

DEKOLORIZACE SYNTETICKÝCH BARVIV HOUBOU *DICHOMITUS SQUALENS*

Hana Válková¹, Hana Mikesková²

¹*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, hanulka.valkova@seznam.cz*

²*Mikrobiologický ústav AV ČR, Laboratoř environmentální biotechnologie, Vídeňská 1083,
Praha 4- Krč 142 20, mikeskova@biomed.cas.cz*

Abstrakt

Ligninolytické houby taxonomicky patří mezi basidiomycety. Ze všech známých mikroorganismů mají houby bílé hniloby (HBH) největší potenciál pro degradaci ligninu, čímž velmi významně přispívají ke koloběhu uhlíku v přírodě. Výzkumy prokázaly jejich schopnost degradovat také různá xenobiotika, jako jsou např. syntetická barviva, polychlorované bifenyly či polycyklické aromatické uhlovodíky. Tato biodegradační kapacita je spojována se schopností hub bílé hniloby produkovat extracelulární ligninolytické enzymy. Řadí se k nim i houba *Dichomitus squalens* (outkovka neladná), na jejíž schopnost dekolorizovat antrachinonové barvivo Remazol Brilliant Blue R v závislosti na množství zdroje uhlíku byla práce prakticky zaměřena. *D. squalens* se zdá být vhodným houbovým organismem pro využití v biotechnologiích.

Klíčová slova: *Dichomitus squalens*; RBBR; glukóza; dekolorizace

Úvod

Velkým problémem moderní civilizace je stále se zvětšující znečištění životního prostředí. Jeho hlavními zdroji jsou průmyslová výroba, doprava, spalování odpadů či výroba energie. Většina vznikajících sloučenin je perzistentní nebo toxická [1.].

Mezi tři hlavní a nejvíce prostudované ligninolytické enzymy patří mangan-dependentní peroxidasa (MnP), lignin peroxidasa (LIP) a lakasa (Lac). Enzymatický systém hub bílé hniloby obvykle obsahuje jeden nebo více z těchto tří hlavních enzymů. Tyto enzymy jsou schopné degradovat lignin (od toho také lignin modifikující enzymy – LME). Vzhledem k nepravidelné struktuře ligninu je jejich substrátová specifita velmi nízká, díky čemuž mají HBH široký biodegradační potenciál [8.].

Dichomitus squalens se řadí do skupiny hub produkujících MnP a Lac. Byla také prokázána jeho schopnost degradovat lignin a několik studií je zaměřeno na dekolorizaci syntetických barviv prostřednictvím *D. squalens*, přesto je zatím velmi málo prozkoumaným organismem [2.]. Byly u něj izolovány dva izoenzymy MnP – Ds MnP1 a Ds MnP2. Enzymy vykazují podobnost s MnP1 u houby *P. chrysosporium*, katalyzují tedy pravděpodobně podobné reakce [4.]. Optimální aktivita enzymů byla zjištěna při pH 4,5 a 5,0 [7.]. Dále byly z kultur *D. squalens* separovány 2 formy lakasy – lakasa c1 (hlavní) a lakasa c2 (vedlejší). Obě formy jsou poměrně stabilní při pH 3, ale záleží také na substrátu [6.].

Dosavadní studie prokázaly schopnost houby *D. squalens* dekolorizovat různá syntetická barviva i ve vysokých koncentracích, které mohou mít na houby toxický vliv. Přítomnost barviva způsobuje pokles produkce biomasy u *D. squalens*, zároveň ale byla zjištěna nižší toxicita barviva po dekolorizaci tímto houbovým kmenem při testech toxicity na okřehku *Lemna minor*. Všechny tyto skutečnosti jsou slibným předpokladem pro využití *D. squalens* v biotechnologiích [3.], [4.].

Tato práce byla zaměřena na studium dekolorizace barviva RBBR houbou *D. squalens* při různých koncentracích barviva. Sledovaným faktorem byl vliv zdroje uhlíku na dekolorizaci.

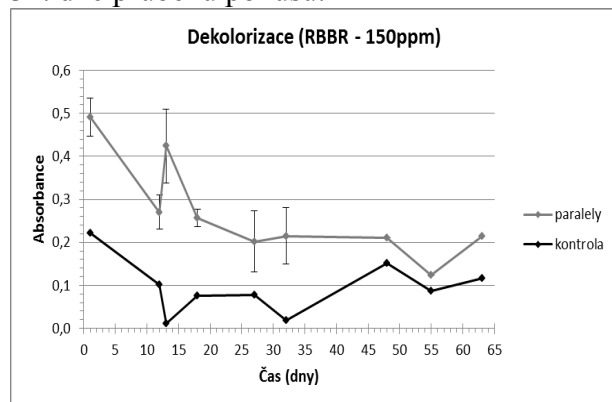
Materiál a metody

Pro vlastní pokus byl použit houbový kmen *Dichomitus squalens* ze sbírky basidiomycetů Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze. Ke studiu dekolorizace bylo zvoleno antrachinonové barvivo Remazol Brilliant Blue R (Sigma, p. a.). Vlastní pokus byl proveden v Erlenmayerových baňkách o objemu 100ml. Pro kultivaci bylo zvoleno Kirkovo médium pH 6 (v 1l: 100 ml 10% glukóza, 100 ml Basal solution - 20 g K_2HPO_4 , 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 100 ml Trace elements, 100 ml 0,1M dimetylsukcinátu (DMS), 10 ml 0,001% thiaminu, 12,5 ml 0,8% vlnanu amonného, 60 ml Trace elements - 3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl, 0,1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,01 g H_3BO_3 , 1,5 g $C_6H_9NO_6$).

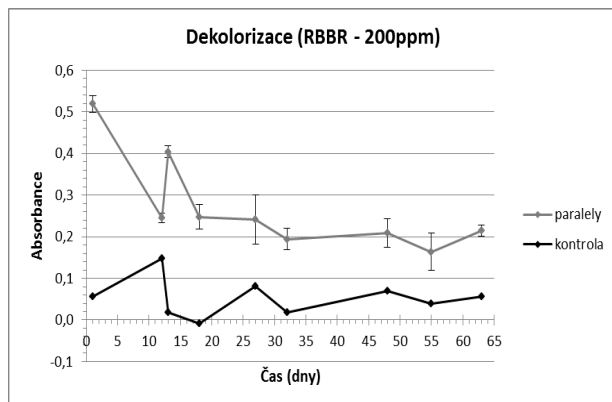
Metodika: Do Erlenmayerových baňek byly vloženy polyamidové drátěnky sloužící jako nosič. Médium bylo připraveno smícháním daných složek a jeho pH bylo upraveno na 6 pomocí 8% NaOH a 36% HCl. Baňky i médium byly sterilizovány autoklávováním po dobu 20 minut při 120°C. Do každé baňky bylo aplikováno 50ml Kirkova média, 10ml homogenní houbové kultury a RBBR v příslušné koncentraci (150, 200 a 300 ppm). Jako kontroly sloužily čisté houbové kultury. Jednou týdně byly měřeny enzymatické aktivity, dekolorizace barviva a množství glukózy v médiu. V průběhu celého pokusu byly kultury kultivovány při 28°C v termostatu.

Výsledky a diskuse

Následující grafy (1 a 2) zobrazují průběh dekolorizace barviva RBBR v různých koncentracích. Bez ohledu na koncentraci byly ve všech případech degradovány asi 2/3 počátečního množství barviva. Zdrojem uhlíku v médiu byla 10% glukóza. Z důvodu velmi rychle probíhající dekolorizace byl již 13. den zahájen druhý dekolorizační cyklus opětovným přidáním barviva v daných koncentracích. Množství barviva v kulturách kleslo na stejnou úroveň jako v prvním cyklu a dále už neklesalo. Z grafů lze usuzovat, že se dekolorizace zastavila kolem 32. dne průběhu pokusu.



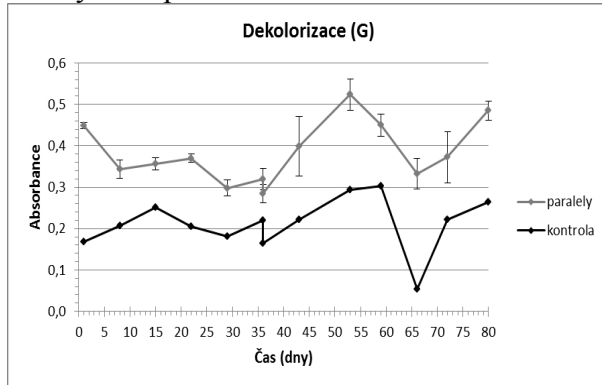
Graf 1. Dekolorizace RBBR kmenem *D. squalens*



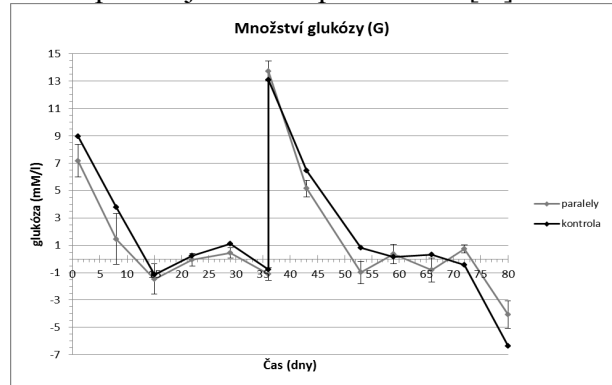
Graf 2. Dekolorizace RBBR kmenem *D. squalens*

V dalších grafech je zobrazena dekolorizace RBBR o koncentraci 200ppm (graf 3) a množství glukózy v kulturách (graf 4). Do média byla na začátku přidána pouze 2% glukóza, která byla vyčerpána do 15. dne, zatímco dekolorizace pokračovala do 30. dne, kdy byla dekolorizována asi třetina původního množství barviva. Následně byla 36. den pokusu přidána

10% glukóza. Ačkoliv se předpokládalo, že dojde k dalšímu masivnímu odbarvování, glukózový šok vyvolal přechodně vzrůst absorbance a dekolorizační proces již dále nepokračoval [9].

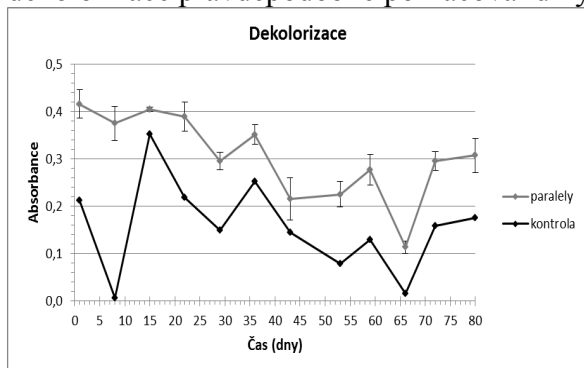


Graf 3. Kultury s RBBR 200ppm, přídavek glukózy

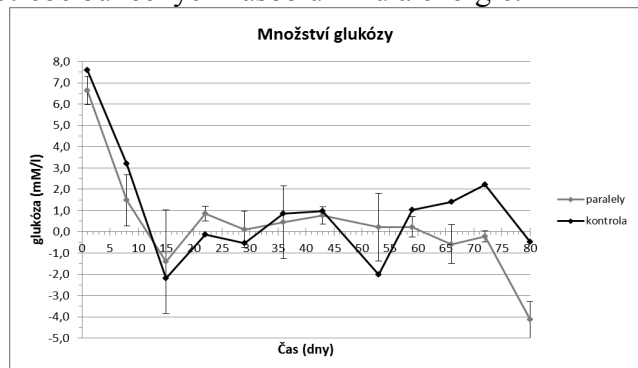


Graf 4. Kultury s RBBR 200ppm, přídavek glukózy

V kulturách bez přidání glukózy v průběhu pokusu (grafy 5 a 6) probíhala dekolorizace RBBR plynule až na hodnotu 25% původního množství barviva. Vyčerpání glukózy v kultuře zjevně předcházelo zastavení procesu dekolorizace barviva. Po vyčerpání glukózy proces dekolorizace pravděpodobně pokračoval díky spotřebě buněčných zásob uhlíku a energie.



Graf 5. Kultury s RBBR 200ppm



Graf 6. Kultury s RBBR 200ppm

Přidání exogenní glukózy nepodpořilo další degradaci přítomného barviva (grafy 3 a 4). Důvod tohoto chování kultury není znám. Z literatury je známo, že zdroj uhlíku hraje významnou roli při dekolorizaci barviv [5.]. Ze srovnání grafů dekolorizace je patrné, že v kulturách, do jejichž média byla v počátku přidána 10% glukóza (grafy 1 a 2), proběhla dekolorizace rychleji než u kultur s médiem obsahujícím 2% glukózu.

Závěr

Houbový organismus *Dichomitus squalens* má potenciál pro využití v biotechnologiích, neboť byl schopen degradovat antrachinonové barvivo RBBR v různých koncentracích. Neočekávaným jevem bylo neobnovení procesu dekolorizace v kulturách, do kterých byl po vyčerpání znovu přidán zdroj uhlíku. Přechodný vzrůst absorbance, který glukózový šok vyvolal, je jev v literatuře zatím nepopsaný. Nabízí se několik hypotetických vysvětlení tohoto jevu. Je možné, že přidání glukózy stimulovalo houbu k uvolnění nějakého metabolitu, který absorbuje ve stejné vlnové délce jako RBBR. Nebo dekolorizace probíhá dvoufázově, tedy přijetím barviva do buněk a poté vlastní dekolorizace. Glukózový šokem by pak právě barvivo přijaté v buňkách mohlo být uvolněno zpět do média. Tyto hypotézy ale nelze prokázat na základě získaných výsledků a nabízí se pro další testování.

Poděkování

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. Dále bychom rády poděkovaly vedoucímu práce Doc. RNDr. Čeňkovi Novotnému, CSc. za metodické vedení v průběhu práce, dále Doc. RNDr. Kateřině Malachové, CSc., Mgr. Zuzaně Rybkové a Mgr. Jiřímu Červeňovi za pomoc při práci v laboratoři a ochotu.

Literatura

- [1.] ALLARD, A. S., H. NEILSON, A. H., (1997): Bioremediation of Organic Waste Sites: A Critical Review of Microbiological Aspects. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39: 253 – 285.
- [2.] EICHLEROVÁ, I., HOMOLKA, L., BENADA, O., KOFROŇOVÁ, O., HUBÁLEK, T., NERUD, F., (2007): Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere* 69: 795 – 802.
- [3.] EICHLEROVÁ, I., HOMOLKA, L., NERUD, F., (2006): Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology* 97: 2153 – 2159.
- [4.] LI, D., LI, N., MA, B., MAYFIELD, M. B., GOLD, M. H., (1999): Characterization of genes encoding two manganese peroxidases from the lignin – degrading fungus *Dichomitus squalens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1434: 356 – 364.
- [5.] NOVOTNÝ, Č., SVOBODOVÁ, K., BENADA, O., KOFROŇOVÁ, O., HEISSENBERGER, A., FUCHS, W., (2011): Potential of combined fungal and bacterial treatment for color removal in textile wastewater. *Bioresource Technol.* 102: 879-888.
- [6.] PÉRIÉ, F. H., REDY, G. V. B., BLACKBURN, N. J., GOLD, M. H., (1998): Purification and Characterization of Laccases from the White-Rot Basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353: 349–355.
- [7.] PÉRIÉ, F. H., SHENG, D., GOLD, M. H., (1996): Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from tile white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1297: 139 – 148.
- [8.] POINTING, S. B., (2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 20 – 30.
- [9.] VÁLKOVÁ, H., (2011): Vliv zdroje uhlíku na dekolizaci antrachinonových barviv houbou *Dichomitus squalens*. Sborník abstraktů. Studentská vědecká konference. ISBN: 978-80-7368-908-7.

Abstract

Ligninolytic fungi taxonomically belong to the group of Basidiomycetes. Of all known microorganisms, white rot fungi have the greatest potential for degradation of lignin and thus contribute significantly to the carbon cycle in nature. It has been shown that these fungi including *Dichomitus squalens* can also degrade various resistant organopollutants, such as synthetic dyes, polycyclic aromatic hydrocarbons or polychlorinated biphenyls. Their biodegradation capacity is associated with the activity of extracellular enzymes produced by these fungi. Our experiments focused on the decolorization of the synthetic dye Remazol Brilliant Blue R in immobilized cultures of *Dichomitus squalens* in dependence on the amount of the carbon source present. *D. squalens* seems to be a suitable fungal organism for use in biotechnology.