

Aleksandra Góralczyk¹, Anna Jasińska¹, Jerzy Długoński^{1*}

¹Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w kwietniu 2016 r.
Zaakceptowano w sierpniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Barwniki syntetyczne – budowa, podział i zastosowanie. 3. Barwniki a środowisko. 4. Metody usuwania barwników syntetycznych ze ścieków. 4.1. Metody chemiczne i fizyczne. 4.2. Metody biologiczne. 4.2.1. Biosorpcja. 4.2.2. Bioakumulacja. 4.2.3. Biodegradacja. 4.3. Sposoby zwiększania wydajności procesu mikrobiologicznej dekoloryzacji barwników. 4.4. Zaawansowane techniki analityczne wykorzystywane w badaniach nad dekoloryzacją barwników. 5. Podsumowanie

Microbial elimination of toxic industrial dyes

Abstract: Many industrial dyes are commonly present in wastewater and, due to its toxicity, mutagenicity and carcinogenicity, can cause serious pollution of the aquatic environment. So far, a number of strategies has been developed for dye elimination from wastewater, however, the most promising method seems to be bioremediation involving various microorganisms such as bacteria, fungi and microscopic algae. This article presents the latest research on microbial decolourisation of synthetic dye. Microorganisms capable for decolourisation, mechanisms involved in the bioremoval of dyes and analytical tools applied in process characterization have been summarised. In addition, this review discusses genetic manipulation of microorganisms and enzymes used for dye decolourisation.

1. Introduction. 2. Synthetic dyes – structure, classification and application. 3. Impact of dyes on the environment. 4. Methods for dye removal. 4.1. Chemical and physical methods. 4.2. Biological methods. 4.2.1. Biosorption. 4.2.2. Bioaccumulation. 4.2.3. Biodegradation. 4.3. Enhancement of the microbial decolourisation of dyes. 4.4. Advanced analytical tools in the decolourisation studies. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: barwniki, biodegradacja, dekoloryzacja, enzymy, mikroorganizmy

Key words: dyes, biodegradation, decolourisation, enzymes, microorganisms

1. Wprowadzenie

Do połowy XIX wieku związki używane przez człowieka do barwienia tkanin, skór czy przedmiotów codziennego użytku otrzymywano wyłącznie z naturalnych źródeł nieorganicznych i organicznych np. hematytu, sadzy, liści, kwiatów i krwi zwierząt. Dopiero w XIX wieku opracowano metody otrzymywania barwników syntetycznych na skalę przemysłową. Pionierem w tej dziedzinie był 18-letni student Wiliam Henry Perkin, który na drodze nieudanej próby syntezy chininy uzyskał niebieską substancję, opatentowaną później jako purpura anilinowa. Od tej pory do produkcji przemysłowej wprowadzono ok. 10 000 różnych syntetycznych środków barwiących, które całkowicie wyparły barwniki pochodzenia naturalnego [72].

2. Barwniki syntetyczne – budowa, podział i zastosowanie

Z technologicznego punktu widzenia barwnikami nazywamy związki chemiczne, które po zetknięciu się z materiałami takimi jak np. włókna naturalne i sztuczne, papier czy tworzywa syntetyczne, wiążą się z nimi

w sposób trwały nadając im odpowiednie zabarwienie. Pod względem chemicznym barwniki to związki, które posiadają zdolność do wybiórczego pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym, czyli dla fal o długości 400–700 nm. Pochłanianie promieniowania widzialnej części widma jest możliwe dzięki obecności w cząsteczce barwnika jonów, atomów lub ugrupowań chemicznych, w których pod wpływem światła następuje przejście elektronu ze stanu podstawowego w stan wzbudzony. Ugrupowanie takie nazywamy chromoforem (z łac. *chroma*-barwa, *foros*-niosący) i najczęściej występuje ono w postaci wiązania $-C=C-$, $-C=N-$, $-C=O-$, $-N=N-$, $-NO_2$ lub pierścienia chininowego. Drugą niezwykle istotną strukturą jest auksochrom – elektrodonorowe ugrupowanie atomów powodujące intensyfikację barwy. Do auksochromów należą m.in. ugrupowania $-NH_3$, $-COOH$, $-SO_3H$, $-OH$ [68].

Pod względem struktury chemicznej oraz rodzaju obecnego w cząsteczce barwnika chromoforu wyróżnia się ok. 20–30 klas barwników [75]. Najważniejsze spośród nich to barwniki azowe (mono-, di-, tri-, poliazowe), trójfenylometanowe, antrachinonowe, nitrowe, nitrozowe, ftaleinowe, indygooidowe i inne. Inna klasyfikacja opiera się na stosowanej metodzie barwienia

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki; Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: jdlugo@biol.uni.lodz.pl

oraz rodzaju sił odpowiadających za wiązanie barwnika z substratem. W proces ten zaangażowane mogą być różne typy oddziaływań chemicznych, do których najczęściej należą siły Van der Waalsa, wiązania wodorowe, jonowe lub kowalencyjne [19].

Barwniki najpowszechniej używane są w przemyśle tekstylnym, papierniczym, kosmetycznym, podczas produkcji farb, lakierów i tworzyw syntetycznych. Stosuje się je również do kontroli skuteczności procesów oczyszczania ścieków, w celu określenia powierzchni właściwej osadu czynnego i monitorowania stanu wód gruntowych. Wiele z tych związków znalazło zastosowanie w naukach biologicznych i medycynie, a te nietoksyczne używane są także w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [58].

3. Barwniki a środowisko

Barwniki syntetyczne dostając się do środowiska naturalnego w postaci ścieków przemysłowych stanowią poważne zagrożenie dla człowieka i innych organizmów żywych. Z uwagi na dużą skalę produkcji oraz nieskuteczność procesów technologicznych do środowiska może przedostawać nawet do 50% użytego barwnika, przy czym stężenie takiego związku w ścieku sięgać może nawet 300 mg/ml [41]. Obecność barwnika nadaje wodzie zabarwienie, a to skutkuje ograniczeniem fotosyntezy, prowadzi do eutrofizacji, zakłóca prawidłowy obieg pierwiastków biogenych oraz bezpośrednio lub pośrednio niekorzystnie oddziałuje na wszystkie poziomy łańcucha troficznego [31, 62]. Barwniki obniżają także efektywność oczyszczania ścieków metodami biologicznymi poprzez hamowanie wzrostu i aktywności enzymatycznej mikroorganizmów, a także ograniczenie bioróżnorodności drobnoustrojów wchodzących w skład kłaczek osadu czynnego i błony biologicznej złożeń zraszanych.

Toksyczne działanie barwników syntetycznych wynika z faktu, że wiele z tych związków to ksenobiotyki o złożonej strukturze, odznaczające się wysoką stabilnością oraz opornością na rozkład chemiczny, fotolityczny i biologiczny. Bardzo często ich obecność może wywołać u organizmów żywych efekt toksyczny, mutageny i/lub kancerogeny [78]. Przykładem jest zieleń malachitowa (barwnik z grupy trójfenylometanowych), dla której udowodnione szkodliwe działanie obejmuje m.in. uszkodzenie chromosomów, zaburzenie działania enzymów oddechowych oraz niekorzystny wpływ na funkcjonowanie wątroby, nerek czy układu rozrodczego [74]. Ponadto, jak wykazał Cha i wsp. [12] barwnik ten może również powodować powstawanie nowotworów.

Liczne doniesienia dotyczące szkodliwego działania barwników na środowisko naturalne doprowadziły do utworzenia stowarzyszenia ETAD (*Ecological and*

Toxicological Association of Dyes and Pigments Manufacturers) zajmującego się klasyfikacją barwników niebezpiecznych, sporządzaniem wytycznych ich użycia oraz popularyzacją wśród producentów danych o toksyczności barwników [61]. Spośród 4 000 barwników przetestowanych przez ETAD ponad 90% wykazywało wartość $LC_{50/24}$ większą niż 2×10^3 mg/kg masy ciała. Najbardziej toksyczne okazały się być związki z grupy zasadowych i dwuazowych barwników bezpośrednich.

4. Metody usuwania barwników syntetycznych ze ścieków

Duża różnorodność barwników stosowanych w przemyśle sprawia, że brak jest jednej, uniwersalnej metody usuwania tych związków ze ścieków i zanieczyszczonych akwenów wodnych [69, 79]. Wyróżnia się trzy podstawowe metody eliminacji barwników syntetycznych: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Jednak najczęściej stosowane są technologie będące kombinacją wymienionych metod, a ich wybór zależy od czynników takich jak rodzaj oraz stężenie barwnika, skład chemiczny ścieku, obecność dodatkowych zanieczyszczeń czy planowane koszty procesu [38, 61].

4.1. Metody chemiczne i fizyczne

Fizyczne metody eliminacji barwników ze ścieków przemysłowych opierają się na zjawiskach takich jak: filtracja membranowa, flokulacja, sedimentacja czy adsorpcja. Ze względu na wysoką wydajność eliminacji związków zaliczanych do różnych klas oraz niskie koszty procesu jedną z najbardziej powszechnych metod dekoloryzacji jest adsorpcja [66, 79]. Polega ona na wiązaniu rozpuszczalnych bądź zawieszonych zanieczyszczeń przez stałą matrycę i przebiega na skutek oddziaływań elektrostatycznych, wymiany jonowej, działania sił van der Waalsa lub reakcji kompleksowania. Efektywność procesu może być z powodzeniem zwiększana po optymalizacji warunków takich jak: temperatura, pH, czas kontaktu czy rodzaj adsorbentu. Najbardziej popularnym sorbentem jest węgiel aktywowany, jednak ze względu na wysoki koszt jego użycia i regeneracji trwają badania m.in. nad wykorzystaniem w adsorpcji odpadów takich jak: torf, wióry drzewne, popioły lotne, makuch rzepakowy, pestki i skórki owoców, biomasa bakteryjna i grzybowa [8, 32, 34, 61]. Pomimo swej wysokiej skuteczności, adsorpcja barwników syntetycznych ze ścieków przemysłowych, posiada również pewne ograniczenia. Najpoważniejszą wadą jest fakt, że adsorpcja prowadzi wyłącznie do skoncentrowania cząsteczek barwnika na powierzchni sorbentu bez zmiany ich struktury chemicznej, a tym samym obniżenia toksyczności [73].

Ze względu na prostotę użycia, spośród chemicznych metod eliminacji barwników syntetycznych ze ścieków, na uwagę zasługują głównie reakcje utleniania. Czynnikiem utleniającym najczęściej jest nadtlenek wodoru, który ze względu na swoje właściwości wymaga uprzedniej aktywacji (jako aktywator nadtlenu wodoru używany jest zazwyczaj odczynnik Fentona). Reakcja Fentona pozwala prowadzić równoległe procesy utleniania i koagulacji ścieków, co znacznie zwiększa efektywność oczyszczania. Jednak ze względu na powstawanie dużych ilości osadów, zawierających zateżone barwniki i żelazo w formie koloidu wodorotlenku żelazowego (III), użycie tej metody jest nieznaczne. Nadtlenek wodoru może być także aktywowany na drodze ozonowania. Poważnymi barierami ozonowania jest jednak krótki czas półtrwania ozonu w wodzie oraz koszty procesu. O wiele bardziej ekonomiczną i równie efektywną metodę eliminacji barwników (głównie azowych), stanowi utlenianie z użyciem chloru gazowego lub podchlorynu sodu, jednak uwalnianie toksycznych i kancerogennych związków sprawia, że metoda ta stosowana jest coraz rzadziej. Największą przewagą metod chemicznych nad fizycznymi jest fakt, że cząsteczki barwników przekształcane są do nietoksycznych pochodnych. Jednak ze względu na wysokie koszty procesu, ich użycie na skalę przemysłową jest mało opłacalne [61].

4.2. Biologiczne metody usuwania barwników

Wysokie koszty, niska efektywność procesu, powstawania toksycznych produktów ubocznych sprawiły, że podjęto próby usuwania barwników z wykorzystaniem procesów zachodzących przy udziale różnych grup organizmów żywych [9, 21]. Jedną z najbardziej obiecujących i intensywnie rozwijanych technologii jest bioremediacja wykorzystująca do oczyszczania środowiska głównie potencjał metaboliczny drobnoustro-

jów. Metody mikrobiologicznej eliminacji barwników opierają się na trzech głównych procesach: biosorpcji, bioakumulacji i biodegradacji lub kombinacji tych mechanizmów (rys. 1). Biosorpcja jest niezależnym do metabolizmu procesem wiązania zanieczyszczeń przez martwe lub żywe komórki mikroorganizmów. Bioakumulacja polega na pobieraniu polutanta do wnętrza żywej komórki i jego akumulacji w obrębie cytoplazmy. Biodegradacja z kolei obejmuje przekształcanie polutanta z wykorzystaniem zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowych enzymów [19].

4.2.1. Biosorpcja

Biosorpcja jest selektywnym, wydajnym i uniwersalnym procesem, w którym cząsteczki barwników przyłączane są do powierzchni ściany komórkowej w sposób bierny, niezależny od metabolizmu. Za wiązanie cząsteczek barwników są odpowiedzialne grupy aminowe, tiolowe, karboksylowe i fosforowe obecne na powierzchni komórek bakteryjnych i grzybowych. Biosorpcja nie wymaga wysokich nakładów inwestycyjnych, bo materiał biologiczny wiążący barwniki syntetyczne jest często tani i może pochodzić z przemysłowej hodowli biomasy lub stanowić produkt odpadowy lub uboczny. Związane z sorbentem barwniki mogą być ponadto odzyskane na drodze desorpcji, a biosorbent po uprzedniej regeneracji wykorzystany w kolejnym cyklu usuwania zanieczyszczeń [38, 82]. Do biosorpcji różnych grup barwników wykorzystywane są liczne gatunki zarówno bakterii, grzybów jak i mikroskopowych glonów.

Jasińska i wsp. [33] wykorzystali martwą biomasę grzyba *Penicillium pinophilum* IM 6480 do wiązania zieleni malachitowej z roztworów wodnych. Już w 30 minucie procesu udało się uzyskać niemal całkowitą eliminację barwnika. Co więcej biomasa grzybowa efektywnie wiązała barwnik także z roztworów zawierających inne barwniki lub metale ciężkie.

| Biosorpcja | Biodegradacja | Bioakumulacja |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Proces pasywny • Żywa lub martwa biomasa • Barwnik związany z powierzchnią komórki • Proces odwracalny • Substancje odżywcze nie są wymagane • Metoda szybka • Metoda niezależna od metabolizmu | <ul style="list-style-type: none"> • Proces aktywny • Żywa biomasa • Barwnik degradowany przez enzymy • Proces nieodwracalny • Substancje odżywcze są wymagane • Metoda wolna • Metoda zależna od metabolizmu | <ul style="list-style-type: none"> • Proces aktywny • Żywa biomasa • Barwnik związany z powierzchnią komórki • Proces częściowo odwracalny • Substancje odżywcze są wymagane • Metoda wolna • Metoda zależna od metabolizmu |

Rys. 1. Porównanie mechanizmów mikrobiologicznej eliminacji barwników

Tabela I
Przykłady drożdży zdolnych do bioakumulacji barwników

| Mikroorganizm | Barwnik (wg Colour Index) | Dekoloryzacja [%] | Źródło |
|---------------------------------|---|-------------------|--------|
| <i>Candida utilis</i> | Remazol Turquoise Blue G 50 mg ^l ⁻¹ | 59,2 | [28] |
| <i>Pichia fermentans</i> | Basic Violet 3 10 mg ^l ⁻¹ | 69,8 | [17] |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | Reactive Red 11 20 mg ^l ⁻¹ | 72,5 | [65] |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | Remazol Blue 50 mg ^l ⁻¹ | 96,0 | [23] |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Remazol Black B 400 mg ^l ⁻¹ | 62,0 | [2] |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Basic Yellow 2 40 mg ^l ⁻¹ | 93,0 | [40] |

Należy jednak pamiętać, że biosorpcja barwników nie rozwiązuje problemu obecności tych zanieczyszczeń w środowisku, ponieważ toksyczne związki nie są rozkładane, a tylko wiązane przy użyciu biosorbentu. Dlatego zastosowanie żywej biomasy, która wiąże barwniki wewnątrz komórek na drodze akumulacji, wydaje się być metodą korzystniejszą, niż biosorpcja. W przypadku żywej biomasy biosorpcja stanowi z reguły początkowy etap eliminacji barwnika. Mou i wsp. [50] zaobserwowali, że żywa biomasa *Myrothecium verrucaria* w ciągu pierwszych 10 godzin reakcji wiąże ponad 50% barwnika, który następnie ulega stopniowej biodegradacji. Przysła i wsp. [55] wykazali, że eliminacja błękitu Evansa i zieleni brylantowej przebiega szybciej i z większą wydajnością w układach zawierających żywą biomasę grzybową lub bakteryjną. Co więcej obserwuje się wówczas istotny spadek toksyczności barwnika.

Naturalne właściwości sorpcyjne biomasy grzybowej lub bakteryjnej mogą być zwiększone poprzez modyfikacje chemiczne i/lub fizyczne ich powierzchni. Na przykład w badaniach z wykorzystaniem *Pseudomonas* sp. DY1 wykazano, że poddana obróbce termicznej biomasa wiąże barwnik azowy Acid Black 172 z wydajnością 150 razy większą, niż żywe, nie poddawane obróbce termicznej komórki [20]. Oprócz obróbki termicznej biosorbent można modyfikować poddając go liofilizacji, ucieraniu, a także traktując roztworami kwasów, zasad lub rozpuszczalników organicznych [4, 25].

4.2.2. Bioakumulacja

Bioakumulacja polega na wiązaniu barwnika do ściany komórkowej, a następnie jego akumulacji obrębie cytoplazmy [16, 84]. Jest to bardzo złożony, zależny od wielu czynników (takich jak skład podłoża, pH, temperatura i obecność innych zanieczyszczeń) proces [40]. W przeciwieństwie do biosorpcji, bioakumulacja nie wymaga oddzielania biomasy od podłoża wzrostowego, jej suszenia, przetwarzania i przechowywania. Jednak proces bioakumulacji wiąże się z pewnymi ograniczeniami np. konieczność zapewnienia odpowiedniego źródła węgla i azotu, hamowanie wzrostu drobnoustrojów w obecności wysokich stężeń barwnika i innych

toksycznych zanieczyszczeń zawartych w ściekach [84]. Najpowszechniej stosowaną do bioakumulacji toksycznych barwników grupą drobnoustrojów są drożdże. Ich przydatność wykazano m.in. w eliminacji barwników azowych, reaktywnych, czy trójfenylometanowych (Tab. I).

4.2.3. Biodegradacja

Biodegradacja to zależny od metabolizmu proces rozkładu cząsteczki barwnika do związków prostszych zachodzący przy udziale zewnątrz- i/lub wewnątrzkomórkowych enzymów. Proces ten prowadzi nie tylko do dekoloryzacji roztworów barwnych, ale także do przekształcenia barwników do związków prostszych, które zazwyczaj charakteryzują się niższą toksycznością, niż związki wyjściowe. W niektórych przypadkach, biodegradacja prowadzi do mineralizacji barwników czyli ich rozkładu do dwutlenku węgla, wody i/lub innych produktów nieorganicznych [57].

Najlepiej poznaną grupę drobnoustrojów zdolnych do dekoloryzacji barwników stanowią tzw. grzyby białej zgnilizny drewna m.in. szczepy z gatunku *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Funalia trogii*, *Phlebia tremellosa*, *Irpex lacteus*, *Dichomitus squalens* i *Pleurotus ostreatus* [11, 22, 26, 51, 52]. Jednak efektywną eliminację barwników opisano również u grzybów należących do *Ascomycota* i *Deuteromycota* takich jak *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp. [38, 86]. Ze względu na dynamiczny wzrost i łatwą adaptację do zmieniających się warunków środowiska, dekoloryzacja barwników z wykorzystaniem grzybów mikroskopowych jest procesem szybkim i wydajnym. Wiele spośród badanych szczepów to izolaty pochodzące ze środowisk skażonych [1, 47, 85].

W bioremediacji środowisk skażonych toksycznymi barwnikami wykorzystywane są także szczepy bakterii zdolne do transformacji i mineralizacji tych związków. Wysoką wydajność eliminacji barwników zaobserwowano w hodowlach bakterii z rodzaju *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Kurthia* sp., *Shewanella* sp., *Desulfovibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Alcaligenes* sp. Procesy odbarwiania ścieków przemysłowych prowadzone są także

Tabela II
Przykłady enzymów odpowiadających za eliminację barwników przez bakterie i grzyby

| Gatunek | Barwnik (wg Colour Index) | Dekoloryzacja [%] | Enzymy zaangażowane w degradację | Źródło |
|-----------------------------------|--|-------------------|------------------------------------|--------|
| <i>Alishewanella</i> sp. | Reactive blue 59 2,5 g ^l ⁻¹ | 95,0 | Cyt P-450, AR, reduktaza NADH-DCIP | [43] |
| <i>Bacillus</i> sp. | Metanil Yellow 200 mg ^l ⁻¹ | 100,0 | AR | [5] |
| <i>Brevibacillus laterosporus</i> | Remazol red 50 mg ^l ⁻¹ | 100,0 | reduktaza NADH-DCIP, VAO, AR | [45] |
| <i>Enterobacter</i> sp. | Reactive red 195 30 mg ^l ⁻¹ | 91,0 | AR | [36] |
| <i>Fusarium solani</i> | Crystal violet 2,5 mg ^l ⁻¹ | 98,0 | Lac | [1] |
| <i>Irpex lacteus</i> | Reactive black 5 200 mg ^l ⁻¹ | 98,4 | MnP | [52] |
| <i>Kocuria rosea</i> | Malachite green 50 mg ^l ⁻¹ | 100,0 | reduktaza ZM, reduktaza DCIP | [53] |
| <i>Lentinus polychrous</i> | Indigo carmine 20 mg ^l ⁻¹ | 97,6 | Lac | [67] |
| <i>Myrothecium roridum</i> | Malachite green 10 mg ^l ⁻¹ | 97,0 | Lac | [35] |
| <i>Penicillium ochrochloron</i> | Cotton blue 50 mg ^l ⁻¹ | 93,0 | LiP | [70] |
| <i>Proteus vulgaris</i> | Scarlet R 150 mg ^l ⁻¹ | 100,0 | reduktaza NADH-DCIP | [64] |
| <i>Trametes</i> sp. | Congo red 100 mg ^l ⁻¹ | 100,0 | Lac | [83] |

AR – azoreduktazy; Cyt P-450 – cytochrom P-450; Lac – lakaza; LiP – peroksydaza ligninowa; MnP – peroksydaza manganowa; reduktaza ZM – reduktaza zieleni malachitowej; VAO – oksydaza alkoholu weratrylowego

przy użyciu niektórych mieszanych kultur bakteryjnych [7, 13, 15, 59].

Zarówno u grzybów jak i bakterii głównym mechanizmem tych grzybów odpowiadającym za transformacje barwników są reakcje katalizowane przez enzymy utleniająco-redukujące, z których najszerzej opisywane są lakazy, peroksydazy i reduktazy [69].

Lakazy to enzymy katalizujące utlenianie szerokiego spektrum związków organicznych i nieorganicznych, któremu towarzyszy redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. Podczas każdego cyklu katalitycznego lakazy dochodzi do redukcji 1 cząsteczki tlenu do 2 cząsteczek wody, czemu towarzyszy utlenienie 4 cząsteczek substratu do 4 rodników substratów [18, 44]. W procesach usuwania barwników syntetycznych zastosowanie znalazły głównie mechanizmy, w których lakaza współdziała z prostymi mediatorami chemicznymi takimi jak 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), syryngaldazylna czy wanilina [6, 60]. Najbardziej podatne na przekształcanie przy udziale lakaz są barwniki antrachinonowe i trójfenylometanowe, a ich odbarwienie jest proporcjonalne do aktywności enzymu [71].

Drobnoustrojowe peroksydazy, takie jak peroksydaza ligninowa (LiP) czy peroksydaza manganozależna (MnP), charakteryzują się niską specyficznością, co umożliwia tym enzymom utlenianie całego spektrum ksenobiotyków, w tym toksycznych barwników syntetycznych [54, 70]. LiP katalizuje jednoelektronowe utlenianie związków fenolowych i niefenolowych, podczas gdy MnP przekształca Mn²⁺ do Mn³⁺, który zdolny jest do utleniania związków stanowiących pochodne fenolu [30]. Wykazano, że dekoloryzację barwników przy udziale peroksydaz wzmacnia obecność alkoholu weratrylowego jako mediatora reakcji. W reakcji takiej alko-

hol ulega utlenieniu przez pojedynczy elektron tworząc kation, który następnie utlenia związek barwny [3].

Barwniki syntetyczne mogą być także dekoloryzowane na drodze zależnych od obecności NADH/NADPH reakcji katalizowanych przez enzymy z grupy reduktaz [10, 32, 63]. Najszerzej zbadano dotąd związane z błoną komórkową azoreduktazy katalizujące rozszczepianie wiązania azowego [42]. Enzymy te w pierwszym etapie redukują substrat azowy do hydrazyny, która następnie zredukowana jest do 2 amin. Wrażliwe na obecność tlenu azoreduktazy po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w hodowlach *Clostridium* i *Eubacterium* [56]. Drugą ważną grupę reduktaz dekoloryzujących barwniki stanowią reduktazy trójfenylometanowe. Produkcję tych enzymów stwierdzono u *Citrobacter* sp. KCTC 18061P, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074, *Exiguobacterium* sp. MG2 i *Mucor mucedo* [32, 37, 49, 80]. Zestawienie enzymów biorących udział w dekoloryzacji barwników przedstawiono w Tabeli II.

Dane literaturowe wskazują, że w procesie dekoloryzacji barwników mogą brać udział nieenzymatyczne, niskocząsteczkowe związki np. rodniki hydroksylowe, wytwarzane przez grzyby białej i brązowej zgnilizny drewna na drodze reakcji Fentona [26, 27, 39, 48, 81].

4.3. Sposoby zwiększania wydajności procesu mikrobiologicznej dekoloryzacji barwników

Zdolność drobnoustrojów do rozkładu barwników syntetycznych wynika przede wszystkim z uzdolnień metabolicznych. Jednak dobierając odpowiednio warunki procesu można wielokrotnie podwyższyć wydajność dekoloryzacji. Duży wpływ na efektywność procesu mają czynniki takie jak: struktura i stężenie

barwnika, pH środowiska, temperatura, dostępność składników odżywczych i tlenu czy obecność innych zanieczyszczeń, w tym jonów metali ciężkich. Spośród dostępnych źródeł węgla glukoza najbardziej sprzyja dekoloryzacji barwników. Jednak ze względu na jej koszt coraz częściej wykorzystuje się tańsze źródła węgla np. skrobię czy melasę. Wykazano, że biodegradacji barwników sprzyja dodatek do podłoża wzrostowego organicznych źródeł azotu oraz tzw. induktorów chemicznych wzmagających aktywność enzymów ligninolitycznych [18].

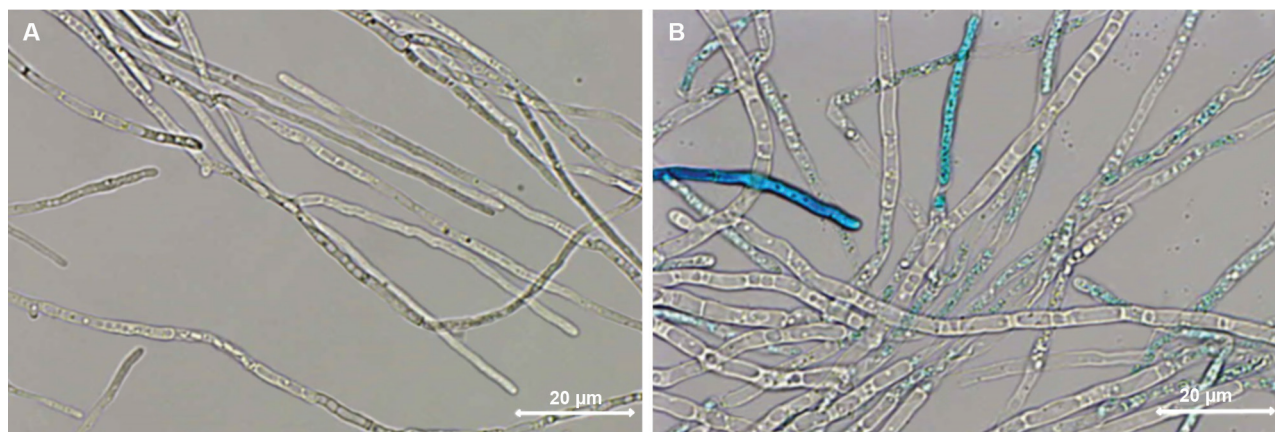
Bardzo często również w celu uzyskania efektywnej eliminacji barwników wybiera się te mikroorganizmy, które narażone były przez długi czas na działanie toksycznych zanieczyszczeń i dzięki temu wykształciły mechanizmy unieszkodliwiające te związki. Proces ten nazywany jest aklimatyzacją i najczęściej polega na nadekspresji genów kodujących enzymy umożliwiające biodegradację ksenobiotyków obecnych w środowisku wzrostu drobnoustroju. Tom-Sinoy i wsp. [77] z gleby pochodzącej z terenu zakładu barwiarskiego wyizolowali dwa szczepy *Pseudomonas* sp., które okazały się być niezwykle efektywne w eliminacji wielu barwników np. zieleni brylantowej, fioleto krystalicznego, fuksyny oraz zieleni malachitowej. Podobnie Thorat i Sayyad [76] w warunkach laboratoryjnych przeprowadzili aklimatyzację próbek gleby w rosnących stężeniach fioleto krystalicznego, co pozwoliło na izolację kilku szczepów bakteryjnych skuteczny w degradacji tego barwnika. Jednak rozwój genomiki i proteomiki przyczynił się do opracowania technik umożliwiających przyspieszenie tych naturalnie zachodzących procesów. Badania prowadzone w tym obszarze polegają głównie na zmianie, z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej, ekspresji, swoistości i powinowactwa enzymów bakteryjnych i grzybowych biorących udział w dekoloryzacji. Lu i wsp. [46] uzyskali ekspresję lakazy z *Pycnoporus sanguineus* w komórkach *Pichia pastoris*

i stwierdzili, że oczyszczony enzym z wysoką wydajnością dekoloryzuje fioleto krystaliczny. Jang i wsp. [32] po raz pierwszy przeprowadzili klonowanie genu reduktazy trójfenylometanowej pochodzącej z *Citrobacter* sp. Podobnie Chengalroyen i Dabbs [14] zidentyfikowali geny zaangażowane w biodegradację barwników trójfenylometanowych, które po wklonowaniu do komórek *Mycobacterium* sp. i *Rhodococcus* sp. nadawały im zdolność do odbarwiania fioleto krystalicznego.

4.4. Zaawansowane techniki analityczne wykorzystywane w badaniach nad dekoloryzacją barwników

Monitorowanie procesu dekoloryzacji barwnika polega na ilościowej ocenie ubytku substratu w hodowli oraz na jakościowej analizie metabolitów powstających podczas tego procesu. Stężenie barwnika może być oceniane poprzez pomiar całkowitego węgla organicznego (CWO), chemicznego zapotrzebowania na tlen (CHZT) lub pomiar absorpcji roztworu przy długości fali dla której barwnik wykazuje maksymalną absorpcję światła. Jednak metody te mogą być obciążone pewnym błędem np. z uwagi na obecność w roztworze dodatkowych zanieczyszczeń, niską selektywność itp. Dlatego obecnie w badaniach nad dekoloryzacją stosuje się bardziej specyficzne i zaawansowane techniki analityczne, które można podzielić na dwie kategorie: techniki separacyjne oraz spektroskopowe [24].

Techniki separacji, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz chromatografia gazowa i cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (GCMS, LCMS), a także metody spektroskopowe np. spektroskopia NMR lub spektroskopia fourierowska, pozwalają monitorować intermedyaty powstające w trakcie dekoloryzacji, a także identyfikować końcowe produkty biodegradacji. Do oceny ubytku barwnika najczęściej używa się spektroskopii UV-VIS [29].



Rys. 2. Akumulacja zieleni malachitowej wewnątrz komórek *Penicillium pinophilum* [35, zmodyfikowany]
A – hodowla prowadzona bez dodatku barwnika; B – hodowla w obecności zieleni malachitowej



Rys. 3. Testy wykorzystywane do oceny toksyczności barwników i ich pochodnych [72, zmodyfikowany]

W analizie procesów dekoloryzacji zachodzących przy udziale drobnoustrojów bardzo często oceniany jest również udział enzymów. Do tego celu wykorzystuje się liczne testy kolorymetryczne, w których specyficzne substraty są utleniane lub redukowane do barwnych pochodnych przez interesujące nas enzymy. Izolacja, oczyszczanie i identyfikacja białek biorących udział w dekoloryzacji barwników możliwa jest dzięki zaawansowanym technikom elektroforetycznym (1-D i 2-D PAGE), spektrometrycznym (MALDI – TOF, ESI) i bioinformatycznym (wykorzystującym oprogramowania do analizy peptydów i białek takie jak ProFound, MASCOT czy MS-Fit).

Przy ocenie udziału biosorpcji/bioakumulacji w procesie eliminacji barwnika nieodzowne wydają się być obserwacje mikroskopowe komórek. Dla przykładu na rysunku 2 przedstawiono obraz grzybni *P. pinophilum* hodowanej bez dodatku (rys. 2A) oraz w obecności (rys. 2B) zieleni malachitowej uzyskany przy pomocy mikroskopii konfokalnej i obrazujący wewnątrzkomórkową akumulację barwnika [35].

Końcowym etapem badań nad dekoloryzacją powinna być ocena toksyczności powstających podczas procesu produktów. W tym celu stosuje się liczne testy toksyczności wykorzystujące jako organizmy wskaźnikowe najczęściej bakterie, skorupiaki, rośliny, a także linie komórkowe (rys. 3).

5. Podsumowanie

Mikrobiologiczna eliminacja toksycznych barwników syntetycznych stanowi bardzo obiecujący sposób usuwania tych związków ze ścieków. Badania wskazują, że wiele gatunków bakterii, grzybów i mikroskopowych glonów zdolnych jest do usuwania tych substancji ze środowiska wzrostu. Także zastosowanie biosorpcji przy udziale odpadowej biomasy bakterii i grzybów stanowi dobrą alternatywę np. do adsorpcji na węglu aktywowanym. Szczególnie interesujące wydaje się być użycie preparatów opartych na drobnoustrojowych enzymach np. lakazach, peroksydazach, reduktazach. Aby to było możliwe konieczne jest poszukiwanie nowych szczepów efektywnie eliminujących barwniki ze środowiska wzro-

stu, wnikliwa ocena mechanizmów odpowiadających za dekoloryzację połączona z oceną toksyczności powstających produktów oraz izolacja i analiza enzymów biorących udział w procesie odbarwiania.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie umowy nr UMO 2013/11/D/NZ9/02776.

Piśmiennictwo

1. Abedin R.M.A.: Decolorization and biodegradation of Crystal Violet and Malachite Green by *Fusarium solani* (martius) saccardo. A comparative study on biosorption of dyes by the dead fungal biomass. *American-Eurasian J. Bot.* **1**, 17–31 (2008)
2. Aksu Z.: Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Biochem.* **38**, 1437–1444 (2003)
3. Alam M.Z., Mansor M.F., Jalal K.C.A.: Optimization of lignin peroxidase production and stability by *Phanerochaete chrysosporium* using sewage-treatment-plant sludge as substrate in a stirred-tank bioreactor. *J. Ind. Microbiol.* **36**, 757–764 (2009)
4. Ambrósio S.T., Vilar Júnior J.C., da Silva C.A.A., Okada K., Nascimento A.E., Longo R.L., Campos-Takaki G.M.: A biosorption isotherm model for the removal of reactive azo dyes by inactivated mycelia of *Cunninghamella elegant* UCP542. *Molecules*, **17**, 452–462 (2012)
5. Anjaneya O., Souche S.Y., Santoshkumar M., Karegoudar T.B.: Decolorization of sulfonated azo dye Metanil Yellow by newly isolated bacterial strains: *Bacillus* sp. strain AK1 and *Lysinibacillus* sp. strain AK2. *J. Hazard. Mater.* **190**, 351–358 (2011)
6. Arora D.S., Sharma R.K.: Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl. Biochem. Biotech.* **160**, 1760–1788 (2010)
7. Ayed L., Chaieb K., Cheref A., Bakhrouf A.: Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by *Staphylococcus epidermidis*. *Desalination*, **260**, 137–146 (2010)
8. Bello O.S., Ahmad M.A., Siang T.T.: Utilization of cocoa pod husk for the removal of remazol black b reactive dye from aqueous solutions: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Trends Appl. Sci. Res.* **6**, 794–812 (2011)
9. Bhatnagar A., Sillanpaa M.: Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment – A review. *Chem. Eng. J.* **157**, 277–296 (2010)
10. Bhosale S., Saratale G., Govindwar S.: Biotransformation enzymes in *Cunninghamella blakesleeana* (NCIM-687). *J. Basic. Microb.* **46**, 444–448 (2006)
11. Casas N., Parella T., Vicent T., Caminal G., Sarra M.: Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere*, **75**, 1344–1349 (2009)

12. Cha Ch.-J., Doerge D.R., Cerniglia C.E.: Biotransformation of Malachite Green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 4358–4360 (2001)
13. Chen Ch.-Ch., Chen Ch.-Y., Cheng Ch.-Y., Teng P.-Y., Chung Y.-Ch.: Decolorization characteristics and mechanism of Victoria Blue R removal by *Acinetobacter calcoaceticus* YC210. *J. Hazard. Mater.* **196**, 166–172 (2011)
14. Chengalroyen M.D., Dabbs E.R.: Identification of genetic elements from *A. orientalis* contributing to triphenylmethane decolorization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci* **2**, 41–56 (2013)
15. Cheriaa J., Khaireddine M., Rouabhia M., Bakhrouf A.: Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *Sci. World J.* DOI: 10.1100/2012/512454 (2012)
16. Chojnacka K.: Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environ. Int.* **36**, 299–307 (2010)
17. Das D., Charumathi D., Das N.: Combined effects of sugarcane bagasse extract and synthetic dyes on the growth and bioaccumulation properties of *Pichia fermentans* MTCC 189. *J. Hazard. Mater.* **183**, 497–505 (2010)
18. Desai S.S., Nityanand C.: Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J. Biotechnol.* **3**, 98–124 (2011)
19. Dos Santos A.B., Cervantes F.J., van Lier J.B.: Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technol.* **98**, 2369–2385 (2007)
20. Du L.-N., Wang S., Li G., Wang B., Jia X.-M., Zhao Y.-H., Chen Y.-L.: Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. *Ecotoxicology*, **20**, 438–446 (2011)
21. Dubey A., Mishra N., Deb A.: Isolation of dye degrading microorganism. *E.J. Environ. Agricul. Food Chem.* **9**, 1534–1539 (2010)
22. Eichlerova I., Homolka L., Nerud F.: Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technol.* **97**, 2153–2159 (2006)
23. Ertugrul S., San N.O., Donmez G.: Treatment of dye (Remazol Blue) and heavy metals using yeast cells with the purpose of managing polluted textile wastewaters. *Ecol. Eng.* **35**, 128–134 (2009)
24. Fernández C., Larrechi M.S., Callao M.P.: An analytical overview of processes for removing organic dyes from wastewater effluents. *Trend. Anal. Chem.* **10**, 1202–1211 (2010)
25. Fu Y., Viraraghavan T.: Fungal decolorization of dye wastewaters. A review. *Bioresource Technol.* **79**, 251–262 (2001)
26. Gomaa O.M., Linz J.E., Reddy C.A.: Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2349–2356 (2008)
27. Gomaa O.M.: Ethanol induced response in *Phanerochaete chrysosporium* and its role in the decolorization of triarylmethane dye. *Ann. Microbiol.* **62**, 1403–1409 (2012)
28. Gonen F., Aksu Z.: Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: Use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. *J. Hazard. Mater.* **172**, 1512–1519 (2009)
29. Gupta V.K., Khamparia S., Tyagi I., Jaspal D., Malviya A.: Decolorization of mixture of dyes: A critical review. *Glob. J. Env. Sci. Manag.* **1**, 71–94 (2015)
30. Husain Q.: Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **26**, 201–221 (2006)
31. Imran M., Crowley D.E., Khalid A., Hussain S., Mumtaz M.W., Arshad M.: Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **14**, 73–92 (2015)
32. Jang M.S., Lee Y.M., Kim C.H., Lee J.H., Kang D.W., Kim S.-J., Lee Y.-Ch.: Triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P: purification, characterization, gene cloning and overexpression of a functional protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 7955–7960 (2005)
33. Jasińska A., Bernat P., Paraszkievicz K.: Malachite green removal from aqueous solution using the system rapeseed press cake and fungus *Myrothecium roridum*. *Desalin. Water Treat.* **1–9**, (2013)
34. Jasińska A., Paraszkievicz K.: Charakterystyka procesu sorpcji zieleni malachitowej oraz jonów kadmu, cynku i ołowiu przez odpadowy makuch rzepakowy. *Ochr. Śr. Zasobów Nat.* **48**, 112–122 (2011)
35. Jasińska A., Różalska S., Bernat P., Paraszkievicz K., Długoński J.: Malachite green decolorization by non-basidiomycete filamentous fungi of *Penicillium pinophilum* and *Myrothecium roridum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **73**, 33–40 (2012)
36. Jirasripongpun K., Nasanit R., Niruntasook J., Chotikasatian B.: Decolorization and degradation of C. I. Reactive Red 195 by *Enterobacter* sp. Thammasat. *Int. J. Sci. Technol.* **12**, 6–11 (2007)
37. Kalyani D.C., Telke A.A., Surwase S.N., Jadhav S.B., Lee J.-K., Jadhav J.P.: Effectual decolorization and detoxification of triphenylmethane dye Malachite Green (MG) by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074 and its enzyme system. *Clean Techn. Environ. Policy*, **14**, 989–1001 (2012)
38. Kandelbauer A., Guebitz G.M.: Bioremediation for the decolorization of textile dyes – a review (w) Environmental Chemistry, red. E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, D. Robert, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2004, s. 269–288
39. Karimi A., Aghbolaghy M., Khataee A., Bargh S.S.: Use of enzymatic bio-Fenton as a new approach in decolorization of Malachite Green. *Sci. World J.*, 691569, 1–5 (2012)
40. Kelewou H., Merzouki M., Hassani A.L.: Biosorption of textile dyes Basic Yellow 2 (BY2) and Basic Green 4 (BG4) by the live yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mater. Environ.* **5**, 633–640 (2014)
41. Khan R., Bhawana P., Fulekar M.H.: Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **12**, 75–97 (2013)
42. Kodam K.M., Kolekar Y.M.: Bacterial Degradation of Textile Dyes (w) Microbial Degradation of Synthetic dyes in Waste waters, Environmental Science and Engineering, red. S.N. Singh, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, s. 243–266
43. Kolekar Y.M., Kodam K.M.: Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. *Appl. Microbiol. Biot.* **95**, 521–529 (2012)
44. Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M.: Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications (w) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, red. A. Mendez-Vilas, Formatex, Badajoz, 2007, s. 233–245
45. Kurade M.B., Waghmode T.R., Tamboli D.P., Govindwar S.P.: Differential catalytic action of *Brevibacillus laterosporus* on two dissimilar azo dyes Remazol red and Rubine GFL. *J. Basic Microb.* **53**, 136–146 (2013)
46. Lu L., Zhao M., Liang S.-C., Zhao L.-Y., Li D.-B., Zhang B.-B.: Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1149–1156 (2009)
47. Mahmood S., Arshad A., Khalid A., Nazli Z.H., Mahmood T.: Isolation and screening of azodye decolorizing bacterial isolates from dye contaminated textile wastewater. *Soil Environ.* **30**, 7–12 (2011)
48. Moldes D., Fernández-Fernández M., Ángeles Sanromán M.: Role of laccase and low molecular weight metabolites from *Trametes versicolor* in dye decolorization. *Sci. World J.*, 398725, 1–9 (2012)

49. Moturi B., Singara Charya M.A.: Decolourisation of Crystal Violet and Malachite Green by fungi. *Sci. World J.* **4**, 28–33 (2009)
50. Mou D.G., Lim K.K., Shen H.P.: Microbial agents for decolorization of dye wastewater. *Biotechnol. Adv.* **9**, 613–622 (1991)
51. Novotný Č., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Šašek V., Molitoris H.P.: Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* **89**, 113–122 (2001)
52. Novotný Č., Svobodová K., Kasinath A., Erbanová P.: Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **54**, 215–223 (2004)
53. Parshetti G., Kalme S., Saratale G., Govindwar S.: Biodegradation of Malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chim. Slov.* **53**, 492–498 (2006)
54. Parshetti G., Saratale G., Telke A., Govindwar S.: Biodegradation of hazardous triphenylmethane dye Methyl Violet by *Rhizobium radiobacter* (MTCC 8161). *J. Basic Microb.* **49**, 36–42 (2009)
55. Przysłaś W., Zabłocka-Godłewska E., Grabińska-Sota E.: Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. *Water Air Soil Poll.* **223**, 1581–1592 (2012)
56. Rafii F., Franklin W., Cerniglia C.E.: Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2146–2151 (1990)
57. Rai H.S., Bhattacharyya M.S., Singh J., Bansal T.K., Vats P., Banerjee U.C.: Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **35**, 219–238 (2005)
58. Rauf M.A., Ashraf S.S.: Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chem. Eng. J.* **209**, 520–530 (2012)
59. Ren S., Guo J., Zeng G., Sun G.: Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Microbiol. Biot.* **72**, 1316–1321 (2006)
60. Riva S.: Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**, 219–226 (2006)
61. Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P.: Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* **77**, 247–255 (2001)
62. Rodríguez Couto S.R.: Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* **27**, 227–235 (2009)
63. Saratale G.D., Bhosale S.K., Kalme S.D., Govindwar S.P.: Biodegradation of Kerosene in *Aspergillus ochraceus* (NCIM 1146). *J. Basic Microb.* **47**, 400–405 (2007)
64. Saratale R.G., Saratale G.D., Kalyani D.C., Chang J.S., Govindwar S.P.: Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. *Bioresour. Technol.* **100**, 2493–2500 (2009)
65. Saravanan P., Sivakumar P., Suganya T., Nagendra N.: Bioaccumulation of reactive Red 11 using live yeast *Rhodotorula glutinis*. *Indian J. Environ. Prot.* **32**, 249–255 (2012)
66. Sarayu K., Sandhya S.: Current technologies for biological treatment of textile wastewater – a review. *Appl. Biochem. Biotech.* **167**, 645–661 (2012)
67. Sarnthima R., Khammuang S., Svasti J.: Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lev. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnol. Bioproc Eng.* **14**, 513–522 (2009)
68. Sathiyar M.P., Periyar S., Sasikalaveni A., Murugesan K., Kalichelvan P.T.: Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 424–429 (2007)
69. Shah M.P. Microbe-Mediated Degradation of Synthetic Dyes in Wastewater. (w) Microbial Degradation of Synthetic dyes in Waste waters, Environmental Science and Engineering, red. S.N. Singh, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, s. 205–241
70. Shedbalkar U., Dhanve R., Jadhav J.: Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *J. Hazard. Mater.* **157**, 472–479 (2008)
71. Singh H.: Fungal Decolorization and Degradation of Dyes (w) *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, red. H. Singh, John Wiley & Sons, NJ, USA, 2006, s. 420–483
72. Singh L., Singh V.P.: Textile Dyes Degradation: A Microbial Approach for Biodegradation of Pollutants (w) Microbial Degradation of Synthetic dyes in Waste waters, Environmental Science and Engineering, red. S.N. Singh, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, s. 187–204
73. Srinivasan A., Viraraghavan T.: Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *J. Environ. Manage.* **91**, 1915–1929 (2010)
74. Srivastava S., Sinha R., Roy D.: Toxicological effects of Malachite Green. *Aquat. Toxicol.* **66**, 319–329 (2004)
75. Sudha M., Saranya A., Selvakumar G., Sivakumar N.: Microbial degradation of Azo dyes: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Applied Sci.* **3**, 670–690 (2014)
76. Thorat P.R., Sayyad M.: Microbial decolorization and degradation of Crystal Violet by aerobic bacteria, *The Bioscan*, **5**, 591–594 (2010)
77. Tom-Sinoy E.S., Mohan D.A., Shaikh H.: Biodegradation of textile dyes by *Pseudomonas* species and *E. coli*. *VSRD-TNTJ*, **2**, 238–248 (2011)
78. Vaithanomsat P., Apiwatanapiwat W., Petchoy O., Chedchant J.: Decolorization of reactive dye by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039. *Kasetart J. (Nat. Sci.)* **44**, 879–890 (2010)
79. Verma A.K., Dash R.R., Bhunia P.: A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *J. Environ. Manage.* **93**, 154–168 (2012)
80. Wang J., Gao F., Liu Z., Qiao M., Niu X., Zhang K.Q., Huang X.: Pathway and molecular mechanisms for Malachite Green biodegradation in *Exiguobacterium* sp. MG2. *PLoS ONE*, **7**, e51808 (2012)
81. Wang J., Qiao M., Wei K., Ding J., Liu Z., Zhang K.Q., Huang X.: Decolorizing activity of Malachite Green and its mechanisms involved in dye biodegradation by *Achromobacter xylosoxidans* MG1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 220–227 (2011)
82. Won S.W., Kim H.-J., Choi S.-H., Chung B.-W., Kim K.-J., Yun Y.-S.: Performance, kinetics and equilibrium in biosorption of anionic dye Reactive Black 5 by the waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* as a low-cost biosorbent. *Chem. Eng. J.* **121**, 37–43 (2006)
83. Yang X.Q., Zhao X.X., Liu C.Y., Zheng Y., Qian S.J.: Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochem.* **44**, 1185–1189 (2009)
84. Yilmazer P., Saracoğlu N.: Bioaccumulation and biosorption of copper(II) and chromium(III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **84**, 604–610 (2009)
85. Youssef A.S., El-Sherif M.F., El-Assar S.A.: Studies on the decolorization of Malachite Green by the local isolate *Acremonium kiliense*. *Biotechnology*, **7**, 213–223 (2008)
86. Youzhu F., Viraraghavan T.: Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour. Technol.* **79**, 251–262 (2001)