

## Streszczenie

Substancje barwiące ze względu na powszechne wykorzystanie w wielu gałęziach przemysłu, przede wszystkim farbiarskim, włókienniczym, kosmetycznym i papierniczym, są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Z powodu nieskuteczności procesów technologicznych do środowiska może przedostawać nawet do 50% substancji stosowanych w barwieniu. Procesy opierające się, przede wszystkim, na biologicznej eliminacji tych zanieczyszczeń stanowią najbardziej obiecujące, atrakcyjne ze względu na aspekt finansowy, a także przyjazne dla środowiska rozwiązanie problemu eliminacji zanieczyszczeń. Uwaga naukowców skupia się głównie na bioremediacji wykorzystującej do oczyszczania środowiska potencjał metaboliczny drobnoustrojów. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się w głównej mierze drobnoustroje wyizolowane z terenów skażonych, z uwagi na wykształcone przez nie mechanizmy adaptacji, które umożliwiły im przetrwanie w zanieczyszczonym środowisku.

Niniejsza praca doktorska miała na celu wytypowanie mikroorganizmu, wykazującego zdolność do produkcji enzymu o aktywności lakazy i eliminacji barwników przemysłu tekstylnego, amin aromatycznych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z jednoczesnym wskazaniem mechanizmów adaptacji drobnoustroju do toksycznych zanieczyszczeń generowanych przez przemysł tekstylny. Charakterystyka lakaz oraz innych enzymów zaliczanych do wielomiedziowych oksydaz (MCOs), a także ich zastosowanie zostały opisane w pracy przeglądowej P1. W pierwszym etapie pracy, którego wyniki zostały przedstawione w pracy eksperymentalnej P2, przeprowadzono skrining grzybów wyizolowanych z terenu dawnych Zakładów Przemysłu Barwników (Z. P. B.) „Boruta” w Zgierzu, charakteryzujących się zdolnością do wytwarzania enzymu o aktywności lakazy. Izolat oznaczony jako IM 6443 odznaczał się najwyższą produkcją enzymu, zarówno podczas hodowli w podłożu stałym, jak i w hodowli płynnej. Wskazany drobnoustrój na podstawie analizy genetycznej został zidentyfikowany jako *Nectriella pironii*. W kolejnym etapie pracy, uprzednio wyizolowana mieszanina zewnątrzkomórkowych białek z hodowli *N. pironii* została poddana oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej oraz filtracji żelowej. Oczyszczone białko zidentyfikowano za pomocą spektrometrii mas jako lakaza. Enzym zachowywał aktywność w szerokim zakresie pH wynoszącym 3,0-10,6 oraz wykazywał zdolność do efektywnej dekoloryzacji (na poziomie wynoszącym 69-92%) barwników przemysłu tekstylnego zaliczanych do różnych grup chemicznych.

Zakres badań, opisanych w pracy eksperymentalnej P3, obejmował ocenę możliwości grzyba *N. pironii* do eliminacji amin aromatycznych i barwników azowych. Ponadto w eksperymentach wykorzystano próbki odcieków (oznaczonych symbolami L1 i L2) pobranych ze składowiska odpadów niebezpiecznych dawnych (Z. P. B.) „Boruta” w Zgierzu. Odcieki te charakteryzowały się podwyższoną zawartością chlorków, żelaza, lotnych fenoli oraz przekroczeniem dopuszczalnej wartości dla wskaźnika BZT<sub>5</sub>. Analiza chromatograficzna wykazała obecność w odciekach amin aromatycznych – *o*-tolidyny oraz 4,4-oksydianiliny. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że grzyb *N. pironii* charakteryzuje się zwiększoną zdolnością do wzrostu w obecności prób pochodzących ze składowiska odpadów

niebezpiecznych. Ponadto dowiedziono, iż *o*-tolidyna podczas hodowli ulega hydroksylacji i/lub przekształceniu do mniej toksycznej pochodnej – 3,3'-dihydroksybenzydyny. Grzyb *N. pironii* odznaczył się zdolnością do efektywnej dekoloryzacji barwników AO 7 i RR 120 również w obecności jonów metali.

W ostatnim etapie pracy, którego rezultaty zostały zawarte w pracy eksperymentalnej P4, oceniono możliwość eliminacji WWA przez *N. pironii* w obecności odcieków składowiskowych oraz zidentyfikowano mechanizmy zachodzące w grzybni na skutek adaptacji mikroorganizmu do zanieczyszczeń. Uzyskane wyniki wykazały, iż badany szczep jest w stanie eliminować trzy-, cztero- i pięciopierścieniowe WWA. Ponadto, wprowadzenie odcieków do hodowli przyspiesza tempo biodegradacji fenantrenu (Fen), benz[*a*]antracenu (B[*a*]A) i benz[*a*]pirenu (B[*a*]P). W wyniku ekspozycji na Fen w połączeniu z L1 zidentyfikowano zmiany w profilu fosfolipidowym. Pod wpływem Fen, dodawanego oddzielnie lub w połączeniu z L1, zwiększeniu w błonach *N. pironii* ulega zawartość fosfatydylocholiny (PC), podczas gdy zawartość fosfatydyloetanolaminy (PE) zmniejsza się. Różnice odnotowano również w zmianie zawartości kwasów tłuszczowych. W obecności Fen zmniejszyła się zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (PC 18:2/18:2; PE 18:2/18:2 i PE 18:2/18:1), podczas gdy zwiększeniu uległa zawartość kwasów nasyconych (PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1), co również potwierdza wzrost integralności błony komórkowej *N. pironii*. Co więcej, w grzybni *N. pironii* poddanej działaniu Fen początkowo odnotowano wzrost poziomu TBARS, wskazującego stopień peroksydacji lipidów, natomiast po 48 godz. hodowli współczynnik ten utrzymywał się podobnym poziomie we wszystkich badanych układach. Uzyskane rezultaty mogą wskazywać na adaptację grzyba *N. pironii* do czynnika stresowego i/lub zdolność do detoksykacji zanieczyszczenia po jego uprzedniej biotransformacji do mniej toksycznych produktów.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wskazują na potencjalne możliwości wykorzystania mikroskopowego grzyba strzępkowego *N. pironii* w procesach eliminacji różnorodnych zanieczyszczeń takich jak barwniki azowe, aminy aromatyczne czy WWA. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż drobnoustrój ten zdolny jest do przekształceń wyżej wymienionych związków nawet w obecności odcieków pobranych ze składowiska odpadów niebezpiecznych, charakteryzujących się zawartością wielu toksycznych substancji.

---

Aleksandra Góralczyk-Bukawska

## Summary

Because of their widespread use in many industries (dyeing, textile, cosmetics and paper), dyes are widely found in the environment. Due to the ineffectiveness of treatment processes, up to 50% of the substances used in dyeing can enter the environment. Methods based on the biological elimination of these pollutants are the most promising, attractive in terms of financial aspects, and also environmentally friendly solution to the problem. Scientists focus primarily on bioremediation, which uses the metabolic potential of microorganisms to clean the environment. Microorganisms isolated from contaminated areas are particularly popular, due to the adaptation mechanisms that allow them to survive in a polluted environment.

The presented doctoral thesis has been based on four earlier publications marked as P1-P4.

Its aim was the selection of a microorganism showing the ability to produce enzyme with laccase activity and eliminate textile industry dyes, aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as well as the indication of the mechanisms of this microorganism's adaptation to toxic pollutants generated by the textile industry. The characteristics of laccases and other enzymes classified as multicopper oxidases (MCOs) as well as their application had been described in review P1. The first stage of the work involved screening of fungi isolated from the area of the former "Boruta" Dye Industry Plant in Zgierz, and characterized by the ability to produce enzymes with lacase activity. The isolate designated as IM 6443 showed the highest enzyme production, both in solid and liquid cultures. Based on the genetic analysis, the indicated microorganism was identified as *Nectriella pironii*. The mixture of extracellular proteins isolated from the culture of *N. pironii* was purified using ion exchange chromatography and gel filtration. The purified protein was identified by mass spectrometry as laccase. The enzyme remained active in a wide pH range of 3.0-10.6 and showed the ability to effectively decolorize (at the level of 69-92%) textile industry dyes belonging to various chemical groups. These results were presented in publication P2.

The scope of the research described in publication P3 included the assessment of the ability of the tested fungus to eliminate aromatic amines and azo dyes. In addition, in these experiments samples of leachates (marked with symbols L1 and L2) collected from the hazardous waste landfill of the former "Boruta" Dye Industry Plant in Zgierz were used. They were characterized by an increased content of chlorides, iron and volatile phenols, and exceeded the allowed value for the BOD<sub>5</sub> index. Chromatographic analysis of leachates showed the presence of aromatic amines, *o*-tolidine, and 4,4-oxidianiline. It was shown that the filamentous fungus *N. pironii* is characterized by an increased ability to grow in the presence of samples from a hazardous waste landfill. Furthermore, it was proven that during cultivation *o*-tolidine underwent hydroxylation and/or conversion to a less toxic derivative,

3,3'-dihydroxybenzidine. *N. pironii* showed the ability to effectively decolorize the dyes Acid Orange 7 and Reactive Red 120 also in the presence of metal ions.

In the last stage of the work, the possibility of PAH elimination by *N. pironii* in the presence of landfill leachates was evaluated. Additionally, the mechanisms occurring in the mycelium as a result of the adaptation to contamination were identified. The obtained results showed that the tested strain was capable of eliminating three-, four-, and five-ring PAHs. In addition, the introduction of the leachate into the culture accelerated the biodegradation rate of phenanthrene (Fen), benz[a]anthracene (B[a]A), and benz[a]pyrene (B[a]P). Under the influence of Fen added alone or in combination with L1, the phosphatidylcholine (PC) content increased in the *N. pironii* membranes, while the phosphatidylethanolamine (PE) content decreased. In the presence of Fen, the content of unsaturated fatty acids (PC 18: 2/18: 2; PE 18: 2/18: 2 and PE 18: 2/18: 1) decreased, while the content of saturated acids increased (PC 16: 0/18: 2 and PC 16: 0/18: 1), which also confirmed the increase in the integrity of the *N. pironii* cell membrane. Furthermore, the mycelium of *N. pironii* treated with Fen initially showed an increase in TBARS, indicating the degree of lipid peroxidation, while after 48 h of cultivation this ratio remained at a similar level in all tested systems. The results obtained might indicate the adaptation of *N. pironii* to stress factors and/or its ability to detoxify the contaminants after biotransformation to less toxic intermediates.

The research carried out as part of the doctoral work indicates the possibilities of using the microscopic filamentous fungus *N. pironii* in the elimination of various pollutants such as azo dyes, aromatic amines and PAHs. It should be emphasized that this microorganism is capable of transforming the above-mentioned compounds even in the presence of leachates collected from a hazardous waste landfill, which contain many toxic substances.

Aleksandra Goralczyk-Bitarska