

Mr Ignac Munjko, prof. biol.

Služba za kontrolu voda, »OKI« — Zagreb

Biooksidacija fenola kulturama streptomiceta

1.1 UVOD

Ispitivanja streptomiceta u različitim tipovima tla postaju sve aktuelnija jer još nije dovoljno ispitano u kojim uvjetima žive ovi važni mikroorganizmi na svojim prirodnim staništima.

Isto tako, još nije utvrđena povezanost streptomiceta s pojedinim tipovima tala. U našoj zemlji tek posljednjih godina istražuju se streptomiceti s ekološkog i horološkog aspekta. O tome je objavljeno nekoliko radova (Starč 1941, Todorović 1953, Micev 1953, Mickovski 1959, 1961, 1963, Pavletić i Stilinović 1962, 1967, 1968, 1969, Piljac 1964, Tešić et al. 1967, Džingov 1970, Stilinović 1971, Munjko 1971, i dr.), ali većina autora ne obrađuje samo streptomicete nego i ostale grupe mikroorganizama.

Međutim, nas u ovom radu nije zanimala rasprostranjenost streptomiceta u različitim tipovima tla, njihovo izlučivanje antibiotika, odnos prema ostalim mikroorganizmima, već njihova adaptacija na podloge sa visokim koncentracijama fenola od 200 do 1 500 mg/l, te postotak biorazgradnje fenola (500-1 000 mg/l) u tekućoj podlozi uz dodatak 0,6% diamonijevog fosfata — $(\text{HN}_4)_2\text{HPO}_4$.

Budući da su za ovaj rad izolirani sojevi streptomiceta iz različitih tala i podneblja (Zagreb, Poreč, Abisko, Narvik, te planine Pelister i Buševa), za koje i postoji i ne postoji mogućnost zagađenja fenolom, htjelo se vidjeti koliko su se pojedine serije i sekcije streptomiceta sposobne adaptirati na fenol i biološki ga razgrađivati u tekućoj podlozi, gdje je fenol jedini izvor ugljika.

Ovaj je rad jedan od prvih takove vrste u našoj literaturi i daje veliki broj interesantnih podataka kao prilog fiziologiji streptomyceta, te otvara mogućnosti ispitivanja biološke razgradnje drugih ugljikovodika, kao što su: benzen, toluen, acetofenon, stiren, etilbenzen, aceton, kumen, mesitil oksid, tetrapropilen i dr., koji dolaze industrijskim otpadom u kopnene vode, zagađuju tlo i podzemne vode, a o njihovoj biološkoj razgradnji u našoj literaturi uopće nema podataka.

1.1 Kratak pregled literature o kretanju fenola u našim vodama

Problem je zagađivanja voda fenolom sve aktuelniji. Za tu tvrdnju dovoljno je pogledati rezultate ispitivanja naših rijeka, potoka i jezera, te priobalnog mora u radovima: Munjko 1970, 1971, 1972, Munjko i Jardas 1970/71, 1972, Munjko et al. 1970, 1971, Pavletić et al. 1972.

Kako Jugoslavija još nije ratificirala Međunarodnu konvenciju za sprečavanje zagađivanja mora uljem, postoji mogućnost sve većeg zagađivanja derivatima nafte, a time i fenolom. Da bi se utvrdilo stanje zagađenosti priobalnog mora, Institut za botaniku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, u saradnji sa Službom za kontrolu voda »OKI« — Zagreb, analizirao je od 3. do 27. IV 1972. morsku vodu na fenol. Evo nekih nalaza fenola u morskoj vodi: Podgora — 60 /ug/l, Neum — 55 /ug/l, Kotor — 45 /ug/l, Cavtat — 4,0 /ug/l, Dubrovnik — 4,5 /ug/l, Risan — 8,5 /ug/l, Herceg-Novi — 5,5 /ug/l, Bar — 6,5 /ug/l, Budva — 0,4 /ug/l, dok u uzorcima morske vode iz Sv. Stefana, Ulcinja, Tivta, Petrovca, Mokošice, Stona i Gradaca nije nađen fenol. Fenol je određivan i u planktonu sa postaja Stončica — 648 /ug/kg, i Kaštela — 525 /ug/kg, te u uginuloj ribi iz Save kod Siska (13. VIII 1971), nađeno je u škrgama — 2 160 /ug/kg, a u utrobi — 4 330 /ug/kg, i mišićima — 14 600 /ug/kg. Također je određivan fenol u tlu (3-15. VIII 1971): aluvijalno savsko tlo (Podsused, Lučko, Zaprude) — 0,7-3,4 mg/kg, te rendzina na miocenskim litvanicama (zajednica Quercu-Ostryetum, mjesto Ponikve, Gračani) — 0,57-0,63 mg/kg. Fenol je određivan po 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-pirazolon (5), ili 4-aminoantipirinom, kod 460 nm (vidi JUS.H.Z1.144).

1.2 Kratak pregled literature o biorazgradnji fenola

Poslije Miyošha (1895) koji je otkrio da mikroorganizam *Botrytis cinerea* razgrađuje parafin, objavljeno je mnogo radova o mikrobiološkom korišćenju ugljikovodika. Prema Zobellu (1950)

ugljkovodicima može se koristiti više od 100 vrsta mikroorganizama, koji su svrstani u oko 40 rodova bakterija, kvasaca i plijesni. Ovi mikroorganizmi mogu se koristiti plinovitim, tekućim i krutim ugljikovodicima alifatskog, olefinskog, aromatskog i naftenskog tipa. Opširan pregled prvih radova s tog područja dao je Beerstecher (1954), a noviji prikaz dali su Van Der Linden i Thijsse (1965).

Ideja o biorazgradnji ugljikovodika razvija se u dva smjera:

— tehnika dobivanja biomase kao proteinsko-vitaminskog koncentrata (Champagnat 1963, Dražić et al. 1967, Adler 1966, i dr.),

— tehnika biološkog pročišćavanja industrijskih otpadnih voda.

Suvremena tehnika pročišćavanja otpadnih voda počinje 1858. (napominje Munro 1964).

Međutim, ima pokusa sa čistim kulturama nekih mikroorganizama: Putilina (1959) radi biorazgradnju fenola pomoću čistih kultura *E. coli*, *B. subtilis*, *B. megatherium*, te nekih funga i aktinomiceta.

Simons (1963) pomoću *Nocardia* sp. radi pokuse biološke razgradnje fenola od 1 000 do 1 500 mg/l.

Van Der Linden i Thijsse (1965) navode da *Nocardia salmonicolor* iskorištava fenol.

Parkinson i Pickett (1964) ispituje biorazgradnju fenola sa *E. coli* pri temperaturi od 20 do 40°C.

Semov (1967) biološki razgrađuje fenol od 400 mg/l pod kulturom *Candida rugosa* na kiselom mineralnom mediju pri temperaturi 25-26°C.

Brébion (1968) razgrađuje fenol u koncentraciji od 750 mg/l pomoću kultura *Pseudomonas* sp. do 99,8‰.

U našoj literaturi imamo malo podataka o biorazgradnji fenola:

Munjko et al. (1970) daju prikaz biološke razgradnje fenola pod eubakterijama.

Munjko i Mikličan (1971) rade pokuse biološke razgradnje fenola pomoću lišajeva.

Maloseja et al. (1972) razgrađuju fenol pomoću čistih i mješovitih kultura alga.

Munjko (1972) daje prikaz biorazgradnje fenola pomoću funga.

2.0 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Upotrijebljeni materijal

Ova ispitivanja, početa 1968. a završena 1971, dijele se na dva dijela:

1. mogućnost adaptacije streptomiceta na kruta hranilišta kojima je dodavan fenol u visokim koncentracijama (200-1 500 mg/l);

2. određivanje biološke razgradnje fenola od 500 mg/l i 1 000 mg/l, kao jedinog izvora ugljika uz dodatak 0,6% diamonijevog fosfata.

Upotrijebljeni sojevi streptomiceta bili su izolirani iz različitih tala okolice Zagreba: aluvijalna tla Podsuseda, Lučkoga, Bundeka i Rugvice, tla na silikatnim stijenama ili zeleni škriljci (Sljeme — vrh Medvednice, Medvedgrad), pseudoglej ili umjereno podzolirano tlo (Maksimir), rendzina Zagrebačke gore ili Medvednice, zatim iz okolice Poreča (zemlja crvenica na Zelenoj Laguni), vrtna zemlja iz okolice Narvika (Norveška), te uzorci tla bez vegetacije i s vegetacijom, kao što su rizosfera *Empetrum* i *Betula* u okolici Abiska (Švedska). Pokusi s izoliranim streptomicetama iz navedenih tala rađeni su 1968. i 1969.

U godini 1970. i 1971. rađeni su pokusi sa sojevima streptomiceta izoliranih iz uzoraka listinac, poluraspalo lišće, humusi i mineralni sloj/planine Buševo nalazište Bazana I — 1 175 m n/v, Kjoška — 1 400 m n/v, Musica — 1 755 m n/v, te planine Pelister nalazište Šumjak — 1 030 m n/v, i Derven — 1 240 m n/v.

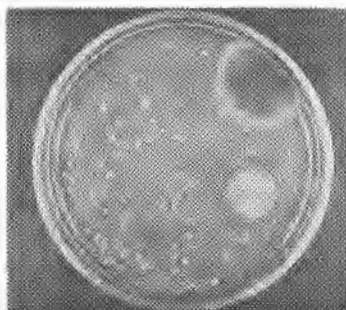
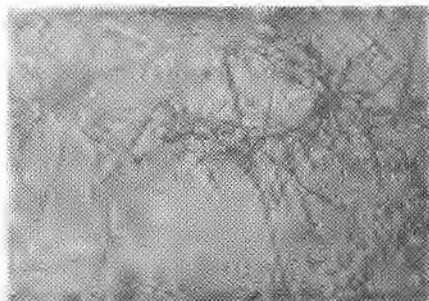
2.1.1 Održavanje pokusnih sojeva streptomiceta

Nakon sedmodnevne inkubacije pri 28-30°C odabrani su za pokuse oni sojevi streptomiceta koji su dobro sporulirali na modificiranom Czapekovom kosom agaru u epruveti.

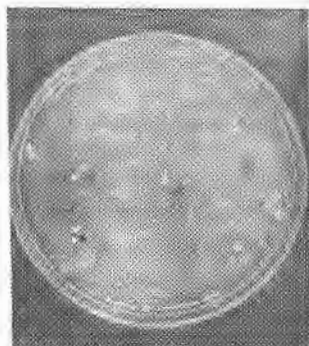
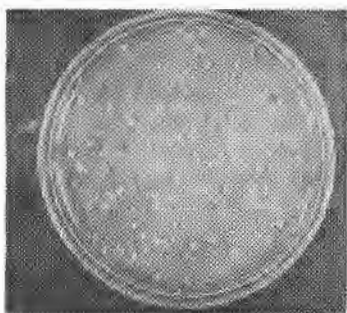
Nakon presađivanja pojedinih sojeva streptomiceta sa kosog agara na Czapekov agar kojemu je dodavana određena količina fenola, sojevi su spremljeni u hladionik pri 4°C najduže tri mjeseca.

2.1.2 Hranjiva podloga za sojeve streptomiceta (modificiran Cz-agar)

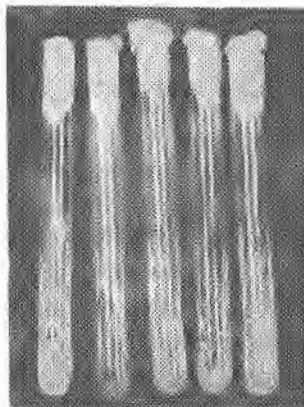
KNO₃ — 2,0 g, (NH₄)₂HPO₄ — 1,0 g, NaCl — 0,56 g, FeSO₄ — 0,01 g, Škrob — 25,0 g, Agar u listićima — 15,0 g, Fenol — 0,2-1,5 g, Deionizirana voda — 1 000 ml, pH — 7,2. Sterilizirano 20 minuta na maksimalno 110°C.



Sl. 1.: Vegetativni miceli streptomiceta u podlozi sa fenolom
Sl. 2.: Česta kontaminacija čistih kultura streptomiceta — fungima



Sl. 3.: Prehodka izolacija streptomiceta iz tla
Sl. 4.: Određivanje broja streptomiceta u ml.



Sl. 5.: Streptomiceti na podlozi sa fenolom od 750 mg/l
Sl. 6.: Privremeno čuvanje (14 dana) kultura streptomiceta na modificiranom CZ-agaru

2.2 METODE RADA

2.2.1 Presađivanje pokusnih sojeva streptomiceta s nižih (200 mg/l) na više koncentracije fenola (do 1 500 mg/l)

Odabrane kulture sojeva streptomiceta, koje su dobro sporulirale na kosom modificiranom Cz-agaru, presade se na svježju krutu podlogu Cz-agara sa fenolom od 200 mg/l. Nakon sedmodnevne inkubacije pri 28-30°C ponovo smo iste sojeve, ako su stvorili zračni micelij, presađivali na sljedeću veću koncentraciju fenola u Cz-agaru.

2.2.2 Pripremanje standardne otopine fenola

Na analitičkoj vagi izmjeri se 500,0 mg fenola i 6,0 g diamonijevog fosfata. To se kvantitativno prenese u odmjerenu tikvicu od 1 000 ml i dopuni do marke deionizirajućom vodom. Obično tako pripremljena standardna otopina fenola ima pH između 7,0 i 7,6 što ovisi o pH — vrijednosti deionizirane vode. Ako je potrebno, pH se podese s nekolike kapi 0,5% KOH. Zatim se standardna otopina prelije u Erlenmajerovu tikvicu (2 l) pokrije vatenim čepom i stavi na kuhalo da uzavre. Pošto se standardna otopina fenola ohladi, prelije se, uz plamenik, u sterilnu staklenu bocu od 1 l tamne boje i stavi u hladionik na 4°C.

Dio uzorka standardne otopine fenola ostavi se za određivanje fenola (na spektrofotometru, kod 289 nm, vidi JUS.H.Z1.147) i pH vrijednost prije pokusa.

Fenol što smo ga upotrijebili u našim pokusima proizveden je u TPMK-OKI, Zagreb. Sastav mu je sljedeći: Fenol — 99,98%, voda — 0,02%, tačka kristalizacije — 40,95°C.

2.2.3 Priređivanje suspenzije spora i određivanje broja spora

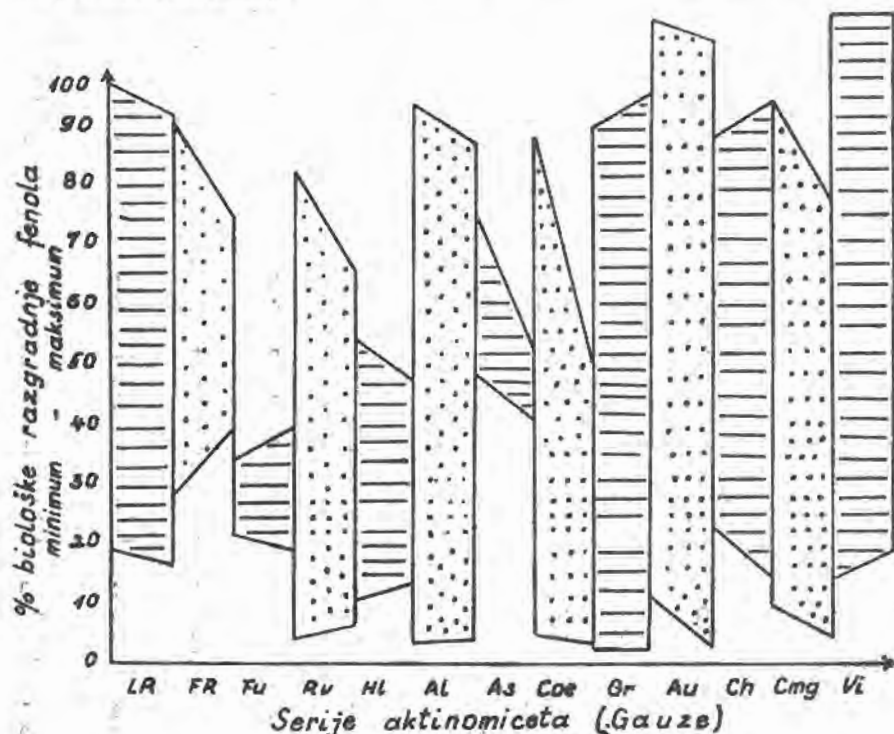
Suspenzija spora streptomiceta priređuje se tako da se na sojeve streptomiceta, koji su dobro rasli i sporulirali na modificiranom Czapek-agaru (Cz-agar), nalije 25 ml sterilne standardne otopine fenola. Zatim se bakteriološkom iglom lagano struže po površini kulture da bi se skinule konidiofore sa micelija. Poslije toga se Petrijeva ploča lagano promućka i uzme tako priređene suspenzije sterilnom pipetom 0,1 ml i stavi u 19,9 ml sterilne fiziološke otopine i dobro promućka. Od tako priređene suspenzije spora uzme se 0,1 ml i dobro razmaže po površini Cz-agara u Petrijevoj ploči te stavi inkubirati na 28°C. U toku 5-6 dana broje se kolonije. U našim pokusima taj broj kretao se između 1×10^6 i 1×10^7 .

Nakon pripremljene suspenzije spora streptomiceta u standardnoj otopini fenola (500 mg/l), jedna se Petrijeva ploča (zdjelica) stavi u termostat (28°C) a druga u inkubator (20°C) i svakodnevno promješa (lagano, da se ne lome micelijske strukture). Nakon inkubacije od 7 dana mjerimo pH i preostali fenol. Iz omjera količine fenola prije i poslije pokusa izračuna se postotak razgradnje pomoću sojeva streptomiceta.

2.3 REZULTATI ISPITIVANJA

2.3.1 Rezultati ispitivanja adaptacije pojedinih serija (Gauze) i sekcija (Pridham) streptomiceta na visoke koncentracije fenola u krutoj podlozi

Ispitivanje adaptacije streptomiceta na visoke koncentracije fenola (200 — 1 500 mg/l) poređali smo po serijama (Gauze) ne uzimajući u obzir vrstu tla i geografski smještaj odakle su izolirani sojevi za pokuse (tabela 1).



Grafikon 1. Kretanje postotka biološke razgradnje fenola (500 mg/l) pri 28 i 20°C za pojedine serije (Gauze) streptomiceta — podaci iz tabele 5.

U tabeli 2 dali smo ukupnu brojčanu zastupljenost pojedine serije u pokusu, te pregled rezultata adaptacije RA, RF i S sekcija (Pridham) na koncentraciju fenola od 200 do 1500 mg/l.

Sumirane rezultate rasta pojedinih sekcija (Pridham) na različite koncentracije fenola (200 — 1500 mg/l) i njihov postotak zastupljenosti na pojedinoj koncentraciji fenola dati su u tabeli 3.

Tabela 1. Rast antagonističkih i neantagonističkih sojeva streptomyceta (izoliranih iz tala okolice Zagreba, Poreča, Narvika, Abiska te planine Buševa i Pelister), na Czapekovom agaru uz dodatak fenola, inkubiranih pri 28°C, kroz 8 dana. Svrstani po serijama (G a u z e) i sekcijama (P r i d h a m).

Oznaka soja	Sekcija	Serija	mg fenola u litri podloge				
			200	500	750	1 000	1 500
ZG-al	RA	Lavendulae-Roseus	4	4	1	0	—
ZG-al	RF	Lavendulae-Roseus	4	4	1	0	—
ZG-al	RF	Lavendulae-Roseus	4	4	0	—	—
ZG-al	RF	Lavendulae-Roseus	4	3	0	—	—
ZI-pp	RA	Lavendulae-Roseus	4	4	4	2	1
ZG-pp	S	Lavendulae-Roseus	4	4	2	0	—
ZG-sp	S	Lavendulae-Roseus	4	2	0	—	—
ZG-rd	RF	Lavendulae-Roseus	4	2	1	—	—
NK-vz	RF	Lavendulae-Roseus	3	3	1	0	—
NK-vz, nea.	RA	Lavendulae-Roseus	3	3	1	0	—
NK-vz, nea.	RF	Lavendulae-Roseus	3	3	1	0	—
PD-li	S	Lavendulae-Roseus	4	4	1	0	—
ZG-pp	RA	Fradiae	3	2	0	—	—
ZG-pp	S	Fradiae	4	3	0	—	—
ZG-rd	S	Fradiae	4	4	3	2	1
NK-vz	RA	Fradiae	4	3	2	1	0
NK-vz	RF	Fradiae	4	3	3	1	1
NK-vz, nea.	RF	Fradiae	4	3	2	1	1
NK-vz, nea.	RF	Fradiae	4	3	2	1	1
AB-br, nea.	RF	Fradiae	3	3	0	—	—
BK-li	RA	Fradiae	3	3	0	—	—
ZG-rd	RF	Fuscus	4	4	2	1	0
BK-pl	S	Fuscus	2	2	0	—	—
BK-li	RF	Fuscus	3	2	0	—	—
PD-pl	S	Fuscus	2	2	0	—	—
ZG-rd	RF	Roseoviolaceus	4	4	3	1	1
ZG-rd	S	Roseoviolaceus	4	4	2	1	0
ZG-rd	S	Roseoviolaceus	4	2	1	0	—
PD-pl	RA	Roseoviolaceus	3	2	0	—	—
P.ZL-c	RF	Ruber	4	4	3	0	—

Oznaka soja	Sekcija	Serija	mg fenola u litri podloge				
			200	500	750	1 000	1 500
ZG-pp	RF	Helvolus	4	4	1	0	—
ZG-pp	S	Helvolus	4	4	2	1	0
ZG-sp	S	Helvolus	4	3	3	1	0
ZG-sp	S	Helvolus	4	2	1	0	—
ZG-al	S	Albus	2	0	—	—	—
ZG-pp	S	Albus	4	4	1	—	—
ZG-pp	S	Albus	3	1	0	—	—
ZG-pp	S	Albus	2	1	0	—	—
ZG-pp	RF	Albus	3	3	1	0	—
ZG-sp	RF	Albus	4	3	1	0	—
ZG-sp	S	Albus	2	1	0	—	—
ZG-sp	S	Albus	4	3	1	0	—
ZG-sp	S	Albus	4	3	1	0	—
ZG-rd	RA	Albus	4	4	3	2	1
ZG-rd	S	Albus	4	4	3	1	0
ZG-rd	S	Albus	4	2	1	0	—
AB-rb, nea.	RA	Albus	3	3	2	0	—
AB-re, nea.	RF	Albus	3	3	0	—	—
AB-rb	RF	Albus	2	1	0	—	—
AB-bv, nea.	S	Albus	2	0	—	—	—
BB-pl	RA	Albus	3	2	0	—	—
PS-pl	RF	Albus	4	3	2	0	—
PS-md	RF	Albus	4	4	2	1	0
PD-li	RF	Albus	4	4	3	2	0
ZG-pp	RF	Albosporeus	4	4	2	1	0
ZG-pp	RF	Albosporeus	4	3	1	0	—
ZG-al	S	Coerulescens	4	4	2	1	0
ZG-al	S	Coerulescens	4	3	1	0	—
ZG-pp	S	Coerulescens	4	4	0	—	—
ZG-rd	S	Coerulescens	4	3	1	—	—
NK-vz, nea.	RF	Coerulescens	4	3	1	0	—
NK-vz	RF	Coerulescens	4	3	0	—	—
NK-vz	RF	Coerulescens	3	2	0	—	—
NK-vz	RF	Coerulescens	3	1	0	—	—
AB-re, nea.	RF	Coerulescens	3	2	1	0	—
ZG-al	RF	Griseus	4	4	3	1	0
ZG-al	RA	Griseus	4	3	3	0	—
ZG-pp	S	Griseus	4	4	3	0	—
ZG-pp	S	Griseus	3	3	1	0	—
ZG-pp	S	Griseus	3	3	0	—	—
ZG-pp	S	Griseus	3	2	0	—	—
ZG-sp	S	Griseus	4	2	1	0	—
ZG-sp	S	Griseus	3	2	0	—	—
ZG-sp	S	Griseus	3	2	0	—	—
ZG-rd	RA	Griseus	4	3	0	—	—
ZG-rd	RF	Griseus	4	4	3	1	0
ZG-rd	S	Griseus	3	2	1	0	—

Oznaka soja	Sekcija	Serija	mg fenola u litri podloge				
			200	500	750	1 000	1 500
P.ZL-c	S	Griseus	4	4	2	0	—
NK-vz	S	Griseus	4	3	3	1	0
NK-vz	RF	Griseus	4	4	3	2	1
NK-vr, nea.	S	Griseus	3	3	0	—	—
AB-re, nea.	S	Griseus	2	0	—	—	—
AB-bv	RA	Griseus	2	0	—	—	—
AB-rb, nea.	RF	Griseus	2	1	0	—	—
BK-li	RF	Griseus	4	2	0	—	—
BK-li	S	Griseus	3	1	0	—	—
BK-pl	RA	Griseus	3	2	0	—	—
BK-md	S	Griseus	4	4	2	1	0
PD-li	RF	Griseus	3	2	0	—	—
PD-md	RF	Griseus	4	4	3	1	0
PS-pl	RF	Griseus	4	4	3	1	0
BM-md	RF	Griseus	4	4	3	1	0
ZG-pp	S	Nigrescens	4	4	3	1	0
ZG-sp	S	Nigrescens	4	2	1	0	—
ZG-pp	S	Chrysomallus	4	4	3	1	0
ZG-pp	S	Chrysomallus	4	4	3	0	—
ZG-pp	S	Chrysomallus	4	3	2	0	—
ZG-rd	S	Chrysomallus	4	4	3	2	—
ZG-al	RA	Aureus	4	4	3	1	0
ZG-al	RF	Aureus	4	2	2	0	—
ZG-al	S	Aureus	2	0	—	—	—
ZG-pp	RF	Aureus	4	3	2	0	—
ZG-pp	RF	Aureus	4	3	2	0	—
ZG-pp	RF	Aureus	4	4	2	1	0
ZG-pp	RF	Aureus	4	3	2	1	0
ZG-pp	RF	Aureus	3	2	1	0	—
ZG-pp	S	Aureus	4	4	3	1	1
ZG-pp	S	Aureus	4	4	1	0	—
ZG-sp	RA	Aureus	4	4	1	0	—
ZG-sp	RF	Aureus	4	4	2	0	—
ZG-sp	RF	Aureus	4	3	1	0	—
ZG-sp	RF	Aureus	3	2	1	0	—
ZG-sp	S	Aureus	4	4	2	0	—
ZG-sp	S	Aureus	4	3	2	0	—
ZG-sp	S	Aureus	4	2	0	—	—
ZG-rd	RF	Aureus	4	2	1	—	—
ZG-rd	S	Aureus	4	4	2	2	1
BK-pl	RF	Aureus	4	3	3	1	0
PD-li	RF	Aureus	4	3	3	1	0
PD-li	RA	Aureus	4	3	2	1	0
PD-pl	RA	Aureus	4	4	3	1	0
PD-pl	RF	Aureus	4	3	0	—	—
PD-pl	S	Aureus	4	4	3	1	0
PD-hs	RA	Aureus	4	3	3	0	—
PS-pl	RF	Aureus	4	3	1	0	—
PS-md	S	Aureus	3	3	0	—	—
BB-md	S	Aureus	4	3	1	0	—

Oznaka soja	Sekcija	Serija	mg fenola u litri podloge				
			200	500	750	1 000	1 500
ZG-al	RA	Chromogenes	3	3	0	—	—
ZG-al	RF	Chromogenes	4	3	1	0	—
ZG-al	RF	Chromogenes	4	3	1	0	—
ZG-al	RF	Chromogenes	3	2	0	—	—
ZG-pp	RF	Chromogenes	4	4	3	2	1
ZG-pp	RF	Chromogenes	4	4	2	1	0
BK-md	RF	Chromogenes	4	4	2	1	0
BK-pl	RF	Chromogenes	4	3	1	0	—
NK-vz	RF	Chromogenes	3	2	0	—	—
AB-re, nea.	RA	Chromogenes	3	2	1	0	—
AB-re, nea.	S	Chromogenes	4	3	2	1	0
ZG-al	RF	Violaceus	4	3	2	0	—
ZG-al	RF	Violaceus	4	3	1	0	—
ZG-al	RF	Violaceus	4	3	1	0	—
ZG-pp	RA	Violaceus	4	3	2	—	—
ZG-pp	RF	Violaceus	4	4	3	2	1
ZG-pp	RF	Violaceus	4	4	1	0	—
ZG-pp	RF	Violaceus	4	4	3	2	0
ZG-pp	RF	Violaceus	4	3	3	0	—
ZG-pp	RF	Violaceus	3	3	2	0	—
ZG-pp	RF	Violaceus	3	2	0	—	—
ZG-pp	S	Violaceus	4	4	3	2	2
ZG-sp	RF	Violaceus	4	3	2	1	0
ZG-sp	RF	Violaceus	4	4	2	0	—
ZG-sp	RF	Violaceus	4	3	0	—	—
ZG-sp	S	Violaceus	4	3	0	—	—
ZG-rd	RF	Violaceus	3	2	0	—	—
ZG-rd	RF	Violaceus	4	3	0	—	—
ZG-rd	RF	Violaceus	3	2	0	—	—
NK-vz, nea.	S	Violaceus	3	2	0	—	—
NK-vz, nea.	RF	Violaceus	4	3	2	0	—
AB-bv, nea.	RF	Violaceus	4	2	0	—	—
BM-hs	RF	Violaceus	3	1	0	—	—

Legenda: ZG-al: aluvijalna tla okolice Zagreba (Podsusud, Bundek, Lučko, Rugvica).

ZG-pp: tla na silikatnim stjenama (zeleni škrljci) (Sljeme — vrh Medvednice i Medvedgrad).

ZG-sp: pseudoglej ili umjereno podzolirano tlo (Maksimir).

ZG-rd: rendzina Zagrebačke gore ili Medvednice.

P.ZL-c: crvenica okolice Poreča — Zelena Laguna.

NK-vz, nea: vrtna zemlja okolice Narvika, nea. — neantagonistički soj.

AB-bv: tlo bez vegetacije Abisko.

AB-re: rizosfera Empetrum okolice Abisko.
 AB-br: rizosfera Betula tomentoza, Abisko.
 BK-li: listinac planine Buševa, nalazište Kjoška.
 BK-hs: humusni sloj, Buševa, Kjoška.
 BK-md: mineralni sloj, Buševa, Musica.
 BB-li: listinac, Buševa, Bazana I.
 BB-pl: poluraspalo lišće, Buševa, Bazana I.
 BB-hs: humusni sloj, Buševa, Bazana I.
 BB-md: mineralni sloj, Buševa, Bazana I.
 PD-li: listinac planine Pelister, nalazište Derven.
 PD-pl: poluraspalo lišće, Pelister, Derven.
 PD-hs: humusni sloj, Pelister, Derven.
 PD-md: mineralni sloj, Pelister, Derven.
 PŠ-li: listinac, Pelister, Sumljak.
 PŠ-hs: humusni sloj, Pelister, Sumljak.
 PŠ-md: mineralni sloj, Pelister, Sumljak.
 PŠ-pl: poluraspalo lišće, Pelister, Sumljak.

Oznake za rast streptomiceta na podlozi s fenolom

- 4 — bujan rast sa preraštavanjem podloge
- 3 — dobar rast s neznačajnom promjenom pigmenta
- 2 — pojedinačne kolonije, očita promjena boje pigmenta
- 1 — pojedinačne kolonije, uglavnom bez pigmenta
- 0 — nije primijećen rast
- — nije nasađen soj

2. 3. 2 Rezultati ispitivanja biološke razgradnje fenola u tekućoj podlozi pomoću streptomiceta

Nakon pozitivnih rezultata adaptacije svih serija i sekcija streptomiceta na visoke koncentracije fenola u krutom hranilištu (tabela 1), počelo se biološkom razgradnjom fenola (kao jedinog izvora ugljika) u tekućoj podlozi.

Pokusi biološke razgradnje fenola pri 20 i 28°C pomoću 104 soja streptomiceta koji su svrstani u 14 serija (Gauze) i 3 sekcije (Pridham) prikazani su u tabeli 4.

U tabeli 5 prikazani su dijapazon kretanja postotka biorazgradnje fenola (500 mg/l) pri 20 i 28°C i razlika u pH jedinicama prije i poslije pokusa, uz postotak pojedinih serija i dominantnost sekcija u pokusima.

U tabeli 6 prikazana je dominantnost sekcija (Pridham) u postotku biorazgradnje fenola od 500 mg/l pri 20 i 28°C.

Na osnovu rezultata tabele 5 načinjen je grafički prikaz 1, gdje vidimo dijapazon postotaka biorazgradnje fenola za pojedine serije streptomiceta kod 20 i 28°C.

U tabeli 7 dati su rezultati biorazgradnje fenola od 1 000 mg/l pomoću nekih serija streptomiceta.

U tabeli 8 prikazani su rezultati biorazgradnje fenola pomoću mješovitih kultura streptomiceta.

Tabela 2. Pregled rezultata rasta pojedinih serija i sekcija streptomiceta na različitim koncentracijama fenola u Czapekovom agaru, inkubiranih pri 28°C, kroz 8 dana

Serija	Ukup. brojč. zastupljenost i %		Sekcija	mg fenola u litri podloge				
				200	500	750	1 000	1 500
				i brojčana zastup. sekcija				
Laven.-Roseus	12	7,5%	RA (4)	4	4	4	1	1
			RF (5)	5	5	3	—	—
			S (3)	3	3	2	—	—
Fradiae	9	5,6%	RA (3)	3	3	1	1	—
			RF (4)	4	4	3	3	3
			S (2)	2	2	1	1	1
Fuscus	4	2,5%	RF (2)	2	2	1	1	—
			S (2)	2	2	—	—	—
Roseoviolaceus	4	2,5%	RF (1)	1	1	1	1	1
			S (2)	2	2	2	1	—
			RF (1)	1	1	1	—	—
Ruber	1	0,6%	RF (1)	1	1	1	—	—
Helvolus	4	2,5%	RA (1)	1	1	—	—	—
			S (3)	3	3	3	2	—
Albus	20	12,5%	RA (3)	3	3	2	1	1
			RF (7)	7	7	7	2	—
			S (10)	10	10	9	1	—
Albosporeus	2	1,2%	RF (2)	2	2	2	1	—
Coerulescens	9	5,6%	RF (5)	5	5	2	1	—
			S (4)	4	4	3	—	—
Griseus	27	16,8%	RA (4)	4	3	1	—	—
			RF (9)	9	9	6	6	1
			S (14)	14	13	7	3	—
Nigrescens	2	1,2%	S (2)	2	2	2	1	1
Chrysomallus	4	2,5%	S (4)	4	4	4	2	—
Aureus	29	18,2%	RA (5)	5	5	5	3	—
			RF (14)	14	14	13	4	—
			S (10)	10	9	6	3	2
Chromogenes	11	6,9%	RA (2)	2	2	1	—	—
			RF (8)	8	8	5	3	1
			S (1)	1	1	1	1	—
Violaceus	22	13,7%	RA (1)	1	1	1	—	—
			RF (18)	18	18	13	4	1
			S (3)	3	3	1	1	1

Tabela 3. Sumirani rezultati rasta pojedinih sekcija (Pridham) na različitim koncentracijama fenola (vidi tabelu 1 i 2)

Sekcija	Ukup. brojč. zastupljenost i %		mg fenola u litri podloge				
			200	500	750	1 000	1 500
Rectus-Flexibilis (RF)	77	48,0%	77	77	73	23	7
Retinaculum-Apertum (RA)	23	14,5%	23	23	19	9	2
Spira (S)	60	37,5%	60	57	50	13	5
Ukupno	160		160	157	142	45	14
Rast u %			100	98,2	88,7	28,1	8,7

Tabela 4. Biološka razgradnja fenola (500 mg/l) u tekućoj podlozi, pomoću aktinomiceta, inkubiranih na 20 i 28°C, kroz 7 dana. Sojevi streptomiceta svrstani su po serijama (Gauze) i sekcijama (Pridham).

Serijs: Lavendulae - Roseus

ZG-al	RA	7,2	6,9	92,6	8,0	7,3	62,3
ZG-al	RF	7,6	7,3	76,0	7,5	7,4	17,0
ZG-al	RF	7,6	7,2	94,6	7,2	6,8	31,8
ZG-pp	RA	7,5	7,1	94,4	7,5	7,1	90,2
ZG-pp	S	7,5	7,1	99,0	7,5	7,2	92,6
ZG-sp	S	7,5	7,4	52,0	8,0	7,9	24,0
ZG-rd	RF	7,5	6,9	43,0	7,6	7,7	30,0
NK-vz	RA	7,8	7,8	19,4	7,5	7,3	28,3
PD-li	S	7,5	6,8	98,0	7,5	7,3	30,5

Serijs: Fradiae

ZG-pp	RA	7,5	7,1	77,0	7,6	7,5	55,0
ZG-pp	S	7,5	7,3	74,0	7,6	7,7	42,0
ZG-rd	S	7,3	6,9	92,5	7,5	7,1	72,7
NK-vz, nea.	RF	7,9	7,5	86,0	7,9	7,7	76,0
AB-br, nea.	RF	7,9	7,6	35,2	7,8	7,7	41,0
BK-li	RA	7,0	6,1	29,0	7,0	5,6	74,0

Serijs: Fuscus

ZG-rd	RF	7,0	6,9	28,8	7,5	7,3	19,6
BK-pl	S	7,0	5,7	21,0	7,4	7,1	27,8
PD-pl	S	7,0	6,1	34,6	7,2	6,4	38,0

Serijs: Roseoviolaceus

ZG-rd	RF	7,5	7,5	4,0	7,5	7,4	6,2
ZG-rd	S	7,2	6,8	83,4	7,6	7,3	67,1

soja	Sekcija	pH-vrijednost prije - nakon pokusa		% bio- razgrad. na 28°C	pH-vrijednost prije - nakon pokusa		% bio- razgrad. na 20°C
ZG-rd	S	7,5	7,4	43,0	7,1	6,9	18,0
PD-pl	RA	7,0	6,2	17,4	7,5	6,7	19,6

Serijski: Helvolus

ZG-pp	RF	7,5	7,3	54,0	7,1	6,9	46,6
ZG-pp	S	7,5	7,4	24,0	7,8	7,6	30,0
ZG-sp	S	7,2	7,1	10,0	7,8	7,6	13,8

Serijski: Albus

ZG-sp	RF	7,2	7,0	52,0	7,3	7,1	32,0
ZG-pp	S	7,2	6,9	94,0	7,2	6,9	65,5
ZG-pp	S	7,8	7,6	13,6	7,5	7,5	3,8
ZG-rd	S	7,2	6,8	72,0	7,3	6,9	51,1
ZG-rd	S	7,5	7,4	43,0	7,6	7,4	26,0
ZG-sp	S	7,8	7,7	15,0	7,3	7,1	20,0
ZG-sp	S	7,1	7,0	13,6	8,0	7,9	8,0
AB-rb	RF	7,0	6,8	24,0	6,9	6,2	27,0
AB-re, nea.	RF	6,5	6,2	61,0	6,5	6,1	87,2
AB-bv, nea.	S	7,2	7,1	2,8	7,5	7,3	11,6
BB-pl	RA	7,2	5,4	13,1	7,2	5,1	16,8
PS-md	RF	7,2	5,3	30,8	6,5	5,8	27,9
PD-li	RF	7,0	4,9	29,9	6,5	5,2	34,2

Serijski: Albosporeus

ZG-pp	RF	7,4	7,2	74,0	7,9	8,1	50,0
ZG-pp	RF	7,5	7,4	49,0	7,9	7,7	40,0

Serijski: Coerulescens

ZG-al	S	7,6	7,2	89,0	7,2	6,9	28,0
ZG-al	S	7,8	7,4	89,0	7,8	7,7	36,0
ZG-pp	S	7,0	6,8	44,7	7,9	7,3	27,6
ZG-rd	S	7,5	7,4	43,0	7,6	7,4	18,6
NK-vz, nea.	RF	7,9	7,4	4,3	7,3	7,2	1,8
AB-re, nea.	RF	7,5	7,2	37,4	7,2	7,0	47,0

Serijski: Griseus

ZG-al	RF	8,2	7,3	37,5	8,3	7,7	80,6
ZG-al	RA	8,1	7,7	33,1	7,9	6,3	81,0
ZG-pp	S	7,5	7,3	70,4	7,3	6,8	77,0
ZG-pp	S	7,0	6,8	66,2	7,4	7,1	22,0
ZG-pp	S	7,5	7,4	56,7	7,8	7,7	5,4
ZG-sp	S	7,3	6,9	89,4	7,9	7,3	75,4
ZG-rd	RA	7,8	7,9	29,3	7,2	6,8	35,8
ZG-rd	RF	7,9	7,3	90,4	7,5	7,3	96,2
P.ZL-c	S	7,6	7,3	42,8	6,9	6,8	22,0
NK-vz	S	7,9	7,6	22,0	8,0	7,8	1,8
NK-vez, nea.	S	7,8	7,4	9,8	7,8	7,3	6,7
AB-re, nea.	S	7,8	7,4	2,2	7,5	7,6	4,3

soja	Sekcija	pH-vrijednost prije - nakon pokusa		% bio- razgrad. na 28°C	pH-vrijednost prije - nakon pokusa		% bio- razgrad. na 20°C
BK-li	RF	7,0	5,1	29,9	7,5	6,2	41,5
BK-pl	RA	7,0	5,2	34,0	7,5	7,3	19,6
BK-md	RA	7,0	5,3	21,0	7,5	6,7	58,4
PS-pl	RF	7,0	5,5	40,0	7,5	7,1	96,0

Serijska: *Nigrescens*

ZG-pp	S	7,0	6,9	66,2	8,0	7,9	28,5
-------	---	-----	-----	------	-----	-----	------

Serijska: *Aureus*

ZG-al	RA	7,8	7,6	98,0	7,7	7,1	96,0
ZG-al	RF	8,2	7,3	63,1	7,9	7,7	65,0
ZG-pp	RF	5,9	5,8	47,5	7,1	7,0	9,4
ZG-pp	RF	7,0	6,9	66,2	7,0	6,8	44,4
ZG-pp	RF	7,5	7,3	11,0	7,9	7,8	16,0
ZG-pp	S	7,5	7,2	60,2	7,8	7,7	17,2
ZG-pp	S	7,5	7,4	24,0	7,1	7,1	2,7
ZG-sp	RA	7,2	7,1	62,0	7,1	6,9	33,8
ZG-sp	RF	7,1	7,0	14,0	7,1	7,1	1,8
ZG-sp	S	7,2	6,7	96,0	7,9	7,3	92,5
ZG-sp	S	7,5	7,3	22,0	7,1	7,1	5,4
ZG-rd	S	7,5	7,4	43,0	7,5	7,5	22,0
BB-md	S	7,5	6,7	98,0	7,3	6,2	63,5
BK-pl	RF	7,0	5,3	34,6	7,5	6,5	34,2
PD-li	RA	7,4	6,7	28,5	7,3	6,8	23,0
PD-pl	RF	7,3	7,1	29,9	7,5	7,3	48,8

Serijska: *Chrysomallus*

ZG-pp	S	7,5	7,2	88,5	7,8	7,3	93,4
ZG-pp	S	7,3	7,3	27,8	7,3	7,2	19,0
ZG-pp	S	7,2	7,1	22,5	7,6	7,7	14,9
ZG-rd	S	7,2	6,9	65,0	7,2	7,1	44,8

Serijska: *Chromogenes*

ZG-al	RF	7,6	7,5	22,5	7,5	7,3	36,9
ZG-al	RA	7,6	7,3	83,5	7,7	7,5	77,0
ZG-pp	RF	7,5	7,3	74,0	8,0	7,9	46,5
ZG-pp	S	7,8	7,6	87,0	7,8	7,9	52,5
ZG-rd	RF	7,3	6,8	94,6	7,2	7,1	24,0
NK-vz	RF	7,2	7,1	8,5	7,1	7,2	4,1
BK-pl	RF	7,3	5,9	16,0	7,1	6,4	38,0
BK-md	RF	7,1	5,6	21,0	6,7	5,5	54,5

Serijska: *Violaceus*

ZG-al	RF	7,6	7,3	72,0	7,5	6,6	96,9
ZG-al	RF	7,6	7,2	87,0	7,5	6,8	94,5
ZG-pp	RF	7,5	7,1	92,4	7,5	7,3	92,2

soja	Sekcija	pH-vrijednost prije - nakon pokusa		% bio- razgrad. na 28°C	pH-vrijednost prije - nakon pokusa		% bio- razgrad. na 20°C
ZG-pp	RF	7,8	7,6	37,8	7,8	7,4	46,6
ZG-pp	RF	7,5	6,8	99,0	8,0	7,9	37,6
ZG-pp	S	7,3	6,8	96,4	7,8	7,4	90,8
ZG-sp	RF	7,5	7,2	90,4	7,5	6,8	99,3
ZG-sp	S	7,9	6,9	90,3	7,5	7,3	18,0
ZG-rd	RF	7,2	7,1	33,6	7,8	7,6	28,0
NK-vz, nea.	S	7,5	7,2	19,0	6,5	6,2	62,1
NK-vz, nea.	RF	7,9	7,5	14,0	7,1	6,7	25,6
AB-bv, nea.	RF	7,8	7,3	46,5	7,3	6,4	67,2
BM-hs	RF	7,2	6,1	23,0	7,2	6,9	23,0

Tabela 5. Dijapazon kretanja postotka biološke razgradnje fenola (500 mg/l) pri 20 i 28°C, kao i razlika u pH-jedinicama prije i nakon pokusa, kod pojedinih serija (G a u z e) streptomyceta. Podaci izvađeni iz tabele 4.

Serijs: Lavendulae-Roseus (ispitano 9 sojeva)

Dominantna sekcija u % biorazg.	% biorazg. od—do kod 28°C	Razlika u pH- jedinica	% biorazgr. od—do kod 20°C	Razlika u pH- jedinica
S (28°C), S (20°C)	19,4—99,0	0,1—0,7	17,0—92,6	0,1—0,7

Serijs: Fradiae (ispitano 6 sojeva)

S (28°C), RF (20°C)	29,0—92,5	0,2—0,9	41,0—76,0	0,1—1,4
---------------------	-----------	---------	-----------	---------

Serijs: Fuscus (ispitano 3 soja)

S (28°C), S (20°C)	21,0—34,6	0,1—1,3	19,6—38,0	0,1—1,2
--------------------	-----------	---------	-----------	---------

Serijs: Roseoviolaceus (ispitano 4 soja)

S (28°C), S (20°C)	4,0—83,0	0,1—1,2	6,2—67,1	0,1—0,8
--------------------	----------	---------	----------	---------

Serijs: Helvolus (ispitano 3 soja)

RF (28°C), RF (20°C)	10,0—54,0	0,1—0,2	13,0—46,6	0,2
----------------------	-----------	---------	-----------	-----

Serijs: Albus (ispitano 13 sojeva)

S (28°C), RF (20°C)	2,8—94,0	0,1—2,1	3,8—87,2	0,0—1,3
---------------------	----------	---------	----------	---------

Serijs: Albosporeus (ispitano 2⁰ soja)

Dominantna sekcija u % biorazg.	% biorazg. od—do kod 28°C	Razlika u pH-jedinica	% biorazgr. od—do kod 20°C	Razlika u pH-jedinica
RF (28°C), RF (20°C)	49,0—74,0	0,2—0,3	40,0—50,0	0,2
Serija: Coerulescens (ispitano 6 sojeva)				
S (28°C), RF (20°C)	4,3—89,0	0,1—0,5	1,8—47,0	0,1—0,6
Serija: Griseus (ispitano 16 sojeva)				
RF (28°C), RF (20°C)	2,2—90,4	0,1—1,9	1,8—96,2	0,1—1,3
Serija: Aureus (ispitano 16 sojeva)				
S (28°C), RA (20°C)	11,0—98,0	0,1—1,7	1,8—96,0	0,0—1,1
Serija: Chrysomallus (ispitano 4 soja)				
S (28 i 20°C)	22,5—88,5	0,0—0,3	14,0—93,4	0,1—0,5
Serija: Chromogenes (ispitano 8 sojeva)				
RF (28°C), RA (20°C)	8,5—94,6	0,1—1,5	4,1—77,0	0,1—1,3
Serija: Violaceus (ispitano 13 sojeva)				
RF (kod 28 i 20°C)	14,0—99,0	0,1—1,1	18,0—99,0	0,1—0,9

Tabela 6. Dominantne sekcije (P r i d h a m) u postotku biorazgradnje fenola (500 mg/l) kod 14 serija (G a u z e) streptomyceta. Pokusi su rađeni sa 104 soja pri 20 i 28°C

Sekcija broj	Ukupan broj dominantnih sekcija u postotku biorazgradnje fenola pri temperaturama	
	28°C	20°C
1. Rectus-Flexibilis (RF)	5	7
2. Retinaculum-Apertum (RA)	0	2
3. Spira (S)	9	5

Tabela 7. Biološka razgradnja fenola (1 000 mg/l) u tekućoj podlozi, pomoću streptomiceta, inkubiranih na 28°C, kroz 7 dana. Sojevi aktomiceta svrstani su po serijama (G a u z e) i sekcijama (P r i d h a m)

Serija: Lavendulae-Roseus				
Oznaka soja	Sekcija	pH-vrijednost prije i nakon pokusa		%-tak biorazgrad. na 28°C
ZG-pp	RA	7,5	7,5	3,0
Serija: Fradie				
ZG-rd	S	8,0	7,9	12,0
Sekcija: Roseoviolaceus				
ZG-rd	RF	7,5	7,4	8,0
ZG-rd	RF	7,5	7,5	7,3
Serija: Albus				
ZG-rd	RA	7,6	7,6	10,0
Serija: Griseus				
ZG-pp	S	7,6	7,6	2,6
ZG-pp	S	8,0	7,8	8,2
ZG-sp	S	7,5	7,4	10,3
ZG-rd	RA	7,5	7,4	16,6
Serija: Aureus				
ZG-sp	S	7,0	6,9	6,1
ZG-pp	S	7,5	7,4	5,3
ZG-pp	RF	7,3	7,2	10,9
Serija: Chrysomallus				
ZG-pp	S	7,7	7,6	11,8
ZG-pp	S	7,5	7,5	16,0
ZG-pp	S	7,7	7,6	19,3
ZG-rd	7,5	7,5	7,4	18,2
Serija: Violaceus				
ZG-sp	RF	7,0	6,9	6,4
ZG-pp	RF	7,6	7,6	7,3
ZG-pp	RF	7,6	7,5	17,2

Tabela 8: Biološka razgradnja fenola (500 mg/l) pri 28°C, pomoću mješovitih kultura streptomiceta uz dodatak diamonijevog fosfata 0,6‰

Naziv kulture	pH-vrijednost prije i nakon pokusa		Trajanje pokusa i % — biorazgradnje			
			1	2	4	7 dana
Sava — Podsusud 10 sojeva	7,5	7,2	—	7,6	50,0	94,0
Sava — Zapruđe 10 sojeva	7,5	7,3	—	—	36,5	68,5
Mikulići 10 sojeva	7,5	7,1	—	2,1	67,0	96,0
Maksimir 10 sojeva	7,5	7,3	—	3,0	18,0	67,0
Buševa — Kjoška 10 sojeva	7,5	6,8	—	3,2	30,5	98,0
Buševa — Bazana I 10 sojeva	7,5	5,6	4,0	23,0	27,0	63,5
Buševa — Musica 10 sojeva	7,5	5,9	3,2	30,5	48,8	54,5
Pelister — Derven 10 sojeva	7,5	6,5	2,8	37,6	50,4	60,0
Pelister — Šumljak 10 sojeva	7,5	6,1	2,3	21,5	30,6	65,8

3.0 DISKUSIJA O REZULTATIMA

U ovome radu bilo je dvije vrste pokusa:

1. Adaptacija pojedinih sojeva streptomiceta (izoliranih iz različitih tala okolice Zagreba, Poreča, Abiska, Narvika, te planine Buševa i Pelister (na fenol, od 200 do 1 500 mg/l).

2. Biološka razgradnja fenola kao jedinog izvora ugljika uz dodatak diamonijevog fosfata u tekućoj podlozi.

U ispitivanjima fenomena adaptacije streptomiceta na visoke koncentracije fenola (200 — 1 500 mg/l), vidimo iz dobivenih rezultata u tabelama 1, 2 i 3, da nakon pokusa od 750 mg/l fenola naglo pada broj sojeva streptomiceta koji mogu rasti većim koncentracijama fenola.

Sojevi streptomiceta koji podnose koncentraciju fenola od 1 000 i 1 500 mg/l uglavnom su izolirani iz vrtne zemlje, rendzine i aluvijalnog tla.

Nijesmo primijetili neku posebnu razliku između sojeva antagonističkih i neantagonističkih streptomiceta kod adaptacije na fenol. Prema usmenom saopćenju prof. dr Vere Johanides, svi su streptomiceti — antagonističari.

Treba napomenuti da se pri 500 mg/l fenola na podlozi razvija normalni vegetativni i zračni micelij. Međutim, pri 750 mg/l fenola u podlozi pigment zračnog micelija javlja se tek sedmog dana i s promjenama u nijansi boje, ako ga usporedimo s početnim sojem. Pri 1 000 mg/l fenola zračni je micelij jedva primjetan (rijetko je razvijen i pigmentiran) i uglavnom depigmentiran, a javlja se poslije 8 do 14 dana kako je nasaden na podlogu. Pri 1 500 mg/l fenola nije zapažen rast zračnog micelija a vegetativni micelij je depigmentiran.

Od 160 sojeva streptomiceta tek 14 sojeva raslo je na podlozi sa 1 500 mg/l fenola, a pripadali su serijama Fradiae (4 od 9), Aureus (2 do 29), Violaceus (2 od 22), Griseus (1 od 27), Albus (1 od 12), Lavendulae-Roseus (1 od 12), Chromogenes (1 od 11), Roseoviolaceus (1 od 4) i Nigrescens (1 od 2). Ostale serije nisu imale sojeve koji bi rasli na podlozi sa 1 500 mg/l fenola.

Međutim, ako pogledamo rezultate tabele 3, vidimo da streptomicete svrstane u sekcije (Pridham) nisu brojčano jednako zastupljene, a ipak su sve u redu veličine što se tiče adaptacije na pojedine koncentracije fenola. Npr., pri 200 mg/l fenola u podlozi, streptomiceti koji pripadaju sekcijama RA, RF, S — adaptiraju se 100%, pri 500 mg/l adaptacija je za sekcije RA i RF 100%, ali za S — 95%. Pri 750 mg/l adaptacija je za RA i S 83% a za RF 95%. Pri 1000 mg/l rezultata je adaptacije slijedeći: RA — 39%, RF — 30%, S — 21,5%, dok pri koncentraciji fenola od 1 500 mg/l postotak adaptacije kreće se: RF — 9,1%, S — 8,3% a RA — 7,8%. Možemo reći da je način prikazivanja adaptacije na fenol i biološke razgradnje fenola mnogo praktičniji pomoću sekcija (Pridham) nego pomoću serija (Gauze), jer oblik sporofora ostaje a pigment se jako mijenja pod uticajem različitih ugljikovodika kao što su fenol, stiren, acetofenon, mestiloksid, benzen, etilbenzen, kumen i dr. (Dokazano u kasnijim pokusima).

Nakon pozitivnih rezultata adaptacije streptomiceta na fenol počela su ispitivanja biorazgradnje fenola u tekućoj podlozi.

Treba napomenuti da su ti pokusi rađeni s manjim brojem sojeva (104), jer su neki sojevi (56) inficirani tokom rada od bakterija i funga.

Rezultati biorazgradnje fenola pomoću streptomiceta također su raspoređeni po serijama (Gauze) i vide se u tabeli 4. Iz tih rezultata možemo zaključiti da 90% sojeva streptomiceta dobro razgrađuje fenol od 500 mg/l.

Oko 10% sojeva streptomiceta veoma slabo razgrađuje fenol, a zapaža se njihov rast na supstratu i uz stijenke Petrijeve zdjelice u vidu sitnih bijelih kolonija. Za te sojeve streptomiceta možemo reći da dobro podnašaju fenol, ali se njime neznatno koriste za svoj rast.

Rezultati koje nam pružaju tabela 5 i grafikon 1 pokazuju veliki dijapazon kretanja postotka biorazgradnje fenola i razlika u pH jedinicama za pojedine serije i dominantnost sekcija pri 20 i 28°C.

Zanimljiva su zapažanja da pojedine serije streptomiceta svoj maksimum postotka biorazgradnje dostignu pri 20°C (*Fuscus*, *Griseus*, *Chrysomallus*), a druge (*Fradiae*, *Helvolus*, *Roseoviolaceus*, *Albosporeus*, *Coerulescens* i *Chromogenes*) pri 28°C.

Zapaža se i to (grafikon 1) da neke serije imaju velik dijapazon postotka razgradnje fenola — ispod 20 do iznad 90%, pri 20° i 28°C, dok su male oscilacije u kretanju postotaka biorazgradnje fenola primjećene kod serija *Lavendulae-Roseus*, *Fuscus*, *Helvolus* i *Albosporeus*.

Interesantan je podatak (tabela 6) koji nam pokazuje dominantnost pojedinih sekcija streptomiceta u postotku biorazgradnje fenola pri temperaturi od 20°C — dominantna je RF — 7 puta i 28°C — dominantna je S — 9 puta.

Ispitivanje biorazgradnje fenola od 1 000 mg/l (tabela 7) samo su potvrda rezultata u tabeli 1.

Pokusi biorazgradnje fenola pomoću mješovitih kultura streptomiceta rađeni su poslije pomenutih pokusa susretljivošću dr B. Stilinovića i mr A. Džingova. Rezultati biorazgradnje fenola pomoću mješovitih kultura streptomiceta (tabela 8) potvrđuju pretpostavku da nije bitno odakle su izolirani sojevi streptomiceta, već su bitna njihova međusobna antagonistička svojstva i fiziološka sposobnost razgradnje fenola.

Primjećeno je u pokusima sa mješovitim kulturama streptomiceta da sojevi iz tala planina Buševa i Pelister naglo snizuju pH vrijednost supstrata, koja je vjerovatno prepreka boljoj razgradnji fenola. Interesantno da streptomiceti izolirani iz aluvijalnih tala rijeke Save (koja je na tim mjestima zagađena fenolom) nisu bolje od ostalih streptomiceta razgrađivali fenol u laboratorijskim uvjetima.

Jedan od sigurnih indikatora biološke razgradnje fenola u pokusu jest miris po zemlji i velika razlika u pH jedinicama (prije i poslije pokusa) koja se kretala od 0,5 do 2,1.

Međutim, ima serija streptomiceta (*Albosporeus*, *Helvolus*, *Coerulescens*) koje dobro razgrađuju fenol a pH razlika je jedva 0,2 — 0,5 jedinica prije i nakon pokusa.

Džingov, 1970, Stilinović, 1971), onda na osnovu naših rezultata možemo reći da streptomicete imaju veliku ulogu u biorazgradnji fenola u vodi i zemlji.

4.0 ZAKLJUČAK

U prvom dijelu eksperimenta dobiveni su različiti sumirani rezultati postotka rasta streptomiceta na različitim koncentracijama fenola: 200 mg/l — 100%, 500 mg/l — 98,2%, 750 mg/l — 88,7%, 1 000 mg/l — 28,1% i 1 500 mg/l — 8,7%.

Zanimljiva su zapažanja: promjena boje pigmenta zračnog i vegetativnog micelija streptomiceta pri 750 i 1 000 mg/l fenola i potpuna depigmentacija vegetativnih micelija (zračni micelij nije primjećen) pri 1 500 mg/l.

U drugom dijelu eksperimenta rađeni su pokusi biorazgradnje fenola od 500 mg/l, kao jedinog izvora ugljika u tekućoj podlozi sa 0,6% diamonijevog fosfata pri 20 i 28°C u toku 7 dana, uz mjerenje pH i preostalog fenola pomoću UV-metode (Schmauch i Grubb, 1954, JUS.H.ZI-147), mjerenjem razlika ekstincije alkalne i zakiseljene otopine pri maksimalnoj apsorpciji 289 nm.

Pokusi su rađeni sa 104 soja streptomiceta od kojih je 90% dobro razgrađivalo fenol, a za ostalih 10% to je teško utvrditi ako se uzmu u obzir standardna greška metode, aparature i ljudski čimilac.

Od ekoloških faktora veći uticaj na postotak biorazgradnje fenola ima vrsta tla (vrtne zemlja, rendzina, aluvijalno tlo) nego geografski smještaj.

Klasifikacija streptomiceta za ispitivanje biorazgradnje fenola po serijama Gauze i sekcijama Pridham u navedenim ispitivanjima zadovoljava. Možda bi za ovakva ispitivanja bila bolja klasifikacija koju su predložili Szabo i Marton (1962), do jednog dana kada budemo u stanju da odredimo soj prema njegovom kemijskom sastavu pomoću već poznatih tehnika (plinska-kromatografija, te sve moderniji monitori i analizatori za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava neke tvari).

5.0 LITERATURA

- Adler, N. (1966): Razgradnja ugljikovodika pomoću mikroorganizama. Mikrobiologija, Beograd, 3, 85-90.
Brebion, G. R. et al. (1968): Biodegradation of phenol, Chem. Abstr., 68, Abstr. № 15890t.

- Dražić, Z. i sur. (1967): Uzajamni odnosi dviju populacija kvasca (*Candida* i *Rhodotorula* sp.) kod uzgoja na teškom plinskom ulju kao jedinom izvoru ugljika, *Mikrobiologija*, Beograd, 1, 1-21.
- Džingov, A. (1970): Rasprostranjenost aktinomiceta u tlima bukovich i jelovih šuma nekih planina Zapadne Makedonije, *Magistarski rad*, PMF — Sveučilište u Zagrebu.
- Gauze, G. F. (1957): *Voprosi klasifikaciji aktinomicetov-antagonistov*, Medgiz, Moskva.
- Jardas, I. i Munjko, I. (1972): Preliminary observation of oil and phenol distribution in the Central Adriatic. *Bilješke*, Split. U štampi.
- Micev, N. (1953): Rizosferna mikroflora nekih sorta pšenice u Makedoniji. *Zemljište i biljka*, Beograd, 2, 3.
- Mickovski, M. (1959): Pridones kon poznavanjetu na mikroflorata na visoko planinske pasišta. *God. zbornik na Zemjodelsko-šumarskiot fakultet na Univerzitetot vo Skopje*, 12, 169-191.
- Mickovski, M. (1961): Pridones kon poznavanjetu na mikroflorata na solenite počvi vo NR Makedonija. *Odpečatok odgod. zbor. na Zemjodelsko-šumarskiot fakultet na Univerzitetot vo Skopje*, *Zemjodelstvo*, 14, 276-289.
- Mickovski, M. (1963): Mikroflorata na planinske temno-kafeavi počvi pod posištava vo Maleševsko SR Makedonija. *Odpečatok od godišniot zbornik na Zemjodelsko-šumarskiot fak. na Univ. vo Skopje*, *Zemjodelstvo*, 16, 367-396.
- Munjko, I. (1970): Zdravstvene, biološke i ekonomske posljedice zagađivanja voda. *Nar. Zd. L.* 12, 146-147, 11-12, Rijeka.
- Munjko, I. i Jardas, I. (1970): O zagađivanju Jadranskog mora fenolom i mineralnim uljima, *More*, 13, 5-6, 24, Rijeka.
- Munjko, I. i surad. (1970): Važnost biorazgradnje fenola radi njegove prisutnosti u rijeci Savi. *Zaštita Materijala*, 18, 8-9, 297-301, Beograd.
- Munjko, I. i Jardas, I. (1970/71): O problemu onečišćevanja in zaštiti vod pred fenoli in mineralni olji. *Proteus*, 33/5, 221-224, Ljubljana.
- Munjko, I. i surad. (1970): Biološka oksidacija fenola kulturama nekih eubakterija. *Mikrobiologija*, 7, 2, 155-161, Beograd.
- Munjko, I. (1971): *Prilog poznavanju biološke razgradnje fenola*. Magistarski rad. *Prir.-matematički fak. Sveučilišta u Zagrebu*.
- Munjko, I. (1971): Utjecaj otpadnih voda na kvalitet podzemnih voda uz prilog poznavanju biooksidacije fenola. *Zaštita materijala*, 19, 4, 159-161, Beograd.
- Munjko, I. i Mikličan, R. (1971): *Prilog poznavanju biorazgradnje fenola pomoću lišajeva*. *Poljoprivreda i šumarstvo*. Titograd.
- Munjko, I. (1972): Biooksidacija fenola u otpadnim vodama pomoću funga. *Voda i sanitarna tehnika*, 2, 1, 33-37, Beograd.
- Parkisan, J. C. and Pickett, J. M. (1964): The influence of temperatur on the effect of bacteriostatic concentrations of phenol against *Escherichia coli*, *J. appl. Bact.* 27, 471-485.
- Pavletić, Z. i Stanković, B. (1968): Utjecaj pedoloških i fitocenoloških faktora na raspored aktinomiceta u tlima Zagrebačke gore. *Referat na I Kongresu mikrobiologa Jugoslavije u Beogradu*, 25-28. XI 1968.
- Pavletić, Z. i Stilić, B. (1969): Rasprostranjenost aktinomiceta antagonista u nekim kontinentalnim tlima Jugoslavije. *Referat na simpoziju iz ekologije*, Beograd 12-14. II 1969.
- Pavletić, Z. i Stilić, B. (1969): *Prilog poznavanju aktinomiceta iz rendzine Zagrebačke gore*. *Acta botanica Croatica*, 28, 227-283, Zagreb.
- Pavletić, Z. i sur. (1972): Zimski i ljetni aspekt heterotrofnih i kalifikativnih bakterija i nekih ekoloških karakteristika unecišćenja u području Riječkog zaljeva. *Acta Adriatica*, Split, u štampi.
- Piljac, G. (1964): *Morfološko-fiziološke studije streptomiceta iz nekih tala kontinentalnog i primorskog dijela Jugoslavije*. *Dizertacija*. PMF — Sveučilišta u Zagrebu.

- Pridham, T. G. et al., (1957): A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of Streptomyces. *Antibiotics Annual*. 947-953.
- Starč, A. (1941): Mikrobiološka studija nekih podzolastih tala Hrvatske. *Poljodjelska znanstvena smotra*, 4, 83-192. Zagreb.
- Stilinović, B. i Pavletić, Z. (1962): Antagonističko djelovanje nekih oblika roda streptomyces iz zemlje vrvenice otoka Prvića u Dalmaciji. *Acta botanica Croatica*. 20/21, 39-46. Zagreb.
- Stilinović, B. (1971): Utjecaj pedoloških i fitocenoloških faktora na rasprostranjenost streptomyceta u tlima okolice Zagreba. *Doktorska dizertacija*, Prirod.-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Semov, V. (1969): Mikrobiološka decomposition of phenol, *Wat. Pollut. Abstr.*, 42, Abstr. No 1678.
- Đodurović, M. (1953): Prilog proučavanju Actinomyces spp. iz naših zemljišta. *Zemljište i biljka*, 2, 439-468.
- Tešić, Ž. i surad. (1967): Prilog poznavanju mikroflore u dolomitским i serpentinskim staništima pod raznim stadijima biljne sukcesije u Bosni i Hercegovini. *Mikrobiologija*, 4, 1-19. Beograd.

BIODEGRADATION OF PHENOL BY STREPTOMYCETES

Mr Ignac Munjko,

Water Control Service, TPMK-OKI — Zagreb, Yugoslavia

Summary

From 1968 through 1971 a study of biodegradation of phenol by streptomycetes. For these experiments 160 strains of streptomycetes from all Gauze series belonging to sections RA, RF, S — Pridham/isolated from the soil specimens from the vicinity of Zagreb, Poreč, the Pelister mountains and Buševo (Yugoslavia), Abisk (Sweden) and Narvik (Norway).

The basic problem was of the study the adaption of streptomycetes to phenol (concentrations 200—1500 ppm/as the only source of carbon).

The results of the first part of the study show the growth rate of streptomycetes in different phenol concentrations. At a concentrations of 200 ppm — of phenol — 100%, 500 ppm — 98,2%, 750 ppm — 88,7%, 1000 ppm — 28,7% and at 1500 ppm — 8,7%. Some interesting features: The changes in pigment colour of air and vegetative mycelium at 750 and 1000 ppm and complete depigmentation of colonies at 1500 ppm seem to be interesting. After repeated planting on the normal Czapek-agar the pigment colour of air mycelium and of the vegetative one is restored.

In the second part of the study comparative tests of biodegradation of 500 ppm phenol were performed in fluid medium with 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ at 20 and 28°C over 7 days. The residual phenol was measured by extinction differences in alkaline and acid solutions at the maximum absorption of 289 nm.

The tests show that streptomycetes (90%) take 7 days for a biodegradation of phenol.

As to the ecological factors it has been shown that the percentage of the biodegradation of phenol depends.

The classification of the streptomycetes by Pridham (1957) as well as by Gauze (1958) is thoroughly satisfactory for the purposes of the studies of phenol biodegradations.