

## Możliwości rozkładu fenolu przez grzyby z rodziny Mucoraceae

ANDRZEJ NESPIAK, JOLANTA KRZYŻANOWSKA, MARIA SIENNICKA\*

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu,  
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna we Wrocławiu

Nespiak A., Krzyżanowska J., Siennicka M.\*: (Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Medical Academy, Kochanowskiego 10, 51-601 Wrocław, Provincial Sanitary-Epidemiological Center\*, Curie-Skłodowska 75, 50-369 Wrocław, Poland). *The possibilities to phenol degradation with some strains of Mucoraceae*, Acta Mycol. 18(2):223-230, 1982(1986).

The investigations included assays of phenol biodegradation possibilities of some strains of *Mucoraceae*. The phenol concentrations in media were 0.01, 0.001, 0.0001%. In this way we selected *Circinella muscae* and *Mortierella isabellina* strains which decomposed phenol with yield from 14,7 to 29,6%.

### WSTĘP

Problem przekształceń przez drobnoustroje fenoli znajdujących się w glebie i wodach ściekowych jest od lat przedmiotem wielu prac badawczych. Posiada on przede wszystkim aspekt praktyczny — oczyszczanie zbiorników wodnych, jak też teoretyczny, gdyż rozkład fenoli łączy się z wytwarzaniem produktów mogących mieć znaczenie gospodarcze (Zdybnińska 1968). Intensywność tego procesu zależy od stężenia fenoli w wodzie. Stwierdzono w licznych doświadczeniach, w których fenol był jedynym źródłem węgla, że bakterie rozkładają go najintensywniej w środowisku, w którym stężenie jego wahało się w granicach 200-500 mg/l. Stężenie mniejsze stwarzało pożywkę zbyt ubogą, w wyższym zaś ujawniały się toksyczne właściwości fenolu. (Kałabina, Rogowska wg Zdybnińskiej l. c.) zwraca uwagę

na kombinowany efekt metabolizmu wielu gatunków drobnoustrojów powodujących rozkład fenolu w wodzie.

Bakterie decydujące o biodegradacji fenolu w wodzie są bardzo szeroko rozpowszechnione (Pawłaczyk-Szpilowa 1965; Lato-szek 1960 i inni). Wynika to z charakteru utleniania fenolu zachodzącego najefektywniej przy pH wyższym od 7,0. Putilina (1959) określiła zespół „szczepów składający się z 10 gatunków bakterii”, promieniowców i grzybów jako najbardziej przydatny do rozkładu fenolu w wodach ściekowych. Zauważyła przy tym, że niektóre spośród szczepów bakterii zmieniły w ciągu 10-letniego pasażowania na podłożach z fenolem swoje właściwości biodegradacyjne.

Ze ścieków fenolowych przemysłu naftowego dokonano m.in. izolacji 720 kultur drobnoustrojów, z których aż 303 wykazało bujny wzrost na pożywce z węglowodanami i fenolem. Wśród nich 26% stanowiły kultury drożdży. Jeśli chodzi o udział innych grzybów w procesie rozkładu fenoli literatura jest wyraźniej uboższa. Szczególne w tym względzie osiągnięcia mają badacze czescy, którzy przy biologicznym oczyszczaniu ścieków gazogeneratorowych stwierdzili, że grzyby z rodzaju *Oospora* zdolne były do rozkładania lotnych fenoli (Kustka 1961).

W ostatnim dwudziestolecu wzrasta ilość prac traktujących o grzybach biorących udział w biodegradacji fenolu w wodach ściekowych. Kluczycki i Kubaczka (1966) określili aktywność drożdżaków z rodzaju *Candida* i *Torulopsis*. Grzyby te po wstępnej adaptacji rosły w środowisku, w którym stężenie fenolu było ok. 50 mg/l. Stwierdzono, że wykorzystywały one jako źródło pokarmu głównie kwasy tłuszczowe z odfenolowanych ścieków kombinatu koksochemicznego, sam fenol był raczej przez nie tolerowany.

W wyniku hodowli ciągłych *Torulopsis utilis* przy próbach oczyszczania nieodfenolowanych ścieków z procesów koksowania węgla brunatnego stwierdzono wzrost i rozmnażanie się komórek grzyba w stężeniach fenolu dochodzących do 5000 mg/ml. Stwierdzono również w podobnych wypadkach, że zawsze lepszy rozkład fenolu wykorzystują grzyby drożdżoidalne wyizolowane z tych ścieków, a nie szczepy adaptowane pochodzące z innych siedlisk. Najczynniejsze okazały się gatunki: *Candida pulcherrina*, *C. brumpti*, *Torulopsis utilis* i *T. inconspicua*. Spośród nich jednak tylko *Candida pulcherrina* wykazała bezpośrednią zdolność zużywania fenolu jako źródła węgla, pozostałe potrzebowały do wzrostu dodatku glukozy do podłoża.

Doniesienia badaczy szwedzkich (Neujahr, Varga 1970) informują o wykorzystaniu fenolu i jego pochodnych jako źródeł węgla przez *Tichosporum cutaneum*. Grupa grzybów drożdżoidalnych, do których należy ten gatunek, znana jest jako organizmy infekujące skórę

oraz błony śluzowe jamy ustnej, dróg oddechowych lub przewodu pokarmowego u ludzi. Istnieją ponadto próby wykorzystania niektórych grzybów do biotransformacji pochodnych fenolowych w celach otrzymywania określonych związków o znaczeniu praktycznym. Ruban i Karasewa (1969) stwierdzili, iż *meta*-paraaminofenole za pomocą *Candida utilis* transformowane były do L-tryptofanu. Herber (1972) za pomocą szczepu *Mucor hiemalis* uzyskali rozkład tymolu do hydrochinonu i monoglikozydu. Wnioskują oni na tej podstawie o istnieniu u tego gatunku grzyba możliwości przenoszenia rodnika  $\beta$ -fruktofuranozowego na hydrochinon z powstaniem parahydroksyfenilo  $\beta$ -D-fruktofuranozydu. Ta ostatnia wzmianka zwróciła naszą uwagę na grzyby z rodziny *Mucoraceae*, które — jako gatunki szeroko rozpowszechnione w przyrodzie — mogłyby spełniać dość istotną funkcję, jeśli chodzi o możliwości biodegradacyjne fenolu. Większa stałość cech morfologicznych gatunków *Mucoraceae* sugeruje, iż ewentualne ich możliwości wykorzystywania fenolu jako źródła węgla mogą stać się ich dodatkową cechą diagnostyczną. Z drugiej strony powszechność występowania tych grzybów w glebie i wielu substratach skalę ważności tego problemu stawia na płaszczyźnie jednego z elementów ochrony środowiska (Skirgiełło, Zadura 1979).

#### METODY

Badania nasze ograniczyliśmy do przedstawicieli rodzajów: *Absidia*, *Zygorynchus*, *Syncephalastrum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Circinella* i *Mortierella* (Nespiak i in. 1978). Grzyby te izolowano z różnych siedlisk — głównie z gleby, substratów organicznych, wody lub powietrza. Przebadano łącznie 34 szczepy należące do 21 gatunków.

Szczepy pochodzące z kolekcji Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu hodowano na pożywkach mineralnych, w których źródłem węgla była glukoza, glukoza + fenol lub sam fenol w ilościach 0,0001; 0,001; 0,01%. Źródłem azotu był  $\text{NaNO}_3$  albo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Inokulum grzyba wprowadzono do probówek z 10 ml pożywki, hodowlę przeprowadzono w temperaturze 25°C. Z trzydziestu czterech szczepów aż dziewięć rośło na podłożu z fenolem jako jedynym źródłem węgla. Były to: *Circinella angarensis* (Schost) Zycha 164, *Absidia glauca* Hagem 254, *Mucor hiemalis* Wehmer 123, *Absidia cylindrospora* Hagem 336, *Mortierella isabellina* Oud. 212, *Circinella muscae* (Sorokine) Berl. et de Toni 302, *Mortierella mutabilis* Linn. 404, *Mucor hiemalis* 162 i 193. Szczepy te hodowano na pożywce syntetycznej z amonowym źródłem azotu i glukozą jako źródłem węgla. Inokulum grzybów (po 0,1 cm<sup>3</sup>) wprowadzono do kolb ze 100 ml pożywki, a hodo-

włą prowadzono w temperaturze 25°C. Po siedmiu dniach inkubacji do poszczególnych prób dodano fenolu w takiej ilości, aby uzyskać stężenia 0,01, 0,001 i 0,0001%. Część prób pozostawiono jako kontrolę bez fenolu. Po dalszych siedmiu dniach inkubacji, wszystkie próby przesączono przez sączki bibułowe i oznaczono suchą masę grzybni, w przesączach zaś określono pozostałości pochodzące z fenolu. Oznaczenie związków fenolu przeprowadzono zgodnie z Polską Normą oznaczania fenoli lotnych w wodzie lub ściekach: metodą kolorymetryczną z 4-aminoantypiryną. Obliczenia suchej masy grzybni i zawartości fenolu w przesączach podhodowlanych wykonano w pięciu powtórzeniach (tab. 1).

Równoległe do hodowli na podłożu syntetycznym płynnym przebadano dla każdego ze szczepów wzrost na pożywce maltozowo-agarowej, do której dodano fenolu w stężeniach: 0,01, 0,001, 0,0001%. Inokulacji podłoża dokonano metodą punktową. Średnice rosnących kolonii grzybni mierzono po trzech i sześciu dniach. Notowano ponadto dzień pojawu sporangioforów i tworzenia w nich zarodników dla każdego z badanych gatunków (tab. 2).

#### WYNIKI OBSERWACJI

Właściwości biodegradacji fenolu przez różne grzyby były rozmaite. W przesączach pochodzących stwierdzono dużą rozbieżność w ubytkach fenolu (tab. 1). Świadczy to, iż możliwości wykorzystania tego związku jako źródła węgla są cechą indywidualną gatunku (względnie nawet szczepu, jak wykazały wyniki badań trzech różnych szczepów *Mucor hiemalis*).

Największe ubytki fenolu w przesączu pochodzącym stwierdzono u *Circinella muscae* 302, szczepu wyizolowanego z wody wodociągowej, a nieco mniejsze u szczepu *Absidia cylindrospora* 336 wyizolowanego z kompostu. Przeżywalność aż dziewięciu szczepów w środowisku o stężeniu fenolu rzędu 100 mg/l, z wyraźnymi możliwościami jego rozkładu, świadczy o aktywności tych grzybów w stosunku do fenolu, przypominającej aktywność niektórych drożdżaków (K l u c z y c k i, K u b a c z k a 1966; i in.). Interesującą ze względów praktycznych wydaje się być aktywność szczepu *Circinella muscae* pochodzącego z wody wodociągowej. Prawie 30-procentowy ubytek fenolu w przesączu pochodzącym świadczy o jego możliwości biodegradacyjnej podobnej do stosowania w biologicznym oczyszczaniu ścieków szczepów z rodzaju *Oospora* (K u s t k a 1961). *Mucor hiemalis*, gatunek najpospolitszy spośród pleśni, wykazał dużo słabsze zdolności biodegradacyjne, jednak częsty pojaw tego grzyba w naturalnych, jak również zmienionych gospodarką

Tabela 1 — Table 1

Sucha masa grzybni szczepów *Mucoraceae* oraz ich zdolności biodegradacyjne w zależności od wysokości stężenia fenolu w pożywce

Dry weight of *Mucoraceae* mycelium and their ability to biodegradation according to phenol concentration in the medium

Szczepy <i>Mucoraceae</i>	Circinella anganensis (Schost.) Zycha	Absidia glauca Hagem	Absidia cylindrospora Hagem	Mortierella isabellina Oud.	Circinella muscae (Sorok.) Berk. et de Toni	Mortierella mutabilis Linn.	Mucor hiemalis Wehmer		
							Nr 123	Nr 162	Nr 193
I	a	422,6	258,6	657,8	197,7	240,5	235,7	278,4	386,0
	b	412,9	258,9	577,6	199,9	260,1	259,6	327,6	373,3
	c	435,9	264,5	578,6	214,9	261,8	270,0	298,5	375,7
	d	452,9	261,6	647,3	212,1	236,7	264,3	342,5	388,4
II	a	90	80,6	70,4	71,8	93	85	86,2	90,1
	b	88	91,5	78,8	76,5	82	87	90,3	95,2
	c	95	100,0	85,3	77,1	88	91	84,2	95,6
	d	—	—	—	—	—	—	—	—
III	a	10	19,4	29,6	28,1	7	15	13,8	9,9
	b	12	8,5	21,2	23,5	18	13	9,7	4,8
	c	5	—	14,7	23,0	12	9	15,8	4,4
	d	—	—	—	—	—	—	—	—

Legenda (Legend): I Sucha masa grzybni w mg (Dry weight of mycelium)

II Pozostałość fenolu w przesączach podobowlanych w ‰ (Phenol residue in filtered cultures in ‰)

III Ubytek fenolu w ‰ (Phenol decrease in ‰)

a — 0,01‰; b — 0,001‰; c — 0,0001‰; d — 0.

Tabela 2 — Table 2

Wpływ fenolu na średnice kolonii i sporulacje badanych szczepów  
 Effect of phenol influence on the diameter of colonies and sporulation of investigated strains

Szczepy Mucoraceae Strains of Mucoraceae	Średnica kolonii w cm po: Diameter of colony in cm after:		Stężenie fenolu w pożywce w % Phenol concentration in medium in %		Circinella angarensis	Absidia glauca	Absidia cythindro- spora	Mortierella isabellina	Circinella muscae	Mortie- rella mutabilis	Mucor hiemalis			
	6 dniach 3 days	3 dniach 3 days	a	b							c	Nr 123	Nr 162	Nr 193
	6,6	7,3	6,6	5,7	2,6	3,6	3,6	5,5	2,7	2,7	2,7	2,7		
	7,1	7,2	7,4	7,0	2,8	3,7	3,9	5,6	3,1	3,1	2,8	2,8		
	6,9	7,4	7,4	6,3	2,7	3,9	4,4	5,6	3,2	3,2	3,0	3,0		
	9,0	9,0	9,0	9,0	2,6	4,0	4,5	5,6	3,2	3,2	3,1	3,1		
	9,0	9,0	9,0	9,0	5,1	7,4	6,1	9,0	6,1	6,1	5,9	5,9		
	9,0	9,0	9,0	9,0	5,6	7,5	7,2	9,0	6,5	6,5	6,2	6,2		
	9,0	9,0	9,0	9,0	3,5	7,4	6,9	9,0	6,5	6,5	6,4	6,4		
	9,0	9,0	9,0	9,0	5,4	7,5	7,0	9,0	6,6	6,6	6,4	6,4		
Pojaw spora- niach: Sporula- tion after: day:	4	3	3	4	7	6	8	8	5	5	5	5		
	3	3	3	4	7	6	7	7	3	3	3	3		
	3	3	3	4	2	6	7	7	2	2	3	3		
	2	2	2	2	4	2	2	2	1	1	1	1		

Legenda (Legend): a — 0,010‰; b — 0,0010‰; c — 0,00010‰; d — 0,0‰

człowieka ekosystemach, jest zjawiskiem korzystnym w procesach naturalnego rozkładu związków fenolowych w przyrodzie.

Wyniki doświadczeń nad wzrostem i tworzeniem zarodni u dziewięciu wytypowanych szczepów na podłożu agarowym wykazują, że u większości z nich najmniejsza nawet dawka fenolu opóźnia znacznie zarodnikowanie, przy jednoczesnym braku zahamowania wzrostu grzybni. Średnica kolonii tych szczepów, niezależnie od ilości fenolu w pożywce, była niemal identyczna ze średnicą kolonii z podłoża bez fenolu, natomiast pojaw sporangioforów, niezależnie od możliwości degradacyjnych szczepu, z reguły był opóźniony o cztery do pięciu dni (tab. 2).

#### WNIOSKI

1. Stwierdzono, że grzyby z rodziny *Mucoraceae* wykazują znaczną tolerancję na stężenie fenolu w podłożu.

2. Siedem szczepów wykazało możliwości biodegradacji fenolu w stopniu słabszym niż stosowane dotychczas do tych celów bakterie lub grzyby drożdżopodobne.

3. Aktywność szczepów *Circinella muscae* oraz *Mortierella isabellina* w stosunku do fenolu w podłożu okazała się najwyższą. Stwarza to możliwość wykorzystania tych grzybów w praktyce.

#### LITERATURA

- Herber R., Lepage M., Pierfitte M., Villoutreux J., 1972, *Metabolisme de quelques dérivés phénoliques chez Mucor hiemalis*, Soc. Biol. 8-9: 1087-1090.
- Kluczycki K., Kubaczka E., 1966, Zagadnienie drożdżowania ścieków fenolowych. Zesz. nauk. Pol. Śląskiej. 1 (9) 65-88.
- Kustka M., 1961, Biologiczne oxydacje fenolu. *Vys. Šk. Chem. Techn. Praha*.
- Latoszek A., 1960, Rozkład fenolu przez czyste kultury. *Pr. Inst. Gosp. Komun.* 14: 26-35.
- Nespiak A., Dmochowska J., Mackiewicz H., Noculak A., Siewiński A., 1978, Raport Nr 3 Programu Badawczego — Ochrona Środowiska Pol. Wrocław.
- Neujahr H. Y., Varga J. M., 1970, Degradation of phenols by intact cell and cell free preparation of *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 13: 37-44.
- Pawlaczyk-Szpilowa M., 1965, Effect of Glucose and Urea on the Rate of Phenol Degradation by *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Mikrobiol. Pol.* 14: 207-213.
- Pawlaczyk-Szpilowa M., 1965, Drobnoustroje rozkładające fenol i ich niektóre cechy ekologiczne. *Zesz. nauk. Pol. Wrocł.* 1 (7) 3-45.
- Polska Norma PN-72, C-04602 — Ark. 02. Woda i ścieki. Badania zawartości fenolu.

- Putilina N., 1959, Mikroby primenamyje na promyšlennych očistnych sooruzhenijach dla obzefienolivanija stočnych vod. Mikrobiologia 1:28, 757-762.
- Ruban E. L., Karaseva G. N. 1969, Ispolzovanie fenola i jego proizvodnych pri sinteze L-tryptofana drożżami *Candida utilis* 295 I, Prikl. bioch. mikrobiol. 5 (1): 107-109.
- Skirgiełło A., Zadara M. 1979, Grzyby — Głonowce, Pleśniakowate (In:) Flora Polska 10, Warszawa.
- Zdybñiewska M. 1968, Mikrobiologiczny rozkład związków fenolowych, Podstawy Mikrobiol. 7 (1): 161-179.