

# AZO BOJE, NJIHOV UTJECAJ NA OKOLIŠ I POTENCIJAL BIOTEHNOLOŠKE STRATEGIJE ZA NJIHOVU BIORAZGRADNJU I DETOKSIFIKACIJU

Ivana GUDELJ<sup>1</sup>, Jasna HRENOVIĆ<sup>2</sup>, Tibela LANDEKA DRAGIČEVIĆ<sup>3</sup>,  
Frane DELAŠ<sup>3</sup>, Vice ŠOLJAN<sup>4</sup> i Hrvoje GUDELJ<sup>1</sup>

*HIPALAB d.o.o.*<sup>1</sup>, *Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu*<sup>2</sup>, *Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu*<sup>3</sup>, *Zagreb*, *Ekološki inženjering, Poreč*<sup>4</sup>, *Hrvatska*

Primljeno u kolovozu 2010.

CrossCheck provjera u listopadu 2010.

Prihvaćeno u siječnju 2011.

Intenzivan industrijski razvoj popraćen je sve većom kompleksnošću sastava otpadnih voda, što u smislu učinkovite zaštite okoliša i održivog razvoja nalaže potrebu pospješivanja kvalitete postojećih te uvođenjem novih postupaka obrade otpadnih voda, kao iznimno važnog čimbenika u interakciji čovjeka i okoliša. Posebnu znanstveno-tehnološku pozornost zahtijevaju novosintetizirani ksenobiotici, poput azo-boja, koji su u prirodi veoma teško razgradivi. Azo-boje podložne su bioakumulaciji, a zbog alergijskih, kancerogenih, mutagenih i teratogenih svojstava nerijetko su prijetnja zdravlju ljudi i očuvanju okoliša. Primjenu fizikalno-kemijskih metoda za uklanjanje azo-boja iz otpadnih voda često ograničavaju visoke cijene, potrebe za odlaganjem nastalog štetnog mulja ili nastanak toksičnih sastojaka razgradnje. Biotehnološki postupci su, zbog mogućnosti ekonomične provedbe i postizanja potpune biorazgradnje, a time i detoksifikacije, sve zastupljeniji u obradi svih vrsta otpadnih voda, pa tako i onih koje sadržavaju azo-boje.

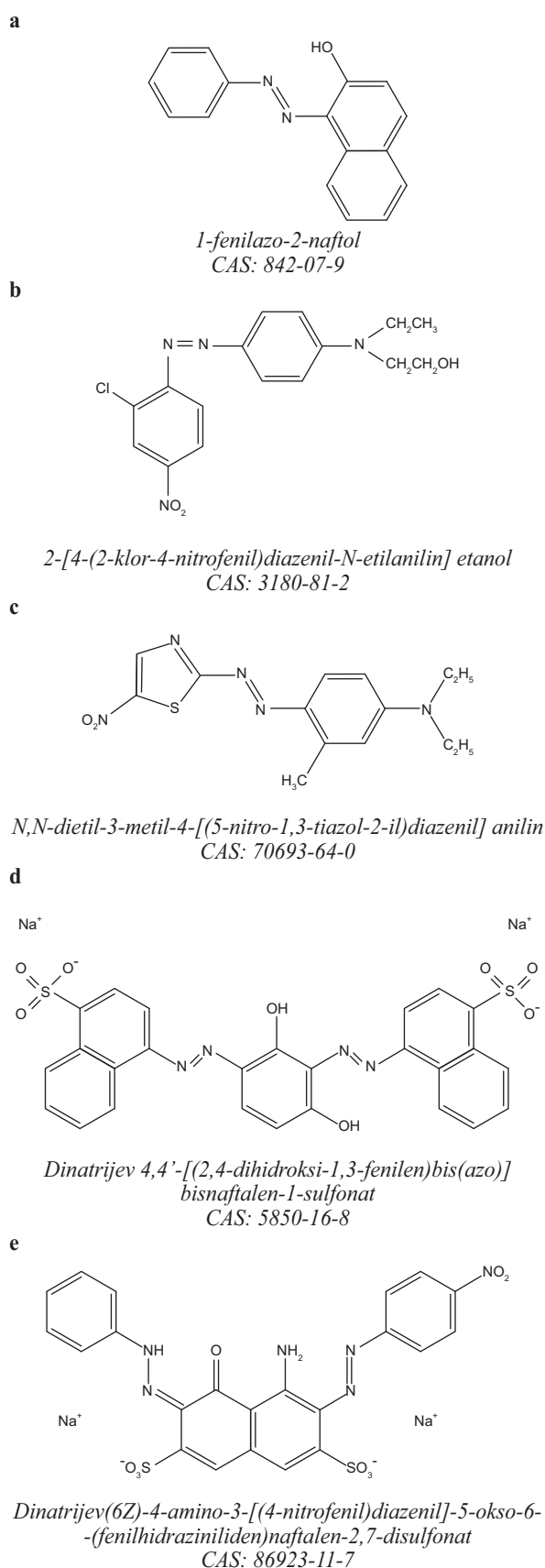
**KLJUČNE RIJEČI:** *biološko obezbojenje, biotehnologija, mješovite mikrobne kulture, obojene otpadne vode*

## TIJEK RAZVOJA BOJA I NJIHOVA PODJELA

Neka tvar ima vlastitu boju ako apsorbira dio svjetlosti koja na nju pada. O preostalom dijelu svjetlosti, koji pojedine tvari propuštaju ili difuzno reflektiraju, ovisi njihova obojenost. Boje su tvari koje apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra, a imaju sposobnost obojenja tekstilnih vlakana ili drugih materijala vežući se na njih fizikalnim silama ili uspostavljajući s materijalom kemijsku vezu. Zajedničko kemijsko svojstvo svih tvari koje pokazuju obojenost jest nezasićenost veza u strukturi njihove molekule (1). Sama obojenost ovisi o broju i

razmještaju dvostrukih veza i kromofora, odnosno o kemijskoj strukturi molekule tvari. Prema podrijetlu boje se dijele na prirodne i sintetske. Ova se podjela temelji na kemijskoj strukturi te području i metodama primjene, a uvrštena je u Colour Index (C.I.) u kojem su bojila i pigmenti označeni dvjema oznakama. Jedna od njih odnosi se na područje primjene i način bojenja te se naziva C.I. generičko ime, dok se druga oznaka, C.I. konstitucijski broj, odnosi na strukturu bojila, topljivost i podatke o sintezi (2).

Čovjek je od prapovijesnih vremena bio zainteresiran za boje. Prirodne boje i postupci bojenja stari su koliko i sam tekstil. Boje mogu biti izolirane iz biljaka, životinja ili minerala. Bojenje se u Europi



**Slika 1** Kemijske strukture, kemijsko ime i CAS broj nekih azo-boja: a - žuta, b - crvena, c - plava, d - smeđa, e - crna. Prilagođeno prema (10)

practiciralo još u brončano doba. Najstariji zapisi o uporabi prirodnih boja pronađeni su u Kini, a datiraju iz vremena 2600. g. p.n.e. Zbog premalo spoznaja o ekstrakciji i učinkovitosti bojenja prirodnim bojama te netoksične i ekološki prihvatljive boje koje svojom primjenom obično ne izazivaju negativne popratne pojave, na današnjem tržištu ni u primjeni nisu ni približno zastupljene kao sintetske boje. Gotovo sve boje koje se danas rabe u komercijalne svrhe sintetskog su podrijetla, čime se postiglo zadovoljenje kriterija ekonomske isplativosti, uz poboljšanje postojanosti boja i učinkovitosti bojenja. Trend porasta uporabe sintetskih boja pratio je razvoj sintetskih vlakana (3). Danas je, na temelju Colour Index-klasifikacije, registrirano oko 8 000 kemijski različitih tipova boja (4). Na tržištu je dostupno više od 100 000 umjetnih boja, a godišnje se u svijetu proizvede oko milijun tona umjetnih boja (5).

## AZO-BOJE

Azo-boje, s 2 000 strukturno različitih spojeva te udjelom od 70 %, najveća su, najvažnija i najraznolikija skupina umjetnih boja koje su u širokoj industrijskoj primjeni (6-9). Na slici 1 prikazane su kemijske strukture, kemijsko ime i CAS broj nekih često rabljenih azo-boja. Pripadaju skupini umjetnih boja koju karakterizira jedna ili više dušikovih veza (-N=N-) između aromatskih prstenova, uz prisutnost auksokromnih hidroksilnih, sulfonskih ili amino-skupina. Prema broju azo-veza u molekularnoj strukturi dijele se na: monoazo, diazo, triazo, tetraazo i poliazo-boje (10).

Prema mogućnostima primjene azo-boje možemo podijeliti na one koje se:

- otapaju u vodi (bazične, kisele, supstantivne ili direktne, kiselomoćilske, reaktivne, metalkompleksne, leuko-estere),
- ne otapaju u vodi (redukcijske, disperzne, pigmentne, topljive u mastima i ulju, obojene lakove),
- grade na vlaknu (bojila tipa naftola AS, oksidacijska bojila i bojila za fotografije u boji) (11).

Od njihova otkrića 1856. godine pa do danas azo-boje su postale najzastupljenijom komercijalnom skupinom boja (12, 13). Upravo azo-boje su boje najšireg spektra primjene, ponajprije u tekstilnoj industriji, a potom u industriji papira, kože, plastičnih masa i drugoga. Većina azo-boja rabi se za bojenje

tekstila i drugih vlaknastih materijala adsorpcijom iz vodene otopine boje. Azo-boje koje se rabe za bojenje materijala iz nevodene medija mogu se podijeliti na boje topljive u mineralnim uljima i mastima, u alkoholu i u organskim otapalima. Azo-boje netopljive u vodi rabe se za bojenje mineralnih ulja i naftnih derivata, masti, voskova, alkoholnih tinta, kože, drva, plastike, lakova i prehrambenih proizvoda.

Sve se azo-boje sintetiziraju tako da budu postojane tijekom pranja, na kemijsko i mikrobiološko djelovanje, kao i na djelovanje svjetlosti (5). Zahvaljujući svojstvima postojanosti, teško su biorazgradive i sklone nakupljanju u prirodi (4).

Kako se više od 10 % azo-boja tijekom procesa bojenja ne uspije vezati na vlakna, goleme količine tih boja dospijevaju u okoliš pa postaju velik ekološki problem (6).

Mnoge azo-boje su kancerogene, mutagene, intenzivna obojenja (14) i izazivaju alergijske reakcije u čovjeka (5). Općenito vrijedi da toksičnost sastojaka raste s povećanjem broja benzenskih prstenova u strukturi (15). Kancerogenost azo-boja direktno ovisi o strukturi molekule i mehanizmu razgradnje, kako je prikazano na tablici 1. Kao produkti razgradnje azo-boja najčešće nastaju aromatski amini različitih struktura, koji također mogu imati kancerogena svojstva.

Azo-veze se u strukturi azo-boja najčešće nalaze unutar benzenskog ili naftalenskog prstena, a u nekim slučajevima između aromatskih prstenova i na njihovim vezanim alifatskim enoliziranim skupinama.

## POSTOJANOST AZO-BOJA I NJIHOV UTJECAJ NA OKOLIŠ I ZDRAVLJE LJUDI

Budući da su azo-boje po svojoj prirodi ksenobiotici i teško biorazgradive, njihovo uklanjanje iz otpadnih voda privlači sve veću pozornost istraživača koji djeluju u području zaštite okoliša (16). Teško se razgrađuju i gube obojenje zbog svoga umjetnog

podrijetla, izrazito složene strukture i izražene postojanosti, pa se nužno moraju ukloniti iz vode prije njezina ispuštanja u prirodu (4). Uklanjanje obojenja ne podrazumijeva uvijek i uklanjanje toksičnosti. Nepotpuna razgradnja i nastanak sastojaka razgradnje tu toksičnost mogu čak i povećati. Stoga je važno da se uspješnost razgradnje boja provjeri provedbom ekotoksikoloških testova (17).

Spojevi koji nastaju razgradnjom azo-boja, osim što su estetski problem, pridonose mutagenosti tla te podzemnih i površinskih voda s kojima dolaze u dodir (9).

Područja primjene u kojima čovjek dolazi u neposredni dodir s bojama ponajprije su njihova uporaba u prehrambenoj industriji, izradi ambalažnog materijala za prehrambene proizvode i proizvodnji lijekova, a važan je i kontakt preko kože (10).

Poseban interes za intenzitet toksičnosti azo-boja uvjetovala je činjenica da većina njih sadržava poznate kancerogene aromatske sastavnice poput benzena i naftalena (4). Najtoksičnijima su se pokazale neke od osnovnih azo i diazo-boja (18).

Najvažniji načini negativnog djelovanja boja su ovi:

- ovisno o koncentraciji boje i trajanju izloženosti nekog organizma boji mogu nastupiti akutni i/ili toksični učinci,
- već i niske koncentracije tih tvari u vodi izazivaju intenzivno obojenje koje privlači veliku pozornost građana i vlasti,
- svojom prisutnošću u vodi i utjecajem na prijenos svjetla boje izazivaju promjene na organizmima koji čine početak hranidbenog lanca u prirodi (19).

## ZAKONSKI UVJETI DOPUŠTENIH KONCENTRACIJA SINTETSKIH BOJA U OKOLIŠU

Proizvođači boja su pod utjecajem sve strožih zakonskih propisa na lokalnoj i međunarodnoj razini

**Tablica 1** Ovisnost kancerogenosti azo-boja o svojstvima. Prilagođeno prema (10)

| Struktura                | Topljivost                | Mehanizam razgradnje                                 | Kancerogenost |
|--------------------------|---------------------------|--|---------------|
| Diazo-sastavnica         | Voda ili organsko otapalo | a) redukcija -N=N-<br>b) N-oksidacija amina          | +             |
| Azo-veza ostaje sačuvana | Organsko otapalo          | Oksidacija prstena<br>N-dealkilacija<br>N-oksidacija | +/-           |
| Sulfonske skupine        | Voda                      | Redukcija -N=N-                                      | -             |

te pritiska javnosti već prije tridesetak godina započeli s ispitivanjem toksikoloških i ekoloških svojstava boja (20). Danas postoji niz zakonskih propisa i regulativa koji od proizvođača zahtijevaju definiranje štetnosti svakog proizvoda, uključujući njegovu akutnu toksičnost, iritabilnost kože i očiju, toksičnost nakon višekratne primjene, fotosenzibilnost, mutagenost, kancerogenost i teratogenost.

Prema novoj regulativi Europske zajednice REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) sve kemikalije, kao čiste tvari ili sastavni dijelovi nekog pripravka, koje se proizvode, stavljaju u promet i upotrebljavaju moraju biti registrirane bez obzira na to pripadaju li u opasne kemikalije ili one koje nisu kategorizirane kao opasne (21).

Prvi korak u razotkrivanju štetnosti boja jesu primjereno testiranje i evaluacija u skladu s EU direktivom 67/548/EEC. Glavne smjernice kontrole boja u sklopu EU direktive temelje se na aspektima štetnosti, opasnosti i upravljanja opasnošću. Pri tome se obavlja klasifikacija spojeva i proizvodnih procesa štetnih za okoliš.

Godine 1974. tvrtke članice ETAD-a (engl. *The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers*) dobrovoljno su uvele praksu izrade i uporabe Sigurnosno-tehničkog lista (engl. *Safety Data Sheet*), dokumenta koji sadržava odgovarajuće podatke karakteristične za svaku umjetno sintetiziranu boju na koju se odnose: identitet boje, mogući štetni sastojci, fizikalno-kemijski, toksikološki i ekološki podaci, mjere prve pomoći, koncentracije dopuštene izloženosti i uputa za uporabu sredstva osobne zaštite pri radu. Toksikološki podaci trebaju pružiti informaciju o štetnosti boje za ljudsko zdravlje nakon njezina unosa u organizam gutanjem, udisanjem ili putem kože, koja se izražava jedinicama letalne doze LD<sub>50</sub> ili letalne koncentracije LC<sub>50</sub> koje znače onu količinu, odnosno koncentraciju toksičnog sastojka pri kojoj ugiba 50 % izložene populacije (10).

Osim akutne toksičnosti, posebnu pozornost zahtijevaju njihovi dugoročni štetni učinci poput mutagenosti, kancerogenosti i teratogenosti. Čimbenici od posebnog značenja su biorazgradivost i toksičnost za vodeni svijet (ribe, bakterije, planktonske organizme poput *Daphnia*, alge...), a opća je činjenica da te boje nisu lako biorazgradive.

Tijekom zadnjih nekoliko godina u mnogim su zemljama postavljeni strogi zakonski uvjeti glede zbrinjavanja obojenih otpadnih voda. Ti se uvjeti u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju neprestano

mijenjavaju u smislu njihova pooštavanja do te mjere da industrije, čijim radom nastaju otpadne vode sa sadržajem boja, prisiljavaju na njihovo pročišćavanje do stupnja koji zakonska regulativa u skladu s ekološkom prihvatljivošću propisuje (4, 19).

Neka istraživanja pokazuju da su boje u prirodnim vodenim tokovima katkad prisutne u koncentraciji od 1,56 mg L<sup>-1</sup>, a boja u čistoj rijeci vidljiva postaje svojom zastupljenošću već u koncentraciji od 0,005 mg L<sup>-1</sup> (22). Budući da zakonski uvjeti postaju sve stroži, nalaže se potreba za što skorijim pronalaskom tehnički izvedivih i ekonomski prihvatljivih metoda obrade otpadnih voda sa sadržajem boja (8, 18). Nove takozvane eko-etikete tekstilnih proizvoda i sve stroži zakonski uvjeti izlaznih vrijednosti sastojaka obrađene obojene otpadne vode, prisiljavaju tako tekstilnu industriju na ponovnu uporabu procesne vode i kemikalija (23). Uklanjanje boja iz otpadnih voda treba nastojati provoditi radi postizanja:

- ponovne uporabe pročišćene otpadne vode, što je prednost i s ekološkog i sa stajališta ekonomske isplativosti;
- smanjenja onečišćenja površinskih voda;
- smanjenja mogućnosti bioakumulacije boja te drugih kemikalija, kojima je popraćena njihova proizvodnja i primjena, u okolišu (19).

## PODRIJETLO INDUSTRIJSKIH OTPADNIH VODA SA SADRŽAJEM BOJA

Iako obojenje industrijskih otpadnih voda može biti uzrokovano prisutnošću različitih sastojaka, posebna se pozornost posvećuje prisutnosti boja i spojeva nastalih njihovom razgradnjom, koji se zbog svoje složene kemijske strukture ne mogu razgraditi u okolišu (4). Posebno važni onečišćivači voda su industrije koje proizvode umjetne boje ili se u svome tehnološkom procesu koriste bojama, primjerice: tekstilna industrija, kožarska industrija, industrija papira, prehrambena industrija (7), kemijske čistionice, proizvodnja plastike (24), farmaceutska i kozmetička industrija (5). Glavne industrije u kojima nastaju obojene otpadne vode jesu tekstilna industrija i industrija proizvodnje boja (4, 25, 26).

Zbog nepotpunog vezanja boje na vlakna, proces bojenja tkanina nedostatan je učinkovit, pa je većina otpadnih voda tekstilne industrije obojena. Tijekom obrade tekstila 30 % do 70 % uporabljene količine boje hidrolizira se i ispušta u otpadnu vodu (27), a tijekom proizvodnje boja ta količina iznosi 10 % do 15 % (28). Obojene otpadne vode podrijetlom iz

industrije proizvodnje boja i tekstilne industrije karakterizirane su visokom: biološkom potrošnjom kisika, kemijskom potrošnjom kisika i koncentracijom suspendiranih tvari, a glavni problem koji se povezuje s ovim tipom otpadnih voda jest postojanost boja koje sadržavaju i njihovo ugrožavanje okoliša (29).

## FIZIKALNO-KEMIJSKI POSTUPCI OBRADJE OTPADNIH VODA SA SADRŽAJEM AZO-BOJA

Primjenom fizikalnih postupaka iz otpadne se vode uklanjaju sastojci bez odvijanja kemijskih reakcija. Najčešće su to postupci filtracije, adsorpcije i taloženja, koji se temelje na fizikalnim čimbenicima filtrabilnosti, adsorpcijskom afinitetu vezanja na adsorbens, odnosno svojstvu taloženja sastojaka iz otpadne vode. Ako se u nekom postupku obrade otpadne vode dodaju kemijska sredstva kojima se odvijanjem kemijskih reakcija intenzivira odstranjivanje onečišćivala prisutnih u obliku suspendiranih čestica ili otopljenih organskih sastojaka, voda se obrađuje fizikalno-kemijskim postupkom (30). Fizikalno-kemijski postupci specijalizirani za uklanjanje boja iz otpadnih voda temelje se na ugušćivanju i koncentriranju boja u talog ili potpunom razaranju njihove molekulske strukture (22). U te svrhe primjenjuju se različiti fizikalno-kemijski procesi: adsorpcija, flokulacija, koagulacija, precipitacija, membranski procesi, ionska izmjena, zračenje, Fentonov proces i kemijska oksidacija (4, 31, 32). Idealni cilj ovih procesa bila bi potpuna mineralizacija boja do  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{SO}_4^{2-}$ . Budući da je velik broj boja postojan prema svjetlosti i topljiv u vodi, navedeni procesi ne uspijevaju ukloniti boju do zadovoljavajuće koncentracije od  $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ , što je znatno niže od maksimalno dopuštenih koncentracija nekih drugih organskih spojeva u obrađenoj otpadnoj vodi (22). Fizikalno-kemijske metode uklanjanja boja imaju tehnička i ekonomska ograničenja (14), a njihovi

nedostaci (tablica 2) uključuju visoku cijenu, nedovoljnu učinkovitost i nastanak toksičnih sastojaka razgradnje (26, 33). Proces koji u novije vrijeme u području fizikalno-kemijske obrade postižu najbolje rezultate napredni su oksidacijski procesi (engl. *Advanced Oxidation Processes - AOPs*) (31, 34-36).

Problem primjene fizikalno-kemijskih metoda jest i nastanak značajne količine toksičnog mulja koji, ako se primjereno ne zbrine, može dovesti do sekundarnog onečišćenja. Stoga je poželjan pronalazak i razvoj alternativnih tehnologija baziranih na primjeni bioloških procesa zbog njihova prihvatljivog utjecaja na okoliš (37).

## BIOTEHNOLOŠKI POSTUPCI UKLANJANJA AZO-BOJA IZ OTPADNIH VODA

U odnosu na fizikalno-kemijske metode, biološki način obrade je prihvatljiviji zbog ekonomičnosti, količine mulja koji nastaje tijekom procesa obrade i ekološke prihvatljivosti (26, 38, 39). Nadalje, procesi utemeljeni na uporabi mikroorganizama za uklanjanje boja iz otpadnih voda pružaju pogodnosti poput niskih troškova održavanja, a procese je moguće provesti uz postizanje potpune mineralizacije onečišćivala kada su konačni produkti netoksični (7, 25). Budući da se azo-boje namjenski sintetiziraju da budu postojane prema degradaciji, ne čudi činjenica da su veoma postojane i na biodegradaciju tehnologijom aktivnog mulja (23). Kemijske strukture molekula boja su jako važne za učinkovitost biodegradacije (40), a još uvijek nije ustanovljen jasan odnos kemijske strukture, količine i selektivnosti mikroorganizama za biodegradaciju (27). Obojenje otpadne vode, uzrokovano sadržajem boje, nastaje pucanjem (-C=C-)-veze, (-N=N-)-veze, odnosno pucanjem heterocikličkih aromatskih prstenova, pri čemu dolazi do pomaka adsorpcije svjetla iz vidljivog područja prema ultravioletnom ili infracrvenom području (4).

Tablica 2. *Fizikalno-kemijske metode za uklanjanje boja iz otpadnih voda. Prilagođeno prema (22)*

| Fizikalna i/ili kemijska metoda obrade | Prednosti                                  | Nedostaci  |
|--|--|--|
| Oksidacija                             | Brzina procesa                             | Energetska zahtjevnost i nastanak produkata razgradnje |
| Adsorpcija                             | Učinkovitost uklanjanja velikog broja boja | Adsorber zahtijeva regeneraciju ili zbrinjavanje       |
| Membranska tehnologija                 | Uklanjanje svih boja                       | Nastanak koncentrata boje                              |
| Koagulacija/flokulacija                | Ekonomska isplativost                      | Nastanak velike količine mulja                         |

Istraživanja pokazuju da boje same po sebi nisu lako biorazgradive, jer ih mikroorganizmi ne mogu iskoristiti kao supstrat (4). Mikroorganizmi koji služe uklanjanju boja iz vode obično se rabe bez detaljnije kvalitativne analize sastava mikrobne zajednice (26). Osim klasičnih postupaka izolacije i odabira mikroorganizama, rabe se i mutacije te drugi genetički postupci preinake mikroorganizama, radi što uspješnije biološke obnove (bioremedijacije) teško biorazgradivih spojeva poput boja (41). Mješovite mikrobne kulture podobnije su za obezbojavanje otpadnih voda od čistih kultura, zbog sinergističkog odnosa mikrobnih vrsta tijekom biološkog postupka obezbojavanja (26). Istraživanja su također pokazala da je teže prenošenje, iz laboratorijskog mjerila u realni sustav, onih mikrobnih procesa koji se temelje na djelovanju čistih kultura u odnosu na procese utemeljene na djelovanju mješovitih mikrobnih kultura (14). U načelu je bakterijska razgradnja boja puno brža od biorazgradnje koju provode kvasci (39). Daljnja prednost koja proizlazi iz heterogenosti sastava mješovite mikrobne zajednice jest u tome što ona omogućuje učinkovito djelovanje na biorazgradnju većeg broja onečišćivala. Učinkovitost procesa obezbojenja može se poboljšati i dodatkom odgovarajućeg kosupstrata (npr. glukoza, laktoza i kvašćev ekstrakt) u predmetni medij obrade, čime se bitno utječe na smanjenje trajanja i cijenu cjelokupnog procesa (42). Kosupstrat služi kao dodatni izvor hraniva te ubrzava proces biorazgradnje i do 36 % (39), jer osigurava opskrbu mikroorganizama aktivnog mulja redukcijskim ekvivalentom elektrona potrebnih za razaranje azo-veze (43).

Rezultati istraživanja pokazuju da, zahvaljujući svojoj promjenjivosti, mikroorganizmi u određenim uvjetima mogu razviti enzimске procese za razgradnju azo-boja (8). Na kvascima koji mogu metabolizirati boje provedeno je vrlo malo istraživanja, ali je utvrđeno da *Cunninghamella elegans* ATCC 3612 može metabolizirati 85 % trifenilmetanske boje zelenog malahita, nakon 24 sata inkubacije. Međutim, mehanizam tog procesa razgradnje još nije poznat (27). Bakterije mogu razgrađivati azo-boje aerobnim i anaerobnim procesima (44), ali u mnogim slučajevima metabolički produkti, obično aromatski amini, toksični su ili još toksičniji od početne azo-boje (27). Većina azo-boja otporna je na aerobnu mikrobnu biorazgradnju tijekom obrade u klasičnim sustavima za obradu otpadnih voda s aktivnim muljem (6, 18, 45, 46). Njihova postojanost prema aerobnoj biorazgradnji zasniva se na sastavnicama deficitarnim elektronima koje posjeduju azo ( $-N=N-$ ) i sulfonske ( $-SO_3^-$ ) skupine

akceptorska elektrona koje molekulu čine manje osjetljivom na oksidativni bakterijski katabolizam (43).

Bakterijsko obezbojenje u aerobnim uvjetima češće rezultira adsorpcijom boje na bakterije nego oksidacijom sastojaka boja. Prednost anaerobnog sustava biološke razgradnje boja u odnosu na aerobni jest u tome što nema potrebe za aeracijom, nastaje malo aktivnog mulja i dolazi do sinteze metana (39). Valja očekivati da degradacijom nastaju aromatski amini koji mogu biti toksični i postojani s obzirom na anaerobni proces, a biorazgradivi u aerobnim uvjetima (47). Postojanost i otpornost azo-boja uvjetuju činjenicu da je njihovo uklanjanje veoma složen i dugotrajan postupak. Tijekom prošlih dvaju desetljeća razvijeno je nekoliko tehnoloških postupaka za uklanjanje obojenja iz industrijskih otpadnih voda (tablica 2) od kojih su neki svoju primjenu našli i u industriji (6). Međutim, postoji potreba za razvojem ekonomičnijih bioloških postupaka obrade učinkovitih za uklanjanje boja iz velikih volumena obojene otpadne vode (4). Zbog svoje genske raznolikosti i metaboličke aktivnosti mikroorganizmi imaju sposobnost bioremedijacije onečišćenja uzrokovanih azo-bojama (27). Neki mikroorganizmi, uključujući obligatne anaerobne sojeve (*Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp. i *Clostridium* sp.), fakultativne anaerobne sojeve (*Sphingomonas* sp. soj BN6, *Pseudomonas luteola* sp., *Proteus vulgaris* i *Streptococcus faecalis*) i neke intestinalne anaerobe, mogu reducirati azo-boje (38). Poznato je da se bakterijska azo-redukcija zbiva u anaerobnim uvjetima, a bakterije mogu aerobno dodatno mineralizirati neke aromatske amine (6, 38). Dokazano je da neki sojevi, primjerice *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostralus* (40), *Trametes modesta* (48) i *Phlebia tremellosa* (49), sudjeluju u obezbojavanju azo-boja, iako detaljni biokemijski putovi još nisu potpuno razjašnjeni (50). Također je dokazano da kvasci mogu iskoristiti kemijske sastojke boja poput anilina, kao jedinog izvora ugljika i dušika, a proces obezbojenja može se bitno poboljšati dodatkom kosupstrata čime se skraćuje trajanje procesa i znatno smanjuju njegovi troškovi (27, 39).

#### ČIMBENICI KOJI ODREĐUJU UČINKOVITOST BIOTEHNOLOŠKOG POSTUPKA UKLANJANJA AZO-BOJA

Trud koji je potrebno uložiti za uspješnu biološku razgradnju boja mora ukorak pratiti trend sinteze

njihovih sve postojanijih molekula. Učinkovita biorazgradnja azo-boja ne može se postići tradicionalnim metodama primjenom tehnologije aktivnog mulja (7). Aktivni mulj uobičajena sastava siromašna je mikrobna zajednica s obzirom na sadržaj mikroorganizama potrebnih za biorazgradnju teško biorazgradivih sastojaka (51, 52). Tehnološkim razvojem i poboljšanjem bioloških procesa obrade otpadne vode zamjetna pozornost pridaje se istraživanju mikrobne kakvoće aktivnog mulja i ulozi članova mikrobne zajednice u procesu biorazgradnje ksenobiotika (53). U biorazgradnji teško razgradivih sastojaka izuzetno važno mjesto ima primjena mikroorganizama dobivenih izdvajanjem iz prilagođenog aktivnog mulja ili genetičkim preinakama. Primjenom genetički modificiranih mikroorganizama može se postići visoka učinkovitost biorazgradnje ksenobiotika u sintetskome mediju (54). Međutim nakon što se dodaju u aktivni mulj, zbog utjecaja drugih prisutnih sastojaka te nepogodnih čimbenika okoliša, mnogi od njih ne mogu preživjeti i zadržati se u tom biološkom sustavu za obradu otpadnih voda. Za razliku od genetički modificiranih, oni mikroorganizmi koji se izoliraju putem prilagodbe aktivnog mulja na specifične u njega dodane ksenobiotičke sastojke uspijevaju opstati unutar aktivnog mulja istodobno poboljšavajući biološku aktivnost razgradnje ksenobiotika (53). U novije vrijeme nalaže se potreba za pronalaskom i razvojem alternativnih metoda, ekonomski isplativih bioloških ili kombiniranih fizikalnih, kemijskih i bioloških metoda za uklanjanje azo-boja iz velikih industrijskih volumena obojenih otpadnih voda (4, 18). Nedavno su opisani bakterijski sojevi koji pokazuju dobar rast u aerobnim uvjetima, ali zadovoljavajući učinak obezbojenja postignut je tek primjenom anoksičnih ili anaerobnih kultura (43). Iz dostupne literature vidljivo je da je istraživanje anaerobne mikrobne azo-redukcije bilo potaknuto prethodno stečenim saznanjima o produktima metabolizma nastalim redukcijom prehranbenih azo-boja u probavnom sustavu sisavaca (46). Azo-veze se lako reduciraju u anaerobnim uvjetima, pri čemu nastaju aromatski amini, koji se ne mineraliziraju anaerobno već aerobno. Stoga se kombinacija anaerobnih i aerobnih uvjeta smatra najpovoljnijom za mineralizaciju azo-spojeva (43). Osim u submerznom mediju, također se provode istraživanja razgradnje azo-boja utemeljena na metodologiji biosorpcije boje iz otopine na biomasu, kao i biodegradaciji boje s pomoću mikroorganizama imobiliziranih na nekom čvrstom nosaču (54).

Bioremedijacija se općenito pospješuje biostimulacijom - dodatkom hraniva te bioaugmentacijom - uporabom inokuluma mikroorganizama poznate sposobnosti razgradnje određenog onečišćivala. Glavni čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje jesu: temperatura, pH, koncentracija kisika, koncentracija mikroorganizama, parcijalni tlak plina, redoks potencijal, hidrauličko vrijeme zadržavanja, dostupnost hraniva, biološka iskoristivost spojeva koji su predmet biorazgradnje (engl. *bioavailability*) te toksičnost razgradnih produkata nastalih biorazgradnjom (15). Aromatski amini koji nastaju kao biorazgradni produkti azo-boja kancerogeni su, toksični i mogu ugroziti zdravlje ljudi. Osobito postojan sastojak azo-boja jest naftilaminsulfonska kiselina. Posljedično tomu, značajan udio u kemijskoj potrošnji kisika nakon biološke obrade otpadne vode koja sadržava azo-boje otpada na sulfonirane aromatske amine. Radi sprječavanja problema, koje u sustavu biološke obrade otpadnih voda izazivaju sastojci koji toksično djeluju na biomasu, u novije se vrijeme rabe specijalni biološki senzori koji operateru koji nadzire sustav biološke obrade omogućuju da takav uzrok pravodobno otkrije te izbjegne njegov ulazak u sustav biološke obrade i njegov inhibitorski utjecaj na mikrobnu biomasu (55). Primjer takvoga biološkog senzora je protočni laboratorijski konični bioreaktor, s kugličnim sinternim nosačima biomase, povezan na cilindričnu komoru koja osigurava recirkulaciju ispitivanog uzorka otpadne vode i njezino dostatno hidrauličko vrijeme zadržavanja u bioreктору, kao i detektorima vođenja procesa povezanih s računalom. Uporaba takvoga biološkog senzora svoju primjenu nalazi i u testiranju djeluje li neka azo-boja prisutna u otpadnoj vodi inhibitorno ili toksično na aktivnu biomasu sustava za biološku obradu te vode (29). Metabolička aktivnost mikrobne zajednice važan je, a ujedno i ograničavajući čimbenik uspješnosti procesa obezbojenja azo-boja (46). Biorazgradnju teško biorazgradivih spojeva poput azo-boja mogu olakšati i materijali odgovarajućih pora na površini, koji kao nosači omogućavaju stvaranje prostora pogodnih za rast mikroorganizama. Ti materijali mogu biti od kaolina, bentonita, praškastog aktivnog ugljena ili silikagela, a da bi zadovoljili svrhovitost primjene, trebaju imati određeni kapacitet adsorpcije onečistila i hraniva koji zadovoljavaju metaboličke potrebe radnih mikroorganizama osiguravajući njihov intenzivni rast na svojoj površini (28, 43). Kao učinkoviti adsorbensi u obradi obojenih otpadnih voda

primjenjivi su i ostaci agroindustrije kao što su piljevina i treset (18, 43). Mikroorganizmi, ovisno o uvjetima uzgoja mogu aktivirati različite enzimske sustave (56). Koncentracija boje koju treba ukloniti iz otpadne vode te spojevi koji tom biorazgradnjom nastaju, neposredno i značajno utječu na metaboličku aktivnost mikrobne zajednice (46). Negativan utjecaj teško biorazgradivih spojeva interferira s biološkom aktivnošću osjetljivih mikroorganizama aktivnog mulja koji bivaju isprani iz aktivnog mulja ili ugibaju, što negativno utječe na kvalitetu izlaznog toka obrađene otpadne vode (53). Budući da je azo-redukcija unutarstanični proces, iznimno važan čimbenik je propusnost stanične membrane za boju (46). Mješovite mikrobne kulture učinkovitije uklanjaju boje od pojedinačnih kultura, što se pripisuje sinergističkom odnosu pojedinih članova (7, 26, 28). Pojedini članovi mješovite mikrobne kulture mogu razgrađivati molekulu boje s različitih strana ili kao supstrat mogu iskoristiti produkte metabolizma nastalih djelovanjem drugih članova u procesu biorazgradnje. Valja naglasiti i da se sastav mješovite mikrobne zajednice može promijeniti tijekom procesa biorazgradnje, zbog čega je važno kontrolirano vođenje tehnološkog procesa utemeljenog na primjeni mješovitih kultura (7). Fiziologija različitih tipova mikroorganizama (heterotrofnih, autotrofnih, aerobnih i anoksičnih) i raznolikost sastava otpadnih voda čimbenici su koji omogućavaju pripremu mješovitih mikrobnih kultura (53). Učinkovitost procesa uklanjanja azo-boja iz otpadne vode može se pospješiti dodatkom odgovarajućeg kosupstrata, kao dodatnog izvora ugljika, znatno smanjujući cijenu cjelokupnog procesa (27, 57). Dodatni izvor hraniva potreban je radi opskrbe mikroorganizama aktivnog mulja redukcijskim ekvivalentom potrebnim za razaranje azo-veze (43). Unatoč postojećim rezultatima istraživanja o mikrobnoj redukciji azo-boja, neodgovorena su još mnoga pitanja o primjeni tog procesa za uklanjanje boja iz velikih volumena industrijskih otpadnih voda (46).

Poželjna su daljnja istraživanja sinergističkog međudjelovanja i biodegradacijske aktivnosti mješovitih mikrobnih zajednica za razgradnju azo-boja, na što se često gleda kao na veliku nepoznanicu (engl. *black box*) (28). Nova dostignuća molekularne biologije i analitičke kemije trebala bi omogućiti diferencijaciju na razini stanice koja bi poboljšala mikrobnu selekciju i eksploataciju, a ujedno pridonijela razjašnjenju postojeće nepoznanice što bi moglo bioaugmentaciju učiniti prikladnijom i pouzdanijom

za praktičnu primjenu (58). Očekuje se da će u budućnosti važno mjesto u uklanjanju postojanih sintetskih boja, primjerice azo-boja, imati tehnologije utemeljene na kombinaciji mikrobioloških, kemijskih i fizikalnih metoda, upravo s ciljem intenziviranja mikrobiološkog potencijala (7). Za sada ne postoji univerzalna metoda učinkovita za uklanjanje svih boja iz otpadnih voda. Odgovornost je i izbor svake industrijske grane da odabere onu metodu pročišćavanja koja odgovara upravo njezinu proizvodnom procesu tijekom kojeg nastaje otpadna voda specifične kakvoće. U budućnosti bi trebalo težiti uporabi najprimjerenije metode s obzirom na strukturu boje, a tome bi moglo pomoći i matematičko modeliranje (19). Novija istraživanja pokazuju da bi rekombinantni sojevi, dobiveni metodama genetičkog inženjerstva, mogli pridonijeti postizanju većega biodegradacijskog kapaciteta radnih mikroorganizama. Osim navedenoga, mikroorganizmi dobiveni genetičkom modifikacijom moraju zadovoljiti kriterij mogućnosti opstanka i održavanja u zajedništvu s nativnim mikroorganizmima mješovite mikrobne zajednice. Smatra se da bi se uporabom rekombinantnih mikroorganizama mogla intenzivirati biodegradacijska učinkovitost postojećih tehnologija (7).

Premda postoji niz laboratorijskih istraživanja o biološkom uklanjanju azo-boja čistim kulturama, one ne nalaze značajniju primjenu u sustavima obrade industrijskih otpadnih voda čija kakvoća varira ovisno o tijeku proizvodnog procesa (59, 60). Daljnji razvoj procesa biološke obrade otpadnih voda sa sadržajem boja trebao bi se temeljiti na identifikaciji najučinkovitijih mikroorganizama, pripremi mješovitih mikrobnih kultura, skraćivanju vremena procesa i provjeri primjenjivosti metodom bioaugmentacije postojećeg aktivnog mulja, što još nije našlo širu primjenu kad je riječ o biološkoj obradi otpadnih voda sa sadržajem boja (9).

## ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

Uklanjanje većinskog dijela onečišćenja iz otpadne vode ne podrazumijeva uvijek i uklanjanje toksičnosti. Naprotiv, nepotpuna razgradnja te nastanak neželjenih sastojaka tijekom te razgradnje tu toksičnost mogu i povećati. Postizanje učinkovite, ekonomski prihvatljive, a s obzirom na konačni ishod, ekološki prihvatljive biorazgradnje kompleksnih sastojaka azo-boja, može se postići provedbom višestupnjevitihih biotehnoških postupaka biorazgradnje utemeljenih



na primjeni mješovitih mikrobnih kultura načinjenih od mikroorganizama specifičnog enzimskog potencijala i metaboličke učinkovitosti. Radi smanjivanja ekoloških problema uvjetovanih postojanošću azo-boja te drugih ksenobiotičkih sastojaka koji nalaze široku industrijsku primjenu, općenito bi bila isplativa i poželjna proizvodnja onih sastojaka koji su svojom strukturom kompatibilni s prirodno postojećim kataboličkim potencijalom mikroorganizama, što iziskuje intenzivan dijalog između kemičara, mikrobiologa, biotehnologa i toksikologa.

#### LITERATURA

1. Siva R. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Curr Sci* 2007;92:916-25.
2. Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White roth fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* 2003;22:161-87.
3. Holme I. Sir William Henry Perkin: a review of his life, work and legacy. *Color Technol* 2006;122:235-51.
4. Anjaneyulu Y, Chary NS, Suman Raj DS. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2005;4:245-73.
5. Adedayo O, Javadpour S, Taylor C, Anderson WA, Moo-Young M. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. *World J Microbiol Biotechnol* 2004;20:545-50.
6. Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:69-80.
7. Forgacs E, Cserháti T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ Int* 2004;30:953-71.
8. Khalid A, Arshad M, Crowley DE. Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;78:361-9.
9. Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeterior Biodegrad* 2007;59:73-84.
10. Hunger K. *Industrial Dyes-Chemistry, Properties, Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2003.
11. Venkataraman K. *The Chemistry of Synthetic Dyes*. London: Academic Press; 1970.
12. Griffiths J. *Colour and Constitution of Organic Molecules*. London: Academic Press; 1976.
13. Zollinger H. *Colour Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. New York: Wiley-VCH; 1991.
14. Cristóvão RO, Tavares AP, Ribeiro AS, Loureiro JM, Boaventura RA, Macedo EA. Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresour Technol* 2008;99:4768-74.
15. Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol* 2005;80:734-6.
16. Yu Z, Wen X. Screening and identification of yeast for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *Int Biodeterior Biodegrad* 2005;56:109-14.
17. Eichlerová I, Homolka L, Benada O, Kofronová O, Hubálek T, Nerud F. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere* 2007;69:795-802.
18. 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* 2001;77:247-55.
19. Slokar YM, Le Marechal M. Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes Pigm* 1998;37:335-56.
20. Edwards LC, Freeman HS. Synthetic dyes based on environmental considerations. Part 3: Aquatic toxicity of iron-complexed dyes. *Color Technol* 2005;121:265-70.
21. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) of 18 December 2006.
22. Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigm* 2003;58:179-96.
23. Vandervivere PC, Bianchi R, Verstraete W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. *J Chem Technol Biotechnol* 1998;72:289-302.
24. Urrea J, Sepúlveda L, Contreras E, Palma C. Screening of static culture and comparison of batch and continuous culture for the textile dye biological decolorization by *Phanerochaete chrysosporium*. *Braz J Chem Eng* 2006;23:281-90.
25. Moosvi S, Keharia H, Madamwar D. Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;21:667-72.
26. Asgher M, Bhatti HN. Decolorization potential of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs. *Biodegradation* 2007;18:311-6.
27. Ambrósio ST, Campos-Takaki GM. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresour Technol* 2004;91:69-75.
28. He F, Hu W, Li Y. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. *Chemosphere* 2004;57:293-301.
29. Georgiou D, Melidis P, Aivasidis A. Use of a microbial sensor-inhibition effect of azo-reactive dyes on activated sludge. *Bioprocess Biosyst Eng* 2002;25:79-83.
30. Clark BJ, Morris M. *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Metcalf and Eddy Inc; 1991.
31. Koprivanac N, Vujević D. Degradation of an azo dye by Fenton type processes assisted with UV irradiation. *Int J Chem Reactor Eng* 2007;5:A56.
32. Oakes J, Gratton P. Kinetic investigations of azo dye oxidation in aqueous media. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1998;9:1857-64.
33. Sandhya S, Padmavathy S, Swaminathan K, Subrahmanyam YV, Kaul SN. Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. *Process Biochem* 2005;40:885-90.

34. Carey JH. An introduction to advanced oxidation processes (AOP) for destruction of organics in wastewater. *Water Poll Res J Can* 1992;27:1-21.
35. Zheng H, Pan Y, Xiang X. Oxidation of acidic dye Eosin Y by the solar photo-Fenton processes. *J Hazard Mater* 2007;141:457-64.
36. Rauf MA, Ashraf SS. Radiation induced degradation of dyes-an overview. *J Hazard Mater* 2009;166:6-16.
37. Supaka N, Juntongjin K, Damronglerd S, Delia ML, Strehaiano P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chem Eng J* 2004;99:169-76.
38. Hong YG, Guo J, Xu Z, Mo C, Xu M, Sun G. Reduction and partial degradation mechanism of naphthylaminesulfonic azo dye amaranth by *Shewanella decolorationis* S12. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75:647-54.
39. Kapdan IK, Kargi F, McMullan G, Marchant R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dye by *C. versicolor*. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:381-7.
40. Novotný C, Rawal B, Bhatt M, Patel M, Šašek V, Molitoris HP. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J Biotechnol* 2001;89:113-22.
41. Dafale N, Rao NN, Meshram SU, Wate SR. Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium – biostimulation and halo tolerance. *Bioresour Technol* 2008;99:2552-8.
42. Sumathi S, Manju BS. Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme Microb Technol* 2000;27:347-55.
43. Barragán BE, Costa C, Márquez MC. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes Pigm* 2007;75:73-81.
44. Tan NCG, Borger A, Slenders P, Svitelskaya A, Lettinga GH, Field JA. Degradation of azo dye Mordant Yellow 10 in a sequential anaerobic and bioaugmented aerobic bioreactor. *Water Sci Technol* 2000;42:337-44.
45. Yu J, Wang X, Yue PL. Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains. *Water Res* 2001;35:3579-86.
46. Cerliell CM, Barclay SJ, Naidoo N, Buckley CA, Mulholland DA, Seniore E. Microbial decolorisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. *Water SA* 1995;21:61-9.
47. O'Neil C, Lopez A, Esteves S, Hawkes FR. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:249-54.
48. Nyanhongo GS, Gomes J, Güubitz GM, Zvauya R, Read J, Steiner W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res* 2002;36:1449-56.
49. Kirby N, Marchant R, McMullan G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;188:93-6.
50. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresour Technol* 1996;58:217-27.
51. Cloete TE, Muyima NYO. *Microbial Community Analysis: The Key to the Design of Biological Wastewater Treatment Systems*. Scientific and Technical Report no. 5. London; IWA Publishing; 1997.
52. Jenkins D, Richard MG, Daigger GT. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Michigan: Lewis Publishers Inc; 1993.
53. Glancer Šoljan M, Ban S, Landeka Dragičević T, Šoljan V, Matic V. Granulated mixed microbial culture suggesting successful employment of bioaugmentation in the treatment of process wastewaters. *Chem Biochem Eng Q* 2001;15: 87-94.
54. Elizalde-González MP, Fuentes-Ramirez LE, Guevara-Villa MRG. Degradation of immobilized azo dyes by *Klebsiella* sp. UAP-b5 isolated from maize bioadsorbent. *J Hazard Mater* 2009;161:769-74.
55. Aivasidis A, Hochscherf H, Rottman G, Hagen T, Mertens MT, Reiners G, Wandrey C. Neuere konzepte zur Prozessüberwachung und -regelung bei der biologischen Stickstoffelimination [New concepts for process monitoring and control in biological nitrogen elimination, in German]. *Abwassertech* 1992;42:48-55.
56. Silva IS, Grossman M, Durrant LR. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *Int Biodeter Biodegr* 2009;63:224-9.
57. Mohanty S, Dafale N, Rao NN. Microbial decolorization of reactive black-5 in a two-stage anaerobic-aerobic reactor using acclimatized activated textile sludge. *Biodegradation* 2006;17:403-13.
58. Thompson IP, Gast CJ, Ciric L, Singer AC. Bioaugmentation for bioremediation – the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 2005;7:909-15.
59. Khehra MS, Saini HS, Sharma DK, Chadha BS, Chimni SS. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes Pigm* 2005;67:55-61.
60. Van Limbergen H, Top EM, Verstraete W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;50:16-23.

### *Summary*

#### AZO DYES, THEIR ENVIRONMENTAL EFFECTS, AND DEFINING A STRATEGY FOR THEIR BIODEGRADATION AND DETOXIFICATION

Intense industrial development has been accompanied by the production of wastewaters of very complex content, which pose a serious hazard to the environment, put at risk sustainable development, and call for new treatment technologies that would more effectively address the issue. One particular challenge in terms of science and technology is how to biodegrade xenobiotics such as azo dyes, which practically do not degrade under natural environmental conditions. These compounds tend to bioaccumulate in the environment, and have allergenic, carcinogenic, mutagenic, and teratogenic properties for humans. Removal of azo dyes from effluents is mostly based on physical-chemical methods. These methods are often very costly and limited, as they accumulate concentrated sludge, which also poses a significant secondary disposal problem, or produce toxic end-products. Biotechnological approach may offer alternative, low-cost biological treatment systems that can completely biodegrade and detoxify even the hard-to-biodegrade azo dyes.

**KEY WORDS:** *biological decolourisation, biotechnology, coloured wastewaters, mixed microbial culture*

#### CORRESPONDING AUTHOR:

Ivana Gudelj  
HIPALAB d.o.o.  
Zagrebačka cesta 181, 10000 Zagreb  
E-mail: [ivana.gudelj@hipalab.hr](mailto:ivana.gudelj@hipalab.hr)