



The influence of growth conditions on removal of azo Evans blue by strain *Escherichia*

Ewa ZABŁOCKA-GODLEWSKA¹, Wioletta PRZYSTAŚ¹

¹ Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice, tel.: +48 32 2372855, e-mail: ewa.zablocka-godlewska@polsl.pl

Abstract

Bacteria from different taxonomic groups are commonly used in processes of biological decolourization of azo dyes. The proper choice of the strain of bacteria and optimization of growth conditions impact on decolourization results. The aim of experiment was estimation of influence of dye concentration, a various level of sample aeration and type of solid supports used for biomass immobilization on efficacy of Evans blue (EB) decolourization. The results of dye concentration test showed that content of 0.1 g/L is too high for studied strain of *E. coli*. In the main experiment concentration 0.08 g/L was used. The tests of many solid supports indicate that the choice of them should not be a random. From the 14 tested solid supports for the main experiment only 2 were selected (wheat straw, flush grid). The type of used solid supports without living bacteria significantly influenced on the dye removal effects. Wheat straw had definitely better sorption properties than flush grid and differences were statistically important. Statistically important differences were also observed in case of usage the solid support with immobilized bacteria biomass. Definitely better results were reached for bacteria immobilized on the wheat straw. The growth conditions: static, semistatic, dynamic had no crucial influence on efficacy of Evans blue removal.

Keywords: decolourization, bacterial processes, biomass solid supports, immobilization, sorption, *Escherichia coli*

Streszczenie

Wpływ warunków hodowli na usunięcie azowego błękitu Evansa przez szczep *Escherichia coli*

W biologicznej dekoloryzacji barwników azowych szerokie zastosowanie znajdują bakterie należące do różnych grup taksonomicznych. Odpowiedni dobór szczepu oraz optymalizacja warunków jego wzrostu decydują o wynikach dekoloryzacji. Celem niniejszych badań było określenie wpływu stężenia barwnika, warunków zróżnicowanego natlenienia prób oraz typu zastosowanego nośnika biomasy na efektywność dekoloryzacji błękitu Evansa (EB). Testy stężeniowe wykazały, że zawartość 0,1 g/L jest zbyt wysoka dla badanego szczepu *E. coli*, zatem użyte w eksperymencie stężenie to 0.08g/L. Testy nośników naturalnych i syntetycznych wykazały, że jest to ważny etap badań, gdyż dobór nośnika nie może być przypadkowy. Spośród 14 testowanych nośników do badań wytypowano 2 (słomę pszeniczną i siatkę podtylnową). Rodzaj użytego nośnika bez żywej biomasy istotnie wpłynął na efekty usunięcia. Zdecydowanie lepsze właściwości sorpcyjne posiadała słoma, a różnice te były istotne statystycznie. Istotne statystycznie różnice stwierdzono również w przypadku użycia nośników z immobilizowaną na nich biomasą. Dużo lepsze wyniki uzyskano dla biomasy immobilizowanej na słomie. Warunki hodowli: statyczne, półstatyczne i dynamiczne nie miały istotnego wpływu na efekty usunięcia EB.

Słowa kluczowe: dekoloryzacja, bakteryjne procesy, nośniki biomasy, immobilizacja biomasy, sorpcja, *Escherichia coli*.

1. Wstęp

Barwniki azowe są najliczniejszą grupą barwników syntetycznych, powszechnie stosowanych w licznych gałęziach przemysłu, zwłaszcza tekstylnym, papierniczym, skórzanym, farmaceutycznym, kosmetycznym czy tworzyw sztucznych. Popularność ich stosowania wynika z niskich kosztów produkcji, trwałości wybarwienia oraz imponującej różnorodności kolorów [1-12].

Powszechność stosowania barwników niesie za sobą znaczne obciążenie środowiska. Konsekwencją ich obecności w wodach powierzchniowych jest ograniczenie przenikania światła, produkcji pierwotnej, zwiększenie deficytu tlenowego, pogorszenie warunków życia organizmów żywych. Bezpośrednie zagrożenie dla organizmów żywych wynika z często toksycznego, mutagennego, kancerogennego charakteru tych substancji oraz produktów ich biologicznych, jak i fizyko-chemicznych przemian. Poważnym problemem ekologicznym jest trwałość tych substancji i możliwość przenikania do sieci troficznej [4-7, 13-16]. W związku z powyższym poszukuje się skutecznych, tanich i bezpiecznych dla środowiska sposobów eliminacji tych zanieczyszczeń. Duże nadzieje wiąże się opracowaniem atrakcyjnych ekonomicznie i bardziej efektywnych, niż obecnie stosowane, biologicznych metod dekoloryzacji [6-7, 11, 17-18]. W metodach tych można wykorzystać różnorodne bakterie, grzyby, glony a nawet rośliny wyższe [3-7, 11-12, 19, 20-25]. Najważniejszymi czynnikami wpływającymi na efektywność procesów biologicznej dekoloryzacji jest dobór właściwego organizmu lub organizmów oraz warunki prowadzenia procesu, takie jak temperatura, natlenienie, pH, dostępność dodatkowego źródła węgla i azotu. Bardzo istotne dla przebiegu procesu są również takie parametry jak stężenie oraz struktura chemiczna barwnika [3-8, 10-15, 20, 26, 27-29]. Biologiczna dekoloryzacja może być wynikiem biodegradacji bądź biotransformacji barwnika (żywa biomasa), jak również sorpcji (żywa bądź martwa biomasa) [1, 3-5, 30-31]. Spośród szczepów bakteryjnych, stosowanych pojedynczo lub w mieszaninach najpopularniejsze są te zaliczane do rodzajów: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Desulphovibrio*, *Proteus*, *Schewanella*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, and *Streptococcus* [1, 3-5, 11, 20-26, 28, 30, 32-33]. Spośród różnych biologicznych metod coraz większą uwagę zwraca się na procesy bioakumulacji oraz biosorpcji. Korzyści wynikające z zastosowania biosorbentów w procesach usuwania barwników to przede wszystkim niskie koszty i dobre efekty dekoloryzacji. Wynika to z możliwości zastosowania różnego typu biomasy, często odpadów poprodukcyjnych (słoma, wysłoty, plewy, skórki pomarańczy, bananów itp). Kolejną zaletą tej metody jest możliwość odzyskania zasorbowanych barwników, oraz możliwość użycia sorbenta w kolejnym cyklu. Kuszące wydają się rozwiązania związane z zastosowaniem biosorbentów, jako nośników żywej biomasy bakteryjnej czy grzybowej i połączenie procesów biodegradacji i/lub biotransformacji z pasywną sorpcją na nośniku. Udowodniono, iż biomasa immobilizowana lepiej się rozwija, a po zakończeniu cyklu dekoloryzacji może być ponownie użyta w następnym cyklu [19, 34-36].

Wykorzystany w eksperymencie szczep *Escherichia coli* jest gram-ujemną, względnie beztlenową, pałeczką należącą do *Enterobacteriaceae*. Stanowi naturalny składnik mikroflory jelita grubego człowieka i zwierząt stałocieplnych [37-38]. Efekty dekoloryzacji barwników azowych z udziałem szczepów *E coli* opisali m.in. Cui et al. [3], Forgacs et al. [13], Saratale et al. [28], Isik et al. [39], Chen et al. [40], Ding et al. [41]. Ciekawe wyniki uzyskał Chang et al. [2] Opisał on możliwość usuwania azowej czerwieni reaktywnej, zastosowanej w stężeniu 200 mg/L, przez szczep *E. coli* strain NO3, który w warunkach statycznych po 8 h usunął 95% barwnika. Bardziej interesujące jest jednak doniesienie, iż efektywność dekoloryzacji można istotnie zwiększyć, wprowadzając do reaktora ze świeżym zaszczepem bakteryjnym, supernatant pochodzący z innej hodowli szczepu, zawierający metabolity powstałe we wczesnej fazie stacjonarnej oraz fazie dekoloryzacji. Metabolitom tym przypisano rolę mediatorów redox, istotnie zwiększającym efektywność dekoloryzacji barwników azowych. Celem badań było określenie wpływu różnego poziomu natlenienia prób oraz zastosowania nośników biomasy na efektywność dekoloryzacji azowego błękitu Evansa przez szczep *Escherichia coli*.

2. Materiały i metody

2.1. Użyty materiał biologiczny

W badaniach wykorzystano szczep bakterii *Escherichia coli*, wyizolowany z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków w Bytomiu. Izolację szczepu przeprowadzono w kilku etapach: izolacja wstępna – metoda fermentacyjna próbówkowa na podłożu LPB (BTL), analiza potwierdzająca na podłożu wybiórczym EE (BTL), posiew na podłożu różnicujące Endo (BTL). Pojedyncze kolonie o wzroście typowym dla *E. coli* poddano oczyszczaniu metodą pasażowania na podłożu Endo. Oczyszczone kolonie przesiano na skosy agarowe (agar odżywczy BTL), stosowane w celu przechowywania szczepów oraz namnażania biomasy. W celu potwierdzenia przynależności do gatunku wyizolowane szczepy poddano identyfikacji do gatunku na podstawie testów API20E (Biomerieux).

2.2. Barwnik

W badaniach użyto błękit Evansa (EB), barwnik z grupy azowych - $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$, (Appllichem; C.I. 23860). Ilość wiązań azowych w cząsteczce klasyfikuje go jako barwnik diazowy. Masa molowa barwnika to 960,81 g/mol, a λ_{max} = 606 nm (UV-VIS Hitachi 1900).

2.3. Nośniki biomasy

W celu immobilizacji biomasy testom zasiedlenia poddano różne rodzaje nośników naturalnych i syntetycznych. Przy wyborze nośnika kierowano się jego łatwą dostępnością, rozbudowaną powierzchnią ułatwiającą zasiedlanie przez mikroorganizmy oraz (w przypadkach odpadów np. rolnych, tartacznych) potrzebą zagospodarowania. Testowane nośniki naturalne to: słoma pszeniczna (łodygi pozbawione liści pocięte na odcinki 1cm), wióry dębowe, wióry bukowe, wióry sosnowe, kora czereśni, śliwy, jabłoni (pocięte na fragmenty 0,5x0,5 cm), pestki brzoskwini, pestki śliwki, łupiny orzecha włoskiego i ziemnego, szyszki modrzewiowe. Testowane nośniki syntetyczne to siatka podtynkowa (fragmenty 1x1 cm) i krzyżyki dystansowe do glazury. Nośniki naturalne wysuszone do stałej masy, a następnie użyto w teście zasiedlenia przez badany szczep *E. coli*.

2.4. Test stężeniowy

Wyizolowane szczepy *E. coli* poddano testom na zdolność dekoloryzacji. Testy przeprowadzono na podłożu Kimury (glukoza 20 g/L, pepton 5 g/L, ekstrakt drożdżowy 2 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, pH 6.8) z dodatkiem barwnika - azowego błękitu Evansa, w stężeniach 0,025, 0,05, 0,075 oraz 0,1 g/l. Test dekoloryzacji przeprowadzono równolegle na podłożach stałych (test płytkowy) i płynnych (test probówkowy). Na podłoża stałe, z odpowiednim stężeniem barwnika, eżą mikrobiologiczną naniesiono biomasę badanych szczepów w postaci rysy długości 1 cm. W przypadku testu na podłożach płynnych, do probówek z 9 ml podłoża Kimury, wprowadzono po 1 ml zawiesiny bakteryjnej o mętności 5 w skali Mc Farlanda. Próby inkubowano 24h w celu namnożenia biomasy, następnie wprowadzono jałowy roztwór błękitu Evansa tak, aby w kolejnych próbach uzyskać stężenie barwnika na poziomie 0,025, 0,05, 0,075 i 0,1 g/L. Przygotowano również kontrole barwnikowe (podłoże hodowlane z odpowiednim stężeniem barwnika bez biomasy). Wszystkie testy wykonano w 3 powtórzeniach. Próby inkubowano w temp. 37°C przez 72h. Po tym okresie na podłożach stałych odczytano strefy odbarwienia podłoża wokół kolonii [mm], mierzone od jej brzegu. Zwrócono również uwagę na zabarwienie biomasy. W przypadku podłoża płynnych próby odwirowano (5000 rpm/10 min) i w supernatancie odczytano ekstynkcje przy długości fali λ_x = 606 nm (UV-VIS Hitachi 1900). Stopień dekoloryzacji określono z zależności:

$$U = \left(1 - \frac{P}{K}\right) * 100\% \quad (2.1.)$$

gdzie:

U – usunięcie barwnika [%],

P – stężenie barwnika w próbce badawczej,

K – stężenie barwnika w kontroli barwnikowej.

Na podstawie testów dekoloryzacji dobrano stężenie barwnika do eksperymentu głównego. Jego wartość ustalono na poziomie 0,08 g/L. Test stężeniowy pozwolił również na wybór szczepu do eksperymentu głównego. Wybrany szczep *E. coli* wykazywał na podłożach stałych największe strefy odbarwienia [mm] oraz najwyższe wartości usunięcia barwnika w teście na podłożach płynnych.

2.5. Test zasiedlenia nośnika przez biomasę

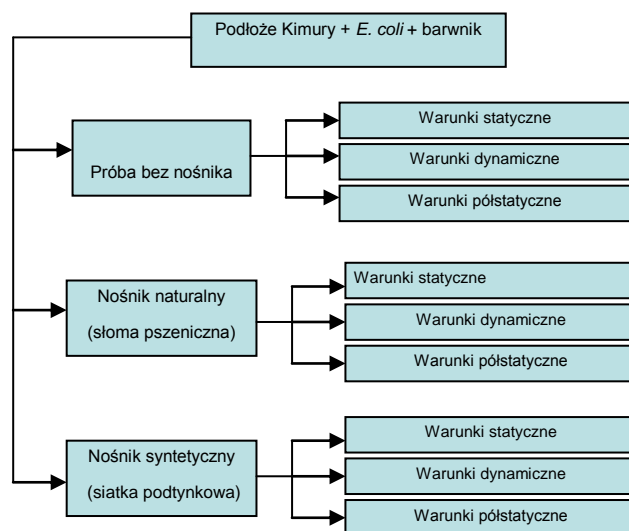
Nośniki po wysuszeniu do stałej masy wprowadzono w identycznych naważkach (5g) do butelek o pojemności 200ml. Następnie do każdej butelki wprowadzono po 50 ml podłoża Kimury. Przygotowano również kontrole – podłoże Kimury bez nośnika. Wszystkie próby wykonano w trzech powtórzeniach i poddano autoklawowaniu. Do jałowych prób wprowadzono po 1ml zawieszonyj w soli fizjologicznej biomasy badanego szczepu (mętność zawiesiny ustalono na poziomie 5 wg skali Mc Farlanda). Tak przygotowane próby inkubowano w temp. 37°C

przez 48-72h. Po tym okresie oceniono wzrost biomasy na nośniku i/lub w roztworze i oceniono możliwość zasiedlenia nośnika. O wzroście biomasy zawieszanej w roztworze świadczyło zmętnienie podłoża, zasiedlenie nośnika (obecność lub brak biofilmu na powierzchni nośnika). Zmiany te oceniano na podstawie analizy mikroskopowej (mikroskop stereoskopowy Nikon SMZ 1500) oraz wybarwionych preparatów mikroskopowych. Do eksperymentu głównego wybrano nośniki zasiedlone przez szczep bakteryjny.

2.6. Określenie wpływu warunków hodowli i zastosowanego nośnika na poziom dekoloryzacji barwnika

W eksperymencie głównym testowano wpływ obecności nośnika biomasy oraz różnych warunków natlenienia prób na efektywność dekoloryzacji diazowego błękitu Evansa. Schemat badań przedstawiono na rysunku 2.1.

Eksperyment prowadzono na podłożu płynnym Kimury, które rozlano po 70 ml do odpowiedniej liczby butelek o pojemności 250 ml. Na podstawie testu zasiedlenia nośników, do eksperymentu głównego wybrano nośnik naturalny – słomę pszeniczną oraz nośnik syntetyczny – siatkę podtynkową. Nośniki wysuszono do stałej wagi, następnie wykonano ich naważki po 3 g i wprowadzono do odpowiednich butelek z podłożem hodowlanym. Tak przygotowane próby z nośnikami i bez wysterylizowano w autoklawie (121°C, 30 minut). Przygotowano zawiesinę szczepu *E. coli*. W tym celu spłukano solą fizjologiczną 24-godzinne skosy z namnożoną biomasą użytego szczepu. Mętność zawiesiny doprowadzono do wartości 5 wg skali Mc Farlanda (porównanie zmętnienia z probówkami standartowymi na bazie chlorku baru i kwasu siarkowego). Próby inokulowano zawieszoną biomasą *E. coli* wprowadzając ją po 1 ml do każdej z butelek. Zaszczepione próby inkubowano w temp. 37°C przez 48 h w celu namnożenia biomasy. Następnym krokiem było wprowadzenie do prób badanego barwnika. Roztwór wyjściowy błękitu Evansa, o stężeniu 0,1 g/L, przed wprowadzeniem do prób wyjałowiono przez filtrację (filtry strzykawkowe PVDF o porach 20 µm firmy Whatman). Wyjałowiony roztwór barwnika wprowadzono do prób badawczych w objętości pozwalającej uzyskać stężenie początkowe na poziomie 0,08 g/L (wartość ustalona na podstawie wyników testu stężeniowego). Równolegle przygotowano próby kontrolne (podłoże Kimury z barwnikiem z i bez nośnika). Wszystkie próby przygotowano w trzech powtórzeniach i inkubowano w temp. 37°C przez 96 h w warunkach statycznych (bez wytrząsania), dynamicznych (wytrząsanie 24 h na dobę - 200 rpm) oraz półstatycznych (inkubacja w zmiennym cyklu: wytrząsanie przez 24h – 200 rpm/ kolejne 24h brak wytrząsania) (rys. 2.1.).



Rys. 2.1. Schemat badań

W celu określenia zmian zawartości barwnika w próbach próbki pobierano po 3, 24, 48, 72 i 96 h od wprowadzenia błękitu Evansa. Próby odwirowano (5000 rpm/10 min) i w supernatancie zmierzono absorbancję przy długości fali λ_{c} = 606 nm (UV-VIS Hitachi 1900). Stopień dekoloryzacji określono na podstawie wzoru 2.1.

W celu określenia statystycznej istotności różnic w dekoloryzacji pomiędzy poszczególnymi modyfikacjami prób przeprowadzono analizę statyczną Anova/Manova NIR (Program Statistica ver.5). ANOVA – jest jednoczynnikową analizą wariancji, jej celem jest testowanie istotności różnic pomiędzy średnimi. Test NIR jest analizą post-hoc i jest to test najmniejszych istotnych różnic.

3. Omówienie i dyskusja wyników

3.1. Wyniki testu stężeniowego

Test stężeniowy przeprowadzono w celu ustalenia wyjściowej zawartości błękitu Evansa w próbie w eksperymencie głównym. Wyniki testu (tab. 3.1.) wyraźnie wskazują na wpływ koncentracji barwnika na efektywność dekoloryzacji. W niższych stężeniach (0,025 i 0,05 g/L), po 72 h inkubacji, dekoloryzacja była na poziomie przekraczającym 90%. Wzrost zawartości barwnika w próbie do 0,075 g/L obniżył efektywność procesu do 72,44%. Obecność barwnika w stężeniu 0,1 g/L wpłynęła na drastyczny spadek wyników jego usunięcia przez szczep *E. coli* (usunięcie na poziomie 23,6%). Również w teście płytkowym zaobserwowano wyraźny wpływ stężenia barwnika na wielkość stref odbarwienia podłoża od 10,6 mm przy stężeniu 0,025 g/L do 1,51 mm przy stężeniu 0,1 g/L. W teście płytkowym oceniano również zabarwienie biomasy. Stwierdzono, że w przypadku wszystkich stężeń biomasa była zabarwiona na niebiesko, co wskazuje na sorpcję barwnika.

Tabela 3.1. Wyniki testu stężeniowego z użyciem błękitu Evansa dla wytypowanego do badań szczepu *E. coli* po 72 h inkubacji w temp. 37°C (test płytkowy – szerokość strefy odbarwienia mierzona od brzegu kolonii [mm], test probówkowy - procentowe usunięcie błękitu Evansa).

Stężenie błękitu Evansa w próbie [g/L]	0,025	0,05	0,075	0,1
Test płytkowy - strefy odbarwienia [mm]/ zabarwienie biomasy „+”, brak zabarwienia „-”	10,6±1,53/+	6,8±2,11/+	5,4±1,83/+	1,51±0,6/+
Test probówkowy - %usunięcie barwnika	99,83±1,15	93,18±2,09	72,44±1,37	23,6±3,04

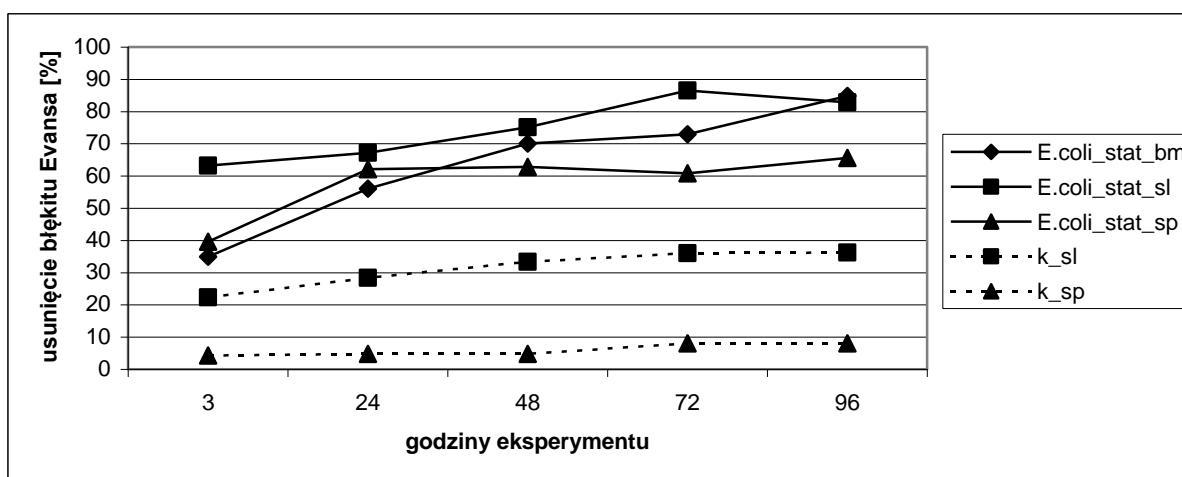
Wpływ początkowego stężenia barwnika na efektywność dekoloryzacji opisany został przez Wu et al. [31]. Efektywność dekoloryzacji przez badany szczep *Shewanella oneidensis* MR-1 spadał wraz ze wzrostem stężenia barwnika w próbie. Podobne wyniki uzyskała Zabłocka-Godlewska et al. [22]. Wzrost początkowego stężenia błękitu Evansa w próbie determinował mniejsze usunięcie barwnika przez badane szczepy *Klebsiella*. An et al. [1] badali możliwości dekoloryzacji czerwieni Kongo przez szczep *Citrobacter* sp. Wzrost stężenia barwnika do poziomu 50 i 100 µM skutkował silnym spadkiem efektywności odpowiednio do 28 i 26%. W przypadku stężenia 2000 µM nie stwierdzono usunięcia barwnika.

3.2. Wyniki testu zasiedlenia nośnika przez biomasę

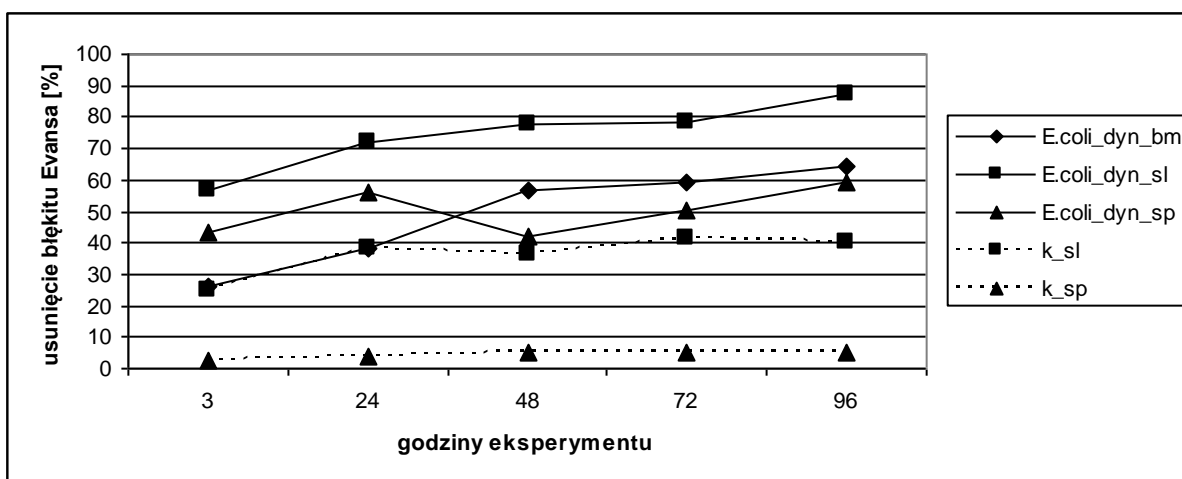
Nośniki naturalne i syntetyczne przetestowano w aspekcie możliwości zasiedlenia ich przez biomasę bakteryjną. Spośród testowanych nośników naturalnych jedynie słoma pszeniczna została zasiedlona przez badany szczep, który rozwijał się również w postaci biomasy zawieszanej w podłożu. Wszystkie pozostałe materiały zdyskwalifikowano ze względu na brak wzrostu biomasy, również tej zawieszanej w podłożu. Należy pamiętać, że przed inokulacją, wszystkie próby były autoklawowane (temp. 121°C, 30 minut). Obróbka termiczna nośników naturalnych, takich jak kora drzew (jabłoni, czereśni, śliwa), szyszki modrzewia, pestki brzoskwini, wióry drzewne (dębowe, bukowe, sosnowe), łupiny orzecha włoskiego i ziemnego, najprawdopodobniej spowodowała uwolnienie do roztworu różnych garbników, związków fenolowych, żywic itp. Związki te stanowią naturalne składniki wymienionych materiałów i są powszechnie znane z biobójczych lub biostatycznych właściwości [42-43]. Spośród syntetycznych nośników obecność biofilmu na powierzchni zaobserwowano w przypadku siatki podtynkowej.

3.3. Określenie wpływu warunków hodowli i zastosowanego nośnika na poziom dekoloryzacji barwnika

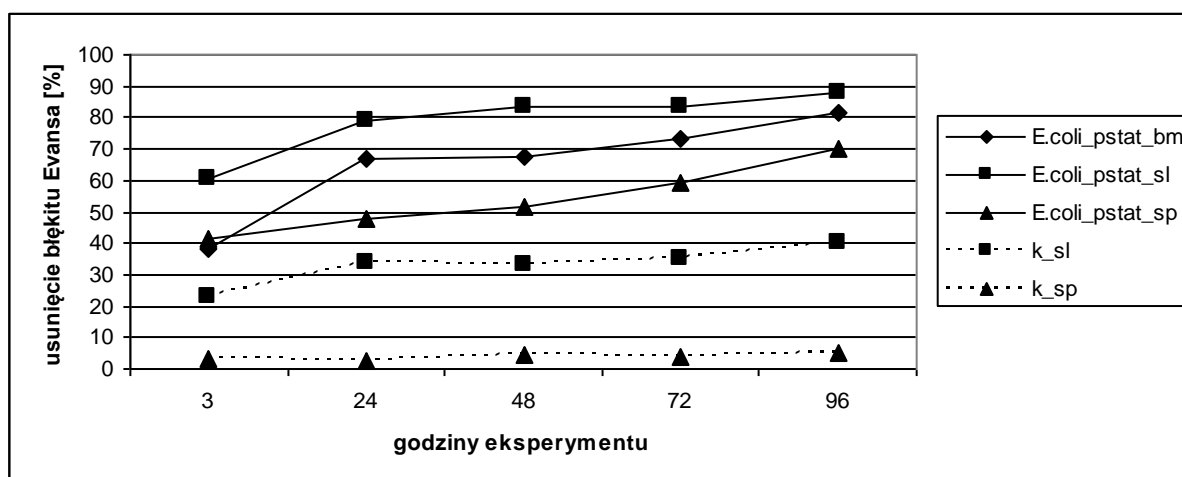
Przeprowadzone analizy wykazały, że warunki inkubacji (statyczne, półstatyczne i wstrząsane) nie miały istotnego wpływu na poziom sorpcji barwnika przez zastosowane nośniki (słoma pszeniczna, siatka podtynkowa) (Rys. 3.1. – 3.3.). Istotne różnice w sorpcji wynikały z charakteru nośnika. Vijayaraghavan et al. [34] zwracają uwagę, że mechanizmy odpowiadające za pochłanianie barwników są różne dla różnych typów nośników. Dla założonego poziomu istotności $p < 0,05$ przeprowadzona analiza statystyczna NIR wykazała, iż różnice w poziomie sorpcji barwnika przez testowane nośniki są istotne statystycznie ($p = 0,006076$). Użyty nośnik naturalny w postaci słomy pszenicznej sorbował od 36,2-40,2% błękitu Evansa, podczas gdy nośnik syntetyczny (siatka podtynkowa) jedynie od 5-8%. W przypadku obu nośników stan wysycenia barwnikiem (brak wzrostu sorpcji barwnika) stwierdzono w 72 h eksperymentu.



Rys. 3.1. Usunięcie błękitu Evansa w warunkach statycznych przez szczep *E. coli* zawieszony lub immobilizowany na stałych nośnikach (*E. coli* – próby zaszczipione bakteriami; stat – warunki statyczne; bm – biomasa bez nośnika; sl – nośnik słoma; sp – nośnik siatka podtynkowa; k – kontrola bez biomasy bakteryjnej).



Rys. 3.2. Usunięcie błękitu Evansa w warunkach dynamicznych przez szczep *E. coli* zawieszony lub immobilizowany na stałych nośnikach (*E. coli* – próby zaszczipione bakteriami; dyn – warunki dynamiczne; bm – biomasa bez nośnika; sl – nośnik słoma; sp – nośnik siatka podtynkowa; k – kontrola bez biomasy bakteryjnej).



Rys. 3.3. Usunięcie błękitu Evansa w warunkach półstatycznych przez szczep *E. coli* zawieszony lub immobilizowany na stałych nośnikach (*E. coli* – próby zaszczerpione bakteriami; pstat – warunki półstatyczne; bm- biomasa bez nośnika; sl – nośnik słoma; sp- nośnik siatka podtynkowa; k- kontrola bez biomasy bakteryjnej).

Znacznie lepsze wyniki usunięcia błękitu Evansa uzyskano w próbach z zawieszoną biomasą szczepu *Escherichia coli*. Pomimo różnic w tempie, jak i poziomie usunięcia błękitu Evansa w próbach statycznych, półstatycznych i wstrząsanych (dynamicznych), przeprowadzona analiza statystyczna (test NIR) nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi wariantami hodowli ($p > 0,05$). Najniższa efektywność usunięcia barwnika przez szczep testowany szczep stwierdzono w warunkach dynamicznych - 64,5% po 96 h, podczas gdy w próbach statycznych i półstatycznych usunięcie barwnika było na poziomie odpowiednio 84,9% i 81,6%. Wytrząsanie prób (warunki dynamiczne i półstatyczne) zwiększa zawartość tlenu w próbach, pozwala na równomierne rozproszenie barwnika w próbce, a to polepsza kontakt bakterii z barwnikiem. Aeracja prób może wpływać pozytywnie bądź negatywnie na efektywność procesu w zależności od mechanizmu dekoloryzacji. Enzymatyczne procesy dekoloryzacji barwników azowych są wynikiem aktywności azoreduktaz wrażliwych na obecność tlenu, jak i tleno-tolerancyjnych [29, 44]. W przypadku azoreduktaz flawinowych, wyizolowanych ze szczepów *E. coli*, tlen jest czynnikiem konkurującym z barwnikami azowymi o zredukowane nośniki elektronów, będące wynikiem aktywności azoreduktaz. Mechanizm redukcji barwników zachodzący w obecności tlenu wymaga obecności specyficznych nieflawinowych, tlenowych azoreduktaz, katalizujących redukcję barwników azowych w obecności tlenu [29, 45]. W badaniach przeprowadzonych przez Isik et al. [39] wykazano, że dekoloryzacja azowej czerni bezpośredniej 38 (Direct black 38) o stężeniu początkowym 100mg/L przez szczep *E. coli* zachodziła z lepszą wydajnością w warunkach anaerobowych ($\approx 70\%$ po 4 dniach) oraz mikroaerofilnych ($\approx 60\%$ po 4 dniach), podczas gdy w warunkach tlenowych usunięcie nie przekroczyło 20% nawet po 9 dniach eksperymentu. Cui et al. [3] badali możliwości dekoloryzacji azowej czerwieni metylowej przez konsorcjum bakteryjne, składające się głównie ze szczepów należącego do *Enterobacteriaceae* rodzaju *Klebsiella*. W warunkach beztlenowych uzyskano dekoloryzację na poziomie 94 i 98 % po 10 i 20 h przy stężeniu początkowym barwnika na poziomie odpowiednio 200 i 500 mg/L. W warunkach tlenowych bakterie potrzebowały 40 h by usunąć 95 % barwnika o stężeniu początkowym 200 mg/L oraz 48 h by usunąć 70% barwnika o stężeniu początkowym 500 mg/L.

Bakteryjne procesy rozkładu związków azowych zazwyczaj rozpoczynają się od beztlenowej redukcji wiązań azowych i wytworzenia toksycznych amin aromatycznych, które w warunkach niedoboru tlenu nie są metabolizowane dalej i ulegają kumulacji w środowisku reakcji. Znaczna kumulacja może wywołać efekt toksyczny w reaktorze i obniżyć wydajność procesu. Dalsze przemiany amin aromatycznych wymagają obecności tlenu. W przeprowadzonym eksperymencie w warunkach półstatycznych, warunkujących naprzemiennie warunki deficytu tlenu i wzrostu jego zawartości w próbce pozwoliły uzyskać nieznacznie lepsze efekty w początkowym etapie badań, różnice te jednak nie są istotne statystycznie.

W przypadku prób półstatycznych od 24 h, a w przypadku prób dynamicznych i statycznych od 48 h eksperymentu, obserwowano zwolnienie tempa dekoloryzacji. Przebieg procesu, jak i zaobserwowane granatowe zabarwienie biomasy, może wskazywać na znaczny udział bioakumulacji i biosorpcji w procesie bakteryjnego usuwania błękitu Evansa [34]. Zwolnienie tempa dekoloryzacji może być wynikiem wysycenia obecnej w próbach biomasy i jednocześnie słabego przyrostu świeżej biomasy.

Różnice w usuwaniu barwnika pomiędzy modyfikacjami prób z biomasą bakteryjną i słomą zaobserwowano w początkowym etapie badań. Były one jednak nieistotne statystycznie ($p > 0,05$). W warunkach półstatycznych po 24 h usunięte zostało 79,3% EB, podczas gdy w warunkach statycznych, po tym samym czasie, było to 67,2%, a w dynamicznych 71,7%. Po 96 h usunięcie barwnika we wszystkich próbach było na zbliżonym poziomie i wynosiło odpowiednio 87,8%, 82,9% oraz 87,6%. Przebieg procesu, zwłaszcza w warunkach półstatycznych (od 24 h eksperymentu brak istotnych statystycznie zmian w poziomie dekoloryzacji), podobnie jak w próbach z samą biomasą bakteryjną, może wskazywać na znaczny udział bioakumulacji i /lub biosorpcji. Bioakumulacja jest definiowana jako pochłanianie barwników przez żywą biomasę. Barwniki mogą wnikać do komórki i akumulować się wewnątrzkomórkowo lub w osłonach komórkowych. Biosorpcja definiowana jest jako proces pasywnego pochłaniania barwników przez martwą biomasę [34]. Jest to proces niezależny od metabolizmu, zachodzący w ścianie komórkowej, a jego mechanizm jest zależny od typu biomasy użytej jako biosorbent [34, 46]. Możliwości sorbowania barwników przez szczepy bakteryjne są zróżnicowane. Wynika to ze składu ściany komórkowej oraz obecności grup funkcyjnych zaangażowanych w wiązanie barwników. Liczne bakterie, grzyby, mikroalgi czy materiały roślinne mają możliwości wiązania barwników różnorodnych klas. Możliwości wiązania barwników zależą również od ich struktury chemicznej i ładunku [34, 47-48]. Zastosowanie słomy jako nośnika biomasy, niezależnie od warunków hodowli, dało najlepsze wyniki usunięcia EB, co wynikało zarówno z procesów biotransformacji barwnika, jak i jego bioakumulacji i/lub biosorpcji oraz biosorpcji wynikającej z obecności słomy.

W próbach z biomasą i siatką podtynkową po 96 h usunięcie barwnika było najwyższe w próbach półstatycznych (70,1%), mniejsze w próbach statycznych (65,6%) oraz najmniejsze w próbach dynamicznych (59,4%). Różnice te nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Wyniki uzyskane w tych próbach były jednak niższe aniżeli w innych próbach z biomasą bakteryjną. Podczas autoklawowania z siatki podtynkowej mogły uwolnić się jakieś substancje negatywnie wpływające na aktywność mikroorganizmów. Przebieg procesu, zwłaszcza w próbach statycznych i dynamicznych, pozwala wnioskować, że usunięcie mogło być wynikiem znacznego udziału biosorpcji oraz sorpcji na nośniku syntetycznym. W próbach dynamicznych w 48 h eksperymentu zaobserwowano znaczną desorpcję barwnika. W warunkach półstatycznych, stwierdzono stopniowo wzrastające usunięcie barwnika, na poziomie pośrednim pomiędzy wynikami uzyskanymi w próbie statycznej i dynamicznej. Mogło to być wynikiem wolniejszego przyrostu w tych warunkach względnie beztlenowej *E. coli* i stopniowej sorpcji i/lub dekompozycji barwnika przez biomasę immobilizowaną na siatce podtynkowej. Na istotny udział sorpcji w procesie może wskazywać intensywnie granatowe zabarwienie biomasy bakteryjnej, a w przypadku prób dynamicznych, zaobserwowana dodatkowo w 48 h desorpcja barwnika.

Zastosowanie, jak i rodzaj nośnika miały istotny wpływ na efektywność procesu dekoloryzacji. Świadczą o tym wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej ANOVA/MANOVA (test NIR). Wyniki tej analizy wskazują na istotne statystycznie różnice pomiędzy próbami dynamicznymi z biomasą bez nośnika, a próbami z biomasą bakteryjną i nośnikiem w postaci słomy ($p = 0,00059$). Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) stwierdzono dla wszystkich warunków hodowli pomiędzy próbami z biomasą bakteryjną a samym nośnikiem w postaci siatki podtynkowej. To samo dotyczyło różnic pomiędzy próbami z biomasą immobilizowaną na słomie a biomasą na siatce podtynkowej. Istotne statystycznie różnice stwierdzono również pomiędzy próbami z biomasą immobilizowaną na słomie czy siatce a próbami z samymi nośnikami bez biomasy. Podobne różnice stwierdzono pomiędzy samymi nośnikami. Pomędzy pozostałymi próbami nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Słoma okazała się o wiele lepszym nośnikiem biomasy i sorbentem barwnika. Wynika to prawdopodobnie z jej złożonej struktury chemicznej (mikrofibrille celulozowe, hemicelulozy, pektyny, lignina, obecność różnych grup funkcyjnych mogących wiązać barwniki), która jest bardziej skomplikowana aniżeli struktura siatki podtynkowej [49].

Zsumowanie efektów usunięcia na samym nośniku z wynikami usunięcia przez biomasę zawieszoną (nieimmobilizowaną) daje wyższe wyniki dekoloryzacji aniżeli w próbach ze szczepem *E. coli* immobilizowanym na nośnikach. Sytuacja ta może być spowodowana możliwością wykorzystania nośników, zwłaszcza słomy, jako dodatkowego, łatwiej bioprzyswajalnego aniżeli barwnik, źródła węgla, co może wpływać

na obniżenie efektywności dekoloryzacji. Należy również mieć na uwadze, iż wzrost bakterii na nośniku, takim jak słoma, może powodować jej zmiany strukturalne, a to może mieć bezpośredni wpływ na poziom sorpcji barwnika przez nośnik. Stąd wniosek, że przy ewentualnym przewidywaniu efektów dekoloryzacji prób z immobilizowaną biomasą nie należy sugerować się wynikami uzyskanymi dla samego nośnika czy samego zastosowanego szczepu.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku badanego szczepu *E. coli* stężenie barwnika miało wpływ na efektywność dekoloryzacji. Zbyt wysoka koncentracja wpływała na obniżenie efektów usunięcia barwnika. Zróżnicowany poziom natlenienia w niewielkim stopniu wpływał na efektywność dekoloryzacji. Stwierdzone różnice nie były istotne statystycznie. Najniższa efektywność usunięcia uzyskana została w warunkach dynamicznych. Wykazano, że wykorzystanie materiału biologicznego czy syntetycznego, jako nośnika, wymaga przeprowadzenia testów wskazujących na możliwość ich zasiedlenia przez biomasę. W wyniku przeprowadzonych testów wytypowano słomę i siatkę podtynkową. Rodzaj użytego nośnika pozbawionego biomasy istotnie wpłynął na efekty usunięcia. Zdecydowanie lepsze właściwości sorpcyjne posiadała słoma, a różnice te były istotne statystycznie. Istotne statystycznie różnice stwierdzono również w przypadku użycia nośników z immobilizowaną na nich biomasą. Znacznie lepsze wyniki usunięcia uzyskano dla biomasy immobilizowanej na słomie. Warunki hodowli nie miały również w przypadku tych prób istotnego wpływu na wyniki odbarwienia.

Literatura:

1. An S. Y., Min S. K., Cha I. H., Choi Y. L., Cho Y. S., Kim C.H., & Lee Y. C. (2002). Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnology Letters*, 24:1037–1040.
2. Chang J. S., Chen B. Y., Lin S. Y. (2004). Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Bioresource Technol.* 91:243-248.
3. Cui D., Li G., Zhao D., Gu X., Wang C., Zhao M. (2012). Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 221–222:185–192. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.04.03.
4. Franciscon E., Zille A., Dias Guimaro F., Ragagnin deMenezes C., Durrant L. R., Cavaco-Paulo A. (2009). Biodegradation of textile azo dyes by facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63:280–288. doi:10.1016/j.ibiod.2008.10.003.
5. Franciscon E., Zille A., Fantinatti-Garbogini F., Serrano Silva I., Cavaco-Paulo A., Durrant, L. R. (2009). Microaerophilic-aerobic sequential decolourization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. strain VN-31. *Process Biochemistry*, 44:446–452. doi:10.1016/j.procbio.2008.12.009.
6. Hamid M., Rehman K. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115:1177–1186. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.035.
7. Koyani R. D., Sanghvi G. V., Sharma R. K., & Rajput K. S.(2013). Contribution of lignin degrading enzymes in decolourisation and degradation of reactive textile dyes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77:1–9.
8. Padamavathy S., Sandhya S., Swaminathan K., Subrahmanyam Y. V., Kaul S. N. (2003). Comparison of decolorization of reactive azo dyes by microorganisms isolated from varioussource. *Journal of Environmental Sciences*, 15:628–632.
9. Somasiri W., Ruan W., Xiufen L., Jian C. (2006). Decolourization of textile wastewater containing acid dyes in UASB reactor system under mixed anaerobic granular sludge. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5(1):1224–1234.
10. Swamy J., Ramsay J. A. (1999). The evaluation of white-rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:130–137. doi:10.1016/S0141-0229(98)00105-7.

11. Tony B. D., Goyal D., Khanna S. (2009). Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63:462–469. doi:10.1016/j.ibiod.2009.01.003.
12. Younes S., Bouallagui Z., Sayadi S. (2012). Catalytic behavior and detoxifying ability of an atypical homotrimeric laccase from the thermophilic strain *Scytalidium thermophilum* on selected azo and triarylmethane dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 79:41–48.
13. Forgacs, E., Cserhati T., Oros G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, 30:953–971. doi:10.1016/j.envint.2004.02.001.
14. Pointing S. B., & Vrijmoed L. L. P. (2000). Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:317–318.
15. Sani R. K., Banerjee U. C. (1999). Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:433–437.
16. Wong P. K., Yuen P. Y. (1998). Decolourization and biodegradation of N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine by *Klebsiella pneumonia* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-1. *Journal of Applied Microbiology*, 85:79–87.
17. Eichlerova I., Homolka L., Nerud F. (2006). Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology*, 97:2153–2159.
18. Hu T. L. (2001). Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. *Water Science and Technology*, 43:261–269.
19. Srinivasan A., Viraraghavan T. (2010). Decolorization of dye wastewater by biosorbents: a review. *Journal of Environmental Management*, 91:915–1929. doi:10.1016/j.jenvman.2010.05.003.
20. Zabłocka-Godlewska E., Przysaś W., Grabińska-Sota E. (2009). Decolourization of triphenylmethane dyes and ecotoxicity their end products. *Environment Protection Engineering*, 35(1):161–169.
21. Zabłocka-Godlewska E., Przysaś W., Grabińska-Sota E. (2012). Decolourization of diazo Evans blue by two strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from different wastewater treatment plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223:5259–5266. doi:10.1007/s11270-012-1276-4.
22. Zabłocka-Godlewska E., Przysaś W., Grabińska-Sota E. (2014). Decolourisation of different dyes by two *Pseudomonas* strains under various growth conditions. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225:1846. doi:10.1007/s11270-013-1846-0.
23. Przysaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E. (2009). Screening of dyes decolorizing microorganisms strains. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(2B):69–73.
24. Przysaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E. (2012). Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223:1581–1592. doi:10.1007/s11270-011-0966-7.
25. Przysaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E. (2013). Effectiveness of dyes removal by mixed fungal cultures and toxicity of their metabolites. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224:1534. doi:10.1007/s11270-013-1534-0.
26. Azmi W., Kumar Sani R., Chand Banerjee U. (1998). Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 22:185–191.
27. Banat I. M., Nigam P., Singh D., Marchant R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, 58:217–227.
28. Saratale R. G., Saratale G. D., Chang J. S., Govindwar S. P. (2010). Decolorization and biodegradation of reactive dyes and dye wastewater by a developed bacterial consortium. *Biodegradation*, 21:999–1015. doi:10.1007/s10532-010-9360-1
29. Stolz A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:69–80. doi:10.1007/s002530100686.

30. Wu J., Jung B., Kim K., Lee Y., Sung N. (2009). Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* WL-13 and its capacity to decolorize triphenylmethane dyes. *Journal of Environmental Sciences*, 21:960–964. doi:10.1007/s00253-012-4476-3.
31. Wu Y., Xiao X., Xu C., Cao D., Du, D. (2012). Decolorization and detoxification of a sulfonated triphenylmethane dye aniline blue by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-012-4476-3
32. Nigam P., McMullan G., Banat I. M., & Marchant R. (1996). Decolorization of effluent from the textile industry by a microbial consortium. *Biotechnological Letters*, 18(1):117–120.
33. Sharma D. K., Saini H. S., Singh M., Chimni S. S., & Chandha B. S. (2004). Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various triphenylmethane dyes. *Journal of Basic Microbiology*, 44(1):59–65. doi:10.1002/jobm.200310334.
34. Vijayaraghavan K., Yun Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26:266-291
35. Rodriguez-Couto S. (2009). Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances* 27:227-235.
36. Iqbal M., Saeed A. (2007). Biosorption of reactive dye by loofa sponge – immobilized fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 42:1160-1164.
37. Salyers A.A., Whitt D.D. (2000). *Microbiology: diversity, disease, and the environment*. 1st edition. New, York: Wiley.
38. Schlegel, H.G. (1993). *General microbiology*, 7th edition. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
39. Isik M., Sponza D. T. (2003). Effect of oxygen on decolourization of azo dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. *Process Biochemistry*, 38:1183–1192.
40. Chen B. Y., Chen S. Y., Lin M. Y., Chang J. S. (2006). Exploring bioaugmentation strategies for azo-dye decolorization using mixed consortium of *Pseudomonas luteola* and *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 41:1574-1581.
41. Ding H. T., Du Y. Q., Liu D. F., Li Z. L., Chen X. J., Zhao Y. H. (2011). Cloning and expression in *E. Coli* of an organic solvent-tolerant and alkali-resistant glucose 1-dehydrogenase from *Lysinibacillus sphaericus* G10. *Bioresour Technol*, 102:1528-1536.
42. Janas R., Węglarz Z., Bączek K., Kosakowska O. (2012). The consequent influence of selected biopreparations used in spice crops on the content of biologically active compounds in the seeds. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 57(3):167-171.
43. Klimek B. (red.) (2011). *Analiza fitochemiczna roślinnych substancji leczniczych*. Wyd. Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
44. Solis M., Solis A., Peres H. I., Manjarrez N., Flores M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*. 47:1723-1748.
45. Burger S., Stolz A. (2010). Characterisation of the flavin-free oxygen-tolerant azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F in comparison to flavin-containing azoreductases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:2067-2076.
46. Malik A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int*, 30:261-278.
47. Won S. W., Choi S. B., Yun Y. S. (2005). Interaction between protonated waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* and anionic dye Reactive Red 4. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 262:175-180.
48. Yun Y. S., Park J. M., Volesky B. (2001). Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environ Sci Technol*, 35:4353-4358.
49. Kopcewicz J., Lewak S. (2012). *Fizjologia roślin*. Wyd. 3 Wyd Nauk PWN Warszawa

