

Razgradnja tiocijanata odabranim sojevima bakterija i združenim mješovitim kulturama

Degradation of Thiocyanates by Means of Selected Single Strains of Bacteria and Composed Mixed Culture

Tibela Landeka, V. Šoljan i Margareta Glancer

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno: 6.9.1993.

Prihvaćeno: 21.10.1993.

Sažetak

U ovom je radu prikazana aerobna razgradnja tiocijanata u kemijski definiranoj podlozi s pomoću odabranih pojedinačnih sojeva bakterija i od njih priređenih mješovitih kultura.

Provjerom aktivnosti pojedinačnih sojeva bakterija, utvrđeno je da svi sojevi pokazuju sposobnost razgradnje tiocijanata do NH_4^+ , odnosno NO_3^- .

Priređene mješovite kulture bakterija pokazale su sposobnost razgradnje tiocijanata u otpadnoj vodi koksare Bakar (Hrvatska) prevodeći tiocijanat oksidacijom u amonijak, a zatim u nitrat.

Uvod

Tiocijanati nastaju u procesu proizvodnje koksa (1,2) kao i u reakcijama niskomolekularnih hlapljivih organskih spojeva sa sumporom koji su prirodni produkti živih organizama i međuproizvodi različitih industrija (3-7).

U mikrobnoj razgradnji tiocijanata bakterije roda *Thiobacillus*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* koriste tiocijanat kao jedini supstrat i izvor energije (8-10). Među njima najviše je istražena razgradnja tiocijanata s pomoću bakterije *Thiobacillus thiocyanooxidans* (10), koja razgrađuje tiocijanat masene koncentracije i do 100 mg/L. U razgradnji tiocijanata s pomoću bakterija roda *Pseudomonas* po aktivnosti se ističe bakterija *Pseudomonas putida* (11).

Prema Kellyu (11) mogući putevi razgradnje tiocijanata s pomoću bakterija roda *Pseudomonas* prikazani su na slici 1.

Razgradnjom tiocijanata uz djelovanje enzima iz skupine cijanaza nastaju NH_3 i CO_2 (12-14).

Budući da otpadne vode koksara sadržavaju velike masene udjele fenola i tiocijanata, prije pročišćavanja potrebno ih je razrijediti. To zahtijeva reaktore velikih volumena, kao i dugo vrijeme zadržavanja, a samim tim i visoko investicijsko ulaganje (15). Prema dosad objav-

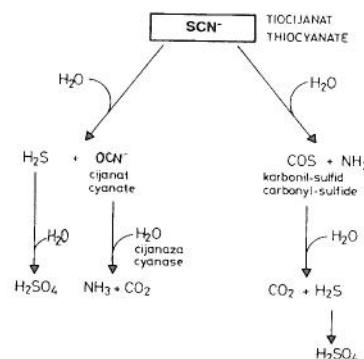
Summary

In this work the aerobic degradation of thiocyanates on a synthetic substrate by means of selected single strains of bacteria and by mixed cultures composed from these strains is presented.

By controlling the activity of single strains of bacteria it was confirmed that all strains show the capability of degradation of thiocyanate into NH_4^+ and NO_3^- , respectively.

The mixed cultures of bacteria exhibited in waste water of the Bakar cokery (Croatia) the capability of degradation thiocyanate to ammonium and then to nitrate.

ljenim rezultatima, moguće je biološki ukloniti fenol, tiocijanat i amonijak u jednostupanjskom procesu uz dodatak NaHCO_3 , s pomoću selektirane mješovite bakterijske kulture (16), kao i primjenom imobilizirane mikrobine biomase (17). Prema dosad objavljenim podacima (18) bolji rezultati uklanjanja navedenih sastojaka iz otpadne vode



Slika 1. Mogući putevi bakterijske razgradnje tiocijanata (11)
Fig. 1. Possible routes for the bacterial degradation of thiocyanate (11)

koksara postižu se u procesu biooksidacije i bioflokulacije uz dodatak Fe soli koje tvore bioferičnu flokulu.

Cilj ovog rada bio je provjeriti aktivnost odabranih sojeva bakterija da razgrađuju tiocijanat u kemijski definiranoj podlozi, te na osnovi njihove aktivnosti sastaviti mješovite mikrobne kulture koje će biti djelotvornije u razgradnji većih koncentracija tiocijanata u kemijski definiranoj podlozi i u otpadnoj vodi podrijetlom iz proizvodnje koksa.

Razgradnja tiocijanata mjerena je promjenom mase-ne koncentracije tiocijanata, te nastalih proizvoda njego-ve biorazgradnje, amonijaka, odnosno nitrata.

Materijal i metode

Bakterijske kulture

Kao početno cjepivo za razgradnju tiocijanata iz otpadne vode koksare Bakar uporabljen je zbirni aktivni mulj dobiven miješanjem mulja podrijetlom iz uređaja za pročišćavanje otpadne vode iz proizvodnje koksa u koksari Bakar i mulj uzet iz kanala kroz koji protjeće ta otpadna voda.

Iz tog je mulja izdvojeno ukupno 14 različitih tipova aerobnih bakterija od kojih 2 pripadaju aktinomicetima.

Samo 9 sojeva bakterija moglo je razgraditi tiocijanat, i to: *Flavobacterium marinum* LOV 1N, *Corynebacterium minutissimum* LOV 2N, *Corynebacterium mycetoides* LOV 3N, *Moraxella osloensis* LOV 6N, *Moraxella osloensis* LOV 10N, *Schewanella putrefaciens* LOV 9N, *Chryseomonas luteola* LOV 13N, *Pseudomonas pickettii* LOV 5N, *Citrobacter freundii* LOV 7N.

Dva soja vrste *Moraxella osloensis* razlikuju se po morfološkom izgledu izraslih kolonija (rub je kolonije soja LOV 6N ravan, a soja LOV 10N nazubljen) i brzini rasta na čvrstoj kemijski definiranoj podlozi pri 22 °C (kolonije soja LOV 6N izrasle su nakon 48 sati, a soja LOV 10N nakon 60 sati).

Bakterije su određene metodom numeričke identifikacije (uporabom kompjutorske baze podataka) u Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Sojevi su pohranjeni u zbirci mikroorganizama Laboratorija za otpadne vode (LOV) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Kulture se precjepljuju na svježu kemijski definiranu podlogu s tiocijanatom svakih 30 dana i nakon 72 sata inkubacije pri 22 °C čuvaju pri 4 °C.

Podloga

Za provjeru aktivnosti sojeva bakterija, izdvojenih iz aktivnog mulja i od njih pripremljenih mješovitih kultura, da razgrađuju tiocijanat kao jedini izvor ugljika i energije, uporabljena je kemijski definirana podloga sastava prikazanog u tablici 1.

Sve su kemikalije 99 %-tne čistoće, proizvodi tvrtke »Merck«, Darmstadt.

Podloga istog sastava, ali s fenolom (400 – 600 mg/L) kao jedinim izvorom ugljika umjesto tiocijanata primijenjena je za određivanje razgradnje fenola pripeđenim mješovitim kulturama.

Tablica 1. Sastav izmijenjene kemijski definirane podloge (19)* s tiocijanatom

Table 1. The composition of the *modified synthetic medium (19) with thiocyanate

Sastojci Components	Masena koncentracija Mass concentration γ / (mg/L)
KCNS	50 – 500
K_2HPO_4	800
$MgSO_4$	20
$FeSO_4$	20
KH_2PO_4	300
NaCl	400
KPK / (mg O ₂ /L)	
COD / (mg O ₂ /L)	60 – 650
pH**	7,9

* podloga je izmijenjena tako da je u podlozi izostavljen dodatak KNO_3 .

* The medium was modified by omitting the addition of KNO_3 .

** pH-vrijednost je namještena dodatkom 20 %-tne H_3PO_4 .

** pH-value was corrected with 20 % H_3PO_4 .

Razgradnja tiocijanata i fenola s pomoću pripremljenih mješovitih mikrobnih kultura, sastavljenih od izdvojenih sojeva bakterija, provedena je u otpadnoj vodi sastava prikazanog u tablici 2.

Aparatura i pribor

Aktivnost izdvojenih pojedinačnih sojeva bakterija da razgrađuju tiocijanat u kemijski definiranoj podlozi praćena je u Erlenmeyerovim tirkicama od 500 mL s volumenom podloge 200 mL. Uzorci su treseni na rotacijskoj tresilici pri frekvenciji vrtnje 180 min⁻¹.

Za praćenje razgradnje tiocijanata u otpadnoj vodi podrijetlom iz proizvodnje koksa uporabljena je labora-

Tablica 2. Kemijski sastav otpadne vode podrijetlom iz koksare u Bakru

Table 2. The composition of waste water from the Bakar cokery

Sastojci Components	Masena koncentracija Mass concentration γ / (mg/L)
Fenol	400 – 600
Phenol	
Tiocijanat	150 – 250
Thiocyanate	
Cijanid	5 – 8
Cyanide	
Poliaromatski ugljikovodici	10 – 20
Polyaromatic hydrocarbons	
Amonijak	40 – 80
Ammonium	
KPK / (mg O ₂ /L)	1200 – 1600
COD / (mg O ₂ /L)	
pH*	8,1 – 8,5

* Prilikom ispitivanja razgradnje sastojaka u otpadnoj vodi pH-vrijednost namještena je na 7,5 – 7,9 s 20 %-trom H_3PO_4 koja je ujedno poslužila kao izvor fosfora.

* During testing of degradation, the pH of the waste water was corrected to 7.5 – 7.9, by adding 20 % H_3PO_4 , which served also as phosphorous source.

torijska aparatura sastavljena od reaktora radnog volumena 2,5 L. Aparatura je opremljena pH-elektrodom (model MA 4268) i kisikovom elektrodom (model MA 5485) proizvodi tvrtke »Iskra« Kranj.

Mikrobnna biomasa odvajana je u centrifugi tipa »Beckman« model J-21B.

Masene koncentracije fenola, tiocijanata i mikrobnne biomase određene su spektrofotometrijski, UV-spektrofotometrom, model »Unicam« SP 1700. Masena koncentracija tiocijanata određivana je s pomoću ion-selektivne elektrode tipa ORION, model broj 9406 BN.

Masene koncentracije nitrata i amonijaka određivane su ionskim kromatografom tipa DX - 100, Dionex, Kanada.

Metode rada

Na čvrstim kemijski definiranim podlogama na Petrijevim pločama (promjera 9 cm), sastava prikazanog u tablici 1 uz dodatak agarja, umnožena je biomasa pojedinačnih sojeva bakterija.

Nakon inkubacije u termostatu, tijekom 72 sata pri temperaturi od 22 °C, s podloga je skinuta biomasa i stavljena u fiziološku otopinu volumena 20 mL.

S tako priređenim suspenzijama 9 pojedinačnih kultura nacijspljene su podloge u Erlenmeyerovim tikvicama u kojima je početna masena koncentracija tiocijanata iznosila 50 mg/L.

U podlogu je dodavana suspenzija pojedinačnih bakterijskih kultura tako da je postignuta približno ista početna vrijednost masene koncentracije biomase ($A_{546 \text{ nm}} = 0,1$).

Aktivnost pojedinačnih sojeva praćena je promjenama masene koncentracije tiocijanata (spektrofotometrijski i ion-selektivnom elektrodom) i bakterijske biomase mjerjenjem apsorbancije pri 546 nm. Postignute vrijednosti prosječni su rezultati dva usporedna uzorka od tri ponovljena pokusa.

Abiotsku razgradnju tiocijanata, istraženu u uvjetima pokusa s neaktivnom biomasom, može se zanemariti jer su promjene masenog udjela tiocijanata bile neznatne.

Na osnovi dobivenih rezultata sastavljene su mješovite kulture: peteročlana mješovita bakterijska kultura (MK₅) koju čine sojevi: *C. minutissimum*, *C. myctoides*, *S. putrefaciens*, *C. luteola* i *C. freundii*; četveročlana mješovita bakterijska kultura (MK₄) koju čine sojevi: *F. marinum*, *M. osloensis* (LOV 6N), *M. osloensis* (LOV 10N) i *P. pickettii*, te devetoročlana mješovita bakterijska kultura (MK₉ = MK₅ + MK₄).

Da bi razgradnja tiocijanata trajala što kraće, ispitani su uvjeti uzgoja priređenih mješovitih bakterijskih kultura te je nađeno da sve tri mješovite kulture pokazuju najbolju aktivnost pri pH = 7,5 – 7,7, masenoj koncentraciji otopljenog kisika $\gamma(O_2) = (0,8-1,5)$ mg/L i temperaturi $t = 22$ °C.

S priređenim mješovitim bakterijskim kulturama praćena je razgradnja tiocijanata u kemijski definiranoj podlozi pri istim uvjetima kao s pojedinačnim kulturama, osim što je masena koncentracija tiocijanata povećana od 50 na 100 mg/L, jer se razrjeđenjem otpadnih voda koksove najčešće postižu upravo takve masene koncentracije tiocijanata. Pokusi su provedeni na rotacijskoj tresilici u Erlenmeyerovim tikvicama s volumenom podloge 200 mL.

Istim postupkom istražena je i razgradnja fenola u kemijski definiranoj podlozi s pripremljenim mješovitim kulturama.

Uumnožena biomasa tako priređenih mješovitih kultura (MK₅, MK₄ i MK₉) primijenjena je kao početno cjevivo za praćenje razgradnje tiocijanata i drugih komponenata koje se nalaze u otpadnoj vodi iz proizvodnje koksa.

Prvo je proveden pokus razgradnje tiocijanata s peteročlanom mješovitom bakterijskom kulturom (MK₅) u otpadnoj vodi (sastava prikazanog u tablici 2) razrijeđenoj vodovodnom vodom 1:1. Pokus je proveden u aparaturi pri masenoj koncentraciji otopljenog kisika $\gamma(O_2) = 1$ mg/L, pH = 7,5, temperaturi $t = 22$ °C, radnom volumenu $V = 2,5$ L i početnoj masenoj koncentraciji biomase $\gamma(s.t.v.) = 1,25$ g/L. Razgradnja je praćena promjenama masene koncentracije tiocijanata, amonijaka, fenola i ukupne organske tvari izražene kao KPK-vrijednost. Uočeno je nakupljanje amonijaka.

Kako je prethodnim pokusom (s pojedinačnim kulturama) ustanovljeno da četveročlana bakterijska kultura može oksidirati amonijak nastao razgradnjom tiocijanata, supernatant dobiven odvajanjem biomase peteročlane bakterijske kulture nakon provedene razgradnje tiocijanata uporabljen je kao podloga za uzgoj četveročlane bakterijske kulture.

Analitičke metode

Masena koncentracija tiocijanata određivana je ion-selektivnom elektrodom i spektrofotometrijski s pomoću FeCl₃ (20).

Masena koncentracija amonijaka i nitrata određivana je ionskom kromatografijom uz slijedeće uvjete: kolona tipa IonPac A39-SC i IonPac A69-SC, eluat 1,8 mM Na₂CO₃ i 1,7 mM NaHCO₃ uz brzinu protoka 2 mL/min.

Ukupna organska tvar određivana je s pomoću KPK-metode oksidacijom s K₂Cr₂O₇ (20).

Masena koncentracija fenola određivana je spektrofotometrijski s pomoću 4-aminoantipirina pri valnoj duljini 510 nm (21).

Rast bakterijske kulture mjerena je s pomoću apsorbancije i suhe tvari biomase. Apsorbancija je određivana spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 546 nm. Suha tvar biomase određivana je u 10 mL uzorka tekuće kulture, centrifugiranjem pri 10 000 g tijekom 10 minuta i sušenjem biomase pri 105 °C tijekom 24 sata, a zatim vaganjem.

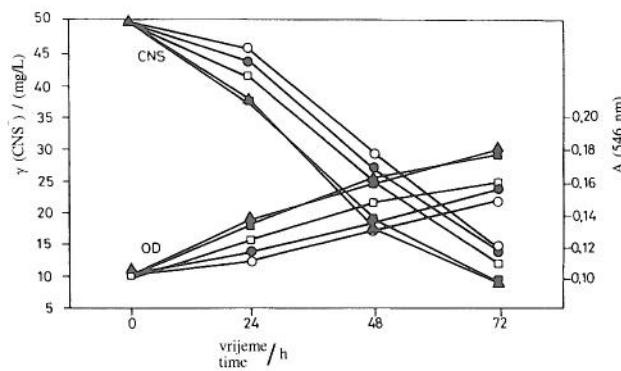
Tijekom provođenja usporednog pokusa prirast biomase definiran je preko apsorbancije pri 546 nm iz baždarnog dijagrama načinjenog iz ovisnosti masene koncentracije biomase o apsorbanciji pri 546 nm.

Kvalitativno određivanje amonijaka i nitrata provedeno je Merckovim obojenim setovima, i to za amonijak tip broj 12 558 i za nitrat tip broj 14 771.

Rezultati i rasprava

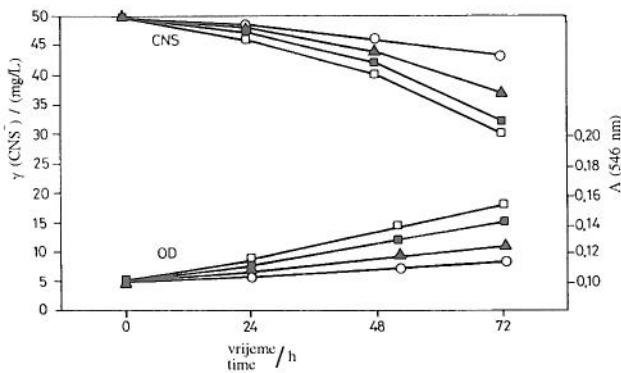
Nakon provjere aktivnosti mulja kao početnog mikrobnog cjeviva da razgrađuje tiocijanat, na čvrstim hranjivim podlogama (sastava prikazanog u tablici 1), izdvojeno je i odabранo 9 sojeva bakterija.

Na tekućoj kemijski definiranoj podlozi s tiocijanatom masene koncentracije 50 mg/L u Erlenmeyerovim tikvicama provjerena je aktivnost pojedinačnih bakterijskih kultura da razgrađuju tiocijanat kao jedini izvor ugljika i energije.



Slika 2. Razgradnja tiocijanata i rast pojedinačnih kultura bakterija (□) *Corynebacterium minutissimum*, (○) *Corynebacterium mycetoides*, (●) *Schewanella putrefaciens*, (▲) *Chryseomonas luteola* i (■) *Citrobacter freundii* tijekom submerznog uzgoja u tresenim tikvicama u kemijski definiranoj podlozi (tablica 1), pri nepromijenjenoj vrijednosti pH = 7,7 uz dodatak KCNS kao jedinog izvora ugljika, pri temperaturi od 22 °C i masenoj koncentraciji otopljenog kisika $\gamma(O_2) = (0,8-1,5)$ mg/L.

Fig. 2. Degradation of thiocyanates and the growth of biomass of the single strains of bacteria (□) *Corynebacterium minutissimum*, (○) *Corynebacterium mycetoides*, (●) *Schewanella putrefaciens*, (▲) *Chryseomonas luteola*, and (■) *Citrobacter freundii* during submerged growth in the synthetic substrate (Table 1), with constant shaking at 22 °C and at constant pH = 7.7. KCNS was added as a single source of carbon. Mass concentration of solved oxygen $\gamma(O_2) = (0.8-1.5)$ mg/L.



Slika 3. Razgradnja tiocijanata i rast pojedinačnih kultura bakterija (■) *Flavobacterium marinum*, (▲) *Moraxella osloensis* LOV 10N, (○) *Moraxella osloensis* LOV 6N i (□) *Pseudomonas pickettii* tijekom submerznog uzgoja u tresenim tikvicama u kemijski definiranoj podlozi (tablica 1), pri nepromijenjenoj vrijednosti pH = 7,7 uz dodatak KCNS kao jedinog izvora ugljika, pri temperaturi od 22 °C i masenoj koncentraciji otopljenog kisika $\gamma(O_2) = (0,8-1,5)$ mg/L.

Fig. 3. Degradation of thiocyanates and the growth of biomass of the single strains of bacteria (■) *Flavobacterium marinum*, (▲) *Moraxella osloensis* LOV 10N, (○) *Moraxella osloensis* LOV 6N and (□) *Pseudomonas pickettii* during submerged growth in the synthetic substrate (Table 1) with constant shaking at 22 °C and at constant pH = 7.7. KCNS was added as a single source of carbon. Mass concentration of solved oxygen $\gamma(O_2) = (0.8-1.5)$ mg/L.

Razgradnja tiocijanata s pomoću pojedinačnih bakterijskih kultura (slike 2 i 3) provjerena je tijekom 72 sata pri temperaturi od 22 °C u tresenim tikvicama.

Kako pokazuju vrijednosti smanjenja masene koncentracije tiocijanata (slike 2 i 3) primjenjeni bakterijski sojevi pokazali su različitu aktivnost u razgradnji tiocijanata.

Veću aktivnost imalo je 5 sojeva bakterija od kojih se posebno ističu *C. luteola* i *C. freundii* koje su postigle razgradnju tiocijanata od početnih 50 mg/L do 9 mg/L tijekom 72 (sata slika 2). Slabiju su aktivnost pokazale 4 bakterije od kojih je najaktivnija bila bakterija *P. pickettii* pri čemu je smanjena masena koncentracija tiocijanata od početnih 50 mg/L na 30 mg/L tijekom 72 sata (slika 3).

U literaturi nema podataka o razgradnji tiocijanata djelovanjem bakterija roda *Bacillus* (10), te bakterije iz roda *Pseudomonas* i *Flavobacterium* (11).

Primjenom Merckovih obojenih setova (tip 12 558 i 14 771) utvrđeno je da pojedinačne kulture bakterija tijekom submerznog uzgoja razgrađuju KCNS ne samo do amonijaka već su u stanju oksidirati amonijak u nitrat (tablica 3).

Uspoređujući dobivene vrijednosti rasta biomase tijekom razgradnje tiocijanata (slike 2 i 3) s mogućnosti nakupljanja amonijaka i nitrata tijekom njegove razgradnje (tablica 3) sastavljene su dvije mješovite kulture, i to: mješovita kultura koja ima sposobnost oksidacije tiocijanata uz nakupljanje amonijaka (peteročlana mješovita bakterijska kultura – MK₅) i mješovita kultura koja ima sposobnost oksidacije tiocijanata do amonijaka, odnosno do nitrata, tj. sposobnost oksidacije i nitrifikacije (četveročlana mješovita bakterijska kultura – MK₄).

S pomoću priređenih mješovitih kultura provjerena je razgradnja tiocijanata masene koncentracije 100 mg/L u kemijski definiranoj podlozi, u tresenim tikvicama pri 22 °C. Kinetika razgradnje tiocijanata peteročlane mješovite kulture je prikazana slikom 4, četveročlane slikom 5 i deveteročlane slikom 6.

Na osnovi postignutih rezultata razgradnje tiocijanata s pomoću pojedinačnih kultura očekivano je da će

Tablica 3. Sposobnost ispitanih bakterija da razgrađuju tiocijanat do amonijaka i nitrata, pod uvjetima opisanim u slikama 2 i 3
Table 3. Capability of the tested bacteria to degrade thiocyanates to ammonium and nitrate under the conditions described in Fig. 2 and 3

Bakterija Bacteria	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	++	-
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	++	-
<i>Citrobacter freundii</i>	++	-
<i>Schewanella putrefaciens</i>	++	-
<i>Chryseomonas luteola</i>	++	-
<i>Flavobacterium marinum</i>	+	++
<i>Pseudomonas pickettii</i>	+	++
<i>Moraxella osloensis</i> LOV 10N	+	++
<i>Moraxella osloensis</i> LOV 6N	+	++

++ nakuplja kao produkt

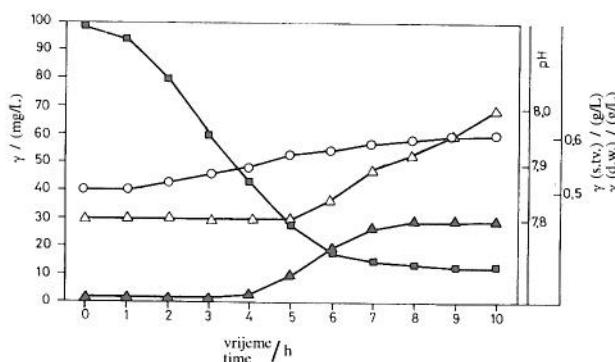
++ accumulates as the product

+ prisutnost dokazana

+ the presence was proved

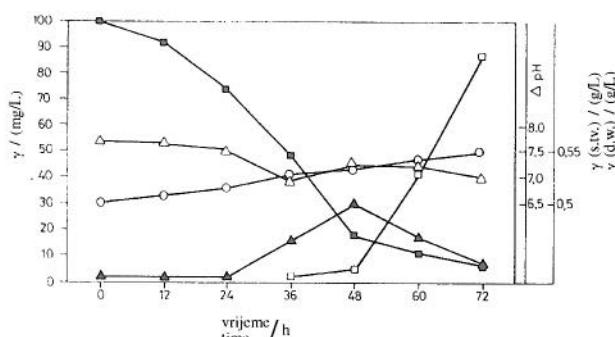
sastavljene mješovite kulture brže razgrađivati tiocijanat. Zbog toga je razgradnja tiocijanata pomoću peteročlane bakterijske kulture praćena svaki sat, a pomoću četveročlane bakterijske kulture svakih 12 sati. Za deveteročalnu kulturu razgradnja tiocijanta praćena je svakih 10 sati jer se očekivalo da će razgradnja trajati dulje negoli za peteročlanu, a kraće negoli za četveročlanu bakterijsku kulturu.

U literaturi su vrlo oskudne informacije o primjeni mješovitih kultura za razgradnju tiocijanata. Kao primjer navode se mješovite kulture bakterija i kvasaca, i to bakterije rodova: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* i kva-



Slika 4. Kinetika razgradnje tiocijanata djelovanjem pteročlane mješovite bakterijske kulture u kemijski definiranoj podlozi s tiocijanatom pri temperaturi od 22 °C i masenoj koncentraciji otopljenog kisika $\gamma(O_2) = (0,8-1,5)$ mg/L, u tresenim tivicama

Fig. 4. Kinetics of thiocyanate degradation by means of five strains of mixed culture in the synthetic substrate with thiocyanate, at 22 °C with constant shaking. Mass concentration of solved oxygen $\gamma(O_2) = (0.8-1.5)$ mg/L



Slika 5. Kinetika razgradnje tiocijanata djelovanjem četveročlane mješovite bakterijske kulture u kemijski definiranoj podlozi s tiocijanatom pri temperaturi od 22 °C i masenoj koncentraciji otopljenog kisika $\gamma(O_2) = (0.8-1.5)$ mg/L, u tresenim tikvicama (■) tiocijanat (Δ) pH-vrijednost (□) nitrat (▲) amonijak (○) $v(s.tv)$

Fig. 5. Kinetics of thiocyanate degradation by means of four strains of mixed culture in the synthetic substrate with thiocyanate, at 22 °C with constant shaking. Mass concentration of dissolved oxygen $\gamma(O_2) = (0.8-1.5)$ mg/L

(■) thiocyanate (Δ) pH-values (□) nitrate
 (▲) ammonium (○) γ(d.w.)

sac roda *Trichosporon* za razgradnju većine sastojaka u otpadnoj vodi iz proizvodnje koksa (22).

Nakon što je određena učinkovita razgradnja tiocijanata u kemijski definiranoj podlozi, istražena je razgradnja tiocijanata u otpadnoj vodi iz proizvodnje koksa.

Kako je prikazano tablicom sastava otpadne vode (tablica 2), u otpadnoj vodi iz proizvodnje koksa mogu se naći inhibitori rasta kao cijanidi, poliaromatski ugljikovodici i fenoli (23-25).

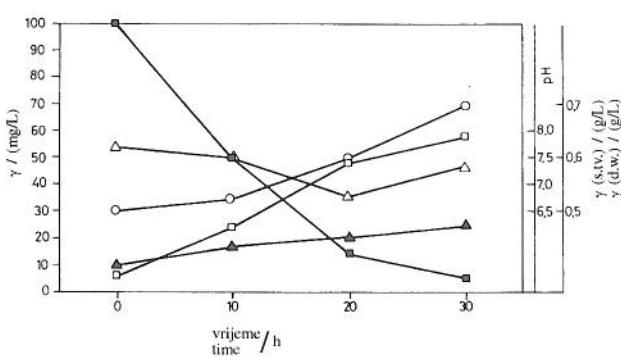
Istražena je aktivnost priređenih mješovitih kultura (peteročlana i četveročlana) u otpadnoj vodi razrijeđenoj vodovodnom vodom 1:1 da bi se izbjegao utjecaj inhibitora.

Na osnovi poznate aktivnosti pterođlane bakterijske kulture u razgradnji tiocijanata u kemijski definiranoj podlozi (slika 4), aktivnost za razgradnju otpadne vode iz proizvodnje koksa razrijedene vodom 1:1 praćena je svakih 5 sati tijekom 15 sati da bi se vidjele promjene koncentracije tiocijanata, fenola i ostalih organskih sastojaka izraženih kao KPK-vrijednost, koji nisu prisutni u kemijski definiranoj podlozi.

Razgradnja organskih sastojaka otpadne vode djelovanjem peteročlane mješovite kulture prikazana je slikom 7. Razgradnja tiocijanata postignuta je tijekom 15 sati uz 84 %-tno iskorištenje. Postignuta je 90 %-tna razgradnja fenola, 79 %-tno smanjenje ukupne organske tvari uz nakupljanje amonijskak.

Preostala ukupna organska tvar (KPK-vrijednost) i amonijak u podlozi poslužili su kao supstrat za određivanje aktivnosti četveročlane mješovite kulture koja je mogla nitrificirati amonijak rastom u kemijski definiranoj podlozi s tiocijanatom (slika 5).

Deset sati nakon završetka pokusa (slika 5), biomasa pteročlane mješovite bakterijske kulture odijeljena je centrifugiranjem, a na supernatantu je provjerena aktivnost četveročlane mješovite bakterijske kulture. Razgradnja supernatanta prikazana je na slici 8.

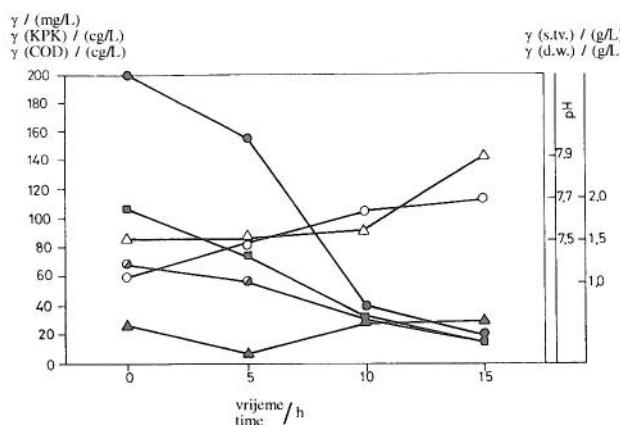


Slika 6. Kinetika razgradnje tiocijanata djelovanjem deveteročlano mješovite bakterijske kulture u kemijski definiranoj podlozi sa tiocijanatom pri temperaturi od 22 °C i masenoj koncentraciji ottopljenog kisika $\gamma(O_2) = (0.8-1.5)$ mg/L, u tresenim tikvicama

Vrijeme (d)	Tiocijanat (Δ)	pH-vrijednost (\square)	Nitrat (\square)	Amonijak (Δ)	$\gamma(O_2)$ (tv.)
0	100	7.0	0	0	1.0
1	85	6.8	0	0	1.0
2	70	6.6	0	0	1.0
3	55	6.4	0	0	1.0
4	40	6.2	0	0	1.0
5	25	6.0	0	0	1.0
6	10	5.8	0	0	1.0
7	0	5.6	0	0	1.0
8	0	5.4	0	0	1.0
9	0	5.2	0	0	1.0
10	0	5.0	0	0	1.0
11	0	4.8	0	0	1.0
12	0	4.6	0	0	1.0
13	0	4.4	0	0	1.0
14	0	4.2	0	0	1.0
15	0	4.0	0	0	1.0
16	0	3.8	0	0	1.0
17	0	3.6	0	0	1.0
18	0	3.4	0	0	1.0
19	0	3.2	0	0	1.0
20	0	3.0	0	0	1.0
21	0	2.8	0	0	1.0
22	0	2.6	0	0	1.0
23	0	2.4	0	0	1.0
24	0	2.2	0	0	1.0
25	0	2.0	0	0	1.0
26	0	1.8	0	0	1.0
27	0	1.6	0	0	1.0
28	0	1.4	0	0	1.0
29	0	1.2	0	0	1.0
30	0	1.0	0	0	1.0
31	0	0.8	0	0	1.0
32	0	0.6	0	0	1.0
33	0	0.4	0	0	1.0
34	0	0.2	0	0	1.0
35	0	0.0	0	0	1.0

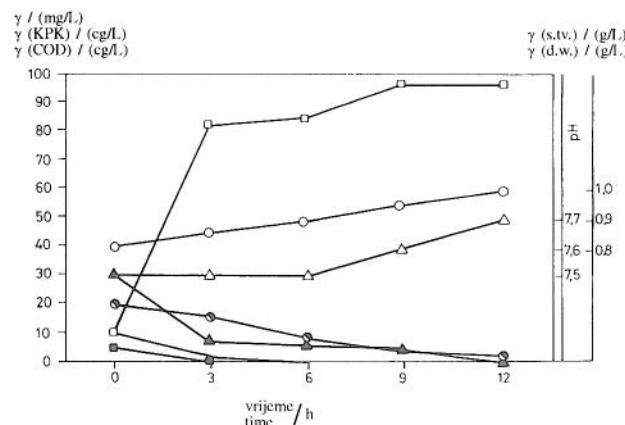
Fig. 6. Kinetics of thiocyanate degradation by means of nine strains of mixed culture in the synthetic substrate with thiocyanates, at 22 °C with constant shaking. Mass concentration of solved oxygen $\text{v}(\text{O}_2) = (0.8-1.5) \text{ mg/l}$.

(■) thiocyanate (Δ) pH-values (\square) nitrate
 (\blacktriangle) ammonium (\circ) γ (d.w.)



Slika 7. Kinetika razgradnje organskih tvari u otpadnoj vodi iz proizvodnje koksa razrijedene vodovodnom vodom 1:1 u laboratorijskom reaktoru, s pomoću adaptirane peteročlane mješovite bakterijske kulture (MK_5). Parametri pokusa su: temperaturna $t = 22^\circ\text{C}$, masena koncentracija otopljenog kisika $\gamma(O_2) = 1 \text{ mg/L}$ i početna količina biomase $\gamma(s.\text{tv.}) = 1,25 \text{ g/L}$

(■) tiocijanat (●) fenol (○) $\gamma(s.\text{tv.})$
 (▲) amonijak (▼) KPK-vrijednost (Δ) pH-vrijednost
 Fig. 7. Kinetics of degradation of the organic components in waste water from the cokery, diluted with water 1:1 in laboratory reactor by means of adapted five strains of mixed culture (MK_5). The parameters of the experiment: temperature $t = 22^\circ\text{C}$, mass concentration of solved oxygen $\gamma(O_2) = 1.0 \text{ mg/L}$ and initial mass concentration of biomass $\gamma(d.w.) = 1.25 \text{ g/L}$
 (■) thiocyanates (●) phenol (Δ) pH-values
 (▲) ammonium (▼) COD-values (○) $\gamma(d.w.)$



Slika 8. Kinetika razgradnje organske tvari u supernatantu (SM_{K5}) postignuta s pomoću četveročlane mješovite bakterijske kulture (MK_4) u laboratorijskom reaktoru. Sastojeći supernatanta: amonijak 30 mg/L, tiocijanat oko 5 mg/L, fenol oko 10 mg/L, nitrat oko 10 mg/L, KPK oko 200 mg/L. Parametri pokusa su: temperaturna $t = 22^\circ\text{C}$, masena koncentracija otopljenog kisika $\gamma(O_2) = 1,5 \text{ mg/L}$ i početna količina biomase $\gamma(s.\text{tv.}) = 0,8 \text{ g/L}$

(■) tiocijanat (□) nitrat (Δ) pH-vrijednost
 (▲) amonijak (▼) KPK-vrijednost (○) $\gamma(s.\text{tv.})$
 (●) fenol

Fig. 8. Kinetics of degradation of the organic components in the supernatant (SM_{K5}) by means of four strains of mixed bacterial culture (MK_4), in laboratory reactor. The components of supernatant: ammonium 30 mg/L, thiocyanate about 5 mg/L, phenol about 10 mg/L, nitrate about 10 mg/L, COD about 200 mg/L. The parameters of the experiment: temperature $t = 22^\circ\text{C}$, mass concentration of solved oxygen $\gamma(O_2) = 1.5 \text{ mg/L}$ and initial mass concentration of biomass $\gamma(d.w.) = 0.8 \text{ g/L}$

(■) thiocyanate (□) nitrate (Δ) pH-value
 (▲) ammonium (▼) COD-value (○) $\gamma(d.w.)$
 (●) phenol

Kako je peteročlana bakterijska kultura, pri rastu u otpadnoj vodi iz proizvodnje koksa razrijedenoj vodom 1:1, bila vrlo aktivna u razgradnji tiocijanata, fenola i drugih organskih sastojaka, očekivalo se da će i četveročlana bakterijska kultura biti učinkovitija u razgradnji preostalih i nakupljenih sastojaka supernatanta peteročlana mješovite bakterijske kulture. Zbog toga je aktivnost u razgradnji supernatanta provjeravana svaka 3 sati tijekom 12 sati.

Tijekom 12 sati ukupna je organska tvar razgrađena od 200 mg O₂/L na 25 mg O₂/L, uz izrazito nakupljanje nitrata u masenoj koncentraciji od 98 mg/L.

U literaturi se navodi da tijekom razgradnje otpadne vode iz proizvodnje koksa dolazi do nakupljanja nitrata, ali se ne navode pojedinosti o procesu nitrifikacije nego se samo upućuje na inhibitore rasta bakterija koje imaju sposobnost nitrifikacije amonijaka u koksarskim otpadnim vodama (24,25).

Zaključak

- Iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda koksara izolirane su aktivne kulture za razgradnju tiocijanata i fenola.

- Priredene su mješovite kulture; peteročlana mješovita bakterijska kultura (MK_5) sposobna da oksidira tiocijanat do amonijaka i četveročlana mješovita bakterijska kultura (MK_4) sposobna da oksidira amonijak do nitrata.

- Postignuti rezultati pokazuju mogućnost primjene mješovitih kultura bakterija u procesu dvostupnjevite biološke razgradnje otpadne vode iz proizvodnje koksa.

- Kroz dodatni biološki proces nitrat bi se mogao denitrificirati i prevesti u dušik.

Extended Abstract

In this work the degradation of thiocyanate in a synthetic medium with thiocyanate as well as in waste water from the Bakar cokery is presented.

The following species of bacteria were used for the degradation of thiocyanate: *Flavobacterium marinum*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium mycetoides*, *Moraxella osloensis*, *Schewanella putrefaciens*, *Chryseomonas luteola*, *Pseudomonas pickettii* and *Citrobacter freundii*.

By controlling the activity of single strains of bacteria it was confirmed that all strains show the capability of degradation of thiocyanate into NH₄. However, the bacteria *Flavobacterium marinum*, *Pseudomonas pickettii* and two strains of *Moraxella osloensis* have exhibited the capability of nitrification of ammonium, which resulted from the degradation of thiocyanate.

On the basis of these results two mixed cultures were composed as follows: the five-member mixed culture of

bacteria, which is capable of oxydative splitting the thiocyanate bonds, whereas the four-member mixed culture has the capability of nitrification of ammonium.

The activity of mixed culture was proved in waste water from coke production in the Bakar cokery. The same behavior of the mixed culture for degradation of thiocyanate as in the synthetic medium with thiocyanate, was found.

The five-member mixed culture of bacteria was able, at pH = 7.8-8.0 and temperature of 22 °C, to degrade thiocyanate of the mass concentration of 100 mg/L in the synthetic medium and 105 mg/L in waste water.

Both mixed cultures exhibited high activity during growth in waste water from coke production with the simultaneous degradation of thiocyanate in the first stage and nitrification of generated ammonium in the second stage.

Literatura

1. R. G. Luthy, *J. Water Pollution Control Federation*, 51 (1979) 252.
2. I. G. Krutko, *Koks i Himija*, 9 (1979) 46.
3. P. O. Larsen, Glucosinolates, In E.E. Conn. (ured.) *The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise*, Academic Press 7 (1981) 501.
4. W. I. Banwart, J. M. Bremner, *Soil Biol. Biochem.*, 8 (1976) 349.
5. J. A. E. Gibson, *Mar. Biol.*, 104 (1990) 339.
6. D. P. Kelly, S. C. Baker, *Microbiol. Rev.*, 87 (1990) 241.
7. D. P. Kelly, N. A. Smith, *Adv. Microb. Ecol.*, 11 (1990) 345.
8. Y. L. Parachuri, N. Shivaraman, P. Kumaran, *Environ. Pollut.*, 68 (1990) 15.
9. F. C. Happold, P. B. Rodgers, *J. Gen. Microbiol.*, 10 (1954) 261.
10. J. Younat, *J. Gen. Microbiol.*, 11 (1954) 139.
11. D. P. Kelly, ISEB (1991) 107.
12. C. J. Knowless, *Rev. Bacteriol.*, 40 (1976) 652.
13. P. K. Dorr, C. J. Knowless, *FEMS Microbiol. Lett.* 60 (1989) 256.
14. D. Y. Kunz, O. Nagappan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (1989) 256.
15. J. J. Ganczarczyk, *Proc. Ind. Waste Conf.*, 35 (1980) 325.
16. N. D. Haritonova, O. Y. A. Maslova, *Koks i Himija*, 12 (1991) 38.
17. P. Huppe, H. Hoke, D. C. Hempel, *Chem. Eng. Technol.*, 13 (1990) 73.
18. X. Littleton, Z. Ren, *Wat. Sci. Tech.* 25 (1992) 25.
19. M.J.Jr. Pelczar, E.C.S. Chan, N.R. Krieg: *Microbiology*, Mc Graw-Hill Book Co., New York (1986).
20. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 14th Ed., Amer. Publish Health Assoc., Washington, (1974) str. 50.
21. ASTM D 1783-7, *Annual Book of ASTM Standards Part 31* (1978).
22. M. Glancer, S. Ban, *Wasser/Abwassertechnik*, 5 (1992) 48.
23. G. Painter, *Nature*, London (1955) 175.
24. R. Neufeld, J. Greenfield, B. Rieder, *Wat. Res.*, 20 (1986) 633.
25. R. D. Neufeld, Y. Y. Hill, D. O. Adehoya, *Wat. Res.*, 14 (1980) 1694.