

## I. Streszczenie

4-nonylofenol, 4-*t*-oktylofenol, 4-kumylofenol, liczne fenole lotne, a także wybrane metale ciężkie są zaliczane do związków toksycznych zaburzających prawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego ludzi i zwierząt.

Prezentowana rozprawa doktorska miała na celu charakterystykę procesów degradacji i detoksykacji 4-nonylofenolu, 4-*tert*-oktylofenolu 4-kumylofenolu przez grzyb mikroskopowy *Umbelopsis isabellina*. Realizowane badania obejmowały ponadto ocenę zdolności grzyba do usuwania wybranych jonów metali ciężkich ze środowiska wzrostu. W pracy podjęto także ekotoksykologiczną analizę procesów eliminacji 4-nonylofenolu, 4-*tert*-oktylofenolu, 4-kumylofenolu oraz metali ciężkich przez szczep *U. isabellina* z użyciem testów wykorzystujących bioindykatory reprezentujące różne poziomy łańcucha troficznego. Poddano również ocenie efektywność *U. isabellina* do usuwania i detoksykacji lotnych fenoli zawartych w odciekach ze składowiska odpadów niebezpiecznych.

W pierwszym etapie badań, których wyniki zostały przedstawione w publikacji P1, wykazano zdolność *U. isabellina* do eliminacji NP, 4-*t*-OP i CP z podłoża wzrostowego. Ubytek około 96 % początkowej zawartości ksenobiotyków w pożywce (25 mg/l) zaobserwowano po 24 godzinach inkubacji. Analizy chromatograficzne ekstraktów pochodowlanych, umożliwiły zidentyfikowanie kilku pośrednich produktów biotransformacji NP, 4-*t*-OP i CP, wskazując na potencjał grzyba do degradacji badanych związków fenolowych. Rozkład NP i 4-*t*-OP przez *U. isabellina* inicjowany był procesami hydroksylacji końcowego atomu węgla we fragmentach alkilowych ksenobiotyków, po których następowało utlenienie grupy hydroksylowej i stopniowe skracanie łańcucha alifatycznego cząsteczki. Biotransformacja CP zachodziła prawdopodobnie poprzez hydroksylację atomu C grupy metylowej (C-8 lub C-9) a następnie utlenienie odpowiednio powstałej grupy karboksylowej. W ramach prowadzonych badań analizowano ponadto wpływ testowanych związków fenolowych oraz powstających w trakcie ich rozkładu intermediatów na szybkość wzrostu i morfologię grzybni *U. isabellina*. Zaobserwowano, że ekspozycja grzyba na działanie NP, 4-*t*-OP i CP powodowała powstawanie zmian w strukturze strzępek (wewnątrzkomórkowe ziarnistości), które zanikały w czasie prowadzenia hodowli co wskazywało na zmniejszenie toksyczności środowiska wzrostu drobnoustroju w trakcie badanych procesów degradacyjnych. Zastosowanie testów

30.11.2010 J. Jankowski

ekotoksyczności potwierdziło wcześniejsze obserwacje, iż procesy biotransformacji substratów fenolowych prowadziły do spadku toksyczności hodowli względem zastosowanych bioindykatorów.

Zakres badań, opisanych w publikacji P2, obejmował przede wszystkim ocenę zdolności *U. isabellina* do biosorpcji i akumulacji metali ciężkich: Ni, Pb, Zn, Mn. Efektywność wychwytywania testowanych jonów metali przez grzybnie drobnoustroju wynosiła od 74,3 mg dla Pb do 6,8 mg dla Ni na gram suchej masy. Otrzymane w trakcie doświadczeń wyniki wskazały ponadto, że dominującym mechanizmem pobierania jonów metali przez grzyba jest sorpcja do powierzchniowych struktur komórkowych. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły także wykazać aktywność *U. isabellina* do jednoczesnej eliminacji ksenobiotyków fenolowych oraz metali ciężkich z podłoża hodowlanego. Równoczesna suplementacja pożywki wzrostowej NP, 4-t-OP i CP oraz Pb, Ni, Mn i Zn hamowała zarówno efektywność wychwytywania przez drobnoustrój jonów metali jak i eliminację NP, 4-t-OP i CP w porównaniu z poziomem ich ubytku w hodowlach traktowanych osobno badanymi zanieczyszczeniami.

Ostatnim realizowanym w niniejszej rozprawie etapem badań opisanych w manuskrypcie P3 była przede wszystkim ocena całkowitego ryzyka przez wszystkie związki zawarte w kulturach grzybowych, powstające podczas biodegradacji NP, 4-t-OP i CP, poprzez zastosowanie wielogatunkowych testów toksyczności. Analizy ekotoksykologiczne uwiaryściły zmniejszenie szkodliwego wpływu filtratów pochodzących w trakcie inkubacji drobnoustroju z zanieczyszczeniami wobec wszystkich testowanych bioindykatorów. Przeprowadzone w pracy doświadczenia ukazały ponadto potencjał *U. isabellina* do redukcji fenoli lotnych z odcieków przemysłowych dawnych Zakładów Produkcji Barwników „Boruta” w Zgierzu. Wykonane analizy wykazały zarówno spadek ilości VP's w trakcie hodowli grzyba suplementowanych odciekami jak i zmniejszenie toksycznego wpływu przesącza na organizmy wskaźnikowe.

Przeprowadzone badania dostarczają dowodów skuteczności redukcji zagrożeń generowanych przez toksyczne ksenobiotyki fenolowe oraz metale ciężkie w wyniku procesów ich mikrobiologicznej eliminacji i degradacji, wskazując na potencjał wykorzystania grzyba *U. isabellina* jako efektywnego narzędzia do bioremediacji środowisk skażonych organicznymi i nieorganicznymi zanieczyszczeniami.

30.11.14 J. Jank

## II. Abstract

4-nonylphenol, 4-*t*-octylphenol, 4-cumylphenol, numerous volatile phenols, and selected heavy metals are classified as toxic compounds that disrupt the proper functioning of the endocrine system of humans and animals.

The presented dissertation was aimed at the characterization of the degradation and detoxification processes of 4-nonylphenol (NP), 4-*tert*-octylphenol (4-*t*-OP) and 4-cumylphenol (4-CP) by the microscopic fungus *Umbelopsis isabellina*. The conducted research also included the assessment of the fungus' ability to remove selected heavy metal ions from the growth environment. The study also undertook an ecotoxicological analysis of the elimination processes of 4-nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol, 4-cumylphenol and heavy metals by the *U. isabellina* strain by performing tests using bioindicators representing different levels of the trophic chain. The effectiveness of *U. isabellina* for the removal and detoxification of volatile phenols contained in the leachate from a hazardous waste landfill was also assessed.

In the first stage of the research, the results of which were presented in the publication P1, the ability of *U. isabellina* to eliminate NP, 4-*t*-OP and CP from the growth medium was demonstrated. A loss of about 96% of the initial content of xenobiotics in the medium (25 mg/l) was observed after 24 hours of incubation. Chromatographic analyzes of post-culture extracts allowed the identification of several intermediate products of NP, 4-*t*-OP and CP biotransformation, indicating the fungus' potential to degrade the phenolic compounds tested. The decomposition of NP and 4-*t*-OP by *U. isabellina* was initiated by the processes of hydroxylation of the terminal carbon atom in alkyl fragments of xenobiotics, followed by oxidation of the hydroxyl group and gradual shortening of the aliphatic chain of the molecule. CP biotransformation probably took place by hydroxylation of the C atom of the methyl group (C-8 or C-9) and then oxidation of the correspondingly formed carboxyl group. As part of the research, the influence of the tested phenolic compounds and the intermediates formed during their decomposition on the growth rate and morphology of the mycelium of *U. isabellina* was also analyzed. It was observed that the fungal exposure to NP, 4-*t*-OP and CP caused changes in the structure of the hyphae (intracellular granules), which disappeared during cultivation, indicating a reduction in the toxicity of the microorganism growth

30.11.2020  
S. K.

environment during the degradation processes studied. The use of ecotoxicity tests confirmed the earlier observations that the processes of biotransformation of phenolic substrates led to a decrease in the toxicity of the culture in relation to the bioindicators used.

The scope of the research described in publication P2 included the assessment of *U. isabellina*'s ability to biosorb and accumulate heavy metals: Ni, Pb, Zn, Mn. The efficiency of capturing the tested metal ions by the microbial mycelium ranged from 74,3 mg for PB to 6,8 mg for Ni per gram of dry fungal mass. The results obtained during the experiments also indicated that the dominant mechanism of metal ion uptake by the fungus is sorption to the surface cell structures. The results of the conducted experiments also allowed to demonstrate the activity of *U. isabellina* for the simultaneous elimination of phenolic xenobiotics and heavy metals from the culture medium. Simultaneous supplementation of the growth medium with NP, 4-*t*-OP and CP as well as Pb, Ni, Mn and Zn inhibited both the efficiency of metal ion capture by the organism and the elimination of NP, 4-*t*-OP and CP compared to the level of their depletion in the cultures treated separately tested pollutants.

The last stage of the research described in the P3 manuscript was assessment of the total risk by all compounds contained in fungal cultures, formed during the biodegradation of NP, 4-*t*-OP and CP, through the use of multispecies toxicity tests. Ecotoxicological analyzes showed a reduction in the harmful effect of post-culture filtrates during the incubation of the microorganism with contaminants against all tested bioindicators. The experiments carried out in the study also showed the potential of *U. isabellina* to reduce volatile phenols from industrial leachate of the former "Boruta" Dye Production Plant in Zgierz. The performed analyzes showed both a decrease in the amount of VPs during the cultivation of the fungus supplemented with leachate and a decrease in the toxic effect of filtrates on the indicator organisms.

The conducted studies provide evidence of the effectiveness of reducing the risks generated by toxic phenolic xenobiotics and heavy metals as a result of the processes of their microbiological elimination and degradation, indicating the potential of using the *U. isabellina* fungus as an effective tool for the bioremediation of environments contaminated with organic and inorganic pollutants.

30.11.21  
S. Jankowski