

ELŻBIETA SZCZYRBA, AGNIESZKA GĄSZCZAK, ANNA SZCZOTKA, HANNA KOLARCZYK, BOŻENA JANUS

WPŁYW NIKLU NA WZROST SZCZEPU *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* KB2 W OBECNOŚCI FENOLU

Instytut Inżynierii Chemicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Bałtycka 5, 44-100 Gliwice

Wykonano eksperymenty mające na celu zbadanie wzrostu komórek szczepu KB2 w obecności niklu, przy zastosowaniu fenolu jako źródła węgla i energii. Przeprowadzane badania potwierdziły hamujący wpływ niklu na wzrost badanego szczepu nawet dla niskich stężeń tego metalu.

Słowa kluczowe: nikiel, wzrost bakterii, fenol

The influence of nickel on the growth of KB2 strain was tested for different concentrations of metal in the presence of phenol as the sole carbon and energy source. The inhibition effect of nickel on bacterial growth was confirmed even for low concentration of tested metal.

Keywords: nickel, bacterial growth, phenol

1. WPROWADZENIE

Metale ciężkie to pierwiastki w większości występujące naturalnie w środowisku. Niestety, ich ilość wraz z rozwojem przemysłu, wzrasta w sposób niekontrolowany. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) podaje, że w Stanach Zjednoczonych 40% składowisk odpadów niebezpiecznych jest zanieczyszczonych jednocześnie związkami organicznymi i metalami ciężkimi co znacznie utrudnia usuwanie tych zanieczyszczeń metodami biologicznymi [1]. Do metali ciężkich zalicza się: miedź, kobalt, chrom, żelazo, cynk, ołów, selen, rtęć, mangan, nikiel, molibden, wanad i wolfram. Są to pierwiastki charakteryzujące się masą właściwą większą od $4,5\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, a ich liczba atomowa znajduje się pomiędzy 22 i 34, oraz 40 a 52. Cechuje je wysoka temperatura wrzenia i topnienia oraz dobra przewodność cieplna i elektryczna oraz wykazują właściwości redukujące [2,3].

Metale można podzielić na dwie grupy: takie, które odgrywają ważną rolę w procesach życiowych bakterii oraz takie, które są dla nich nieistotne. Niektóre z nich (między innymi chrom, nikiel, magnez, cynk) są niezbędne mikroorganizmom do życia. Metale te są wykorzystywane przez mikroorganizmy do procesów redoks i sta-

bilizowania cząsteczek poprzez interakcje elektrostatyczne. Stanowią one składniki różnych enzymów oraz biorą udział w regulacji ciśnienia osmotycznego. Do grupy metali, które nie mają biologicznego znaczenia dla mikroorganizmów, a często są dla nich toksyczne, zaliczamy między innymi srebro, aluminium, miedź i ołów [1].

Obecność metali w otoczeniu w znaczący sposób wpływa na wiele procesów mikrobiologicznych takich jak: metabolizm metanu, wzrost, przemiany azotu i siarki, dehalogenację i procesy redukujące. Toksyczność metali najczęściej przypisywana jest wiązaniu jonów metali ciężkich do grup sulfhydrylowych w kluczowych enzymach, co przyczynia się do zmniejszenia biodegradacji związków organicznych [4].

Jednym z najczęściej występujących metali ciężkich jest nikiel. Pierwiastek ten jest uwalniany do środowiska przez różne gałęzie przemysłu takie jak: przemysł galwanizacyjny, papierniczy, stalownie, fabryki nawozów sztucznych i rafinerie. Wykorzystuje się go do produkcji powłok galwanicznych, sprzętu laboratoryjnego, elektrod, baterii, stali stopowych itp. Do atmosfery nikiel jest emitowany w procesie spalania węgla i paliw płynnych. Duże stężenie niklu może być szkodliwe dla zdrowia i może powodować inhibicję enzymów oksydacyjnych, włóknienie płuc, obrzęk nerek, nudności, wymioty, biegunkę, zapalenie skóry oraz bóle w klatce piersiowej. Udowodniono również kancerogenne działanie tego metalu oraz wywoływanie alergii kontaktowych [2, 3, 5].

Nikiel zaliczany jest do pierwiastków niezbędnych do wzrostu mikroorganizmów, jednak w nadmiarze staje się dla nich toksyczny, co w efekcie prowadzi zarówno do zahamowania wzrostu mikroorganizmów, jak i inhibicji procesu biodegradacji [6]. Dane literaturowe wskazują, że obecność niklu w środowisku najczęściej wpływa hamująco na wzrost mikroorganizmów, przykładem mogą być szczepy *Vibrio fluvialis* i *Pseudomonas fluorescens* wyizolowane przez Asitok i współpracowników oraz *Ochrobacterium* sp. P1 i *Bacillus* sp. P19 opisane przez Zhong i współpracowników [6, 7]. W wyniku coraz powszechniejszego występowania metali ciężkich w środowisku, niektóre szczepy zaadaptowały się do nowych warunków wytwarzając mechanizmy odporności na wysokie stężenia metali ciężkich [1]. Sposobem mikroorganizmów na zmniejszenie toksyczności metali ciężkich jest wytwarzanie przez komórki biosurfaktantów, substancji powierzchniowo czynnych zmniejszających napięcie powierzchniowe pomiędzy wodą i powietrzem, niemieszalnymi cieczami oraz cieczami i ciałami stałymi. Zarówno szczep P1 jak i P19 miały zdolność do wytwarzania biosurfaktantów, co wspomagało biodegradację toluenu dzięki obniżeniu toksyczności metali ciężkich [1, 7, 8].

Nikiel jest pierwiastkiem bardzo często spotykanym w odpadach powstałych w wyniku działalności zakładów chemicznych. Składowanie odpadów zanieczyszczonych metalami ciężkimi bez żadnych zabezpieczeń prowadzi do skażenia wód gruntowych i powierzchniowych. Przykładem może być staw Kalina w Świętochłowicach całkowicie zanieczyszczony odciekami z hałdy utworzonej przez odpady powstałe w wyniku działalności Zakładów Chemicznych „Hajduki”. Działalność tych zakładów opierała się na destylacji smoły węglowej, produkcji węglowodorków w tym fenolu,

naftalenu, benzenu, produkcji żywic fenolowo-formaldehidowych oraz produkcji farb i lakierów. Odpady poprodukcyjne w postaci zafenolowanych szlamów wapiennych, odpadów po produktach smolistych, osadów z oczyszczalni ścieków, żużli z zakładowej kotłowni oraz inne niebezpieczne produkty uboczne utworzyły ogromną hałdę, która spowodowała skażenie otaczającego ją środowiska. Badania wód w okolicy hałdy pozwoliły stwierdzić, że przekroczone są tam dopuszczalne normy pH, przewodności elektrolitycznej, ogólnego węgla organicznego, jonu amonowego, fenoli, węglowodorów aromatycznych, arsenu, chromu, cynku i niklu. Wielokrotnie podejmowano próby rekultywacji zanieczyszczonego terenu, jednak mimo poniesionych ogromnych nakładów finansowych prace nie zakończyły się sukcesem. Staw Kalina nadal jest silnie zanieczyszczony, a normy stężenia fenoli są przekroczone 30 tysięcy razy. Przekroczone normy niklu stwierdzono również w rzece Stole przepływającej w pobliżu Zakładów Chemicznych Tarnowskie Góry, a śródroczne stężenia niklu przekraczały środowiskowe normy również w zlewniach Przemszy, Gostyni (dorzecze Wisły), Kłodnicy, Małej Panwi i Olzy (dorzecze Odry). Natomiast ponad normatywne stężenia fenolu stwierdzono między innymi w rejonie zakładów „Organika Jaworzno” w potoku Wąwolnica, przed ujściem do Białej Przemszy [9, 10, 11].

Biodegradacja fenolu jest uznawana za wydajną, przyjazną dla środowiska metodę usuwania fenolu, dodatkowo korzystną ze względów ekonomicznych. Jak przedstawiono we wcześniejszych pracach. Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 skutecznie degradowa fenol oraz 4-chlorofenol w układzie kometabolicznym z fenolem jako substratem wzrostowym [12, 13, 14]. W prezentowanej pracy sprawdzono wpływ obecności niklu na wzrost komórek szczepu KB2, co jest pierwszym etapem badań mającym określić wpływ metali ciężkich na biodegradację fenolu.

2. MATERIAŁY I METODY

W czasie badań zastosowano szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, przechowywany pod numerem E-113197 w kolekcji VTT w Finlandii, a pozyskano go z kolekcji Zespołu Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

W eksperymentach wykorzystano komórki przystosowane wcześniej do wzrostu z fenolem jako źródłem węgla i energii. Materiał biologiczny namnażano w kolbach Erlenmayera w wytrząsarce inkubacyjnej Innova (New Brunswick) w temperaturze 30°C i wytrząsaniem 300 rpm. Skład wykorzystanej pożywki mineralnej oraz roztworu pierwiastków śladowych TMS (ang. *Trace Mineral Solution*) opisano we wcześniejszej pracy [12]. Aby zapewnić komórkom niezbędną do procesów życiowych ilość węgla codziennie dodawano nową dawkę fenolu. Po 5 dniach hodowli materiał biologiczny zwirowywano i przechowywano w 4°C.

Przed przystąpieniem do testów sporządzano zawiesinę bakterii w pożywce mineralnej, o absorbancji początkowej wynoszącej 0,2. Stosowano tę samą pożywkę i TMS co w trakcie namnażania materiału biologicznego. Hodowle prowadzono w kolbach

Erlenmayera w wytrząsarce inkubacyjnej Innova. Przez czas trwania eksperymentów utrzymywano stałą temperaturę i szybkość wytrząsania wynoszące odpowiednio 30°C i 300 rpm. Objętość zawiesiny w kolbach wynosiła 300 ml. Do każdej kolby dodawano fenol jako substrat wzrostowy, uzyskując stężenie początkowe fenolu 50 lub 100 g·m⁻³.

Nikiel dodawano w postaci wodnego roztworu soli NiSO₄·7H₂O. W 100 μl tego roztworu było zawarte 10 mg niklu.

Zmiany ilości komórek mikroorganizmów oznaczano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr HACH 3900), poprzez pomiar absorbancji zawiesiny (długość fali λ=550 nm).

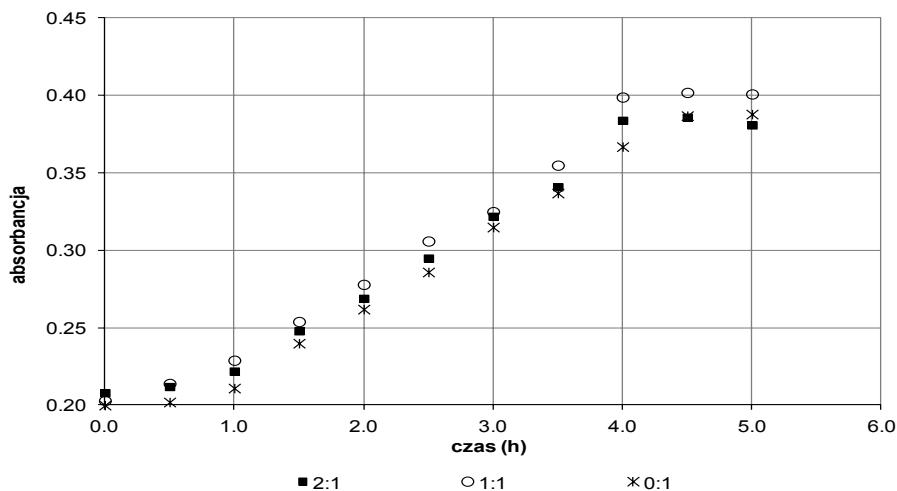
Pomiar absorbancji wykonywano co 30 min, natomiast na koniec badań potwierdzano całkowitą degradację fenolu poprzez zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Próbkę po pobraniu z kolb wirowano, a następnie supernatną przefiltrowywano przy użyciu filtra strzykawkowego (0,2 μm) i rozcieńczano wodą w stosunku 1:1. Przygotowane w ten sposób próbki poddawano analizie chromatograficznej. Wykorzystano w tym celu chromatograf firmy Waters, wyposażony w pompę gradientową Waters 1525, dwufalowy detektor UV-VIS Waters M2487, oraz kolumnę z odwróconym układem faz (Spherisorb ODS 2, 5μm, 150×4,6 mm). Eluentami był metanol oraz 1% wodny roztwór kwasu octowego (40:60 (v:v)). Szybkość przepływu cieczy wynosiła 1 ml·min⁻¹. Pomiar wykonywano przy długości fali λ=272 nm.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

W niniejszym opracowaniu opisano rezultaty badań dotyczących wpływu obecności niklu na wzrost komórek szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 z wykorzystaniem fenolu jako źródła węgla. We wcześniejszych pracach dowiedziono, że komórki KB2 efektywnie degradują fenol wykorzystując go jako źródło węgla i energii [12, 13, 14]. Ponieważ dane literaturowe wskazywały, że obecność metali ciężkich w środowisku ma duży wpływ na procesy życiowe mikroorganizmów oraz biodegradację substancji organicznych sprawdzono, czy obecność niklu oddziałuje na wzrost szczepu KB2.

W trakcie prac wstępnych stwierdzono, że nikiel powodował wytrącanie się soli fosforanowych, a powstający osad zaburzał pomiar absorbancji, co uniemożliwiało na określenie wpływu niklu na wzrost ilości komórek KB2. Rutynowo stosowana w hodowli *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 pożywka zawierała 3,78 g·dm⁻³ Na₂HPO₄ × 12H₂O oraz 0,5 g·dm⁻³ KH₂PO₄. W czasie badania wpływu metali ciężkich na biodegradację fenolu Nakamura i Sawada stosowali pożywkę zawierającą fosforany w postaci 0,5 g·dm⁻³ KH₂PO₄, a Kotresha i Vidyasagar dodawali 6,3 g·dm⁻³ K₂HPO₄ oraz 1,82 g·dm⁻³ KH₂PO₄ [15, 16]. Duże dysproporcje stężeń fosforanów w stosowanych przez badaczy pożywkach sugerowały, że aby uniknąć wytrącania się osadu w trakcie badań, można przeprowadzić eksperymenty z zastosowaniem pożywki mineralnej o obniżonej zawartości fosforanów. W celu zmniejszenia zawartości fosforanów przy-

gotowano stosowaną standardowo pożywkę oraz pożywkę bez soli fosforanowych, a następnie zmieszano je w różnych proporcjach (pożywka bez PO_4^{3-} : pożywka stosowana standardowo): 0:1, 1:1, 2:1. Przeprowadzenie serii eksperymentów z wykorzystaniem tak przygotowanych pożywek pozwoliło stwierdzić, że obniżenie stężenia soli fosforanowych w pożywce, poprzez rozcieńczenie jej pożywką bez fosforanów w stosunku 1:2, nie wpływa na wzrost bakterii i dodatkowo eliminuje wytracanie soli fosforanowych (rys.1). Sandrin i Maier w swojej pracy podkreślają, że istotnym czynnikiem wpływającym na biodegradację jest biodostępność metali w pożywce. Obecność soli fosforanowych jak i soli siarczanowych powodowało redukcję stężenia metali w pożywce, w efekcie zmniejszała się ilość jonów metali ciężkich dostępnych dla bakterii [4]. Dlatego też, redukcja zawartości fosforanów w pożywce w trakcie eksperymentów mających na celu określenie wpływu niklu na wzrost szczepu KB2, pozwoliła na zwiększenie biodostępności niklu dla badanych komórek. Jednocześnie, w mieszaninie reakcyjnej, znajdowała się ilość jonów PO_4^{3-} niezbędna komórkom KB2 do przeprowadzania procesów życiowych.



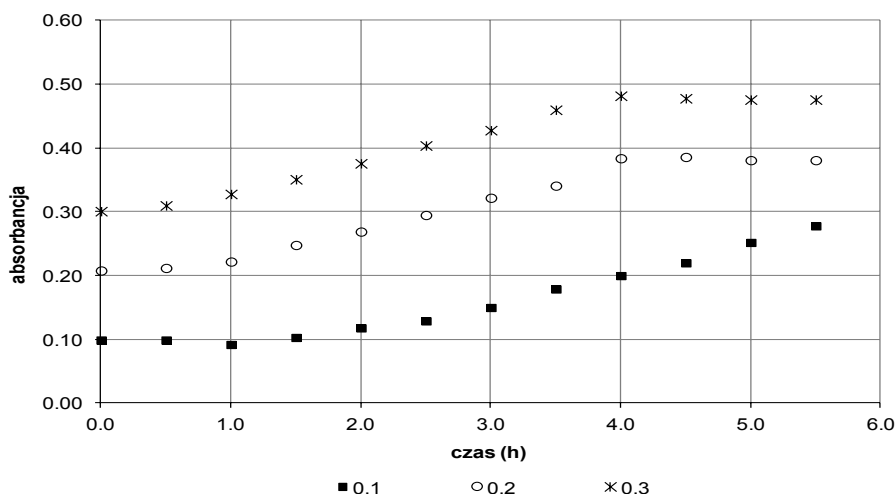
Rys. 1. Wpływ zawartości fosforanów w pożywce na wzrost komórek szczepu KB2 po zmieszaniu pożywki bez PO_4^{3-} i standardowej pożywki w stosunku 2:1, 1:1 i 0:1

Fig. 1. Influence of phosphates on KB2 strain growth after mixing medium without PO_4^{3-} with standart medium in proportion 2:1, 1:1 i 0:1

Innym czynnikiem wymienianym w literaturze wpływającym na biodostępność niklu było pH, którego zmiany są często prezentowanym sposobem obniżenia toksyczności metali ciężkich. Sandrin i współpracownicy opisali, że nawet niewielkie zmiany pH pożywek, zawierających w swoim składzie fosforany, powodują spadek rozpuszczalności metalu obniżając tym samym jego stężenie w roztworze. Jednak w przypadku szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 optymalny odczyn pH mieścił się

w zakresie od 6 do 7. Podwyższenie lub obniżenie pH powoduje znaczący spadek zarówno szybkości wzrostu komórek KB2 jak i biodegradacji fenolu [14].

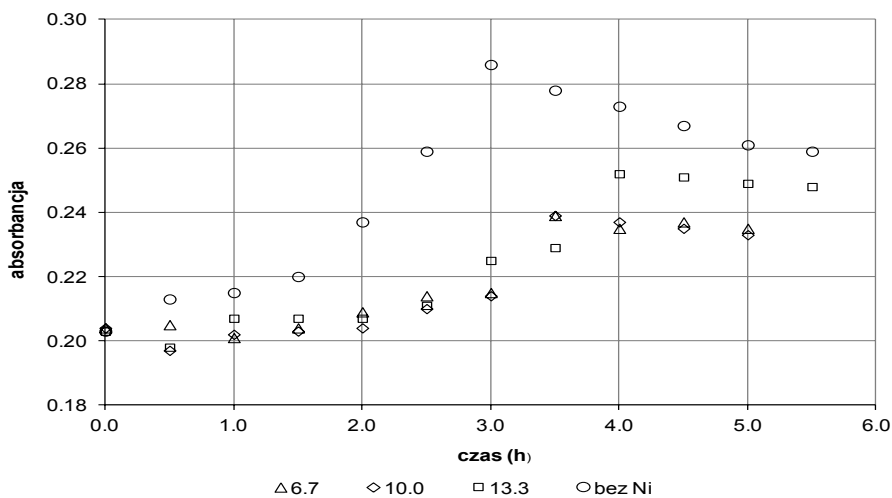
W toku eksperymentów dobrano początkowe stężenie komórek w zawiesinie, przeprowadzając testy dla trzech absorbancji początkowych wynoszących 0,1, 0,2 oraz 0,3. Na podstawie uzyskanych wyników badań, stwierdzono, że optymalną absorbancją początkową była Abs_0 wynosząca 0,2. W przypadku, gdy absorbancja początkowa wynosiła 0,1 obserwowano znaczne wydłużenie czasu niezbędnego do osiągnięcia maksymalnego wzrostu liczby bakterii i całkowitej degradacji fenolu. Natomiast zwiększenie Abs_0 do 0,3 nie skróciło czasu trwania wzrostu, ani nie zwiększyło tempa biodegradacji fenolu, a jednocześnie wymagało użycia większej ilości materiału biologicznego. Dla Abs_0 wynoszącej 0,2 ilość biomasy w mieszaninie reakcyjnej była optymalna dla przeprowadzanych eksperymentów (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ absorbancji początkowej na wzrost komórek szczepu KB2

Fig. 2. Influence of initial absorbance on the growth of KB2 strain.

Przeprowadzono serię badań dla początkowego stężenia fenolu wynoszącego $50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ oraz różnych stężeń niklu: 6,7, 10 i $13,3 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$. Otrzymane w toku eksperymentów wyniki nie pozwoliły na zaobserwowanie wyraźnej zależności pomiędzy wzrostem komórek KB2, a zastosowanym stężeniem niklu (rys. 3). W kolejnych badaniach stężenie początkowe fenolu zwiększono do $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, przy którym zmiany zawartości niklu w mieszaninie reakcyjnej wyraźnie wpływały na wzrost badanego szczepu.



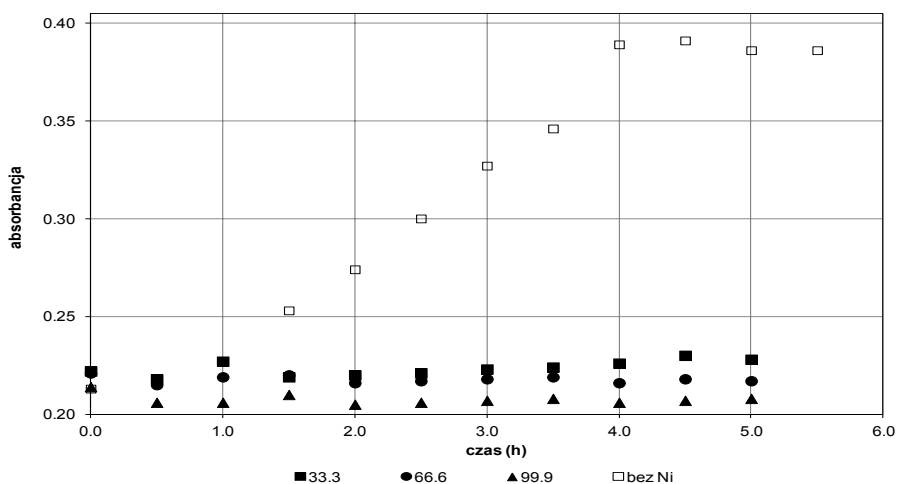
Rys. 3. Wpływ różnych stężeń niklu na (6,7; 10; 13,3 g·m⁻³) wzrost szczepu KB2 dla początkowego stężenia fenolu wynoszącego 50 g·m⁻³

Fig. 3. Effect of different concentration of nickiel (6,7; 10; 13,3 g·m⁻³) on the growth of KB2 strain. Initial phenol conentation was 50 g·m⁻³

Zasadniczą część badań prowadzono przy stężeniu fenolu 100 g·m⁻³ oraz przy różnych stężeniach niklu. Do mieszaniny hodowlanej wprowadzano takie ilości wodnego roztworu soli NiSO₄·7H₂O, aby otrzymać stężenia niklu w zakresie od 6,7 do 99,9 g·m⁻³. Na rysunkach 4 i 5 przedstawiono wzrost absorbancji w czasie, co obrazuje przyrost liczby komórek, po dodaniu różnych objętości roztworu niklu w obecności fenolu jako źródła węgla. Na podstawie wykresów zależności absorbancji od czasu trwania reakcji można było zaobserwować, że nikiel miał duży wpływ na wzrost komórek KB2. Badany szczep wykazywał dużą wrażliwość na obecność niklu, który nawet w niewielkim stężeniu, w znaczący sposób powodował zmniejszenie przyrostu liczby komórek. W eksperymentach, w których stężenie niklu w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 30 g·m⁻³ obserwowano silną inhibicję wzrostu komórek KB2. Po zakończeniu każdego z eksperymentów przeprowadzano analizę chromatograficzną próbek na zawartość fenolu i na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że fenol w obecności niklu jest całkowicie degradowany przez testowany szczep. Hamujący wpływ niklu na wzrost komórek udowodnili wcześniej Zhong i współpracownicy. W swojej pracy opisali dwa szczepy (P1 i P19), wyizolowane z próbek wody pobranej z delty Żółtej Rzeki. Badania miały na celu określenie zdolności do biodegradacji węglowodorów w obecności niklu i ołowiu. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że zarówno nikiel jak i ołów powodują inhibicję wzrostu szczepu P1, a wraz ze wzrostem stężenia metali ciężkich obserwowano słabszy wzrost badanych mikroorganizmów. Badacze stwierdzili, że już stężenie niklu wynoszące 0,1 mM powodowało

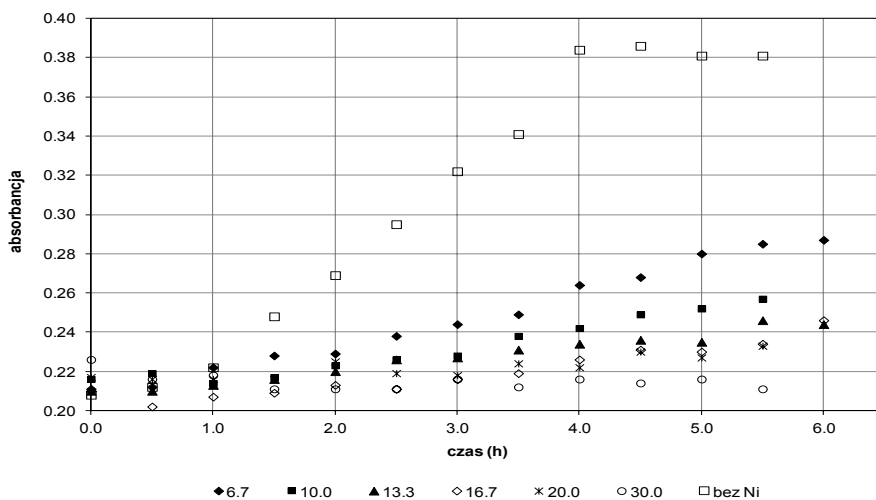
inhibicję wzrostu, lecz jednocześnie przyspieszało degradację toluenu, co pozwalało sądzić, że pewne enzymy produkowane przez komórki P1, są aktywowane przez nikiel i zwiększały tempo degradacji toluenu. Niewielkie dawki niklu powodowały natomiast przyspieszenie tempa wzrostu szczepu P19, co sugerowało, że metale ciężkie były kluczowymi składnikami niektórych białek w tym enzymów. Natomiast po przekroczeniu granicznego stężenia niklu powyżej wartości dobrze tolerowanej przez komórki, metal ten hamował wzrost komórek P19 [7].

Wpływ niklu na wzrost szczepów *Pseudomonas fluorescens* i *Vibrio fluvialis* przedstawili w swojej pracy Asitok i współpracownicy. Stwierdzili, że stężenie niklu wynoszące 1,17 mM gwałtownie obniżało właściwą szybkość wzrostu komórek *Pseudomonas fluorescens* z $0,447 \text{ h}^{-1}$ do $0,186 \text{ h}^{-1}$ i *Vibrio fluvialis* z $0,443 \text{ h}^{-1}$ do $0,185 \text{ h}^{-1}$. Wzrost komórek obu szczepów przy stężeniu 2,34 mM był całkowicie zahamowany [6]. Na podstawie danych literaturowych oraz wyników uzyskanych podczas przeprowadzonych testów, można stwierdzić, że nikiel wykazywał silne właściwości inhibujące wzrost szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz wielu innych gatunków mikroorganizmów.



Rys. 4. Wpływ różnych stężeń niklu (33,3; 66,6; 99,9 $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) na wzrost szczepu KB2.

Fig. 4. Effect of different concentrations (33,3; 66,6; 99,9 $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) of nickel on the growth of KB2 strain



Rys. 5. Wpływ różnych stężeń niklu (6,7; 10; 13,3; 16,7; 20; 30 g·m⁻³) na wzrost szczepu KB2 dla początkowego stężenia fenolu wynoszącego 100 g·m⁻³

Fig. 5. Effect of different concentration of nickel (6,7; 10; 13,3; 16,7; 20; 30 g·m⁻³) on the growth of KB2 strain. Initial phenol concentration was 100 g·m⁻³

WNIOSKI

- Szczep KB2 degraduje fenol gdy w pożywce obecny jest nikiel
- Nawet niewielkie ilości niklu w mieszaninie reakcyjnej zmniejszają wzrost liczby komórek badanego szczepu z fenolem jako źródłem węgla
- Wzrost KB2 jest uzależniony od stężenia niklu w mieszaninie reakcyjnej. Im stężenie niklu jest większe, tym wzrost liczby komórek KB2 jest mniejszy.
- Stężenia niklu powyżej 30 g·m⁻³ całkowicie hamują wzrost *Stenotrophomonas maltophilia* KB2.
- Określenie parametrów równania kinetycznego dla wzrostu bakterii w obecności różnych stężeń niklu wymaga przeprowadzenia badań w reaktorze okresowym. Pozwoli to również na określenie wpływu niklu na biodegradację fenolu przez szczep KB2.

OZNACZENIA – SYMBOLS

A_{550} – absorbancja mierzona przy długości fali 550 nm

	absorbance by wave length 550 nm
S	– stężenie substratu, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$
	substrate concentration
S_0	– stężenie początkowe substratu, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$
	initial substrate concentration
t	– czas, h
	time
λ	– długość fali
	wave length

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE – REFERENCES

- [1] Asitok A.D., Antai S.P., Eyong U.E., Ekpenyong M.G., 2019. Growth dynamics of *Pseudomonas fluorescens* and *Vibrio fluvialis* exposed to various concentration of nickiel. Int J Innov Res Sci Eng Technol 4;9:471-479.
- [2] Bucko-Serafin A., 2017. Stan środowiska w województwie śląskim w 2017 roku. Biblioteka Monitoringu Środowiska 2018 Katowice.
- [3] Gawdzik J., 2013. Mobilność wybranych metali ciężkich w osadach ściekowych. Monografie, Studia, Rozprawy Politechnika Świętokrzyska nr M44, 1-143.
- [4] Koc-Jurczyk, 2013. Mikrobiologiczne usuwanie metali ciężkich ze ścieków. Inż. Ekologiczna, 34, 166-172.
- [5] Kotresha D., Vidyasagar G.M., 2008. Isolation and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC4996. World J. Microbiol Biotechnol 24, 541-547 DOI:10.1007/s11274-007-9508-2.
- [6] Nakamura Y., Sawada D., 2000. Biodegradation of phenol in the presence of heavy metals. J. Chem Technol Biotechnol 75, 137-142. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(200002)75:2<137::AID-JCTB194>3.0.CO;2-0.
- [7] Olaniran A.O., Balgobind A., Pillay B., 2013. Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. Int. J. Mol. Sci. 14, 10197-10228. DOI: 10.3390/ijms140510197.
- [8] Raval N.P., Shah P.U., Shah N.K., 2016. Adsorptive removal of nickiel (II) ions from aqueous environment: A review. J. Environ Manage 179, 1-20. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.04.045.
- [9] Rial D., Vazquez J.A., Murado M.A., 2011. Effects of three heavy metals on the bacteria growth kinetics: a bivariate model for toxicological assessment. Appl. Microbiol. Biotechnol., 90, 1095–1109. DOI: 10.1007/s00253-011-3138-1.
- [10] Sandrin T.R., Maier R.M., 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. Environ Health Perspect., 111 (8), 1093-1101. DOI: 10.1289/ehp.5840.
- [11] Szczyrba E., Kaleta J., Szczotka A., Bartelmus G., 2015. Kinetyka biodegradacji fenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w reaktorze okresowym. Prace Naukowe ICh PAN, 19, 5-19.
- [12] Szczyrba E., Szczotka A., Bartelmus G., Gąszczak A., Greń I., Kolarczyk H., 2016. Kometaboliczna biodegradacja 4-chlorofenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. Prace Naukowe ICh PAN, 20.
- [13] Szczyrba E., Szczotka A., Bartelmus G., 2016. Modelling of aerobic biodegradation of phenol by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. Proceedings of ECOpole 10 (2), 533-543. DOI: 10.2429/proc.2016.10(1)057.
- [14] Wrześniak A., Kopyczok J. 2012. Ocena stanu środowiska w rejonie obiektów objętych monitoringiem lokalnym, na terenie województwa śląskiego. Biblioteka Monitoringu Środowiska

- [15] Zhong C., Zhao J., Chen W., Wu D., Cao G., 2020. Biodegradation of hydrocarbons by microbial strains in the presence of Ni and Pb. 3 Biotech 10:18. DOI: 10.1007/s13205-019-2011-2.
- [16] https://pl.wikipedia.org/wiki/Staw_Kalina.

ELŻBIETA SZCZYRBA, AGNIESZKA GAŚCZAK, ANNA SZCZOTKA, HANNA KOLARCZYK, BOŻENA JANUS

IMPACT OF NICKEL ON GROWTH OF *STENOTROPHOMONAS MALTOLPHILA* KB2 IN THE PRESENCE OF PHENOL

Heavy metals affect a broad range of microbial processes like growth, biodegradation of organic compounds, and others. The chemical elements could be divided into two groups: essential for microorganisms like Fe, Ni, Zn, and non-essential: Ag, Pb, and Cu. The essential heavy metals play a significant role in different microbial processes, and the non-essential group has no biological role. The impact of metals on microorganisms is connected with their interactions with enzymes involved in bacterial metabolism and high concentrations of the elements in the environment seem to be toxic for microorganisms.

The effect of nickel on the growth of different bacterial strains was described previously. It belongs to the group of essential heavy metals and it is widely spread in the environment because of its application in various industries. In the presented study, the influence of nickel on *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 growth was tested. The ability of KB2 strain to use phenol as the carbon and energy source was previously confirmed and it was connected with the presence of special enzymes in the cells.

The experiments were conducted in Erlenmeyer flasks for different concentrations of nickel (6,7 do 99,9 g·m⁻³). The initial absorbance was 0,2 ($\lambda = 550$ nm) and phenol concentration was 100 g·m⁻³. Every test was carried out in an incubator shaker at 30°C, 300 rpm. The concentration of phosphorus in the medium was adjusted to the optimal level, as well as initial absorbance and phenol concentration. The reaction of phosphates and metal oxide had a great impact on solution - phase metal concentration and the bioavailability of nickel for bacteria. Because of that the amount of phosphates in the medium was limited to the necessary concentration. During the experiments, the absorbance was measured using a spectrophotometer at regular intervals. The complete degradation of phenol was confirmed for each flask using the HPLC method at the end of tests. Results of the experiments showed that nickel had a great effect on *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 growth even for a low concentration of nickel. The tested strain was very sensitive to nickel, and the concentration of that metal above 30 g·m⁻³ inhibits the growth of KB2 completely. The next step of the work would be the assessment of the impact of nickel on the biodegradation of phenol in a batch reactor.

Received: 16.11.2020

Accepted: 11.12.2020