

Słowa kluczowe: barwniki trójfenylometanowe, dekoloryzacja, zootoksyczność

Ewa ZABŁOCKA-GODLEWSKA*, Wioletta PRZYSTAŚ*,
Elżbieta GRABIŃSKA-SOTA*

TOKSYCZNOŚĆ BARWNIKÓW TRÓJFENYLOMETANOWYCH I PRODUKTÓW ICH BIOLOGICZNYCH PRZEMIAN

Powszechne stosowanie barwników wiąże się z problemem zanieczyszczenia nimi wód powierzchniowych w rejonach uprzemysłowionych. Celem badań było określenie toksyczności bakteryjnych i grzybowych produktów przemian trójfenylometanów (fiolet krystaliczny, zieleń brylantową, czerwień krezolową i błękit tymolowy). Testy toksyczności prowadzono na *Daphnia magna*. Zgodnie z wytycznymi ACE 89/BE 2/D3 Final Report Commission EC barwniki zaklasyfikowano jako toksyczne. Bakteryjne produkty biodegradacji były bardziej toksyczne niż same barwniki (IV grupa), a przemiany grzybowe większości barwników dały produkty mniej toksyczne.

1. WSTĘP

Barwniki trójfenylometanowe (TPH) są szeroko stosowane w różnych gałęziach przemysłu [10,14,19]. W zbiornikach i ciekach wodnych zmieniają barwę, ograniczają produkcję pierwotną, powodują deficyt tlenowy i pogorszenie warunków życia [5]. Większość barwników charakteryzuje się wysoką toksycznością, mutagennością i niską biodegradowalnością [4,6,10,15,19]. Dominującą rolę w rozkładzie TPH przypisuje się licznym bakteriom i grzybom. Zdolność rozkładu zależy od struktury i koncentracji barwnika, stopnia zaadaptowania mikroorganizmów i ilości użytej biomasy [15,21]. Szczepy bakterii wyróżniające się zdolnością do adsorpcji i biodegradacji barwników TPH to *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Kurthia* sp., *Shewanella* sp., *Desulfovibrio* sp. [10,15,19]. Wśród grzybów na uwagę zasługują *Pseudozyma rugulosa*, *Candida krusi*, *Rhodotorulla* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogi*, *Coriolus versicolor*, *Cyathus species* [6,9,10,19].

Przemiany biologiczne mogą prowadzić do metabolitów bardziej toksycznych niż związki wyjściowe.

* Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Określenie ich toksyczności zapewnienia zatem bezpieczeństwo środowiskowe. Celem badań było określenie zdolności wybranych szczepów bakteryjnych i grzybowych do usuwania barwników, oraz ocena bezpieczeństwa środowiskowego prowadzonych przez nie procesów. Testy toksyczności metabolitów wykonano z użyciem organizmu wodnego *Daphnia magna*.

2. METODYKA BADAŃ

Badano zdolność usuwania zieleni brylantowej (ZB), fioletu krystalicznego (FK), błękitu tymolowego (BT) i czerwieni krezolowej (CK) przez bakterie i grzyby. Szczepy bakterii wyizolowano ze ścieków bytowo-gospodarczych na podłożu mineralnym Bushnell-Hass z dodatkiem naftalenu (0,25% w/v). Do badań wybrano 4 szczepy o najintensywniejszym wzroście, które w oparciu o testy API 20NE i API 20E zidentyfikowano jako: *Chryseomonas luteola* (A3), *Pseudomonas aeruginosa* (B2), *Burkholderia cepacia* (B3). Szczepu A1 nie zidentyfikowano. Grzyby wyizolowano metodą tkankową z owocników: *Polyporus picipes* (RWP17) i *Trametes versicolor* (L4), *Clitocybe dealbata* (RWP1) i *Morchella* sp. (SM).

Badania odbarwiania prowadzono na podłożu Kimury [8]. Test w trzech powtórzeniach wykonano w probówkach z 10 ml pożywki inokulowanymi 1 ml odpowiedniej zawiesiny bakterii i grzybów sporządzonych w soli fizjologicznej. Inokulum bakteryjne przygotowano z 48h hodowli, grzybowe z 72h. W celu namnożenia odpowiedniej ilości biomasy próby inkubowano w 26°C, bakteryjne przez 48h, grzybowe przez 5 dni.

Dla określenia stopnia biodegradacji użyto żywej biomasy. Martwa biomasa (autoklawowana) posłużyła do określenia sorpcji. Do inokulowanych prób wprowadzono sterylne, wodne roztwory barwników, o początkowym stężeniu 0,05 g/l. Po 7 dniach inkubacji hodowle odwirowano i zmierzono absorbancję otrzymanego supernatantu. Stopień sorpcji i usunięcia przez żywą biomasę obliczono z zależności: $S[\%]=((P_k-P_s)/P_k)*100\%$ i $U[\%]=((P_k-P_{ns})/P_k)*100\%$; gdzie P_k – stężenie barwnika w próbce kontrolnej [mg], P_s – pozostałość barwnika w próbce z martwą biomasą [mg], P_{ns} – pozostałość barwnika w próbce z żywą biomasą [mg].

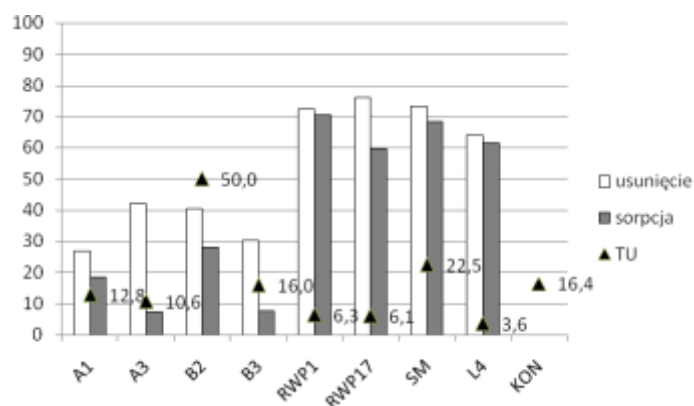
Testy zootoksyczności z *Daphnia magna* wykonano według wytycznych OECD 202 i wyznaczono jednostki toksyczności TU. Próby zaklasyfikowano do klas toksyczności (na podstawie ACE 89/BE 2/D3 Final Report Commission EC).

3. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Stosowane powszechnie barwniki syntetyczne są związkami o strukturze pierścieniowej, których biodegradacja wiąże się z niebezpieczeństwem powstawania toksycznych produktów pośrednich. Zasadne zatem jest włączenie do badań nad dekoloryzacją analiz toksykologicznych, które pozwolą określić wpływ

oczyszczonych ścieków na życie biologiczne odbiornika. Do chwili obecnej większość badań skupiała się na efektywności procesu dekoloryzacji, a badania toksykologiczne dotyczyły samego barwnika.

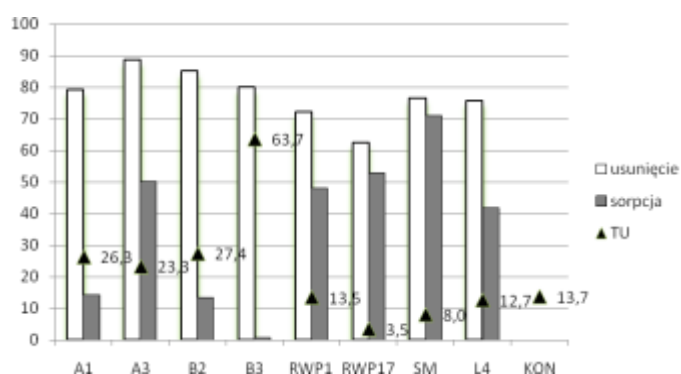
Efektywność dekoloryzacji oraz toksyczność badanych barwników i produktów ich przemian, zależała od testowanego szczepu i struktury badanego związku (rys. 1–4), co stwierdzono w licznych doniesieniach literaturowych [1,2,7,10,17]. Kumar Sani [10] wykazał, że dla *Kurthia* sp. usunięcie różnych TPH wzrastało wraz z uproszczeniem ich budowy (od 8% dla skomplikowanego strukturalnie fioletu etylowego do 100% usunięcia strukturalnie prostej zieleni brylantowej). An [2] uzyskał 80% usunięcie fioletu gencyjany, zieleni malachitowej i brylantowej oraz 90% usunięcie fioletu krystalicznego i czerwieni metylowej przy zastosowaniu szczepu *Citrobacter* sp. Obiecujące wyniki uzyskano również w przypadku takich szczepów jak: *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophilla*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* oraz *Pseudomonas cepacia* [1]. Dobrze udokumentowana jest wysoka efektywność usuwania zabarwienia przez grzyby, zwłaszcza białej zgnilizny drewna (np. *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes* sp.) [3,4,6,11,12,13,16,20]. Radha [16] dla *P. chrysosporium* uzyskał 95% usunięcie fioletu metylowego w 120h. Sześć spośród 7 testowanych szczepów grzybowych usuwało zielen brylantową w 99–100% w ciągu 7 dni. Tychanowicz [18] wykazała, iż *Pleurotus pulmonaris* usuwał 93% fioletu metylowego w ciągu 6 dni. Uzyskane wyniki uzależnione są od warunków prowadzenia procesu, wpływających m.in. na produkcję enzymów, szczególnie ligninolitycznych [4,16,18,20].



Rys. 1. Stopień usunięcia fioletu krystalicznego przez szczepy bakterii i grzybów oraz wartość TU

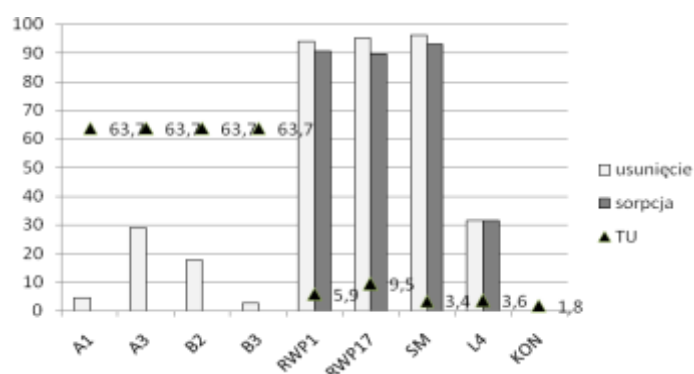
Stopień dekoloryzacji FK przez szczepy bakteryjne i grzybowe oraz wyznaczone wartości TU przedstawiono na rys. 1. Dekoloryzacja może być wynikiem adsorpcji na biomase lub/i biodegradacji. Sorpcja jest często pierwszym etapem procesu degradacji barwnika. Obserwacja biomasy może zatem świadczyć o charakterze przemian [2,12,13,16]. Wyższy stopień usunięcia barwy wykazywały szczepy

grzybowe. Dla szczepów bakteryjnych charakterystyczny był natomiast większy udział biodegradacji w dekoloryzacji. Wartość TU zmieniała się w zależności od zastosowanego szczepu. Usunięcie barwy przez szczepy A1, A3, RWP1, RWP17 i L4 spowodowało spadek wartości TU. Dla szczepów RWP1, RWP17, i L4 wiązało się to ze zmianą klasy toksyczności prób z IV na III. FK używany w medycynie ma właściwości cytotoksyczne i jest toksyną mitotyczną [19]. Brak jest jednak doniesień o właściwościach powstałych produktów metabolizmu tego barwnika.

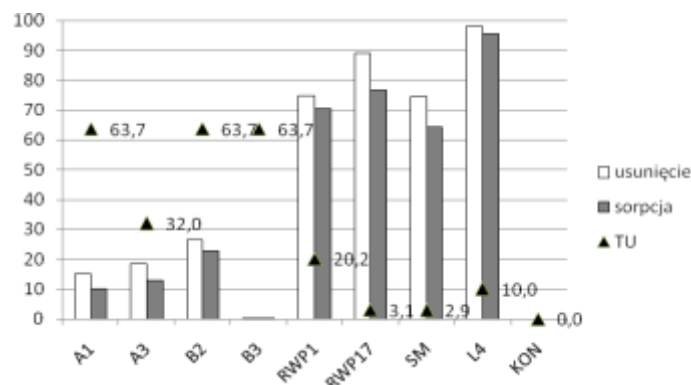


Rys. 2. Stopień usunięcia zieleni brylantowej przez szczepy bakterii i grzybów oraz wartość TU

Wyniki dekoloryzacji ZB i wartości TU przedstawiono na rys. 2. W przeciwieństwie do FK lepsze wyniki dekoloryzacji uzyskano dla szczepów bakteryjnych. Dobrym wynikiem dekoloryzacji towarzyszył jednak wzrost TU (od TU =13,7 w kontroli do 23,3 dla A3 i 63,7 dla B3). U grzybów, podobnie jak dla FK, charakterystyczny był duży udział sorpcji w usuwaniu barwy i spadek wartości TU (od 3,5 dla RWP17 do 13,5 dla RWP1). W przypadku dwóch szczepów (SM i ponownie RWP17) klasa toksyczności uległa zmianie z IV na III.



Rys. 3. Stopień usunięcia błękitu tymolowego przez szczepy bakterii i grzybów oraz wartość TU



Rys. 4. Stopień usunięcia czerwieni krezolowej przez szczepy bakterii i grzybów oraz wartość TU

4. PODSUMOWANIE

Wysoka efektywność dekoloryzacji nie zawsze wiązała się ze zmniejszeniem toksyczności mieszaniny poreakcyjnej. Najtrudniej usuwalnym barwnikiem był FK (usunięcie 27–76%). Stosunkowo słabemu usunięciu barwy towarzyszył na ogół spadek toksyczności prób. Wysoki stopień usunięcia ZB przez bakterie (79,3–88,6%) wiązał się ze wzrostem toksyczności ścieków, a niższa efektywność dekoloryzacji z udziałem grzybów (62,5–76,6%) powodowała jej obniżenie. BT jak i CK okazały się dla bakterii trudnymi substratami (stopień dekoloryzacji <30%). Przemiany jakim podlegały te barwniki doprowadziły do wzrostu toksyczności prób, co sugeruje powstanie toksycznych metabolitów. W przypadku grzybów bardzo wysoki stopień usunięcia barwy (>80%) powodował wzrost toksyczności produktów przemian nisko toksycznych substratów.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007–2010, jako projekt badawczy N523 17 85 33

LITERATURA

- [1] Alhassani, H.A., Rauf, M.A., Ashraf, S. S., 2007. *Efficient microbial degradation of Toluidine Blue dye by Brevibacillus sp.* Dyes and Pigments 75, 395-400.
- [2] An, S.Y., i wsp., 2002. *Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by Citrobacter sp.* Biotechnology Letters 24, 1037-1040.
- [3] Anjaneyulu, Y., Chary, N.S., Suman Raj, D.S., 2005. *Decolorization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review.* Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 4, 245-273.
- [4] Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., 1996. *Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review.* Bioresource Technol. 58, 217-227.

- [5] Chander, M., Arora, D.S., 2007. *Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes*. Dyes and Pigments 72, 293-298.
- [6] Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G., 2004. *Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review*. Environment International 30, 953-971.
- [7] Jang, M.S., i wsp., 2005. *Triphenylmethane reductase from Citrobacter sp. Strain KCTC 18061P: purification, characterization, gene cloning, and overexpression of functional protein in Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology Dec., 7955-7960.
- [8] Kimura, Y., Asada, Y., Kuwahara, M., 1990. *Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 (4), 436-442.
- [9] Knapp, J.S., Newby, P.S., Reece, L.P., 1995. *Decolorization of wood-rotting basidiomycete fungi*. Enzyme Microb. Technol. 17, 664-668.
- [10] Kumar Sani, R., Chand Banerjee, U., 1999. *Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by Kurthia sp.* Enzyme and Microbial Technology 24, 433-437.
- [11] Moreira, M. T., Mielgo, I., Feijoo, G., Lema, J.M., 2000. *Evaluation of different fungal strains in the decolorization of synthetic dyes*. Biotechnology Letters 22, 1499-2000.
- [12] Novotny, C., i wsp., 2001. *Capacity of Irpex lacteus and Pleurotus ostreatus for decolorization of chemically different dyes*. Journal of Biotechnology 89, 113-122.
- [13] Novotny, C., Svobodova, K., Kasinath, A., Erbanova, P., 2004. *Biodegradation of synthetic dyes by Irpex lacteus under various growth conditions*. International Biodet. and Biodegr. 54, 215-223.
- [14] Pearce, C.I., Lloyd, J. R., Guthrie, J. T., 2003. *The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review*. Dyes and Pigments 58, 179-196.
- [15] 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.
- [16] Radha, K.V., Regupathi, A., Arunagiri, A., Murugesan, T., 2005. *Decolorization studies of synthetic dyes using Phanerochaete chrysosporium and their kinetics*. Process Biochemistry 40, 3337-3345.
- [17] Sharma, D.K., Saini, H.S., Singh, M., Chimni, S.S., Chadha, B.S., 2004. *Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various triphenylmethane dyes*. J. Basic Microbiol. 44 (1), 59-65.
- [18] Tychanowicz, G.K., Zilly, A., Marquez de Souza, C.G., Peralta, R.M., 2004. *Decolorization of industrial dyes by solid-state cultures of Pleurotus pulmonaris*. Process Biochemistry 39, 855-859.
- [19] Wamik Azmi, Rajesh Kumar Sani, Uttm Chand Banerjee, 1998. *Biodegradation of triphenylmethane dyes*. Enzyme and Microbial Technology 22, 185-191.
- [20] Wesenberg, D., Kyriakides, Agathos, S.N., 2003. *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. Biotechnology Advances 22, 161-187.
- [21] Yuzhu Fu, Viraraghavan T., 2001. *Fungal decolorization of dye wastewater: a review*. Biores. Techn. 79, 251-262.

TOXICITY OF TRIPHENYLMETHANE DYES AND PRODUCTS OF THEIR BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS

Dyes commonly used in industry lead to high water pollution. The goal of research was evaluation of toxicity of bacterial and fungal triphenylmethane dyes decolorization products. Zootoxicity was tested with *Daphnia magna*. According to ACE 89/BE 2/D3 Final Report Commission EC dye control samples were classified as toxic. Bacterial samples with all tested dyes were classified as IV toxicity class. Samples with fungal strains were less toxic than controls.