

ELŻBIETA SZCZYRBA¹, ANNA SZCZOTKA¹, GRAŻYNA BARTELMUS¹, AGNIESZKA GĄSZCZAK¹, IZABELA GREŃ², HANNA KOLARCZYK¹

KOMETABOLICZNA BIODEGRADACJA 4-CHLOROFENOLU PRZEZ SZCZEP *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* KB2

1. Instytut Inżynierii Chemicznej PAN Gliwice, ul. Bałtycka 5, 44-100 Gliwice
2. Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

W pracy badano biodegradację 4-chlorofenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w układzie kometabolicznym z fenolem jako substratem wzrostowym. Eksperymenty prowadzono w reaktorze okresowym, w temperaturze 30°C, przy pH środowiska 7 i natlenieniu rzędu 5–7 mg_{tlenu}·l⁻³. Zmieniając w szerokim zakresie początkowe stężenia fenolu (50 do 300 g·m⁻³) i 4-chlorofenolu (25 do 100 g·m⁻³) analizowano wpływ zmian stężeń obu substratów na szybkość ich transformacji i wzrost biomasy. Oszacowano również wartości współczynnika wydajności transformacyjnej substratu wzrostowego (*W*) oraz współczynnika *f*, wskazującego, jaka część równoważników redukcyjnych z utlenienia fenolu została użyta do transformacji 4-chlorofenolu.

Słowa kluczowe: kometabolizm, fenol, chlorofenol

The cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain in the presence of phenol as the sole carbon and energy source was studied. The experiments were carried out in a batch bioreactor. The tests were conducted at 30°C, pH 7 and oxygenation maintained at the level of 5–7 mg·l⁻³. The effect of changes in initial concentration of both substrates on the rate of biomass growth and substrates transformation were analyzed. The initial concentration of phenol was changed within the range of 50–300 g·m⁻³ and 4-chlorophenol within the range of 25–100 g·m⁻³. The values of growth substrate transformation yield (*W*) and the *f* coefficient, indicating the fraction of reductant from phenol oxidation used to transform 4-chlorophenol, were also estimated.

Keywords: cometabolism, phenol, chlorophenol

1. WPROWADZENIE

Zdobycze cywilizacyjne poprawiły warunki życia ludzi, lecz jednocześnie przyczyniły się do wzrostu zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Toksyczne związki przeniknęły do atmosfery, wody i gleby. Od dawna dysponujemy technikami usuwania zanieczyszczeń, wykorzystującymi procesy fizykochemiczne (absorpcja, adsorpcja czy katalityczne utlenianie). Praktyka wykazała jednak, że fizykochemiczne

metody są stosunkowo drogie i mało efektywne, szczególnie przy małych stężeniach zanieczyszczenia w oczyszczanym strumieniu. Przyjaznym dla środowiska naturalnego rozwiązaniem jest zastosowanie technologii opartych na metodach biologicznych, które są stosunkowo tanie i nie generują toksycznych, wtórnych produktów pośrednich [1].

Chlorowane związki organiczne stanowią jedną z głównych grup zanieczyszczeń środowiska. Ze względu na toksyczność, jaką wykazują nawet w niewielkich stężeniach oraz zdolność do bioakumulacji, zostały one zakwalifikowane jako zanieczyszczenia pierwszej kategorii i umieszczone na priorytetowej liście zarówno przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA), Agencję ds. Substancji Toksycznych oraz Rejestru Chorób (ATSDR), jak i Unię Europejską [2, 3]. Przykładem związku o istotnym znaczeniu środowiskowym jest 4-chlorofenol (4-CP). Związek ten jest półproduktem w syntezie insektycydów, herbicydów, konserwantów, środków antyseptycznych i dezynfekujących. Jest on używany również do produkcji leków, barwników, środków zapachowych, jako rozpuszczalnik przy ekstrakcji związków siarki i azotu z węgla oraz selektywny rozpuszczalnik w procesach rafinacji olejów mineralnych [4, 5]. Dawniej stosowany był powszechnie jako środek dezynfekujący i antyseptyczny, dzisiaj jego rolę przejęły inne substancje [6]. Jego obecność w środowisku jest głównie wynikiem chlorowania ścieków, procesów bielenia w przemyśle tekstylnym i papierniczym oraz rozpadu fenoksyherbicydów [7]. Wody pochodzące z tych przemysłów są bogate w rozpuszczalne w wodzie monochlorofenole i niewłaściwe ich traktowanie może skazić gleby i wody podziemne. 4-chlorofenol jest toksyczny przede wszystkim dla układu nerwowego, przyczyniając się do demielinizacji włókien nerwowych oraz obniżenia stężenia wszystkich neuroprzekazników. Badania przeprowadzone na zwierzętach potwierdziły również jego toksyczny wpływ na narządy wewnętrzne, w tym działanie hepatotoksyczne [2, 4, 8]. Jego obecność w wodzie jest wyczuwalna już przy stężeniach rzędu ppb, nadając jej nieprzyjemny smak i zapach (próg smakowy to $\sim 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, zapachowy $\sim 33 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) [2].

Wiele związków aromatycznych obecnych w środowisku łatwo ulega biodegradacji przez mikroorganizmy, jednak ich chlorowcopochodne są bardziej trwałe i często toksyczne dla większości mikroorganizmów [9]. W literaturze można znaleźć informacje na temat mikrobiologicznego rozkładu chlorofenoli, zarówno na drodze tlenowej, jak i beztlenowej, prowadzonego zarówno przez bakterie, jak i grzyby. Jednak tylko nieliczne mikroorganizmy są w stanie wykorzystać je jako jedyne źródło węgla i energii [6, 10], najczęściej są one transformowane w procesach kometabolicznych.

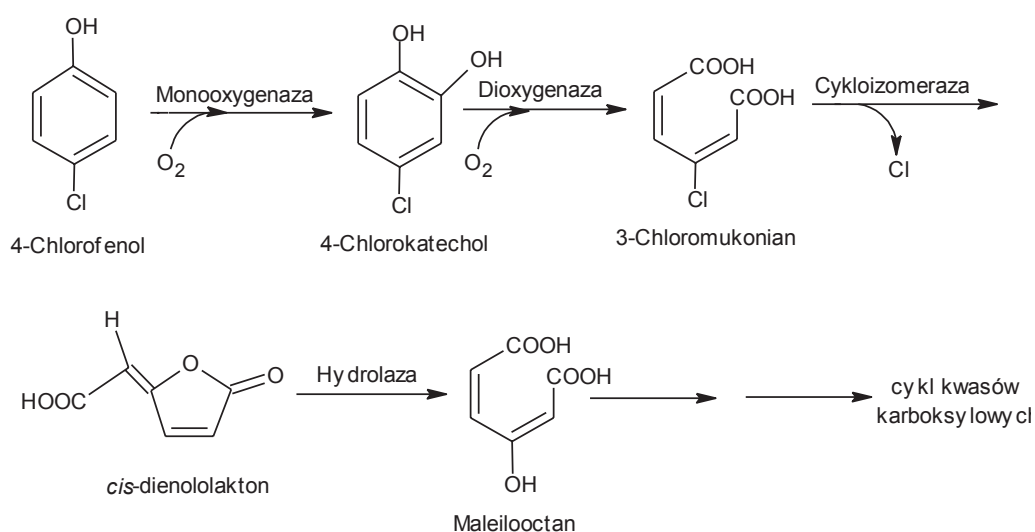
Criddle [11], powołując się na pracę Horvatha [12], definiuje kometabolizm jako transformację niewzrostowego substratu, która zachodzić może zarówno w obecności substratu wzrostowego, jak i w hodowlach komórek w fazie spoczynku (ang. resting cells), lecz aktywnych metabolicznie, nie zawierających substratu wzrostowego [13]. Mianem substratu wzrostowego określane jest donor elektronów, który zapewnia

zdolność redukcyjną oraz energię dla wzrostu mikroorganizmów i podtrzymania ich funkcji życiowych (przemiany podstawowej). Substrat wzrostowy indukuje wiele kometabolicznych enzymów i kofaktorów, chociaż wiele kometabolicznych czynników może być indukowanych przez inne czynniki, lub mogą być produkowane konstytucyjnie. Z kolei transformacja substratu niewzrostowego w ogóle nie dostarcza węgla i energii do wzrostu komórek (jest on wówczas nazywany kometabolitem) albo też zapewnia je w niedostatecznych ilościach. Główne czynniki, warunkujące dość powszechne występowanie kometabolizmu wśród mikroorganizmów, to szeroka specyficzność substratowa enzymów, odpowiedzialnych za kometaboliczne reakcje oraz obecność kofaktorów, będących uniwersalnymi źródłami elektronów, takich jak NAD(P)H i FADH₂. W związku z tym substraty niewzrostowe, które są strukturalnie podobne do substratów wzrostowych, mogą wiązać się z enzymami odpowiedzialnymi za ich metabolizm i ulegać transformacji poprzez ich niespecyficzną aktywność. W szczególności dotyczy to enzymów utleniających (oksygenaz) [14]. Ponieważ aktywne miejsca enzymów, które katalizują kometaboliczne reakcje mogą reagować zarówno z substratem wzrostowym, jak i szeroką gamą kometabolitów, stąd pomiędzy substratami wystąpić może inhibicja kompetycyjna, której wynikiem jest obniżenie szybkości transformacji każdego z nich [15]. Rolę substratów wzrostowych mogą pełnić także substancje nie będące strukturalnymi analogami kometabolitów, ale należące do grupy łatwo przyswajalnych źródeł węgla, np. cukry proste czy aminokwasy. Poza podtrzymywaniem wzrostu komórek, taki substrat wzrostowy indukuje kofaktory, niezbędne do przebiegu reakcji kometabolicznych.

Termin kometabolizm jest tradycyjnie stosowany dla procesów utleniania, jednak wiele procesów redukcji również z powodzeniem można opisać za pomocą przedstawionej powyżej definicji. Wiele związków, zawierających jeden-/dwa chlorowane węgle, jest koredukowanych przez bakterie redukujące siarczany (VI), bakterie metanogenne, fakultatywne anaeroby, acetobakterie i clostridia.

Kinetyka kometabolicznych przemian może być czynnikiem limitującym w procesach bioremediacji. Stąd odpowiednie wyrażenia matematyczne, opisujące te zjawiska, są kluczowe dla opisanie szybkości procesu, w którym substancje, często bardzo szkodliwe dla środowiska, są utylizowane w drodze kometabolizmu. Tym bardziej, że kinetyka tych przemian jest często bardzo złożona, a co za tym idzie trudna do opisanie.

Przedmiotem badań niniejszej pracy był kometaboliczny rozkład 4-chlorofenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w obecności fenolu jako łatwego do mineralizacji substratu wzrostowego oraz analiza interakcji pomiędzy obydwoma substratami.



Rys. 1. Zmodyfikowany szlak *orto* biodegradacji 4-CP [10]
 Fig. 1. 4-CP degradation via modified *orto* cleavage pathway [10]

Wybór fenolu jako substratu wzrostowego wydaje się być rozwiązaniem optymalnym. Reakcje enzymatyczne, składające się na szlak rozkładu fenolu, można zgrupować w trzy kluczowe etapy degradacyjne. Pierwszy związany jest z utlenieniem wyjściowej struktury związku aromatycznego, z udziałem monoooksygenazy fenolowej, do centralnego metabolitu, tj. katecholu. Drugi etap obejmuje reakcje rozszczepienia struktury aromatycznej z wykorzystaniem dioksygenaz, a trzeci dalsze przemiany produktów rozszczepienia do intermediatów cyklu Krebsa [16]. Szlak rozkładu 4-chlorofenolu [17] i fenolu [18] cechuje duże podobieństwo enzymów, a istotną różnicą w specyficzności enzymów, uczestniczących w rozkładzie chlorowanej struktury aromatycznej, jest zdolność do przemiany związków zawierających podstawnik chlorowy lub zdolność do jego usuwania. Na rysunku 1 przedstawiono zmodyfikowany mikrobiologiczny szlak rozkładu 4-CP. Pierwszym etapem jest reakcja hydroksylacji do kluczowego intermediatu – chlorokatecholu, katalizowana przez monoooksygenazę chlorofenolową [EC 1.14.13], enzym zależny od NADH/NAD(P)H. Następnym etapem jest rozszczepienie pierścienia aromatycznego, katalizowane przez 1,2-dioksygenazę katecholową [EC 1.13.11.1], której produktem jest kwas 3-chloromukonowy. Związek ten jest następnie transformowany przez cykloizomerazę chloromukonianową [EC 5.5.1.7] do *cis*-dienololaktonu z jednoczesną eliminacją jonu Cl⁻ (dehalogenacja). Hydroliza, katalizowana przez hydrolazę dienololaktonową [3.1.1.45] przekształca go do maleilooctanu, który jest następnie przekształcany do intermediatów cyklu TCA [10].

2. KOMETABOLICZNY ROZKŁAD 4-CHLOROFENOLU

W literaturze znaleźć można wiele opracowań, których autorzy badali procesy rozkładu 4-chlorofenolu w układach kometabolicznych, stosując różne mikroorganizmy i różne substraty wzrostowe. W niniejszej pracy skupiono uwagę jedynie na tych opracowaniach, w których substratem wzrostowym był fenol. Związek ten nie tylko łatwo indukuje monooksygenazę, niezbędną do transformacji 4-CP, ale jednocześnie, w wyniku jego utlenienia, uwalniane są elektrony niezbędne do regeneracji NAD(P)H, również zużywanego podczas tej transformacji [19]. Niestety, obydwa substraty, fenol i 4-chlorofenol, hamują wzajemnie szybkość swej biodegradacji. W Tabeli 1 zestawiono ważniejsze dane literaturowe, podając stosowane w badaniach zakresy zmian stężeń obu substratów.

Analiza danych literaturowych, zestawionych w Tabeli 1, wydaje się potwierdzać, że kluczowe dla analizy i zrozumienia interakcji, zachodzących w układzie fenol/4-CP, były prace Saeza i Rittmanna [19], Kima i Hao [14] oraz Wanga i Loha [31, 32, 33].

Saez i Rittmann [19] przeprowadzili eksperymenty dla dwóch wartości początkowego stężenia fenolu, równych $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i $175 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zmieniając początkową dawkę 4-CP. W pierwszej serii wartości stosunku fenol/4-CP były równe 2; 1 i 0,66, natomiast w drugiej 7; 3,5 i 1,75. Jedynie w testach, w których stosunek fenol/4-CP równy był 2; 7 i 3,5 uzyskano całkowitą biodegradację 4-CP, jednak nawet dla najniższych dawek obu substratów (50/25) czas ich rozkładu wynosił 35 godzin dla fenolu i 65 godzin dla 4-CP.

Równoczesna transformacja obu substratów zaczynała się po trwającej ~25 godzin fazie zastoju, przy czym fenol był degradowany znacznie szybciej niż 4-CP. Wyczerpanie fenolu zatrzymywało wzrost bakterii, ale transformacja 4-chlorofenolu trwała dalej, chociaż znacznie wolniej. Wg autorów, parametrem, który wskazuje, czy 4-CP będzie całkowicie zdegradowany, jest wartość stosunku $(4\text{-CP}/X)$, określona w momencie całkowitego wyczerpania fenolu; dla $(4\text{-CP}/X) \leq 0,21$ należy oczekiwać pełnej transformacji kometabolitu, natomiast dla $(4\text{-CP}/X) \geq 0,38$ pozostanie on w hodowli. Wyniki doświadczeń wskazały, że oba substraty współzawodniczą o centrum aktywne monooksygenazy, a utleniony intermediat fenolu może również konkurować z 4-CP o miejsce regulatorowe enzymu.

Tabela 1. Zestawienie danych literaturowych odnoszących się do kometabolicznej transformacji 4-CP z fenolem

Table 1. Comparison of the literature data referring to cometabolic transformation of 4-CP with phenol

Mikroorganizm	Stężenie fenolu, mg·l ⁻³	Stężenie 4-CP, mg·l ⁻³	Temp., °C	Literatura
<i>Burkholderia tropicalis</i>	200	20	33±2	[7]
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	250–700	60	25–29	[9]
<i>Acinetobacter</i>	55–297	23–46,5	30	[14]
<i>Pseudomonas putida</i> PpG4 (ATCC 17453)	50 lub 175	25–100	23–26	[19]
<i>Pseudomonas putida</i> LY1	20–400	15 lub 40	25	[20]
<i>Pseudomonas</i> sp. cbp1-3*	100–600	60–150	30	[21]
<i>Comamonas testosteroni</i> CECT326T	40–180	20 lub 40	30	[22]
<i>Candida tropicalis</i> W1	150	150	b.d.	[23]
<i>Rhodococcus</i> sp. RSP8*	5–1600	5–250	37	[24]
osad czynny	525	105–2100	20–35	[25]
<i>Candida tropicalis</i> CTM2*	0–800	400	30	[26]
<i>Candida tropicalis</i>	100–800	350 lub 420	30	[27]
mieszana kultura bakterii	5–500	10–50	25	[28]
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 49451)	150–300	50–100	30	[29]
<i>Comamonas testosteroni</i> *CPW301	28,2; 56,4; 92,1	38,6; 77,2; 126	30	[30]

* Mikroorganizm może wykorzystywać 4-CP jako jedyne źródło węgla

Jeśli fenol jest utleniany z dostatecznie dużą prędkością, a więc produkowana jest dostatecznie duża ilość katecholu, wówczas 4-CP nie może wiązać się efektywnie z monooksygenazą i w ten sposób zredukowany jest dezaktywujący enzym wpływ 4-CP, ale równocześnie nie jest on transformowany. Jeśli natomiast fenol nie jest dostępny w dostatecznie dużym stężeniu, wówczas 4-CP konkuruje z nim o aktywne miejsce enzymu (inhibicja kompetycyjna). Równie wysoki stosunek obydwu substratów, niezbędny dla ich całkowitej transformacji, wykazali Wang i wsp. [20] dla *Pseudomonas putida* LY1. Efektywna kometaboliczna transformacja 4-CP była możliwa wówczas, gdy stosunek stężeń fenolu i 4-chlorofenolu był nie mniejszy niż 1,25.

Inhibicję kompetycyjną można wyeliminować, jeśli oba substraty będą transformowane przez różne enzymy. Jeśli kometabolit jest zdolny indukować enzymy dla własnej transformacji, wówczas substrat wzrostowy jest odpowiedzialny jedynie za wzrost mikroorganizmów i regenerację kofaktorów.

Wang i Loh [31, 32, 33] badali biodegradację 4-CP z użyciem szczepu *Pseudomonas putida* ATCC 49451 w obecności fenolu oraz dodatkowego źródła węgla. Autorzy stosowali jako dodatkowy substrat wzrostowy glutaminian sodu lub glukozę. Oba substraty wzrostowe spełniały wówczas odmienne funkcje. Specyficzny substrat (fenol) był odpowiedzialny za indukcję enzymów transformacyjnych, natomiast dodatkowy substrat wspomagał wzrost mikroorganizmów, czego konsekwencją była redukcja toksycznego wpływu 4-CP, a tym samym wzrost szybkości jego biodegradacji. Suplementacja hodowli dodatkowym źródłem węgla w postaci glukozy powodowała jednak obniżenie pH roztworu, w wyniku tworzenia się dużych ilości kwaśnych metabolitów (kwas octowy, mlekowy itp.), co źle wpływało na aktywność enzymów transformacyjnych. Również Tobajas i wsp. [22] stosowali dwusubstratowy układ fenol-glukoza w procesie biodegradacji 4-CP. Autorzy wykazali, że dodatek glukozy w ilości $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do roztworu zawierającego $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ fenolu i $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-CP obniża dwukrotnie czas transformacji substratów (z 18 do 9 godzin). Dwukrotne zwiększenie stężenia glukozy nie przyniosło znaczących zmian w szybkości degradacji obu substratów.

Kim i Hao [14] stosowali w badaniach komórki *Acinetobacter* sp. indukowane fenolem. Całkowitą transformację 4-chlorofenolu uzyskiwali wówczas, gdy stosunek fenol/4-CP był większy od 4. Przyczyną tego była prawdopodobnie niedostateczna ilość równoważników redukcyjnych NAD(P)H, otrzymywanych w wyniku utlenienia fenolu. Dwukrotne zwiększenie stężenia 4-CP (z 25 do $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), przy stężeniu fenolu $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, spowodowało dwukrotny wzrost czasu transformacji obu substratów, co świadczy o inibicji kompetycyjnej pomiędzy substratami. Obliczona przez autorów wartość wydajności transformacyjnej, wskazująca, ile gramów fenolu zostało zużyte tylko na transformację 4-CP, wahała się w granicach 0,78–1,57.

Jiang i wsp. [27], w wyniku napromieniowania laserem dzikiego szczepu *Candida tropicalis*, uzyskali mutant, oznaczony symbolem CTM 2. Jego zdolność do wykorzystania 4-chlorofenolu jako jedynego źródła węgla wzrosła z $350 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Badane przez Sinha i wsp. [24] bakterie *Rhodococcus* sp. RSP8 również są w stanie wykorzystać oba substraty, tj. fenol i 4-CP, jako źródło węgla i energii. Gdy są utylizowane wspólnie, obserwuje się silne wzajemne interakcje inhibujące ich transformację. Przedstawiony przegląd ważniejszych danych literaturowych wskazuje, że obecnie badania są ukierunkowane na poszukiwanie mikroorganizmów, które są w stanie efektywnie i w rozsądnym przedziale czasu zdegradować oba substraty oraz znalezienie sposobu zmniejszenia toksyczności obu substratów w stosunku do mikroorganizmów.

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. W badaniach procesu biodegradacji fenolu [34] szczep wykazał wysoką aktywność biodegradacyjną i odporność na inhibitujący jego wzrost wpływ dużych stężeń fenolu. Stąd następnym etapem badań było sprawdzenie jego aktywności w kometabolicznej transformacji 4-chlorofenolu w obecności fenolu. Szczep przechowywany był na skosach agarowych w temperaturze 4°C.

Skład pożywki mineralnej, w której hodowano bakterie i prowadzono badania przedstawiony został we wcześniejszym opracowaniu [34].

Badania prowadzono w bioreaktorze Biostat B firmy Sartorius (USA) o objętości roboczej 2,7 dm³ (objętość hodowli 1,5 dm³). Aparat wyposażony był w czujnik temperatury, elektrody pH i pO₂. Badania prowadzono w środowisku o odczynie pH 7, w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 300 rpm, utrzymując natlenienie roztworu na poziomie 5–7 mg·l⁻¹.

Stężenie mikroorganizmów oznaczano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr HACH 3900), mierząc absorbancję próbek zawiesiny przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Przed rozpoczęciem badań przygotowano krzywe wzorcowe, umożliwiające przeliczenie absorbancji na stężenie suchej masy komórek.

Zmiany stężenia substratu wzrostowego (fenol) i niewzrostowego (4-CP) 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 ODS2, 5 μ m, 150×4,6 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⁻¹. Detekcję prowadzono przy długości fali $\lambda = 272$ nm. Przed analizą pobrane z biostatu próbki odwirowywano, odfiltrowywano w filtrze strzykawkowym (średnica porów 0,2 μ m) i rozcieńczano wodą w stosunku 1:1.

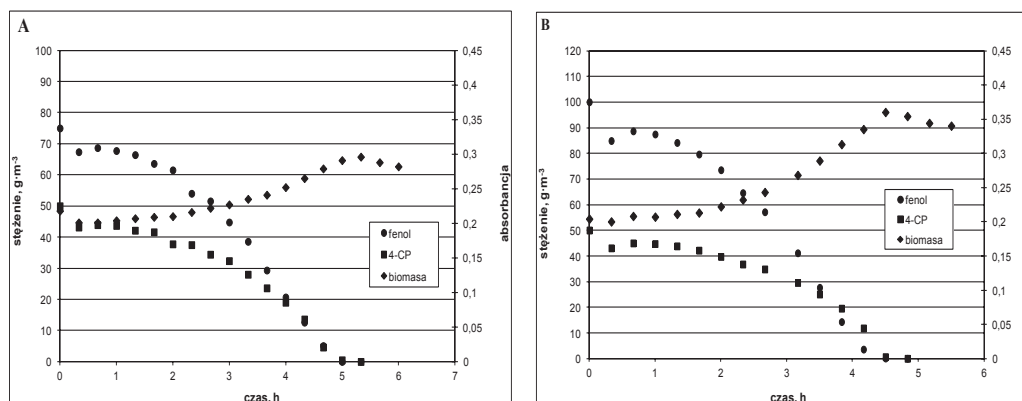
4. WYNIKI BADAŃ

4.1 BIODEGRADACJA 4-CP JAKO JEDYNEGO ŹRÓDŁA WĘGLA I ENERGII

Dla sprawdzenia, czy stosowany w badaniach szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 może wykorzystywać 4-chlorofenol jako jedyne źródło węgla i energii dla wzrostu komórek, przeprowadzono serię testów, zmieniając początkowe stężenie 4-CP w granicach 10–50 g·m⁻³. Nie zaobserwowano ani znaczącego ubytku substratu, ani wzrostu ilości biomasy. Niewielki, rzędu kilku procent, ubytek substratu był zapewne spowodowany faktem, że szczep namnażany był na fenolu, który indukuje enzymy niezbędne do rozkładu 4-chlorofenolu, a zatem niewielkie ilości enzymów mogły być tą drogą wprowadzone do hodowli. Eksperymenty potwierdziły, że szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 nie potrafi wykorzystać 4-CP jako jedyne źródła węgla i energii.

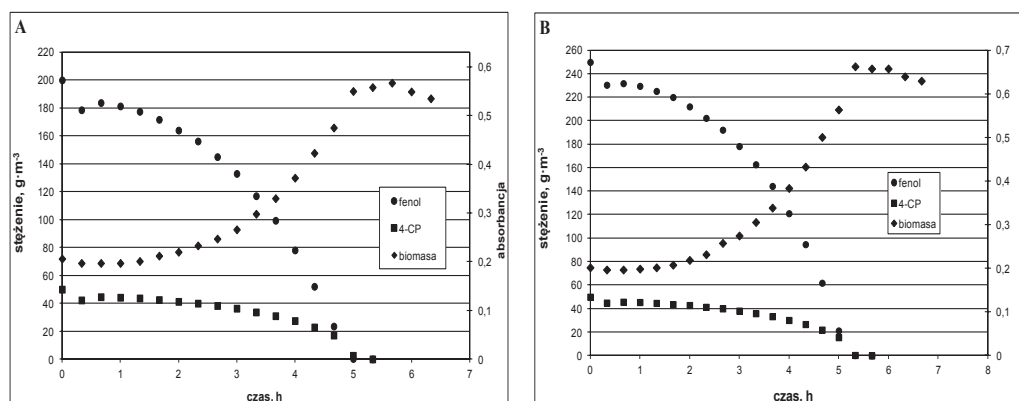
4.2 WPLYW FENOLU NA BIODEGRADACJĘ 4-CHLOROFENOLU

Badania procesu kometabolicznej transformacji 4-chlorofenolu (substrat niewzrostowy, kometabolit) w obecności fenolu (substrat wzrostowy, źródło węgla i energii) przeprowadzono w dwóch seriach. Seria pierwsza obejmowała hodowle prowadzone przy stałym początkowym stężeniu 4-CP, wynoszącym $50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, natomiast początkowe stężenie fenolu zmieniano w kolejnych eksperymentach w granicach $50\text{--}300 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ (Tabela 2). Rysunki 2 i 3 przedstawiają zmiany w czasie stężeń obu substratów i biomasy dla 4 wybranych wartości stosunku fenol/4-CP.



Rys. 2. Zmiana stężenia fenolu, 4-CP i biomasy w czasie dla stosunku początkowych stężeń fenol/4-CP równych 75/50 (A) i 100/50 (B)

Fig. 2. Time-dependent curves of phenol and 4-CP degradation and cell growth for initial concentration ratio of phenol to 4-CP 75/50 (A) and 100/50 (B)



Rys. 3. Zmiana stężenia fenolu, 4-CP i biomasy w czasie dla stosunku początkowych stężeń fenol/4-CP równych 200/50 (A) i 250/50 (B)

Fig. 3. Time-dependent curves of phenol and 4-CP degradation and cell growth for initial concentration ratio of phenol to 4-CP 200/50 (A) and 250/50 (B)

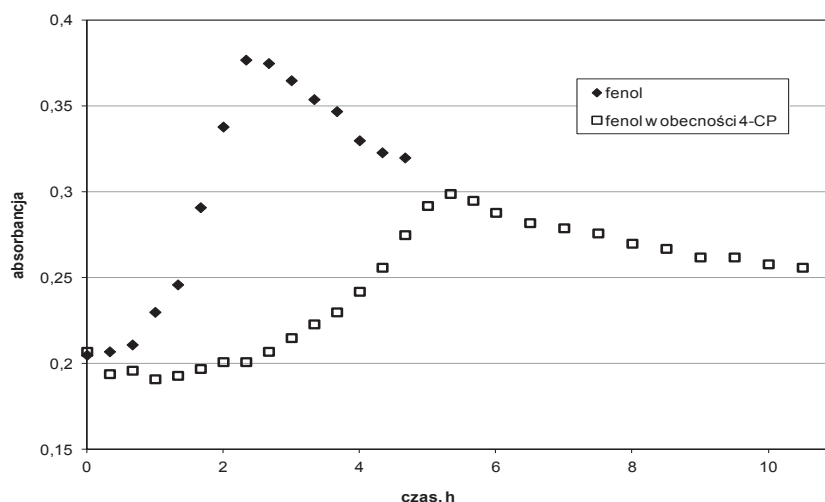
Tabela 2. Parametry kometabolicznej degradacji 4-chlorofenolu w obecności różnych stężeń początkowych fenolu
 Table 2. Parameters of cometabolic degradation of 4-CP in the presence of phenol at various initial concentration

Stężenie substratów, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$		$dX,$ $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$	W	f	4-CP/ fenol	Fenol/4-CP	Czas, po którym stężenie substratów = 0, min
fenol	4-CP						
50	50	12,57	1,627	0,614	1,000	1	360
50	50	16,55	2,000	0,500	1,000	1	330
75	50	31,88	1,876	0,355	0,667	1,5	320
75	50	28,20	1,551	0,430	0,667	1,5	340
100	50	47,82	1,876	0,267	0,500	2	290
100	50	40,77	1,335	0,375	0,500	2	280
125	50	61,93	1,665	0,240	0,400	2,5	280
125	50	56,10	1,277	0,313	0,400	2,5	300
150	50	69,28	1,143	0,292	0,333	3	290
150	50	67,44	1,074	0,310	0,333	3	290
200	50	110,67	1,652	0,151	0,250	4	320
200	50	110,67	1,652	0,151	0,250	4	320
250	50	142,86	1,618	0,124	0,200	5	320
250	50	141,32	1,504	0,133	0,200	5	340
300	50	175,05	1,586	0,105	0,167	6	340
300	50	172,59	1,417	0,118	0,167	6	306

Należy nadmienić, że dla całego badanego zakresu zmian stosunku masowego fenol/4-CP (1–6), oba substraty były degradowane równocześnie, a czas ich degradacji nie przekraczał 6 godzin. Świadczy to o dużej aktywności testowanego szczepu. Dla porównania: w pracy [20] dawka $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ fenolu i $40 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ 4-CP była degradowana przez bakterie *Pseudomonas putida* LY1 w ciągu 65 godzin, natomiast dawka $200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ fenolu i $40 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ 4-CP przez około 120 godzin.

Duża początkowa dawka fenolu (rys. 3a, 3b) powodowała, że to on był degradowany jako pierwszy; wyraźny rozkład 4-chlorofenolu rozpoczynał się, gdy stężenie fenolu obniżało się do $\sim 150 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$. Świadczy to o wyraźnej inhibicji kompetycyjnej substratów. Gdy stosunek fenolu do 4-CP jest wysoki, współzawodnictwo jest zdominowane przez utlenianie fenolu, a zatem 4-CP nie może połączyć się efektywnie z monooksygenazą [22]. W momencie całkowitego wyczerpania fenolu praktycznie kończyła się faza wzrostu komórek, po czym natychmiast, lub po bardzo krótkiej fazie stacjonarnej, zaczynała się faza zamierania.

Porównując wzrost szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w hodowli mono- i dwusubstratowej (rys. 4) można stwierdzić wyraźną inhibicję wzrostu mikroorganizmów przez dodatek do roztworu toksycznego kometabolitu.



Rys. 4. Zmiana stężenia biomasy (OD) w hodowli mono- ($C_{\text{fenolu}} = 75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$) i dwusubstratowej ($C_{\text{fenolu}} = 75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, $C_{4\text{-CP}} = 50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)

Fig. 4. Changes in biomass concentration (OD) in mono- ($C_{\text{Ph}} = 75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$) and dual-substrate ($C_{\text{Ph}} = 75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, $C_{4\text{-CP}} = 50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$) cultures

Biodegradacja fenolu dostarcza reduktorów dla wzrostu komórek i transformacji 4-CP [14]. Pomijając zużycie substratu w wyniku metabolizmu endogenego, sformułować można bilans masowy substratu wzrostowego. I tak, fenol zużywany jest na transformację kometabolitu oraz na wzrost biomasy, co można zapisać jako:

$$-\Delta S_g = -\frac{\Delta S_c}{W} + \frac{\Delta X}{Y_{X/S}} \quad (1)$$

gdzie: ΔS_g , ΔS_c , ΔX to zmiany stężenia substratów wzrostowego i niewzrostowego oraz biomasy ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), W to wydajność transformacyjna substratu wzrostowego ($\text{g}_{4\text{-CP}}/\text{g}_{\text{fenolu}}$ zużytego wyłącznie na transformację kometabolitu), natomiast $Y_{X/S}$ to współczynnik wydajności biomasy w hodowlach bez 4-CP. Dla szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 jego wartość wynosi 0,652 [34]. Przekształcając zależność (1) otrzymać można równanie, umożliwiające obliczenie wartości W :

$$W = \frac{\Delta S_c}{\Delta S_g + \frac{\Delta X}{Y_{X/S}}} \quad (2)$$

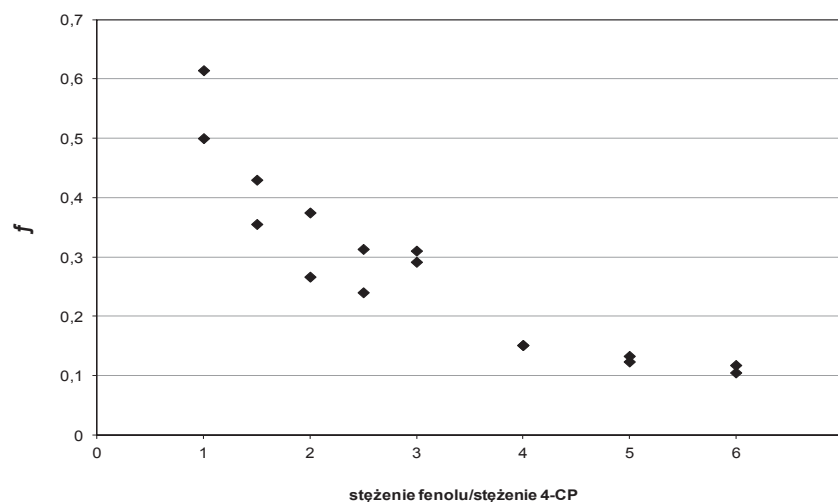
W tabeli 2 zestawiono wyestymowane wartości W , które zmieniały się w zakresie 1,1–2, co świadczy o dużej aktywności transformacyjnej testowanych mikroorganizmów. Dzieliąc zależność (1) przez $(-\Delta S_g)$ i oznaczając:

$$f = 1 - \left(\frac{\Delta X}{(-\Delta S_g) \cdot Y_{X/S}} \right) \quad (3)$$

otrzymuje się współczynnik f wskazujący, jaka część równoważników redukcyjnych, otrzymywanych z utleniania fenolu jest zużywana na biodegradację 4-CP. Pozostała część, a więc $(1-f)$, to część zużywana na wzrost biomasy. Zatem:

$$1 - f = \frac{\Delta X}{(-\Delta S_g) \cdot Y_{X/S}} \quad (4)$$

Jak widać z tabeli 2, wraz ze wzrostem początkowego stężenia fenolu (przy $C_{4-CP} = \text{const.}$) maleje wartość współczynnika f , co jest zgodne z obserwacjami Kima i wsp. [14] oraz Wang'a i wsp. [20]. Przyczyną tego jest zapewne inhibicja kompetycyjna obydwóch substratów, która zależy od stężenia obu substancji w roztworze (rys. 5).



Rys. 5. Część równoważników redukcyjnych dostarczonych z utleniania fenolu zużyta na kometaboliczne przemiany, w zależności od początkowego stosunku stężeń fenolu i 4-CP

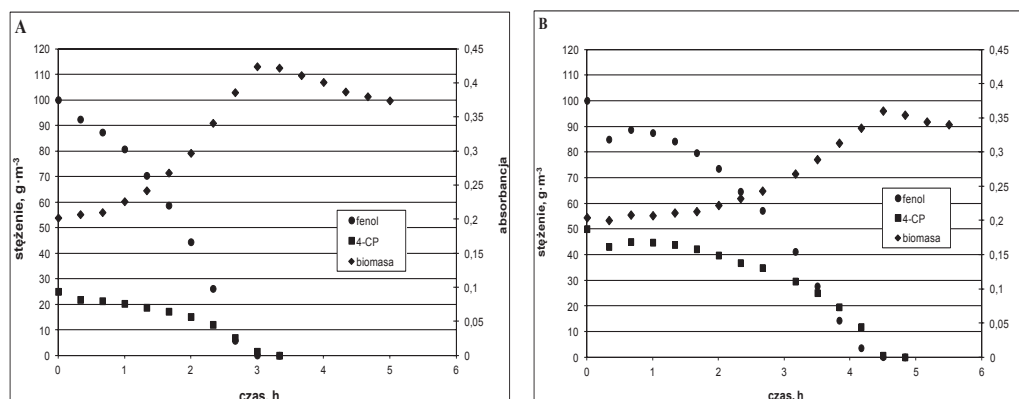
Fig. 5. Fraction of reductant supply from phenol oxidation used for cometabolism versus the initial (C_{Ph}/C_{4-CP}) ratio

4.3 WPŁYW 4-CHLOROFENOLU NA BIODEGRADACJĘ FENOLU

Dla sprawdzenia wpływu 4-CP na wzrost mikroorganizmów i degradację fenolu wykonano dwie serie eksperymentów (Tabela 3), w których dla stałych wartości stężenia fenolu, równych $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ i $75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, zmieniano w kolejnych hodowlach początkowe stężenie 4-CP w granicach $25\text{--}100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ (rys. 6 i 7).

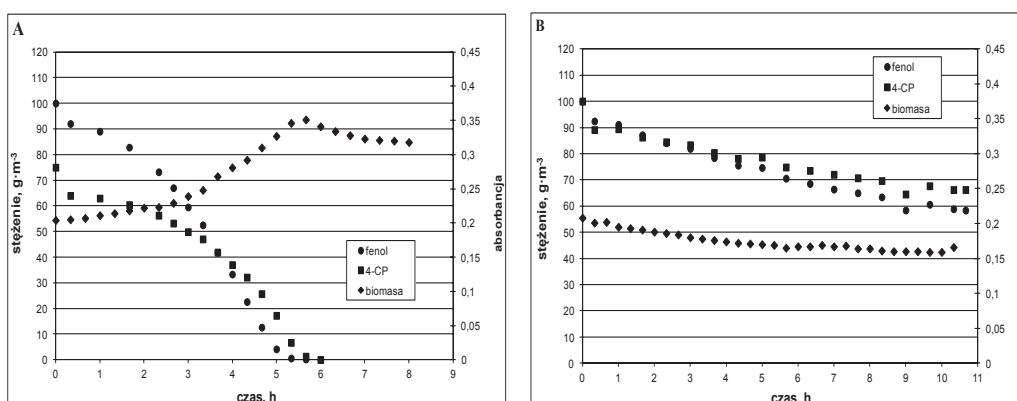
Tabela 3. Zestawienie wyników kometabolicznej degradacji różnych dawek 4-CP w obecności fenolu
 Table 3. Summarized results for cometabolic degradation of various concentration of 4-chlorophenol in the presence of phenol

Stężenie substratów, $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$		$dX,$ $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$	W	f	4-CP/ fenol	Fenol/4-CP	Czas, po którym stężenie substratów = 0, min
fenol	4-CP						
75	25	44,45	3,664	0,091	0,333	3	180
75	25	45,37	4,619	0,072	0,333	3	200
75	50	31,88	1,876	0,355	0,667	1,5	320
75	50	28,20	1,551	0,430	0,667	1,5	340
75	75	15,63	1,450	0,690	1,000	1	440
75	75	21,46	1,776	0,563	1,000	1	420
75	100	Brak przyrostu biomasy, brak degradacji			1,333	0,75	
100	25	62,54	6,124	0,041	0,250	4	200
100	25	68,06	-5,707	-0,044	0,250	4	200
100	50	47,82	1,876	0,267	0,500	2	290
100	50	40,77	1,335	0,375	0,500	2	280
100	75	29,43	1,344	0,558	0,750	1,33	420
100	75	45,063	2,429	0,309	0,750	1,33	360



Rys. 6. Zmiana stężenia fenolu, 4-CP i biomasy w czasie dla stosunku początkowych stężeń fenol/4-CP równych 100/25 (A) i 100/50 (B)

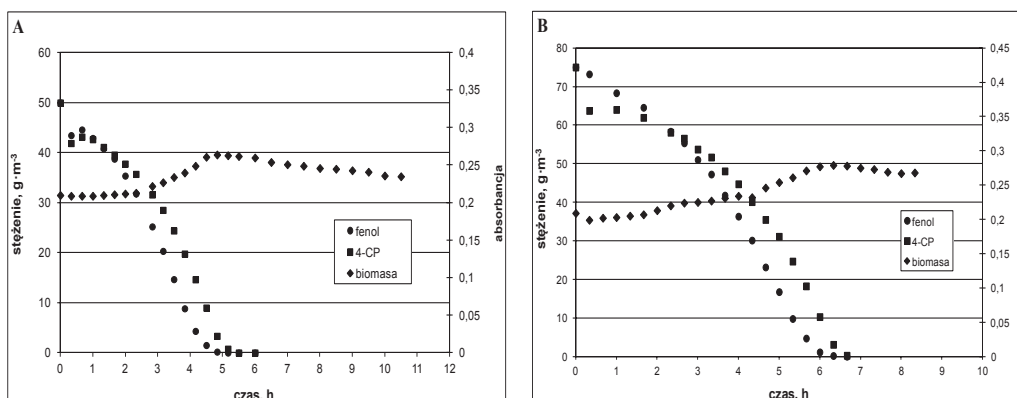
Fig. 6. Time-dependent curves of phenol and 4-CP degradation and cell growth for initial concentration ratio of phenol to 4-CP 100/25 (A) and 100/50 (B)



Rys. 7. Wpływ początkowego stężenia 4-CP na degradację substratów i wzrost biomasy dla początkowego stosunku stężeń fenol/4-CP: 100/75 (A) i 100/100 (B)

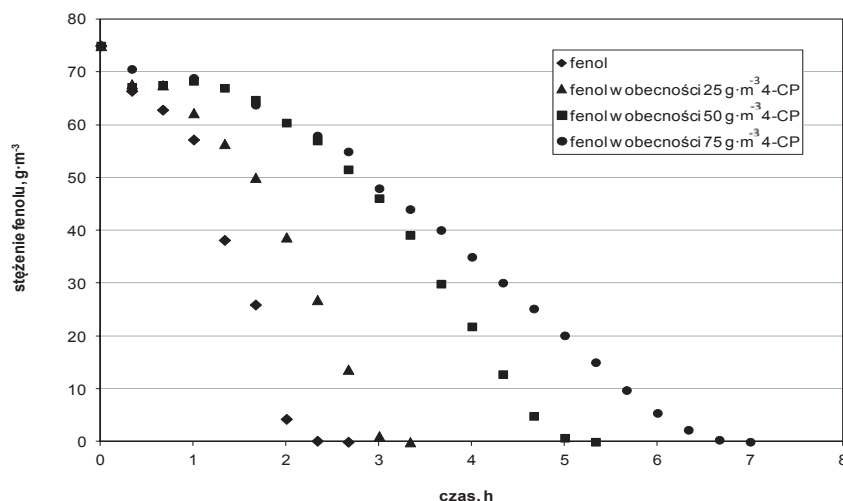
Fig. 7. Effect of initial 4-CP concentration on substrates degradation and cell growth for initial phenol/4-CP concentration ratio: 100/75 (A) i 100/100 (B)

Jak widać z rys. 7b, dla stężenia 4-CP rzędu $100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, przy stosunku fenol/4-CP równym 1, w hodowli nie zaobserwowano ani wzrostu mikroorganizmów, ani efektywnej degradacji obu substratów, podczas gdy dla stężeń $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ fenolu/ $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ 4-CP i $75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ fenolu/ $75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ 4-CP, a więc również dla ich stosunku równego 1, oba substraty uległy całkowitej degradacji, chociaż wzrost biomasy nie był zbyt intensywny (rys. 8). Wynika z tego, że samo operowanie stosunkiem obu substratów jako kryterium efektywnej biodegradacji obu substancji nie jest właściwe.



Rys. 8. Biodegradacja fenolu, 4-CP i wzrost biomasy przy początkowych stężeniach obu substratów $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ (A) i $75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ (B)

Fig. 8. Biodegradation of phenol, 4-CP and biomass growth at the initial concentration of both substrates: $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ (A) i $75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ (B)

Rys. 9. Wpływ 4-CP na biodegradację fenolu ($C_{\text{fenolu}} = 75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$)Fig. 9. Effect of 4-CP on phenol degradation ($C_{\text{Ph}} = 75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$)

Porównując wyniki badań rozkładu fenolu przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (rys. 9) w hodowli monosubstratowej oraz w obecności rozkładanego kometabolicznie 4-chlorofenolu stwierdzono, że wzrost początkowego stężenia 4-CP w roztworze wydłuża znacznie czas całkowitego rozkładu fenolu. Wzrost stężenia 4-chlorofenolu w hodowli, przy stałym stężeniu początkowym fenolu, wydaje się obniżać wydajność transformacyjną substratu wzrostowego (ze wzrostem stężenia 4-CP maleje wartość W), natomiast coraz większa część równoważników redukcyjnych jest zużywana na biodegradację 4-CP (rośnie znacząco wartość f).

WNIOSKI

Badania wykazały bardzo wysoką aktywność biodegradacyjną szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w hodowlach dwusubstratowych fenol/4-CP. Oba substraty były całkowicie degradowane w hodowlach, w których stosunek fenol/4-CP zmieniał się w granicach 1–6. Należy podkreślić, że całkowitą biodegradację obu substratów uzyskiwano w czasie nie dłuższym niż 6 godzin. Opracowanie zależności opisujących kinetykę kometabolicznego rozkładu 4-chlorofenolu w obecności fenolu jako łatwo przyswajalnego źródła węgla i energii, wymaga jeszcze wykonania serii badań rozkładu 4-CP przez komórki *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w fazie spoczynku (ang. resting cell).

OZNACZENIA – SYMBOLS

A_{550} – absorbancja mierzona przy długości fali 550 nm
absorbance by wave length 550 nm

f	– ilość reduktora wykorzystana na transformację 4-CP fraction of reductant used for 4-CP transformation
S_g	– stężenie substratu wzrostowego, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ growth substrate concentration
S_c	– stężenie substratu niewzrostowego, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ nongrowth substrate concentration
W	– wydajność transformacji substratu wzrostowego ($\text{mg}_{4\text{-CP}}/\text{mg}_{\text{fenolu}}$ zużytego tylko na transformację 4-CP) growth substrate transformation yield ($\text{mg}_{4\text{-CP}}/\text{mg}_{\text{phenol}}$ solely used for 4-CP transformation)
X	– stężenie biomasy, $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ biomass concentration
$Y_{x/s}$	– współczynnik wydajności dla czystego fenolu, $\text{g}_{\text{s.m.}}/\text{g}_{\text{substr.}}$ yield coefficient for phenol alone
4-CP	– 4-chlorofenol 4-chlorophenol
λ	– długość fali wave length

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE – REFERENCES

- [1]. Klein J.A., Lee D.D., 1978. Biological treatment of aqueous wastes from usual conversion processes. *Biotechnol. Bioeng.*, 8, 379.
- [2]. U.S. Environmental Protection Agency, 1980. Ambient water quality criteria for chlorinated phenols. 440/5-80-032. U.S. Washington.
- [3]. ATSDR, 2015. Comprehensive environmental response, compensation and liability act (CERCLA), priority list of hazardous substances.
- [4]. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [5]. Gaofeng W., Hong X., Mei J., 2004. Biodegradation of chlorophenols. A review. *Chemical Journal on Internet.*, 6, 1-67.
- [6]. Field J.A., Sierra-Alvarez R., 2008. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 7, 211-241.
- [7]. De Los Cobos-Vasconcelos D., Santoyo-Tepole F., Juarez-Ramirez C., Ruiz-Ordaz N., Galindez-Mayer C.J.J., 2006. Cometabolic degradation of chlorophenols by a strain of *Burkholderia* in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 57-60.
- [8]. <http://www.ciop.pl/>
- [9]. Hill G.A., Milne B.J., Nawrocki P.A., 1996. Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 163-168.
- [10]. Arora P.K., Bae H., 2014. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb. cell fact.* 13, 1-31. (<http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/31>).
- [11]. Criddle C.S., 1993. The kinetics of cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 1048-1056.
- [12]. Horvath R.S., 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.*, 36 (2), 146-155.
- [13]. Aktas Ö., 2012. Effect of S0/X0 ratio and acclimation on respirometry of activated sludge in the cometabolic biodegradation of phenolic compounds. *Bioresource Technol.*, 111, 98-104. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.027.
- [14]. Kim M.H., Hao O.J., 1999. Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species. *Wat. Res.*, 33 (2), 562-574.

- [15]. Alvarez-Cohen L., Speitel Jr. G.E., 2001. Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. *Biodegradation*, 12, 105-126. DOI: 10.1023/A:1012075322466.
- [16]. Greń I., Guzik U., Wojcieszynska D., Łabużek S., 2008. Molekularne podstawy rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych. *Biotechnologia*, 2 (81), 58-67.
- [17]. Wojcieszynska D., Guzik U., Hupert-Kocurek K., Siupka P., 2011. Mikrobiologiczny rozkład chlorofenoli, uciążliwych odpadów przemysłu chemicznego. *Przemysł Chemiczny*, 90 (8), 1515-1519.
- [18]. Wojcieszynska D., Greń I., Łabużek S., Respondek M., 2007. Specyficzność substratowa oraz wrażliwość monooksygenazy fenolowej ze szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 a jej potencjalne zastosowanie w bioremediacji środowiska. *Biotechnologia*, 2 (77), 181-191.
- [19]. Saéz P.B., Rittmann B.E., 1993. Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and an inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). *Biodegradation*, 4, 3-21. DOI: 10.1007/BF00701451.
- [20]. Wang Q., Li Y., Li J., Wang Y., Wang C., Wang P., 2015. Experimental and kinetic study on the cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 22, 565-573. DOI: 10.1007/s11356-014-3374-x.
- [21]. Liu J., Jia X., Wen J., Zhou Z., 2012. Substrate interactions and kinetics study of phenolic compounds biodegradation by *Pseudomonas* sp. cbp1-3. *Biochem. Eng. J.*, 67, 156-166. DOI:10.1016/j.bej.2012.06.008.
- [22]. Tobajas M., Monsalvo V.M., Mohedano A.F., Rodriguez J.J., 2012. Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol induced with phenol and glucose as carbon sources by *Comamonas testosteroni*. *J. Environ. Manage.*, 95, 116-121. DOI: 10.1016/j.jenvman.2010.09.030.
- [23]. Wang J., Ma X., Liu S., Sun P., Fan P., Xia Ch., 2012. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* W. *Procedia Environ. Sci.*, 16, 299-303. DOI: 10.1016/j.proenv.2012.10.042.
- [24]. Sinha P.K., Sinha A., Das M., 2011. Microbial removal of phenol and p-chlorophenol from industrial waste water using *Rhodococcus* sp. RSP8 and its growth kinetic modeling. *J. Water Resource Prot.*, 3, 634-642. DOI: 10.4236/jwarp.2011.38073.
- [25]. Monsalvo V.M., Mohedano A.F., Casas J.A., Rodríguez J.J., 2009. Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures. *Bioresource Technol.*, 100, 4572-4578. DOI:10.1016/j.biortech.2009.04.044.
- [26]. Jiang Y., Ren N., Cai X., Wu D., Qiao L. Lin S., 2008. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the mutant strain CTM 2. *Chin. J. Chem. Eng.*, 16, 796-800.
- [27]. Jiang Y., Wen J., Lan L. Hu Z., 2007. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis*. *Biodegradation*, 18, 719-729. DOI: 10.1007/s10532-007-9100-3.
- [28]. Lee C.-Y., Lee Y.-P., 2007. Degradation of 4-chlorophenol by enriched mixed cultures utilizing phenol and glucose as added growth substrate. *World J. Microb. Biot.*, 23, 383-391. DOI: 10.1007/s11274-006-9235-0.
- [29]. Loh K.-Ch., Wu T., 2006. Cometabolic transformation of 2-chlorophenol and 4-chlorophenol in the presence of phenol by *Pseudomonas putida*. *Can. J. Chem. Eng.*, 84, 356-367.
- [30]. Bae H.S., Lee J.M., Kim Y.B., Lee S.T., 1996. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation*, 7, 463-469.
- [31]. Loh K.-C., Wang S.-J., 1998. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation*, 8, 329-338. DOI: 10.1023/A:1008267607634.
- [32]. Wang S.-J., Loh K.-C., 2000. New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Res.*, 34, 3786-3794. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00144-5.

- [33]. Wang S.-J., Loh K.-C., 2001. Biotransformation kinetics of *Pseudomonas putida* for cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of sodium glutamate. *Biodegradation*, 12, 189-199. DOI: 10.1023/A:1013170322269.
- [34]. 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.

ELŻBIETA SZCZYRBA, ANNA SZCZOTKA, GRAŻYNA BARTELMUS, AGNIESZKA GAŚCZAK, IZABELA GREŃ,
HANNA KOLARCZYK

COMETABOLIC BIODEGRADATION OF 4-CHLOROPHENOL BY *STENOTROPHOMONAS*
MALTOPHILIA KB2 STRAIN

The subject of analysis of the present study was the cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by *Stenotrophomas maltophilia* KB2 strain in the presence of phenol as the growth substrate. The tested strain was isolated from activated sludge coming from a city sewage-treatment plant. The ability of *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain to biodegrade phenol as the only source of carbon and energy was tested in earlier studies [34]. The strain is not capable of using 4-chlorophenol as growth substrate. Literature data relating to cometabolic biodegradation of the mixture of phenol and 4-chlorophenol by various microorganisms was surveyed. Next, a series of tests were carried out in a batch reactor changing, in a wide range, the initial ratios of concentrations of both substrates. Every test was carried out in the same conditions: temperature 30°C, pH 7, oxygenation 5–7 mg·dm⁻³.

During the experiment, at regular intervals, concentrations of biomass and substrates were determined. The first series of experiments was carried out at the initial concentration of 4-chlorophenol equaling 50 g·m⁻³, whereas the concentration of phenol was changed in the range of 50 to 300 g·m⁻³. Total biodegradation was achieved for the whole range of changes of concentrations of both substrates (at the same time substrates were transformed) and biodegradation time did not exceed 6 hours. It shows great activity of the tested strain.

The values of growth substrate transformation yield (W) and the f term, which indicates the fraction of reductant supply from phenol oxidation that is consumed for 4-CP biodegradation were also estimated. As it can be seen from Table 2, the f value decreases with the increase in the initial phenol concentration showing the competitive inhibition of both substrates.

The other series of experiments was carried out at constant initial phenol concentration (75 and 100 g·m⁻³), but various initial concentration of 4-chlorophenol (changed in the range of 25–100 g·m⁻³). It was stated that the increase in the initial 4-chlorophenol concentration significantly lengthens the time of total phenol degradation and decreases the amount of the formed biomass. The increase in the initial co-substrate concentration, at constant initial phenol concentration, decreases transformation yield of the growth substrate (W) and bigger and bigger fraction of reductant is used to biodegrade 4-chlorophenol (the f value increases significantly).

Received: 29.08.2016 r.

Accepted: 4.10.2016 r.