

ELŻBIETA SZCZYRBA, JOANNA KALETA, ANNA SZCZOTKA, GRAŻYNA BARTELMUS

KINETYKA BIODEGRADACJI FENOLU PRZEZ SZCZEP *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* KB2 W REAKTORZE OKRESOWYM

Instytut Inżynierii Chemicznej PAN Gliwice, ul. Bałtycka 5, 44-100 Gliwice

W pracy badano biodegradację fenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w reaktorze okresowym. Dla różnych początkowych stężeń fenolu zmienianych w zakresie 25-500 g·m⁻³, przeprowadzone zostały testy wzrostu mikroorganizmów, dla których degradowany związek był jedynym źródłem węgla i energii. Model kinetyczny Haldane'a najlepiej przybliżał dane eksperymentalne zatem wyestymowano stałe równania kinetycznego oraz współczynnik wydajności biomasy.

The biodegradation of phenol by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain in a batch reactor was studied. Microbial growth tests in the presence of phenol as the sole carbon and energy source were conducted for different initial concentrations of the degraded compound changed in the range 25-500 g·m⁻³. Haldane's growth kinetic model was found to be the best to fit the experimental data so constants of the kinetic equation as well as yield coefficient were estimated.

1. WPROWADZENIE

Rosnące zanieczyszczenie środowiska pogarsza stopniowo jakość naszego życia. Stąd coraz więcej uwagi poświęca się opracowaniu efektywnych metod remediacji środowiska. Bioremediacja obejmuje 3 główne etapy [1]:

- transformację bądź nieznaczną modyfikację cząstki zanieczyszczenia,
- fragmentację molekuly na prostsze składniki,
- mineralizację bądź konwersję na proste składniki (H₂O, CO₂, NH₃, CH₄ itp.).

W procesy bioremediacji zaangażowanych jest wiele mikroorganizmów (bakterie, grzyby drożdże, algi). Stąd w ostatnich dekadach uwagę skupiono na określeniu aktywności biodegradacyjnej wielu mikroorganizmów w odniesieniu do licznych antropogenicznych zanieczyszczeń. Nie należy bowiem zapominać, że rośnie liczba opornych na biodegradację substancji, takich jak syntetyczne polimery, barwniki, pestycydy, farmaceutyki czy detergenty, które nie mogą być rozłożone w sposób

naturalny w środowisku. Substancje te, zwane ksenobiotykami, są wysoce toksyczne nawet w niewielkim stężeniu i wykazują właściwości mutagenne, kancerogenne i alergenne. Stąd tak ważne staje się zastosowanie biodegradacyjnych zdolności mikroorganizmów do usuwania antropogenicznych zanieczyszczeń ze środowiska.

Fenol i jego pochodne są obecne w środowisku jako naturalne i antropogeniczne produkty, zanieczyszczające głównie powietrze i wodę. Są bowiem obecne w ściekach z wielu procesów przemysłowych, takich jak: produkcja olejów i produktów olejowych, koks, stali, materiałów wybuchowych, farb, włókna szklanego, produkcja i recykling wyrobów gumowych, przemysł tekstylny i niektóre gałęzie przemysłu spożywczego. Fenol stosowany jest przy produkcji kaprolaktamu, bisfenolu A, środków do dezynfekcji i preparatów czyszczących, w farmacji i medycynie [2,3]. Stężenie fenolu w ściekach może osiągać nawet poziom $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ [4].

Negatywny wpływ fenolu i jego pochodnych na środowisko naturalne, zdrowie ludzi i jakość życia jest szeroko dyskutowany w literaturze [5]. Ze względu na wysoką toksyczność, nawet w niewielkich stężeniach i zdolność do bioakumulacji stanowi on poważne zagrożenie dla ekosystemu [6,7]. W naturalnym środowisku fenol występuje w rozkładającej się martwej materii organicznej. Związek ten i jego pochodne są częstymi składnikami ścieków z przemysłu chemicznego, petrochemicznego, farmaceutycznego, metalurgicznego oraz z produkcji pestycydów [2,3].

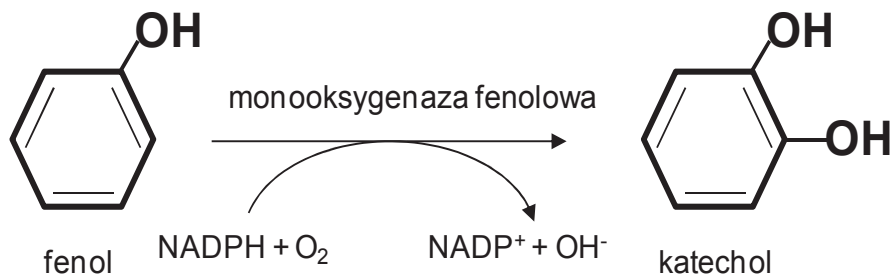
Stąd duża liczba dokumentów regulujących i określających normy bezpieczeństwa dla wody pitnej i środowiska. Dyrektywa EU 80/778/EEC określa stężenie fenolu i wszystkich jego pochodnych w wodzie pitnej na poziomie $0,5 \text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ [8]. US EPA określa jako bezpieczne stężenie $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ fenolu i jego nitro-, metylo- i chloropochodnych [9].

Fakty te spowodowały, że intensywnie rozwijane są fizyczne, chemiczne i biologiczne metody usuwania fenolu i jego pochodnych ze środowiska. Praktyka pokazuje, że fizykochemiczne metody / technologie są stosunkowo drogie i mało efektywne przy małym stężeniu zanieczyszczenia. Jedną z podstawowych wad tych metod jest tworzenie toksycznych, wtórnych produktów pośrednich [10]. Stąd metody biologiczne są obiecującą alternatywą ponieważ całkowicie degradują zanieczyszczenia, są stosunkowo tanie i proste w obsłudze.

Fenol i jego pochodne nie są łatwo biodegradowalne, ponieważ są toksyczne dla wielu mikroorganizmów i w wyższych stężeniach inhibują wzrost mikroorganizmów. Tak więc fenol jest stosowany jako środek dezynfekujący oraz znajduje się w preparatach medycznych takich jak krople do oczu i nosa, maści, płyny do płukania ust i płyny antyseptyczne [11].

W procesie degradacji fenolu bierze udział wiele mikroorganizmów zarówno bakterie (*Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas putida*), grzyby (*Aspergillus*, *Corpinus*, *Geotrichum*, *Phanerochaete*), drożdże (*Candida*) oraz algi (*Ankistrodesmus*, *Ochromonas*, *Scenedesmus*), które wykorzystują ten związek jako źródło węgla i energii [12]. W podstawowym etapie biodegradacji bierze udział monoooksygenaza fenolowa [EC 1.14.13.7], która katalizuje przyłączenie grupy

hydroksylowej do pierścienia aromatycznego tworząc katechol, a następnie degradacja zachodzi drogą *orto*- (produktem końcowym jest kwas bursztynowy i acetylo-CoA) lub *meta*- (produktem końcowym jest aldehyd octowy oraz kwas pirogronowy) [13].



Rys.1. Pierwszy etap rozkładu fenolu [33]
 Fig.1. The first step degradation of phenol [33]

W niniejszym opracowaniu uwagę skupiono na określeniu kinetyki reakcji biodegradacji fenolu za pomocą gram ujemnych bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, których zdolność do rozkładu licznych związków monoaromatycznych została potwierdzona we wcześniejszych testach [13,14].

2. KINETYKA WZROSTU BAKTERII

W ostatnich trzydziestu latach w literaturze ukazało się wiele prac, których autorzy badali kinetykę biodegradacji fenolu i jego pochodnych przez różne mikroorganizmy. W tabeli 1 zestawiono parametry kinetyczne uzyskane w tych pracach dla różnych szczepów bakterii.

Kinetykę wzrostu biomasy określa się wykonując serię eksperymentów/hodowli w reaktorze okresowym, przy różnych początkowych stężeniach substratu wzrostowego, monitorując, w określonych odstępach czasowych, zmiany stężenia biomasy. W fazie zrównoważonego wzrostu właściwa szybkość wzrostu biomasy (μ_{max}) jest stała i zależna jedynie od początkowego stężenia substratu w roztworze. Szybkość wzrostu biomasy opisuje więc zależność:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot X \quad (1)$$

Scalkowanie równania (1) przy warunku początkowym: $X = X_0$ dla $t = 0$ daje:

$$\ln X = \mu_{max} t + \ln X_0 \quad (2)$$

Tabela 1. Porównanie parametrów kinetyki wzrostu biomasy uzyskanych podczas biodegradacji fenolu w hodowli okresowej

Table 1. Comparisons of growth kinetic parameters obtained during phenol biodegradation in batch mode

Szczep	Zakres stężenia fenolu [mg·l ⁻¹]	Równanie Haldane'a			Warunki hodowli		Lit.
		μ_{max} [h ⁻¹]	K_s [mg·l ⁻¹]	K_i [mg·l ⁻¹]	Temperatura [°C]	pH	
Konsorcjum bakterii	100-800	0,3085	44,92	525,0	27	7,0	[15]
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 548	1-100	0,436	6,19	54,1	26	6,8-6,3	[16]
<i>Bacillus brevis</i>	750-1750	0,026-0,078	2,2-29,3	868-2434,7	34	8,0	[17]
<i>Pseudomonas putida</i> (Tan1) i <i>Staphylococcus aureus</i> (Tan2)	100-800	3,56	18,7	212,48	35	6,0	[18]
<i>Bacillus cereus</i>	50-600	0,153	21,33	238,0	30	7,0	[19]
Konsorcjum bakterii	25-1450	0,143	87,44	107,06	25	6,9	[20]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100-500	0,357	50,2	67,7	30	---	[21]
Konsorcjum bakterii	500-3000	0,355	603,803	40,0	----	6,0	[22]
Konsorcjum bakterii	23,5-659	0,3095	74,65	648,13	25	7,2	[23]

Dla każdego punktu eksperymentalnego, tj. dla każdego początkowego stężenia fenolu, wykres zależności $\ln X = f(t)$ jest linią prostą, której współczynnik kierunkowy określa wartość μ_{max} . Zmieniając początkowe stężenie substratu uzyskuje się bazę danych eksperymentalnych $\mu_{max} = f(S)$, umożliwiającą wybór formy równania opisującego kinetykę wzrostu biomasy oraz estymację stałych tego równania. W hodowli okresowej wzrostowi stężenia biomasy towarzyszy spadek stężenia substratu wzrostowego, który opisać można zależnością:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Jak widać z powyższej zależności, współczynnik wydajności biomasy umożliwia transformację równania opisującego szybkość wzrostu biomasy w równanie opisujące szybkość zużywania substratu wzrostowego. Jest on definiowany jako stosunek przyrostu biomasy do masy wykorzystanego substratu, mierzonych w tym samym interwale czasowym fazy wzrostu:

$$Y_{XS} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (4)$$

3. MATERIAŁY I METODY

Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, pochodzący z kolekcji Katedry Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (przechowywany pod numerem E-113197 w kolekcji VTT w Finlandii), został wyizolowany z osadu czynnego oczyszczalni ścieków w Bytomiu-Miechowicach. Bakterie należące do szczepu KB2 to tlenowe, Gram-ujemne, ruchliwe pałeczki, nie tworzące form przetrwalnikowych [14]. Szczep przechowywany jest na skosach agarowych w temperaturze 4°C.

Skład pożywki mineralnej, w której hodowano bakterie, a także prowadzono badania przedstawiał się następująco: Na₂HPO₄ × 12H₂O 3,78 g; KH₂PO₄ 0,5 g; NH₄Cl 5 g; MgSO₄ × 7H₂O 0,2 g; ekstrakt drożdżowy 0,01 g; woda destylowana 1000 ml; pH 7,1-7,3, wzbogacanej roztworem mikroelementów TMS (ang. *Trace Mineral Solution*), w ilości 1 ml na 1000 ml pożywki, o składzie: FeSO₄ × 7H₂O 3,82g; CoSO₄ × 7H₂O 295 mg; MnSO₄ × H₂O 82 mg; ZnSO₄ × 7H₂O 141 mg; H₃BO₃ 6 mg; Na₂MoO₄ × 2H₂O 40 mg; NiSO₄ × 7H₂O 82 mg; CuSO₄ × 5H₂O 2,9 mg; Al₂(SO₄)₃ × 18H₂O 148 mg; Na₂WO₄ × 2H₂O 6 mg rozpuszczone w 10 ml 32% HCl i uzupełnione dejonizowaną wodą destylowaną do objętości 1000 ml.

W celu przygotowania mikroorganizmów do badań komórki *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 przenoszono ze skosów agarowych do probówek zawierających pożywkę mineralną (20 ml) i do każdej probówki dodawano 150 µl fenolu. Po 24 h zawiesinę przenoszono do kolb Erlenmayera, uzupełniono do 100 ml roztworem soli mineralnych i dodawano 750 µl fenolu. W kolejnej dobie hodowle przenoszono do kolb o objętości 500 ml, uzupełniano pożywką do uzyskania 300 ml hodowli, dodawano roztwór mikroelementów oraz 2,25 ml fenolu. Hodowle prowadzono przez 2-3 doby, dodając każdego dnia 2,25 ml fenolu. Po tym czasie komórki odwirowywano i przechowywano w probówkach, w postaci zawiesiny, w temperaturze 4°C. Hodowle komórek prowadzono w wytrząsarkach inkubacyjnych w temperaturze 30°C.

Przed przystąpieniem do właściwych badań przetestowano dwa sposoby natleniania hodowli: poprzez dozowanie do roztworu nadtlenu wodoru oraz napowietrzanie. W hodowlach prowadzonych z użyciem 0,075% roztworu H₂O₂ nie zaobserwowano przyrostu biomasy, a stężenie fenolu zmieniało się nieznacznie. Prawdopodobnie, w wyniku utleniania jonu Fe²⁺ w centrum aktywnym monoooksygenazy fenolowej, nadtlenek wodoru powodował spadek aktywności tego enzymu [13]. W związku z tym tlen dostarczany był do hodowli przez barbotowanie zawiesiny powietrzem i utrzymywany na poziomie 5 mg·l⁻¹.

Badania prowadzono w bioreaktorze Biostat B firmy Sartorius (USA) o objętości roboczej 2,7 dm³. Aparat wyposażony był w czujnik temperatury, elektrodę pH i pO₂. Badania prowadzono w środowisku o odczynie pH 7 i temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 300 rpm (rys.2).



Rys.2. Zdjęcie stanowiska badawczego
Fig.2. Picture of experimental setup

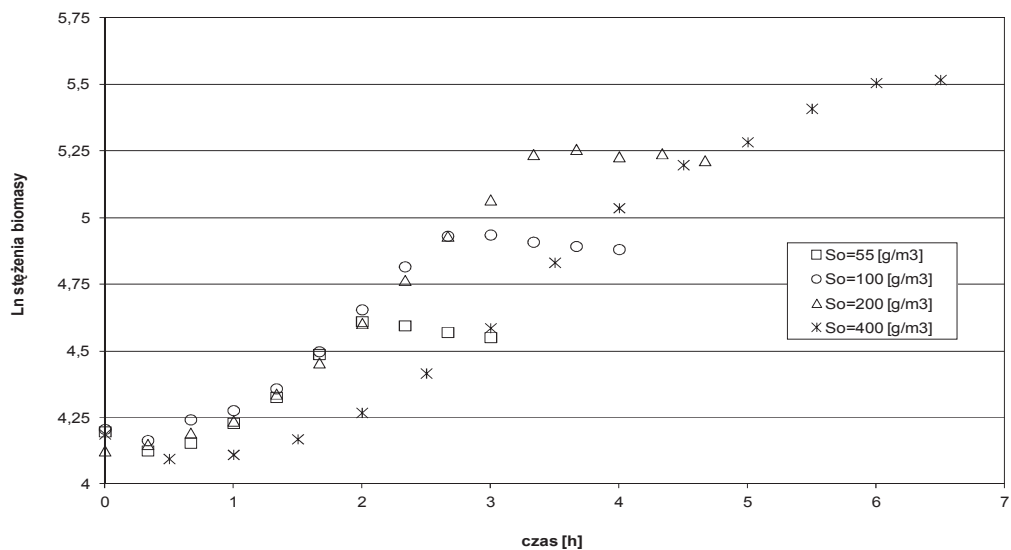
Stężenie mikroorganizmów oznaczano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr HACH 3900), mierząc absorbancję próbek zawiesiny przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Zmiany stężenia substratu wzrostowego (fenol) w płynie hodowlanym określano za pomocą chromatografu cieczowego firmy Waters, wyposażonego w pompę gradientową Waters 1525 oraz dwufalowy detektor UV-VIS Waters M2487. Rozdział prowadzono na kolumnie z odwróconym układem faz (Spherisorb ODS 2, $5\mu\text{m}$, $150 \times 4,6\text{mm}$). Jako fazę ruchomą stosowano układ metanol - 1% wodny roztwór kwasu octowego w stosunku 40:60 (v:v). Natężenie przepływu eluentu wynosiło 1 ml/min. Detekcję prowadzono przy długości fali $\lambda = 272$ nm. Próbki do analizy chromatograficznej pobierano z bioreaktorów, odwirowywano, przeciskano przez filtr strzykawkowy (średnica porów $0,2\mu\text{m}$) i rozcieńczano wodą w stosunku 1:1.

Przed każdym pomiarem przygotowywano 1500 ml zawiesiny mikroorganizmów o $A_{550} \sim 0,200$ nm, którą przelewano do sterylnego bioreaktora, a następnie - po ustabilizowaniu parametrów procesowych - dodawano określoną dawkę fenolu.

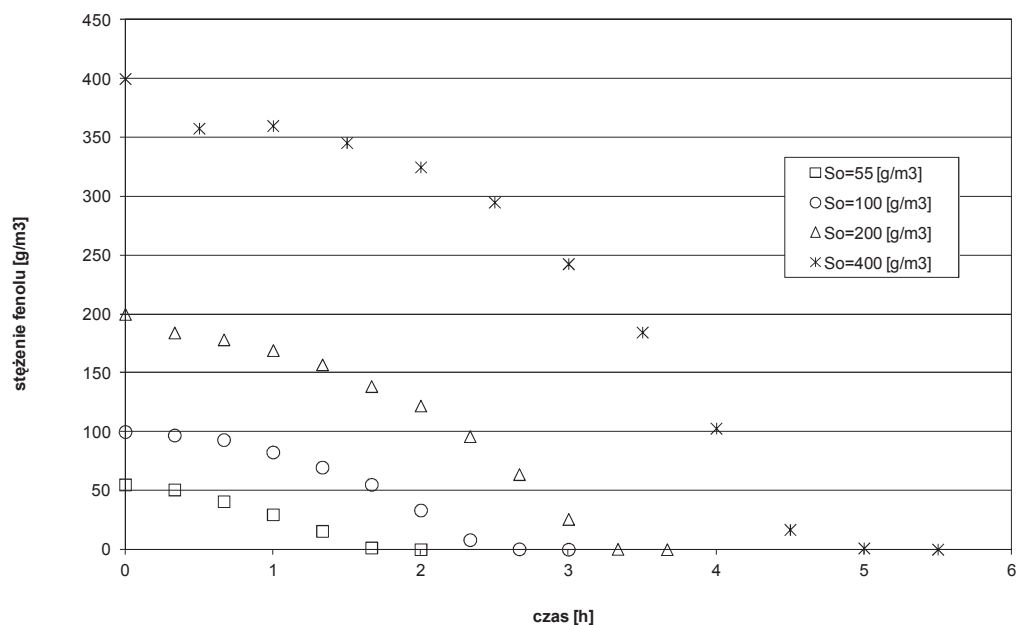
4. WYNIKI BADAŃ

Badania kinetyki biodegradacji fenolu przez bakterie szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 prowadzono w reaktorze okresowym dla początkowego stężenia substratu wzrostowego zmienianego w zakresie od 25 do $500 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, przy niezmiennych pozostałych parametrach, takich jak: temperatura, pH czy pO_2 . Dla wybranych początkowych stężeń fenolu wyniki badań przedstawiono w postaci

krzywych wzrostu populacji komórek *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (rys.3) oraz spadku stężenia substratu wzrostowego (rys.4).



Rys.3. Zmiana stężenia biomasy w czasie dla wybranych początkowych stężeń fenolu
 Fig.3. The variation of biomass concentration versus time for selected initial concentration of phenol



Rys.4. Zmiana stężenia fenolu w czasie dla różnych stężeń początkowych substratu
 Fig.4. Variation of phenol concentration versus time for different initial substrate concentration

Analizując wyniki pomiarów stwierdzono, że wzrost początkowego stężenia substratu nie wpływa znacząco na wydłużenie lag fazy. Zauważono także, że faza wzrostu wykładniczego nie jest wspólna, a uzyskane wartości μ_{max} sugerują inhibicję substratową.

Ważną cechą szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 jest ich zdolność do szybkiej utylizacji fenolu. W tabeli 2 porównano czas trwania rozkładu takich samych dawek fenolu przez badany szczep KB2 i szczepy opisane w literaturze.

Tabela 2. Czas trwania rozkładu fenolu przez różne szczepy
Table 2. Time of phenol decomposition by different strains

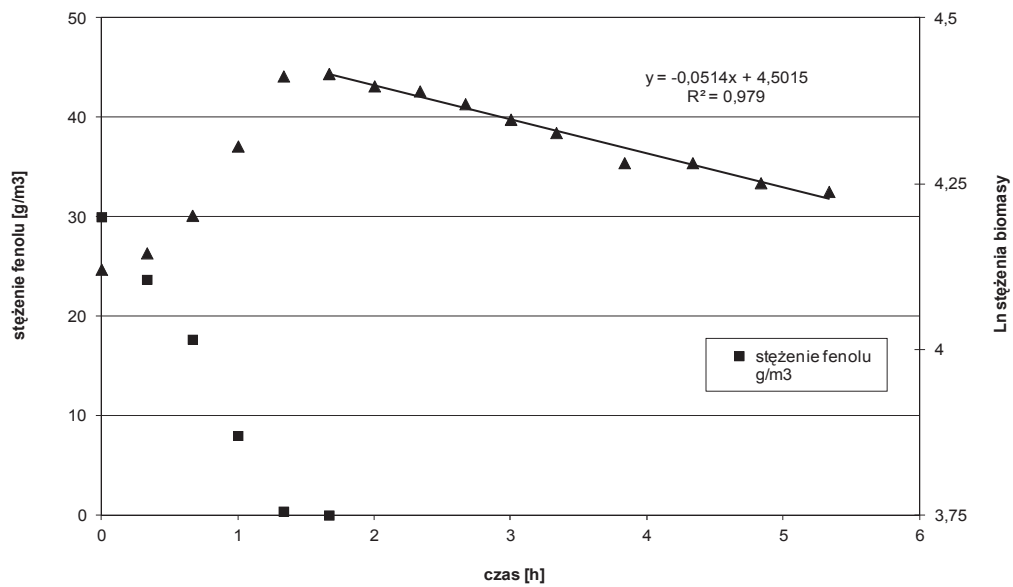
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KB2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> [21]	Konsorcjum bakterii [15]	Konsorcjum bakterii [25]	<i>Bacillus cereus</i> WJ1 [19]
Stężenie [g·m ⁻³]	Czas [h]				
100	3	90	10	8,2	16
200	3,7	126	15	12	26
300	4,7	168	19	12,5	28
400	5,5	250	26	20	40

Stwierdzono, że w momencie całkowitego wyczerpania fenolu w reaktorze, kończyła się faza wzrostu (rys.5). Podobne zjawisko obserwowali Zhang i wsp. [19] dla szczepu *Bacillus cereus* WJ1. W kilku hodowlach kontynuowano pomiar absorbancji po wyczerpaniu substratu. Zaobserwowano, że faza zamierania, czyli takiego okresu w hodowli, kiedy część populacji staje się pokarmem dla innych komórek [17,24] rozpoczynała się po bardzo krótkiej fazie stacjonarnej lub wręcz natychmiast po zakończeniu fazy wzrostu logarytmicznego. Zebrane dane umożliwiły wyznaczenie współczynnika zamierania komórek (k_d) (rys.5) opisanego zależnością:

$$\frac{dX}{dt} = -k_d X \quad (5)$$

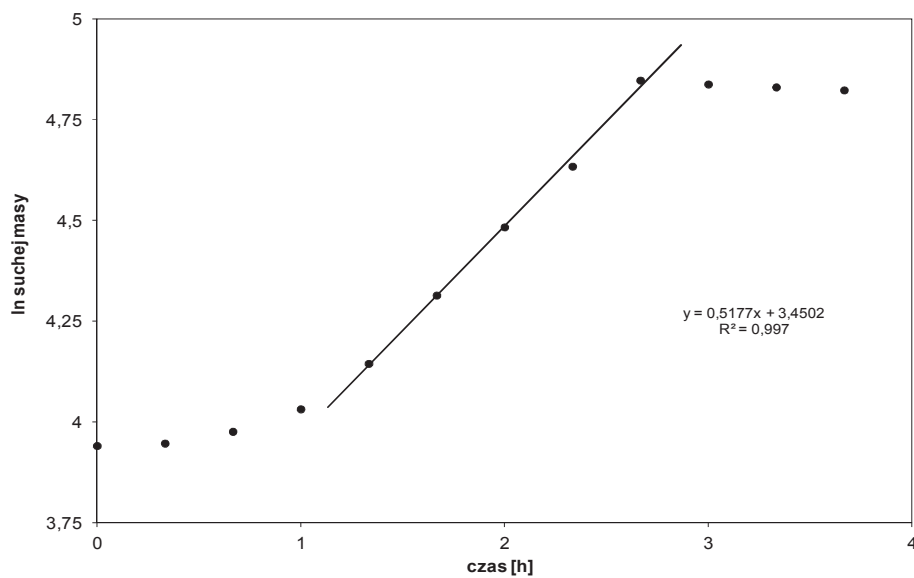
Należy podkreślić, że wartość współczynnika zamierania nie zależy od początkowego stężenia substratu w hodowli. Parametr ten wykorzystany będzie przy modelowaniu procesu kometabolicznej degradacji chlorofenoli w obecności fenolu jako substratu wzrostowego.

Dla każdego eksperymentu na podstawie krzywej wzrostu biomasy wyznaczono właściwą szybkość wzrostu z nachylenia prostej na półlogarytmicznym wykresie zależności stężenia biomasy od czasu hodowli podczas wzrostu logarytmicznego, kiedy to właściwa szybkość wzrostu jest stała (rys.6).



Rys.5. Zmiany stężenia biomasy i fenolu w czasie z uwzględnieniem fazy zamierania po wyczerpaniu substratu wzrostowego k_d (dla $S_0 = 30 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$)

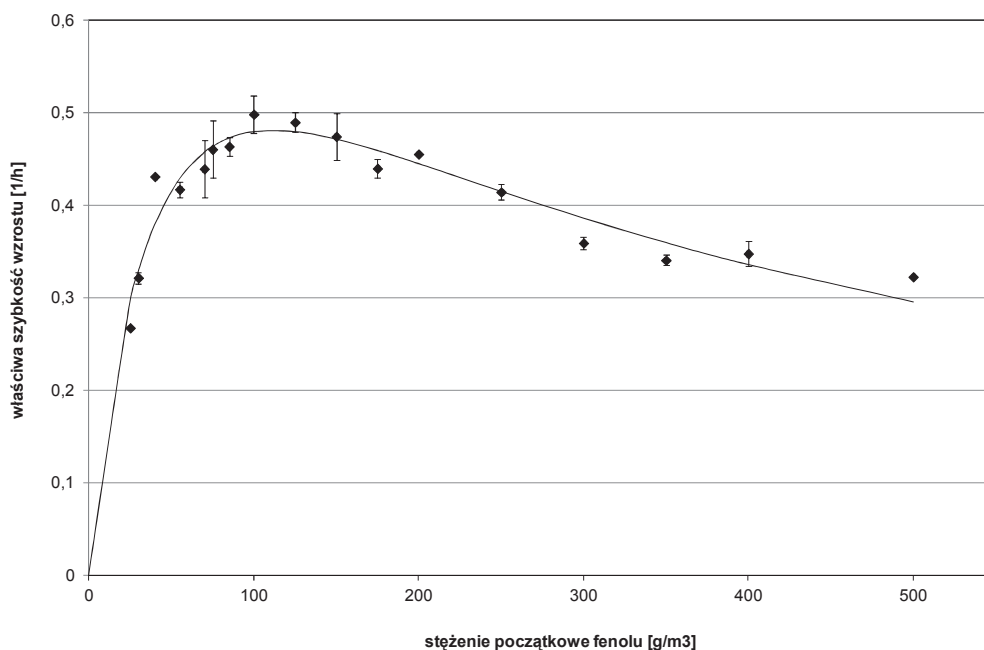
Fig.5. The variation of biomass and phenol concentration versus time and the evaluation of decay coefficient after complete consumption of substrate k_d (for $S_0 = 30 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$)



Rys.6. Wyznaczenie właściwej szybkości wzrostu z półlogarytmicznego wykresu zależności stężenia biomasy od czasu (dla $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$)

Fig.6. Estimation of specific growth rate from the semi-logarithmic plot of biomass concentration versus time (for $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$)

Zgromadzona została w ten sposób baza danych $\mu = f(S)$, którą przedstawiono na wykresie (rys.7), a jej kształt potwierdza wcześniejsze obserwacje, że mamy do czynienia z reakcją enzymatyczną inhibitowaną przez substrat.



Rys.7. Wpływ początkowego stężenia fenolu na właściwą szybkość wzrostu
Fig.7. Effect of initial phenol concentration on specific growth rate

W literaturze znaleźć można wiele propozycji równań opisujących kinetykę wzrostu mikroorganizmów inhibitowaną substratem [21,26]. Najczęściej stosowane jest równanie Haldene'a w postaci:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{(K_S + S)(1 + \frac{S}{K_i})} \quad (6)$$

Jeśli $K_i \gg K_S$ przedstawione powyżej równanie upraszcza się do:

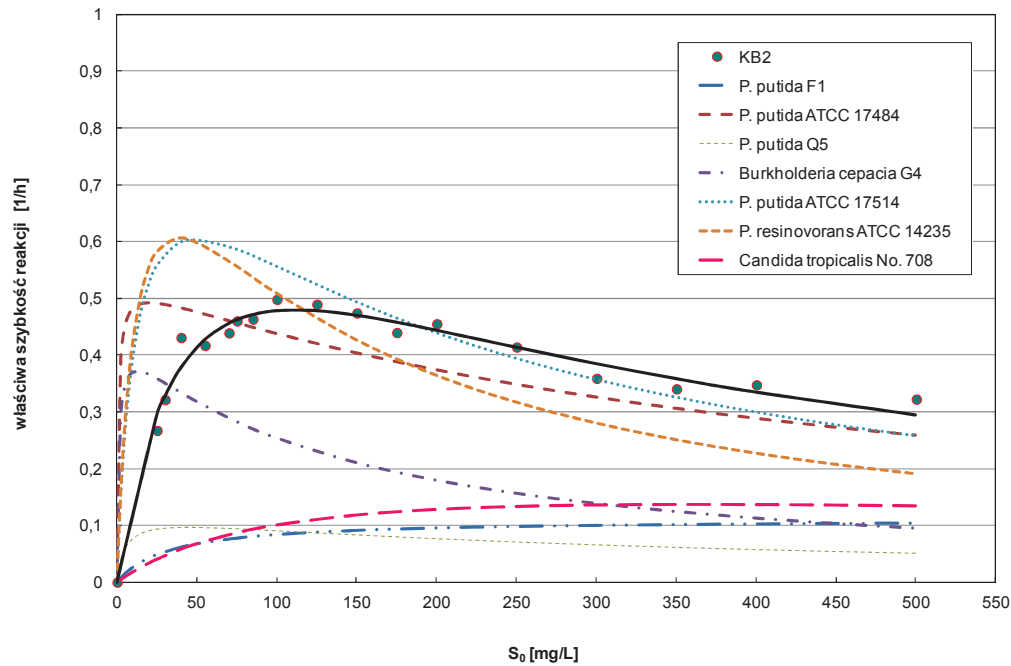
$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (7)$$

W oparciu o własną bazę danych eksperymentalnych wyestymowano wartości stałych równania kinetycznego, otrzymując:

$$\mu = \frac{0,9 \cdot S}{48,97 + S + \frac{S^2}{256,12}} \quad (8)$$

które ze średnim błędem procentowym nie przekraczającym 5 % ($R^2 = 0,95$) przybliża eksperymentalne dane.

Na rys.8 porównano właściwą szybkość wzrostu szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 z danymi zaczerpniętymi z literatury, uzyskanymi dla innych mikroorganizmów [27,28,29,30,31,32].



Rys.8. Właściwa szybkość wzrostu różnych mikroorganizmów na fenolu: *P. putida F1* [27]; *P. putida* ATCC 17484 [28]; *P. putida* Q5 [29]; *Burkholderia cepacia* G4 [30]; *P. putida* ATCC 17514 i *P. resinovorans* ATCC [31]; *Candida tropicalis* No. 708 [32]

Fig.8. The specific growth rate of various microorganisms in phenol: *P. putida F1* [27]; *P. putida* ATCC 17484 [28]; *P. putida* Q5 [29]; *Burkholderia cepacia* G4 [30]; *P. putida* ATCC 17514 i *P. resinovorans* ATCC 14235 [31]; *Candida tropicalis* No. 708 [32]

Większość badaczy stwierdza inhibitujący wpływ fenolu na proces jego biodegradacji, a zjawisko to opisują również równaniem Haldane'a. W przypadku szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 najwyższą właściwą szybkość wzrostu obserwowano dla stężenia początkowego fenolu wynoszącego 100 g m^{-3} , podczas gdy dane literaturowe wskazują, że mikroorganizmy osiągają najwyższą właściwą szybkość wzrostu dla o wiele niższych stężeń substratu wzrostowego. Wyznaczona

została również średnia wartość współczynnika wydajności biomasy ($Y_{XS} = 0,65$) oraz współczynnika zamierania $k_d = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

Powyższe fakty wskazują, że szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 jest obiecującym kandydatem dla zastosowań przemysłowych (krótka faza zastoju, duża aktywność biodegradacyjna, optymalna szybkość wzrostu osiągnięta przy stosunkowo dużych stężeniach fenolu).

WNIOSKI

- W reaktorze okresowym przeprowadzono badania kinetyki biodegradacji fenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. Badania prowadzono w warunkach optymalnych dla wybranych mikroorganizmów (pH 7, temp. 30°C, natlenienie 5-7 mg·l⁻¹) stosując różne stężenia początkowe fenolu.
- Stwierdzono, że szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 wykorzystuje intensywnie fenol jako źródło węgla i energii, a duże stężenia początkowe fenolu nie wydłużają znacząco fazy lag.
- W oparciu o eksperymentalną bazę danych jako model kinetyczny wybrano równanie Haldane'a i wyestymowano stałe tego równania, otrzymując: $\mu_{max} = 0,9 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 48,97 \text{ g m}^{-3}$ i $K_i = 256,12 \text{ g m}^{-3}$.
- Stwierdzono, że wraz z całkowitym wyczerpaniem substratu wzrostowego następuje gwałtowne zatrzymanie wzrostu biomasy, a następnie rozpoczyna się faza zamierania komórek.

OZNACZENIA - SYMBOLS

A_{550}	– absorbancja mierzona przy długości fali 550 nm absorbance by wave length 550 nm
k_d	– współczynnik zamierania, h ⁻¹ decay coefficient
K_i	– stała inhibicji, g·m ⁻³ inhibition constant
K_s	– stała nasycenia, g·m ⁻³ half saturation constant
μ	– właściwa szybkość wzrostu, h ⁻¹ specific growth rate
λ	– długość fali wave length
μ_{max}	– maksymalna właściwa szybkość wzrostu, h ⁻¹ maximum specific growth rate
R^2	– współczynnik korelacji correlation rate
S	– stężenie substratu, g·m ⁻³

	substrate concentration
S_0	– stężenie początkowe substratu, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ initial substrate concentration
t	– czas, h time
X	– stężenie biomasy, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ biomas concentration
X_0	– początkowe stężenie biomasy, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ initial biomas concentration
Y_{XS}	– współczynnik wydajności yield coefficient

PIŚMIENICTWO CYTOWANE – REFERENCES

- [1]. KRASTANOV A., ALEXIEIEVA Z., YEMENDZHIEV H., *Microbial degradation of fenol and fenolic derivatives*, Eng. Life Sci. 2013, 13, 76.
- [2]. VIJAYARAGHAVAN S., SRINIVASARAGHAVAN T., MUSTI S., KAR S., SWAMINATHAN T., BARADARAJAN A., *Biodegradation of phenol by arthrobacter and modelling of the kinetic*, Bioprocess Eng. 1995, 12, 227.
- [3]. BASHA K.M., RAJENDRAN A. THANGAVELU V., *Recent advances in the biodegradation of phenol: A review*, Asian J. Exp. Biol. Sci. 2010, 1, 219.
- [4]. FEDORAK P.M., HRUDEY S.E., *Anaerobic degradation of phenolic compounds with application to treatment of industrial waste waters*, Biotreatment Systems, CRC, Boca Raton 1988, 170.
- [5]. CALABRESE E.J., KENYON E.M., *Air toxics and risk assesments*, Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan 1991.
- [6]. AL-KHALID T., EL-NAAS M.H., *Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review*, Crit. Rev. Env. Sci. Tech. 2012, 42, 1631.
- [7]. BHANDARI A., FANGXIANG X., *Containment of phenolic contaminants in soils by peroxidase addition*, International Containment & Remediation Technology Conference and Exhibition. Orlando, Florida 2001.
- [8]. *Drinking Water Directive 80/778/EEC*, Commision of the European Communities, 1980.
- [9]. U.S. EPA Current National Recommended Water Quality Criteria. (accessed Aug.23.2007).
- [10]. KLEIN J.A., LEE D.D., *Biological treatment of aqueous wastes from usual conversion processes*, Biotechnol. Bioeng. 1978, 8, 379.
- [11]. JAKUBOWSKI M., *Fenol. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego*, Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 2003, 35, 87.
- [12]. SRIDEVI V., CHANDANA LAKSHMI M.V.V., MANASA M., SRAVANI M., *Metabolic pathways for the biodegradation of phenol*, Int. J. Eng. Sci. Adv. Technol. 2012, 2, 695.
- [13]. WOJCIESZYŃSKA D., GREŃ I., ŁABUŻEK S., RESPONDEK M., *Specyficzność substratowa oraz wrażliwość monoooksygenazy fenolowej ze szczepu Stenotrophomonas maltophilia KB2 a jej potencjalne zastosowanie w bioremediacji środowiska*, Biotechnologia 2007, 2, 181.
- [14]. GUZIK U., GREŃ I., WOJCIESZYŃSKA D., ŁABUŻEK S., *Isolation and characterization of a novel strain of stenotrophomonas maltophilia possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation*, Braz. J. Microbiol. 2009, 40.
- [15]. SARAVANAN P., PAKSHIRAJAN K., SAHA P., *Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor*, Bioresour. Technol. 2008, 99, 205.
- [16]. MONTEIRO A.M.G., BOAVENTURA R.A.R., RODRIGUES A.E., *Phenol biodegradation by Pseudomonas putida DSM 548 in batch reactor*, Biochem. Eng. J. 2000, 6, 45.

- [17]. ARUTCHELVAN V., KANAKASABAI V., ELANGO VAN R., NAGARAJAN S., MURALIKRISHNAN V., *Kinetics of high strength phenol degradation using Bacillus brevis*, J. Hazard. Mater. 2006, 129, 216.
- [18]. SENTHILVELAN T., KANAGARAJ J., *Biodegradation of phenol by mixed microbial culture: An eco-friendly approach for the pollution reduction*, Clean Technol. Envir. 2014, 16, 113.
- [19]. ZHANG Y., LU D., JU T., WANG L., LIN S., ZHAO Y., WANG CH., HEI H., DU Y., *Biodegradation of phenol using bacillus cereus WJ1 and evaluation of degradation efficiency based on a graphene modified electrode*, Int. J. Electrochem. Sci. 2013, 8, 504.
- [20]. NUHOGLU A., YALCIN B., *Modelling of phenol removal in a batch reactor*, Process Biochem. 2005, 40, 1233.
- [21]. AGARRY S.E., SOLOMON B.O., *Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous Pseudomonas fluorescence*, Int. J. Environ. Sci. Tech. 2008, 5, 223.
- [22]. HUSSAIN A., DUBEY S.K., KUMAR V., *Kinetic study for aerobic treatment of phenolic wastewater*, Water Resources and Industry, 2015, 11, 81.
- [23]. BAJAJ M., GALLERT C., WINTER J., *Phenol degradation kinetics of an aerobic mixed culture*, Biochem. Eng. J. 2009, 46, 205.
- [24]. KUMAR A., KUMAR S., KUMAR S., *Biodegradation kinetics of phenol and catechol using Pseudomonas putida MTCC 1194*, Biochem. Eng. J. 2005, 22, 151.
- [25]. DEY S., MUKHERJEE S., *Performance and kinetic evaluation of phenol biodegradation by mixed microbial culture in a batch reactor*, Int. J. Water Resour Environ. Eng. 2010, 2, 40.
- [26]. SINGH S., SINGH B.B., CHANDRA R., *Biodegradation of phenol in batch culture by pure and mixed strains of Paenibacillus sp. and Bacillus cereus*, Pol. J. Microbiol. 2009, 58, 319.
- [27]. REARDON K.F., MOSTELLER D.C, BULL ROGERS J.D., *Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for Pseudomonas putida F1*, Biotechnol. Bioeng. 2000, 69, 385.
- [28]. HILL G.A., ROBINSON C.W., *Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by Pseudomonas putida*. Biotechnol. Bioeng. 1975, 17, 599.
- [29]. KOTTURI G., ROBINSON C.W., INNIS W.E., *Phenol degradation by a psychotropic strain of Pseudomonas putida*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 34, 539.
- [30]. SÁEZ P.B., RITTMANN B.E., *Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol)*, Biodegradation 1993, 4, 3.
- [31]. DIKSHITULU S., BALTZIS B.C., LEWANDOWSKI G.A., PAVLOU S., *Competition between two microbial populations in a sequencing fed-batch reactor*, Biotechnol. Bioeng. 1993, 42, 643.
- [32]. SHIMIZU T., UNO T., DAN Y., NEI N., ICHIKAWA K., *Continuous treatment of wastewater containing phenol by Candida tropicalis*, J. Ferm. Technol. 1973, 51, 809.
- [33]. <http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=r&reacID=r0696>.

KINETICS OF PHENOL BIODEGRADATION BY *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* KB2 STRAIN IN BATCH REACTOR

The subject of analysis presented in this study was kinetics of phenol biodegradation by bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. The examined strain was isolated from the activated sludge of a sewage treatment plant. The ability of that Gram-negative strain to use phenol as the only source of carbon and energy was connected with presence of special enzyme - phenol monooxygenase which took part in first step of phenol metabolic pathway (formation of catechol) and then the biodegradation went *ortho*- or *meta*- cleavage pathway. The experiments were conducted in a batch bioreactor for different initial concentrations of phenol (25 - 500 g·m⁻³) which was the only source of carbon and energy for the tested microorganisms. Every test was conducted in the same conditions: temperature 30°C, pH 7,0,

aeration 5-7 mg·l⁻¹. During the experiment, at regular intervals, biomass concentration and growth substrate concentration were determined. The concentration of biomass was determined by measuring the absorbance of the fluid culture ($\lambda = 550$ nm). Next the suspension absorbance was converted into grams of dry biomass according to the earlier calibration. The concentration of utilized substrate was determined by means of the HPLC method.

For every experimental point, that was, for every initial dose of substrate, the $\ln X = f(t)$ graph was prepared, from which the specific growth rate was determined. The data base compiled in this way was shown in Fig.7. The research showed that at concentration in the solution exceeding ~ 100 gm⁻³, phenol began to act as an inhibitor of bacterial activity. Therefore, the Haldane's model was used to describe *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain growth kinetics on phenol, and kinetic equation parameters were estimated ($\mu_{max} = 0.9$ h⁻¹, $K_s = 48.97$ g·m⁻³ and $K_i = 256.12$ g·m⁻³). The equation (8) with the mean percentage error not exceeding 5% approximates the experimental data. The conducted experiments made it possible to determine the value of the biomass yield coefficient. Its value changed depending on the initial phenol concentration in the solution. The mean integral value of Y_{XS} determined in the range of changes of the initial phenol concentration in the solution of 25 - 500 g·m⁻³ was 0.65.