

DEKOLORIZACE BARVIV IMOBILIZOVANÝMI KULTURAMI LIGNINOLYTICKÝCH HUB

Roman Pořízka, Veronika Dorňáková, Jana Svorová

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, romanporizka@seznam.cz*

Abstrakt

V současné době je degradace polutantů, jejichž součástí jsou i syntetická barviva, zajištěna fyzikálně-chemickými metodami. Tyto konvenční metody se zpravidla vyznačují vysokými provozními náklady a vznikem vedlejších produktů. V posledních letech jsou zkoumány možnosti degradace biodegradačními technologiemi využívajícími ligninolytické houby.

Práce je zaměřena na hodnocení degradačních schopností houbových kultur *Irpex lacteus* a *Pleurotus ostreatus* v rotačním diskovém bioreaktoru. Schopnost dekolorence hub byla sledována na barvivech RBBR (150 mg l⁻¹), Methylene blue (150 mg l⁻¹, 300 mg l⁻¹), DB3 (150 mg l⁻¹) a reálného vzorku barvicí směsi z provozu barvení textilií.

Klíčová slova: houby bílé hniloby; biodegradace; bioreaktor; syntetická barviva

Úvod

Houby bílé hniloby patří mezi nejvýznamnější ligninolytické houby. V přírodě jsou vázány na dřevo a díky svým ligninolytickým enzymům degradují lignin, celulózu a hemicelulózu. Podle degradace ligninu můžeme houby bílé hniloby rozdělit do dvou skupin. První skupina je schopna degradovat lignin selektivně, nachází se v tvrdé, ale i v měkké části dřeva a řadíme zde například *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus sp.*. Druhá skupina hub degraduje lignin zároveň s celulózou, atakuje především tvrdé dřevo, zřídka pak měkké dřevo. Patří zde například *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Heterobasidium annosum* [3, 4]. Ukázalo se, že ligninolytické enzymy produkované těmito houbami mohou mít velký význam v procesu degradace. Je pro ně charakteristická nízká specifita vzhledem k nepravidelné struktuře biopolymerní aromatické molekuly ligninu. Díky tomu mají tyto enzymy velmi široký biodegradační potenciál [1]. Jedná se především o extracelulární enzymy ligninperoxidázu, mangan-dependentní peroxidázu a lakázu [2, 5].

Cílem této studie bylo pozorovat biodegradační schopnosti hub *Irpex lacteus* a *Pleurotus ostreatus* v rotačním diskovém bioreaktoru a zhodnotit jejich biodegradační schopnosti prostřednictvím syntetických barviv RBBR, Methylene blue, DB3 a reálného vzorku barvicí směsi z provozu barvení textilií.

Materiál a metody

Houby *Pleurotus ostreatus* a *Irpex lacteus* 617/93 byly získány ze sbírky kultur CCBAS (Akademie Věd České republiky, Praha). Zásobní kultury byly kultivovány na agarových plotnách s tuhým malt extrakt glukózovým médiem při teplotě 28 °C po dobu jednoho týdne. Houby byly uchovávány v ledničce při 4 °C.

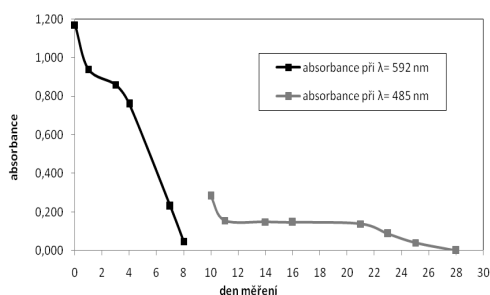
Pro vlastní experimenty bylo využíváno tekuté malt extrakt glukózové médium (MEG). Objem jednoho litru média byl získán smícháním destilované vody (1000ml) s broth malt extraktem (5 g) a dextrózy (10 g). Vzniklé médium bylo upraveno na pH 5,5 pomocí kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného. Médium bylo vysterilizováno při teplotě 120°C po dobu 21

min a tlaku 200 kPa. Takto připravené médium bylo využito pro přípravu tekuté houbové kultury, imobilizované houbové kultury a především sloužilo jako prostředí, ve kterém probíhala dekolorizace barviv. Obdobným způsobem bylo připraveno také pevné malt extrakt glukózové médium. Pro přípravu 1 litru agaru bylo zapotřebí: 1000 ml destilované vody, 5 g broth malt extraktu, 10 g dextrózy a 20 g agar powder. Médium bylo využito při kultivaci zásobních kultur.

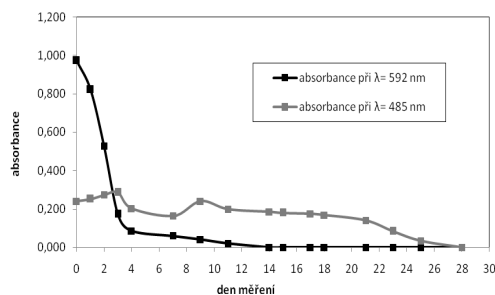
Pro spuštění bioreaktoru bylo nezbytné připravit imobilizovanou houbovou kulturu. Na předem připravené molitanové disky byly aplikovány 4 ml zhomogenizované houbové kultury a 25 ml tekutého média MEG. Po 2-3 týdenní kultivaci byly houbou porostlé molitanové disky vloženy do rotačního diskového reaktoru. Reaktor byl naplněn MEG médiem se smíchaným barvivem o příslušné koncentraci. Průběh degradace barviva byl kontrolován měřením změn v absorbanci. Absorbance každého barviva byla měřena při vlnové délce absorpčního maxima. Vzhledem k postupné změně barvy dekolorizovaného roztoku z modré na červenou byly v případě RBBR a DB3 absorbance měřeny při dvou vlnových délkách. Odběry vzorků byly prováděny do doby, dokud nedošlo k úplné dekolorizaci, nebo bylo zřejmé, že další biodegradace již neproběhne, např. vzhledem k vysoké počáteční koncentraci barviva v tekutém živném médiu MEG. V závislosti na průběhu dekolorizace a jiných faktorech byly provedeny buď další cykly (tzn. vylití zdegradovaného barviva a naplnění bioreaktoru novým tekutým živným médiem MEG s barvivem) nebo byl experiment ukončen.

Výsledky a diskuse

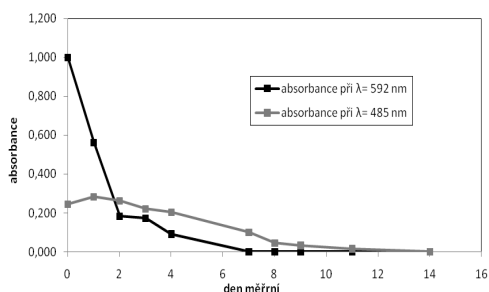
U RBBR byly provedeny celkem 4 cykly, vždy se stejnou počáteční koncentrací barviva 150 mg l^{-1} . V rámci prvního cyklu (Obr. 1) bylo do bioreaktoru nalito 1200 ml tekutého živného média MEG. V rámci druhého cyklu (Obr. 2) 1470 ml tekutého živného média MEG. V případě 1. a 2. cyklu nastala 100% dekolorizace po 28 dnech. Ve 3. cyklu (Obr. 3) nastala 100% dekolorizace po 14 dnech. Ve 4. cyklu (Obr. 4) značný nárůst houbové kultury zřejmě způsobil rychlejší dekolorizaci barviva než v předešlých cyklech, a proto 100% dekolorizace nastala již po 4 dnech. 3. a 4. cyklus probíhal v objemu 1350 ml.



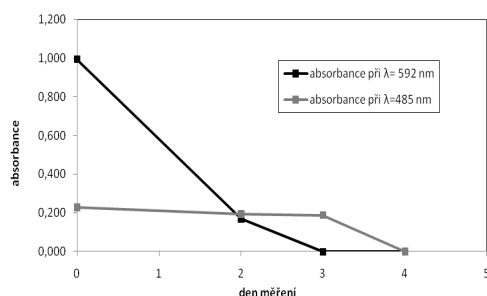
Obrázek 1. 1. cyklus dekolorizace RBBR houbou *Irpex lacteus*.



Obrázek 2. 2. cyklus dekolorizace RBBR houbou *Irpex lacteus*.

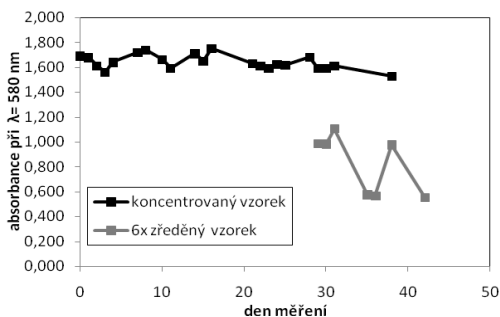


Obrázek 3. Pokles absorbance z 3. cyklu degradace RBBR houbou *Irpex lacteus*.

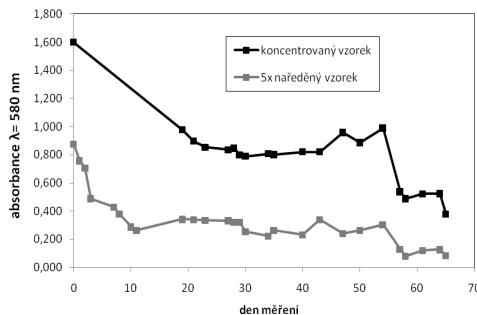


Obrázek 4. Pokles absorbance z 4. cyklu degradace RBBR houbou *Irpex lacteus*.

U Methylene blue byl experiment proveden 2x. V 1. pokusu (Obr. 5) při koncentraci 300 mg l^{-1} . Dvě paralely nepoukazovali na žádnou dekolorizaci. Pro tento pokus byl učiněn závěr, že příliš vysoká koncentrace mohla být pro houbu toxická. Proto pro 2. pokus (Obr. 6) byla použita koncentrace barviva 150 mg l^{-1} . Během pokusu bylo 7. a 44. dne provedeno doplnění média MEG. V 19. dni byl proveden odběr meziproduktu. Kultura vykazovala po 65 dnech až 90,4% dekolorizaci barviva. Tato účinnost je vztažena na 5x naředěný vzorek. V obou případech byl celkový objem média v bioreaktoru 1500 ml. Degradace byla provedena houbou *Irpex lacteus*.

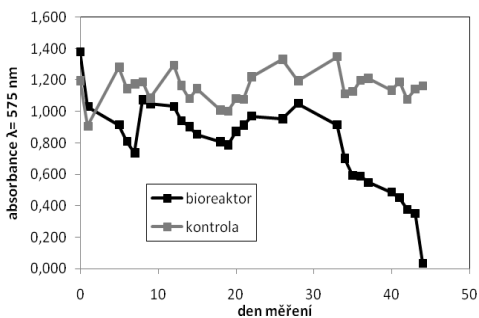


Obrázek 5. Methylene blue (300 mg l^{-1}).

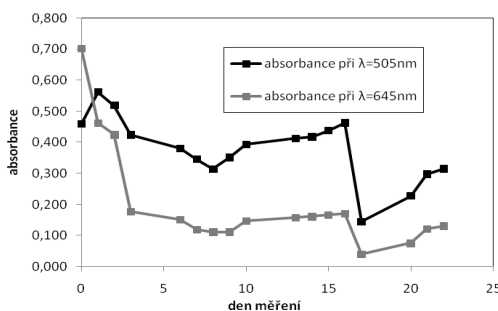


Obrázek 6. Methylene blue (150 mg l^{-1}).

Reálný vzorek byl naředěn tekutým médiem MEG 100 x. Degradace tohoto barviva byla provedena houbou *Irpex lacteus*. V 8. dni proběhla změna motorku (pomalejší rotace), v 28. dni se bioreaktor zastavil a 33. dne bylo dolito odpařené médium. Kultura vykazovala po 44 dnech až 98% dekolorizaci barviva. Dekolorizace barviva byla provedena houbou *Pleurotus ostreatus* celkem ve 3 opakováních. Ve 3. pokusu bylo 17. dne provedeno dolití reaktoru 1200 ml destilované vody. V obou případech koncentrace barviva činila 150 mg l^{-1} a celkový objem média byl 1500 ml.



Obrázek 7. Reálný vzorek barvicí lázně z provozu barvení textilií. **Obrázek 8.** 3. Pokus - DB3 (150 mg l^{-1}).



Závěr

Studie prokázaly, že ligninolytická houba *Irpex lacteus* je schopna dekolorizovat RBBR, Methylene blue a reálný vzorek. Výsledky ukázaly, že houba realizuje dekolorizaci barviva RBBR při koncentraci 150 mg l⁻¹, Methylene blue při koncentraci 150 mg l⁻¹ a reálný vzorek při koncentraci, který byl 100x zředěn. Z dosud uskutečňovaných pokusů dekolorizace houbou *Pleurotus ostreatus* ani jeden zatím neposkytl signifikantní výsledky. Z toho plyne, že mezi oběma organismy jsou blíže nespécifikované rozdíly, které je nutné experimentálně ověřovat. Během druhého pokusu došlo ke značnému úniku média a další pokračování v tomto experimentu nebylo dále možné. Jako zajímavé se jeví studium kometabolismu houby bílé hniloby s kvasinkami, jaké naznačily výsledky 1. pokusu s houbou *Pleurotus ostreatus*, kdy byla úplná dekolorizace zjištěna již po 5 dnech. Ve 3. pokusu došlo pouze k částečné dekolorizaci. Tyto výsledky budou předmětem dalšího studia.

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucímu mé práce Vážené paní Doc. RNDr. Kateřině Malachové CSc., dále panu RNDr. Novotnému, CSc. a Mgr. Jiřímu Červeňovi za pomoc, ochotu a cenné rady. Článek byl vypracován v rámci projektu SGS č. sgs 19/PřF/2012 Studium faktorů ovlivňujících průběh biodegradačních procesů syntetických barviv a projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR.

Literatura

- [1.] ŠUŠLA M., SVOBODOVÁ K. (2006): *Lignolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů*. Chem. Listy. 100: 889–895.
- [2.] HARITASH A., KAUSHIK C. (2009): *Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS): a review*. Journal of Hazardous Materials 169: 1–15.
- [3.] MARTÍNEZ Á., SPERANZA M., CAMARERO S., MARTÍNEZ M. (2005): *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*. International Microbiology. 8:195-2048:195-204.
- [4.] TUOR U., WINTERHALTER K., FIECHTER A. (1995): *Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay*. Journal of Biotechnology 41: 1–17.
- [5.] ESHGHIA H., ALISHAHIB Z., ZOKAEIB M., DAROODIA A., TABASIB E. (2011): *Decolorization of methylene blue by new fungus: Trichaptum bifforme and decolorization of three synthetic dyes by Trametes hirsuta and Trametes gibbosa*. European Journal of Chemistry 2 (4): 463-468.

Abstract

At present, the degradation of pollutants, which include also synthetic dyes, is performed by physico-chemical methods. These conventional methods are generally characterized by high running costs and by formation by-products. In recent years, the possibility of degradation by biodegradation technologies using ligninolytic fungus are investigated.

This work is focused on the evaluation of degradation abilities of fungal cultures *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* in rotating disc bioreaktor. Decolorization ability by fungi was observed on the dye RBBR (150 mg l⁻¹), Methylene Blue (150 mg l⁻¹), DB3 (150 mg l⁻¹), and the real sample of dyeing mixture from dyeing process.