

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

STRESZCZENIE

Barwniki syntetyczne stanowią poważne zagrożenie dla środowiska i zdrowia publicznego ze względu na ich szerokie zastosowanie przemysłowe, stabilność chemiczną oraz toksyczny wpływ na ekosystemy wodne i zdrowie ludzi. Około 100 000 ton barwników jest uwalnianych rocznie przez przemysły intensywnie wykorzystujące barwniki, a w wielu krajach, o niskich i średnich dochodach, nawet 80% ścieków zawierających barwniki jest odprowadzanych bez oczyszczania. Konwencjonalne fizykochemiczne metody oczyszczania są często kosztowne, energochłonne i generują wtórne zanieczyszczenia. Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy grzybów białej zgnilizny drewna jako zrównoważonej biologicznie alternatywy dla oczyszczania ścieków zanieczyszczonych barwnikami syntetycznymi, ze szczególnym naciskiem na zrozumienie mechanizmów, optymalizację procesów i redukcję ekotoksyczności.

Odbarwianie barwników reprezentujących trzy główne klasy strukturalne - azowe (błękit Evansa (EB), czerwień Kongo (CR)), trifenylometanowe (zieleń brylantowa (BG), fiolet krystaliczny (CV)) i antrachinonowe (błękit brylantowy Remazol R (RBBR)) - oceniano przy zastosowaniu *Trametes versicolor* (CB8) i *Pleurotus ostreatus* (BWPH). Usuwanie barwników następowało poprzez mechanizmy biodegradacji i biosorpcji. Optymalizacja parametrów operacyjnych (pH, temperatura, mieszanie, stężenie barwnika, źródła węgla i azotu, nośnik do immobilizacji i rodzaj biomasy) wykazała, że immobilizowany na gąbce *T. versicolor* hodowany w standardowym podłożu (CB8/S2) osiągnął najwyższą wydajność odbarwiania (~96%) dla RBBR, błękitu Evansa i fioletu krystalicznego, a następnie *T. versicolor* w warunkach wytrząsania (~90%). *P. ostreatus* wykazał umiarkowaną wydajność (82-90%) w porównywalnych warunkach. Analiza ANOVA potwierdziła, że gatunek grzyba, źródło węgla i źródło azotu istotnie wpływały na odbarwianie ($p < 0,05$), przy czym źródło azotu wykazywało wysoce istotny wpływ ($F = 226,64$, $p < 0,001$). Badania ekotoksykologiczne z użyciem *Daphnia magna* i *Spirodela polyrhiza* wykazały istotną redukcję toksyczności w oczyszczonych ściekach (od klasy IV do III według Persoone dla barwnika RBBR przez oba szczepy grzybów). Dlatego też próbki poddane dodatkowej obróbce są bezpieczniejsze dla środowiska niż czysty barwnik. CB8/S2 wykazał najwyższą aktywność lakazy (20 U/l) po 96 godzinach inkubacji z RBBR. Analiza korelacji Spearmana wykazała silne, ale statystycznie nieistotne korelacje między aktywnością lakazy a dekoloryzacją RBBR ($\rho = 0,771$, $p = 0,072$) oraz między aktywnością MnP a dekoloryzacją ($\rho = 0,771$, $p = 0,072$), podczas gdy aktywność LiP wykazała nieistotną korelację ($\rho = 0,086$, $p = 0,872$), co wskazuje, że sama aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych nie wyjaśnia w pełni skuteczności usuwania barwnika.

Pomimo szeroko zakrojonych badań nad dekoloryzacją barwników grzybowych, mechanizmy molekularne leżące u podstaw specyficznej dla barwników adaptacji metabolicznej grzybów białej zgnilizny drewna pozostają słabo poznane, szczególnie na poziomie biologii systemów. W niniejszym badaniu wykorzystano zintegrowane analizy transkryptomowe i proteomiczne w celu wyjaśnienia zmian odpowiedzi komórkowej *T. versicolor* podczas biodegradacji

strukturalnie odmiennych barwników, RBBR i EB. Analiza transkryptomyczna ujawniła rozległą zróżnicowaną odpowiedź ekspresji genów, z różnicą ekspresji genów wynoszącą 1106 i 1830 ($|fc| \geq 2$, $p < 0,05$) u *T. versicolor* odpowiednio podczas degradacji RBBR i błękitu Evansa. Wśród genów o podwyższonej ekspresji znalazły się monooksygenazy cytochromu P450, oksydoreduktazy zależne od NAD(P)H, ketoreduktazy i dehydrogenazy aldehydowe, a także geny związane z transportem. Jednoczesne obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego, organizację cytoszkieletu i replikację DNA wskazało na zahamowanie wzrostu pod wpływem stresu barwnikowego. Analiza proteomiczna potwierdziła trendy transkryptomiczne, ujawniając specyficzne dla barwnika przeprogramowanie metaboliczne, konserwatywne reakcje w odpowiedzi na stres z udziałem transporterów P450 i ABC oraz zwiększoną zależność od peroksydaz podczas degradacji RBBR. Łącznie takie multiomiczne podejście dostarcza nowych spostrzeżeń na temat biodegradacji barwników z udziałem grzybów, wykazując, że usuwanie barwników przez grzyby powodujące białą zgniliznę drewna wiąże się ze złożonymi wewnątrzkomórkowymi zmianami regulacyjnymi, które dotychczas nie zostały scharakteryzowane na tak głębokim poziomie.

Badania biosorpcji wykazały, że żywa biomasa w postaci biosorbentów immobilizowanych na gąbce (CB8/S2-BS) charakteryzowała się lepszą wydajnością w przypadku barwników trifenylometanowych. CB8/S2-BS osiągnął maksymalną zdolność sorpcyjną wynoszącą 379,4 mg/g dla BG i 48,9 mg/g dla CV przy stężeniu 400 mg/l, usuwając do 90,3% i 43,9% barwników w ciągu 6 godzin, co jest wynikiem 3-5 razy lepszym niż w przypadku biosorbentów immobilizowanych bez sztucznego nośnika. Analiza FT-IR potwierdziła, że dominującymi mechanizmami są powstające wiązania wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne, a biosorbenty można skutecznie ponownie wykorzystać bez konieczności dodatkowego oczyszczania. Badania w skali bioreaktora potwierdziły wykonalność operacyjną, obniżone koszty i wysoką wydajność oczyszczania w zoptymalizowanych warunkach.

Badania te dostarczają zintegrowanej wiedzy na temat mechanizmu eliminacji barwników z udziałem grzybów, skutecznie łącząc wyniki badań prowadzonych w skali laboratoryjnej z możliwościami zastosowania przemysłowego. Co ważne, prace te ustanawiają skalowalne ramy dla włączenia grzybów białej zgnilizny do infrastruktury oczyszczania ścieków, jednocześnie pogłębiając wiedzę na temat detoksykacji wewnątrzkomórkowej i procesów zależnych od transporterów, wykraczających poza tradycyjne modele zewnątrzkomórkowe, skoncentrowane na enzymach. Wyniki mogą wspierać rozwój dostosowanych, zdecentralizowanych systemów bioreaktorów grzybowych, zoptymalizowanych pod kątem określonych klas barwników i przyczyniają się bezpośrednio do osiągnięcia Celów Zrównoważonego Rozwoju ONZ (SDGs 6, 12 i 14).

Słowa kluczowe: mykoremediacja; grzyby powodujące białą zgniliznę; barwniki syntetyczne; biodegradacja; biosorpcja; transkryptomika; proteomika; ekotoksykologia; oczyszczanie ścieków; *Trametes versicolor*; *Pleurotus ostreatus*