

Wioletta Przysaś, Ewa Zabłocka-Godlewska, Elżbieta Grabińska-Sota, Monika Urbaniak

## Badania zdolności wybranych szczepów grzybów ligninolitycznych do rozkładu barwników syntetycznych

Liczbę używanych obecnie barwników szacuje się na ponad 10 tys. [1–4], przy czym z tak szerokim zastosowaniem tych substancji wiąże się niestety także wzrost zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Wiele z nich jest bardzo trwałych i ma właściwości toksyczne, mutagenne i rakotwórcze. Zakłada się bowiem, że dobry barwnik powinien być substancją odporną na wodę, pot, światło, wiele chemikaliów (środki utleniające) oraz atak mikroorganizmów [5]. W przypadku zastosowania barwników są to cechy pożądane, jednak w przypadku ich utylizacji cechy te stanowią istotny problem. Niedoskonałość przemysłowych procesów technologicznych powoduje, że nawet do 15% barwników przedostaje się do oczyszczalni ścieków. Konwencjonalny proces osadu czynnego nie pozwala na istotne zmniejszenie intensywności barwy ścieków [6–8]. Dlatego problem poszukiwania skutecznych metod usuwania barwników ze ścieków pozostaje wciąż aktualny. Najczęściej do tego celu stosuje się procesy fizyczno-chemiczne, które często są zbyt drogie i powodują powstawanie dużej ilości osadów [6–11]. Obecnie pojawia się wiele doniesień dotyczących akumulacji różnych mutagennych barwników w osadach dennych zbiorników wodnych oraz o ich szkodliwym wpływie na organizmy występujące w tych zbiornikach [6], a także w glebie [11]. Ponieważ metody biologiczne wydają się najbardziej bezpieczne środowiskowo, dlatego wciąż poszukuje się szczepów organizmów o dużym potencjale rozkładu barwników. Szczególnie obiecujące są badania prowadzone z udziałem różnych szczepów grzybów, ponieważ ta grupa organizmów wykorzystuje do tego celu szereg egzoenzymów, które pozwalają na rozkład wielu toksycznych zanieczyszczeń bez ich transportu do wnętrza komórki [11].

Celem badań było pozyskanie ze środowiska naturalnego szczepów grzybów ligninolitycznych, zdolnych do skutecznego rozkładu wybranych barwników syntetycznych. Szczepy takie mogłyby w przyszłości posłużyć do stworzenia bioreaktora pozwalającego skutecznie ograniczyć barwę ścieków przed ich wprowadzeniem do odbiornika. Reaktor taki powinien być uniwersalny i działać bez zakłóceń, nawet przy zmianie barwnika czy grupy barwników stosowanych w danym procesie produkcyjnym. W tym celu wyizolowane ze środowiska szczepy grzybów poddano szeregowi testów, uwzględniających typ i skład podłoża oraz barwniki wybrane z trzech grup najpowszechniej stosowanych (azowe, trójfenylometanowe i fluorenowe).

### Materiały i metodyka

Wykorzystane w badaniach szczepy grzybów zostały wyizolowane z wykorzystaniem metody tkankowej lub zarodnikowej z owocników porastających pnie drzew oraz owocników rosnących na ściółce. Izolacji dokonano na podłożu MEA (Difco) z dodatkiem chloramfenikolu ( $100 \text{ g/m}^3$ ), a czyste szczepy przechowywano do czasu badań w temp.  $4^\circ\text{C}$ . Do badań wytypowano 24 dobrze rozwijające się szczepy grzybów oznaczone symbolami MW11, MW13, MW31, MW34, MW36, MW44, MW45, MW48, MW49, MW60, MW66, MW73, MW79, MW84, MW86, MW103, MW113, MW132, MW133, MW140, MW141, MW143, MW170 i MW171. Przed wprowadzeniem do odpowiednich testów szczepy hodowano na podłożu MEA (Difco) z dodatkiem chloramfenikolu przez  $5\div 7$  d (w zależności od szybkości wzrostu grzybni).

W badaniach wykorzystano pięć barwników – dwa trójfenylometanowe (fiolet genecjany – FG i zieleń brylantowa – ZB), dwa fluorenowe (erytrozyna – E i róż bengalski – RB) i jeden azowy (dwuazowy błękit Evansa – BE). Barwniki dodano do wszystkich hodowli w tej samej ilości  $100 \text{ g/m}^3$ . Długość fali (przy maksymalnej absorpcji) w przypadku każdego barwnika dobrano eksperymentalnie z użyciem spektrofotometru UV-VIS (HP Diode Array Spectrophotometer 8452A). Wyznaczone długości fali wynosiły odpowiednio  $590 \text{ nm}$  (FG),  $624 \text{ nm}$  (ZB),  $527 \text{ nm}$  (E),  $548 \text{ nm}$  (RB) i  $611 \text{ nm}$  (BE).

Testy przeprowadzono z użyciem dwóch typów podłoży – bogatego w składniki pokarmowe YEPG i uboższego MSB. Oba podłoża zastosowano zarówno w postaci płynnej, jak i stałej. Podłoże YEPG zawierało glukozę ( $10 \text{ g/dm}^3$ ), pepton ( $5 \text{ g/dm}^3$ ), ekstrakt drożdżowy ( $2 \text{ g/dm}^3$ ) oraz  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1 \text{ g/dm}^3$ ) i  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \text{ g/dm}^3$ ) ( $\text{pH}=5,6$ ). W przypadku podłoża stałego dodano jeszcze agar ( $20 \text{ g/dm}^3$ ). Podłoże MSB zawierało glukozę ( $10 \text{ g/dm}^3$ ), winian amonu ( $0,2 \text{ g/dm}^3$ ), tiaminę ( $10 \text{ mg/dm}^3$ ) oraz  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $2 \text{ g/dm}^3$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \text{ g/dm}^3$ ) i  $\text{CaCl}_2$  ( $0,1 \text{ g/dm}^3$ ) ( $\text{pH}=5,6$ ). W przypadku stałego podłoża MSB również dodano agar ( $20 \text{ g/dm}^3$ ). Barwniki wprowadzono do podłoży płynnych po wcześniejszym namnożeniu w nich biomasy grzybów, natomiast do podłoża stałego barwniki dodano po uprzednim autoklawowaniu podłoża i jego zestaleniu. Podłoża wysterlizowano przez autoklawowanie ( $121^\circ\text{C}$ ,  $1,5 \text{ atm}$ ,  $15 \text{ min}$ ).

W przypadku podłoży płynnych, grzybnię rozrośniętą na podłożu MEA pocięto na fragmenty o średnicy  $5 \text{ mm}$  i wprowadzono do probówek z odpowiednim podłożem. Każdy test przygotowano w trzech powtórzeniach. Tak zaszczipione probówki zawierające  $10 \text{ cm}^3$  odpowiedniego

Tabela 1. Skuteczność rozkładu wybranych barwników przez testowane szczepy grzybów na podłożach płynnych YEPG i MSB (%)  
 Table 1. Efficiency of color reduction (%) by some fungal strains in liquid YEPG and MSB media

Szczep	Nazwa gatunkowa	Podłoże	Róż bengalski	Erytrozyna	Fiolet gencjany	Zieleń brylantowa	Błękit Evansa
MW11	<i>Piptoporus betulinus</i>	YEPG	94,6±7,9	98,0±2,4	38,9±11,1	95,5±0,9	86,3±6,2
		MSB	100,0±0,0	99,7±0,6	24,5±3,8	88,1±7,3	68,8±4,1
MW13	<i>Piptoporus betulinus</i>	YEPG	30,0±3,6	92,7±2,9	36,3±3,4	6,4±11,2	88,7±5,2
		MSB	100,0±0,0	95,9±2,9	22,6±8,1	70,3±8,1	37,0±7,4
MW31	<i>Letinula edodes</i>	YEPG	25,3±10,0	1,7±2,3	20,8±13,5	0,0±0,0	52,8±22,0
		MSB	96,9±1,2	68,2±11,3	38,2±8,1	64,9±13,7	39,8±6,6
MW34	<i>Trametes hirsuta</i>	YEPG	5,8±2,1	45,4±6,8	62,1±3,5	81,1±8,7	73,2±2,0
		MSB	96,4±0,5	93,1±1,1	16,3±8,5	46,8±3,6	11,1±4,1
MW36	<i>Alternaria</i> sp.	YEPG	88,2±5,5	88,0±10,7	50,7±9,7	79,3±7,3	71,7±2,5
		MSB	91,3±5,9	90,2±3,8	5,1±7,5	0,0±0,0	63,9±0,0
MW44	szczep niezidentyfikowany	YEPG	37,2±23,8	60,0±2,7	27,3±4,5	63,6±6,7	79,1±0,8
		MSB	96,3±1,7	81,7±6,9	21,6±4,8	65,9±10,7	16,3±0,3
MW45	szczep niezidentyfikowany	YEPG	61,1±5,9	60,5±7,0	65,3±8,7	8,8±0,7	72,7±7,0
		MSB	98,1±1,2	93,0±0,5	5,8±10,1	70,8±3,0	3,6±5,8
MW48	<i>Postia stiptica</i>	YEPG	57,6±12,3	83,4±26,3	79,5±6,2	80,2±2,6	81,0±4,7
		MSB	86,0±3,7	26,0±5,8	0,0±0,0	26,0±0,3	0,0±0,0
MW49	<i>Fomitopsis pinicola</i>	YEPG	37,4±7,2	23,0±0,9	87,2±1,5	52,7±1,8	95,0±0,5
		MSB	94,4±2,0	86,0±1,6	43,8±8,5	97,3±0,5	72,2±6,8
MW60	<i>Lycoperdon perlatum</i>	YEPG	88,1±0,2	61,5±9,0	46,4±3,8	68,2±0,1	94,4±4,4
		MSB	96,6±1,6	92,4±1,2	2,6±4,5	59,8±2,7	2,7±4,7
MW66	<i>Amanita muscaria</i>	YEPG	45,4±12,0	55,0±9,0	79,4±0,9	80,7±10,3	65,9±6,6
		MSB	84,2±14,9	97,0±0,5	53,8±4,2	86,7±2,9	95,0±3,5
MW73	<i>Pleurotus ostreatus</i>	YEPG	0,0±0,0	24,4±0,4	35,3±9,8	55,9±21,4	36,3±4,0
		MSB	47,4±5,7	38,7±3,8	33,0±1,3	0,0±0,0	26,9±0,0
MW79	szczep niezidentyfikowany	YEPG	44,3±3,1	46,3±5,8	75,2±0,6	65,0±6,9	62,7±7,4
		MSB	45,1±10,2	49,2±6,6	0,3±0,5	81,7±6,0	70,0±8,5
MW84	<i>Pleurotus ostreatus</i>	YEPG	0,0±0,0	34,0±5,0	44,4±0,6	66,4±4,7	56,7±4,1
		MSB	35,5±6,3	83,1±0,4	9,9±7,6	59,9±25,0	79,4±1,1
MW86	<i>Ganoderma lucidum</i>	YEPG	53,7±5,6	88,8±0,6	32,1±5,5	47,8±5,8	37,9±4,6
		MSB	67,1±6,2	80,3±4,5	11,8±8,9	0,0±0,0	67,7±3,8
MW103	<i>Chondrostereum purpureum</i>	YEPG	58,9±5,6	46,8±4,9	77,5±5,0	75,8±7,9	0,0±0,0
		MSB	96,0±4,1	98,5±0,2	36,5±6,7	87,1±0,8	87,4±11,1
MW113	szczep niezidentyfikowany	YEPG	54,7±13,6	96,6±2,2	74,7±3,8	96,2±0,2	98,4±1,1
		MSB	89,3±10,5	98,0±1,0	0,0±0,0	94,3±0,5	94,4±3,1

Szczep	Nazwa gatunkowa	Podłoże	Róż bengalski	Erytrozyna	Fiolet gencjany	Zieleń brylantowa	Błękit Evansa
MW132	<i>Phlebia radiata</i>	YEPG	84,0±2,5	81,1±0,2	23,2±0,0	49,5±6,2	67,9±12,2
		MSB	92,8±2,1	90,2±3,0	57,5±2,7	0,0±0,0	96,0±0,7
MW133	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	YEPG	90,0±1,6	81,5±2,5	34,2±4,5	16,2±4,0	72,5±0,1
		MSB	89,1±7,0	91,4±1,8	61,4±8,2	0,0±0,0	94,0±3,1
MW140	<i>Polyporus brumalis</i>	YEPG	41,7±11,2	72,0±10,0	85,1±5,9	12,2±1,3	50,9±4,5
		MSB	54,3±19,9	80,0±3,1	34,2±9,9	75,1±2,2	73,0±1,3
MW141	<i>Schizophyllum commune</i>	YEPG	50,6±5,9	39,5±5,1	56,8±3,8	58,0±5,9	92,0±4,4
		MSB	87,6±8,6	92,1±2,4	25,5±2,4	0,0±0,0	83,7±1,4
MW143	<i>Hypholoma fasciculare</i>	YEPG	8,6±8,3	8,8±9,7	19,9±18,5	53,6±42,3	34,9±7,1
		MSB	94,1±0,9	93,4±1,1	65,0±5,1	86,6±5,3	70,6±7,5
MW170	<i>Pleurotus eryngii</i>	YEPG	44,3±0,0	12,9±2,4	40,3±18,4	95,7±0,1	57,0±4,0
		MSB	41,1±23,1	29,8±6,8	17,7±16,1	9,1±15,7	62,8±12,4
MW171	<i>Ganoderma lucidum</i>	YEPG	77,6±0,1	47,3±1,7	48,9±2,4	0,0±0,0	33,8±5,9
		MSB	44,2±8,9	74,2±4,4	62,9±34,3	33,9±0,0	51,2±0,8

podłoża inkubowano przez 7 d (26°C) w celu namnożenia odpowiedniej ilości biomasy. Do probówek wprowadzono po 1 cm<sup>3</sup> roztworu danego barwnika, wysterylizowanego uprzednio przez filtrację (celulozowe filtry strzykawkowe o porach 0,20 µm). Po 10 d próbki inkubowane w warunkach statycznych odwirowano (10 tys. obr./min przez 15 min) i zmierzono absorbancję otrzymanego roztworu. W przypadku podłoży stałych grzybnie rozrośniętą na podłożu MEA również pocięto na fragmenty o średnicy 5 mm, po czym na każdym podłożu zawierającym odpowiedni barwnik umieszczono po trzy krawki grzybni. Każdą płytkę zawierającą 3 krawki grzybni posiano w dwóch powtórzeniach (6 powtórzeń na jeden szczep w przypadku jednego barwnika). Codziennie prowadzono obserwacje wzrostu grzybni na podłożach zawierających barwniki oraz ewentualne strefy przejaśnienia wokół kolonii. Po 10 d eksperymentu odczyty zakończono i zmierzono strefy przejaśnień oraz wzrost grzybni.

## Dyskusja wyników badań

Poszukiwanie skutecznych metod usuwania barwników z wody i ścieków jest wciąż ważnym problemem, o czym świadczy liczba publikacji dotyczących dekoloryzacji z użyciem zarówno metod fizyczno-chemicznych, jak i biologicznych. Badania przeprowadzone w wielu ośrodkach naukowych potwierdziły, że procesy biologiczne, m.in. z udziałem grzybów, można zaliczyć do jednych z najbardziej skutecznych. Badania opisane w pracach [12–17] wskazują również, że duży potencjał rozkładu barwników mają grzyby białej zgnilizny, ale także brązowej zgnilizny drewna oraz grzyby mikoryzowe. Do chwili obecnej szczególnie dobrze przebadano *Phanerochaete chrysosporium* [5, 16–18], dla którego udowodniono zdolność rozkładu szeregu różnorodnych ksenobiotyków, w tym wielu barwników. Jak jednak wykazały badania [16], nie należy pomijać

także innych gatunków grzybów. Badania przesiewowe wykazały bowiem, iż *Irpex lacteus* może nawet skuteczniej usuwać różne barwniki niż dobrze scharakteryzowany już *P. chrysosporium* [17]. Podobne wnioski w przypadku jednego szczepu grzybów zawiera praca [19].

Przeprowadzone badania dotyczyły głównie grzybów zgnilizny drewna i grzybów ściółkowych, będących przedstawicielami Basidiomycota i Ascomycota (tab. 1). W ramach badań przesiewowych przetestowano szczepy pozyskane z terenów leśnych południowej Polski. Wyniki testów przeprowadzonych zarówno na podłożach stałych, jak i płynnych o różnym składzie potwierdziły dużą zdolność rozkładu wybranych barwników przez niektóre z wyizolowanych szczepów, zwłaszcza zaliczanych do grzybów białej zgnilizny drewna. Wyniki podstawowych testów zdolności rozkładu barwników w hodowlach płynnych przy udziale badanych szczepów grzybowych przedstawiono w tabeli 1. Stwierdzono, że zdolność rozkładu poszczególnych barwników była cechą indywidualną każdego szczepu i nie była związana z określonym gatunkiem. Na przykład szczepy MW11 i MW13, będące przedstawicielami tego samego gatunku, cechowała duża zdolność rozkładu erytrozyny na obu podłożach. Te same szczepy całkowicie odbarwiły próbki zawierające róż bengalski na podłożu MSB (100%), ale tylko szczep MW11 był w stanie z podobną skutecznością rozkładać ten barwnik na podłożu YEPG (94,6%). Również w przypadku trójfenylo-metanowej zieleni brylantowej szczep MW11 był skuteczniejszy niż MW13 (odpowiednio 95,5% i 6,4% rozkładu barwnika na podłożu YEPG). Korelacji między gatunkiem grzybów a ich zdolnością do rozkładu określonego barwnika nie stwierdzono także w przypadku izolatów bocznika ostrygowatego (MW73 i MW84). Mimo iż oba szczepy nie rozkładały skutecznie różu bengalskiego, to w przypadku pozostałych barwników właśnie szczep MW84 wykazywał ogólnie większą skuteczność. Duży potencjał *Pleurotus*

*ostreatus* do rozkładu wielu barwników stwierdzono także w pracy [16] wykazując, że szczep ten rozkładał zarówno barwniki antrachinonowe i azowe, jak i polimerowe (np. polyR 478). Wiele uwagi temu gatunkowi poświęcono także w pracy [4], w której udowodniono, iż grzyb ten przy udziale enzymów ligninolitycznych jest w stanie całkowicie rozłożyć barwnik RBBR (Remazol Brilliant Blue R) już w ciągu 3 d.

Nie zaobserwowano też korelacji między typem barwnika, a skutecznością jego rozkładu. Co prawda większość szczepów lepiej rozkładała barwniki fluorenowe (róż bengalski i erytrozyna) niż barwniki trójfenylometanowe czy azowy błękit Evansa, jednak w przypadku szczepów MW11, MW13, MW34, MW44, MW48, MW66, MW73, MW84, MW113 i MW140 erytrozyna była lepiej rozkładana niż róż bengalski. W przypadku sześciu innych testowanych szczepów to róż bengalski był łatwiej rozkładany niż erytrozyna. Zatem zaobserwowano zdecydowane różnice w skuteczności rozkładu poszczególnych barwników. Trójfenylometanowa zieleń brylantowa była rozkładana w ponad 80% przez 13 szczepów, w tym przez MW11, MW113 i MW170 w ponad 95%, podczas gdy fiolet gencjany uległ rozkładowi w ponad 80% tylko z udziałem szczepów MW49 (87,2%) i MW140 (85,1%). Fiolet gencjany okazał się zatem barwnikiem wyjątkowo trudno rozkładalnym dla testowanych szczepów. Drugi z barwników trójfenylometanowych – zieleń brylantowa – został rozłożony w ponad 80% przez szczepy MW11 (95,5 i 88,1%, odpowiednio na podłożu YEPG i MSB), MW34 (81,1% na YEPG), MW48 (80,2% na YEPG), MW49 (97,3% na MSB), MW66 (80,7 i 86,7%, odpowiednio na YEPG i MSB), MW79 (81,7% na MSB), MW113 (96,2% i 94,3% odpowiednio na YEPG i MSB), MW143 (86,6% na MSB) i MW170 (95,7% na YEPG). Oba barwniki były dodane do próbek w tej samej ilości (100 g/m<sup>3</sup>).

Jak już wielokrotnie udowodniono, właśnie budowa chemiczna barwnika ma zdecydowany wpływ na skuteczność jego rozkładu. Decydują o tym nawet niewielkie różnice w strukturze tych związków [7, 12, 14, 15, 20, 21]. W przypadku fioletu gencjany czy zieleni brylantowej należy dodatkowo uwzględnić fakt, że barwniki te stosowane są powszechnie do dezynfekcji. Fiolet gencjany jest znanym środkiem zapobiegającym rozwojowi grzybicy w jamie ustnej, zatem jako fungistatyk jest dla tej grupy organizmów trudnym substratem [6].

Mimo iż barwniki azowe należą do substancji najtrudniej biologicznie rozkładanych [11], to w przypadku testowanych szczepów grzybów aż 10 spośród 24 szczepów było w stanie rozłożyć błękit Evansa w ponad 80%. Jak widać, większość badanych szczepów lepiej rozkładała ten barwnik na podłożu YEPG, natomiast szczepy MW113 i MW141 rozkładały ten barwnik niezależnie od zastosowanego podłoża (odpowiednio 98,4 i 92,0% na YEPG i 94,4% i 83,7% na MSB). Zdolność rozkładu dwuazowego błękitu Evansa ze skutecznością większą niż 80% stwierdzono w przypadku szczepów *Piptoporus* MW11 i MW13 na podłożu YEPG (odpowiednio 86,3% i 88,7%), MW48, MW49, MW60 również na podłożu YEPG (odpowiednio 81,0%, 95,0%, 94,4%) oraz MW66, MW103, MW132 i MW133 na podłożu MSB (odpowiednio 95,0%, 87,4%, 96,0% i 94,0%). Na obu podłożach szczególnie dobre wyniki uzyskano w przypadku szczepów MW113 i MW141 (w zależności od podłoża odpowiednio 98,4% i 94,4% oraz 92,3% i 83,7%).

Jak wykazały przeprowadzone badania, nie odnotowano wyraźnej korelacji między zdolnością usuwania barwników przez poszczególne szczepy a zastosowanym podłożem. Podobne obserwacje opisano w pracy [17] – pewne barwniki były lepiej rozkładane na podłożach ubogich w azot, a inne na podłożach uboższych również w inne składniki pokarmowe, co było szczególnie widoczne w przypadku barwników antrachinonowych. Szczep MW48 również rozkładał erytrozynę z większą skutecznością na podłożu YEPG, natomiast róż bengalski zdecydowanie lepiej na podłożu MSB (odpowiednio erytrozyna w 83,4% i 26,0% oraz róż bengalski w 57,6% i 86,0%). Słabo rozkładający barwniki na podłożu YEPG (<55%) szczep MW143 (*Hypholoma fasciculare*) rozkładał te same barwniki w ponad 65% na uboższym podłożu MSB. Inny z grzybów zgnilizny drewna, MW140 (*Polyporus brumalis*), z większą intensywnością rozkładał na podłożu MSB erytrozynę (80,0%), zieleń brylantową (75,1%) i błękit Evansa (73,0%). Grzyb ten jednak nie był w stanie równie skutecznie rozłożyć fioletu gencjany (tylko 34,2%, przy czym na podłożu YEPG – 85,1%). Podłoże MSB charakteryzuje się znacznie uboższą zawartością związków organicznych niż YEPG, przy czym podstawowy substrat węglowy stanowi tam glukoza, a źródłem azotu jest winian amonu. Być może taki właśnie skład podłoża stymuluje produkcję określonych enzymów. Stosunek C:N był mały, a – jak wiadomo – właśnie mały stosunek tych dwóch pierwiastków może odpowiadać za zwiększoną produkcję enzymów ligninolitycznych [5, 22–24].

Z badań przeprowadzonych na podłożach płynnych wynika, że do szczepów mających wyraźną zdolność rozkładu wielu syntetycznych barwników organicznych należały MW11, MW48, MW66, MW103 i MW113, rozkładające w ponad 80% aż cztery spośród pięciu testowanych barwników należących do różnych grup. Zdecydowanie najszerzym spektrum działania wykazał się szczep MW49, który w zależności od zastosowanego podłoża był w stanie rozłożyć wszystkie badane barwniki ze skutecznością ponad 85%.

Podłoża stałe – odmiennie niż w przypadku podłoży płynnych – dały tylko jakościowy obraz możliwości rozkładu testowanych barwników przez szczepy grzybów. Wyniki testów przeprowadzonych na podłożach stałych przedstawiono na rysunku 1. Obserwowano strefy przejaśnienia wokół kolonii grzybów wyrosłych na podłożach. Spośród testowanych szczepów brak zdolności do rozkładu barwników na obu podłożach wykazały szczepy MW13, MW36 i MW48, a szczepy MW34 i MW86 nawet nie wyrosły w obecności barwników. Dodana do podłoża zieleń brylantowa hamowała możliwość wzrostu większości testowanych szczepów grzybów. Na podłożu YEPG wyrosło pięć szczepów, ale tylko szczepy MW113 i MW170 były w stanie w niewielkim stopniu rozłożyć dodany do podłoża barwnik. Podobnie na podłożu MSB tylko pięć szczepów wyrosło w obecności zieleni brylantowej, z czego rozkładały ten barwnik jedynie szczepy MW44, MW60 i MW113. Drugi z testowanych barwników trójfenylometanowych – fiolet gencjany – nie charakteryzował się aż tak dużą toksycznością. Wyniki te były zupełnie odmiennie od otrzymanych na podłożu płynnym. Na stałym podłożu YEPG szczepy MW44 i MW60 wykazały zdolność rozkładu fioletu gencjany, a na podłożu MSB takie właściwości miały także szczepy MW31 i MW73. Większość testowanych szczepów grzybów rosła intensywnie w obecności różu bengalskiego i erytrozyny, jednak tylko w przypadku kilku z nich (MW44, MW60) obserwowano strefy

przejaśnienia. Zdecydowanie największe strefy przejaśnienia, świadczące o zdolności do rozkładu barwnika, obserwowano w przypadku dwuazowego błękitu Evansa. Na obu podłożach z tym barwnikiem tylko dwa szczepy nie wykazały wzrostu, a brak stref odbarwienia zaobserwowano w przypadku szczepów MW13, MW36 i MW48.

Podczas poszukiwania szczepów aktywnych w usuwaniu barwników stosuje się szereg różnorodnych metod, zarówno testy na podłożach płynnych jak i stałych, głównie z użyciem pojedynczych barwników [14, 15–17, 25]. Aby wytypować szczepy najbardziej aktywne wykorzystuje się z reguły tylko jedną z tych metod, natomiast dokładniejsze badania prowadzi się już w hodowlach płynnych. W przypadku przeprowadzonych analiz wykorzystano obie metody, aby można było porównać wyniki uzyskane w różnych testach.

Jak wskazują dane zawarte w tabeli 1 i na rysunku 1, wyniki testów na podłożach stałych i płynnych nie pokrywały się. Na przykład szczepy MW44 i MW60 mogą rozkładać skutecznie wybrane barwniki na obu podłożach stałych. Wyjątek w obu przypadkach stanowiła zieleń brylantowa na podłożu YEPG. Jednak w próbkach szczepu te nie należały do zbyt aktywnych. Na podłożu YEPG szczep MW44 nie usunął żadnego z barwników w ponad 80%. Szczep MW60 na podłożu stałym potrafił odbarwić nawet fiolet gencjany, a na podłożu płynnym jego skuteczność nie osiągnęła nawet 50%. Podobne zależności odnotowano w przypadku dobrze radzących sobie na podłożu płynnym szczepów MW49 (*Fomitopsis pinicola*) i niezidentyfikowanego szczepu MW113. W przypadku pierwszego z nich większość barwników dodanych do podłoża stałego spowodowała zahamowanie wzrostu tego szczepu, a strefy przejaśnienia były obserwowane tylko w przypadku błękitu Evansa. Trochę lepiej radził sobie szczep MW113, który został wytypowany do dalszych badań. Na podłożach stałych wykazał strefy przejaśnienia tylko w obecności zieleni brylantowej i błękitu Evansa, a na podłożach płynnych

powodował skuteczny rozkład także barwników fluorenowych. W badaniach przesiewowych głównie wykorzystuje się jedną z opisanych powyżej metod. Odmienne wyniki opisano w pracach [14, 16, 17], w których stwierdzono istotną korelację między odbarwieniem obserwowanym na płytkach a zdolnością rozkładu barwników w hodowlach płynnych. Dodatkowym czynnikiem, który z pewnością miał wpływ na otrzymane wyniki był sposób prowadzenia hodowli grzybów na podłożu z barwnikiem. W przypadku podłoży płynnych hodowla miała charakter statyczny, a powierzchnia kontaktu grzybów z podłożem zawierającym barwnik była mała.

## Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość wykorzystania grzybów do rozkładu różnych grup barwników. Wśród szczepów wytypowanych do dalszych badań znalazły się MW11 (*Piptoporus betulinus*), MW48 (*Postia stiptica*), MW60 (*Lycoperdon perlatum*), MW66 (*Amanita muscaria*), MW103 (*Chondrostereum purpureum*), niezidentyfikowany szczep MW113 oraz szczep MW49 (*Fomitopsis pinicola*). Dominującą grupę stanowiły grzyby zgnilizny drewna, powszechnie występujące w środowisku. Dwa typy testów z wykorzystaniem barwników potwierdziły konieczność przeprowadzania szerokiego spektrum analiz przed wytypowaniem organizmów do dalszych badań. Stwierdzono, że zarówno rodzaj i skład podłoża hodowlanego, jak i sposób prowadzenia procesu odbarwiania miały istotny wpływ na wynik analiz. Szczepy dobrze sprawdzające się w testach płytkowych niekoniecznie dobrze radziły sobie w próbach płynnych. Dla odmiany te szczepy, które bardzo dobrze odbarwiały hodowle płynne, nie były w stanie odbarwić podłoża stałych. Jednocześnie na podłożach stałych odnotowano dużą tolerancję szczepów wobec barwników dodanych do podłoża, bez wykazania zdolności ich rozkładu. Stwierdzono również, że skuteczność procesu zależała nie tyle od grupy, do której przynależał dany barwnik, ale od struktury samego barwnika. Zależała ona również od składu podłoża wykorzystanego w badaniach, który może mieć wpływ na rodzaj enzymów produkowanych przez poszczególne szczepy. Konieczne jest zatem dokładniejsze przeanalizowanie wpływu warunków prowadzenia procesu rozkładu barwników i określenie wpływu powierzchni kontaktu grzybnia z substancjami toksycznymi na jej rozwój i skuteczność procesu odbarwiania. Wszystkie hodowle płynne były prowadzone w probówkach, co charakteryzowało je małą powierzchnią kontaktu szczepu z barwnikiem, gdyż grzybnia rozwijała się tylko na powierzchni. W dalszych badaniach przewiduje się także określenie szkodliwego wpływu metabolitów powstających w procesie rozkładu barwników na środowisko.

Praca została sfinansowana ze środków przeznaczonych na naukę w latach 2007–2010, jako projekt badawczy nr N523 17 85 33.

## LITERATURA

1. I.M. BANAT, P. NIGAM, D. SINGH, R. MARCHANT: Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. *Bioresource Technology* 1996, Vol. 58, pp. 217–227.
2. L. YOUNG, J. YU: Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 1997, Vol. 31, No. 5, pp. 1187–1193.

Szczep	YEPG					MSB				
	RB	E	FG	ZB	BE	RB	E	FG	ZB	BE
MW11										
MW13										
MW31										
MW34										
MW36										
MW44										
MW45										
MW48										
MW49										
MW60										
MW66										
MW73										
MW79										
MW84										
MW86										
MW103										
MW113										
MW132										
MW133										
MW140										
MW141										
MW143										
MW170										
MW171										

Wzrost bez odbarwienia    
  Odbarwienie    
  Brak wzrostu

Rys. 1. Skuteczność odbarwienia podłoży YEPG i MSB zawierających barwnik w ilości 100 g/m<sup>3</sup>

Fig. 1. Efficiency of decolorization of YEPG and MSB media containing 100 g/m<sup>3</sup> of dyes

3. L. LEVIN, L. PAPINUTTI, F. FORCHIASSIN: Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Biore-source Technology* 2004, Vol. 94, pp. 169–176.
4. G. PALMIERI, G. CENNAMO, G. SANNIA: Remazol Brilliant Blue R decolorization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 2005, Vol. 36, pp. 17–24.
5. D. WESENBERG, I. KYRIAKIDES, S.N. AGATHOS: White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 2003, Vol. 22, pp. 161–187.
6. W. AZMI, R. KUMAR SANI, U.C. BANERJEE: Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 1998, Vol. 22, pp. 185–191.
7. A.A.M. MARTINS, M.J. QUEIROZ, A.J.D. SILVESTRE, N. LIMA: Relationship of chemical structure of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation. *Research in Microbiology* 2002, Vol. 153, pp. 361–368.
8. I. EICHLEROVA, L. HOMOLKA, F. NERUD: Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology* 2006, Vol. 97, pp. 2153–2159.
9. A. KLEPACZ-SMÓLKA, K. PAŹDZIÓR, S. LEDAKOWICZ, J. SÓJKA-LEDAKOWICZ, Z. MROZIŃSKA, R. ŻYŁŁA: Kinetic studies of decolorisation of concentrates from nanofiltration treatment of real textile effluents in anaerobic/aerobic sequencing batch reactors. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 3, pp. 145–155.
10. K. MAJEWSKA-NOWAK: Ultrafiltration of dye solutions in the presence of cationic and anionic surfactants. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 4, pp. 111–121.
11. P.K. GILL, D.S. ARORA, M. CHANDER: Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *helbia* spp. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002, Vol. 28, pp. 201–203.
12. J.S. KNAPP, P.S. NEWBY, L.P. REECE: Decolorization of wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 1995, Vol. 17, pp. 664–668.
13. M.T. MOREIRA, I. MIELGO, G. FEIJOO, J.M. LEMA: Evaluation of different fungal strains in the decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology Letters* 2000, Vol. 22, pp. 1499–2000.
14. A. JAROSZ-WILKOŁAZKA, J. KOCHMAŃSKA-RDEST, E. MALARCZYK, W. WARDAS, A. LEONOWICZ: Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, Vol. 30, pp. 566–572.
15. W. LIU, Y. CHAO, X. YANG, H. BAO, S. QIAN: Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002, Vol. 28, pp. 201–203.
16. C. NOVOTNY, B. RAWAL, M. BHATT, M. PATEL, V. SASEK, H.P. MOLITORIS: Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* 2001, Vol. 89, pp. 113–122.
17. C. NOVOTNY, K. SVOBODOVA, A. KASINATH, P. ERBANNOVA: Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2004, Vol. 54, pp. 215–223.
18. K.V. RADHA, A. REGUPATHI, A. ARUNAGIRI, T. MURUGESAN: Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry* 2005, Vol. 40, pp. 3337–3345.
19. M. CHANDER, D.S. ARORA: Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolorise industrial dyes. *Dyes and Pigments* 2007, Vol. 72, pp. 293–298.
20. S.B. POINTING, L.L.P. VRIJMOED: Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2000, Vol. 16, pp. 317–318.
21. K. SELVAM, K. SWAMINATHAN, K.S. CHAE: Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology* 2003, Vol. 88, pp. 115–119.
22. M. TATARKO, J.A. BUMPUS: Biodegradation of Congo red by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research* 1998, Vol. 32, No. 5, pp. 1713–1717.
23. Z. FU-MING, J.S. KNAPP, K.N. TAPLEY: Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology* 1999, Vol. 24, pp. 48–53.
24. Y. FU, T. VIRARAGHAVAN: Fungal decolorization of dye wastewater: A review. *Bioresource Technology* 2001, Vol. 79, pp. 251–262.
25. M.A.M. MARTINS, N. LIMA, A.J.D. SILVESTRE, M.J. QUEIROZ: Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere* 2003, Vol. 52, pp. 967–973.

**Przystas, W., Zablocka-Godlewska, E., Grabińska-Sota, E., Urbaniak, M. Potential Ability of Some Ligninolytic Fungal Strains to Decolorize Synthetic Dyes. *Ochrona Srodowiska* 2010, Vol. 32, No. 3, pp. 15–20.**

**Abstract:** Of the numerous methods that are in use for reducing colorants (many of the dyes are toxic), preference should be given to biological methods, as they do not produce additional groups of troublesome pollutants. In recent times much consideration has been focused on fungal decolorization of dye effluents. The aim of this work was to evaluate the potential ability of 24 isolated fungal strains (MW11, MW13, MW31, MW34, MW36, MW44, MW45, MW48, MW49, MW60, MW66, MW73, MW79, MW84, MW86, MW103, MW113, MW132, MW133, MW140, MW141, MW143, MW170 and MW171) to decolorize the synthetic dyes chosen. Use was made of fluorone dyes (erythrosine and Bengal rose), triphenylmethane dyes (brilliant green

and gentian violet), the diazo Evans blue dye, and the following two media, YEPG and MSB (both liquid and solid). The experimental results have corroborated the ability of the strains to decolorize the dyes tested, in many instances with an efficiency higher than 90%. The strains MW113 and MW49 were found to be particularly active regardless of the medium applied. The study has revealed that the efficiency of the decolorization process depends not so much on the group into which the dye has been classified, as on the specific structure and composition of the dye, as well as on the form of the medium and on the strain used in the experiment. This finding substantiates the necessity of using a set of different tests even in the screening experiments, because the results of a single test may not be sufficient for a complete description of the potential abilities of the organisms tested.

**Keywords:** Decolorization, fungi, azo dyes, fluorone dyes, triphenylmethane dyes.