

ELŻBIETA SZCZYRBA, HANNA KOLARCZYK, BOŻENA JANUS, AGNIESZKA GĄSZCZAK

PROJEKTOWANIE UKŁADU KOMETABOLICZNEGO DLA PROCESU TRANSFORMACJI 1,4-DIOKSANU: STUDIA LITERATUROWE I EKSPERYMENTY

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

W pracy przeprowadzono analizę danych literaturowych dotyczących biodegradacji 1,4-dioksanu. Wykonane zostały testy wzrostu mikroorganizmów, dla których 1,4-dioksan był jedynym źródłem węgla i energii, oraz w układzie kometabolicznym z fenolem jako substratem wzrostowym. Przeprowadzono również eksperymenty mające na celu wyindukowanie głównego enzymu szlaku rozkładu 1,4-dioksanu.

Słowa kluczowe: 1,4-dioksan, monooksygenaza, kometabolizm

Major methods of 1,4-dioxane degradation were described and different bacterial strains using that xenobiotic as a source of carbon and energy were presented. Microbial growth tests during 1,4-dioxane degradation in metabolic and cometabolic processes were conducted. The tests of the inducibility of monooxygenase, the main enzyme of 1,4-dioxane biodegradation pathway, were also provided.

Keywords: 1,4-dioxane, monooxygenase, cometabolic biodegradation

1. WPROWADZENIE

Rozwój przemysłu doprowadził do poprawy warunków życia ludzi, jednocześnie powodując powstanie nowych zagrożeń dla środowiska naturalnego. W wyniku działalności człowieka powstało wiele nowych związków chemicznych, które wcześniej nie były spotykane w naturze i ich usunięcie z wody, powietrza i gleby stało się ważnym zagadnieniem wielu prac naukowych.

Jednym ze związków, który budzi szczególne zainteresowanie, jest 1,4-dioksan. Występuje on w postaci bezbarwnej cieczy o charakterystycznym zapachu. Jego charakterystyczną cechą jest duża rozpuszczalność w wodzie i niski współczynnik podziału oktanol/woda, a także niska stała Henry'ego. Wszystkie te właściwości 1,4-dioksanu powodują, że jest bardzo mobilny w wodzie, dlatego też jest on wykrywany na całym świecie w wodach powierzchniowych i podziemnych. Obecność tego związku została potwierdzona również w źródłach wody pitnej, a nawet w arktycznych wodach podziemnych [14, 38]. Związek ten został sklasyfikowany przez US EPA jako

związek potencjalnie kancerogeny i na tej podstawie niektóre stany USA wprowadziły ograniczenie stężenia dioksanu w wodzie pitnej $\leq 0,35 \mu\text{g/l}$ [12].

W przeszłości (do roku 1996) 1,4-dioksan był powszechnie stosowany jako stabilizator kwasu trichlorooctowego (TCA) i do środowiska został uwolniony w czasie produkcji, składowania i usuwania TCA. Obecnie produkcja trichlorooctanu jest zakazana, pomimo to wskazuje się jako jedną z przyczyn skażenia środowiska naturalnego przez 1,4-dioksan. Ten cykliczny eter ma szerokie zastosowanie w procesie produkcji farb, smarów, lakierów, detergentów i produktów farmaceutycznych. Wykorzystuje się go jako stabilizator dla chlorowanych rozpuszczalników i jest produktem pośrednim w procesie wytwarzania plastiku z tereftalanu polietylenu (PET) [1, 12, 19, 24, 34, 37].

Obecność 1,4-dioksanu stwierdzono również w kosmetykach takich jak szampony, pasty do zębów czy płyny do płukania ust. Związek ten łagodzi działanie drażniących składników szamponów np. siarczanu sodowo-laurylowego i wzmacnia właściwości spieniające produktu. Jednocześnie należy podkreślić, że 1,4-dioksan nie jest składnikiem dodawanym do kosmetyków celowo, lecz powstaje jako produkt uboczny podczas syntezy surfaktantów, takich jak tlenek polietylenu, polietylen czy glikol polietylenowy i jako taki dostaje się do produktów końcowych. Do tej pory nie wprowadzono norm, które określałyby dozwoloną ilość 1,4-dioksanu w produktach kosmetycznych, lecz jest to na tyle ważne zagadnienie, że wzbudziło zainteresowanie ICCR (International Cooperation on Cosmetics Regulation) [3, 7, 18, 32].

Problem ze skażeniem środowiska 1,4-dioksanem dostrzeżono na całym świecie, a szczególną uwagę zwrócił w Unii Europejskiej, Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Japonii i Korei Południowej, gdzie powstaje wiele raportów, opracowań i prac naukowych obejmujących zarówno zanieczyszczenie środowiska 1,4-dioksanem, jak i różne metody utylizacji tego związku.

Do usuwania 1,4-dioksanu z zanieczyszczonego środowiska stosuje się różne metody: zaawansowane procesy utleniania, degradację fotokatalityczną, fitoremediację, bioaugmentację, i biostymulację. Zaawansowane procesy oksydacyjne (ozonowanie, światło ultrafioletowe, nadtlenek wodoru) są bardzo skuteczną techniką usuwania 1,4-dioksanu, niemniej technologie te wymagają dużej ilości związków chemicznych i nakładów energii, co skutkuje wysokimi kosztami operacyjnymi. Dlatego też konieczne jest znalezienie metod mniej kosztownych i wymagających mniejszej ilości energii. Biodegradacja wyróżnia się pod tym względem, ponieważ wydaje się być najbardziej ekonomiczna i przyjazna dla środowiska. Metoda ta prowadzi do skutecznego rozkładu związku, jednocześnie zapobiegając akumulacji toksycznych produktów pośrednich [12, 14, 17]. Początkowo 1,4-dioksan był uważany za niebiodegradowalne syntetyczne zanieczyszczenie przemysłowe, jednak w ostatnich dekadach ukazały się prace wskazujące na możliwość usuwania 1,4-dioksanu z wykorzystaniem metod biologicznych (tab. 1).

Tabela 1. Porównanie sposobów degradacji 1,4-dioksanu
Table 1. Comparisons of metabolic i cometabolic degradation of 1,4-dioxane

Szczep	Metabolizm	Kometabolizm	Indukcja	Lit.
Konsorcjum	tak	THF		[2]
<i>Azoarcus</i> sp. DD4	nie	Tak z 1,1-DCE	propan	[6]
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	tak	TCE	propan	[10]
<i>Mycobacterium aphagni</i> ENV482		etan		[11]
<i>Acinetobacter baumannii</i> DD1	Tak	nie		[14]
<i>Pseudonocaria acaciae</i> JCM 16707 <i>Pseudonocaria asaccharolytica</i> JCM 10410 <i>Pseudonocaria dioxanivorans</i> JCM 13855 <i>Pseudonocaria aetherivorans</i> JCM 14343	Tak	THF THF THF THF		[15]
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> JCM 14343	Tak		1,4-dioksan, THF, 1,4-budanediol	[16]
<i>Pseudonocardia</i> sp. D17	tak			[17]
<i>Mycobacterium</i> sp. PH-06	Tak			[20]
<i>Pseudonocardia</i> sp. K1		THF		[21]
Konsorcjum	Tak			[22]
<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190 <i>Pseudonocardia benzenivorans</i> B5 <i>Bulkholderia cepacia</i> G4 <i>Ralstonia pockettii</i> PKO1 <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1 <i>Methylosinus thichosporium</i> OB3b <i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5 <i>Rhodococcus</i> RR1 <i>Escherichia coli</i> TG1	Tak Tak Nie Nie Nie Nie Nie Nie	 Toluen toluen toluen metan propan toulen LB	 rozpuszczony metan propan toluen	[23]
<i>Pseudonocardia dioxanivirans</i> CB1190 <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	tak	Tak		[24]
<i>Pseudionocardia carboxydivorans</i> RM-31	Tak			[26]
<i>Pseudonocardia</i> CB1190	Tak			[27]
<i>Afipia</i> sp D1 <i>Mycobacterium</i> sp. D6 <i>Mycobacterium</i> sp. D11 <i>Pseudonokardia</i> sp. D17	Tak Tak Tak Tak		D1 i D2	[28]
<i>Rodococcus ruber</i> T1 <i>Rodococcus ruber</i> T5		THF THF		[29]
<i>Flavobacterium</i>	Nie	THF		[30]
<i>Pseudonocaria</i> sp. ENV478	Tak		THF	[33]
<i>Pseudonocardia</i> sp. N23	Tak			[35]
Konsorcjum	Nie	Tak		[36]

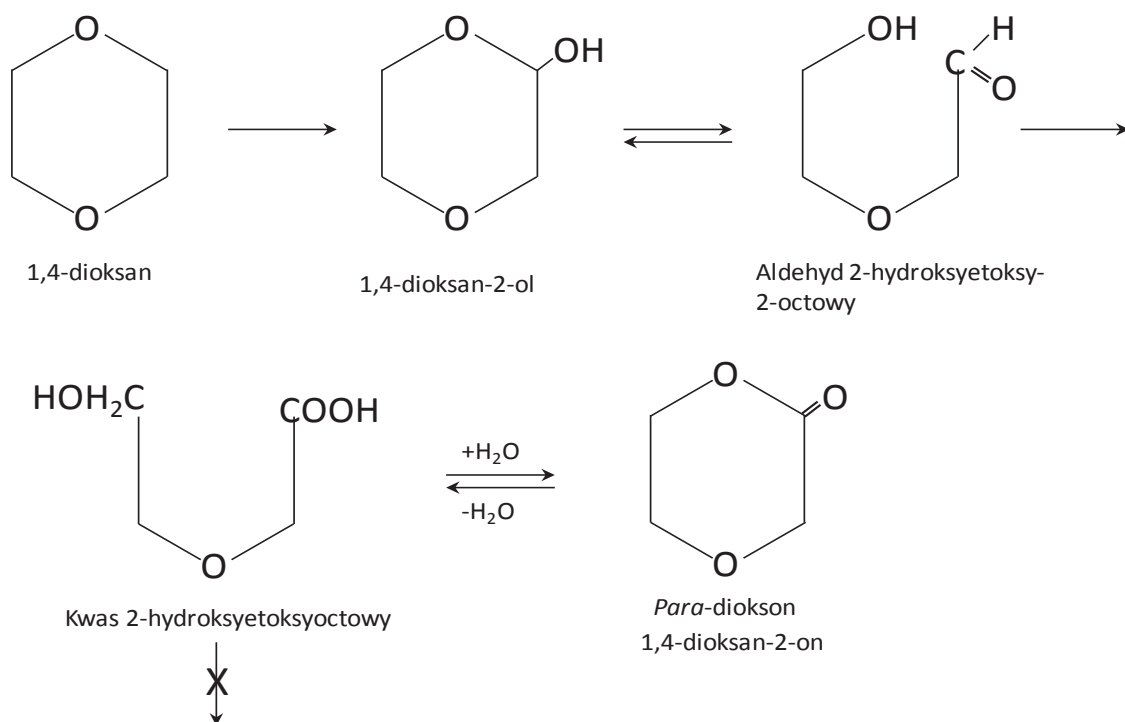
Niestety, pomimo tego, że 1,4-dioksan występuje w środowisku dość powszechnie, znalezienie szczepu bakterii, który usuwałby ten związek szybko i wydajnie jest bardzo trudne. W zależności od roli, jaką pełni 1,4-dioksan we wzroście komórek, organizmy zostały podzielone na metabolizujące lub kometabolizujące ten związek.

Metabolizm to proces w którym mikroorganizmy wykorzystują zanieczyszczenie organiczne jako źródło węgla i energii, co umożliwia wzrost biomasy. Parales i współpracownicy [27] izolowali ze ścieków przemysłowych komórki szczepu *Actinomyces* CB1190, które były zdolne do wzrostu z wykorzystaniem 1,4-dioksanu jako źródła węgla i energii. Szczep CB1190 degradował 1,4-dioksan z szybkością $0,33 \text{ mg dioksanu} \cdot \text{mg białka}^{-1}$, a 59,5% związku ulegało mineralizacji do CO_2 . Szczep ten w późniejszych pracach został zaklasyfikowany jako *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190. Szczegółowe badania pozwoliły na wyznaczenie następujących parametrów kinetycznych: $k_{max}=1,1 \text{ mg dioksanu} \cdot \text{mg białka}^{-1}$, $K_s=160 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, współczynnik wydajności $Y=0,9 \text{ mg białka} \cdot \text{mg dioksanu}^{-1}$. W tej samej pracy opisano drugi szczep – *Pseudonocardia benzenivorans*, dla którego wyznaczono parametry: $k_{max}=0,1 \text{ mg dioksanu} \cdot \text{mg białka}^{-1}$, $K_s=330 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ oraz współczynnik wydajności $Y=0,03 \text{ mg białka} \cdot \text{mg dioksanu}^{-1}$. Krótka ekspozycja tych szczepów na gaz acetylenowy, powodowała zanik zdolności do degradacji 1,4-dioksanu przez testowane komórki. Wskazuje to na udział enzymów z grupy monoooksygenaz w szlaku rozkładu 1,4-dioksanu, ponieważ acetylen jest znanym inhibitorem tej grupy enzymów.

Innym szczepem wykorzystującym 1,4-dioksan jako źródło węgla i energii był *Mycobacterium* sp. PH-06 [20], który w ciągu 15 dni zmniejszył stężenie 1,4-dioksanu z początkowego $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ do $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Obserwowano również zależność pomiędzy degradacją związku w hodowli a przyrostem biomasy, ponieważ wraz ze spadkiem stężenia związku następował przyrost komórek. Huang i współpracownicy [14] wyizolowali *Acinetobacter baumannii* DD1, który degradował $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 1,4-dioksanu w 42 h, a współczynnik wydajności wynosił $0,144 \text{ mg białka} \cdot \text{mg dioksanu}^{-1}$. W czasie badań stwierdzono obecność monoooksygenazy w komórkach szczepu, wskazując jednocześnie, że enzym ten wymaga indukcji poprzez wcześniejszą inkubację hodowli w obecności 1,4-dioksanu. Parametry kinetyczne, które są najczęściej używane do oceny degradacji 1,4-dioksanu zostały określone dla czterech szczepów: D1, D6, D11 i D17 przez Sei i współpracowników [28]. Współczynnik wydajności mieścił się w zakresie $0,179 - 0,223 \text{ mg białka} \cdot \text{mg dioksanu}^{-1}$, właściwa szybkość degradacji $0,052 - 0,263 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a $K_s - 20,6 - 69,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. O ile w dotychczas opisywanych pracach model kinetyczny Monoda najlepiej opisywał proces degradacji 1,4 dioksanu, tak Chen i współpracownicy [4] zastosowali model Haldane'a dla szczepu *Xanthobacter flavus* DT8. Związane jest to występowaniem zjawiska inhibicji substratowej u testowanego szczepu, którego równanie kinetyczne Monoda nie uwzględnia. Stwierdzono wzrost właściwej szybkości wzrostu wraz ze wzrostem stężenia początkowego substratu od 10 do $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, a przyczynę tego zjawiska upatrywano w zwiększonej dostępności substratu. Dalszy wzrost stężenia 1,4-dioksanu skutkował obniżeniem właściwej szybkości reakcji, co z kolei dowodziło istnienia zjawiska inhibicji substra-

towej. Określono następujące parametry: $\mu_{max} = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $K_s=17,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ i $K_i=166,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Maksymalna właściwa szybkość wzrostu *X. flavus* DT8 była jedną z najwyższych opisanych do tej pory.

Kometabolizm opisywany jest jako proces przemian substratu niewzrostowego, zachodzących w obecności substratu wzrostowego. Substrat wzrostowy jest donorem elektronów i dzięki temu zapewnia zdolność redukcyjną i energię umożliwiającą podtrzymanie funkcji życiowych mikroorganizmów i ich wzrost [5, 13]. W tym układzie substrat niewzrostowy (kometabolit) nie dostarcza węgla i energii do wzrostu komórek, a jego transformacja jest możliwa dzięki szerokiej specyficzności substratowej enzymów biorących udział w przemianach substratów wzrostowych oraz występowaniu kofaktorów takich jak NAD(P)H i FADH₂, które są donorami elektronów. Podobieństwo strukturalne substratów wzrostowych i kometabolitów oraz niespecyficzna aktywność enzymatyczna umożliwia transformację substratów niewzrostowych przy udziale enzymów biorących udział w szlaku rozkładu substratów wzrostowych. Enzymy katalizujące reakcje mogą ulegać inhibicji kompetycyjnej, co jest spowodowane rywalizacją substratów wzrostowych i nie wzrostowych o miejsce aktywne enzymu, w wyniku czego obniżeniu ulega szybkość transformacji każdego z nich.



Rys. 1. Szlak rozkładu 1,4-dioksanu przez szczep ENV478
Fig. 1. 1,4-dioxane biodegradation pathway by strain ENV478

Vainberg i współpracownicy [33] przedstawili w swojej pracy szczep *Pseudocardia* sp. ENV478 zdolny do degradacji 1,4-dioksanu w układzie kometabolicznym z tetrahydrofuranem z szybkością początkową szacowaną na $21 \text{ mg dioksanu}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g TSS}^{-1}$. Na podstawie zidentyfikowanych w czasie badań produktów pośrednich zapro-

ponowali szlak rozkładu 1,4-dioksanu przez komórki ENV478. Podobnie jak we wcześniejszych pracach kluczową rolę w tym procesie odgrywała monoooksygenaza, która umożliwiała wprowadzenie grupy hydroksylowej do pierścienia węglowego, w wyniku czego powstawał 1,4-dioksan-2-ol (rys.1).

W celu degradacji 1,4-dioksanu stosowano nie tylko pojedyncze szczepy, lecz także konsorcja wyizolowane z rejonów zanieczyszczonych tym związkim. Zenker i współpracownicy [36] opisali konsorcjum złożone z kilku szczepów, które degradowały 1,4-dioksan w układzie kometabolicznym z tetrahydrofuranem (THF). W czasie prób selekcji pojedynczych szczepów, stwierdzono utratę zdolności wzrostu z THF jako źródłem węgla. Autorzy nie obserwowali wzrostu komórek, gdy jedynym dostępnym substratem w układzie był 1,4-dioksan, natomiast wzrost mikroorganizmów pojawił się w obecności THF i 1,4-dioksanu. W momencie, gdy ilość substratu wzrostowego w hodowli obniżała się znacząco, następowała degradacja 1,4-dioksanu. W przeprowadzonych testach próbowano określić wpływ obecności 1,4-dioksanu na wzrost komórek. Dla stężenia początkowego $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ dla obu związków obliczono współczynnik wydajności wynoszący $0,750 \text{ mg TSS}\cdot\text{mgC}^{-1}$ podczas gdy dla THF jedynego źródła węgla współczynnik wydajności wyniósł $0,668 \text{ mg TSS}\cdot\text{mgC}^{-1}$, czyli jedynie o 12% mniej, niż gdy oba związki były w układzie, a wynik ten nie ma znaczenia statystycznego. Na tej podstawie zasugerowano, iż zgodnie z definicją kometabolizmu, transformacja substratu niewzrostowego nie przynosi korzyści odżywczych dla mikroorganizmów. Nie stwierdzono toksyczności produktów powstających w wyniku przemian kometabolicznych w przypadku testowanego konsorcjum, co jest poważnym problemem pojawiającym się w układach kometabolicznych. Zaobserwowano natomiast pojawienie się zjawiska inhibicji kompetycyjnej, co jest charakterystyczne dla układów kometabolicznych. Opisane powyżej zjawisko jest efektem współzawodnictwa pomiędzy substratem wzrostowym i niewzrostowym o miejsce w centrum aktywnym tego samego enzymu. W efekcie degradacja 1,4-dioksanu następowała dopiero, gdy stężenie THF było relatywnie niskie. Zjawisko inhibicji kompetycyjnej zaobserwowano również u szczepów badanych przez Sei i współpracowników [29]. Przetestowano pięć szczepów, z których dwa (T1 i T5) wykazywały zdolność degradacji 1,4-dioksanu w obecności THF. W dalszych testach szczepy te zidentyfikowano jako *Rhodococcus ruber* DSM43338T i *Rhodococcus ruber* M2. Kiedy do kultury bakterii dodawano 1,4-dioksan nie obserwowano wzrostu komórek oraz degradacji substratu, natomiast w obecności THF, 1,4-dioksan był degradowany po wyczerpaniu się THF w hodowli, co dowodzi istnienia inhibicji kompetycyjnej pomiędzy tymi substratami. W celu zmaksymalizowania kometabolicznej degradacji 1,4-dioksanu przy minimalnej inhibicji kompetycyjnej zastosowano odpowiednie dawki substratów: dla szczepu T1: $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ THF i $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 1,4-dioksanu, a dla szczepu T5: $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ THF i $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 1,4-dioksanu, z czego wywnioskowano, że dla obu szczepów optymalnym stosunkiem THF/1,4-dioksan jest 2 do 4. Stwierdzono również, że limitująco na proces degradacji 1,4 dioksanu w układzie kometabo-

licznym wpływała akumulacja produktów pośrednich w tym toksycznego 2-HEAA (kwas 2-hydroksyetoksyoctowy).

Wykorzystywanie mikroorganizmów umożliwia wyeliminowanie szkodliwych substancji ze środowiska. Aby zoptymalizować proces biologicznego usuwania zanieczyszczeń chemicznych z wykorzystaniem mikroorganizmów, konieczne jest jak najlepsze poznanie procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Prace naukowe dotyczące biodegradacji 1,4-dioksanu opisują dwa podstawowe szlaki rozkładu 1,4-dioksanu przez mikroorganizmy, w których kluczową rolę odgrywa monooksygenaza. Enzym ten może występować w komórkach konstytutywnie lub wymagać indukcji samym 1,4-dioksanem lub innym związkiem (tab.1). Najczęściej wymienianymi związkami, mającymi zdolność pobudzenia komórek do wytworzenia monooksygenazy biorącej udział w degradacji 1,4-dioksanu, poza samym dioksanem są tetrahydrofuran, toluen, metan, propan i 1-butanol. Sei i współpracownicy [28] przebadali na obecność monooksygenazy lub możliwość jej wyindukowania 4 szczepy wyizolowane z obszaru, na którym znajdowały się zakłady chemiczne. Zawiesinę bakterii każdego szczepu pre-inkubowano w płynnej pożywce CGY (w skład której wchodziły: hydrolizat kazeiny, gliceryna, ekstrakt drożdżowy) lub w pożywce BMM (podstawowa pożywka minimalna) z 1,4-dioksanem. Na podstawie tych badań stwierdzono, że szczepy D1 i D6 wytwarzają monooksygenazę po pre-inkubacji 1,4-dioksanem, natomiast enzym ten jest obecny konstytutywnie w komórkach szczepów D11 i D17.

Badacze najczęściej proponują jedną z dwóch ścieżek rozkładu 1,4 dioksanu dla różnych szczepów. Głównym produktem pierwszej z nich jest kwas 2-hydroksyetoksyoctowy (rys. 1), a przykładowymi mikroorganizmami są w tym przypadku: *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190, *Pseudonocardia benzenivorans* B5, *Rhodococcus ruber* T1, *Rhodococcus ruber* T5 i *Pseudonocardia* sp. ENV478 [23, 29, 33]. Natomiast produktami alternatywnego szlaku są 1,4-dioksan-2-ol i glikol etylenowy. Do grupy szczepów degradujących 1,4-dioksan tą ścieżką należą między innymi: *Mycobacterium* sp. PH-06, *Acinetobacter baumannii* DD1, *Xanthobacter flavus* DT8 [4, 14, 20].

W niniejszym opracowaniu uwagę skupiono na analizie danych literaturowych dotyczących biodegradacji 1,4-dioksanu jako źródła węgla i energii oraz doborze szczepu, zdolnego do rozkładu 1,4-dioksanu.

2. MATERIAŁY I METODY

W badaniach wykorzystano szczepy, u których we wcześniejszych testach stwierdzono obecność głównego enzymu szlaku rozkładu 1,4-dioksanu – monooksygenazy.

Do testów wybrano następujące szczepy *Pseudomonas* sp. E-93486, *Pseudomonas putida* mt-2, *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz *Rhodococcus erythropolis* KB4.

Szczep *Pseudomonas* sp. E-93486, posiadający zdolność degradacji styrenu oraz szczep *Pseudomonas putida* mt-2, degradujący *p*-ksylen zakupiono w kolekcji VTT

Culture Collection, Technical Reserach Centre of Finland. Obydwa szczepy hodowano na płynnej pożywce mineralnej o składzie opisanym przez Greń i współpracowników [8].

Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz *Rhodococcus erythropolis* KB4 pozyskano z kolekcji Katedry Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Szczep KB2 jest przechowywany pod numerem E-113197 w kolekcji VTT w Finlandii. Skład pożywki hodowlanej przedstawiono we wcześniejszych pracach [9].

Literatura podaje, że na zdolność szczepów do degradacji związków organicznych wpływa substrat, z którym były pre-inkubowane. W związku z powyższym zastosowano różne substraty na początkowym etapie hodowli komórek. W celu przygotowania mikroorganizmów do badań komórki bakteryjne przenoszono ze skosów agarowych do probówek zawierających bulion lub pożywkę z glukozą lub pożywkę z 1,4-dioksanem. Po 24 godzinach od zaszczepienia hodowle przelewano do probówek z odpowiednią pożywką mineralną i dodawano 1,4-dioksan, fenol lub toluen. Jak podaje literatura, niektóre szczepy degradujące toluen mają enzymy umożliwiające rozkład 1,4-dioksanu jako jedyne źródła węgla lub jako kosubstratu z toluenem [12, 23]. Z tej przyczyny podjęto próbę sprawdzenia, czy testowane szczepy można przystosować do wzrostu z toluenem jako źródłem węgla. Następnie szczep KB2 przenoszono do kolb, a pozostałe szczepy do butelek i uzupełniano odpowiednią pożywką mineralną aby uzyskać hodowlę o objętości 100 ml. Do hodowli dodawano odpowiedni związek jako źródło węgla, regulując dawkę w zależności od zapotrzebowania. Co 24h wykonywano pomiary absorbancji przy użyciu spektrofotometru HACH 2900 (długość fali $\lambda=550$) pozwalającej stwierdzić wzrost komórek. Hodowle prowadzono w wytrząsarkach inkubacyjnych w temperaturze 30°C.

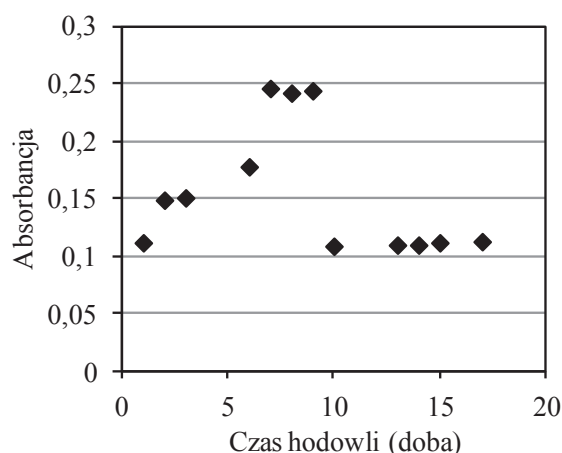
Pomiar stężenia 1,4-dioksanu mierzono metodą chromatografii gazowej przy użyciu chromatografu Varian 3800 wyposażonego w detektor FID i kolumnę kapilarną. Zastosowano metodę temperaturową: temperaturą wyjściową było 70°C utrzymane przez 3 minuty, potem następował wzrost temperatury o 30°C/min do temperatury 210°C. Temperatura injectorów i detektora wynosiła 250°C. Gazem nośnym był hel.

Następnym etapem badań miało być sprawdzenie czy bakterie hodowane w obecności toluenu będą w stanie degradować 1,4-dioksan jako jedyne źródło węgla lub w układzie kometabolicznym z toluenem.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

W pracy testowano szczepy do wzrostu w obecności 1,4-dioksanu jako jedyne źródła, oraz w obecności innego związku jako substratu wzrostowego. W celu doboru szczepu zdolnego do degradacji 1,4-dioksanu przeprowadzono testy z wykorzystaniem *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Rhodococcus erythropolis* KB4, *Pseudomonas* sp. E-93486 oraz *Pseudomonas putida* mt-2. Szczepy te wybrano na podstawie wcze-

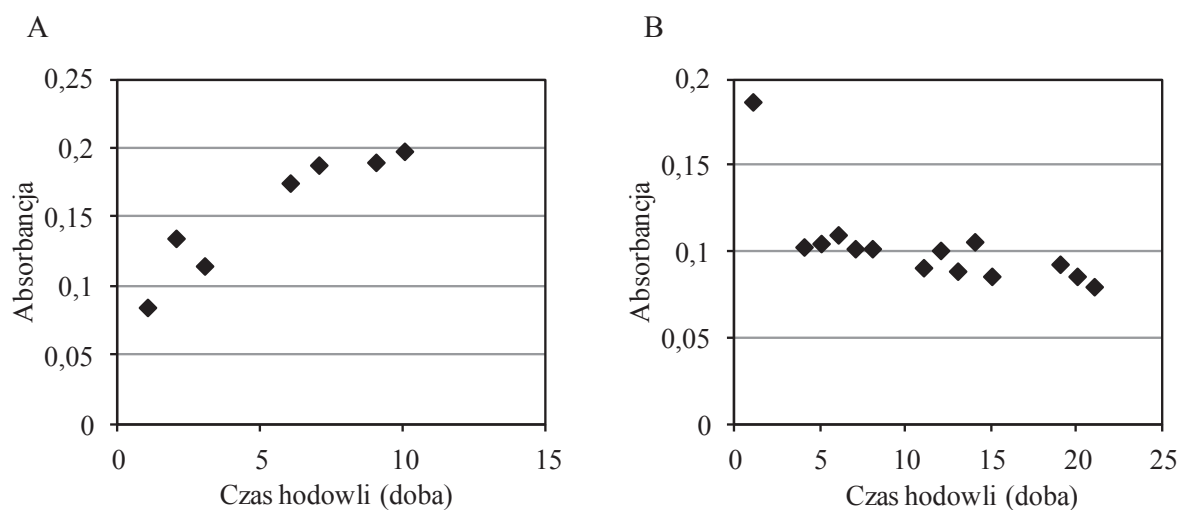
śniejszych badań, które dowiodły obecności monoooksygenazy w ich komórkach. Sprawdzone, czy szczepy mają zdolność do biodegradacji 1,4-dioksanu jako jedynego źródła węgla i energii lub jako substratu niewzrostowego w układzie kometabolicznym z innym związkiem jako substratem wzrostowym. Przeprowadzono również eksperymenty mające wykazać, czy możliwe jest wyindukowanie w komórkach bakteryjnych układu enzymatycznego niezbędnego do degradacji 1,4-dioksanu poprzez dodanie toluenu, jednego z najczęściej wymienianych w literaturze związków pobudzającego produkcję monoooksygenazy u bakterii.



Rys. 2. Wzrost komórek szczepu mt-2 w kolbach w obecności 1,4-dioksanu jako źródła węgla
Fig.2. The growth of mt-2 cells with 1,4-dioxane as the only carbon source

Hodowlę szczepu *Pseudomonas putida* mt-2 z probówek z bulionem przeniesiono do butelek hodowlanych o objętości 500 ml i po uzupełnieniu pożywką do 100 ml dodawano 1,4-dioksan. Hodowlę prowadzono 17 dni i nie stwierdzono przyrostu biomasy (rys. 2), co jest dowodem na brak w komórkach tego szczepu enzymów umożliwiających degradację 1,4-dioksanu jako jedynego źródła węgla, oraz brak możliwości wyindukowania tego enzymu przez toluen u badanych komórek, dlatego zaprzestano dalszej hodowli.

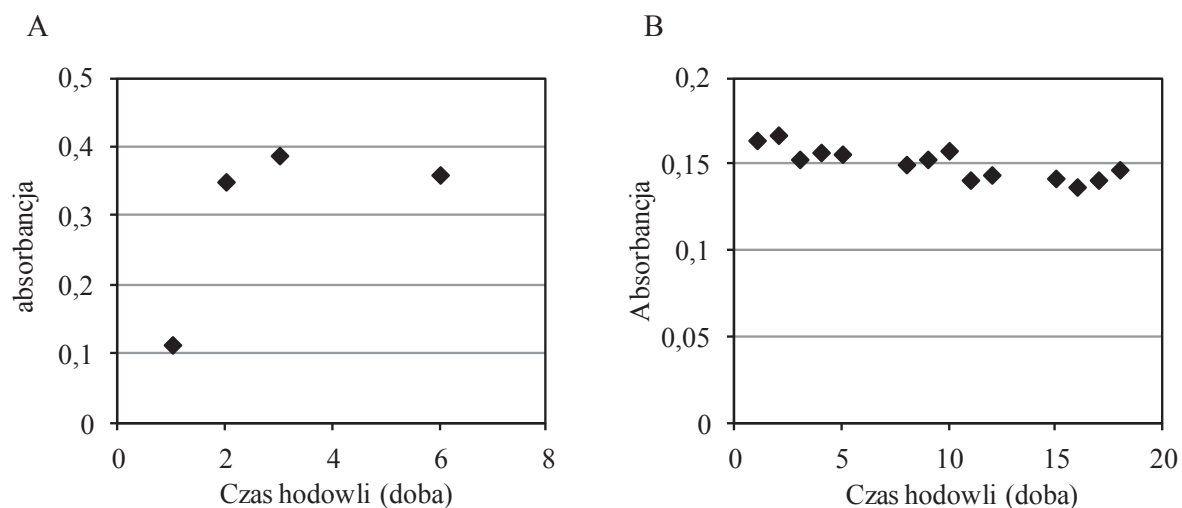
W przypadku szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486, po przeniesieniu hodowli z probówek do butelek, początkowo stwierdzono wzrost absorbancji. Po pierwszym pasażu (przeniesieniu hodowli do nowych, sterylnych butelek o objętości 500 ml i uzupełnieniu pożywką mineralną do 100 ml) gęstość optyczna zawiesiny komórek w butelce zaczęła spadać (rys. 3). Przyczyną początkowego wzrostu mogły być pozostałości substratów odżywczych z bulionu, które w kolejnym pasażu uległy wyczerpaniu, a ich brak spowodował zatrzymanie dalszego wzrostu. Na tej podstawie można wywnioskować, że w komórkach E-93486 prawdopodobnie brakowało enzymów niezbędnych do degradacji 1,4-dioksanu i nie można było też pobudzić ich produkcji.



Rys. 3. Wzrost komórek szczepu E-93486 w kolbach w obecności 1,4-dioksanu jako źródła węgla (A) i po pierwszym pasażu (B)

Fig. 3. The growth of E-93486 cells with 1,4-dioxane as the only carbon source (A) and after the first passage (B)

Rhodococcus erythropolis KB4, podobnie jak szczep E-93486, bezpośrednio po przeniesieniu z probówek do butelek obserwowano wzrost komórek, natomiast po pasażu nastąpiło zahamowanie wzrostu, co pozwoliło wyciągnąć podobne wnioski jak w przypadku szczepu E-93486 (rys. 4).

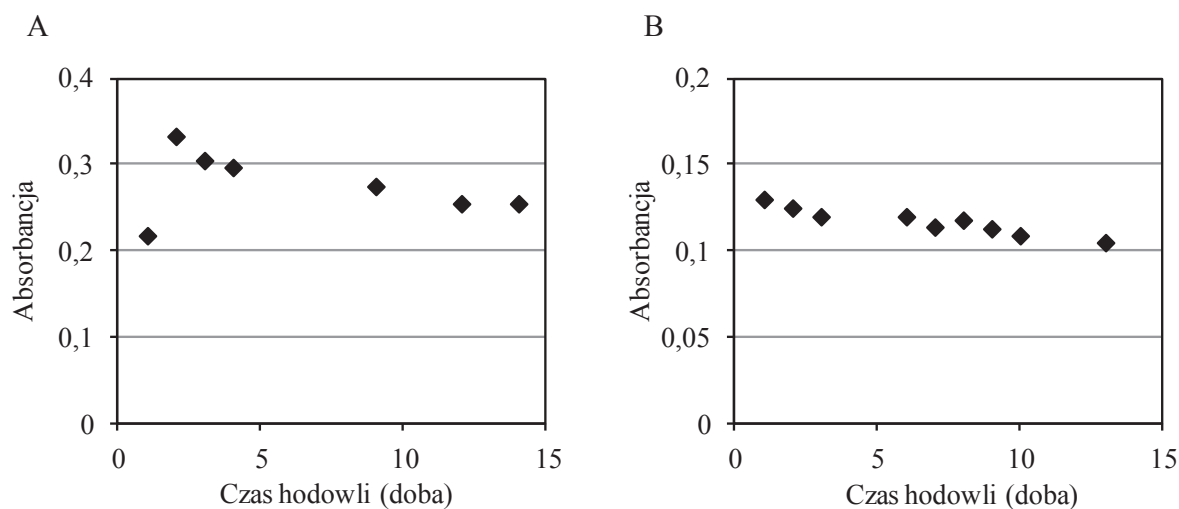


Rys. 4 Wzrost komórek szczepu KB4 w obecności 1,4-dioksanu jako źródła węgla(A) i po pierwszym pasażu (B)

Fig.4. The growth of KB4 cells with 1,4-dioxane as the only carbon source (A) and after the first passage (B)

Wykresy opisujące wzrost komórek szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w obecności 1,4-dioksanu jako źródła węgla przedstawiają rysunki 5 A i 5 B. Nie stwierdzono wzrostu badanego szczepu w obecności 1,4-dioksanu. Wykonanie pasażu było możliwe dzięki dość wysokiej liczbie komórek uzyskanej po etapie hodowli

w probówkach. Otrzymane wyniki sugerują, że szczep KB2 nie posiada układu enzymatycznego, który umożliwiłby mu wykorzystanie 1,4-dioksanu jako źródła węgla i energii.



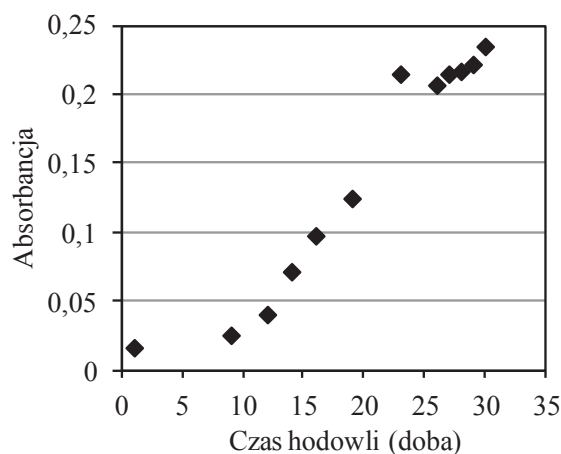
Rys. 5. Wzrost komórek szczepu KB2 w obecności 1,4-dioksanu jako źródła węgla (A) i po pierwszym pasażu (B)

Fig.5. The growth of KB2 cells with 1,4-dioxane as the only carbon source (A) and after the first passage (B)

Zgodnie z literaturą zdolność rozkładu 1,4-dioksanu można wyindukować przy pomocy toluenu (Mahendra i Alvarez-Cohen, 2006) [23]. Ponieważ we wcześniejszych badaniach stwierdzono, że *Pseudomonas* sp. E-93486 oraz *Pseudomonas putida* mt-2 nie potrafią wykorzystywać toluenu jako źródła węgla, dodano toluen tylko do hodowli szczepu KB2.

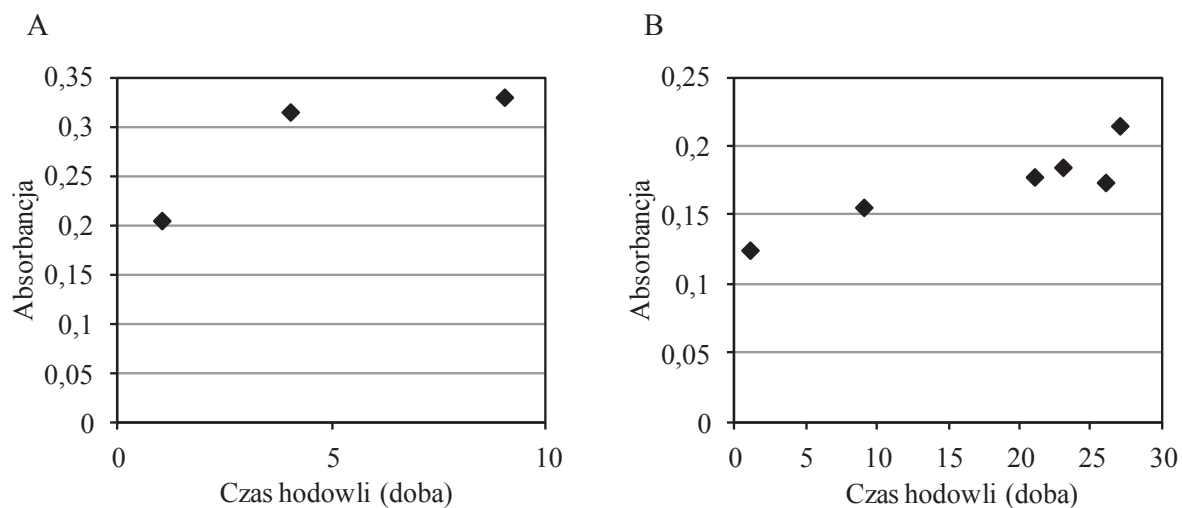
Posiew szczepu KB2 ze skosu wykonano w probówkach zawierających bulion odżywczy, pożywkę mineralną z glukozą lub pożywkę mineralną z toluenem. Hodowlę na bulionie odżywcym po 24 h przeniesiono do probówki z pożywką mineralną i dodano toluen. Podobne postępowanie zastosowano w przypadku komórek hodowanych z glukozą jako substratem odżywcym. Dodanie bulionu i glukozy miało umożliwić namnożenie komórek szczepu KB2, a dodatkowo wykazać czy rodzaj substratu odżywczego może wpłynąć na potencjalną degradację toluenu. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów stwierdzono, że toluen nie może być substratem odżywcym dla komórek KB2, ponieważ szczep ten nie wykazuje wzrostu, jeśli toluen zostanie dodany jako jedyne źródło węgla (rys. 6 i 7). Najśłabszy wzrost uzyskano dla zawiesiny bakterii pierwotnie hodowanej w probówkach z bulionem. Po przelaniu kultury do probówek z pożywką mineralną i dodaniu toluenu początkowo obserwowano wzrost biomasy. Natomiast trzeciej dawki toluenu komórki KB2 nie potrafiły zdemini-zować przez 11 dni. Szczep KB2 przeniesiony ze skosu do pożywki mineralnej, do której dodano toluen wykazały pewien wzrost, niestety był on słaby i bardzo wolny (rys.7A). Na podstawie uzyskanych wyników, można stwierdzić, że komórki szczepu

KB2 nie rosną w obecności toluenu na tyle efektywnie, aby możliwe było ich wykorzystanie w dalszych badaniach.



Rys. 6. Wzrost komórek szczepu KB2 w obecności toluenu jako źródła węgla. Bakterie ze skosu zostały przeniesione do próbówki z pożywką mineralną i dodano toluen

Fig. 6. The growth of KB2 cells with toluene as the only carbon source. The cells from agar plates were moved to the mineral medium and toluene was added

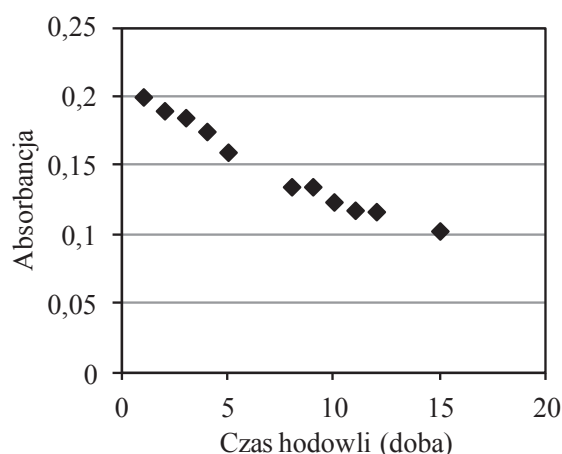


Rys. 7. Wzrost komórek szczepu KB2 w obecności toluenu jako źródła węgla. Bakterie ze skosu zostały przeniesione do próbówki z bulionem odżywczym (A) lub do próbówki z pożywką mineralną z glukozą (B). Po 24 h hodowle przeniesiono do nowej próbówki z pożywką mineralną i dodano toluen

Fig. 7. The growth of KB2 cells with toluene as the only carbon source. The cells from agar plates were transferred to the nutritional broth (A) or to the mineral medium with glucose (B). After 24 h the culture was transferred to the mineral medium and 1,4-dioksan was added every 24 h

Kolejnym etapem prac było sprawdzenie, czy szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 przystosowany wcześniej do degradacji fenolu, posiada zdolność rozkładu 1,4-dioksanu. Kluczowym enzymem szlaku rozkładu fenolu, podobnie jak w przypad-

ku 1,4-dioksanu jest monoooksygenza, dlatego podjęto prace pozwalające stwierdzić, czy możliwe jest wykorzystanie komórek degradujących fenol do rozkładu 1,4-dioksanu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wcześniejsze przystosowanie komórek szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 do degradacji fenolu, nie umożliwia tym komórkom wzrostu z wykorzystaniem 1,4-dioksanu jako jedyne źródła węgla (rys. 8).

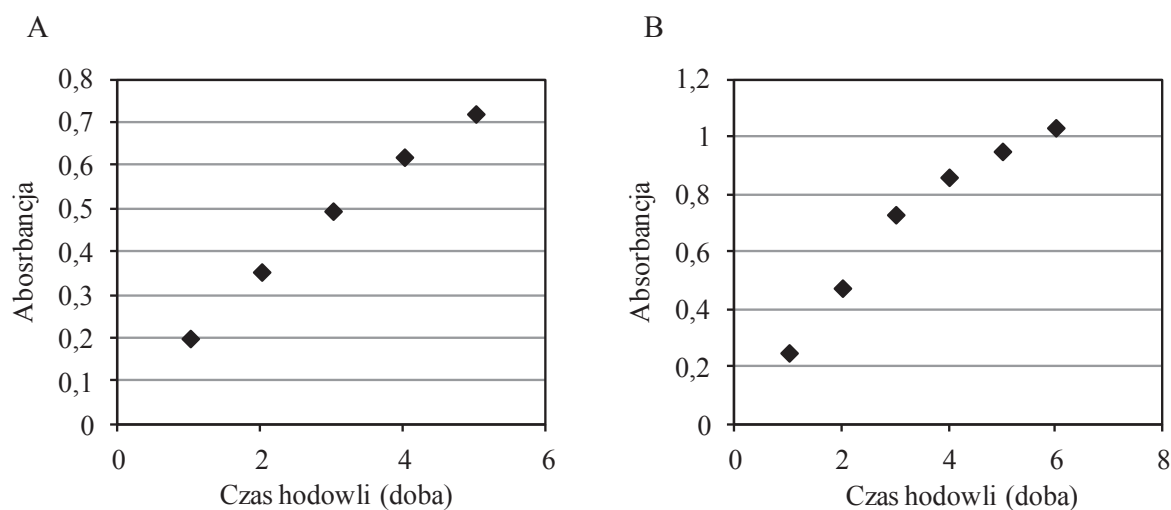


Rys. 8. Wzrost komórek szczepu KB2 pre-inkubowanego z fenolem. W obecności 1,4-dioksanu jako jedyne źródła węgla

Fig. 8. The growth of KB2 cells pre-incubated with phenol. 1,4-dioxane was a the only carbon source

Powstało wiele prac dotyczących rozkładu 1,4-dioksanu (tab. 1), które dowodzą, że związek ten może być rozkładany przez bakterie albo jako samodzielny substrat, albo w układzie kometabolicznym z innymi związkami, dlatego też gdy wcześniejsze badania wykazały, że *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, nie ma zdolności do wykorzystania 1,4-dioksanu jako źródła węgla, przeprowadzono próby kometabolicznego rozkładu testowanego związku w obecności fenolu.

Testy przeprowadzone w kolbach wykazały wzrost absorbancji, a co za tym idzie liczby komórek KB2, gdy do hodowli dodawany był zarówno fenol jak i 1,4-dioksan. Po pierwszym tygodniu hodowli (rys. 9A) znacząco zwiększono dawkę fenolu (rys. 9B) do ilości dodawanej standartowo w czasie hodowli badanego szczepu z fenolem jako jedynym źródłem węgla (z 500 μ l do 2500 μ l fenolu). Jednocześnie analizy chromatograficzne pozwoliły stwierdzić, że o ile fenol był degradowany zupełnie po każdej kolejnej dawce, o tyle 1,4-dioksan pozostawał w hodowli, a jego stężenie wzrastało wraz z kolejno wprowadzаныmi dawkami.



Rys. 9. Wzrost komórek szczepu KB2 pre-inkubowanego z fenolem. Fenol i 1,4-dioksan stanowiły źródło węgla (A) i po pierwszym pasażu (B).

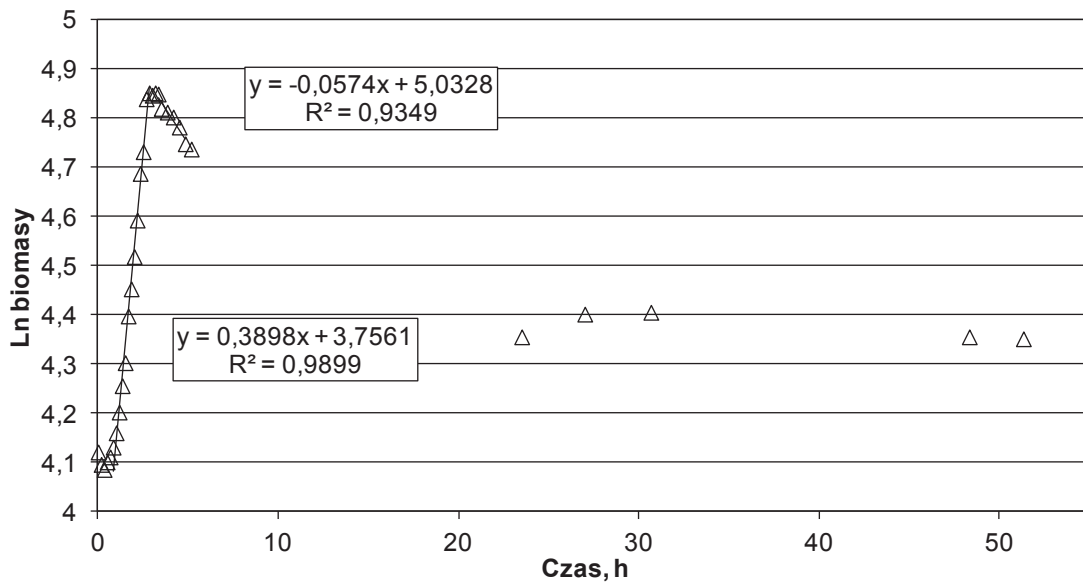
Fig. 9. The growth of KB2 cells pre-incubated with phenol. 1,4-dioxane and phenol was added every 24 h to the culture (A) and after first passage (B).

Przeprowadzono wstępne badania wpływu 1,4-dioksanu na rozkład fenolu w reaktorze okresowym przez różne szczepy bakterii. Badania przeprowadzono dla różnych stężeń początkowych fenolu i 1,4-dioksanu. Dla każdego eksperymentu, na podstawie krzywej wzrostu biomasy, wyznaczono właściwą szybkość wzrostu z nachylenia prostej na półlogarytmicznym wykresie zależności stężenia biomasy od czasu hodowli. Analizowana była faza wzrostu wykładniczego, podczas której właściwa szybkość wzrostu mikroorganizmów jest stała (rys. 10, 12, 14, 16).

Stwierdzono, że w momencie całkowitego wyczerpania fenolu w reaktorze kończyła się również faza wzrostu. Podobne zjawisko można było zaobserwować w przypadku, gdy fenol był jedynym źródłem węgla w hodowli. Po wyczerpaniu się fenolu obserwowano pojawienie się fazy zamierania, czyli takiego okresu w hodowli, kiedy część populacji staje się pokarmem dla innych komórek. Dla przeprowadzanych pomiarów wyznaczono współczynnik zamierania komórek (k_d) (rys. 10, 12, 14, 16) opisanego zależnością:

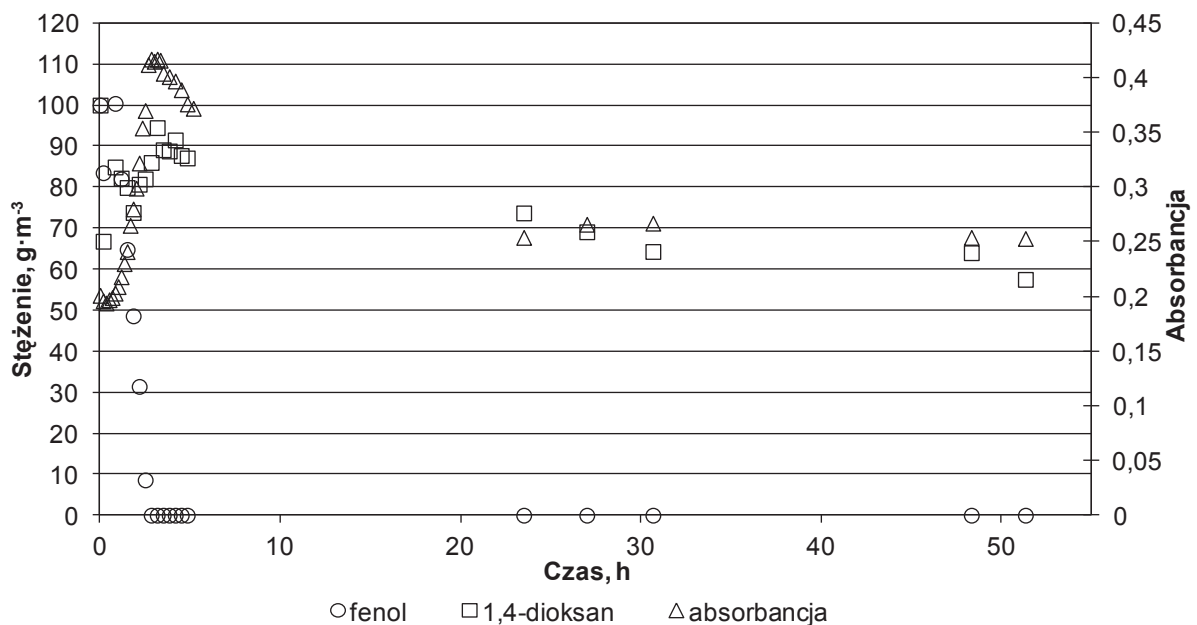
$$\frac{dX}{dt} = -k_d X$$

Na rysunkach 11, 13, 15 i 17 przedstawiono zmiany stężeń substratów oraz biomasy w czasie trwania eksperymentów. We wszystkich przeprowadzanych eksperymentach fenol ulegał całkowitej degradacji, podczas gdy 1,4-dioksan pozostawał w mieszaninie reakcyjnej.



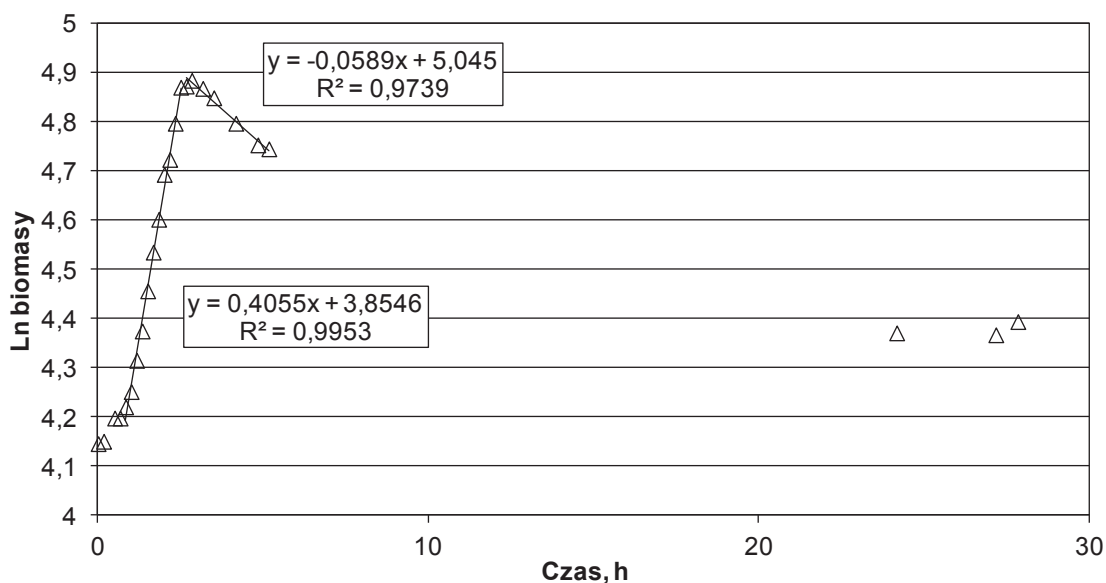
Rys. 10. Wyznaczenie właściwej szybkości wzrostu z półlogarytmicznego wykresu zależności stężenia biomasy od czasu (stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioksan - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$) oraz współczynnika zamierania

Fig. 10. Estimation of specific growth rate from the semi-logarithmic plot of biomass concentration versus time (for phenol $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioxane $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$). Evaluation of decay coefficient



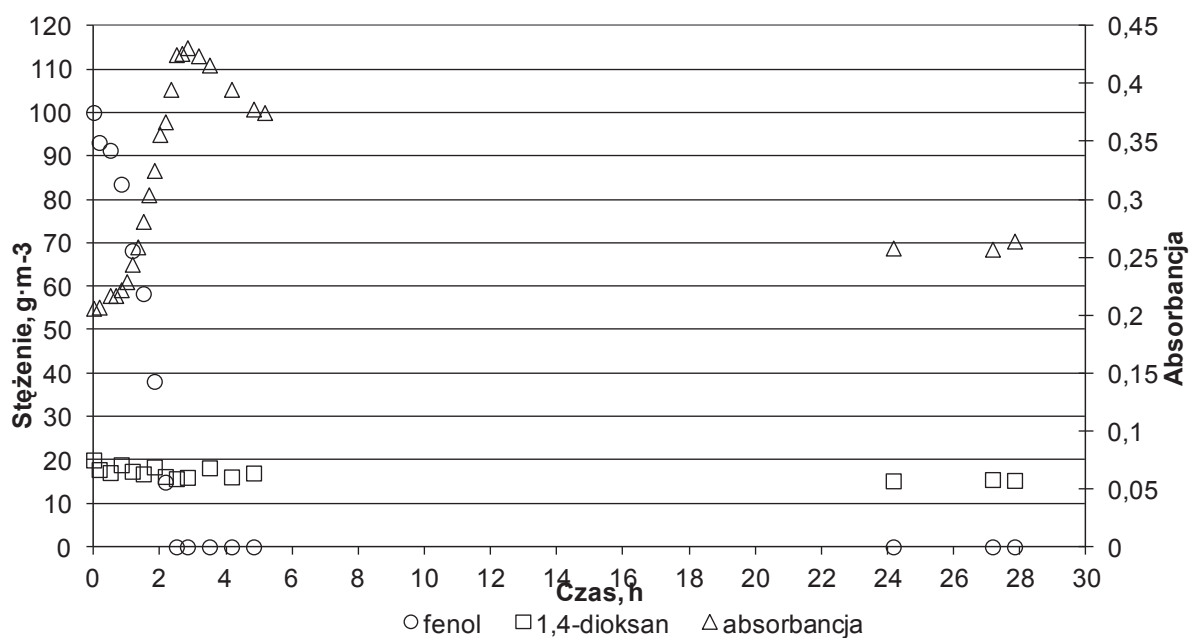
Rys. 11. Zmiany stężeń fenolu i 1,4-dioksanu. Stężenia początkowe: fenol- $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ i 1,4-dioksan - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$

Fig. 11. The variation of biomass, phenol and 1,4-dioxane concentration versus time



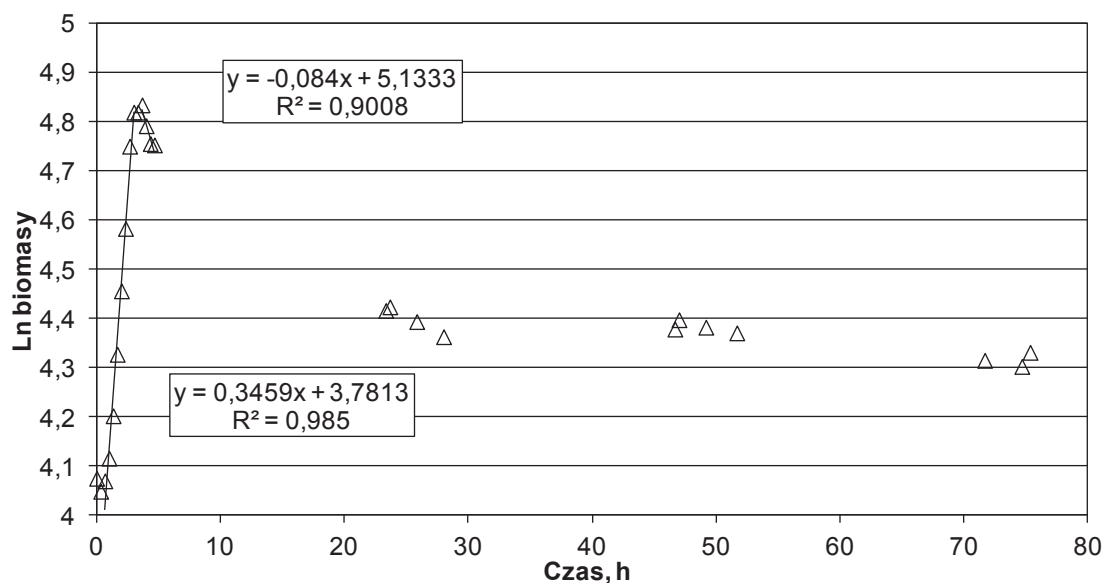
Rys. 12. Wyznaczenie właściwej szybkości wzrostu z półlogarytmicznego wykresu zależności stężenia biomasy od czasu (stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioksan - $S_0 = 20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$) oraz współczynnika zamierania

Fig. 12. Estimation of specific growth rate from the semi-logarithmic plot of biomass concentration versus time (for phenol $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioxane $S_0 = 20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$). Evaluation of decay coefficient



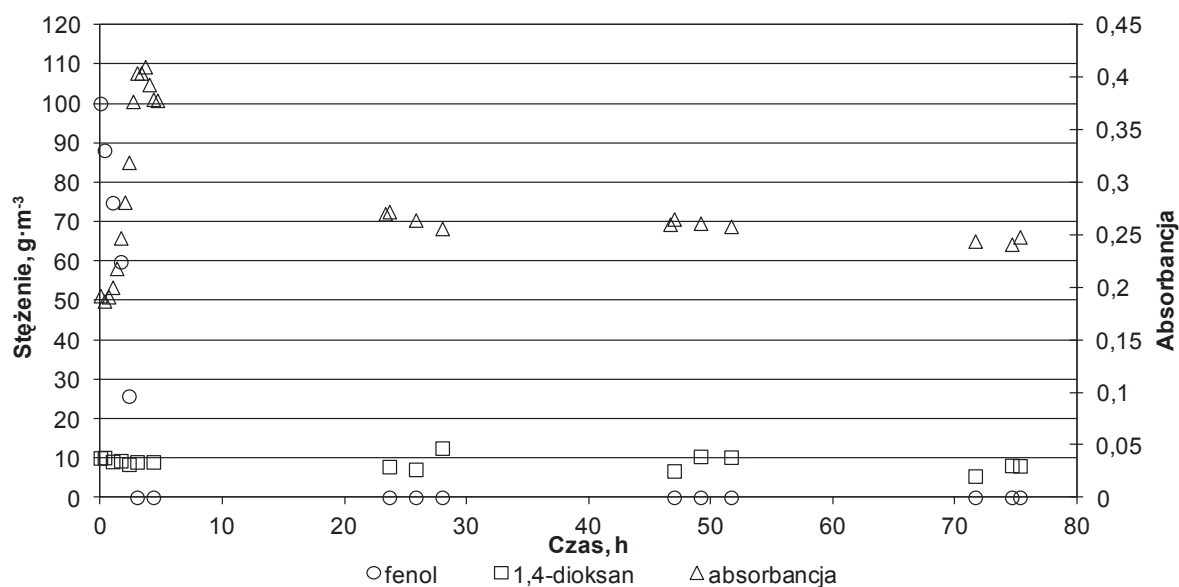
Rys. 13. Zmiany stężeń fenolu i 1,4-dioksanu. Stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ i 1,4-dioksan - $S_0 = 20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$

Fig. 13. The variation of biomass, phenol and 1,4-dioxane concentration versus time



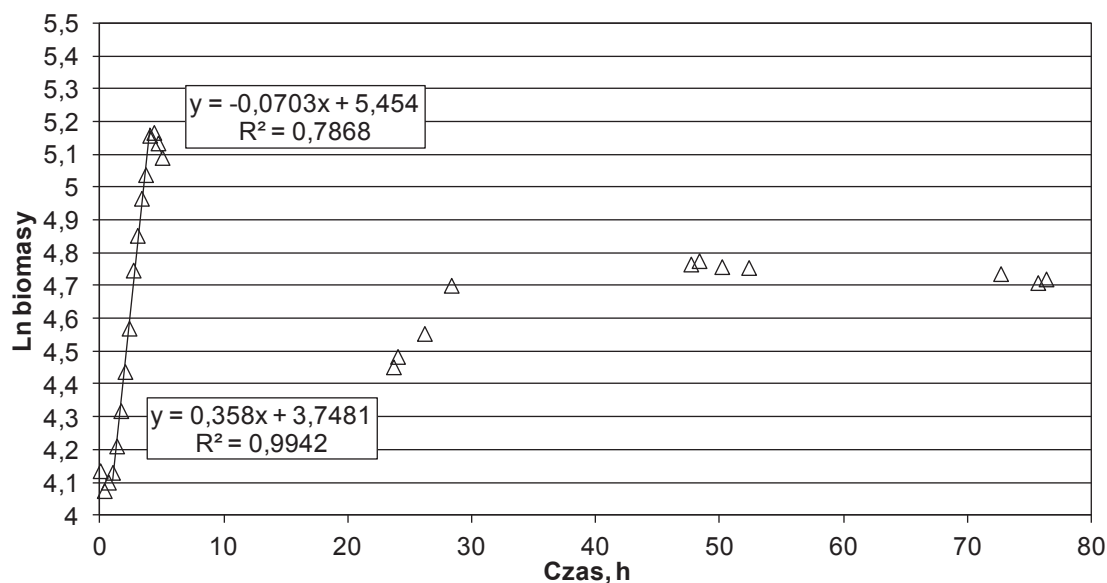
Rys. 14. Wyznaczenie właściwej szybkości wzrostu z półlogarytmicznego wykresu zależności stężenia biomasy od czasu (stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioksan - $S_0 = 10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$) oraz współczynnika zamierania

Fig. 14. Estimation of specific growth rate from the semi-logarithmic plot of biomass concentration versus time (for phenol $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioxane $S_0 = 10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$). Evaluation of decay coefficient



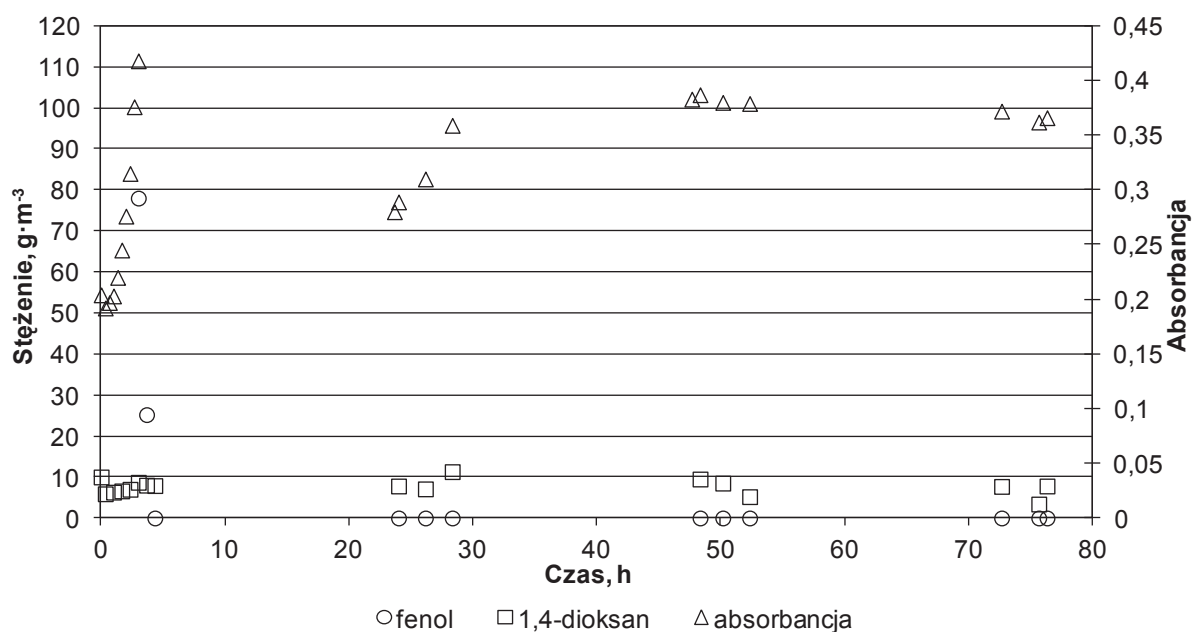
Rys. 15. Zmiany stężeń fenolu i 1,4-dioksanu. Stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ i 1,4-dioksan - $S_0 = 10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$

Fig. 15. The variation of biomass, phenol and 1,4-dioxane concentration versus time



Rys. 16. Wyznaczenie właściwej szybkości wzrostu z półlogarytmicznego wykresu zależności stężenia biomasy od czasu (stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioksan - $S_0 = 10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$) oraz współczynnika zamierania

Fig. 16. Estimation of specific growth rate from the semi-logarithmic plot of biomass concentration versus time (for phenol $S_0 = 200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 1,4-dioxane $S_0 = 10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$). Evaluation of decay coefficient



Rys. 17. Zmiany stężeń fenolu i 1,4-dioksanu. Stężenia początkowe: fenol - $S_0 = 200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ i 1,4-dioksan - $S_0 = 10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$

Fig. 17. The variation of biomass, phenol and 1,4-dioxane concentration versus time

Jak można zaobserwować na podstawie wstępnych badań, właściwa szybkość wzrostu i współczynnik zamierania nie są zależne ani od początkowego stężenia fenolu ani 1,4-dioksanu (tab. 2). Wyniki te wymagają dalszej weryfikacji.

Tabela 2. Właściwa szybkość reakcji dla różnych początkowych stężeń substratów.

Table 2. Specific growth rates for different initial concentrations of substrates.

Fenol S_0 , g·m ⁻³	1,4-dioksan S_0 , g·m ⁻³	μ_m , h ⁻¹	k_d , h ⁻¹
100	100	0,39	-0,0574
100	20	0,41	-0,0589
100	10	0,35	-0,084
200	10	0,358	-0,0703

Właściwa szybkość wzrostu mikroorganizmów w obecności fenolu i 1,4-dioksanu była niższa, niż gdy w hodowli bakteryjnej występował tylko fenol, dla którego μ_m wynosiło 0,5177 h⁻¹ ($S_{0fenolu}=100$ g·m⁻³). Natomiast współczynnik zamierania był nieznacznie większy dla komórek hodowanych w obecności fenolu jako jedyne źródła węgla i wynosił -0,514 h⁻¹ [31].

Przyczyn braku wzrostu bakterii w obecności 1,4-dioksanu może być wiele. Najczęściej wymienianymi w literaturze były brak odpowiednich enzymów szlaku rozkładu 1,4-dioksanu lub brak zdolności efektywnego przetwarzania metabolitów powstających w wyniku degradacji 1,4-dioksanu. Jako najbardziej toksyczny produkt pośredni wymieniany był kwas 2-hydroksyetylooctowy (2-HEAA), który akumulował się w komórkach uniemożliwiając ich wzrost [25, 33]. Vainberg i współpracownicy [33] opisali szczep *Pseudonocardia* sp. ENV478 zdolny do degradacji 1,4-dioksanu z szybkością początkową szacowaną na 21 mg dioksanu·h⁻¹·g TSS⁻¹. Okazało się jednak, że szczep ten nie miał zdolności wzrostu w obecności 1,4-dioksanu, co spowodowane było najprawdopodobniej pojawieniem się w komórkach toksycznego 2-HEAA, który nie był transformowany w kolejne produkty pośrednie.

Jednym z opisywanych w literaturze szczepów degradujących 1,4-dioksan był *Pseudonocardia dioxanovirans* CB1190, u którego potwierdzono obecność monooksygenazy. Maksymalna właściwa szybkość wzrostu, w zależności od autora pracy, wynosiła 2,4 (dzień⁻¹) lub 0,8 (dzień⁻¹). Wśród produktów rozkładu 1,4-dioksanu potwierdzono obecność 2-HEAA, jednak był on przekształcany w następne produkty pośrednie i nie akumulował się w komórkach [23, 25, 27].

Przeprowadzone testy, mające na celu dobranie mikroorganizmów efektywnie degradujących 1,4-dioksan, pozwoliły stwierdzić, że badane do tej pory szczepy nie mają zdolności wzrostu z 1,4-dioksanem jako źródłem węgla, co jest warunkiem niezbędnym do stworzenia modelu kinetycznego reakcji. Obecnie prowadzone są eksperymenty, które pozwolą określić, czy szczepy *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 i *Pseudomonas* sp. E-93486 są zdolne do wykorzystania tetrahydrofuranu (THF) jako źródła węgla i czy możliwy będzie rozkład 1,4-dioksanu w układzie kometabolicznym z tetrahydrofuranem jako substratem wzrostowym.

WNIOSKI

- Analiza danych literaturowych wykazała występowanie szczepów zdolnych do transformacji 1,4-dioksanu jako jedyne go źródła węgla lub w układzie kometa-bolicznym.
- Istnieją dwa podstawowe szlaki rozkładu 1,4-dioksanu – w jednym głównym produktem jest kwas 2-hydroksyetoksyoctowy, w drugim 1,4-dioksan-2-ol i gli-kol etylenowy.
- Obecność głównego enzymu szlaku przemian 1,4-dioksanu w komórkach bakte-ryjnych – monooksygenazy – może być konstytutywna lub wymagać indukcji.
- Przebadane w niniejszym opracowaniu szczepy: *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Rhodococcus erythropolis* KB4, *Pseudomonas* sp. E-93486 oraz *Pseudo-monas putida* mt-2 nie mają zdolności wykorzystania 1,4-dioksanu jako źródła węgla i energii.
- Żaden z badanych substratów (1,4-dioksan, toluen, fenol) nie jest induktorem monooksygenazy, która umożliwiłaby transformację 1,4-dioksanu.
- Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 nie degradowuje 1,4-dioksanu w ukła-dzie kometabolicznym z fenolem jako substratem wzrostowym.
- Obecność 1,4-dioksanu w hodowli bakteryjnej powoduje obniżenie właściwej szybkości wzrostu dla stężenia początkowego fenolu wynoszącego $100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$.

OZNACZENIA – SYMBOLS

S_0	– stężenie początkowe substratu, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ growth substrate concentration
k_d	– współczynnik zamierania, h^{-1} decay coefficient
K_i	– stała inhibicji, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ inhibition constant
K_s	– stała półnasylenia, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ half saturation constant
R^2	– współczynnik korelacji correlation rate
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
TSS	– całkowita masa cząsteczek zawieszonych total suspended solids
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	– współczynnik wydajności growth rate
λ	– długość fali wave length
μ_m	– parametr w modelu wzrostu, h ⁻¹ parameter in growth model

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE – REFERENCES

- [1] Abe A., 1999. Distribution of 1,4-dioxane in relation to possible sources in the water environment. *Sci. Total Environ.*, 227, 41-47.
- [2] Arulazhagan P., Yeom I.T., Sivaraman C., Srikanth M., Rajesh Banu J., 2013. Role of nutrients on biodegradation of 1,4 dioxane by a bacterial consortium enriched from industrial sludge. *Adv. Environ. Biol.*, 7(9), 2081-2090.
- [3] Black R.E., Hurley F.J., Havery D.C., 2001. Occurrence of 1,4-dioxane in cosmetic raw materials and finished cosmetic products. *J. AOAC Int.*, 84(3), 666-670.
- [4] Chen D.Z., Jin X.J., Chen J., Ye J.X., Jiang N.X., Chen J.M., 2016. Intermediates and substrate interaction of 1,4-dioxane degradation by the effective metabolizer *Xanthobacter flavus* DT8. *Int. Biodeterior. Bioder.*, 106, 133-140. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.09.018.
- [5] Criddle C.S., 1993. The kinetics of cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 1048-1056.
- [6] Deng D., Li F., Wu C., Li M., 2018. Synchronic biotransformation of 1,4-dioxane and 1,1-dichloroethylene by a gram-negative propanotroph *Azoarcus* sp. DD4. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 5, 526-532. doi: 10.1021/acs.estlett.8b00312.
- [7] Fuh C.B., Lai M., Tsai H.Y., Chang C.M., 2005. Impurity analysis of 1,4-dioxane in nonionic surfactants and cosmetics using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1071(1-2), 141-145. doi: 10.1016/j.chroma.2004.09.012.
- [8] Greń I., Gąszczak A., Szczyrba E., Łabużek S (2009) Enrichment, isolation and susceptibility profile to the growth substrate of bacterial strains able to degrade vinyl acetate. *Pol J Environ Stud* 18:383-390 .
- [9] Greń I., Wojcieszńska D., Guzik U., Perkosz M., Hupert-Kocurek K. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:289-295. DOI: 10.1007/s11274-009-0172-6.
- [10] Hand S., Wang B., Chu K.H., 2015. Biodegradation of 1,4-dioxane: Effects of enzyme inducers and trichloroethylene. *Sci. Total Environ.*, 520, 154-159. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.031.
- [11] Hatzinger P.B., Banerjee R., Rezes R., Streger S.H., McClay K., Schaefer C.E., 2017. Potential for cometabolic biodegradation of 1,4-dioxane in aquifers with methane or ethane as primary substrates. *Biodegradation*, 28(5-6), 453-468. doi: 10.1007/s10532-017-9808-7.
- [12] He Y., Mathieu J., da Silva M.L.B., Li M., Alvarez P.J.J., 2018. 1,4-Dioxane-degrading consortia can be enriched from uncontaminated soils: prevalence of *Mycobacterium* and soluble di-iron monooxygenase genes. *Microb. Biotechnol.*, 11(1), 189-198. doi: 10.1111/1751-7915.12850.
- [13] Horvath R.S., 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.*, 36(2), 146-155.
- [14] Huang H., Shen D., Li N., Shan D., Shentu J., Zhou Y.Y., 2014. Biodegradation of 1,4-dioxane by a novel strain and its biodegradation pathway. *Water Air Soil Pollut.*, 225(9), 2135-2146. doi: 10.1007/s11270-014-2135-2.
- [15] Inoue D., Tsunoda T., Sawada K., Yamamoto N., Saito Y., Sei K., Ike M., 2016. 1,4-Dioxane degradation potential of members of the genera *Pseudonocardia* and *Rhodococcus*. *Biodegradation*, 27, 277-286. doi: 10.1007/s10532-016-9772-7.

- [16] Inoue D., Tsunoda T., Yamamoto N., Ike M., Sei K., 2018. 1,4-Dioxane degradation characteristics of *Rhodococcus aetherivorans* JCM 14343. *Biodegradation*, 29(3), 301-310. doi: 10.1007/s10532-018-9832-2.
- [17] Isaka K., Udagawa M., Kimura Y., Sei K., Ike M., 2016. Biological 1,4-dioxane wastewater treatment by immobilized *Pseudonocardia* sp. D17 on lower 1,4-dioxane concentration. *J. Water Environ. Technol.*, 14(4), 289-301. doi: 10.2965/jwet.15-084.
- [18] Juhász M.L.W., Marmur E.S., 2014. A review of selected chemical additives in cosmetic products. *Dermatol. Ther.*, 27(6), 317-322. doi: 10.1111/dth.12146.
- [19] Karges U., Backer J., Püttmann W., 2018. 1,4-Dioxane pollution at contaminated groundwater sites in western Germany and its distribution within a TCE plume. *Sci. Total Environ.*, 619-620, 712-720. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.043.
- [20] Kim Y.M., Jeon J.R., Murugesan K., Kim E.J., Chang Y.S., 2009. Biodegradation of 1,4-dioxane and transformation of related cyclic compounds by a newly isolated *Mycobacterium* sp. PH-06. *Biodegradation*, 20(4), 511-519. doi: 10.1007/s10532-008-9240-0.
- [21] Kohlweyer U., Thieme B., Schröder T., Andreesen J.R., 2000. Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186(2), 301-306. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09121.x.
- [22] Lee K.H., Park D.R., Lee Y.J., Jun M.H., Yeom I.T., 2015. A study on biodegradation of 1,4-dioxane using mixed consortium of bacteria. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Technol.*, (IJASEAT), 3, 18-19.
- [23] Mahendra S., Alvarez-Cohen L., 2006. Kinetics of 1,4-dioxane biodegradation by monooxygenase-expressing bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 40(17), 5435-5442. doi: 10.1021/es060714v.
- [24] Mahendra S., Grostern A., Alvarez-Cohen L., 2013. The impact of chlorinated solvent co-contaminants on the biodegradation kinetics of 1,4-dioxane. *Chemosphere*, 91(1), 88-92. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.104.
- [25] Mahendra S., Petzold C.J., Baidoo E.E., Keasling J.D., Alvarez-Cohen L., 2007. Identification of the intermediates of in vivo oxidation of 1,4-dioxane by monooxygenase-containing bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 41(21), 7330-7336. doi: 10.1021/es0705745.
- [26] Matsui R., Takagi K., Sakakibara F., Abe T., Shiiba K., 2016. Identification and characterization of 1,4-dioxane-degrading microbe separated from surface seawater by the seawater-charcoal perfusion apparatus. *Biodegradation*, 27(2-3), 155-163. doi: 10.1007/s10532-016-9763-8.
- [27] Parales R.E., Adamus J.E., White N., May H.D., 1994. Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12), 4527-4530.
- [28] Sei K., Miyagaki K., Kakinoki T., Fukugasako K., Inoue D., Ike M., 2013. Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source. *Biodegradation*, 24(5), 665-674. doi: 10.1007/s10532-012-9614-1.
- [29] Sei K., Oyama M., Kakinoki T., Inoue D., Ike M., 2013. Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation. *J. Water Environ. Technol.*, 11(1), 11-19. doi: 10.2965/jwet.2013.11.
- [30] Sun B., Ko K., Ramsay J.A., 2011. Biodegradation of 1,4-dioxane by a *Flavobacterium*. *Biodegradation*, 22(3), 651-659. doi: 10.1007/s10532-010-9438-9.
- [31] Szczyrba E., Kaleta A., Szczotka A., Bartelmus G., 2015. Kinetyka biodegradacji fenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w reaktorze okresowym. *Prace naukowe ICh PAN*, 19, 5-19.
- [32] Tahara M., Obama T., Ikarashi Y., 2013. Development of analytical method for determination of 1,4-dioxane in cleansing products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 35(6), 575-580. doi: 10.1111/ics.12079.
- [33] Vainberg S., McClay K., Masuda H., Root D., Condee C., Zylstra G.J., Steffan R.J., 2006. Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia* sp. strain ENV478. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8), 5218-5224. doi: 10.1128/AEM.00160-06.

- [34] Water Research Foundation (2014). 1,4-dioxane white paper. Denver, Colorado.
- [35] Yamamoto N., Saito Y., Inoue D., Sei K., Ike M., 2018. Characterization of newly isolated *Pseudonocardia* sp. N23 with high 1,4-dioxane-degrading ability. *J. Biosci. Bioeng.*, 125(5), 552-558. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.005.
- [36] Zenker M.J., Borden R.C., Barlaz M.A., 2000. Mineralization of 1,4-dioxane in the presence of a structural analog. *Biodegradation*, 11(4), 239-246. doi: 10.1023/A:1011156924700.
- [37] Zhang S., Gedalanga P.B., Mahendra S., 2017. Advances in bioremediation of 1,4-dioxane-contaminated waters. *J. Environ. Manage.*, 204, 765-774. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.05.033.
- [38] Zhou Y.Y., Huang H., Shen D., 2016. Multi-substrate biodegradation interaction of 1,4-dioxane and BTEX mixtures by *Acinetobacter baumannii* DD1. *Biodegradation*, 27(1), 37-46. doi: 10.1007/s10532-015-9753-2.
- [39] <http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=r&reacID=r0696>.

ELŻBIETA SZCZYRBA, HANNA KOLARCZYK, AGNIESZKA GĄSZCZAK, GRAŻYNA BARTELMUS

DESIGNING OF COMETABOLIC MICROBIAL DEGRADATION OF 1,4-DIOXANE

1,4-dioxane is an organic compound widely used in various industrial processes. It is a known solvent stabilizer especially for chlorinated solvents. This compound is also an undesired by-product of many industrial processes, like manufacturing of polyester for example. 1,4-dioxane is a colorless, cyclic ether which was classified by the US Environmental Protection Agency and International Agency for Research on Cancer as a probable human carcinogen. Because of its chemical properties, 1,4-dioxane is highly water miscible and low volatile xenobiotic, that's why ones released to the environment remain there for a long time. Different remediation strategies were used to remediate 1,4-dioxane contamination, but the biological methods seem to be most appropriate because of their economic and environmental advantages. 1,4-dioxane seems to be a very interesting subject for researchers. Different bacterial strains were tested to check their ability of this compound degradation. Major strategies of 1,4-dioxane's degradation by microorganisms could be divided into two main groups: metabolism and cometabolism. Metabolism is connected with using carbon from degraded contaminant as a carbon and energy source. To this group of microorganisms belong: *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190, *Mycobacterium* sp. PH-06 *Acinetobacter baumannii* DD1 and *Xanthobacter flavus* DT8. Cometabolism is a transformation process of a non-growth substrate in the presence of another source of carbon and energy (growth substrate). The carbon from co-substrate transformation cannot be incorporated into cells structures and also energy from this process is not used for growth or cells maintain. The cometabolism is possible thanks to non-specificity of enzymes of growth substrates, which can transform a wide range of compounds not only this one, for which it was synthesized. Therefore, competitive inhibition could be observed between growth and non growth substrates. The bacterial strains described previously which can degraded 1,4-dioxane by cometabolism were: *Pseudonocardia* sp. ENV478, *Rhodococcus ruber* T1, *Rhodococcus ruber* T5 and mixed cultures.

The most important enzyme taking part in 1,4-dioxane degradation was monooxygenase. This enzyme could exist in cells constitutively or require induction by chemical compounds. Common inducers of 1,4-dioxane monooxygenase except 1,4-dioxane itself were: THF, toluene, methane and propane.

The authors of previous works suggest that there were two main degradation pathway of 1,4-dioxane. The major product of this compound decomposition were identified in the first degradation pathway as 2-hydroxyethoxyacetic acid and in the second one: 1,4-dioxane-2-ol and ethylene glycol.

The subject of the analysis presented in this study was to test different bacterial strains if they have the ability of 1,4-dioxane degradation. *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Rhodococcus erythropolis*

KB4, *Pseudomonas* sp. E-93486 and *Pseudomonas putida* mt-2 were the examined for their 1,4-dioxane degradation ability. That strains were proven in previous works, that they use monooxygenase to degrade some organic compounds. Because none of examined strains show 1,4-dioxane degradation ability, the inducibility of monooxygenase by toluene was tested but experiments reveal that 1,4-dioxane monooxygenase cannot be induced by toluene in that microorganisms. Also, cometabolic degradation of 1,4-dioxane by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 was tested with the phenol as the growth substrate. Unfortunately, the results show that strain KB2 did not transform 1,4-dioxane in cometabolic process with phenol as the source of carbon and energy. The effect of 1,4-dioxane on phenol degradation was observed. The presence of 1,4-dioxane in the reaction mixture causes a slight decrease of the specific growth rate of bacteria compared to the obtained results when phenol was added alone. The biodegradation tests of 1,4-dioxane require continuation with other bacterial strains.

Received: 8.11.2019

Accepted: 3.12.2019