

Ewa ZABŁOCKA-GODLEWSKA<sup>1\*</sup> i Wioletta PRYZYTAŚ<sup>1</sup>

## POZYSKIWANIE BAKTERII WYKAZUJĄCYCH ZDOLNOŚĆ DEKOLORYZACJI BARWNIKÓW AZOWYCH

### OBTAINING OF BACTERIA WITH THE ABILITIES OF DECOLOURIZATION OF AZO DYES

**Abstrakt:** Barwniki azowe to najliczniejsza i najczęściej stosowana grupa barwników syntetycznych. W większości są to substancje odporne na działanie czynników fizycznych, chemicznych oraz biologicznych, co wpływa na trudności w efektywnym ich usuwaniu ze ścieków i stwarza ryzyko ich przenikania do środowiska wodnego. Badania nad zwiększeniem sprawności konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków barwnych obejmują m.in. pozyskiwanie mikroorganizmów o wysokim potencjale dekoloryzacyjnym, które można będzie wykorzystać np. do bioaugmentacji układów biologicznego oczyszczania. Celem badań był screening bakterii wykazujących zdolność dekoloryzacji dwóch barwników azowych (błękitu Evansa (BE), czerwieni Kongo (CK)). Mikroorganizmy izolowano ze ścieków komunalnych, kompostu oraz spróchniałego drewna bukowego. W pierwszym etapie izolacji wykorzystano podłoża stałe (mineralne i agar odżywczy) suplementowane barwnikami należącymi do dwóch grup chemicznych (disazowy błękit Evansa (BE), trifenylometanowa zieleń brylantowa (ZB)). Izolaty kilkakrotnie pasażowano w celu potwierdzenia ich czystości i potencjału dekoloryzacyjnego. W drugim etapie badań zastosowano hodowlę płynną na podłożu bulion odżywczy zawierającym barwniki syntetyczne (BE lub CK) w stężeniu 0,1 g/dm<sup>3</sup>. Pomiar spektrofotometryczny prób po dekoloryzacji posłużył do określenia zawartości barwników i obliczenia ich procentowego usunięcia. Wykazano, że wszystkie wykorzystane materiały mogą stanowić źródło pozyskiwania bakterii dekoloryzujących. Największą ich liczbę izolowano ze ścieków komunalnych, następnie kompostu i próchna. Bardziej skomplikowany strukturalnie BE był efektywniej usuwany przez bakterie niż CK. Większą efektywność dekoloryzacji wykazywały szczepy izolowane na podłożu mineralnym. Spośród nich 3 izolowane na podłożu MM charakteryzowały się szczególnymi właściwościami, usuwały zadane barwniki już po 48 h hodowli z efektywnością przekraczającą 90 %.

**Słowa kluczowe:** barwniki syntetyczne, barwniki azowe, błękit Evansa, czerwień Kongo, bakterie, screening, dekoloryzacja

### Wprowadzenie

Współczesny konsument ma wysokie wymagania związane z estetyką produktu. Dążenie do zaspokojenia tych oczekiwań przyczyniło się do wzrostu zapotrzebowania na barwniki syntetyczne. Powszechność ich stosowania jest związana z łatwością produkcji i niskimi jej kosztami oraz oferowaną szeroką gamą kolorystyczną [1, 2]. Wśród tych substancji najliczniejszą i najczęściej stosowaną grupą są barwniki azowe, obejmujące ponad 3000 różnych związków, wagowo stanowiących około 70 % globalnie stosowanych barwników syntetycznych [3, 4].

Powszechne stosowanie barwników azowych, w większości odpornych na działanie czynników fizycznych, chemicznych oraz biologicznych, stwarza ryzyko ich przenikania do ekosystemów wodnych i pogarszania biologicznych i fizykochemicznych właściwości. Jest to wynikiem trudności efektywnego usuwania tych substancji ze ścieków [1, 4, 5].

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice, tel. 32 237 28 55

\* Autor do korespondencji: ewa.zablocka-godlewska@polsl.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 19, Polanica-Zdrój, 9-12.10.2019

W eliminacji zanieczyszczeń barwnikowych stosuje się różnorodne metody. Zadowalające wyniki uzyskuje się w przypadku metod fizycznych i chemicznych (np. flokulacja, koagulacja, sorpcja, strącanie, utlenianie, metody membranowe i inne). Powszechnie zastosowanie ich jest jednak ograniczone ze względu na wysokie koszty oraz generowanie dużych ilości osadów stanowiących trudny do zagospodarowania odpad niebezpieczny [5, 6]. Powszechnie stosowanymi metodami usuwania barwników ze ścieków są biologiczne metody, prowadzone w różnych warunkach i przy wykorzystaniu różnych organizmów [1-3, 5-10]. Są to procesy bezpieczne środowiskowo, atrakcyjne ze względów finansowych, dające szerokie możliwości, zwłaszcza w przypadku wykorzystania mikroorganizmów, które cechują się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi. Złożony, zmienny i często toksyczny charakter ścieków barwnych sprawia, że najczęściej stosowane konwencjonalne metody biologicznego oczyszczania ścieków barwnych, oparte na technologii osadu czynnego, wykazują efektywność niższą od oczekiwanej. Istotnym czynnikiem wpływającym na sprawność tych procesów, oprócz warunków ich prowadzenia, jest odpowiedni skład mikroflory zaadaptowanej do obecności tych specyficznych zanieczyszczeń [1, 5, 7]. W celu poprawy efektywności konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków barwnych prowadzi się badania ukierunkowane na pozyskiwanie mikroorganizmów o wysokim potencjale dekoloryzacyjnym, które można będzie wykorzystać jako czynnik wzbogacający i wspomagający w istniejących już układach biologicznego oczyszczania [11-13]. Celem badań był screening bakterii wykazujących wysoki potencjał dekoloryzacyjny względem dwóch barwników disazowych (błękitu Evansa (BE), czerwieni Kongo (CK)).

## Metodyka badań

### *Barwniki wykorzystane w badaniach*

W badaniach screeningowych wykorzystano 3 barwniki syntetyczne: dwa barwniki azowe (disazowy błękit Evansa (BE) i czerwień Kongo (CK)) oraz jeden barwnik należący do grupy trifenylometanów - zieleń brylantowa (ZB). Wszystkie barwniki zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Charakterystykę barwników łącznie z eksperymentalnie wyznaczonymi właściwościami spektralnymi (spektrofotometr UV-VIS Hitachi 1900) przedstawiono w tabeli 1.

Wykorzystane w badaniach roztwory wodne barwników przygotowano w jałowej wodzie destylowanej. Roztwory przed użyciem poddano sterylizacji mechanicznej z użyciem celulozowych filtrów strzykawkowych (średnica porów 0,2  $\mu\text{m}$ ). W sterylnych roztworach przy odpowiedniej długości fali określono spektrofotometrycznie (spektrofotometr UV-VIS Hitachi 1900) rzeczywiste stężenie barwników. Tak przygotowane roztwory wyjściowe przechowywano w lodówce w szczelnie zamkniętych butelkach z ciemnego szkła.

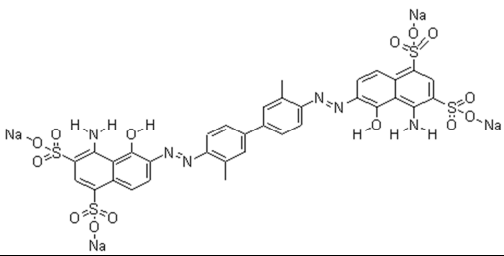
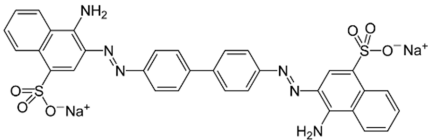
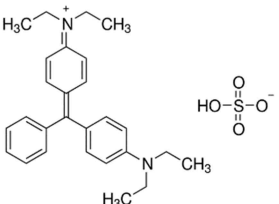
Jałowe roztwory barwników wprowadzano do mikrobiologicznych podłoży hodowlanych w objętościach pozwalających na uzyskanie stężenia wyjściowego barwników na poziomie 0,1  $\text{g}/\text{dm}^3$ .

Tabela 1

Barwniki użyte w badaniach - charakterystyka (opracowano na podstawie [14])

Table 1

Dyes used in the study - characteristics (based on [14])

<b>Barwniki azowe</b>			
Błękit Evansa			
			
Wzór cząsteczkowy: C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>4</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	Masa cząsteczkowa: 960,79 g/mol	Nr C.I.: 23860	Długość fali λ <sub>max.</sub> = 606 nm
Czerwień Konga			
			
Wzór cząsteczkowy: C <sub>32</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Masa cząsteczkowa: 696,67 g/mol	Nr CAS.: 573-58-0	Długość fali λ <sub>max.</sub> = 490 nm
<b>Barwnik trifenylometanowy</b>			
Zieleń brylantowa			
			
Wzór cząsteczkowy: C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Masa cząsteczkowa: 482,63 g/mol	Nr C.I.: 42040	Długość fali λ <sub>max.</sub> = 624 nm

*Podłoża hodowlane i roztwory*

Izolację bakterii wykazujących potencjał dekoloryzacyjny, oczyszczanie wyizolowanych szczepów i badania potwierdzające ich zdolność do usuwania barwników prowadzono na dwóch różnych, zestalonych agarach podłożach mikrobiologicznych, wzbogaconych zielenią brylantową lub błękitem Evansa (stężenie barwnika w podłożu 0,1 g/dm<sup>3</sup>). Zastosowano agar odżywczy (BTL) oraz podłoże mineralne minimalne MM (skład [g/dm<sup>3</sup>]: 1,75 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,75 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,025 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,25 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 g agar-agar). Podłoża poddano sterylizacji w autoklawie (121 °C przez 15 min). Do gorących, sterylnych podłoży mikrobiologicznych wprowadzono jałowe roztwory barwników (ZB lub BE) w objętościach pozwalających na uzyskanie ich wyjściowych

stężeń na poziomie  $0,1 \text{ g/dm}^3$ . Tak przygotowane podłoża rozlano na sterylne płytki Petriego i pozostawiono do zastygnięcia.

Wyziolowane szczepy bakterii przechowywano i namnażano w probówkach na skosach z agaru odżywczego (BTL).

Drugi etap screeningu prowadzono na płynnym podłożu bulion odżywczy (BTL). Podłoże przed użyciem poddano sterylizacji w autoklawie ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 15 minut).

W celu przygotowania roztworów do posiewów materiał wyjściowy (ścieki, kompost, próchno bukowe) rozcieńczano w jałowej soli fizjologicznej (0,85 % wodny roztwór NaCl).

#### *Materiał wyjściowy - przygotowanie oraz izolacja bakterii dekoloryzujących*

Bakterie dekoloryzujące izolowano z trzech różnych materiałów wyjściowych, których cechą wspólną była obecność aktywnych bakterii uczestniczących w dekompozycji materii organicznej. Do izolacji wybrano:

- ścieki komunalne pobrane z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków w Bytomiu (S);
- kompost pobrany z przydomowego kompostownika (K);
- próchno drzewa bukowego, pobrane z lasu mieszanego w Bargłowie (P).

Materiał wyjściowy poddano obróbce przygotowawczej (kompost przesiano przez sita o średnicy oczek 2 mm, próchno bukowe rozdrobiono i również przesiano przez sita). Z przygotowanego wstępnie materiału wyjściowego oraz ścieków wykonano serię rozcieńczeń w jałowej soli fizjologicznej (w zakresie: ścieki i kompost:  $10^{-1}$ - $10^{-9}$ , próchno bukowe:  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ ). Rozcieńczone próby posiano metodą powierzchniową w dwóch seriach:

Seria I - posiew na podłoże agar odżywczy wzbogacony ZB lub BE;

Seria II - posiew na agar MM wzbogacony ZB lub BE.

Płytki z materiałem biologicznym inkubowano w szafie termostatycznej (w temp.  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 96 h). Po inkubacji dokonano izolacji bakterii wykazujących zdolność usuwania barwników obecnych w podłożach. Wybrano kolonie, wokół których obserwowano wyraźne strefy przejaśnienia (odbarwienia podłoża) i/lub intensywne zabarwienie biomasy odpowiadające kolorowi obecnemu w podłożu barwnika. W celu oczyszczenia i potwierdzenia zdolności dekoloryzujących wybrane kolonie pobrano i poddano pasażowaniu na podłożach o składzie identycznym z tym, na których bakterie te wyrosły. Tak wyizolowane szczepy przeniesiono na skosy agarowe w celu namnożenia biomasy.

Bakteriom przypisano kody literowo-cyfrowe w sposób określający źródło ich pozyskania oraz rodzaj barwnika i rodzaj podłoża hodowlanego, wykorzystanego do izolacji:

- S, K, P - bakterie izolowane odpowiednio ze ścieków komunalnych (S); kompostu (K); próchna bukowego (P);
- Z, B - rodzaj barwnika, którym suplementowano podłoże, z którego dokonano izolacji bakterii: Z - zieleń brylantowa; B - błękit Evansa;
- cyfra w kodzie - odpowiada liczbom porządkowym przypisanym kolejnym szczepom izolowanym z danego podłoża;

- „m” - bakterie izolowane na podłożu mineralnym minimalnym MM (kod zakończony cyfrą - bakterie wyizolowane na agarze odżywczym).

#### *Badania możliwości dekoloryzujących izolowanych szczepów*

Badano możliwości usuwania dwóch barwników azowych: błękitu Evansa (BE) i czerwieni Kongo (CK). Test próbówkowy wykonano z użyciem płynnego podłoża bulion odżywczy (każda próbówka zawierała 10 cm<sup>3</sup> podłoża). Dla każdego z badanych szczepów przygotowano dwie serie testu - jedną do określenia możliwości usuwania BE, drugą CK. Każdą serię wykonano w 4 powtórzeniach. Dla każdej serii nastawiono również próby kontrolne zawierające jedynie podłoże hodowlane i badane barwniki (próby niezaszczepiane biomasą). Przed przystąpieniem do testów przygotowano zawiesiny bakteryjne. W tym celu spłukano jałową solą fizjologiczną skosy z namnożoną, 48 h biomasą bakteryjną. Spłukaną biomasę poddano ocenie gęstości optycznej, wykorzystując wzorce McFarlanda. Gęstość optyczną wszystkich zawiesin bakteryjnych ustalono na poziomie 15 · 10<sup>8</sup> CFU/cm<sup>3</sup>. Probówki zawierające jałowe podłoże hodowlane inokulowano przygotowanymi wcześniej zawiesinami bakteryjnymi w objętości 0,1 cm<sup>3</sup>. Próby inkubowano w szafie termostatycznej (temp. 26 °C przez 48 h) w celu namnożenia biomasy. Do tak przygotowanych prób wprowadzono odpowiednie roztwory wyjściowe barwników (BE lub CK) w objętościach pozwalających na uzyskanie ich stężenia w próbce na poziomie 0,1 g/dm<sup>3</sup>. Po wprowadzeniu barwników próby ponownie poddano inkubacji w szafie termostatycznej (w temp. 26 °C przez 96 h). Co 24 godziny oceniano wizualnie postęp dekoloryzacji. Dla prób, w których stwierdzono wysoki poziom odbarwienia, pierwszy odczyt wykonano po 48 h. Końcowy odczyt wszystkich prób wykonano po upływie 96 h.

Po zakończeniu inkubacji, w celu określenia zawartości barwników w próbach, próbki odwirowano (5000 rpm/10 min). Zawartość barwników oceniano w uzyskanym supernatancie. Dokonano pomiarów spektrofotometrycznych (spektrofotometr UV-VIS Hitachi U-1900) przy odpowiednich długościach fal (BE - 606 nm; CK - 490 nm). Stężenie barwników w próbach obliczono w oparciu o przygotowane krzywe wzorcowe. Procentowe usunięcie barwnika  $U$  [%] obliczono, korzystając ze wzoru:

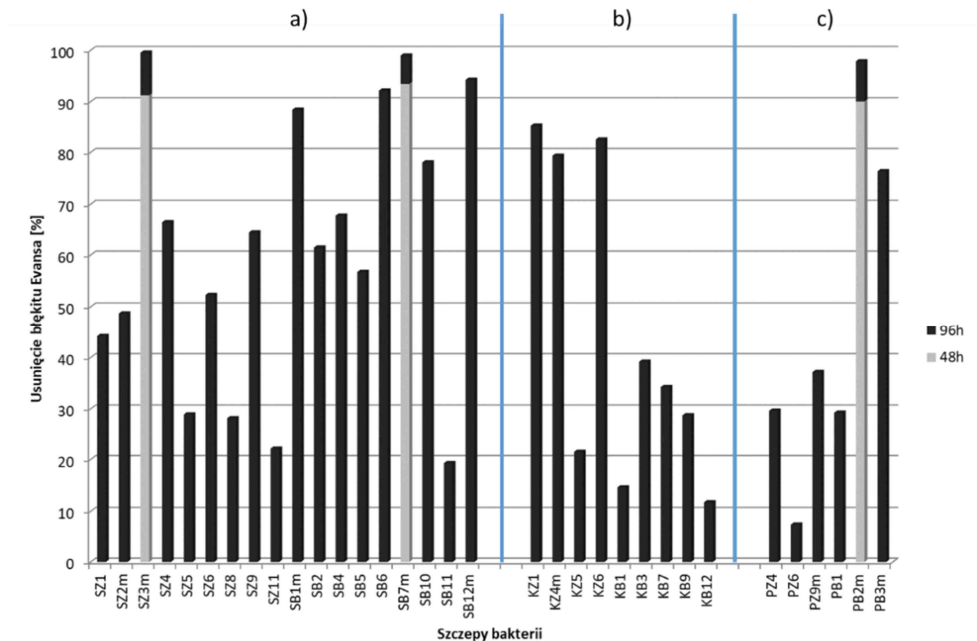
$$U = (K - B/K) \cdot 100 \%$$

gdzie:  $K$  - zawartość barwnika w próbce kontrolnej (pozbawionej biomasy) [mg/dm<sup>3</sup>];  
 $B$  - zawartość barwnika w próbce badawczej (zawierającej biomasę bakteryjną) [mg/dm<sup>3</sup>].

#### **Wyniki badań i ich dyskusja**

Ścieki barwne produkowane są przez różne branże przemysłu. Wytwórcą największych ich ilości jest jednak branża włókiennicza. Skład ścieków barwnych jest bardzo złożony i zmienny w zależności od aktualnego zapotrzebowania na substancje barwiące i inne, co stwarza problemy podczas ich oczyszczania. Większość stosowanych barwników syntetycznych to substancje stabilne chemicznie, odporne na działanie czynników biologicznych i fizykochemicznych, często toksyczne i mutagenne, stanowiące poważne zagrożenie zarówno dla ekosystemów wodnych, jak i całych sieci troficznych z nimi powiązanych. W najczęściej stosowanych biologicznych metodach oczyszczania

bardzo istotna jest obecność w układzie oczyszczania mikroorganizmów o dużych zdolnościach adaptacyjnych względem zmiennych warunków siedliskowych i jednocześnie posiadających możliwość efektywnego metabolizowania złożonych związków organicznych. Bioaugmentacja biologicznych systemów oczyszczania biopreparatami zawierającymi odpowiednio wyselekcjonowane drobnoustroje jest nadal obiecującą metodą wspomagania tych układów, mającą na celu zwiększenie efektywności usuwania zanieczyszczeń.

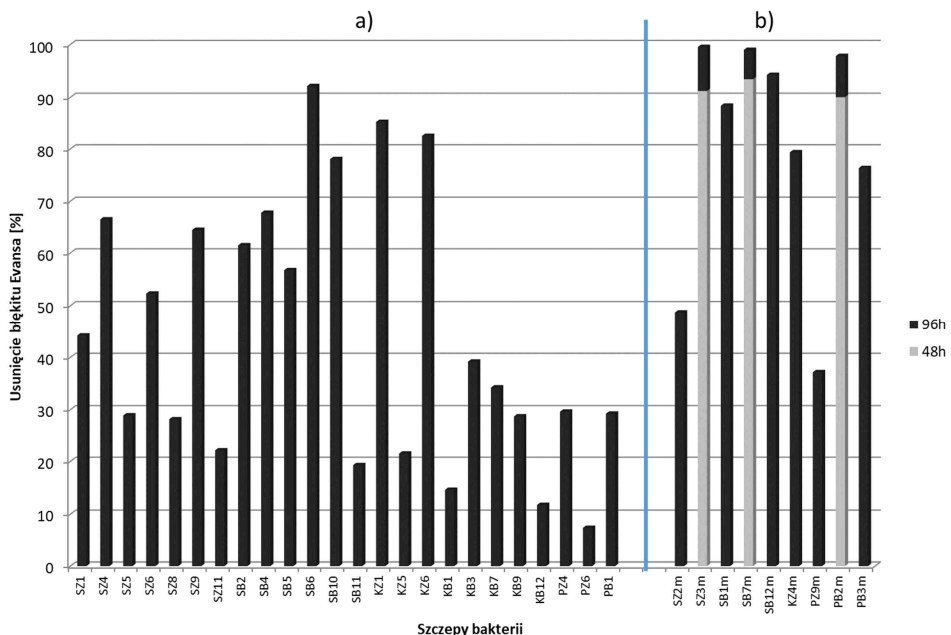


Rys. 1. Wyniki usunięcia błękitu Evansa przez szczepy bakteryjne izolowane z różnych materiałów źródłowych: a) ścieki, b) kompost, c) próchno

Fig. 1. Results of Evans blue removal by bacterial strains isolated from various source materials: a) sewage, b) compost, c) rotten wood

Przeprowadzone badania były ukierunkowane na izolację bakterii efektywnie usuwających barwniki syntetyczne. Prezentowane wyniki dotyczą oceny potencjału dekoloryacyjnego izolowanych bakterii względem dwóch barwników azowych: błękitu Evansa (BE) i czerwieni Kongo (CK). Bakterie wyizolowano z materiałów wyjściowych, których cechą wspólną były zachodzące w nich intensywne procesy biodegradacyjne, złożonej często z materii organicznej (np. związki ligninowe). Mikroorganizmy aktywne w procesach dekoloryzacji pozyskuje się najczęściej ze ścieków przemysłowych. Wykazano, że wartościowym źródłem pozyskiwania tych mikroorganizmów mogą być również inne materiały oraz że o sukcesie decyduje odpowiedni dobór czynników selekcyjnych. W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę pozyskania bakterii dekoloryzujących ze ścieków komunalnych, kompostu oraz próchna drzewa bukowego.

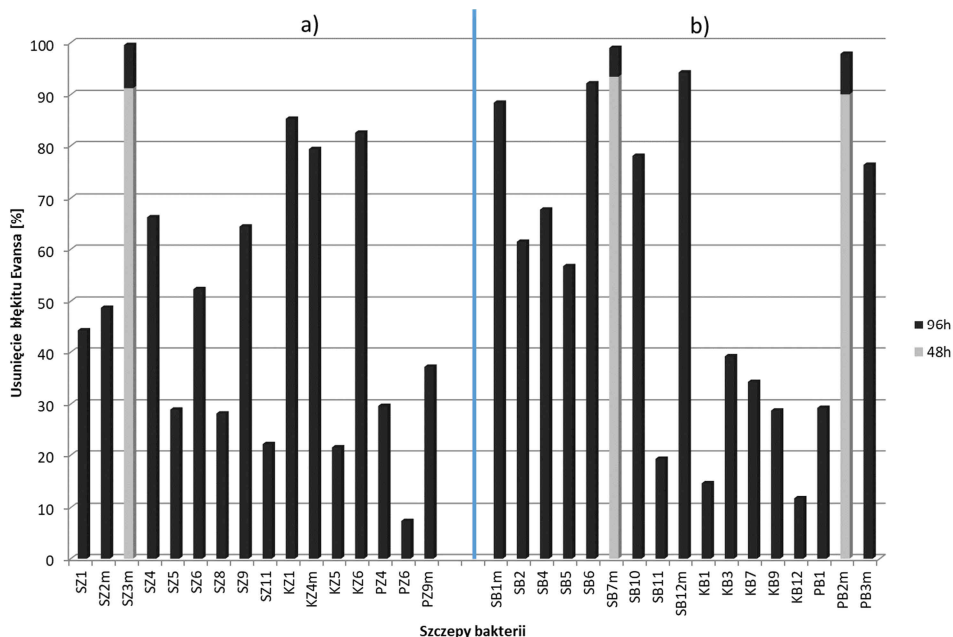
Największą liczbę szczepów bakteryjnych wyizolowano ze ścieków (18), z kompostu udało się pozyskać 9 izolatów, z próchna drzewa bukowego tylko 6. Jest to zrozumiałe, biorąc pod uwagę wysoką bioróżnorodność typową dla ścieków komunalnych oraz zachodzące w tych sztucznych ekosystemach procesy adaptacyjne związane z obecnością złożonych i różnorodnych źródeł węgla, w tym również barwników trafiających do ścieków, jako wynik użytkowania barwionych produktów. Wśród szczepów izolowanych z poszczególnych materiałów usunięcie błękitu Evansa przekraczające po 96 h 50 % stwierdzono w przypadku 67 % mikroorganizmów izolowanych ze ścieków, 33 % izolatów z kompostu oraz 33 % izolowanych z próchna (rys. 1). Usunięcie BE przekraczające 80 % stwierdzono odpowiednio w przypadku 28, 22 i 17 % szczepów. Wyniki te wskazują, że najwyższy potencjał dekoloryacyjny względem błękitu Evansa wykazuje mikroflora izolowana ze ścieków, co nie umniejsza wartości pozostałych materiałów źródłowych (kompostu i próchna), z których pozyskano mniejszą liczbę izolatów, ale o wysokiej efektywności usuwania badanego barwnika. Najwyższą efektywność dekoloryzacji stwierdzono w przypadku 3 szczepów, które odbarwiły próby już po 48 h hodowli (usunięcie  $\approx 90$ ). Dwa z nich izolowano ze ścieków (SZ3m i SB7m), a jeden z próchna bukowego (PB2m). Należy podkreślić, że wszystkie, wykazujące najwyższą efektywność dekoloryzacji izolowano na podłożu mineralnym MM, w którym barwnik syntetyczny był jedynym źródłem węgla i energii.



Rys. 2. Wyniki usunięcia błękitu Evansa przez szczepy bakterii wyizolowane na podłożach hodowlanych różniących się składem: a) agar odżywczy, b) podłoże mineralne minimalne MM

Fig. 2. Results of Evans blue removal by bacteria strains isolated on culture media differing in composition: a) nutrient agar, b) minimal mineral medium MM

Z porównania wyników usunięcia barwnika (BE) przez bakterie izolowane na podłożu organicznym i mineralnym minimalnym (MM) wynika, że równie istotny jak materiał wyjściowy jest skład podłoża wykorzystanego do izolacji (rys. 2). W przypadku 78 % bakterii wyizolowanych na podłożu MM suplementowanym barwnikiem syntetycznym (ZB lub BE) usunięcie BE po 96 h było powyżej 50 %, a w przypadku 56 % szczepów usunięcie było powyżej 80 %. W tej grupie mikroorganizmów 33 % izolatów usunęło 90 % BE już po 48 h. Były to opisane wcześniej 3 izolaty: SZ3m; SB7m; PB2m. W przypadku bakterii izolowanych na podłożu organicznym usunięcie BE powyżej 50 % odnotowano w przypadku 42 % szczepów, powyżej 80 % już tylko w przypadku 13 %. Żaden szczep z tej grupy nie odbarwił podłoża po 48 h.



Rys. 3. Wyniki usunięcia błękitu Evansa przez szczepy bakterii wyizolowane na podłożach hodowlanych suplementowanych różnymi barwnikami: a) ZB, b) BE

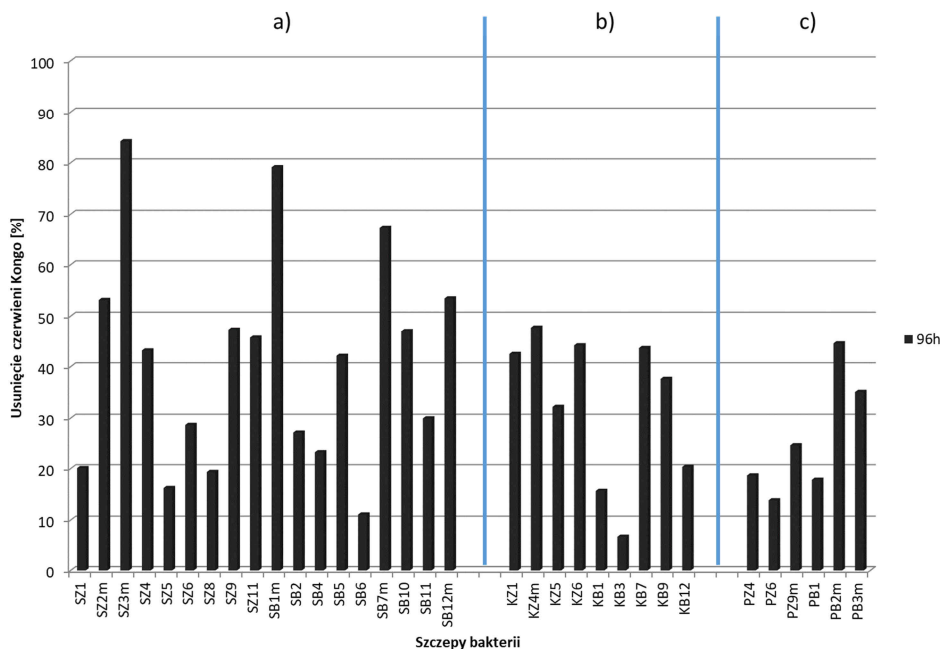
Fig. 3. Results of Evans blue removal by bacteria strains isolated on culture media supplemented with different dyes: a) BG, b) EB

Oprócz składu podłoża podstawowego selektywnym czynnikiem były również wykorzystane w suplementacji podłoża barwniki syntetyczne (BE lub ZB) (rys. 3). Jak można było się spodziewać, bakterie izolowane na podłożu suplementowanym azowym błękitem Evansa wykazywały wyższy potencjał dekoloryzacyjny względem tego barwnika aniżeli szczepy izolowane w obecności trifenylometanowej zieleni brylantowej. W przypadku bakterii izolowanych na podłożu z BE usunięcie tego barwnika po 96 h powyżej 50 % uzyskano w przypadku 59 % izolatów, a powyżej 80 % w przypadku 29 %. Spośród izolowanych w obecności ZB było to odpowiednio 44 i 18 % szczepów. Spośród



opisywanych wyżej 3 szczepów, które usunęły  $\approx 90\%$  BE po 48 h hodowli, dwa były izolowane na podłożu MM z BE (SB7m; PB2m), a jeden na podłożu MM z ZB (SZ3m).

Drugim badanym barwnikiem disazowym była czerwień Kongo (CK), która strukturalnie podobna jest do BE i podobnie jak BE zawiera 6 pierścieni aromatycznych (tab. 1). Zważywszy na niższą od BE masę cząsteczkową oraz brak grup hydroksylowych, CK powinna być bardziej podatna na biodegradację aniżeli BE [15-18]. Uzyskane wyniki nie potwierdzają jednak tego założenia. Usunięcie CK przez izolowane bakterie było na dużo niższym poziomie aniżeli BE. Dekoloryzację powyżej 50 % po 96 h inkubacji stwierdzono jedynie w przypadku 28 % szczepów izolowanych ze ścieków komunalnych, a powyżej 80 % tylko w przypadku 6 % (rys. 4). Słabsza podatność CK na biologiczny rozkład może mieć związek z mniejszą, aniżeli w przypadku BE, liczbą elektronoakceptorowych grup sulfonowych w cząsteczce [15-18]. Usunięcie CK przez bakterie izolowane z kompostu i próchna bukowego po 96 h inkubacji było poniżej 50 %. Skład podłoża podstawowego, wykorzystanego w screeningu, istotnie wpłynął na jego wyniki (rys. 5).

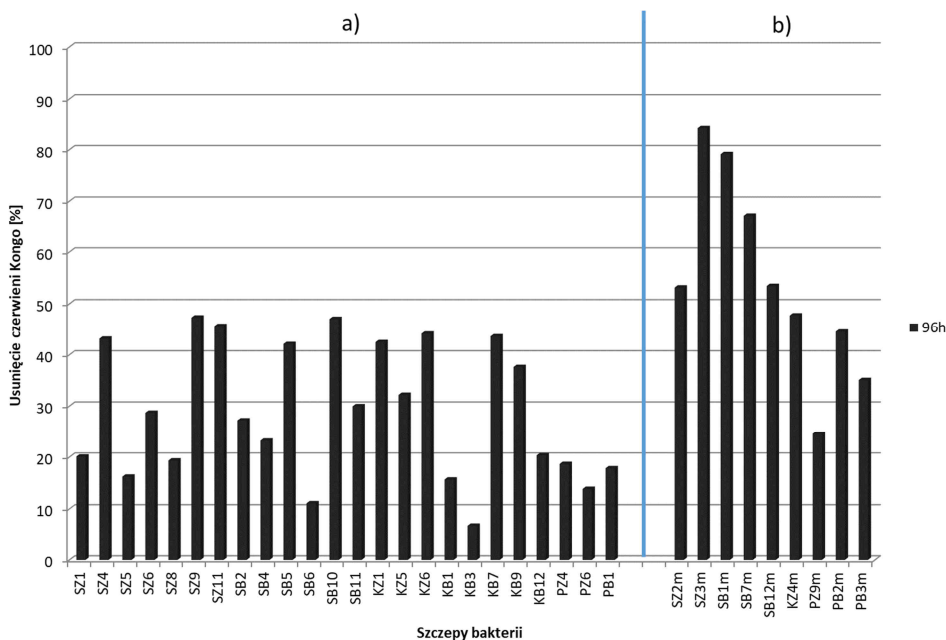


Rys. 4. Wyniki usunięcia czerwieni Kongo przez szczepy bakteryjne izolowane z różnych materiałów źródłowych: a) ścieki, b) kompost, c) próchno

Fig. 4. Results of Congo red removal by bacterial strains isolated from various source materials: a) sewage, b) compost, c) rotten wood

Screening przeprowadzony na podłożu MM, suplementowanym barwnikami syntetycznymi (ZB lub BE), pozwolił pozyskać bakterie wykazujące wyższy potencjał dekoloryzacyjny aniżeli w przypadku użycia suplementowanego podłoża organicznego.

Wzrost determinowany koniecznością wykorzystania barwnika syntetycznego, jako jedyne źródła węgla i energii, umożliwił bardziej restrykcyjną selekcję mikroorganizmów pod kątem ich możliwości dekoloryzacyjnych, bazujących z konieczności na biochemicznych mechanizmach rozkładu barwników. Spośród 9 szczepów wyizolowanych na podłożu MM 60 % usunęło CK z efektywnością wyższą niż 50 %, a 22 % z nich usunęło  $\approx 80$  % barwnika, podczas gdy jego usunięcie przez szczepy izolowane na podłożu organicznym było poniżej 50 %.



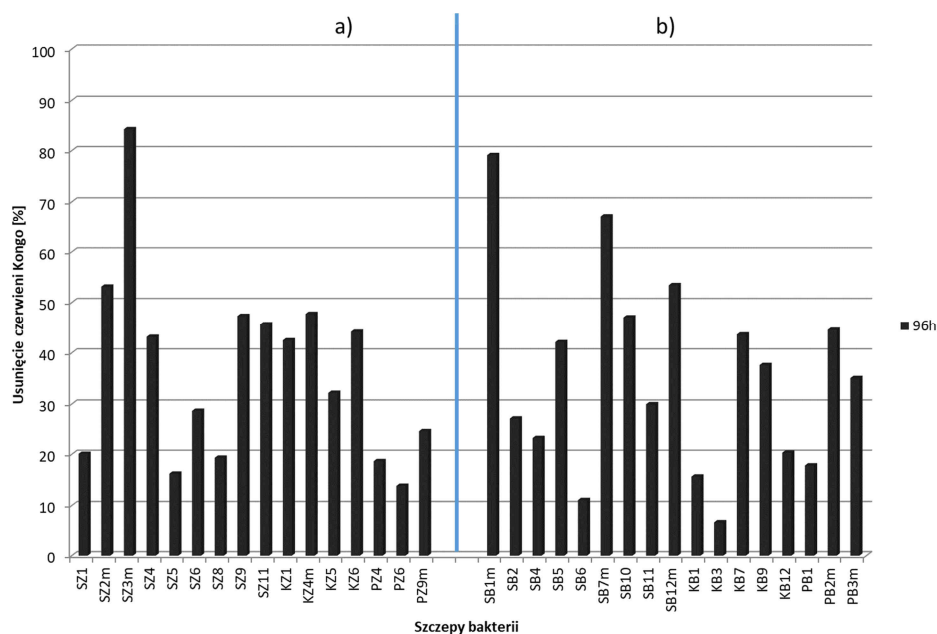
Rys. 5. Wyniki usunięcia czerwieni Konga przez szczepy bakterii wyizolowane na podłożach hodowlanych różniących się składem: a) agar odżywczy, b) podłoże mineralne minimalne MM

Fig. 5. Results of Congo red removal by bacteria strains isolated on culture media differing in composition: a) nutrient agar, b) minimal mineral medium MM

Rodzaj użytego w screeningu barwnika (ZB lub BE), jako czynnika selektywnego, miał znacznie mniejszy wpływ na potencjał dekoloryzacyjny wyizolowanych bakterii względem CK, aniżeli stwierdzony względem BE (rys. 3 i 6).

Zaskakujące jest, że bakterie wyizolowane na podłożu suplementowanym disazowym BE wykazywały nieco słabszy potencjał usuwania disazowej CK od tych, które wyizolowano na podłożu suplementowanym trifenylometanową ZB (po 96 h hodowli usunięcie > 40 % odnotowano w przypadku odpowiednio 41 i 50 % izolatów). Szczepy, których efektywność usuwania BE była najwyższa i była na poziomie > 90 % po 48 h hodowli (SZ3m; SB7m; PB2m), nie wykazały tak wysokiej efektywności względem disazowej CK. Wydłużenie czasu inkubacji do 96 h pozwoliło jednak w przypadku dwóch z nich uzyskać najwyższe, odnotowane wyniki usunięcia CK (SZ3m - 84 %; SB7m -

67 %). Reasumując, screening prowadzony na podłożu MM suplementowanym barwnikami pozwala na wyizolowanie bakterii wykazujących wysoki potencjał dekoloryzujący względem obu disazowych barwników.



Rys. 6. Wyniki usunięcia czerwieni Konga przez szczepy bakterii wyizolowane na podłożach hodowlanych suplementowanych różnymi barwnikami: a) ZB, b) BE

Fig. 6. Results of Congo red removal by bacteria strains isolated on culture media supplemented with different dyes: a) BG, b) EB

Bakterie uzyskujące najlepsze wyniki usunięcia obu barwników azowych należy poddać dalszym badaniom w celu wykazania ich potencjału względem innych grup barwników, a następnie ich mieszanin. Takie działanie pozwoli na wyselekcjonowanie odpowiednich szczepów, które można będzie wykorzystać do komponowania biopreparatów i użycia ich w bioaugmentacji systemów oczyszczania ścieków barwnych.

### Podsumowanie i wnioski

Z doniesień literaturowych wynika, że najczęściej stosowanym materiałem źródłowym w celu pozyskania bakterii efektywnie dekoloryzujących barwniki syntetyczne są ścieki przemysłu włókienniczego. Wyniki przeprowadzonego screeningu, ukierunkowanego na izolację bakterii usuwających barwniki azowe, wskazują na możliwość pozyskiwania tego typu mikroorganizmów również z innych źródeł. Największą liczbę szczepów o takich możliwościach wyizolowano ze ścieków, następnie kompostu i próchna bukowego. Stwierdzono, że zastosowane w screeningu czynniki selekcyjne miały wpływ na potencjał dekoloryzacyjny pozyskanych bakterii. Izolacja przeprowadzona na podłożu MM

suplementowanymi barwnikami syntetycznymi, stanowiącymi jedyne źródło węgla i energii, pozwoliła na wyselekcjonowanie mniej licznej grupy bakterii, ale wykazującej duży potencjał dekoloryacyjny. Rodzaj zastosowanego w suplementacji barwnika miał nieco mniejszy wpływ na możliwości dekoloryacyjne izolowanych bakterii. Wykazano, że pomimo mniej skomplikowanej struktury i mniejszej masy cząsteczkowej azowa czerwień Kongo była mniej podatna na bakteryjne procesy dekoloryacyjne niż azowy błękit Evansa. Spośród pozyskanych szczepów 3 z nich, izolowane na podłożu MM, wykazały szczególne zdolności dekoloryacyjne, usuwały zadane barwniki już po 48 h hodowli z efektywnością przekraczającą 90 %.

### Podziękowania

Badania były finansowane z projektów: 08/080/BK\_19/0067 (BK-258/RIE8/2019).

### Literatura

- [1] Gomaa OM, Linz JE, Reddy CA. Decolorization of Victoria Blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:2349-56. DOI: 10.1007/s11274-008-9750-2.
- [2] Vijayaraghavan K, Yun YS. Bacterial biosorbents and biosorption. Research review paper. *Biotechnol Advances*. 2008;26:266-91. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.02.002.
- [3] Zabłocka-Godlewska E, Przysaś W, Grabińska-Sota E. Decolourisation of different dyes by two *Pseudomonas* strains under various growth conditions. *Water Air Soil Pollut*. 2014;(225):1846-59. DOI: 10.1007/s11270-013-1846-0.
- [4] Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigments*. 2003;(58):179-96. DOI: 10.1016/S0143-7208(03)00064-0.
- [5] Rauf MA, Ashraf SS. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Review. Chem Eng J*. 2012(209):520-30. DOI: 10.1016/j.cej.2012.08.015.
- [6] Cui D, Li G, Zhao D, Gu X, Wang C, Zhao M. Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. *J Hazard Mater*. 2012;221-222:185-92. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.032.
- [7] Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Bacterial decolourization and degradation of azo dyes: a review. *J Taiwan Inst Chem Engineers*. 2011;42:138-57. DOI: 10.1016/j.jtice.2010.06.006.
- [8] Solis M, Solis A, Perez HI, Manjarrez N, Flores M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochem*. 2012;47:1723-48. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.08.014.
- [9] Saratale RG, Saratale GD, Kalyani DC, Chang JS, Govindwar SP. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. *Bioresour Technol*. 2009;100:2493-500. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.12.013.
- [10] Hsueh CC, Chen BY, Yen CY. Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*. *J Hazard Mater*. 2009;167:995-1001. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.01.077.
- [11] Ghaly AE, Ananthashankar R, Alhattab M, Ramakrishnan VV. Production, characterization and treatment of textile effluents: A critical review. *J Chem Eng Process Technol*. 2014;5(1):1-19. DOI: 10.4172/2157-7048.1000182.
- [12] Khehra MS, Saini HS, Sharma DK, Chadha BS, Chimni SS. Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. *Water Res*. 2005;39:5135-41. DOI: 10.1016/j.watres.2005.09.033.
- [13] Pricelius S, Held C, Sollner S, Deller S, Murkovic M, Ullrich R, et al. Enzymatic reduction and oxidation of fibre-bound azo-dyes. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40:1732-8. DOI: 10.1007/s00253-007-1165-8.
- [14] <https://www.sigmaaldrich.com/poland.html>.
- [15] Chequer FMD, Dorta DJ, de Oliveira DP. Azo dyes and their metabolites: does the discharge of azo dye into water bodies represent human and ecological risks? In: Hauser P, editor. *Advances in Treating Textile Effluent*. INTECH, ch. 2. 2011, 28-48. DOI: 10.5772/19872.

- [16] Ong SA, Uchiyama K, Inadama D, Ishida Y, Yamagiwa K. Phytoremediation of industrial effluent containing azo dye by model up-flow constructed wetland. *Chin Chem Lett.* 2009;20:225-8. DOI: 10.1016/j.ccllet.2008.10.028.
- [17] Przysaś W, Zabłocka-Godlewska E, Grabińska-Sota E. Effectiveness of dyes removal by mixed fungal cultures and toxicity of their metabolites. *Water Air Soil Pollut.* 2013;224(5):1534-43. DOI: 10.1007/s11270-013-1534-0.
- [18] Zabłocka-Godlewska E, Przysaś W, Grabińska-Sota E. Possibilities of obtaining from highly polluted environments: new bacterial strains with a significant decolorization potential of different synthetic dyes. *Water Air Soil Pollut.* 2018;229(176):1-13. DOI: 10.1007/s11270-018-3829-7.

## OBTAINING OF BACTERIA WITH THE ABILITIES OF DECOLOURIZATION OF AZO DYES

Environmental Biotechnology Department, Faculty of Energy and Environmental Engineering  
Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

**Abstract:** Azo dyes are the most numerous and most commonly used group of synthetic dyes. Most of them are resistant to physical, chemical and biological factors. It causes difficulties in effective removal of dyes from wastewater and creates the risk of their penetration into the aquatic environment. Research on increasing the efficiency of conventional methods of treatment of the coloured wastewater includes, inter alia, obtaining microorganisms with high decolourization potential. Such microorganisms can be used e.g. for bioaugmentation of biological treatment systems. The aim of the study was screening of bacteria showing the ability to decolorize two azo dyes (Evans blue (EB), Congo red (CR)). Microorganisms were isolated from municipal sewage, compost and rotten beech wood. At the first stage of screening were used two kinds of solid growth media (mineral and nutrient agar) supplemented with dyes belonging to two chemical groups (disazo Evans blue (EB); triphenylmethane brilliant green (BG)). Isolates were passaged several times to confirm their purity and decolourization potential. In the second stage of research, liquid cultures on nutrient broth containing synthetic dyes (EB or CR) at a concentration of 0.1 g /dm<sup>3</sup> were used. The content of dyes in samples after decolourization were measure spectrophotometrically and their percentage removal was calculated. It has been shown that all used materials can be a source for obtaining decolorizing bacteria. The largest number of them was isolated from municipal wastewater, followed by compost and rotten wood. Structurally more complicated EB was more efficiently removed by bacteria than CR. Strains isolated on mineral media showed greater decolourization efficiency. Amongst the strains isolated on MM, 3 of them removed dyes already after 48 h of culture with an efficiency exceeding 90 %.

**Keywords:** synthetic dyes, azo dyes, Evans blue, Congo red, bacteria, screening, decolourization