

Н. БЕРНОВСКАЯ, М. ГУБЕРГРИЦ, УУВЕ КИРСО

## КИНЕТИКА БИОХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛОВ РАЗЛИЧНОГО СТРОЕНИЯ

### СООБЩЕНИЕ 1. ДЕГРАДАЦИЯ НА ИЛЕ, АДАПТИРОВАННОМ К ОКСИБЕНЗОЛУ

Основным веществом, загрязняющим сточные воды сланцеперерабатывающих комбинатов, являются фенолы. Для обезвреживания фенольных сточных вод применяются различные методы очистки, в том числе и биохимические. Данное сообщение посвящено вопросам изучения биodeградации фенолов различного строения, которые встречаются в сланцевых сточных водах (метилпроизводные резорцина, одноатомные фенолы).

Вопросам механизма биологического окисления фенолов посвящен ряд работ. При помощи современных методов анализа (меченые атомы, ЭПР и др.) установлена общая схема биodeградации фенолов. В большинстве случаев отмечается *орто*-гидроксилирование фенолов, доказательством которого является образование производных пирокатехина [1-5]. Дальнейшее биохимическое превращение ведет к различным продуктам расщепления бензольного кольца — к образованию щавелевой, муконовой, пировиноградной и др. кислот [2-4, 6-8]. По данным работы [5], среди продуктов окисления фенола идентифицирован и *орто*-бензохинон. По существующим взглядам биоокисление производных резорцина протекает по другому механизму [2]. Однако авторами [9] получен из орцина также продукт *орто*-гидроксилирования — 2,3,5-тригидрокситолуол, который в дальнейшем превращается в ацетаты и в производные пировиноградной кислоты.

Разные мнения высказываются авторами при определении окисляемости фенолов различной структуры. Это, возможно, объясняется тем, что использованные в опытах микроорганизмы отличались по своей природе и степени адаптированности к определенному субстрату. По одним данным [10], бактерии, выращенные на оксibenзоле, так же легко разрушают другие одноатомные фенолы и только после длительного инкубационного периода — многоатомные.

Меньшее влияние структуры фенолов и особенно наличия второй гидроксильной группы на скорость и полноту разрушения отмечено в работах ряда других авторов [11, 12, 14]. Описаны опыты, когда клетки, выросшие на оксibenзоле, одинаково хорошо окисляют фенол, пирокатехин и резорцин [13].

В литературе нет сведений об употреблении методов химической кинетики для оценки биоокисляемости различных фенолов. Настоящая работа посвящена именно этому вопросу — определению скорости биохимического окисления различных фенолов илом, адаптированным к оксibenзолу.



Константы скорости ( $k \cdot 10^{-5}$  моль/л · мин)  
биохимического окисления фенолов  
активным илом с различной длительностью  
адаптации к оксибензолу

Номер	Фенол	Время адаптации, недели		
		1—2	3—4	5—6
1.	Оксибензол	2,8	7,5	6,4
2.	о-Крезол	1,2	1,9	1,8
3.	м-Крезол	0,4	1,0	1,3
4.	п-Крезол	2,1	1,3	1,3
5.	3,4-Ксиленол	0,1	0,3	—
6.	Пирокатехин	18,0	8,1	—
7.	Резорцин	1,0	0,6	—
8.	5-Метилрезорцин (орцин)	0,4	0,2	—

## Методика исследования

Опыты проведены при комнатной температуре на лабораторной модели аэротенка, работающего в условиях контакта. Аэротенк представляет собой стеклянную трубку диаметром 43 мм и высотой 1 м. Нижнее днище аэротенка — стеклянная пористая пластинка, через которую подводится воздух. Количество подаваемого воздуха 0,2—0,3 л/мин. Объем исследуемого раствора 1 л. В опытах использован активный ил промышленной установки биохимической очистки сточных вод Сланце-

перерабатывающего комбината «Сланцы». Перед опытом ил в течение определенного времени (см. табл. 1) адаптировался к оксибензолу. Характеристика ила: иловый индекс 60—90; зольность 11,5%; результаты микроскопирования — зооглейные скопления бактерий овальной формы и с радиальным расположением клеток; из простейших наблюдаются бесцветные жгутиковые и реснитчатые инфузории, коловратки. Классификация микробов не проводилась, но, учитывая данные по исследованию микрофлоры аналогичных стоков [15], можно полагать, что основную часть микробов (60%) составляют *Pseudomonas*. Дозировка ила производилась в расчете на сухое вещество: 3 г на литр исследуемого раствора. Растворы исследуемых фенолов в дистиллированной воде готовились непосредственно перед проведением опыта. Для обеспечения питания микроорганизмов и стабилизации величины pH [6, 7] в раствор вводились следующие соли:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2$  и фосфатная буферная смесь из  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Перечень исследуемых фенолов приводится в табл. 1. Предварительно проведенными опытами по определению кинетики процесса биохимического разрушения очищенных и неочищенных фенолов (оксибензол, резорцин и орцин) заметной разницы не обнаружено. Поэтому основные исследования проводились с использованием реагентов без дополнительной очистки. Исходное содержание фенолов в растворах — 400—500 мг/л (3,5—5 мМ). Анализ исходного фенола проводился описанными в работе [16] методами.

## Результаты и обсуждение

Кинетика биохимического разрушения всех изученных фенолов изображена на рис. 1. Каждая из прямых построена на значительном количестве экспериментальных точек (см. пример для оксибензола на рис. 2), которые не нанесены на график. При помощи методов формальной химической кинетики [17] получена константа скорости процесса нулевого порядка:  $k = \Delta c / \tau$ , где  $\Delta c$  — убыль концентрации фенола в промежуток времени  $\tau$ .

Рассчитанные таким образом константы скорости разложения исследуемых фенолов приведены в табл. 1. Они показывают, что активный ил, адаптированный к оксибензолу, разрушает и некоторые другие одноатомные фенолы, такие как пара-, орто- и мета-крезолы. Введение в



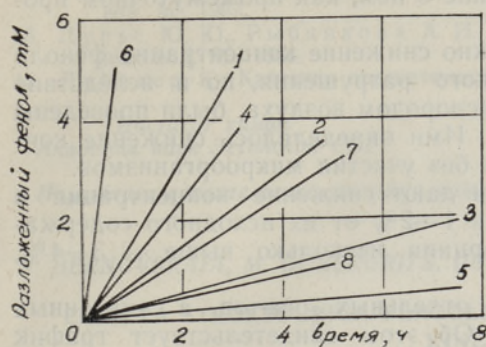


Рис. 1. Кинетика биохимического разрушения фенолов различной структуры. Обозначения кривых по таблице.

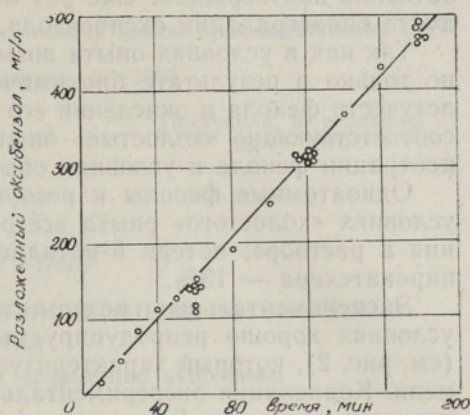


Рис. 2. Кинетика биodeградации оксибензола.

молекулу фенола алкильных групп замедляет процесс: крезолы окисляются медленнее, чем оксибензол, но быстрее, чем 3,4-ксиленол. Оксибензол и *пара*-крезол разрушаются полностью за 3 ч аэрации; *орто*-крезол не обнаруживается в растворе через 5–6 ч. *Мета*-крезол за это же время разрушается на 35%, 3,4-ксиленол — на 15%. При длительной обработке (24 ч) содержание *мета*-крезола в растворе составляет 1 мг/л (длительность адаптации 3–4 недели).

Более длительная адаптация активного ила к оксибензолу приводит к повышению его избирательности.

В процессе биохимического разрушения *орто*- и *пара*-крезола наблюдается образование окрашенных в желтый цвет промежуточных продуктов. Особенно интенсивную окраску приобретает раствор *орто*-крезола (рис. 3). Снижение оптической плотности растворов начинается после разрушения основного количества фенолов.

Биохимическому разрушению в данной системе подвергаются и двухатомные фенолы: резорцин, и особенно пирокатехин. Резорцин за пять часов аэрации разрушается на 90%; орцин, как метилпроизводное резорцина, окисляется медленнее — на 40%. Раствор орцина вследствие образования промежуточных продуктов приобретает интенсивную розовую окраску. Быстрое разрушение пирокатехина приводит к накоплению в растворе кислых промежуточных продуктов, которые вызывают торможение процесса, а затем полностью его прекращают. Константа скорости превращения пирокатехина определена для области  $pH=6,6 \div 5,6$ , т. е. в течение первых пяти минут аэрации. В условиях нормального значения  $pH$  среды пирокатехин разрушается полностью. Окрашенные промежуточные продукты также разрушаются, и раствор становится бесцветным. Чрезвычайно высокая скорость окисления пиро-

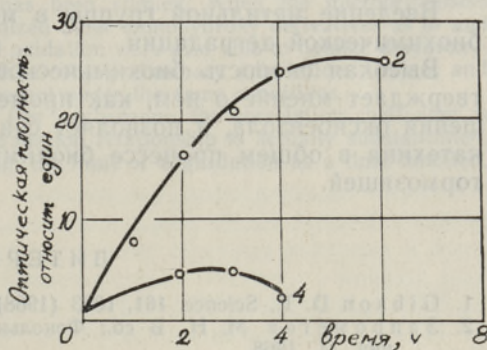


Рис. 3. Изменение оптической плотности растворов во времени. Обозначения кривых по таблице.



катехина подтверждает еще раз мнение о нем, как промежуточном продукте биodeградации оксибензола.

Так как в условиях опыта возможно снижение концентрации фенола не только в результате биохимического разрушения, но и вследствие летучести фенола и окисления его кислородом воздуха, были проведены соответствующие «холостые» опыты. Ими определялось снижение концентрации фенола в условиях опыта без участия микроорганизмов.

Одноатомные фенолы и резорцин дают снижение концентрации в условиях «холостого» опыта всего на 1—2% от их исходного содержания в растворе; потери 5-метилрезорцина несколько выше — 3—4%, пирокатехина — 13%.

Экспериментальные результаты отдельных опытов в указанных условиях хорошо репродуцируемы. Об этом свидетельствует график (см. рис. 2), который характеризует биodeградацию оксибензола во времени. Корреляция экспериментальных данных при помощи метода наименьших квадратов [17] дает коэффициент корреляции  $r=0,9524$  и стандартную ошибку определения  $s=44,62$  (мг/л). Полученная хорошая корреляция кинетических данных не подтверждает мнение некоторых авторов о плохой воспроизводимости результатов биохимического окисления фенолов.

### Выводы

Биохимическое разложение фенолов активным илом, при отсутствии тормозящего влияния промежуточных продуктов окисления, в определенной области концентраций описывается уравнением нулевого порядка.

Ил, адаптированный к оксибензолу, способен разрушать как одноатомные (оксибензол, орто-, мета-, пара-крезолы, 3,4-ксиленол), так и двухатомные фенолы (пирокатехин, резорцин, орцин).

Введение метильной группы в молекулу фенола тормозит процесс биохимической деградации.

Высокая скорость биохимического разрушения пирокатехина подтверждает мнение о нем, как промежуточном продукте в схеме разрушения оксибензола, и позволяет считать, что стадия разложения пирокатехина в общем процессе биохимического разрушения не является тормозящей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Gibson D. T., Science, **161**, 1093 (1968).
2. Запрометов М. Н., В сб.: Фенольные соединения и их биологические функции, М., 1968.
3. Brebion G., Cabridenc R., Huriet B., Rev. Inst. Franç. Petrole, **22**, 1029 (1967).
4. Erlebach J., Solin V., Sbor. Vysoké školy Chem.-Technol. v Praze, Technol., **11**, 59 (1969).
5. Дурмидзе С. В., Угрехлидзе Д. Ш., Дзикая А. Н., Докл. АН СССР, **184**, 466 (1969).
6. Таусон В. О., Основные положения растительной биоэнергетики. Микроорганизмы химически устойчивых соединений, М., 1950.
7. Solin V., Vodni hospodářství, No. 7—7a, 5 (1955).
8. Тоуэрс Г. Х. Н., Биохимия фенольных соединений, VII глава, М., 1968.
9. Ribbons D. W., Chapman P. J., Biochem. J., **106**, 44P (1968).
10. Meissner B., Wasserwirtsch.-Wassertechn., **12** (1953).
11. Ross E., McKinney, Sewage and Industr. Wastes, **28**, 4 (1956).
12. Winter W., Wasserwirtsch.-Wassertechn., **2** (1964).
13. Hamdy M. K., Sherrer E. L., et al., Appl. Microbiol., **4**, 2 (1956).
14. Юровская Е. М., Ботвинова Л. Е., Ерусалимская Л. Ф., Микробиология, **37**, 655 (1968).



15. Роговская Ц. И., Биохимический метод очистки производственных сточных вод, М., 1967.
16. Лурье Ю. Ю., Рыбникова А. И., Химический анализ производственных сточных вод, М., 1966.
17. Лейдлер К., Кинетика органических реакций, М., 1966.

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
25/VI 1970

Научно-исследовательский институт сланцев

N. BERNOVSKAJA, M. GUBERGRITS, UUE KIRSO

## ERINEVA STRUKTUURIGA FENOOLIDE BIOKEEMILISE OKSÜDEERIMISE KINEETIKA

### 1. Lagundamine oksübensoolile adapteeritud aktiivmudal

Käsitletakse erineva struktuuriga fenoolide bioloogilist lagundamist oksübensoolile adapteeritud aktiivmudal. Eksperimentaalsete andmete hea reprodutseeritavus (oksübensooli suhtes  $r=0,9524$ ) võimaldab arvutada fenoolide bioloogilise lagundamise kiiruskonstandid. Kuigi uuritud aktiivmuda oli kasvatatud oksübensoolil, toimis ta lagundavalt teistesegi üheaatomilistesse fenoolidesse (*orto*- ja *para*-kresool), samuti lagunesid temas kaheaatomilised fenoolid (resortsiin, ortsiin, pürokatehiin). Eriti kõrge lagunemiskiirus on omane pürokatehiinile. Alküülgruppide sisseviimine fenooli tuuma aeglustab oksüdeerimist.

N. BERNOVSKAYA, M. GUBERGRITS, UUE KIRSO

## THE KINETICS OF BIOCHEMICAL OXIDATION OF PHENOLS OF DIFFERENT STRUCTURE

### 1. Degradation on mud adapted to oxybenzene

The microbial oxydability of phenols has been studied. When the microorganisms were grown on oxybenzene, they rapidly oxidized other monohydroxy derivatives as *o*- and *p*-cresol. The microorganisms liable to phenol oxidation were also able to oxidize dihydroxyphenols, catechol, resorcinol and orcinol without any preliminary adaptation. Orcinol and resorcinol are oxidized more slowly than catechol under the same conditions.

A satisfactory fit of experimental data (for oxybenzene, the correlation coefficient is  $r=0.9524$ ) indicates that the linear time-degradation relationship is actually substantiated. Oxidation rate constants were calculated from the limit of degradation as a time function.