

Mikrobiálna degradácia lignocelulózového materiálu odpadových vôd celulózky Vranov nad Topľou

MARTA ČERŇÁKOVÁ, LADISLAV ŠUTÝ, EMIL GOLIS

V súčasnosti pri rýchlom rozvoji vedy a techniky je aj veľa faktorov vonkajšieho prostredia, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú zdravie človeka. Jedným z nich sú chemické látky, ktoré majú široké použitie v praxi. Sú to napr. chemoterapeutiká, ktoré liečia, ale môžu mať aj vedľajšie škodlivé účinky, konzervačné prostriedky potravín, pesticídy, kozmetické preparáty atď. Takéto látky sú potenciálne nebezpečenstvo tak pre samého človeka, ako aj pre ďalšie generácie. Preto je dôležité odhaľovať ich vlastnosti a eliminovať ich zo životného prostredia.

Účinky zlúčenín chlóru na mikroorganizmy

Nepriaznivé účinky na živé organizmy rozdeľujeme na inhibičné, toxické, mutagénne a karcinogénne (Šrám, 1974).

Vzhľadom na to, že tak mikroorganizmy, ako aj človek majú rovnakú dvojzávitnicovú štruktúru DNA a tie isté štyri nukleotidy, a pretože mutagény reagujú s DNA, možno predpokladať, že mutagény pre nižšie organizmy sú mutagénmi aj pre vyššie organizmy. Zásah do štruktúry DNA vplyvom mutagénov môže organizmus opraviť, alebo sa zásah fixuje a vznikajú populácie so zmenenými génovými vlastnosťami.

Chlórované organické zlúčeniny, ktoré produkujú v procese

bielenia zlúčeniny chlóru, vykazujú všetky negatívne účinky (Ames, 1974; Ander, 1977). Predovšetkým negatívne pôsobia chlórované aromatické zlúčeniny typu chlórphenolov, chlór-gvajakolov, chlórpyrokatecholov, chlórvanilínov, chlór-syringaldehydov (Axejard, 1986), chlór-syringolov (Turner, Wallin, 1982) a iných. (Vl.orec 1 na str. 251.) Podľa Alxejarda (1986) sú v bieliarenských vodách, pokiaľ ide o množstvo, zastúpené 3,4,5-trichlór-gvajakol, tetrachlórpyrokatechol, 4,5-dichlór-gvajakol, tetrachlór-gvajakol a pentachlór-phenol.

V bieliarenských vodách sa vyskytujú aj iné chlórové zlúčeniny,

ako 3-chlór-4-dichlórmetyl-5-hydroxy-2-furanón, monochlór — dichlór — a trichlóroctová kyselina (Čerňáková a spol., 1987), 1,1,2,3- tetrachlórpropén, 1,1,2,3,4- pentachlórpropén a mnohé ďalšie, ktoré pochádzajú z polysacharidickej časti alebo z extraktov či fragmentov lignínu (Ander, 1977), vykazujúcich bakteriálnu mutagenitu podľa testu na Salmonellu. (Vzorec 2, na str. 251.)

Za nebezpečné sa v bieliarenských vodách považujú aj živíčné a mastné kyseliny a ich chlórové deriváty monochlór-, dichlórdehydrobietová kyselina, dichlórstearová kyselina a ďalšie (Turner, Wallin, 1982).

Niektoré typy húb sú schopné degradovať chlórové zlúčeniny z bielenia. Potvrdili to aj niektoré naše výsledky (Čerňáková a spol., 1987).

Na transformačné degradácie chlórových zlúčenín vo vodách možno využiť aj fotochemické reakcie, ktoré čerpajú energiu zo slnka.

Na rôznych pracoviskách sa hľadajú modely na identifikáciu mutagénosti, resp. karcinogénosti. Najznámejšie modely sú baktérie, kvasinky, bičíkovce, ľudské leukocyty, tkaninové štruktúry, *Drosophila melanogaster*, teplokrvné cicavce, ryby a vyššie rastliny (Šrám, 1975; Krijgsted, 1986).

Na sledovanie účinku chemických látok vyvolávajúcich chromozomálne zmeny sa s výhodou využívajú bunky HeLa, bunky škvrčka, bunky koreňového vrcholu *Allium cepa* a iné.

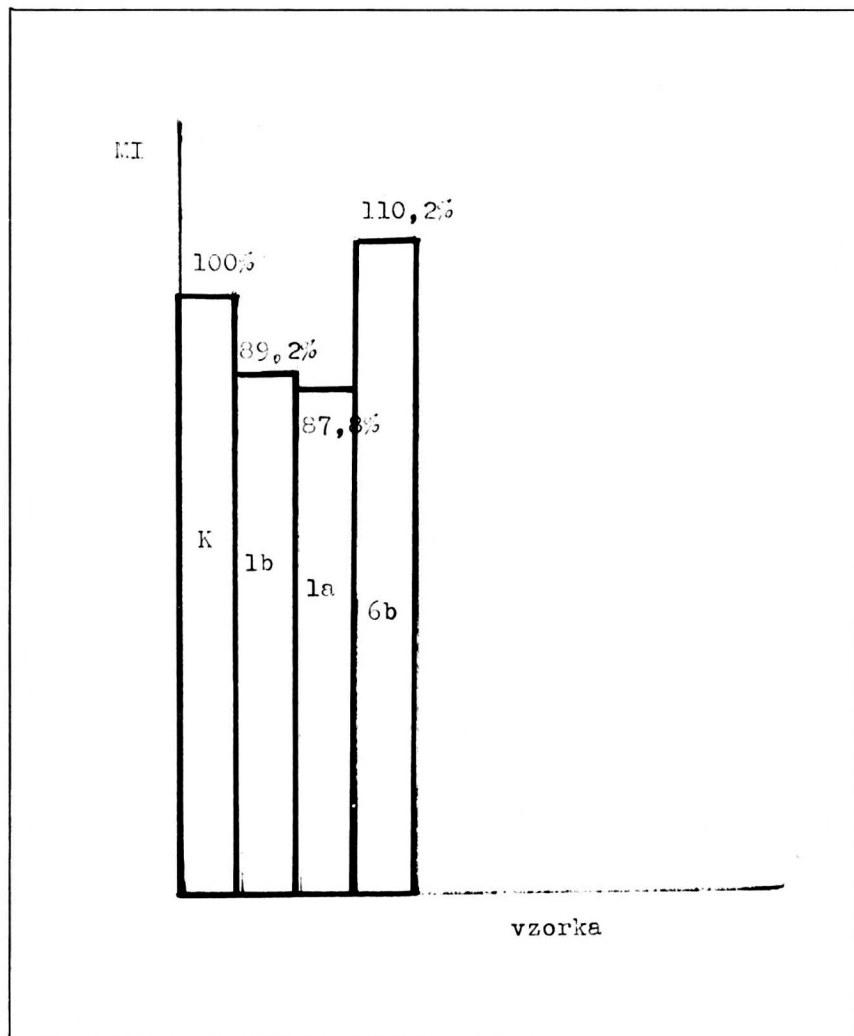
Niektoré látky v určitom vhodnom koncentračnom rozmedzí spôsobujú oneskorený účinok, kým nižšie koncentrácie na jeho vyvolanie nestačia a silnejšie dávky spôsobujú akútnu toxicitu (Tidd, 1972).

Na určenie stupňa nebezpečnosti chlórovaných zlúčenín existujú viaceré metodiky. Na určenie mutagénosti vyvinuli Ames a spol. (1973, 1971) screeningový test s kmeňom *Salmonella typhimurium* LT-2. Všetky ostatné kmene s odlišným genotypom derivovali z uvedeného kmeňa. Vzniknuté deriváty sú auxotrofné mutanty, nezávisia od histidínu a biotínu. V dôsledku genetického zásahu vznikli úplne nepatogénne kmene s vysokou permeabilitou a citlivosťou na chemické látky. Každý kmeň môže byť revertovaný späť na divoký prototrofný typ určitým mutagénom.

Výsledky a diskusia

Vyšetrené vzorky vôd Celulózka, n. p. Vranov nad Topľou boli: 1. čierny výluh, 2. zvyškový roztok z prípravy bieliacich roztokov, 3. voda po chlorácii (C) I. filter, 4. voda po alkalickéj





extrakcii (E) II. filter, 5. voda po chlórdioxide (D) III. filter, 6. voda po hypochlorite (H 1) IV. filter, 7. voda po hypochlorite (H 2) V. filter, 8. voda z filtra po triedení bielenej buničiny VI. filter, 9. zmesové odpadové vody z bieliarne, 10. recirkulovaný biokal, 11. voda z chemickej úpravne vody.

Sledovali sme 22 vzoriek technologických vôd (11a — viskózová buničina, 11b — papierenská buničina). Niektoré vzorky boli kontaminované. Kontamináciu sme odstránili filtráciou cez membránový filter. Prehľad bakteriálnej kontaminácie vzoriek ukazuje tab. 1.

V prvom stupni sme sledovali inhibičný účinok rastu a rozmnožovania 11 kmeňov *Salmonella typhimurium* s rôznym geno-

typom, t. j. testovací organizmus na sledovanie mutagénneho účinku podľa Amesovho testu, ktorý chceme robiť. Pravda, na to sme doteraz potrebovali zistiť koncentrácie a rozpätie inhibičného účinku. Na testovanie sme použili minerálnu pôdu — MP. Testované vzorky vôd sa nanášali v množstve 0,4 ml do vyhlbených jamiek. Cez noc narastená, čerstvá kultúra *S. typhimurium* v koncentracii 1- až 2-krát 10^8 buniek/ml sa nanášala do 50 ml kultivačnej pôdy. Po kultivácii sme okolo vyrezaných jamiek merali zónu inhibície v mm. Výsledky testovania na MP sú v tab. 2, kde jasne vidieť, že vzorky s inhibičným účinkom sú: 1a, b, 2a, b a 6b. Kultiváciou na MPA pôsobila iba 1a. Eliminácia inhibičného účinku v prípade 1b, 2a, b a 6b by sa dala vysvetliť výživou mikroorganizmov

Tab. 1. Kontaminované vzorky vôd

| Vzorky | | | | | | | |
|--------|---|---|---|----|---|----|---|
| 2 | 4 | 5 | 6 | 10 | | 11 | |
| a | a | a | a | a | b | a | b |
| k | k | k | k | k | k | k | k |

k – kontaminácia

Tab. 2. Inhibícia *S. typhimurium* na MP

| Kmene CCM | Vzorky | | | | |
|-----------|---------------------|----|----|----|----|
| | inhibičné zóny v mm | | | | |
| | 1 | | 2 | | 6 |
| | a | b | a | b | e |
| 3811 | 38 | — | 24 | 38 | 19 |
| 3812 | 30 | 14 | 18 | 20 | — |
| 3813 | 24 | — | 24 | 28 | 21 |
| 3815 | 38 | — | 24 | 31 | 23 |
| 3819 | 34 | — | 16 | 23 | 19 |
| 3807 | 33 | 16 | 15 | 19 | 14 |
| 3809 | 36 | 16 | 15 | — | 17 |
| 3810 | 30 | 15 | — | — | 13 |
| 3818 | 32 | 19 | 12 | 23 | 15 |
| 3808 | 31 | 18 | — | 20 | 18 |
| 3814 | 38 | 14 | 24 | 20 | — |
| 3816 | 34 | 17 | 28 | 27 | 33 |
| 3817 | 34 | 17 | — | 17 | 18 |

Tab. 3. Inhibičný účinok vzoriek

| Mikroorganizmy | Vzorky | | |
|--------------------|--------|----|----|
| | 1a | 2a | 6b |
| <i>E. coli</i> | 19 | — | — |
| <i>B. subtilis</i> | 30 | 30 | — |
| <i>Penicillium</i> | 22 | — | 10 |

Tab. 4. Účinok na fotosyntézu

| Vzorky 1 : 10 | Chlorella | Scenedesmus | Euglena gracillis |
|--|-----------------|--------------------------------|-------------------|
| 1a | sr | sr | sr |
| 1b | r | r | r |
| 2a | r | r | r |
| 2b | b | b | r |
| 6b | po 5 dňoch r | po 12 dňoch b po 9 dňoch | sr |
| Chlórdioxid $6,3 \cdot 10^{-2}$ g/l | b | b | b |
| Chlórová voda $7-8 \cdot 10^{-2}$ g/l | b | b | r |
| Hypochlorit $2,6 \cdot 10^{-1}$ g/l | b | b | b |
| Delignifikačný roztok | r | r | r |

sr – slabo rastie, r – rastie, b – vybielená

Tab. 5. Účinok na vodné červy LD₁₀₀ Tubiflex

| Chlórdioxid | | Chlórová voda | | Hypochlorit | | Delignifikačný roztok | | 6b |
|-------------|---|---------------|---------|-------------|--------|-----------------------|---------|-----------|
| a | b | a | b | a | b | a | b | voda |
| Po 30 min | ž | po 20 min | po 10 h | po 20 min | po 9 h | po 15 min | po 20 h | po 30 min |

a – koncentrácia ako v tab. 4, e – 10-krát menšia, ž – žijú

MPA je plnohodnotné kultivačné médium, kým MP je minimálne médium s malým obsahom histidínu a biotínu.

Inhibičný účinok testovaný difúznou metódou bol aj na baktérie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a mikromycéty z rodu *Penicillium* sp. Výsledky sú v tab. 3.

Chromozomálne aberácie koreňového systému rastlinných buniek *Allium cepa* sa nezaznačili, iba inhibícia mitózy vo vzorkách



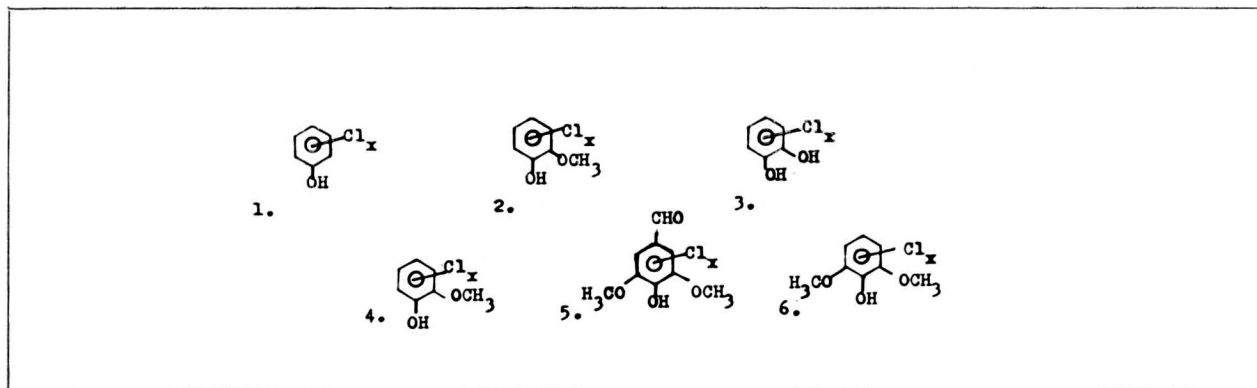
1a — 87,8 %, 1b — 87,2 % delenia buniek oproti kontrole, zatiaľ čo vzorka 6b predstavovala miernu stimuláciu delenia — 110,3 %. Bunkové jadrá sa farbili 2-percentným orceínom v 45- až 65-percentnej octovej kyseline. Výsledky sú odvodené z mitotického indexu MI a mitotickej pásky MP (obr. 1).

Účinnok na fotosyntézu sme sledovali na troch fotosyntetizujúcich organizmoch: *Chlorella* — riasa zelená, *Scenedesmus* — riasa zelená a *Euglene gracillis* — bičíkovec s chlorofylom. Testovali sme inhibičný účinok odpadových vôd a niektorých štandardov. Výsledky sú v tab. 4. Testované organizmy prejavili citlivosť na testované látky tým, že vybleli, stratili chlorofyl a bunky sa rozpadávali. Účinnok sa prejavil po 24 hodinách. Pri sledovaní koncentrácií

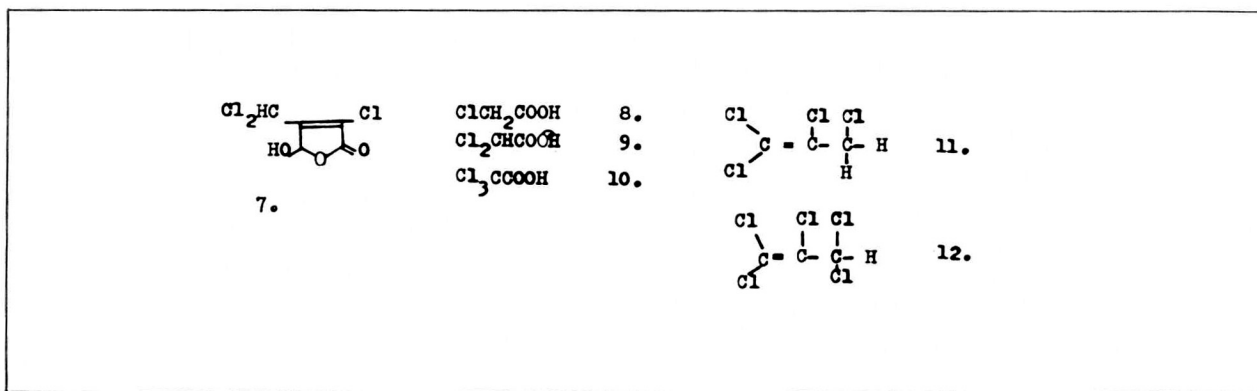
štandardov, ktoré spôsobujú vybledenie a rozklad rias, zistili sme, že v prípade chlóríoxidu je to $6,3 \cdot 10^{-3}$ g/l, chlóróvá voda $7,8 \cdot 10^{-3}$ g/l, hypochlorit $2,6 \cdot 10^{-3}$ g/l.

Účinnok na vodné červy je v tab. 5. Účinnok sa hodnotil ako LD_{100} a totálny rozklad červov, ktorý nastal po určitom čase v závislosti od koncentrácie testovanej látky.

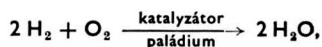
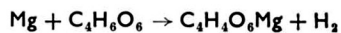
V podmienkach anaeróbnej kultivácie rástli baktérie na vodách 1a, b, 2a, b a 6b. Anaeróbne baktérie sa kultivovali z pôdy. Anaeróbne podmienky sa zabezpečili chemickým spôsobom — použitím horčíkového generátora plynu. Zmes horčíka, kyseliny vínnej a hydrouhličitanu sodného.



Vzorec 1 (text na str. 246).



Vzorec 2 (text na str. 247).



Komerčný anaerostat na obr. 2 vyrobilo vývojové pracovisko ÚSVÚ v Brne.

Mutagénny účinok Amesovým testom sa dokázal pre čierny výluh. Tento výsledok sa zhodoval s poznatkom o mutagénnom účinku čierneho výluhu, dokázaného mikronukleovým testom na ľudskej krvi podľa Hajdákovej a kol. (1990) a na syntéze DNA podľa Čerňákovvej a kol. (1990a, b).

Literatúra:

- Ames, B. N., a kol., 1975: Mutation Res., 31, 347 pp.
 Ames, B. N., 1971: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York, Plenum press, 1, p. 267–282.
 Ames, B. N., Durston, W. E., Aymasaki, E., Lee, F. D., 1973: Proc. Natl. Acad. U. S., 70, p. 2281–2285.
 Axejard, P., Tappi, J., 1986: 10, p. 54.
 Turner, S. A., Wallin, B. K., Tappi, J., 1982: 68, 8, 108 pp.
 Čerňáková, M., Šutý, L., Golis, E., 1987: Pap. a Cel., 42, 3, p. 5–10.
 Čerňáková, M., Golis, E., Šutý, L., Mozoľová, L., 1990: Papier a celulóza (v tlači).
 Hajdáková, M., Čerňáková, M., Golis, E., Šutý, L., 1990: Papier a celulóza (v tlači).
 Krijgsteld, K. R., A. van der Leider, 1986: Chemosphere, 15, 7, p. 825–893.
 Šrám, R. J., 1974: Genetické riziko chemických látok. Avicenum, Praha.
 Šrám, R. J., 1975: Biol. Listy, 40, 36–38, p. 124–137.
 Tidd, D. M. a kol., 1972: Cancer Res., 32, p. 317–322.