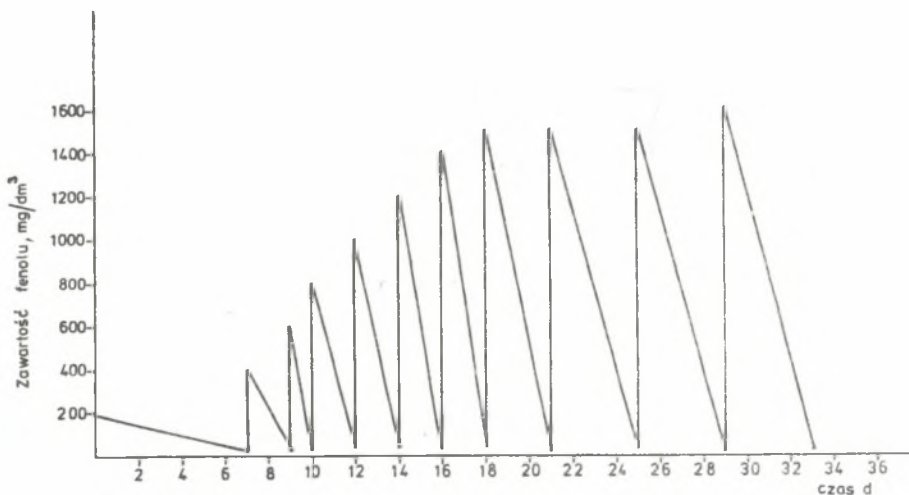
Oznaczenie stężenia fenolu i pirydyny
w podłożu hodowlanym

Wzrost populacji grzyba w chemostacie sprawdzano oznaczając obecność fenolu w podłożu metodą p-nitroanilinową [4]. Natomiast stężenie mieszaniny fenolu i pirydyny oznaczano metodą spektrofotometryczną [8], stosując spektrofotometr firmy Unicam. Rejestrowano widmo absorpcji wodnego roztworu fenolu i pirydyny w bezbarwnej i klarownej pożywce. W pomiarach wykorzystano własności pochłaniania przez fenol i pirydynę promieniowania ul-

trafiolowego. Fenol posiada maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 273$ nm, a pierścień heterocykliczny pirydyny przy $\lambda = 260$ nm. Dla uniknięcia wpływu fenolu na pomiar pirydyny jej stężenia oznaczano po stwierdzeniu metodą p-nitroanilinową, że w podłożu brak fenolu.

Wyniki i dyskusja

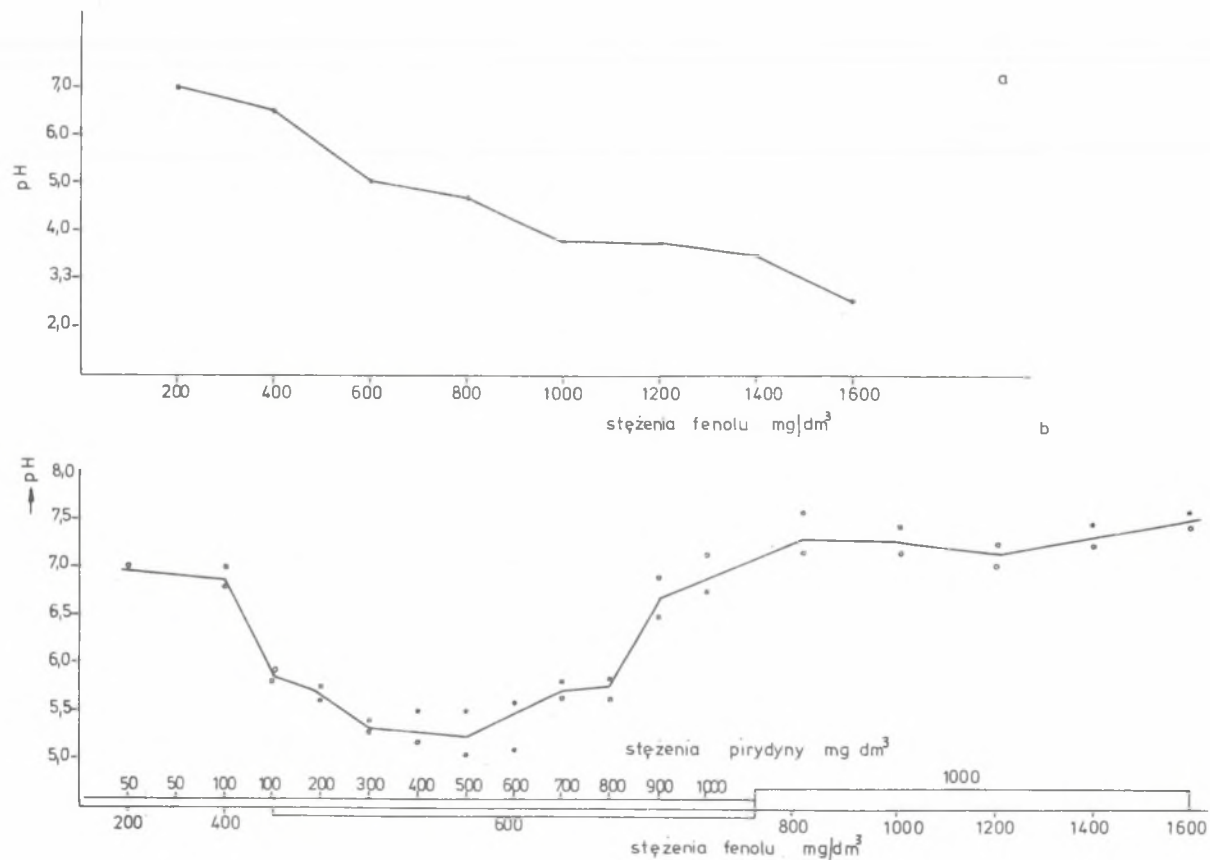
Adaptacja szczepu *Oospora* sp. A₁ do wyjściowego stężenia 200 mg/dm³ fenolu wyuosiła siedem dni. Po sześciu dniach hodowli rozkład fenolu wynosił od 53 do 65%, a po siedmiu dniach 90-95%. Następne dawki fenolu, podwyższone stopniowo po 200 mg/dm³ aż do stężenia 1400 mg/dm³, rozkładane były przeważnie w ciągu 48 godzin. Wyższe dawki fenolu - 1500 i 1600 mg/dm³ wymagały już dłuższego czasu i dopiero po 72 lub 96 godzinach hodowli ulegały rozkładowi w 90-98% (rys. 1).



Rys. 1. Przebieg rozkładu wzrastającego stężenia fenolu w podłożu hodowlanym przez *Oospora* sp. A₁

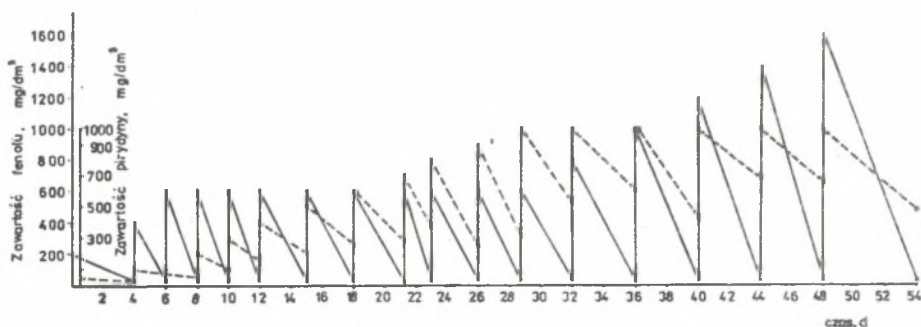
Podczas adaptacji *Oospora* sp. A₁ do stężenia 1600 mg/dm³ fenolu odczyn pożywki zmieniał się z obojętnego na kwaśny. Odczyn podłoża obniżał się z pH 7,0 do 2,5 (rys. 2). Spadek odczynu wynikał przypuszczalnie z wykorzystania jonu amonowego z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jako jedynego źródła azotu.

W jednocześnie prowadzonych hodowlach grzyba z dawką 50 mg/dm³ pirydyny degradacja wyjściowego stężenia 200 mg/dm³ fenolu zachodziła po czterech



Rys. 2. Zmiany pH podłoża w hodowlach półciągłych *Oospira sp.*A, wykorzystującego jako główne źródło węgla:
 a - fenol, b - fenol i pirydynę

rech dniach. Wyższe dawki fenolu 400 i 600 mg/dm³ w obecności od 100 do 300 mg/dm³ pirydyny rozkładane były w czasie 48 godzin, podobnie jak w hodowlach bez pirydyny. Przy dalszym stopniowym podwyższaniu stężenia pirydyny w hodowlach po 100 mg/dm³ do dawki 1000 mg/dm³, utrzymywane w tym okresie hodowli na stałym poziomie stężenie 600 mg/dm³ fenolu rozkładane było przeważnie po 72 godzinach trwania hodowli (rys. 3). Natomiast wyższe dawki fenolu sukcesywnie podwyższane do 800, 1000, 1200 i 1400 mg/dm³ w obecności 1000 mg/dm³ pirydyny ulegały degradacji po 96 godzinach hodowli, zaś stężenie 1600 mg/dm³ wymagało już czasu od 3 do 7 dni (rys. 3).



Rys. 3. Przebieg rozkładu fenolu przez *Oospora sp. A1* w obecności wzrastających dawek pirydyny
fenol ●—●, pirydyna ●— — — ●

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że nawet dawka 1000 mg/dm³ pirydyny nie hamowała rozkładu fenolu przez *Oospora sp. A1*, lecz zwalniała szybkość jego wykorzystania (rys. 3). W obecności 1000 mg/dm³ pirydyny szybkość rozkładu fenolu zależała od jego stężenia; im wyższe było stężenie fenolu, tym wolniej przebiegał jego rozkład (rys. 3).

Uzyskanych wyników nie można porównać z danymi w dostępnej literaturze, ponieważ dotychczasowe badania [3,9], nie wykazujące ujemnego wpływu pirydyny na przebieg biologicznego oczyszczenia wód fenolowych, były prowadzone tylko dla niskich stężeń pirydyny do 300 mg/dm³ i małej koncentracji fenoli do 150 mg/dm³.

W badaniach stwierdzono, że dawkowana do podłoża pirydyna także ulegała rozkładowi. Stopień jej degradacji przy 100% wykorzystaniu każdej porcji fenolu wynosił średnio od 40 do 50% (rys. 3).

Rozkładana pirydyna działała buforująco na podłoże hodowlane. Początkowo hamowała spadek odczynu poniżej pH 5,0 - obserwowany w hodowlach grzy-

ba na podłożu a fenolem lub pirydyny (rys. 2a). Zaś dawka 1000 mg/dm³ pirydyny przy stężeniach fenolu od 600 do 1600 mg/dm³ powodowała wzrost pH podłoża do 7,6 (rys. 2b). Występujące zmiany w odczynie podłoża przypuszczalnie były wywołane wzrostem w środowisku hodowlanym zawartości azotu amonowego pochodzącego z rozkładu pirydyny. Zdaje się na to wskazywać wzrost zawartości azotu amonowego w ściekach miejskich oczyszczonych osadem czynnym zaadaptowanym do degradacji pirydyny w stężeniach 500 i 700 mg/dm³, obserwowany przez Gomółków B. i E. oraz Gomółkę B. [1,2]. Autorzy sugerują, że wzrost koncentracji azotu amonowego i odczynu oczyszczonych ścieków był wywołany większą ilością rozłożonej pirydyny oraz całkowitym wyeliminowaniu procesu nitryfikacji.

Wnioski

1. Użyty w doświadczeniu grzyb *Oospora* Sp. A₁ rozkładał podnoszone stopniowo do 200 mg/dm³ dawki fenolu od 200 do 1400 mg/dm³ w czasie 48 godzin hodowli.
2. W hodowlach z pirydyną w porożach od 50 do 300 mg/dm³ fenol w stężeniu od 200 do 600 mg/dm³ był rozkładany również w czasie 48 godzin. Natomiast wyższe dawki pirydyny od 400 do 1000 mg/dm³ powodowały wydłużenie czasu potrzebnego do rozkładu fenolu w stężeniach od 600 do 1400 mg/dm³ z 48 do 72 i 96 godzin trwania hodowli.
3. W hodowlach *Oospora* sp. A₁ na podłożu z fenolem i pirydyną około 100% rozkładowi fenolu towarzyszyło 40-50% wykorzystanie pirydyny, co ujawniało się wzrostem odczynu (pH) podłoża. Przypuszczalnie zachodząca biodegradacja pirydyny wpływała na powolniejsze wykorzystanie fenolu.

LITERATURA

- [1] Gomółka B., Gomółka E.: The effect of final products of pyridine biodegradation on chemical characteristics of aerated municipal wastewater. *Environment Protection Engineering* 4: 339, 1978.
- [2] Gomółka B.: Podatność benzenu i pirydyny na biochemiczny rozkład w procesie osadu czynnego. Pr. nauk. Inst. Inż. Ochr. Środ. PW, 45, Monografia 15, 1979.
- [3] Lecianova L.: Vyzkum biologického cistení fenolnych vod závodu DEZA ve val Mezirici. Závěrečná zpráva 1953.
- [4] Lurie J.J., Rybnikova A.J.: Chimicheskij analiz proizvodstviennykh stocznykh vod. *Geschimizdat Moskva*, 1968.
- [5] Putilina N.T.: Mikroby primienajemyje na promyslennykh ocsistnykh сооруženiah dla obesfenolivahija stocznykh vod. *Mikrobiologia* 28, 957, 1959.
- [6] Rodina N.: *Mikrobiologičesne metody badania wód*, PWRiL, Warszawa 1968.
- [7] Smith G.: *An introduction to Industrial Mycology*. London, Edward Arnold, 1960.

- [8] Świętosławska I.: Spektrofotometria absorpcyjna. PWN, Warszawa 1962.
- [9] Zdybiewska M., Kwiatkowska K.: Wpływ benzenu i pirydyny na biologiczne osuszanie ścieków koksochemicznych na złożach szlamowych. Zeszyty Naukowe Pol. Śl., Inż. Sanit. 8, 149, 1965.

ВЛИЯНИЕ ПИРИДИНА НА БИОДЕГРАДАЦИЮ ФЕНОЛА ООСПОРОМ СП. А₁

Р е з ю м е

В работе на основе эксперимента показано влияние возрастающей концентрации пиридина на скорость разложения фенола путём действия Ооспором сп. А₁. Исследования показали, что дозы пиридина ниже 1000 мг/дм³ не припятствовали в разложении фенола, уменьшали однако скорость его использования для концентрации выше 600 мг/дм³.

THE EFFECT OF PYRIDINE ON THE PHENOL BIODEGRADATION
BY OOSPORA SP. A₁

S u m m a r y

The studies present the effect of pyridine concentration on the decomposition velocity of phenol by Oospora sp. A₁. Pyridine portions lower than 1000 mg/dm³ have no effect on the decomposition velocity of its application in concentrations ever 600 mg/dm³.