

Determination of the mechanism and optimization of the conditions of the process of removing colored aromatic compounds by selected Basidiomycota

Określenie mechanizmu i optymalizacja warunków procesu usuwania barwnych związków aromatycznych przez wybrane grzyby podstawkowe

Author:

M.Sc. Ruchi Manishkumar Upadhyay

Department of Air Protection,

Faculty of Energy and Environmental Engineering,

Silesian University of Technology, Poland

Supervisor:

Prof. dr hab. inż. Wioletta Przysaś

Department of Air Protection,

Faculty of Energy and Environmental Engineering,

Silesian University of Technology, Poland

Słowa kluczowe: mykoremediacja; grzyby białej zgnilizny drewna; barwniki syntetyczne; biodegradacja; biosorpcja; transkryptomika; proteomika; ekotoksykologia; oczyszczanie ścieków; *Trametes versicolor*; *Pleurotus ostreatus*

1. Wprowadzenie

Szybka urbanizacja i industrializacja doprowadziły do powszechnego stosowania barwników syntetycznych w takich gałęziach przemysłu jak tekstylny, skórzaný, papierniczy, farmaceutyczny, spożywczy i kosmetyczny [1,2]. Od wprowadzenia barwników syntetycznych w 1856 roku opracowano ponad 10 000 rodzajów barwników, a ich globalna produkcja przekracza 1 milion ton rocznie [3]. Sam przemysł tekstylny zużywa prawie 80% tych barwników i odgrywa kluczową rolę w gospodarkach wielu krajów rozwijających się, generując zatrudnienie i dochody z eksportu [4].

Jednak koszty środowiskowe tego wzrostu są znaczne. Tylko 10–15% barwników wiąże się skutecznie z włóknami tekstylnymi, a pozostała część jest odprowadzana do ścieków. W rezultacie około 100 000 – 280 000 ton barwników przedostaje się do środowiska wodnego każdego roku [5]. Kraje o silnie skoncentrowanym przemyśle tekstylnym, takie jak Bangladesz, Indie i Chiny, generują rocznie miliardy ton ścieków zawierających barwniki, z których znaczna część jest odprowadzana bez oczyszczania [6]. Ścieki te poważnie pogarszają jakość wody, utrudniają przenikanie światła, zakłócają funkcjonowanie ekosystemów wodnych i stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i środowiska, w tym toksyczne, alergenne i rakotwórcze [7].

Barwniki syntetyczne są szczególnie problematyczne ze względu na ich złożoną strukturę aromatyczną, wysoką stabilność chemiczną i odporność na biodegradację. Zanieczyszczenie barwnikami znacząco podważa zrównoważony rozwój i pogłębia globalny niedobór wody. W związku z tym oczyszczanie ścieków zawierających barwniki stało się głównym priorytetem badawczym i kluczowym celem międzynarodowej polityki środowiskowej [8], w tym Celów Zrównoważonego Rozwoju Organizacji Narodów Zjednoczonych (w szczególności 6 Celu Zrównoważonego Rozwoju: Czysta woda i warunki sanitarne oraz 3 Celu Zrównoważonego Rozwoju: Dobre zdrowie i dobre samopoczucie) oraz Europejskiego Zielonego Ładu.

Konwencjonalne metody oczyszczania ścieków – takie jak koagulacja, zaawansowane procesy utleniania, adsorpcja, filtracja membranowa i degradacja mikrobiologiczna – są szeroko stosowane do usuwania barwników [3]. Jednak ich skuteczność różni się w zależności od struktury barwnika, rozpuszczalności i warunków operacyjnych, a wiele technik jest kosztownych, energochłonnych lub nieodpowiednich do zastosowań zdecentralizowanych. W związku z tym istnieje pilna potrzeba opracowania przyjaznych dla środowiska, opłacalnych i zdecentralizowanych technologii oczyszczania dostosowanych specjalnie do ścieków zawierających barwniki [9].

Biologiczne oczyszczanie z wykorzystaniem mikroorganizmów stanowi obiecującą alternatywę ze względu na swoją elastyczność operacyjną i optymalność dla środowiska. Wśród czynników biologicznych, grzyby – zwłaszcza grzyby białej zgnilizny drewna – zyskują coraz większe zainteresowanie ze względu na swoje wyjątkowe zdolności do usuwania barwników [10]. Dzięki synergistycznemu połączeniu biosorpcji i biodegradacji enzymatycznej, grzyby białej zgnilizny mogą przekształcać złożone cząsteczki barwników w

mniej toksyczne lub zmineralizowane produkty. Mykoremediacja jest szczególnie atrakcyjna ze względu na niskie wymagania infrastrukturalne, skalowalność i wpływ na zrównoważony rozwój [11].

Pomimo rosnącego zainteresowania eliminacją barwników z wykorzystaniem grzybów, nadal istnieją znaczne luki w wiedzy w zakresie zrozumienia i optymalizacji mechanizmów regulujących usuwanie barwników przez grzyby białej zgnilizny drewna. W szczególności synergistyczny udział biosorpcji i pozakomórkowej biodegradacji enzymatycznej nie został jeszcze wystarczająco wyjaśniony, co ogranicza przewidywalność i skalowalność systemów oczyszczania z wykorzystaniem grzybów. Istnieje pilna potrzeba oceny wykonalności integracji procesów z wykorzystaniem grzybów białej zgnilizny w małych, zdecentralizowanych systemach bioreaktorów dostosowanych do określonych klas barwników, szczególnie w regionach pozbawionych scentralizowanej infrastruktury ściekowej [12]. Ponadto, nie poświęcono wystarczającej uwagi bezpieczeństwu ekotoksykologicznemu oczyszczonych ścieków, które ma kluczowe znaczenie dla ochrony środowiska i akceptacji regulacyjnej. Obecnie brak mechanistycznej wiedzy łączącej ekspresję genów, wydzielanie enzymów i wydajność degradacji barwników utrudnia racjonalną optymalizację procesów [13]. Pilnie konieczne jest zatem wypełnienie tych luk za pomocą zaawansowanych podejść multiomicznych - obejmujących transkryptomikę, proteomikę i metabolomikę - aby umożliwić modelowanie predykcyjne, zwiększyć wydajność oczyszczania i wesprzeć rozwój technologii oczyszczania ścieków nowej generacji na bazie grzybów.

2. Plan badań

2.1 Luka badawcza

Na podstawie obszernego przeglądu literatury, niniejsze badania zidentyfikowały następujące kluczowe luki badawcze dotyczące odbarwiania barwników techniką mykoremediacji:

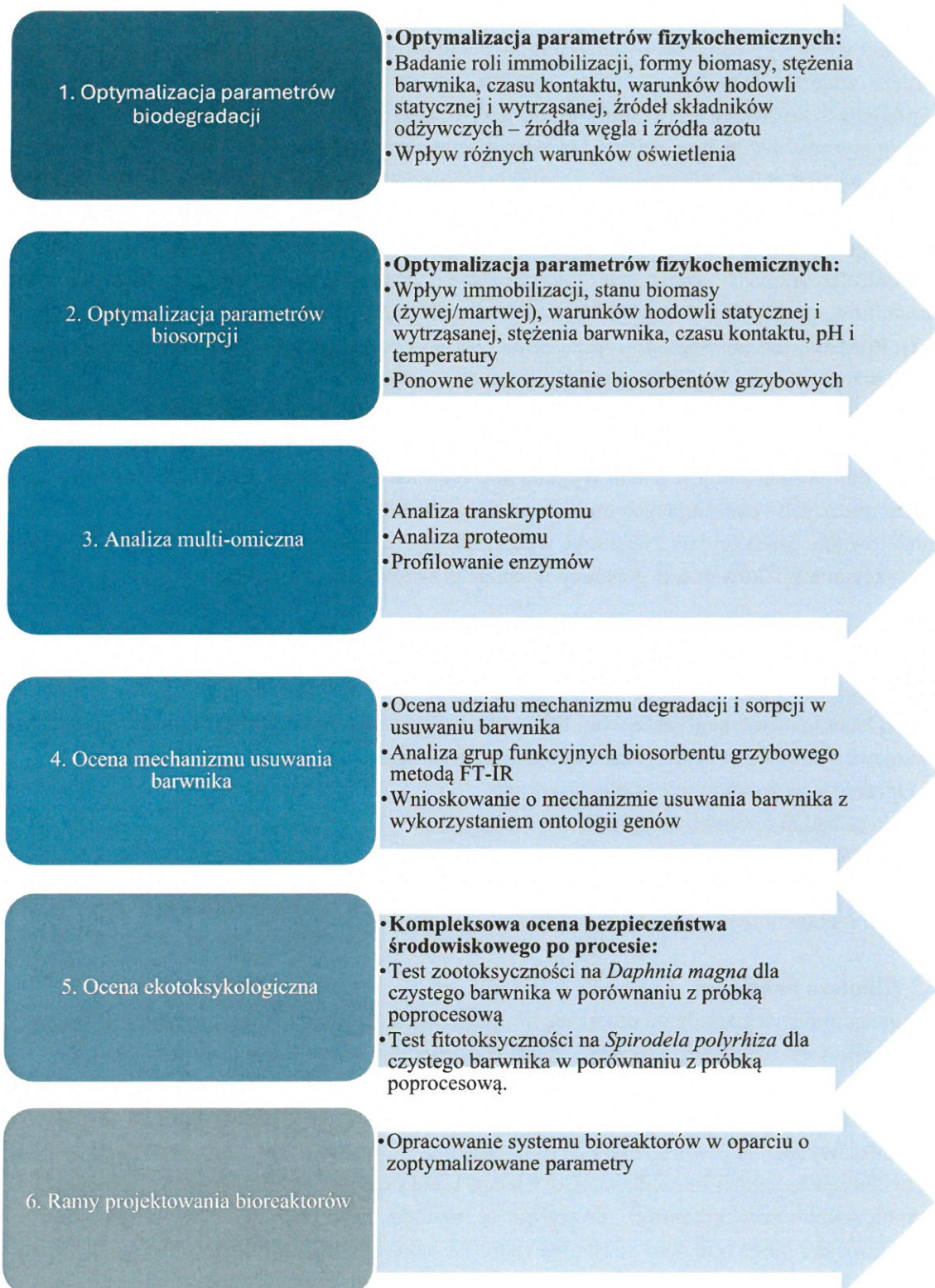
1. Ograniczone zrozumienie mechanistyczne,
2. Zakres badań optymalizacyjnych,
3. Ograniczona integracja multiomik,
4. Brak kompleksowej oceny toksyczności,
5. Zapotrzebowanie na zdecentralizowane oczyszczanie ścieków.

2.2 Hipoteza badawcza

Hipoteza niniejszego badania opiera się na tych lukach, zgodnie z którymi grzyby, takie jak *T. versicolor* i *P. ostreatus*, wykazują zdolność usuwania barwników poprzez synergistyczny mechanizm biosorpcji i biodegradacji enzymatycznej, który można znacznie ulepszyć poprzez optymalizację kluczowych parametrów fizykochemicznych i skutecznie zastosować w kompaktowych, zdecentralizowanych systemach bioreaktorów zaprojektowanych dla określonych kategorii barwników. Co więcej, takie oczyszczanie może wytwarzać ścieki o ograniczonej ekotoksyczności, co czyni tę metodę opłacalną dla środowiska. Badania multiomiczne mogą pomóc w rozszyfrowaniu związku między profilem enzymów a ekspresją genów, co może stanowić podstawę do predykcyjnego modelowania interakcji między enzymami grzybowymi a różnymi klasami barwników.

2.3 Cel badań

W oparciu o wyznaczony zakres badań, systematycznie sformułowano cele szczegółowe, aby uwzględnić każdy aspekt w sposób kompleksowy i praktycznie wykonalny (rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat celów badawczych

3. Materiały i metodologia badań

3.1 Substancje testowe – barwniki syntetyczne

W niniejszym badaniu wybrano szereg barwników syntetycznych reprezentujących trzy główne klasy strukturalne barwników – azowe (czerwień Kongo (CR), błękit Evansa (EB)), trifenylometanowe (zieleń brylantowa (BG), fiolet krystaliczny (CV)) i antrachinonowe (błękit brylantowy Remazol R (RBBR)) – do dekoloryzacji przez grzyby białej zgnilizny. Barwniki o czystości analitycznej użyto do przygotowania sterylnych roztworów macierzystych (1000 mg/L) w wodzie dejonizowanej, a roztwory robocze o pożądanych stężeniach przygotowano na świeżo w warunkach aseptycznych.

3.2 Wybór szczepu grzyba i nośnika do immobilizacji

Czyste kultury grzybów białej zgnilizny drewna (WRF), *Pleurotus ostreatus* (szczep BWPH) i *Trametes versicolor* (szczep CB8) pobrano z depozytu Kolekcji Szczepów Grzybów Katedry Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Izolacja i identyfikacja gatunków grzybów zostały wcześniej opisane przez Jureczko i in. [34]. Oba szczepy utrzymywano w płynnym podłożu organicznym, zwanym podłożem regularnym (RM), zawierającym glukozę – 5 g/L, pepton – 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1 g/L i KH_2PO_4 – 1 g/L (pH – 5,7).

Immobilizacja biomasy grzybów została zastosowana w celu zwiększenia stabilności strukturalnej i możliwości ponownego wykorzystania kultur grzybowych w procesach eliminacji zanieczyszczeń. Nośnik S1: myjka polipropylenowa nadający się do mycia naczyń oraz nośnik S2: gąbka – komercyjny poliuretan wybrano ze względu na opłacalność, stabilność mechaniczną i neutralność dla środowiska.

3.3 Przygotowanie i immobilizacja biomasy grzybów

Wyhodowaną 7-dniową biomasę przeniesiono do 250 ml kolby Erlenmeyera zawierającej 150 ml płynnej pożywki organicznej i hodowano w różnych parametrach wzrostowych w celu uzyskania różnych wariantów biomasy grzybów (Tabela 1). W przypadku eksperymentów biodegradacji barwnik dodawano bezpośrednio do pożywki zawierającej m.in. enzymy pozakomórkowe. W przypadku eksperymentów biosorpcji biomasę grzybów oddzielono od pożywki, a następnie do barwnika dodano tylko peletki biomasy grzybów.

Tabela 1. Warunki wzrostu dla wytwarzania wariantów biomasy grzybów

Parametry wzrostu	Opis	Zawieszona biomasa grzybowa	immobilizowana bez nośnika biomasa grzybowa	immobilizowana na nośniku biomasa grzybowa
Statyczne	-	X	-	-
Wstrząsanie	150 rpm	-	X	X
Nośnik do unieruchomienia	myjka-S1 lub gąbka-S2	-	-	X
Temperatura	20°C ± 2°C	X	X	X
Skróty do eksperymentów biodegradacji	Biomasa grzybów + ekstrakt pozakomórkowy	CB8/ST, BWPH/S T	CB8/SH, BWPH/SH	CB8/S1, CB8/S2, BWPH/S1, BWPH/S2
Skróty do eksperymentów biosorpcji	Tylko biomasa grzybowa	-	CB8-BS, BWPH-BS	CB8/S2-BS, BWPH/S2-BS

(Uwaga: „X” oznacza zastosowanie parametru)

3.4 Ocena odbarwienia barwnika poprzez biodegradację

Wstępne eksperymenty biodegradacji, jak wspomniano wcześniej, przeprowadzono z pięcioma wybranymi barwnikami. Oceniono wpływ początkowego stężenia barwnika (100-400 mg/L) na wydajność procesu. Jeden fragment 7-dniowego osadu grzybni z nośnikiem lub bez niego przeniesiono do 2 ml pożywki zawierającej odpowiednie stężenie każdego barwnika i inkubowano w warunkach statycznych w temperaturze pokojowej przez 96 godzin. Kontrole biotyczne i abiotyczne przygotowano i inkubowano w ten sam sposób, bez inokulacji szczepami. Procent odbarwienia barwnika (%) obliczono za pomocą równania 1.

$$DP[\%] = \frac{C-S}{C} \times 100 \quad (\text{równanie 1})$$

Gdzie C to aktualne stężenie barwnika w próbce kontrolnej z podłożem lub samą pożywką (mg/l), a S to aktualne stężenie barwnika w próbkach z immobilizowaną lub wolną biomasa grzybów (mg/l).

Po wstępnych eksperymentach wybrano RBBR, EB i CV do badań optymalizacji, ponieważ skutkowały one ponad 90% dekoloryzacją roztworów. Skuteczność eliminacji barwnika oceniano przy różnych parametrach:

- Wpływ mieszania kultur grzybowych na odbarwianie barwnika: statyczne i wstrząsanie
- Wpływ źródła węgla i mieszania na odbarwianie barwnika: podłoże z dodatkiem sacharozy (SM), podłoże z dodatkiem glukozy (GM),
- Wpływ źródła azotu i mieszania na odbarwianie barwnika: podłoże z dodatkiem azotanu amonu (ANM), podłoże z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (YEM),

- Wpływ immobilizacji na odbarwianie barwnika: immobilizacja na gąbce,
- Ocena skuteczności odbarwiania mieszaniny barwników: mieszanina RBBR, EB i CV w proporcji 1:1:1

3.5 Profilowanie enzymów i analizy multiomiczne

Przeprowadzono badania aktywności enzymów lakkazy, peroksydazy manganozależnej (MnP) i peroksydazy ligninowej (LiP) w warunkach bez immobilizacji biomasy, immobilizacji bez nośnika i immobilizacji z wykorzystaniem nośnika, aby wyjaśnić wpływ parametrów fizycznych i biochemicznych systemów grzybowych na usuwanie barwników RBBR, EB i CV. Grzyby *T. versicolor* (CB8) hodowane w warunkach wytrząsania i immobilizacji z wykorzystaniem gąbki okazały się lepsze w odbarwianiu barwników, dlatego wybrano je do analizy transkryptomicznej i proteomicznej, aby zrozumieć mechanizm degradacji barwników.

W celu ekstrakcji RNA do analizy transkryptomicznej pobrano peletki grzybów CB8/SH eksponowane przez 24 godziny na działanie RBBR i EB. Ekstrakcję RNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Qiagen RNeasy Plant Mini, zakupionego od Qiagen Polska Sp. z o.o., Wrocław. Kwantyfikację RNA przeprowadzono za pomocą Nanodrop, a wysokiej jakości próbki RNA wysłano do Macrogen w Holandii w celu sekwencjonowania i analizy bioinformatycznej. Do analizy Gene Ontology (GO) i szlaku KEGG wybrano geny o zróżnicowanej ekspresji (DEG) z bezwzględną zmianą krotności ≥ 2 ($|FC| \geq 2$) i wartością $p < 0,05$ w teście nbinomWaldTest, a adnotację funkcjonalną przeprowadzono za pomocą mappera eggNOG opartego na ortologach funkcjonalnych.

Do analizy proteomicznej zebrano filtry hodowli zewnątrzkomórkowej CB8/SH wystawione na działanie barwników RBBR, EB i CV (48 h) i zagęszczono je za pomocą ultrafiltracji 10 kDa MWCO (VIVASPIN TURBO). Stężenie białka oszacowano za pomocą testu kolorymetrycznego opartego na BSA. Liofilizowane próbki analizowano metodą LC-MS w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Surowe dane ze spektrometrii mas przetworzono za pomocą oprogramowania MaxQuant (v2.7.5.0). Trypsynę określono z dopuszczalnym jednym pominiętym rozszczepieniem; minimalna długość peptydu wynosiła 7 aminokwasów, a PSM FDR ustawiono na 0,01. Do akwizycji danych wykorzystano HCD, z metylotio (C) jako modyfikacją stałą i utlenianiem (M) jako modyfikacją zmienną; LFQ wyłączono z powodu braku replik biologicznych. Dane zostały dodatkowo przetworzone w programie Perseus (wersja 2.1.6.0), z wyłączeniem trafień odwrotnych, zanieczyszczeń i identyfikacji samych lokalizacji. Intensywność białek została przekształcona $\log_2$, obliczono zmiany $\log_2$ -krotności względem kontroli, a białka o $\log_2FC \geq 0,3$ uznano za różnicowo liczne w analizach GO i KEGG.

3.6 Ocena ekotoksykologiczna

Ocenę zootoksyczności dla próbek czystego barwnika i barwników poddanych działaniu grzybów przeprowadzono za pomocą zestawu DAPHTOXKIT F™ MAGNA (Tigret Sp. z o.o., Warszawa, Polska). Probki czystego barwnika i próbki po obróbce rozcieńczano seryjnie (100–

6,25%) w dwukrotnym szeregu geometrycznym, używając standardowej wody słodkiej. Do każdego dołka dodano po pięć młodych organizmów, a płytki uszczelniono Parafilmem i inkubowano w ciemności w temperaturze 20°C. Śmiertelność i unieruchomienie rejestrowano po 24 i 48 godzinach. Wartości EC₅₀ określono na podstawie krzywych stężenie – unieruchomienie, przeliczono na jednostki toksyczności za pomocą równania 2 i sklasyfikowano zgodnie z klasami toksyczności dla osób.

$$TUA = \frac{100}{EC_{50}} \quad (\text{równanie 2})$$

Aby ocenić toksyczne działanie czystego barwnika i próbek barwników poddanych działaniu grzybów na poziomie producenta, przeprowadzono mikrobiotest hamowania wzrostu z użyciem rzęsy wodnej *Spirodela polyrhiza* (SPIRODELA DUCKWEED TOXKIT, TIGRET Sp. z o.o., Polska). Kontrolę, czysty barwnik i próbki poddane działaniu grzybów ustawiono na 100% i rozcieńczono seryjnie do 50%, 25%, 12,5% i 6,25%. Jeden trzylistkowy frond umieszczono w każdym naczyniu zawierającym pożywkę wzrostową Steinberg (kontrola) lub roztwór toksyny, płytki inkubowano przez 72 godziny w temperaturze 25°C przy ciągłym oświetleniu 6000 luksów. Zdjęcia wykonane w 0 i 72 godzinie przeanalizowano przy użyciu ImageJ w celu pomiaru powierzchni liści, a wzrost obliczono jako różnicę między końcową (72 godziny) a początkową (0 godzin) powierzchnią liści. Dla każdego stężenia określono procent zahamowania wzrostu, a 72-godzinne EC₅₀ obliczono metodą analizy probitowej i wyrażono w jednostkach toksyczności (równanie 2).

3.7 Ocena dekoloryzacji barwników za pomocą eksperymentów biosorpcyjnych

Potencjał biosorpcji przez grzybnie *T. versicolor* (CB8) i *P. ostreatus* (BWPH) dla barwników trifenylometanowych, zieleni brylantowej i fioletu krystalicznego, oceniano w warunkach okresowych. Biosorbenty grzybowe przygotowano zgodnie z opisem w punkcie 3.3. Do zbadania wpływu początkowego stężenia barwnika i czasu kontaktu na wydajność sorpcji wykorzystano żywą biomasę grzybów. Oceniono wpływ immobilizacji i warunków wzrostu w hodowli statycznej na usuwanie barwnika i porównano go z biomasą swobodnie zawieszoną. Aby odróżnić pobieranie bierne od metabolicznego, zbadano również usuwanie barwnika przez autoklawowaną (martwą) biomasę. Systematycznie zbadano wpływ pH i temperatury na biosorpcję obu barwników w celu określenia optymalnych warunków operacyjnych. Do identyfikacji kluczowych czynników wpływających na sorpcję barwnika zastosowano analizę wieloczynnikową z wykorzystaniem analizy głównych składowych (PCA). Strukturalne i powierzchniowe właściwości macierzy grzybni przed i po pobraniu barwnika zostały przeanalizowane za pomocą FT-IR i SEM w celu wyjaśnienia mechanizmów biosorpcji. Na koniec oceniono możliwość ponownego użycia i stabilność unieruchomionej grzybni w kolejnych cyklach sorpcji, aby ocenić ich praktyczną przydatność.

3.8 Badania w bioreaktorach

Wcześniejsze badania laboratoryjne wykazały, że systemy CB8/SH i CB8/S2 są systemami, które są najbardziej wydajne i najszybsze w dekoloryzacji RBBR; dlatego te konfiguracje

wybrano do eksperymentów w bioreaktorach. Dekoloryzację w bioreaktorze przeprowadzono w optymalnych warunkach, stosując 0,2 l RM, w czterech kolejnych cyklach dodawania barwnika, z odpowiednimi kontrolami abiotycznymi. Po 7-dniowej inkubacji biomasy grzybów w celu jej namnożenia, do reaktorów dodawano po 125 mg/l RBBR na cykl, bez suplementacji składników odżywczych i napowietrzania. Stężenia barwnika mierzono przy 596 nm po każdym dodaniu i po 48 godzinach, a wydajność usuwania obliczono w odniesieniu do kontroli, korzystając z równania 1.

4. Wyniki i dyskusja

Biologiczna eliminacja syntetycznych barwników w oczyszczaniu ścieków opiera się na zdolnościach wybranego organizmu do biosorpcji i biodegradacji. Oba szczepy grzybów wykazały optymalny wzrost w pożywce RM i zostały skutecznie unieruchomione na obu nośnikach, a optymalnie na gąbce (70–100%). W wyniku wstępnych eksperymentów stwierdzono, że *T. versicolor* i *P. ostreatus* skutecznie usuwały strukturalnie zróżnicowane barwniki z różnych klas, takich jak barwniki azowe, trifenylometanowe i antrachinonowe, z dość wysoką wydajnością przy wyższym obciążeniu barwnikiem. *T. versicolor* osiągnął skuteczność usuwania barwnika na poziomie ~98%, 91%, 98%, 97%, 97%, a *P. ostreatus* osiągnął skuteczność usuwania barwnika na poziomie ~88%, 57%, 92%, 84%, 97% przy wyższym obciążeniu barwnikiem (400 mg/l) odpowiednio dla błękitu Evansa, czerwieni Kongo, zieleni brylantowej, fioletu krystalicznego i remazolowego błękitu brylantowego R [14].

4.1 Optymalizacja parametrów biodegradacji barwników i profilowanie enzymów

Oceniono wpływ wytrząsania hodowli grzybów, źródła węgla, źródła azotu i immobilizacji. Przeprowadzono trójczynnиковą analizę wariancji (ANOVA) w celu określenia optymalnych warunków odżywczych dla odbarwiania barwników, oceniając wpływ źródła węgla, źródła azotu i gatunku grzyba na skuteczność usuwania barwnika. Wszystkie trzy czynniki miały statystycznie istotny wpływ. Największy wpływ miało źródło azotu ($F = 226,64$, $p < 0,001$), a następnie gatunek grzyba ($F = 18,85$, $p < 0,001$), podczas gdy źródło węgla miało mniejszy, ale istotny statystycznie wpływ ($F = 4,81$, $p = 0,0125$). Stosunkowo niska wariancja wskazuje na dobre dopasowanie modelu. Wzorce te odzwierciedlają ustaloną fizjologię grzybów: wystarczająca ilość azotu sprzyja metabolizmowi pierwotnemu, jednocześnie hamując procesy wtórne, takie jak modyfikacja ligniny i degradacja barwników. W przeciwieństwie do tego, ograniczenie azotu przesuwa grzyby w kierunku metabolizmu wtórnego, znacząco zwiększając pozakomórkową produkcję enzymów oksydacyjnych, które rozkładają złożone związki aromatyczne [15,16]. Ogólnie rzecz biorąc, rodzaj składników odżywczych – a w szczególności źródło azotu – i dobór grzybów mają kluczowe znaczenie dla optymalizacji procesu.

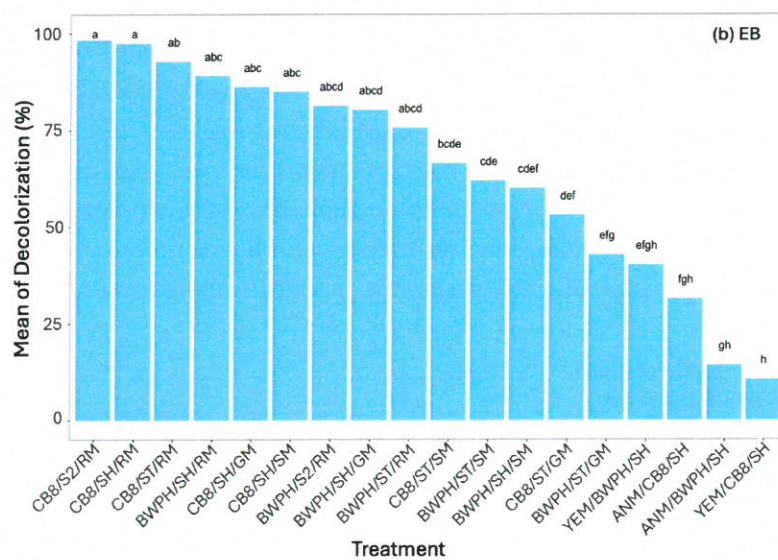
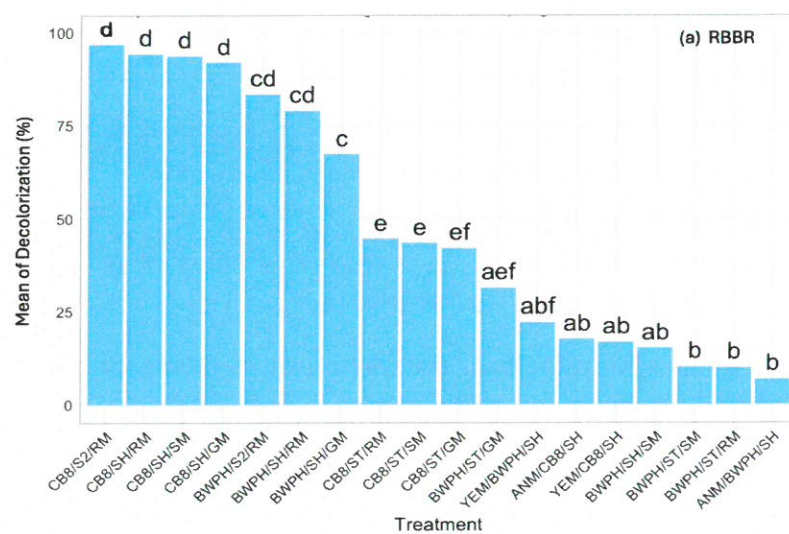
Do porównania średniej wydajności odbarwiania barwnika w różnych warunkach, metodach immobilizacji, składzie podłoża i typach biomasy grzybów zastosowano test post hoc Tukeya ($p < 0,05$) (Rysunek 2). W przypadku RBBR, *T. versicolor* (CB8) z biomasą immobilizowaną

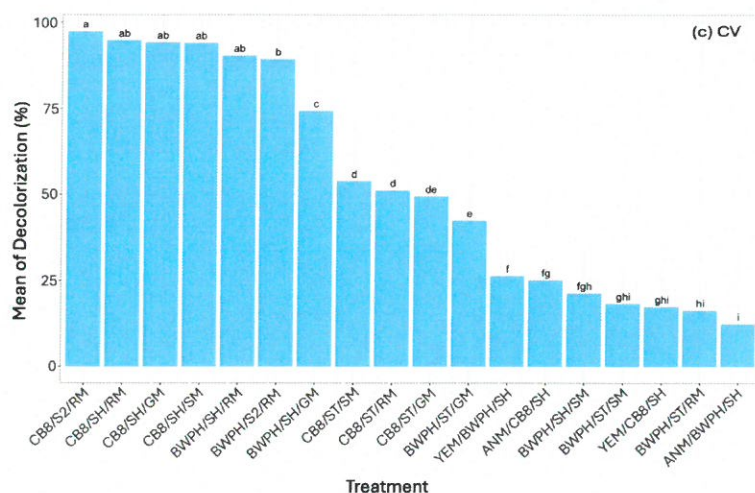
na gąbce w standardowym podłożu (CB8/S2/RM) osiągnął najwyższą dekoloryzację (~98%), znacząco przewyższając inne metody. Inne metody z wtórzystaniem CB8 w standardowym podłożu również wykazały wysoką wydajność (92–95%), podczas gdy podłoża bogate w azot skutkowały najniższym usunięciem. Imobilizacja generalnie zwiększała usuwanie barwnika, a wytrząsanie poprawiało wydajność *P. ostreatus* (BWPH). W przypadku błękitu Evansa najwyższą wydajność uzyskano dla szczepu CB8 hodowanego w standardowym podłożu w warunkach imobilizacji na gąbce lub w warunkach wytrząsania (97,6–98,4%), które stanowiły najwyższą grupę statystyczną. BWPH wykazało umiarkowaną skuteczność dekoloryzacji, natomiast pożywki bogate w glukozę, sacharozę i azot znacząco zmniejszyły odbarwienie roztworów w przypadku obu grzybów. Podobnie, w przypadku fioletu krystalicznego, imobilizowany CB8 w zwykłym podłożu stanowił optymalną modyfikację, tworząc wiodącą grupę statystyczną. Wyniki te dodatkowo potwierdzają ustalenie ANOVA, że źródło azotu ma silniejszy wpływ na proces niż źródło węgla. BWPH osiągnął najwyższy poziom usunięcia barwy w warunkach wytrząsania lub imobilizacji w standardowym podłożu, ale pozostał mniej skuteczny niż CB8. Ogólnie rzecz biorąc, CB8 hodowany w standardowym podłożu w warunkach imobilizacji lub wytrząsania był konsekwentnie identyfikowany jako statystycznie lepszy system do odbarwiania barwników RBBR, błękitu Evansa i fioletu krystalicznego. Gdy te rodzaje biomasy zostały użyte do odbarwienia trójskładnikowej mieszaniny barwników w stosunku 1:1:1, *T. versicolor* (CB8/SH i CB8/S2) osiągnął ponad 70% odbarwienia. Wskazuje to na jego duży potencjał w zakresie oczyszczania mieszanin barwników z różnych klas, powszechnie spotykanych w rzeczywistych ściekach.

Inni badacze również podkreślili korzyści płynące z imobilizowanych kultur, wykazując, że grzyby białej zgnilizny drewna unieruchomione na nośnikach, takich jak pianka poliuretanowa, gąbka loofa lub kulki alginianowe, wykazują zwiększoną i bardziej stabilną produkcję enzymów, ochronę przed narażeniem na stres i toksycznymi metabolitami barwników, tworzenie gęstego biofilmu oraz lepszą degradację barwnika dzięki przedłużonej aktywności i dodatkowej zdolności adsorpcyjnej [17,18].

Narażenie na RBBR, EB i CV wywołało wyraźną indukcję aktywności lakkazy zarówno u *T. versicolor* (CB8), jak i *P. ostreatus* (BWPH), przy czym stopień produkcji enzymów różnił się w zależności od barwnika, gatunku grzyba i warunków wzrostu. Najwyższą produkcję enzymu lakazy odnotowano dla CB8/S2 w warunkach dekoloryzacji RBBR (20 U/l). CB8/SH charakteryzuje się ogólnie wysoką produkcją MnP (~80 U/l). Produkcja LiP była niższa w narażeniu na barwnik w porównaniu z kontrolą bez barwnika. Podsumowując tę część badań, przeprowadzono analizy statystyczne w celu określenia znaczenia każdego enzymu oraz oceny korelacji między aktywnością enzymu a obserwowanymi procentami odbarwienia w warunkach statycznych, wstrząsanych i biomasy grzybowej unieruchomionej na gąbce. Korelacja Spearmana wykazała silną dodatnią korelację między odbarwieniem RBBR a aktywnością lakkazy i MnP ($\rho = 0,771$, $p = 0,072$), podczas gdy LiP wykazywał nieistotną statystycznie korelację ($\rho = 0,086$, $p = 0,872$). Odkrycia te wskazują, że chociaż zewnątrzkomórkowe enzymy ligninolityczne są istotne dla utleniania barwników, sama aktywność enzymu jest niewystarczająca do wiarygodnego przewidywania skuteczności odbarwiania w złożonych układach grzybowych. Ta złożoność podkreśla potrzebę podejść

systemowych, takich jak analizy transkryptomyczne i proteomiczne, w celu wyjaśnienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw odbarwiania barwników.

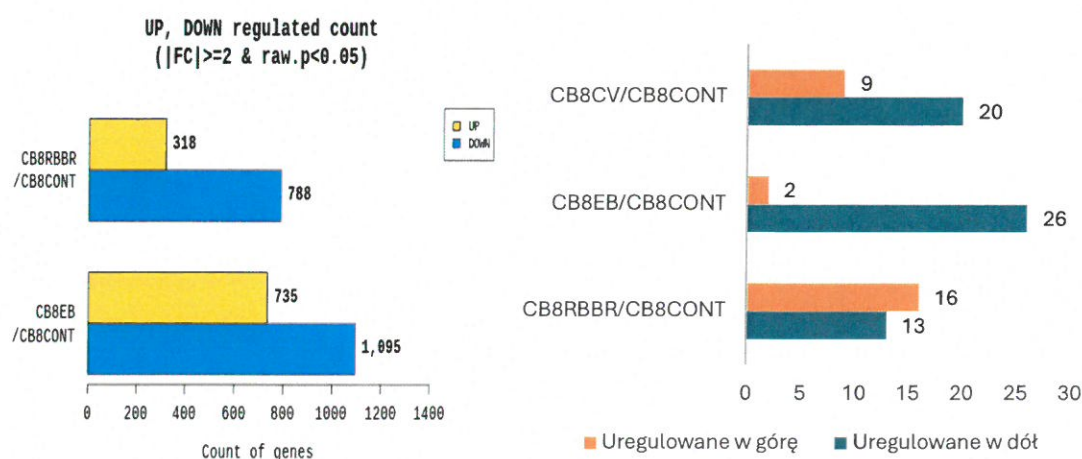




Rysunek 2. Test grupowania post hoc Tukeya w celu wyboru optymalnych warunków odbarwiania barwnika spośród mieszania, rodzaju immobilizacji i źródła składników odżywczych dla (a) błękitu brylantowego Remazol R (b) błękitu Evansa i (c) fioletu krystalicznego przez *T. versicolor* (CB8) i *P. ostreatus* (BWPH)

4.2 Molekularne spojrzenie na mechanizmy degradacji barwników

W niniejszym badaniu przeprowadzono sekwencjonowanie całego transkryptomu *T. versicolor* (szczep CB8) w celu identyfikacji genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG), a proteomikę metodą LC/MS w celu identyfikacji białek o zróżnicowanej ekspresji (DEP). Celem było przeprowadzenie adnotacji genów (GO) i odkrycie wcześniej niescharakteryzowanych genów i białek potencjalnie zaangażowanych w dekoloryzację barwników przez grzyby powodujące białą zgniliznę. Ogólnie rzecz biorąc, analiza transkryptomiczna i proteomiczna wykazała, że wysoki odsetek genów i białek uległ zmniejszeniu, jak pokazano na rysunku 3.



Rysunek 3. Różnicowa ekspresja (a) genów ($|fc| \geq 2$) i surowa wartość p testu nbinomWaldTest $< 0,05$) i (b) białek ($\log_2 fc > 0,3$) pary porównawczej próbek kontrolnych i barwionych *T. versicolor*

Podczas szczegółowych badań tych genów i białek ujawniono, że wewnątrzkomórkowe szlaki detoksykacji, obejmujące przede wszystkim monooksygenazy cytochromu P450, oksydoreduktazy, dehydrogenazy, enzymy zależne od glutationu oraz transportery błonowe, wspólnie pośredniczą w transformacji barwnika, detoksykacji i transporcie metabolitów. Szlaki wewnątrzkomórkowe w dużym stopniu przyczyniają się do degradacji barwnika [19,20]. Obniżenie ekspresji genów podziałów komórkowych i cytoszkieletu wskazuje na supresję wzrostu grzybni, która priorytetowo traktuje detoksykację i tolerancję na stres [21]. Kilka genów i białek o nieprzypisanych funkcjach może przyczyniać się do degradacji barwnika. Przeprowadzono szczegółowe adnotacje genów oparte na funkcjonalnych ortologach. Krótki przegląd danych dotyczących różnicowej ekspresji genów podczas degradacji barwnika RBBR przez *T. versicolor* przedstawiono w Tabeli 2:

Tabela 2. Ontologia genów dla DEGs podczas degradacji barwnika RBBR przez *T. versicolor*

Kategoria wzbogacania ontologii genów (GO) – funkcje molekularne (MF)					
Identyfikator białka	Funkcja przypuszczalna	Kategoria COG	Opis GO	Identyfikator GO	Złóż zmianę
39887	cytochrom P450	IQ	aktywność monooksygenazy	4497	147.4
35158	Aldo-keto-reduktaza	C	Aktywność katalityczna	3824	126.3
34024	oksydoreduktaza	C	Aktywność katalityczna	3824	4.0
39879	Nadrodzina hydroksylaz kwasów tłuszczowych	I	Aktywność katalityczna	3824	3.2
34426	Hydrogenaza żelaza	Y	Aktywność katalityczna	3824	3
32719	Należy do rodziny nośników mitochondrialnych (TC 2.A.29)	C	działalność transportera	5215	3
36733	Ogólny transporter substratu MFS	U	działalność transportera	5215	2.8
42056	Izoenzym peroksydazy manganozależnej MP2	T	Aktywność peroksydazy zależnej od manganu (utleniającej NADH)	16689	-2.1
44196	Peroksydaza ligninowa	T	Aktywność peroksydazy diarylopropano	16690	-2.1
32737	Lakas I	Q	Aktywność oksydoreduktazy	16682	-2.5

32773	Domena specyficznego czynnika transkrypcyjnego grzybów	K	region regulujący transkrypcję wiązanie kwasu nukleinowego	1067	-5.5
39667	Domena RF-1	J	wiązanie kwasu nukleinowego	3676	-84.3

4.3 Redukcja toksyczności i bezpieczeństwo środowiskowe

Testy zootoksyczności z użyciem *Daphnia magna* wykazały, że czyste barwniki RBBR, EB i CV zostały sklasyfikowane do klasy IV po 48-godzinnej ekspozycji, która po bioremediacji przez *T. versicolor* i *P. ostreatus* zmalała do klasy III. Testy fitotoksyczności z użyciem *Spirodela polyrhiza* wykazały, że czyste barwniki RBBR, EB i CV zostały sklasyfikowane odpowiednio jako IV, III i IV, a ich toksyczność została zredukowana do klas III, II i II po zastosowaniu *P. ostreatus*. Procesy z użyciem grzybów zmniejszyły zatem toksyczność, potwierdzając ekotoksykologiczne bezpieczeństwo oczyszczonych ścieków [22].

4.4 Optymalizacja parametrów biosorpcji barwnika

Aspekt biosorpcji w niniejszym badaniu wykazał, że żywa biomasa grzybów unieruchomiona na gąbce zapewnia szybkie, wydajne i wielokrotnego użytku usuwanie barwnika, szczególnie w przypadku barwników trifenylometanowych (zieleni brylantowej i fioletu krystalicznego), znacznie przewyższając tradycyjne immobilizowane biosorbenty. Maksymalna sorpcja w 6 h wynosiła 379,4 mg/g dla BG i 48,9 mg/g dla CV przy stężeniu 400 mg/l. Nasz biosorbent miał znacznie wyższą skuteczność niż wcześniej zgłaszane sorbenty biologiczne lub fizykochemiczne metody do usuwania barwnika BG. Wykazuje również wyższą wydajność i szybsze wchłanianie niż wcześniejsze sorbenty grzybowe. Dla porównania, *Phanerochaete chrysosporium* unieruchomiony na gąbce luffy osiągnął 101,06 mg/g dla remazolowego błękitu brylantowego R [23], podczas gdy suszony *Sarocladium* sp. osiągnęło sorpcję 58,48 mg/g dla barwnika czerń remazolowa [24]. Tabela 3 podsumowuje zdolności biosorpcyjne opracowanych biosorbentów zarówno w stanie żywej, jak i martwej biomasy. Badania nad optymalizacją procesu sorpcji wykazały, że usuwanie BG jest najwyższe w temperaturze 20,85–32,17°C, pH 3,4–6, a sorpcja CV jest najskuteczniejsza w temperaturze 30°C, pH 6,5–7,5; dane badań sorpcji pasują do założonego modelu ($p < 0,05$). Peletki grzybowe wykazały również potencjał ponownego wykorzystania bez dodatkowej obróbki.

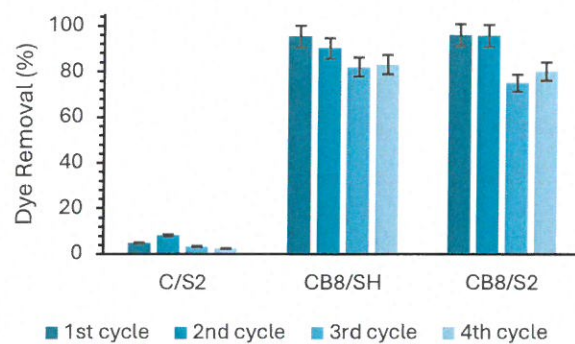
Tabela 3. Zdolność biosorpcji wariantów *T. versicolor* i *P. ostreatus* dla BG i CV w hodowli wsadowej (warunki: C0 = 200 mg/l, dawka biomasy unieruchomionej bez nośnika = 0,5 g mokrej/10 ml, dawka biomasy unieruchomionej na gąbce = 1 sztuka/10 ml, rodzaj biomasy = żywa/autoklawowana-martwa, T = 22,5 °C, t = 6 godz.)

Biosorbent	Rodzaj biomasy	Sorpcja zieleni brylantowej (%)	Sorpcja fioletu krystalicznego (%)
<i>Trametes versicolor</i> (CB8-BS)	żywa	14.2	15.6
immobilizowany <i>Trametes versicolor</i> (CB8/S2-BS)	żywa	90.3 ****	43.9 **
immobilizowany <i>Trametes versicolor</i> (CB8/S2-BS-A)	autoklawowana - martwa	48.4 ***	22.8 *
<i>Pleurotus ostreatus</i> (BWPH-BS)	żywa	23.9	12.1
immobilizowany <i>Pleurotus ostreatus</i> (BWPH/S2-BS)	żywa	81.7 *	39.3 *
Immobilizowany <i>Pleurotus ostreatus</i> (BWPH/S2-BS-A)	autoklawowana - martwa	30.3-	18.9-
gąbka (S2)	bez biomasy grzybowej	49.9 ***	6.5-

(Uwaga: **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, - $p \geq 0,05$ dla testu t w porównaniu z samoistnie unieruchomioną biomasą).

4.5 Wydajność bioreaktora i implikacje praktyczne

Poprzednie badania laboratoryjne wykazały, że immobilizowany bez nośnika i unieruchomiony na gąbce *T. versicolor* (CB8/SH i CB8/S2) osiągnął szybką i wysoką dekoloryzację RBBR w zoptymalizowanych warunkach; dlatego te biomasy wybrano do eksperymentów w bioreaktorach. Wydajność dekoloryzacji oceniano w czterech kolejnych cyklach dodawania barwnika (125 mg/l na cykl), aby ocenić stabilność operacyjną w porównaniu z kontrolami abiotycznymi. Kontrola abiotyczna zawierająca jedynie fragmenty gąbek wykazała znikomą redukcję barwy (2,4–8,2%), co potwierdza minimalną adsorpcję fizyczną i konieczność zastosowania aktywnej enzymatycznie grzybni (rysunek 4). Oba reaktory grzybowe wykazały wysoką dekoloryzację już w pierwszym cyklu, przy czym w CB8/SH i CB8/S2 usunięto odpowiednio 95,3% i 96,0% barwnika w ciągu 48 godzin. W ciągu czterech cykli utrzymano 75–80% wydajności dekoloryzacji. Ogólnie rzecz biorąc, *T. versicolor* utrzymywał skuteczną dekoloryzację w różnych cyklach, a immobilizacja na gąbce zapewniała porównywalną lub lepszą wydajność, szczególnie na wczesnym etapie eksploatacji reaktorów. Wyniki badań laboratoryjnych z powodzeniem przełożono na skalę bioreaktorową, co wskazuje na wykonalność kompaktowych, zdecentralizowanych systemów oczyszczania. Wyniki badań stanowią podstawę do opracowania niestandardowych systemów opartych na grzybach, dostosowanych do konkretnych rodzajów barwników i charakterystyki ścieków.



Rysunek 4. Procent usunięcia barwnika RBBR w bioreaktorach zawierających unieruchomioną bez nośnika grzybnicę i zimmobilizowaną na gąbce biomasę *T. versicolor* (CB8/SH i CB8/S2)

5. Wnioski

Niniejsze badania w ramach rozprawy doktorskiej jednoznacznie dowodzą, że grzyby powodujące białą zgniliznę drewna, a w szczególności *Trametes versicolor* (CB8), są wysoce skutecznymi, bezpiecznymi środowiskowo i skalowalnymi sposobami biologicznego oczyszczania ścieków zanieczyszczonych barwnikami syntetycznymi. Dzięki systematycznej optymalizacji parametrów fizykochemicznych, immobilizacji biomasy na ekonomicznych nośnikach gąbkowych oraz walidacji zarówno w skali laboratoryjnej, jak i bioreaktorowej, badania wykazały wysoką i stabilną skuteczność usuwania w obrębie strukturalnie zróżnicowanych klas barwników, nawet przy wysokich stężeniach barwnika i w ich mieszaninach. Badania te pozwoliły stwierdzić, że usuwanie barwników jest regulowane przez synergistyczne współdziałanie szybkiej biosorpcji, zewnątrzkomórkowej aktywności enzymów ligninolitycznych oraz – co szczególnie istotne – wewnątrzkomórkowych szlaków detoksykacji, co zostało wyjaśnione w zintegrowanych analizach transkryptomowych i proteomicznych, które podkreślają kluczową rolę metabolizmu zależnego od cytochromu P450, enzymów redoks i mechanizmów transportu. Oceny ekotoksykologiczne potwierdziły ponadto, że oczyszczanie z wykorzystaniem grzybów znacząco zmniejsza toksyczność, zapewniając bezpieczeństwo środowiskowe oczyszczonych ścieków. Podsumowując, niniejsza praca rozwija wiedzę o mechanizmach degradacji barwników z wykorzystaniem grzybów, tworzy solidne ramy do projektowania dostosowanych, zdecentralizowanych bioreaktorów grzybowych i pozycjonuje wykorzystanie *T. versicolor* jako biotechnologicznie wykonalne rozwiązanie dla zrównoważonego zarządzania ściekami, bezpośrednio wspierając Cele 6, 12 i 14 Zrównoważonego Rozwoju Organizacji Narodów Zjednoczonych.

6. Perspektywy przyszłych badań

Wyniki niniejszego badania wskazują na jasne kierunki przyszłych badań procesów z wykorzystaniem grzybów do usuwania barwników w praktyce przemysłowej, w tym rozwój ciągłych, modułowych systemów bioreaktorów z immobilizowaną biomasą grzybów białej zgnilizny drewna, walidację z wykorzystaniem rzeczywistych ścieków przemysłowych oraz integrację z istniejącymi technologiami oczyszczania w celu zwiększenia wydajności i zrównoważonego rozwoju. Badania mechanizmów oparte na analizie omnicznej pozwoliły wysnuć wnioski stanowiące solidną podstawę do ukierunkowanej poprawy szczepów poprzez inżynierię metaboliczną i genetyczną – taką jak wzmocnienie detoksykacji zależnej od cytochromu P450, aktywności oksydoreduktazy i funkcji transporterów – w celu stworzenia specyficznych dla barwników lub „projektowanych” systemów grzybowych o zwiększonej tolerancji i zdolności do degradacji. Uzupełniające oceny cyklu życia (LCA), długoterminowe oceny ekotoksykologiczne oraz badania nad ponownym wykorzystaniem i waloryzacją biomasy będą niezbędne do potwierdzenia bezpieczeństwa środowiskowego i potencjału w wykorzystaniu procesów w biogospodarce o obiegu zamkniętym. Łącznie te postępy w inżynierii bioreaktorów, optymalizacji wykorzystania szczepów i ocenie wpływu na zrównoważony rozwój oferują spójną ścieżkę do opracowania solidnych, skalowalnych i przyjaznych dla środowiska rozwiązań problemu zanieczyszczenia przemysłowego barwnikami z wykorzystaniem grzybów białej zgnilizny.

Bibliografia

1. Vikrant, K.; Giri, B.S.; Raza, N.; Roy, K.; Kim, K.-H.; Rai, B.N.; Singh, R.S. Recent Advancements in Bioremediation of Dye: Current Status and Challenges. *Bioresour. Technol.* **2018**, *253*, 355–367, doi:10.1016/j.biortech.2018.01.029.
2. Farhana, K.; Mahamude, A.S.F.; Mica, M.T. The Scenario of Textile Industry in Malaysia: A Review for Potentiality. *Mater. Circ. Econ.* **2022**, *4*, doi:10.1007/s42824-022-00063-5.
3. Lin, J.; Ye, W.; Xie, M.; Seo, D.H.; Luo, J.; Wan, Y.; Van Der Bruggen, B. Environmental Impacts and Remediation of Dye-Containing Wastewater. *Nat. Rev. Earth Environ.* **2023**, *4*, 785–803, doi:10.1038/s43017-023-00489-8.
4. Sosa-Martínez, J.D.; Balagurusamy, N.; Montañez, J.; Peralta, R.A.; Moreira, R.D.F.P.M.; Bracht, A.; Peralta, R.M.; Morales-Oyervides, L. Synthetic Dyes Biodegradation by Fungal Ligninolytic Enzymes: Process Optimization, Metabolites Evaluation and Toxicity Assessment. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *400*, 123254, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123254.
5. Tkaczyk, A.; Mitrowska, K.; Posyniak, A. Synthetic Organic Dyes as Contaminants of the Aquatic Environment and Their Implications for Ecosystems: A Review. *Sci. Total Environ.* **2020**, *717*, 137222, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137222.
6. Ewuzie, U.; Saliu, O.D.; Dulta, K.; Ogunniyi, S.; Bajeh, A.O.; Iwuzor, K.O.; Ighalo, J.O. A Review on Treatment Technologies for Printing and Dyeing Wastewater (PDW). *J. Water Process Eng.* **2022**, *50*, 103273, doi:10.1016/j.jwpe.2022.103273.
7. Lellis, B.; Fávoro-Polonio, C.Z.; Pamphile, J.A.; Polonio, J.C. Effects of Textile Dyes on Health and the Environment and Bioremediation Potential of Living Organisms. *Biotechnol. Res. Innov.* **2019**, *3*, 275–290, doi:10.1016/j.biori.2019.09.001.
8. Breitenmoser, L.; Cuadrado Quesada, G.; N, A.; Bassi, N.; Dkhar, N.B.; Phukan, M.; Kumar, S.; Naga Babu, A.; Kierstein, A.; Campling, P.; et al. Perceived Drivers and Barriers in the Governance of Wastewater Treatment and Reuse in India: Insights from a Two-Round Delphi Study. *Resour. Conserv. Recycl.* **2022**, *182*, 106285, doi:10.1016/j.resconrec.2022.106285.
9. Obaideen, K.; Shehata, N.; Sayed, E.T.; Abdelkareem, M.A.; Mahmoud, M.S.; Olabi, A.G. The Role of Wastewater Treatment in Achieving Sustainable Development Goals (SDGs) and Sustainability Guideline. *Energy Nexus* **2022**, *7*, 100112, doi:10.1016/j.nexus.2022.100112.
10. Latif, W.; Ciniglia, C.; Iovinella, M.; Shafiq, M.; Papa, S. Role of White Rot Fungi in Industrial Wastewater Treatment: A Review. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 8318, doi:10.3390/app13148318.
11. Kaushik, P.; Malik, A. Mycoremediation of Synthetic Dyes: An Insight into the Mechanism, Process Optimization and Reactor Design. In *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*; Singh, S.N., Ed.; Environmental Science and Engineering; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 1–25 ISBN 978-3-319-10941-1.
12. Przysaś, W. Decolourisation of a Mixture of Dyes from Different Classes Using a Bioreactor with Immobilised *Pleurotus Ostreatus* Mycelium. *Water* **2025**, *17*, 2314, doi:10.3390/w17152314.
13. Kijpornyongpan, T.; Schwartz, A.; Yaguchi, A.; Salvachúa, D. Systems Biology-Guided Understanding of White-Rot Fungi for Biotechnological Applications: A Review. *iScience* **2022**, *25*, 104640, doi:10.1016/j.isci.2022.104640.
14. Upadhyay, R.; Khan, I.U.-H.; Przysaś, W. An Evaluation of Decolorization Mechanism of Synthetic Dyes Belonging to the Azo, Anthraquinone and Triphenylmethane Group, as a Sustainable Approach, by Immobilized CB8 Strain (*Trametes Versicolor*). *DESALINATION WATER Treat.* **2023**, *284*, 268–277, doi:10.5004/dwt.2023.29270.

15. Tudzynski, B. Nitrogen Regulation of Fungal Secondary Metabolism in Fungi. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 656, doi:10.3389/fmicb.2014.00656.
16. Zhang, J.; Zhuo, X.; Wang, Q.; Ji, H.; Chen, H.; Hao, H. Effects of Different Nitrogen Levels on Lignocellulolytic Enzyme Production and Gene Expression under Straw-State Cultivation in *Stropharia Rugosoannulata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10089, doi:10.3390/ijms241210089.
17. Rodríguez Couto, S.; Sanromán, M.A.; Hofer, D.; Gübitz, G.M. Stainless Steel Sponge: A Novel Carrier for the Immobilisation of the White-Rot Fungus *Trametes Hirsuta* for Decolourization of Textile Dyes. *Bioresour. Technol.* **2004**, *95*, 67–72, doi:10.1016/j.biortech.2003.05.002.
18. Qiang, X.; Guo, X.; Quan, Q.; Su, H.; Huang, D. Improving the Adsorption Performance of Loofah Sponge towards Methylene Blue by Coating Ca²⁺ Crosslinked Sodium Alginate Layers on Its Fiber Surface. *Coatings* **2020**, *10*, 814, doi:10.3390/coatings10090814.
19. Syed, K.; Yadav, J.S. P450 Monooxygenases (P450_{ome}) of the Model White Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **2012**, *38*, 339–363, doi:10.3109/1040841X.2012.682050.
20. Barski, O.A.; Tipparaju, S.M.; Bhatnagar, A. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and Its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metab. Rev.* **2008**, *40*, 553–624, doi:10.1080/03602530802431439.
21. Matsuzaki, F.; Shimizu, M.; Wariishi, H. Proteomic and Metabolomic Analyses of the White-Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium* Exposed to Exogenous Benzoic Acid. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 2342–2350, doi:10.1021/pr700617s.
22. Przysaś, W.; Zabłocka-Godlewska, E.; Grabińska-Sota, E. Effectiveness of Dyes Removal by Mixed Fungal Cultures and Toxicity of Their Metabolites. *Water. Air. Soil Pollut.* **2013**, *224*, 1534, doi:10.1007/s11270-013-1534-0.
23. Iqbal, M.; Saeed, A.; Edyvean, R.G.J.; O'Sullivan, B.; Styring, P. Production of Fungal Biomass Immobilized Loofa Sponge (FBILS)-Discs for the Removal of Heavy Metal Ions and Chlorinated Compounds from Aqueous Solution. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1319–1323, doi:10.1007/s10529-005-0477-y.
24. Nouri, H.; Azin, E.; Kamyabi, A.; Moghimi, H. Biosorption Performance and Cell Surface Properties of a Fungal-Based Sorbent in Azo Dye Removal Coupled with Textile Wastewater. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2021**, *18*, 2545–2558, doi:10.1007/s13762-020-03011-5.

