

Wioletta PRYZYSTAŚ^{1*} i Ewa ZABŁOCKA-GODLEWSKA¹

WYKORZYSTANIE WYBRANYCH SZCZEPÓW *Basidiomycota* DO USUWANIA MIESZANIN BARWNIKÓW Z RÓŻNYCH KLAS

THE USAGE OF SELECTED STRAINS OF *Basidiomycota* TO REMOVE MIXTURE OF DYES FROM DIFFERENT CLASSES

Abstrakt: Barwniki syntetyczne, ze względu na toksyczność i słabą podatność na biodegradację, należą do zanieczyszczeń niebezpiecznych i trudno usuwalnych. Jeszcze większe problemy następczą ich mieszaniny. Celem badań było przeanalizowanie efektywności usuwania mieszanin barwników z różnych klas z wykorzystaniem wybranych szczepów grzybów podstawkowych. Testowano mieszaniny dwuskładnikowe (zakres ich stężeń to 0,01-0,15 g/dm³) składające się z: antrachinowego brylantowego błękitu remazolowego R (RBBR), azowej czerwieni Kongo (CK) i trójfenylometanowej zieleni brylantowej (ZB). Badano szczepy z gatunku *Pleurotus ostreatus* (szczepy BWPH i K4) i *Polyporus picipes* (RWP17). Usunięcie barwników analizowano w oparciu o wyznaczone długości fal odpowiadające najwyższej absorpcji. Zaskakująco wraz ze wzrostem stężenia mieszaniny 1 (CK+RBBR) obserwowano zwiększone usunięcie barwy przez grzybnie szczepów BWPH i K4. Ta sama mieszanina była dobrze usuwana przez szczep RWP17, a efektywność dekoloryzacji malała ze wzrostem stężenia (95 % dla 0,01 g/dm³; 75 % dla 0,15 g/dm³ mieszaniny). Usunięcie mieszaniny 2 (CK + ZB) było bardzo wysokie dla szczepów BWPH i K4. Wzrost jej stężenia powodował spadek efektywności procesu (100 % dla 0,01 g/dm³; 0 % dla 0,15 g/dm³ mieszaniny). Szczep RWP17 usuwał M2 w różnym stopniu - przy różnych długościach fali uzyskiwano odmienne wyniki. Badania potwierdziły, że usuwanie mieszanin barwników stanowi duże wyzwanie, a efektywność dekoloryzacji uzależniona jest od składu, stężenia usuwanej mieszaniny oraz zastosowanego szczepu.

Słowa kluczowe: mieszaniny barwników, grzyby podstawkowe, dekoloryzacja, barwniki azowe, barwniki trójfenylometanowe, barwniki antrachinonowe

Wprowadzenie

Barwniki syntetyczne stanowią jedno z istotniejszych i powszechnie występujących zanieczyszczeń wód powierzchniowych. Związane jest to z ich powszechnym stosowaniem w różnych branżach, w tym spożywczej i tekstylnej, kosmetycznej i wielu innych [1-5]. Szczególnie w produkcji tekstyliów i produktów spożywczych wykorzystywane są w celu nadania intensywnej barwy, która z założenia powinna być odporna na działanie światła, potu czy mikroorganizmów [5, 6]. Takie założenie powoduje, że produkuje się na szeroką skalę barwniki, które są słabo podatne na rozkład biologiczny. Zatem związki te wprowadzone do środowiska nie ulegają łatwo rozkładowi biologicznemu. Jako substancje toksyczne, często o właściwościach rakotwórczych czy mutagennych, stwarzają duże zagrożenie dla ekosystemów, szczególnie wodnych [5, 7, 8].

Ze względu na aromatyczną strukturę i wspomniane powyżej właściwości toksyczne konwencjonalne biologiczne systemy oczyszczania ścieków, oparte na osadzie czynnym, nie są w stanie efektywnie usunąć takich substancji. Dlatego prowadzone na szeroką skalę

¹ Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice, tel. 32 237 28 55

* Autor do korespondencji: wioletta.przystas@polsl.pl

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

badania nad usuwaniem barwników ze ścieków skupiają się w dalszym ciągu na selekcji organizmów pod kątem ich zdolności do usuwania tych substancji, wykorzystaniu procesów fizycznych i chemicznych, w tym łączeniu procesów biologicznych z fizycznymi i chemicznymi [9-14].

Wśród mikroorganizmów podkreśla się znaczenie grzybów w usuwaniu tych substancji, co ma związek z możliwością wytwarzania przez te organizmy dużej ilości nisko specyficznych enzymów o szerokim spektrum działania. Do grzybów takich zalicza się m. in. grzyby białej zgnilizny drewna, produkujące peroksydazy i lakazy, biorące udział w rozkładzie takich polimerów, jak lignina. Udowodniono, że organizmy te potrafią rozkładać barwniki z dużą efektywnością [1, 15-19]. Obecnie prowadzone badania skupiają się głównie na usuwaniu pojedynczych substancji, w tym najpowszechniej stosowanych na świecie barwników azowych. Drugą grupę związków, których wykorzystanie stale rośnie, stanowią barwniki trójfenylometanowe, a trzecią barwniki antrachinonowe [20, 21]. Należy pamiętać, że nawet jeśli do środowiska wraz ze ściekami wprowadzane są pojedyncze substancje, to już w odbiorniku obecne są ich mieszaniny. Najczęściej jednak mieszaniny powstają w samych zakładach produkcyjnych, co wynika ze specyfiki produkcji. Powstawanie mieszanin barwników znacząco może utrudniać proces usuwania barwy, bowiem związki te mogą ze sobą reagować [22].

Celem badań jest określenie możliwości wykorzystania wybranych szczepów grzybów podstawkowych, wykazujących zdolność usuwania barwników aromatycznych z różnych klas, do dekoloryzacji ich mieszanin.

Metodyka badań

Szczepy wykorzystane w badaniach

Badania prowadzono z wykorzystaniem trzech szczepów grzybów, dla których wcześniej wykazano zdolność dekoloryzacji szeregu substancji. Szczepy BWPH i K4 zalicza się do gatunku *Pleurotus ostreatus*, natomiast szczep RWP17 zaliczany jest do gatunku *Polyporus picipes*. Wszystkie szczepy pochodzą z kolekcji Katedry Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej.

Barwniki i mieszaniny barwników wykorzystane w badaniach

Do sporządzenia mieszanin wykorzystano barwniki zaliczane do 3 różnych klas: czerwień Kongo (CK) zaliczaną do barwników azowych, posiadającą w swojej strukturze dwa wiązania azowe; zielen brylantową (ZB) zaliczaną do barwników trójfenylometanowych; antrachinonowy brylantowy błękit remazolowy R (RBBR). Charakterystykę barwników przedstawiono w tabeli 1.

Sporządzono trzy mieszaniny dwuskładnikowe barwników w stosunku wagowym 1:1. Pierwsza mieszanina (M1) składała się z czerwieni Kongo i błękitu RBBR, druga (M2) - z czerwieni Kongo i zieleni brylantowej, a trzecia (M3) - z zieleni brylantowej i błękitu RBBR. Ostatnią z nich wyeliminowano od razu na wstępnym etapie z dalszych badań, ponieważ oba barwniki silnie reagowały ze sobą - zaobserwowano szybkie wytrącenie się osadu, co mogłoby utrudnić badania dekoloryzacji. Wodne roztwory każdego z barwników poddano sterylizacji w autoklawie (121 °C, 147 kPa, 15 min) i sprawdzono widma tak

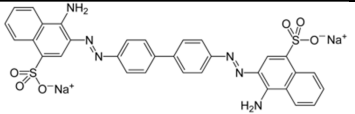
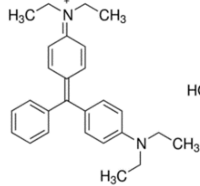
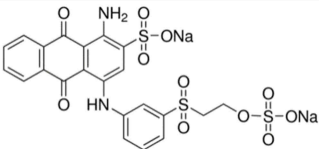
sporządzonych roztworów w pełnym zakresie długości fali w celu wyeliminowania wpływu temperatury na strukturę barwnika. Sporządzono mieszaniny i dla każdej z nich wyznaczono ponownie długość fali (spektrofotometr UV-Vis Hitachi 9000), przy której obserwowana była najwyższa absorbancja. Wartości długości fal, przy których obserwowano najwyższe piki, przedstawiono w tabeli 2.

Charakterystyka barwników użytych do sporządzenia mieszanin

Tabela 1

Characteristics of the dyes used to make the mixtures

Table 1

Klasa barwnika	Nazwa barwnika (producent)	Struktura chemiczna	Struktura molekularna i masa cząsteczkowa [g/mol]	Długość fali λ_{\max} [nm] [*]
Azowy	Czerwień Kongo (Sigma-Aldrich)		C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂ 696,67	490
Trójfenylo- metanowy	Zieleń brylantowa (Sigma-Aldrich)		C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₄ S 482,63	624
Antrachino- nowy	Brylantowy błękit remazolowy R (Acros Organics)		C ₂₂ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₁₁ S ₃ 626,54	593

* długość fali wyznaczona spektrofotometrycznie - UV-Vis Hitachi 9000

Charakterystyka mieszanin

Tabela 2

Characteristics of the mixtures

Table 2

Mieszanina	Składniki mieszaniny	Długości fali λ_{\max} [nm] [*]
Mieszanina 1 (M1)	Czerwień Kongo +	228
	Brylantowy błękit remazolowy R	340
		499
Mieszanina 2 (M2)	Czerwień Kongo +	322
	Zieleń brylantowa	436
		630
Mieszanina 3 (M3)	Brylantowe błękit remazolowy R + Zieleń brylantowa	Nie wyznaczono - barwniki sedimentowały w postaci osadu

Badania dekoloryzacji mieszanin barwników przez grzybnię

Badania dekoloryzacji prowadzono w probówkach zawierających 10 cm³ sterylnego płynnego podłoża hodowlanego o składzie: glukoza (10 g/dm³), pepton (1 g/dm³), MgSO₄·7H₂O (0,5 g/dm³) i KH₂PO₄ (0,1 g/dm³). Pożywkę sterylizowano przez autoklawowanie (121 °C, 147 kPa, 15 min). Jałowe podłoże zaszczerpiono grzybnią szczepów poprzez wprowadzenie do podłoża 1 cm³ zawiesiny grzybni, wcześniej hodowanej na takim samym podłożu, a następnie zhomogenizowanej (BagMixer - czas homogenizacji 5 minut). Prehodowla grzybni w temperaturze 25 °C trwała odpowiednio: dla szczepów BWPH i RWPI7 7 dni, a dla szczepu K4 10 dni. Hodowlę biomasy wykorzystanej do dekoloryzacji w probówkach prowadzono przez 7 dni w temperaturze 25 °C. Do tak przygotowanych hodowli wprowadzono mieszaniny barwników w stężeniach: 0,01, 0,03, 0,06, 0,09, 0,1, 0,12 i 0,15 g/dm³. Każdą próbkę przygotowano w 4 powtórzeniach. Równolegle przygotowano taką samą ilość powtórzeń kontroli: podłoże z grzybnią bez barwników, podłoże z mieszaninami bez biomasy. Po tygodniu inkubacji z każdej z prób pobierano próbki o objętości 1 cm³, które rozcieńczano w celu wykonania widma UV-VIS. Każde z widm dla prób z daną mieszaniną analizowano przy charakterystycznych dla niej długościach fali i obliczono procentowy stopień dekoloryzacji U [%]:

$$U = \frac{(K - P)}{K} \cdot 100 \text{ [%]}$$

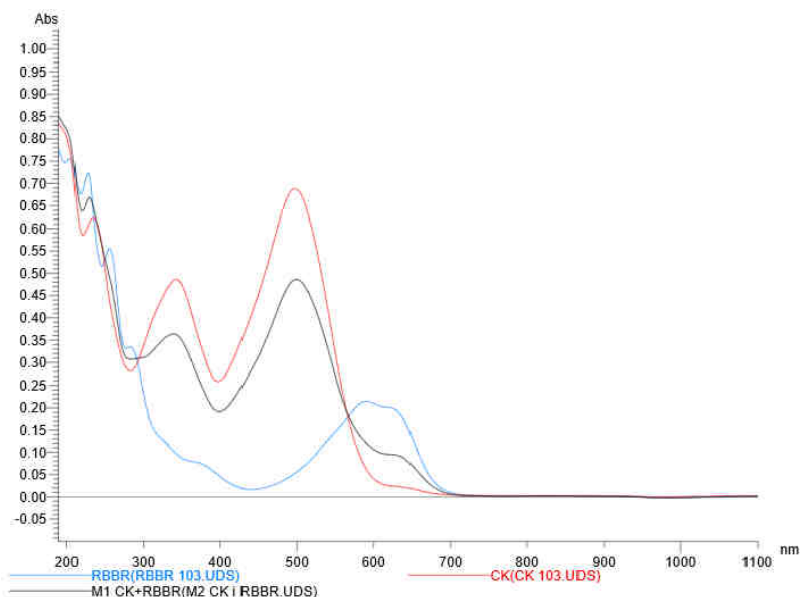
gdzie: K - średnie stężenie mieszaniny w kontroli wyznaczone dla prób zawierających pożywkę i mieszaninę w określonym stężeniu, przy danej długości fali (kontrola mieszaniny), P - średnie stężenie mieszaniny barwników po dekoloryzacji w próbce zaszczerpionej daną grzybnią przy danej długości fali.

Na koniec eksperymentu określono zawartość biomasy w próbkach: biomasę przeniesiono na papierowy sączek i suszono w suszarce w 55 °C do całkowitego wyschnięcia.

Wyniki badań i ich dyskusja

Stosowane w procesach produkcyjnych różne barwniki często zanim trafią na oczyszczalnię ścieków zostają okresowo deponowane w zbiornikach retencyjnych. Sprzyja to powstawaniu mieszanin o nieznanym składzie i właściwościach, zarówno fizykochemicznych, jak i toksycznych. W trakcie prowadzenia badań sporządzono kilka różnych dwuskładnikowych mieszanin barwników. Skład mieszaniny determinuje charakter interakcji pomiędzy jej składnikami, czego potwierdzeniem jest wytrącenie się osadu przy tworzeniu M3. RBBR i zieleń brylantowa silnie ze sobą przereagowały, co nie było obserwowane w przypadku mieszanin z czerwienią Kongo.

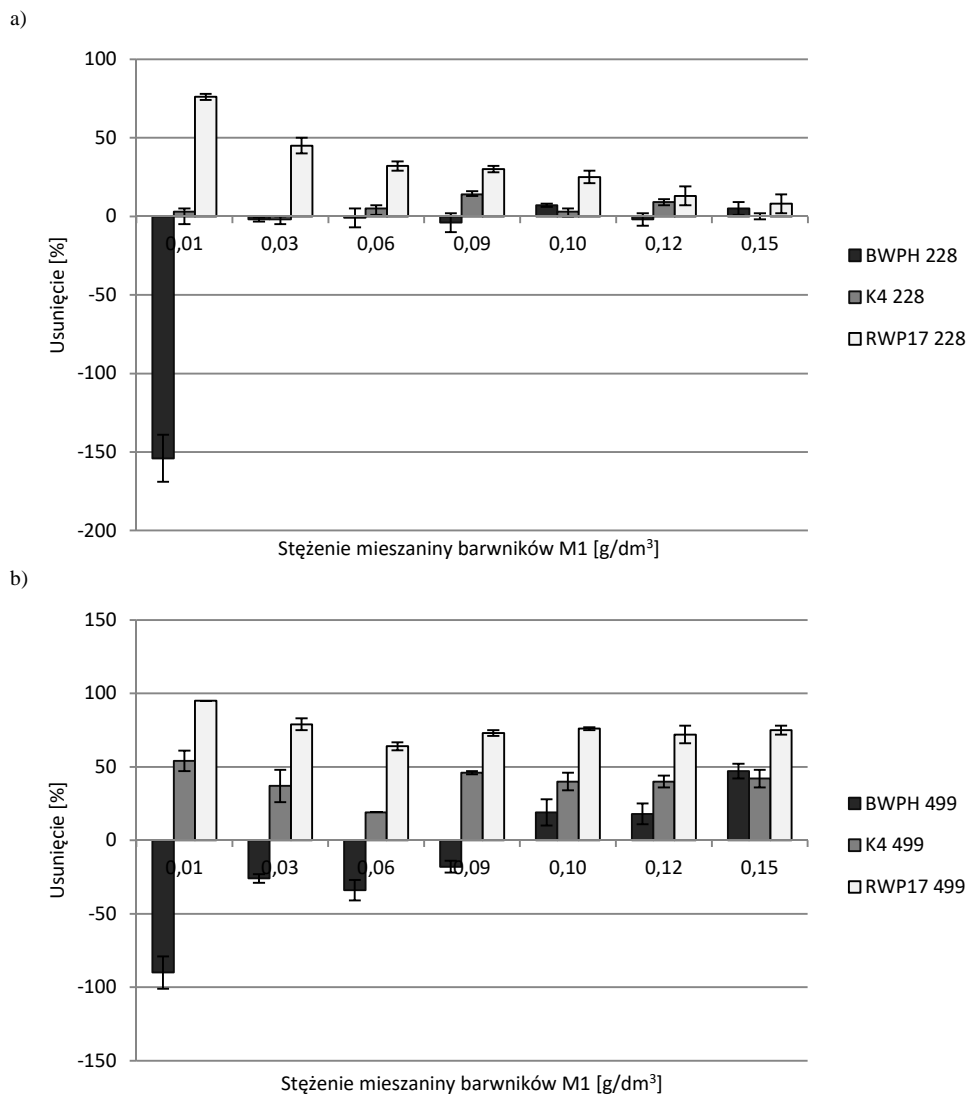
Pierwsza z wykorzystanych w badaniach mieszanin (M1) składała się z barwnika azowego (CK) i antrachinonowego (RBBR). Charakterystyczną jej cechą było przesunięcie się λ_{\max} z 490 nm charakterystycznego dla czerwieni Kongo na 499 nm oraz zniknięcie pików charakterystycznych dla RBBR przy długości fali 593 nm (rys. 1).



Rys. 1. Widma UV-VIS mieszaniny M1 oraz czystych roztworów barwników

Fig. 1. UV-VIS spectra of a mixture of M1 and pure dye solutions

Niezależnie od jej stężenia nie obserwowano właściwie usunięcia barwy przez szczep BWPB (dla długości fali 228 nm). Najwyższe usunięcie (7 %) odnotowano dla stężenia $0,1 \text{ g/dm}^3$ i było ono w granicach błęd pomiarowego. Brak usunięcia M1 przy tej długości fali przez grzybnie szczepu BWPB wskazuje na większą trudność w usuwaniu mieszanin przez grzyby. W przypadku 499 nm obserwowano, iż wraz ze wzrostem stężenia barwnika usunięcie barwników przez ten szczep wzrasta. Dla stężeń $0,1$ i $0,12 \text{ g/dm}^3$ uzyskano usunięcie $\sim 19\%$. Dla $0,15 \text{ g/dm}^3$ stężenia M1 było to 47% . Wyniki uzyskane dla długości fali 228 nm i ujemne wartości usunięcia dla 499 nm w zakresie stężeń $0,01$ - $0,09 \text{ g/dm}^3$ sugerują, iż prawdopodobnie zachodzi reakcja chemiczna mieszaniny z metabolitami grzyba. Takie zjawisko obserwowano już wcześniej [22]. Przyrost barwy dla stężenia $0,01 \text{ g/dm}^3$ M1 w ponad 90 % niezależnie od długości fali wskazuje wyraźnie na interakcję zachodzącą w próbkach i pojawienie się nowych wiązań chemicznych. Zbliżone wyniki uzyskano dla drugiego przedstawiciela bocznika ostrygowatego (szczep K4), jednak dla długości fali 228 nm nie obserwowano przyrostu barwy w całym zakresie badanych stężeń, a najwyższy stopień usunięcia, wynoszący 14 %, uzyskano dla stężenia M1 = $0,09 \text{ g/dm}^3$. Dalszy wzrost stężenia barwników powodował ograniczenie ich usunięcia. Dla długości fali 499 nm w zakresie stężeń $0,01$ do $0,09 \text{ g/dm}^3$ obserwowano spadek stopnia dekoloryzacji wraz ze wzrostem stężenia (od 54 do 19 %), a w zakresie stężeń $0,12$ - $0,15 \text{ g/dm}^3$ usunięcie było zbliżone, na poziomie 40-46 %. Jak wskazują wyniki badań, efektywność dekoloryzacji przez oba szczepy bocznika jest znacząco różna. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenia [23], w których wykazano, że każdy ze szczepów cechuje się odmiennym charakterem procesu i zdolnością dekoloryzacji.



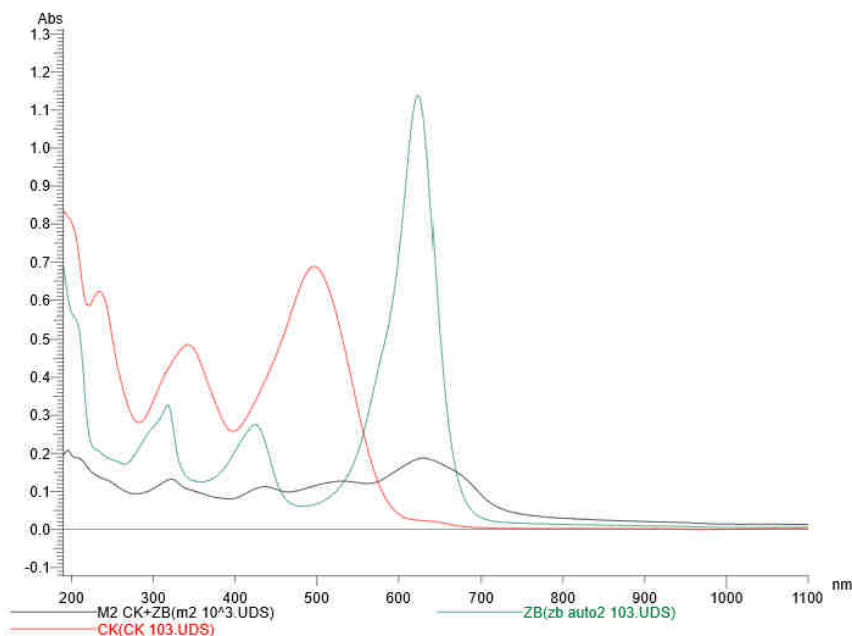
Rys. 2. Procentowe usunięcie mieszaniny M1 w próbkach z różnymi szczepami grzybów dla różnych długości fal: a) 228 nm, b) 499 nm

Fig. 2. Percentage removal of the M1 mixture at different wavelengths in samples with different strains of fungi at different wavelength: a) 228, b) 499 nm

Zupełnie odmienne wyniki usunięcia tej mieszaniny uzyskano dla szczepu RWP17. Wraz ze wzrostem stężenia M1 obserwowano spadek stopnia usunięcia barwy, dla długości fali 228 nm z 76 % dla stężenia 0,01 g/dm³ do zaledwie 8 % dla stężenia 0,15 g/dm³, dla długości fali 499 nm z 95 do 75 %. Szczególnie dla fali 499 nm

zwiększenie stężenia z 0,01 do 0,03 g/dm³ powoduje drastyczne zmniejszenie stopnia usunięcia. Dalsze zwiększanie stężenia M1 nie powodowało już drastycznych zmian w efektywności dekoloryzacji (usunięcie w zakresie 64 % przy stężeniu 0,06 g/dm³ i ~74 % dla pozostałych stężeń). Takie wyniki sugerują, iż w przypadku tego szczepu mechanizm usuwania barwy może mieć charakter biochemiczny, na co wskazuje nieznacznie wahający się stopień usunięcia barwy mimo wzrastających stężeń barwników. Wyniki uzyskane dla fali 228 nm, dla której obserwowano, że wraz ze wzrastającym stężeniem mieszaniny spada stopień dekoloryzacji sugerują jednak, iż proces może mieć jednocześnie charakter sorpcji i wynikać z wyczerpania miejsc aktywnych w biomacie, bowiem w zakresie 0,03-0,15 g/dm³ mieszaniny M1 spadek usunięcia barwy wraz ze wzrostem stężenia barwników ma charakter liniowy ($R^2 = 0,9625$).

Mieszaninę M2 stanowiły barwnik azowy (czerwień Kongo) i barwnik trójfenylometanowy (zielen brylantowa). Podobnie jak w przypadku M1, zaobserwowano przesunięcie się pików λ_{\max} z 490 nm charakterystycznego dla czerwieni Kongo do 436 nm, i z 624 nm charakterystycznej dla zieleni brylantowej do 630 nm (rys. 3). Pojawiające się na wykresie piki λ_{\max} zbliżone są mocno do pików charakterystycznych dla zieleni brylantowej, co mogłoby sugerować, iż te dwa barwniki nie reagowały ze sobą, a barwa próbki jest zdominowana przez barwnik trójfenylometanowy.



Rys. 3. Widma UV-VIS mieszaniny M2 oraz czystych roztworów barwników

Fig. 3. UV-VIS spectra of a mixture of M2 and pure dye solutions

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla M1, w przypadku M2 wraz ze wzrostem stężenia mieszaniny obserwowano spadek stopnia usunięcia barwy niezależnie

od wykorzystanego do badania szczepu (rys. 4). Szczep BWPH lepiej usuwał M2 w zakresie stężeń 0,01 do 0,09 g/dm³ niż należący do tego samego gatunku szczep K4. W tym zakresie stężeń szczep BWPH właściwie całkowicie usuwał barwę (długość fali 322 nm), natomiast stężenia od 0,06 do 0,09 g/dm³ były przez szczep K4 usuwane z dużo mniejszą efektywnością (< 90 %). Dalszy wzrost stężenia barwników powodował zahamowanie procesu dekoloryzacji przez grzybnię BWPH, a dla stężenia 0,15 g/dm³ uzyskano nawet przyrost barwy w próbkach. Dla szczepu K4 dla długości fali 322 nm usunięcie mieszaniny w stężeniu 0,1 g/dm³ było o 23 % większe niż dla szczepu BWPH, a dla 0,12 g/dm³ prawie o 50 % większe. Nawet przy stężeniu 0,15 g/dm³ uzyskano pozytywny wynik usunięcia barwy (11 % przy długości fali 322 nm). Dla długości fali 630 nm wyniki redukcji barwy uzyskane dla tego szczepu były jednak znacznie niższe niż dla szczepu BWPH, co może sugerować, że w przypadku szczepu K4 proces ma charakter biochemiczny, natomiast w przypadku szczepu BWPH w większym stopniu proces opiera się na sorpcji barwników, a spadek efektywności procesu i wzrost zabarwienia roztworu może wynikać z wypełnienia miejsc aktywnych w biomacie i uwalniania substancji produkowanych przez grzyba do roztworu.

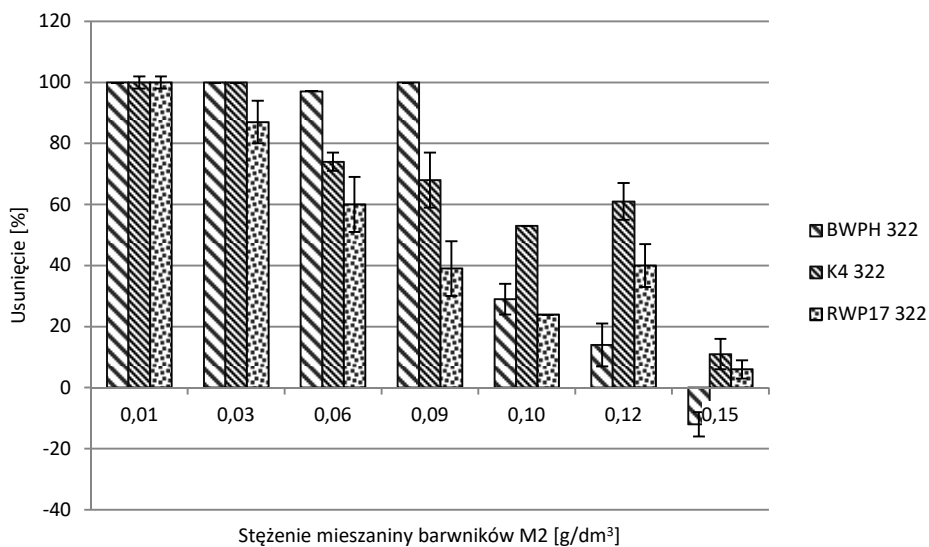
Podobne zmniejszenie efektywności dekoloryzacji wraz ze wzrostem stężenia M2 obserwowano dla szczepu RWP17. Szczep ten zdecydowanie najstabiliej usuwał analizowaną mieszaninę, bowiem dla długości fal 322 i 436 nm pełną dekoloryzację uzyskano jedynie dla stężenia 0,01 g/dm³, a dla długości fali 630 nm usunięcie wynosiło zaledwie 76 %. Przy długości fali 630 nm zahamowanie dekoloryzacji następowało już dla stężenia 0,09 g/dm³. Dla stężenia 0,15 g/dm³ obserwowano całkowite zahamowanie procesu odbarwiania.

Analiza stężenia suchej masy grzybni w próbkach zawierających zarówno M1, jak i M2 pozwoliła stwierdzić, iż badane mieszaniny nie są toksyczne dla grzybni, a efektywność procesu dekoloryzacji dla żadnego ze szczepów nie jest pozytywnie skorelowana ze stężeniem biomasy (rys. 5). Najwyższe stężenia grzybni obserwowano w próbkach ze szczepem BWPH, jednak w przypadku mieszaniny M1 (rys. 5a) szczep ten nie był w stanie usunąć barwników wchodzących w jej skład niezależnie od stężenia. Stężenie suchej masy grzybni szczepów K4 i RWP17 było często o ponad połowę niższe, jednak usunięcie barwników, szczególnie przez szczep RWP17, było na wysokim poziomie. Sugeruje to udział procesów biochemicznej transformacji barwników przez oba szczepy grzybów. W przypadku szczepu RWP17 można przypuszczać, iż proces ma jednak w głównej mierze charakter sorpcji, na co wskazywały omawiane powyżej wyniki dla długości fali 228 nm. Brak wyraźnej korelacji między redukcją barwy a stężeniem grzybni w próbkach potwierdza jednak jednoczesne zachodzenie biotransformacji w trakcie procesu.

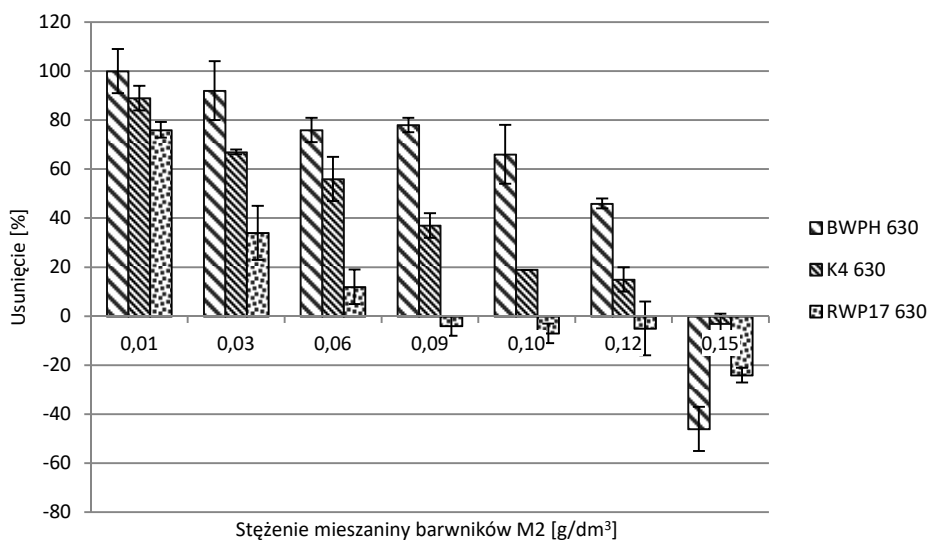
W przypadku M2 (rys. 5b) również najwyższe stężenie suchej masy obserwowano dla szczepu BWPH. Wysokie stężenie biomasy przełożyło się w przypadku tej mieszaniny na wysoką efektywność dekoloryzacji. Obserwowane zjawisko zwiększenia intensywności wzrostu grzybni wraz ze wzrostem jej stężenia sugeruje, że mieszanina ta nie jest toksyczna dla grzybni, a w próbkach poza procesem sorpcji zachodził proces biotransformacji. Uwalniające się do podłoża biogeny stymulowały wzrost biomasy tego szczepu. Podobną zależność zaobserwowano również w przypadku pozostałych dwóch szczepów (K4

i RWP17). Wraz ze wzrostem stężenia M2 w próbce wzrastała ilość suchej masy, jednak spadał stopień dekoloryzacji.

a)

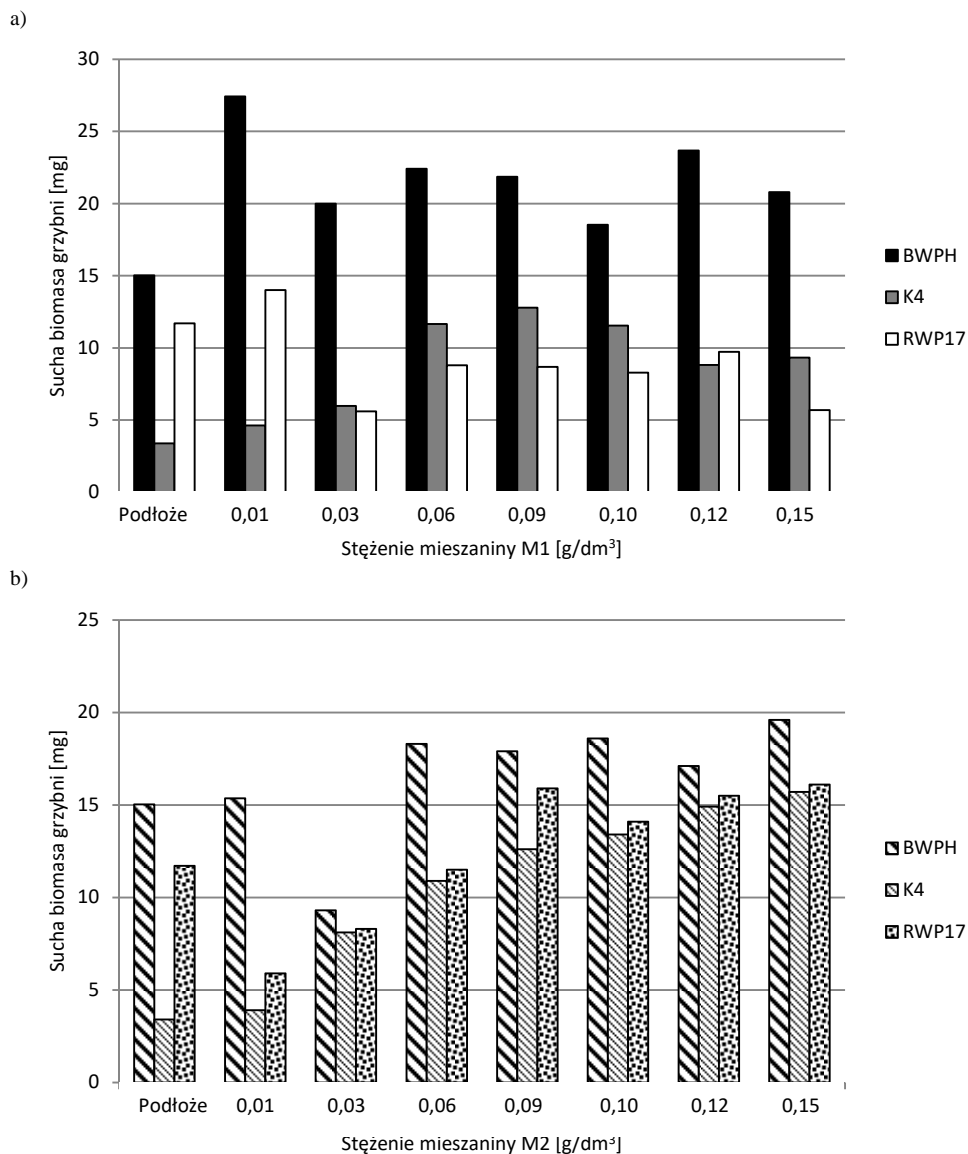


b)



Rys. 4. Procentowe usunięcie mieszaniny M2 w próbkach z różnymi szczepami grzybów dla różnych długości fal: a) 322 nm, b) 630 nm

Fig. 4. Percentage removal of the M1 mixture at different wavelengths in samples with different strains of fungi at different wavelength: a) 322, b) 630 nm



Rys. 5. Zawartość suchej masy grzybni w próbkach: a) mieszaniny M1, b) mieszaniny M2

Fig. 5. Concentration of dry biomass in samples: a) mixture M1, b) mixture M2

Czerwień Kongo była wielokrotnie badana i udowodniono, że jest to barwnik, który jest z dużą łatwością usuwany przez grzyby [24, 25]. Grzyb pleśniowy *Aspergillus niger* w zaledwie 6 dni całkowicie usuwał ten barwnik z roztworów [24, 25], natomiast *Ceriporia*

lacerata w odpowiednich warunkach proces dekoloryzacji z efektywnością ponad 90 % przeprowadzała w zaledwie 48 h [26]. Pozostałe barwniki, takie jak RBBR i zieleń brylantowa, były również badane i usuwane z różną skutecznością przez grzyby [23, 27, 28]. Dla przykładu, szczep MW84 zaliczany do boczników usuwał zieleń brylantową w ponad 60 % niezależnie od składu podłoża, a drugi z przedstawicieli tego samego gatunku odbarwiał roztwory jedynie w obecności dużych stężeń związków organicznych w podłożu hodowlanym. Dużą efektywność dekoloryzacji RBBR wchodzącego w skład mieszaniny M1 przez boczniki uzyskali również Cassieri i inni [27]. W przypadku badań Bibi i Bhatti [28] barwnik RBBR okazał się najlepiej usuwanym barwnikiem reaktywnym. Jak zatem pokazują wyniki badań innych autorów, wytypowane do utworzenia mieszaniny barwniki, mimo swojej toksyczności i słabej podatności na biodegradację, mogą być efektywnie usuwane przez grzyby. Biorąc powyższe pod uwagę oraz przedstawione powyżej badania dotyczące mieszaniny M1, należy stwierdzić, że prawdopodobną przyczyną trudności w usuwaniu mieszanin jest interakcja zachodząca między barwnikami.

Pogorszenie efektywności dekoloryzacji w przypadku mieszanin barwników w stosunku do czystych substancji obserwowano już wcześniej [24]. Badania prowadzono na dwuskładnikowej mieszaninie zieleni brylantowej i azowego błękitu Evansa z użyciem grzybni szczepów BWPH i RWP17. Uzyskane dla niej wyniki były zbliżone z wynikami dla mieszaniny M2, bowiem obserwowano, iż wraz ze wzrostem jej stężenia efektywność usuwania barwy maleje. Jednocześnie obserwowano, że nawet mieszanina barwników $0,12 \text{ g/dm}^3$ jest usuwana przez oba szczepy w ponad 60 %, co znacząco różni się od wyników uzyskanych dla M2, a w przypadku szczepu BWPH również i M1.

Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania potwierdzają, że proces usuwania mieszanin barwników może stanowić poważne wyzwanie, bowiem nawet szczepy znane ze swoich dobrych właściwości dekoloryzacyjnych względem pojedynczych barwników, przy zmianach zachodzących podczas mieszania barwników, mogą mieć trudność w usuwaniu powstających mieszanin, co zaobserwowano szczególnie na przykładzie szczepu BWPH i mieszaniny M1. Biorąc pod uwagę procesy zachodzące dla M1 i M2, zarówno w kontekście usunięcia barwy, jak i stężenia suchej masy grzybni, w próbkach zaobserwowano, iż obie mieszaniny przez każdy z wykorzystanych w badaniach szczepów były usuwane z różną intensywnością, a efektywność procesu nie zależała od stężenia biomasy. Mechanizm usuwania mieszanin jest trudny do określenia ze względu na złożoność procesów zachodzących w próbkach. Znaczące różnice intensywności procesu dekoloryzacji potwierdzają konieczność prowadzenia dalszych badań nad usuwaniem mieszanin barwników z różnych klas, w tym składających się z większej ilości barwników. Potwierdzono również, że szczepy tego samego gatunku różnią się znacząco zarówno efektywnością prowadzenia procesu, jak i mechanizmem usuwania barwy. Mimo niezbyt wysokiego stopnia usunięcia barwy w przypadku M2 szczep RWP17 wydaje się być bardzo obiecujący do wykorzystania w usuwaniu mieszanin barwników.

Podziękowania

Badania były finansowane z projektu 08/080/BK_19/0067 (BK-258/RIE8/2019).

Literatura

- [1] Bhatia D, Sharma NR, Singh J, Kanwar RS. *Critical Rev Environ Sci Technol.* 2017;47(19):1836-76. DOI: 10.1080/10643389.2017.1393263.
- [2] Benkhaya S, M'rabet S, El Harfi A. *Heliyon.* 2020;6(1):e03271. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03271.
- [3] Bafana A, Devi SS, Chakrabarti T. *Environ Rev.* 2011;19(NA):350-71. DOI: 10.1139/a11-018.
- [4] Markandeya T, Shukla SP, Mohan D. *Res J Environ Toxicol.* 2017;11:72-89. DOI: 10.3923/rjet.2017.72.89.
- [5] O'Neill C, Hawkes FR, Hawkes DL, Lourenço ND, Pinheiro HM, Delée W. *J Chem Technol Biotechnol.* 1999;74(11):1009-18. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199911)74:11<1009::AID-JCTB153>3.0.CO;2-N.
- [6] Lade H, Govindwar S, Paul D. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(6):6894-918. DOI: 10.3390/ijerph120606894.
- [7] Lellis B, Fávoro-Polonio CZ, Alencar Pamphile J, Polonio JC. *Biotechnol Res Innovation.* 2019;3(2):275-90. DOI: 10.1016/j.biori.2019.09.001.
- [8] Katheresan V, Kansedo J, Jon Lau S. *J Environ Chem Eng.* 2018;6(4):4676-97. DOI: 10.1016/j.jece.2018.06.060.
- [9] Anjaneyulu Y, Chary NS, Suman Raj DS. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2005;4(4):245-73. DOI: 10.1007/s11157-005-1246-z.
- [10] Yang CL, McGarrah J. *J Hazard Mater.* 2005;127(1-3):40-7. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.05.050.
- [11] Bharathi KS, Ramesh ST. *Appl Water Sci.* 2013;3(4):773-90. DOI: 10.1007/s13201-013-0117-y.
- [12] Gupta VK. *J Environ Manage.* 2009;90(8):2313-42. DOI: 10.1016/j.jenvman.2008.11.017.
- [13] Daud NK, Hameed BH. *Desalination.* 2011;269:291-3. DOI: 10.1016/j.desal.2010.11.016.
- [14] Slokar YM, Le Marechal AM. *Dyes Pigments.* 1998;37:335-56. DOI: 10.1016/S0143-7208(97)00075-2.
- [15] Fu Y, Viraraghavan T. *Bioresour Technol.* 2001;79:251. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00028-1.
- [16] Khan R, Bhawana P, Fulekar MH. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2013;12:75-97. DOI: 10.1007/s11157-012-9287-6.
- [17] Knapp JS, Newby PS, Reece LP. *Enzyme Microb Technol.* 1995;(17):664-8. DOI: 10.1016/0141-0229(94)00112-5.
- [18] Kaushik P, Malik A. *Environ Int.* 2009;35:127-41. DOI: 10.1016/j.envint.2008.05.010.
- [19] Forootanfar H, Moezzi A, Aghaie-Khozani M, Mahmoudjanlou Y, Ameri A, Niknejad F, et al. *Iran J Environ Health Sci Eng.* 2012;9:27. DOI: 10.1186/1735-2746-9-27.
- [20] Liu Y, Jiang Y, Hu M, Li S, Zhai Q. *Chem Eng J.* 2015;273:371-80. DOI: 10.1016/j.cej.2015.03.109.
- [21] Radhika R, Jebapriya GR, Gnanadoss JJ. *Pakistan J Biol Sci.* 2014;17:248-53. DOI: 10.3923/pjbs.2014.248.253.
- [22] Przysaś W, Zabłocka-Godlewska E, Grabińska-Sota E. *Brazilian J Microbiol.* 2015;46(2):415-24; DOI: 10.1590/S1517-838246246220140167.
- [23] Przysaś W, Zabłocka-Godlewska E, Grabińska-Sota E. *Desalin Water Treat.* 2019;161:376-86. DOI: 10.5004/dwt.2019.24314.
- [24] Asses N, Ayed L, Hkiri N, Hamdi M. *D. Bio Med Res Int.* 2018; 9 p. DOI: 10.1155/2018/3049686.
- [25] Asses N, Ayed L, Hkiri N, Hamdi M. *Bio Med Res Int.* 2019; DOI: 10.1155/2018/3049686.
- [26] Wang N, Chu Y, Wu F, Zhao Z, Xu X. *Int Biodeterioration Biodegradation.* 2017;117:236-44. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.12.015.
- [27] Casieri L, Varese GC, Anastasi A, Prigione V, Svobodová K, Filippello Marchisto V, et al. *Folia Microbiol.* 2008;53(1):44-52. DOI: 10.1007/s12223-008-0006-1.
- [28] Bibi I, Bhatti HN. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;166:2078-90. DOI: 10.1007/s12010-012-9635-6.

THE USAGE OF SELECTED STRAINS OF *Basidiomycota* TO REMOVE MIXTURE OF DYES FROM DIFFERENT CLASSES

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

Abstract: Synthetic dyes, due to their toxicity and low biodegradability, belong to hazardous and hardly removable contaminants. Even bigger problems are caused by their mixtures. The aim of the study was to analyze the effectiveness of removing of mixtures of dyes from various classes using selected strains of *Basidiomycota* (*Pleurotus ostreatus* - BWPH and K4, *Polyporus picipes* - RWP17). Two-component mixtures consisting of anthraquinone remazol brilliant blue R (RBBR), azo Congo red and triphenylmethane brilliant green (concentration range of mixtures 0.01-0.15 g/dm³) were tested. Removal of dyes was analyzed at the wavelengths corresponding to the highest absorbance. Surprisingly with increasing concentration of mixture 1 (CK+RBBR), increased removal of colour by BWPH and K4 strains was observed. This mixture was well removed by the RWP17 strain and decolourisation efficiency decreased with increasing concentration (from 95 to 75 %). Removal of mixture 2 (CK+ZB) was very high for *Pleurotus strains* - increase in the concentration caused a decrease in the efficiency of the process (from 100 to 0 %). The RWP17 strain removed this mixture with different degrees at different wavelengths. Studies have confirmed that the removal of dye mixtures is very challenging, and the process efficiency depends on the mixture composition, concentration and the strain used.

Keywords: mixture of dyes, basidiomycota, decolourisation, azo dyes, triphenylmethane dyes antraquinone dyes