



## The possibility to use natural materials as supports of biomass during the RBBR decolourization process involving *Corioloropsis gallica*

Wioletta PRYZYTAŚ<sup>1</sup>, Ewa ZABŁOCKA-GODLEWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice, tel.: +48 32 2372855, e-mail: wioletta.przystas@polsl.pl

### Abstract

Natural materials that are post-production waste from food industry can be used as solid supports of fungal biomass. The wood rot fungi easily colonize the above-mentioned materials. They are the group of fungi that have a high potential for degradation of various xenobiotics, including synthetic dyes. The aim of this study was to determine the influence of immobilization of *Corioloropsis gallica* on the effectiveness of decolourisation of anthraquinone RBBR (remazol brilliant blue R). Six different natural materials (hay, sawdust, seeds of cherry and , peach, walnut and peanut shells) were tested for possible usage in the immobilization of biomass of *C. gallica*. The most intensive growth of the mycelium on a support was obtained only in the case of peanut shells, sawdust and hay. These carriers were characterized by the strongest adsorption of RBBR to the substrate (7-12% within 4 hours). Immobilization of strain on the solid support caused a significant increase in the efficiency of decolourization process. Non-immobilized biomass, grown under conditions of shaking, removed only 5,8%. Results reached after 96h of process when biomass was immobilized on sawdust > 56%, and in the case of hay > 80%.

**Keywords:** decolourization, natural solid supports, fungi

### Streszczenie

Możliwości wykorzystania materiałów naturalnych jako nośników biomasy podczas procesu dekoloryzacji RBBR z udziałem *Corioloropsis gallica*

Materiały naturalne będące odpadami poprodukcyjnymi branży spożywczej można wykorzystać jako nośniki biomasy grzybów. Szczególnie grzyby tzw. zgnilizny drewna łatwo kolonizują wyżej wymienione materiały. Jednocześnie grzyby zaliczane do tej grupy są wykazują wysoki potencjał degradacyjny różnych ksenobiotyków, m.in. barwników syntetycznych. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu immobilizacji grzybni *Corioloropsis gallica* na efektywność dekoloryzacji antrachinowego barwnika RBBR (brylantowy błękit remazolowy R). W badaniach przetestowano 6 materiałów odpadowych (siano, trociny, pestki czereśni, pestki brzoskwiń, łupiny orzecha włoskiego i łupiny orzecha ziemnego) pod kątem możliwości wykorzystania ich w immobilizacji biomasy szczepu *C. gallica*. Intensywny wzrost grzybni na nośniku uzyskano jedynie w przypadku łupin orzecha ziemnego, trocin i siana. Nośniki te najmocniej sorbowały dodany do podłoża RBBR (7-12% w ciągu 4 h). Immobilizacja szczepu na tych nośnikach spowodowała zdecydowany wzrost efektywności procesu odbarwiania roztworów. Biomasa nieimmobilizowana, hodowana w warunkach wstrząsania usunęła zaledwie 5,8%. Wynik dekoloryzacji po 96h w przypadku grzybni immobilizowanej na trocinach osiągnął >56%, a w przypadku siana >80%.

**Słowa kluczowe:** dekoloryzacja, nośniki naturalne, grzyby.

### 1. Wstęp

Grzyby są jednymi z głównych organizmów mających zdolność rozkładu związków ligninowo-celulozowych w środowisku naturalnym [1-4]. Dla wielu z nich materiał ten stanowi główne źródło biogenów i energii. Jednocześnie jest to jeden z głównych produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego [5]. Materiały te można wykorzystać w różnorodny sposób, także podczas dekoloryzacji barwników syntetycznych.

Zaletą zastosowania tego typu materiałów w dekoloryzacji barwników jest powszechna dostępność, łatwość w stosowaniu, a także niski koszt pozyskania [6-8]. Udowodniono, iż naturalne materiały odpadowe są dobrym sorbentem barwników z różnych klas. Badania adsorpcji barwników prowadzono na takich materiałach jak: odpady przemysłu rybnego [9], chitozan [10-11], łuski orzecha kokosowego [12], łuski ryżowe [13], torf [13-14], pulpa po produkcji cukru trzcinowego [15], trociny [16-17], skórki pomarańczy [18] czy rdzenie bananowca [19-20].

Namasivayam i wsp. [21] przebadał usuwanie kwaśnego fioletu, kwaśnego błękitu brylantowego (barwników kwasowych), rodaminy B i błękitu metylenowego (barwników podstawowych) na rdzeniach z włókna kokosowego. Proces dekoloryzacji zachodził dzięki wymianie jonowej (w przypadku kwaśnego błękitu brylantowego i błękitu metylenowego), jak również adsorpcji fizycznej czy chemicznej (rodamina B). Nie udało się jednak w pełni usunąć barwników. Maksymalnie usunięto 95% barwników (z wyjątkiem kwaśnego błękitu brylantowego – 76,6%) przy dawce adsorbenta 16 mg/ml. Ten sam zespół w swoich badaniach wykorzystał odpady w postaci skórek pomarańczy [18]. Czerwień Kongo była usuwana w 76,6% w pH 5, rodamina B w 67%, a Procion Orange w 49% w pH 3. Sivaraj i wsp. [22] z wykorzystaniem tego samego materiału odpadowego uzyskali usunięcie 19,88 mg/g kwaśnego fioletu przy pH 6,3. Najlepsze wyniki uzyskano przy czasie kontaktu sorbenta z barwnikiem wynoszącym 80 min. dla odpowiednio 10, 20, 30 i 40 mg/l barwnika. Maksymalnie usunięto 87% barwnika przy pH 2 i dawce adsorbentu 600 mg/50ml i dawce barwnika 10 mg/l [22]. Piccin i wsp. [23] jako sorbent wykorzystali odpady przemysłu skórzanego w postaci skrawków uzyskanych w trakcie procesów wyprawiania skóry. Odpady te są często klasyfikowane jako niebezpieczne, głównie dzięki obecności w nich chromu [24-25]. Wyniki badań uzyskanych przez zespół Piccin i wsp. [2012] potwierdziły możliwość wykorzystania tego typu odpadów, jako aktywnego adsorbenta barwników ze ścieków. Usunięto nawet 413,9 mg/g Acid Red 357 i 156,6 mg/g Acid Black 210. Jednocześnie wzrost koncentracji barwnika zwiększał zdolność jego adsorpcji poprzez tworzenie wielu warstw barwnika na sorbencie [23].

Tego typu materiały odpadowe mogą również stanowić nośnik biomasy podczas biologicznej dekoloryzacji. Wiadomo, iż grzyby mogą efektywnie usuwać barwniki ze ścieków dzięki zdolności do ich adsorpcji i biotransformacji [3; 26-31]. Badania nad dekoloryzacją barwników przez grzyby wskazują, iż proces ten jest o wiele efektywniejszy jeśli grzybnia zostanie zimmobilizowana na jakimś nośniku. Immobilizacja biomasy pozwala na polepszenie warunków wzrostu i zwiększenie aktywności mikroorganizmów, oraz zwiększenie powierzchni kontaktu biomasy z zanieczyszczeniem [3;32-34].

Celem przeprowadzonych badań było określenie możliwości wykorzystania różnych naturalnych materiałów odpadowych do immobilizacji grzybni zaliczanego do *Basidiomycota* szczepu *Corioloropsis gallica* (AWSP85) oraz wpływu immobilizacji na efektywność procesu dekoloryzacji.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiał biologiczny

W badaniach wykorzystano szczep grzyba *Corioloropsis gallica* (AWSP85) zaliczany do podstawczaków, wyizolowany z owocników zebranych na terenie Górnego Śląska przy wykorzystaniu metody zarodnikowej. Do izolacji, jak również przechowywania szczepu wykorzystano podłoże MEA (Difco). Hodowlę grzybni prowadzono w temp. 26°C, a wyhodowaną grzybnię przechowywano w temp. 5°C.

### 2.2. Barwnik

W pracy przeprowadzono badania dekoloryzacji brylantowego błękitu remazolowego R (RBBR) produkowanego przez firmę Acros Organics (ChemIndex C.I. 61200). Jest to barwnik antrachinonowy, zaliczany do anionowych barwników reaktywnych, charakteryzujący się masą molową 626,54 g/mol i  $\lambda_{max}$  = 593 nm (UV-VIS Hitachi 1900).

### 2.3. Wykorzystane nośniki biomasy

Jako nośniki biomasy wykorzystano naturalne materiały odpadowe, takie jak: siano (S), mieszanina trocin drzew liściastych i iglastych pochodząca z tartaku (T), łupiny orzecha włoskiego (LOW), łupiny orzecha ziemnego (LOZ), pestki czereśni (PCZ), pestki brzoskwiń (PB). Wszystkie materiały wysuszono do stałej masy i rozdrobniono na fragmenty o wielkości około 0,5x0,5 cm.

## 2.4. Określenie stopnia adsorpcji barwnika na nośniku

W celu określenia stopnia adsorpcji barwnika RBBR na nośniku naturalnym (siano, trociny, łupiny orzecha włoskiego, łupiny orzecha ziemnego) rozdrobiony materiał nośny (fragmenty materiału 0,5x0,5 cm) wprowadzono do szklanych fiolek o pojemności 50 ml. Materiały wprowadzono tak, iż w każdym pojemniku znajdowała się taka sama naważka. Innym rodzajem odpadów stosowanych w badaniach były pestki czereśni i pestki brzoskwiń, które wprowadzono do pojemników w całości. Do tak przygotowanej próbki dodawano wodny roztwór RBBR o stężeniu 0,1 g/l. Każdą próbkę przygotowano w 5 powtórzeniach. Równolegle przygotowano próbki kontrolne zawierające nośniki i wodę (w takiej samej ilości powtórzeń) oraz próbki kontrolne, barwnikowe. Po 4 godzinach inkubacji na wytrząsarce (150 rpm), w temp. 26°C, próbki przesączono przez sączki celulozowe (o gramaturze 84 g/m<sup>2</sup>) i mierzono absorbancję supernatantu przy długości fali 593nm. Stopień adsorpcji barwnika wyznaczono z zależności:

$$A = \left(1 - \frac{P}{K}\right) * 100\% \quad (2.4.1)$$

gdzie:

A – adsorpcja barwnika na materiale [%],

P – stężenie RBBR w próbce badawczej po 4h inkubacji, po odjęciu tła spowodowanego barwą uwolnioną z materiału (kontrola na wodzie destylowanej);

K – stężenie RBBR w wodnym roztworze (kontrola barwnikowa).

## 2.5. Określenie potencjału dekoloryacyjnego szczepu *C. gallica*

W celu potwierdzenia, zdolności dekoloryzacji barwników przez badany szczep wykonano test płytkowy z dwoma rodzajami podłoża hodowlanego: MEA (Difco) oraz MSB (MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O - 0,5 g/l, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O- 0,1 g/l, glukoza – 10 g/l, winian amonowy- 0,2 g/l, tiamina – 10 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2 g/l, agar – 20 g/l; pH 5,6). Do podłoży dodano RBBR tak, aby uzyskać stężenie barwnika 0,1 g/l. W centralnej części każdej 6 cm płytki Petriego umieszczono krążek grzybni o Ø=0,5 cm. Obserwacje wzrostu grzybni prowadzono codziennie i notowano średnicę kolonii oraz średnicę strefy dekoloryzacji, widocznej w postaci przejaśnień wokół kolonii. Na podstawie proporcji średnic kolonii i strefy dekoloryzacji wyznaczono współczynnik D (dekoloryzacji).

## 2.6. Dobór nośnika biomasy

Test zasiedlania naturalnych materiałów odpadowych przez grzybnię szczepu AWSP85 prowadzono na podłożu PG (glukoza 5 g/l; pepton 1 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/l). Do zamykanych szklanych fiolek o objętości 50 ml wprowadzono rozdrobione na fragmenty wielkości 0,5x0,5 cm siano, trociny, łupiny orzecha włoskiego, łupiny orzecha ziemnego. Materiały wprowadzono tak, iż w każdym pojemniku znajdowała się taka sama naważka materiałów. Pestki czereśni i pestki brzoskwiń użyto bez rozdrabniania. Do fiolek z materiałem nośnym wprowadzono po 25 ml podłoża. Nośniki wraz z podłożem poddano sterylizacji poprzez autoklawowanie (121°C, 30 minut). Do tak przygotowanych prób wprowadzono po dwa krążki grzybni pobranej z hodowli na MEA (Ø=0,5cm). Dla każdego nośnika przygotowano 5 powtórzeń. Próby inkubowano na wytrząsarce (150 rpm) w temp. 26°C przez 8/16 dni w zależności od tempa wzrostu grzybni, które było różne dla każdego ze szczepów. Po okresie inkubacji próby przesączono, suszono w temp. 55°C (do stałej masy) i z różnic między suchą masą nośnika i suchą masą nośnika z grzybnią obliczono przyrost biomasy. Równolegle prowadzono obserwacje wzrostu biomasy na nośniku. Do oceny intensywności wzrostu biomasy na powierzchni nośników przyjęto następujące kryteria: ++++ intensywny wzrost – pokrycie nośnika na powierzchni 75-100%; +++ średni wzrost – pokrycie nośnika w zakresie 50-75% powierzchni; ++ słaby wzrost – pokrycie nosnika grzybnią w zakresie 25-50%; + bardzo słaby wzrost – pokrycie powierzchni nośnika grzybnią >25%, - wzrost tylko w podłożu, -- brak wzrostu.

## 2.7. Określenie wpływu zastosowanego nośnika biomasy na efektywność dekoloryzacji RBBR

W celu określenia wpływu nośnika biomasy na efektywność dekoloryzacji błękitu przygotowano próby z grzybnią w postaci zawiesiny oraz z grzybnią immobilizowaną na sianie, trocinach i łupinach orzecha ziemnego. Materiały te zostały wybrane na podstawie wcześniejszych testów jako nośniki, na których biomasa rosła intensywnie. Nośniki biomasy rozdrobiono na fragmenty o wielkości 0,5x0,5 cm i wprowadzono do kolb o objętości 100 ml zawierających 70 ml podłoża PG. Materiał wprowadzono w takiej naważce, aby zajmował on

nie więcej niż  $\frac{3}{4}$  kolby, przy czym waga danego nośnika w każdej kolbie była identyczna. Równolegle przygotowano podłoże bez nośnika. Tak przygotowane materiały autoklawowano ( $121^{\circ}\text{C}$ , 30 minut). Do tak przygotowanych jałowych prób wprowadzono 1 ml grzybni hodowanej uprzednio na podłożu PG (6 dni) i zhomogenizowanej z wykorzystaniem BagMixer 400P (10 min.). Zaszczepione kolby inkubowano w wytrząsarce (100 rpm;  $26^{\circ}\text{C}$ ) przez 6 dob. Do namnożonej biomasy wprowadzono sterylizowany przez filtrację (filtry strzykawkowe PVDF o porach  $20\ \mu\text{m}$  firmy Whatman) barwnik RBBR uzyskując stężenie wyjściowe w próbce  $0,1\ \text{g/l}$ . Zastosowane w doświadczeniu modyfikacje to: podłoże z zawieszoną grzybnią i barwnikiem (B), podłoże z grzybnią immobilizowaną na sianie i barwnikiem (SB); podłoże z grzybnią immobilizowaną na trocinach i barwnikiem (TB); podłoże z grzybnią immobilizowaną na łupinach i barwnikiem (LOZB). Równocześnie dla każdego z powyższych wariantów sporządzono kontrole bez grzybni oraz kontrole bez barwnika. Wszystkie próby, włącznie z kontrolami barwnikowymi wykonano w 4 powtórzeniach. Po dodaniu barwnika kolby inkubowano przez 96h pobierając próbki po 1, 3, 24, 48, 72 i 96 h w celu określenia zmian stężenia barwnika w próbach. Równocześnie po zakończeniu badań określono stężenie suchej masy w próbach ( $55^{\circ}\text{C}$  – suszenie do stałej masy).

Stopień dekoloryzacji określono z zależności:

$$U = \left(1 - \frac{P}{K}\right) * 100\% \quad (2.2)$$

gdzie:

U – usunięcie barwnika [%],

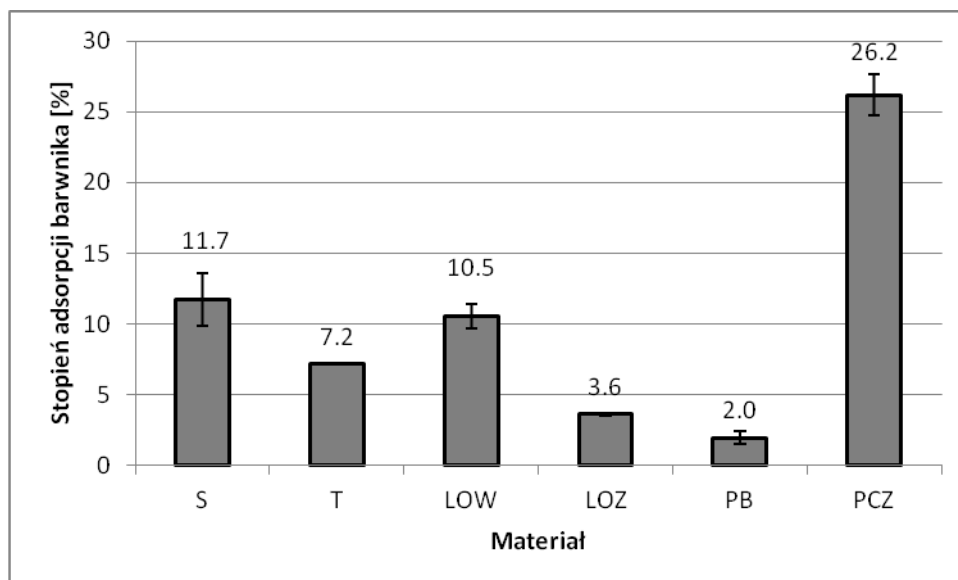
P – stężenie RBBR w próbce badawczej po danym czasie.

K – stężenie RBBR w kontroli barwnikowej.

### 3. Omówienie i dyskusja wyników

#### 3.1. Określenie stopnia adsorpcji barwnika na nośniku

Stopień adsorpcji RBBR na nośnikach biomasy przedstawiono na rys. 3.1.1.



Rys. 3.1.1. Adsorpcja barwnika na materiale nośnikowym po 4 godzinach ekspozycji (S – siano, T – trociny, LOW – łupiny orzecha włoskiego, LOZ – łupiny orzecha ziemnego, PB – peski brzoskwiń, PCZ – pestki czereśni).

W ciągu 4 godzin eksperymentu stwierdzono nieznaczny ubytek barwy w próbach. Najwyższy stopień adsorpcji barwnika stwierdzono na sianie (11,7%), łupinach orzecha włoskiego (10,5%) oraz trocinach (7,2%). W przypadku pozostałych nośników adsorpcja barwników nie przekraczała 4 %. Niski stopień adsorpcji tego barwnika przez materiały może wynikać z jego właściwości. RBBR podczas procesów barwienia tkanin jest

wiązany przez ich włókna w 75-80%, co powoduje, iż znaczne jego ilości trafiają do ścieków. Jednocześnie stwierdzono, iż należy do barwników słabo podatnych na degradację. Jego czas półrozpadu w wodzie określa się nawet na 46 lat przy pH 7 i temperaturze 25°C. Ze względu na takie właściwości stał się materiałem wyjściowym do syntezy barwników polimerowych, trwałych i silnie toksycznych. Ponadto RBBR należy do barwników odpornych na utlenianie chemiczne, co ma ścisły związek z jego antrachinową strukturą [35-37].

### 3.2. Dobór nośnika biomasy

Wyniki testu zasiedlania nośników przez grzybnię przedstawiono w tabeli 3.2.1. Pomiary przyrostu biomasy w ciągu 8 dni dały wyniki ujemne w przypadku wszystkich prób. Wszystkie zastosowane nośniki są dla grzybów zgnilizny drewna źródłem węgla i energii. Stąd też przyrost biomasy jest wypadkową wzrostu biomasy na nośnikach i ubytku substratu. Ponieważ nośnik jest przerastany przez grzybnię niemożliwe jest, aby w pełni ocenić stężenie suchej biomasy grzyba w próbach. Jednocześnie obserwowano intensywny wzrost grzybni na sianie, trocinach, trochę słabszy na łupinach orzecha ziemnego i niewielki na łupinach orzecha włoskiego. Pestki, zarówno czereśni, jak i brzoskwiń, właściwie nie nadają się jako nośnik biomasy. W przypadku pestek czereśni wzrost był obserwowany w podłożu, a nie na nośniku. W przypadku brzoskwiń wzrostu w ogóle nie obserwowano. Można to wiązać z faktem, że pestki czereśni, a szczególnie brzoskwiń zawierają duże ilości amidaliny, której produktem rozpadu jest silna trucizna - cyjanowodor, cyjanki zaś w obecności siarki (która była obecna w podłożu hodowlanym) mogą tworzyć również toksyczne rodanki [38]. Cyjanki mogą również usuwać wszystkie atomy miedzi z lakazy powodując zatrzymanie jej aktywności enzymatycznej.

Tabela. 3.2.1. Intensywność wzrostu grzybni na nośniku

Nośnik	S	T	LOW	LOZ	PB	PCZ
Przyrost biomasy w ciągu 8 dni [g/l] (z odchyleniem standardowym)	-0,032 ±0,0024	-0,008 ±0,0003	-0,088 ±0,0015	-0,022 ±0,0010	0±0	-0,092 ±0,0031
Intensywność wzrostu biomasy na nośniku - obserwacje	++++	++++	++	+++	--	-

++++ intensywny wzrost; +++ średni wzrost; ++ słaby wzrost; + bardzo słaby wzrost, - wzrost tylko w podłożu, -- brak wzrostu.

### 3.3. Określenie potencjału dekoloryzacyjnego szczepu AWSP85

Wyniki obserwacji dekoloryzacji podłoży stałych z udziałem szczepu *C. gallica* przedstawiono w tabeli 3.3.1. W przypadku obu podłoży po 1 dobie inkubacji dekoloryzacja ograniczała się jedynie do podłoża pod grzybnię. Na podłożu MEA, bogatym w składniki odżywcze, pierwsze strefy przejaśnienia były wyraźnie widoczne już po dwóch dobach. Najwyższy współczynnik dekoloryzacji zaobserwowano jednak dopiero po 3 dniach ( $D=1,62$ ). Płytki zostały całkowicie odbarwione, a jednocześnie przerośnięte grzybnię po 6 dobach. Na podłożu MSB wzrost grzybni był wolniejszy, co wynika z uboższego składu, związanego głównie z mniejszą ilością azotu i węgla. W 4 dobie współczynnik dekoloryzacji osiągnął wartość 1,72. W pozostałych dniach grzybnia intensywnie rosła, nie obserwowano jednak zwiększania się stref odbarwienia. Obecność przejaśnień na podłożu potwierdza, iż badany szczep ma zdolność rozkładu antrachinowego RBBR.

Tabela. 3.3.1. Współczynnik dekoloryzacji RBBR (D) na różnych podłożach

Doby inkubacji	1	2	3	4	5	6	7
D (MEA)	1,0±0	1,56±0,02	1,62±0,03	1,34±0,01	1,12±0,01	NB	NB
D (MSB)	1,0±0	1,36±0,03	1,55±0,02	1,72±0,01	1,23±0,01	1,07±0,01	1,0±0

NB – nie wyznaczono z powodu przerośnięcia płytki przez grzybnię

Podobne, jak wykonane w tej pracy, testy są często spotykane w literaturze przy określaniu zdolności dekoloryzacji barwników z udziałem różnych mikroorganizmów. W przypadku badanego przez Eichlerovą i wsp. [39] szczepu zaliczanego do rodzaju *Pleurotus* pełna dekoloryzacja dodanego do podłoża oranż G oraz RBBR zachodziła dopiero po 12-28 dniach inkubacji płytek. Powyższe badania potwierdzają, iż efektywność dekoloryzacji jest zależna od składu podłoża. Do podobnych wniosków doszedł zespół Novotny i wsp. [40]. Pewne z barwników wykorzystanych w ich badaniach były lepiej usuwane, gdy grzybnia rosła na podłożach



bogatych w azot, inne na podłożach uboższych w ten składnik. Autorzy podkreślili, iż największe różnice obserwowano właśnie w przypadku barwników antrachinonowych, do których zaliczany jest RBBR [40].

### 3.4. Określenie wpływu zastosowanego nośnika biomasy na efektywność dekoloryzacji RBBR

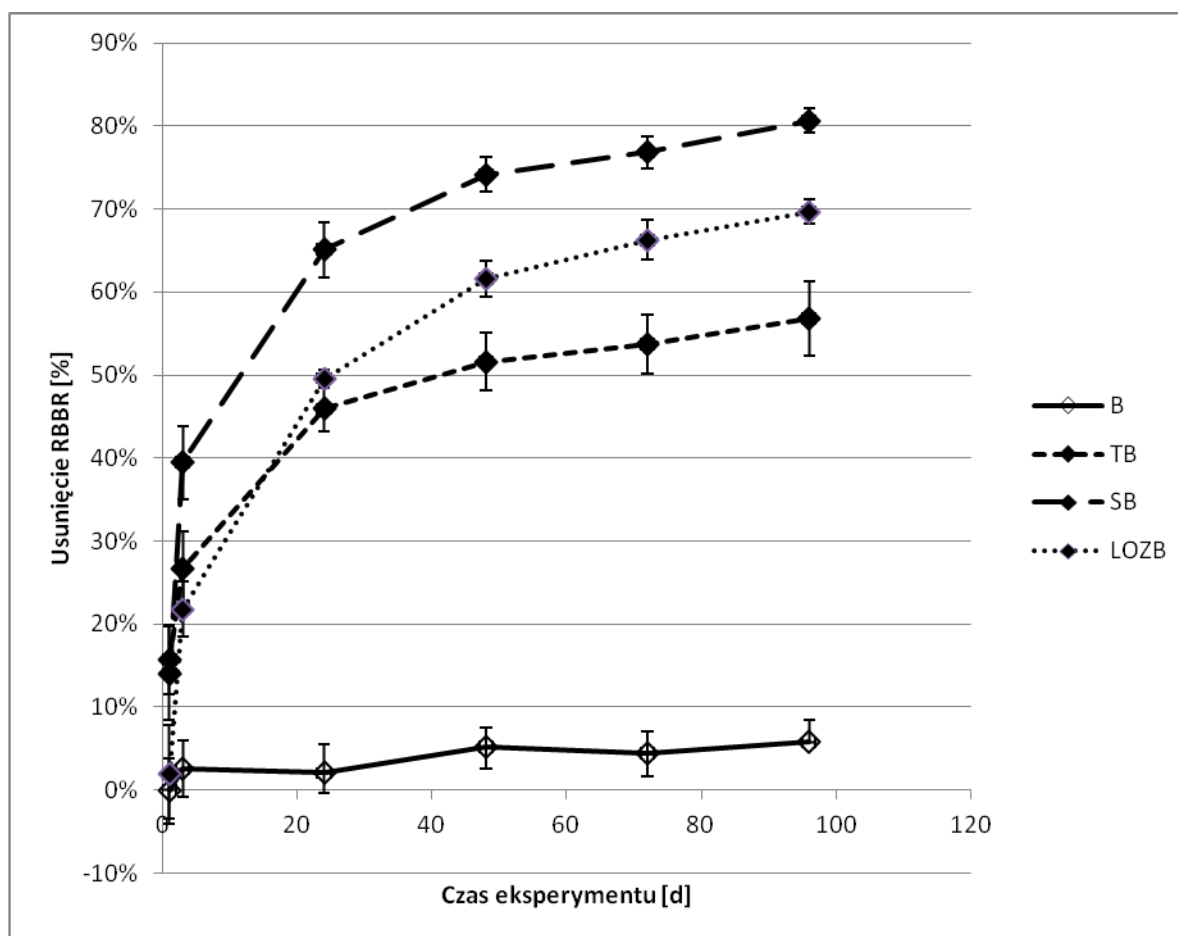
*Corioloopsis gallica* należy do grzybów, którym poświęcono do tej pory niewiele uwagi [41-43]. Gatunek ten należy do grzybów zgnilizny drewna i produkuje znaczne ilości lakazy oraz peroksydazę Mn-zależną [43]. Są to jedne z głównych enzymów, biorących udział w dekompozycji złożonych substratów, w tym barwników syntetycznych [3; 26-31].

Na rys. 3.4.1 przedstawiono efektywność dekoloryzacji RBBR. W przypadku grzybni zawieszanej w ubytek barwy był nieznaczny. Po 1 h eksperymentu barwa była zbliżona do kontroli, po 24 h zabarwienie zostało zredukowane zaledwie w 2,5%, a po 96 h eksperymentu usunięcie barwy wyniosło 5,75%. Immobilizacja grzybni na nośniku pozwoliła na usunięcie barwy z podłoża nawet w 40% (grzybnia immobilizowana na sianie) już po 3 h eksperymentu. Po 24 h dekoloryzacja była na poziomie 45,9%, 65,14% i 49,6% odpowiednio w próbach z grzybnią immobilizowaną na trocinach, sianie i łupinach orzecha włoskiego. Po 96 h eksperymentu z prób usunięto odpowiednio 56,8%, 80,7% i 69,7% RBBR.

Równolegle przeprowadzono badania sorpcji RBBR na użytych do immobilizacji nośnikach. Wyniki sorpcji RBBR po 96 h przedstawiono w tabeli 3.4.1. Najwyższy stopień sorpcji obserwowano dla trocin (58,8%), a najniższy dla siana (33,3%). Wyniki wskazują zatem, iż proces dekoloryzacji jest wypadkową sorpcji i biotransformacji. Właściwości sorpcyjne użytych nośników nie decydują o ostatecznym wyniku dekoloryzacji przez immobilizowaną na nich biomasę. Pomimo najniższej sorpcji RBBR na samym sianie (33,3%) w próbach z grzybnią immobilizowaną usunięcie było najwyższe (80,7%). Sorpcja na poziomie 55,8% w przypadku trocin nie przełożyła się na wysoki poziom dekoloryzacji z próbach z immobilizowaną biomasą (56,8%).

Badania przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają wyniki uzyskane przez Kenkebashvili i wsp. [43]. Stwierdzili oni, iż obecność otrębów pszennych w podłożu stymuluje produkcję enzymów ligninolitycznych, a szczególnie wyraźnie jest to widoczne w przypadku obecności w podłożu RBBR. Obecność substratu ligninocelulozowego stymuluje zwłaszcza aktywność peroksydazy Mn-zależnej. Usunięcie barwy spowodowanej RBBR sięgało nawet 90% w ciągu 24 h, przy czym do podłoża dodano 0,2% barwnika [43]. Podobne badania z użyciem *C. gallica* przeprowadził zespół Daâssi i wsp. [41]. Udowodniono, iż immobilizowana na alginianie grzybnia *C. gallica* może usunąć nawet 88,7% barwnika Lanaset Grey G (LG) po 72 h, kiedy jego koncentracja w podłożu wynosi 0,15 g/l. Unieruchomienie grzybni pozwoliło po 3 cyklach pracy uzyskać w dalszym ciągu 75% redukcję barwy [41].

Daâssi i wsp. [42] wykorzystali w swoich badaniach również lakazę pozyskaną z tego gatunku grzyba, unieruchomioną w alginianie wapnia, do dekoloryzacji RBBR oraz barwników azowych Reactive Black 5 (RB5), Bismark Brown R (BBR) i Lanaset Grey G (LG). Wyraźnie wyższe wyniki dekoloryzacji uzyskano w przypadku enzymu immobilizowanego, aniżeli w przypadku enzymu wolnego. Dekoloryzacja RBBR zachodziła najbardziej intensywnie, natomiast pozostałe barwniki były usuwane w znacznie mniejszym stopniu, szczególnie dotyczyło to metalicznego LG. Aby proces zachodził intensywnie konieczne było dostarczenie mediatora w postaci 1-hydroxybenzotiazolu. Uzyskano ponad 80% usunięcie RB5 i BBR po 24h, natomiast podobny wynik uzyskano w przypadku RBBR już po 2h kontaktu [42]. Yagüe i wsp. [44] wykorzystali *C. gallica* do dekoloryzacji ścieków browarnianych bogatych w związki taninowe, nadające im intensywną barwę. Udało się uzyskać usunięcie 50% barwy w ciągu 12 dni, a mechanizm usunięcia barwy związany był najprawdopodobniej z biodegradacją, nie obserwowano bowiem adsorpcji barwników na powierzchni grzybni.



Rys. 3.4.1. Efektywność dekoloryzacji RBBR w zależności od nośnika biomasy i w próbie z biomasą zawieszoną (B – biomasa zawieszona; TB – biomasa immobilizowana na trocinach; SB – biomasa immobilizowana na sianie; LOZB – biomasa immobilizowana na łupinach orzecha ziemnego).

Tabela. 3.4.1. Sorpcja barwnika na nośnikach użytych do immobilizacji biomasy po 96h.

Materiał	trociny	siano	Łupiny orzecha ziemnego
Sorpcja [%] po 96h	55,80±2,12	33,25±1,56	48,44±4,09

W trakcie badań zaobserwowano, iż stężenie biomasy zawieszonej w podłożu było 10 krotnie niższe aniżeli na łupinach orzecha ziemnego. W przypadku pozostałych dwóch prób ilość biomasy była niższa, jednak należy pamiętać, że jest to wypadkowa przyrostu biomasy i rozkładu nośnika, który dla tej grupy grzybów mógł być łatwiej przyswajalnym źródłem węgla i energii aniżeli łupiny orzecha.

Przedstawione powyżej wyniki (rys. 3.2) potwierdzają, iż immobilizowany szczep AWSP85 jest zdolny do efektywnego usuwania barwy. Podobną efektywność uzyskali w swoich badaniach również inni autorzy. Dekoloryzacja RBBR była również badana przez Siri i wsp. [45]. *Trametes versicolor* usuwał RBBR w ponad 50% w zaledwie 3 h i w ponad 85% po 6 godzinach inkubacji. Immobilizowane na odpadach szczepy wykorzystał w swoich badaniach zespół Tychanowicz i wsp. [46]. *Pleurotus pulmonaris* immobilizowany na kolbach kukurydzy całkowicie zdekoloryzował w zaledwie 6 dni azową czerwień Konga, błękit trypanowy, fiolet etylowy, i brylantowy, zieleń metylową i RBBR.

#### 4. Wnioski

Przeprowadzone badania wskazują, iż odpady naturalne takie jak siano, trociny, czy łupiny orzecha ziemnego są dobrym nośnikiem biomasy grzybów. W przypadku pestek owoców stwierdzono brak kolonizacji powierzchni nośnika przez grzybnie, co może być wynikiem uwalniania amigdaliny. Immobilizacja testowanego szczepu *Corioloropsis gallica* AWSP85 na wybranych nośnikach wpłynęła pozytywnie na efektywność dekoloryzacji antrachinonowego RBBR. Najlepsze efekty uzyskano w przypadku szczepu immobilizowanego na sianie (po 96 h >80%) pomimo najniższej wartości sorpcji dla samego nośnika (33,2%). Proces dekoloryzacji w tym przypadku jest zatem wypadkową sorpcji i biodegradacji. Ocena stopnia adsorpcji na nośniku i zdolność jego kolonizacji nie jest wystarczającym wskaźnikiem jego wykorzystania do efektywnej dekoloryzacji.

#### Literatura

1. Banat I. M., Nigam P., Singh D., Marchant R. (1996). Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review. *Bioresource Technology* 58:217–227.
2. Asgher M., Shah S.A.H., Ali M., Legge R.L. (2006). Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World J Microbiol Biotechnol.* 22:89-93
3. Rodriguez-Couto S. (2009). Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances* 27:227-235.
4. Knapp J.S., Newby P.S., Reece L.P. (1995). Decolorization of wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb Technol.* (17):664-668.
5. Crini G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Bioresour Technol.* 97:1061–1085.
6. Gao J., Zhang Q., Su K., Chen R., Peng Y. (2010a). Biosorption of Acid Yellow 17 from aqueous solution by non-living aerobic granular sludge. *J Hazard Mater.* 174:215–225.
7. Kurniawan A., Kosasih A.N., Febrianto J., Ju Y.-H., Sunarso J., Indraswati N., Ismadji S. (2011). Evaluation of cassava peel waste as lowcost biosorbent for Nisorption: equilibrium, kinetics, thermodynamics and mechanism. *Chem Eng J.* 172:158–166.
8. Slokar Y. M., Le Marechal A.M. (1998). Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes and Pigments* 37:335-356.
9. Piccin J.S., Vieira M.L.G., Goncalves J.O., Dotto G.L., Pinto L.A.A. (2009). Adsorption of FD&C Red No. 40 by chitosan: isotherms analysis. *J Food Eng.* 95:16–20.
10. Dotto G.L., Pinto L.A.A. (2011). Adsorption of food dyes onto chitosan: optimization process and kinetic, *Carbohydr Polym.* 187:164–170.
11. McKay G., Blair H.S., Gardner J.R. (1982). Adsorption of dyes on Chitin: 1-Equilibrium studies. *J Appl Poly Sci* 27:3043–57.
12. Low K., Lee C., Tan B. (2000). Quarternized wood as sorbent for reactive dyes. *Appl Biochem Biotechnol.* 87:233–245.
13. Nawar S.S., Doma H.S. (1989). Removal of dyes from effluents using low cost agricultural by products. *The Sci Tot Environ* 79:271-9.
14. Sepúlveda L., Fernández K., Contreras E., Palma C. (2004). Adsorption of dyes using peat: equilibrium and kinetic studies. *Environ Technol.* 25:987–996.
15. Ab-El-Thalouth I., Kamel M.M., Haggag K., El-Zawahry M. (1993). Utilizing sugarcane bagasse pulp and carbomoyl ethyl derivatives as direct dye absorbent. *Am Dyes Rep.* 82:36–41.
16. Asfour H.M., Nassar M.M., Fadali D.A., El-Geundi M.S. (1985). Colour removal from textile effluents using hardwood saw dust as an adsorbent. *J Chem Tech Biotech.* 35A:28–35.
17. Garg V.K., Gupta R., Yadav A.B., Kumar R. (2003). Dye removal from aqueous solution by adsorption on treated sawdust. *Bioresour Technol.* 89:121–124.



18. Namasivayam C., Muniasamy N., Gayarti K., Rani M., Ranganathan K. (1996). Removal of dyes from aqueous solutions by cellulosic waste Orange peel. *Bioresource Technology* 57:37-43.
19. Namasivayam C., Kanchana N., Yamuna R.T. (1993). Waste banana pith as adsorbent for removal of rhodamine-B from aqueous solution. *Waste Managm.* 14:89-95.
20. Namasivayam C., Prabha D., Kumutha M. (1997). Removal of dyes by adsorption on to agricultural solid waste. *Bioresource Technol.* 62:123-7.
21. Namasivayam C., Dinesh Kumar M., Selvi K., Begum R.A., Vanathi T., Yamuna R.T. (2001). 'Waste' coir pith—a potential biomass for the treatment of dyeing wastewaters. *Biomass and Bioenergy* 21:477–483.
22. Sivaraj R., Namasivayam C., Kadirvelu K. (2001). Orange peel as an adsorbent in the removal of acid violet 17 (acid dye) from aqueous solutions. *Waste Manag.* 21(1):105-10.
23. Piccin J.S., Gomes C.S., Feris L.A., Gutterres M. (2012). Kinetics and isotherms of leather dye adsorption by tannery solid waste. *Chemical Engineering Journal* 183:30-38.
24. Chabaane L., Tahiri S., Albizane A., Krati M.E., Cervera M.L., de la Guardia M. (2011). Immobilization of vegetable tannins on tannery chrome shavings and their use for the removal of hexavalent chromium from contaminated water. *Chem Eng J.* 174:310–317.
25. Fathima N.N., Aravindhan R., Rao J.R., Nair B.U. (2011). Stabilized protein waste as a source for removal of color from wastewaters. *J Appl Polym Sci.* 120:1397–1402.
26. Azmi W., Sani K.R., Banerjee U.C. (1998). Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb Technol.* 22:185-191.
27. Radha K.V., Regupathi A., Arunagiri A., Murugesan T. (2005). Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry* 40(10):3337-3345.
28. Eichlerova I., Homolka L., Nerud F. (2007). Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjercandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments* 75:38-44.
29. Jarosz-Wilkolazka A., Kochmańska-Rdest J., Malarczyk E., Wardas W., Leonowicz A. (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30:566-572.
30. Kaushik P., Malik A. (2009). Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environment Int* 35:127-141.
31. Khan R., Bhawana P., Fulekar M.H. (2013) Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12:75–97. doi 10.1007/s11157-012-9287-6.
32. Iqbal M., Saeed A. (2007). Biosorption of reactive dye by loofa sponge – immobilized fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 42:1160-1164.
33. Gao D., Du L., Yang J., Wu W., Liang H. (2010b). A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology* 30:70-77.
34. Castillo-Carvajal L., Ortega-González K., Barragán-Huerta B.E., Pedroza-Rodríguez A.M. (2012). Evaluation of three immobilization supports and two nutritional conditions for reactive black 5 removal with *Trametes versicolor* in air bubble reactor. *African Journal of Biotechnology* 11(14):3310-3320.
35. Memon F.N. i Memon S. (2012). Calixarenes: A Versatile Source for the Recovery of Reactive Blue-19 Dye from Industrial Wastewater. *Pak J. Anal. Environ. Chem.* Vol. 13, No. 2:148-158.
36. Palmieri G., Cennamo G., Sannia G. (2005). Remazol Brilliant Blue R decolourization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 36:17-24.
37. Rezaee A., Ghaneian M. T., Khavanin A., Hashemian S. J., Moussavi Gh., Ghanizadeh Gh., Hajizadeh E. (2008). Photochemical oxidation of reactive blue 19 dye in textile wastewater by UV/K2S2O8 process. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering* 5(2):95-100.
38. Bolarinwa I.F., Orfila C., Morgan M.R.A. (2014). Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry* 52:133-139.

39. Eichlerova I., Homolka Ā.L., Nerud Ā.F. (2006). Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinotum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:759–766.
  40. Novotny Ā., Svobodova K., Kasinath A., Erbanova P. (2004). Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodet. and Biodegr.* 54(2-3):215-223.
  41. Daāssi D., Mechichi T., Nasri M., RodrĀguez-Couto S. (2013). Decolorization of the metal textile dye Lanaset Grey G by immobilized white-rot fungi. Find all citations in this journal (default). *Journal of Environmental Management* 129:324-332.
  42. Daāssi D., RodrĀguez-Couto S., Nasri M., Mechichi T. (2014). Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation* 90: 71-78 doi:10.1016/j.ibiod.2014.02.006
  43. Kenkebashvili N., Elisashvili V., Wasser S.P. (2012). Effect of Carbon, nitrogen sources, and copper concentrations on the ligninolytic enzyme production by *Coriopsis gallica*. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology* 1(2):22-27.
  44. YagĀe S., TerrĀn M.C., Gonzālez T., Zapico E., Bocchini P., Galletti G.C., Gonzālez A.E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14(10):905-910.
  45. Siri A.A., Tachibana S., Muryanto. (2012). Correlation of ligninolytic enzymes from a newly found species of *Trametes versicolor* U97 with RBBR decolorization and DDT degradation. *Water Air and Soil Pollution* 223:5781-5792.
  46. Tychanowicz G.K., Zilly A., Marquez de Souza C.G., Peralta R.M. (2004). Decolorization of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonaris*. *Process Biochem* 39:855–859.
-