

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Kazimir Antunović

Obezbojenje sintetskih bojila pomoću peleta gljiva

završni rad

Osijek, 2015.

**SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

Obezbojenje sintetskih bojila pomoću peleta gljiva

Naziv nastavnog predmeta

Osnove biotehnologije

Predmetni nastavnici: doc. dr. sc. Natalija Velić

izv. prof. dr. sc. Vinko Krstanović

| | | |
|---------------------|----------------------------|---------------|
| Student: | Kazimir Antunović | (MB: 3257/09) |
| Mentor: | doc. dr.sc. Natalija Velić | |
| Predano (datum): | 10. kolovoza 2015. | |
| Pregledano (datum): | 09. rujna 2015. | |

Ocjena:

Potpis mentora:

Obezbojenje sintetskih bojila pomoću peleta gljiva

Sažetak:

Obojene otpadne vode koje se ispuštaju u prirodne prijemnike, a sadrže velike koncentracije sintetskih bojila, važan su izvor onečišćenja površinskih i podzemnih voda. Prisutnost bojila u industrijskim otpadnim vodama predstavlja problem zbog izrazite otpornosti bojila na promjene temperature i na utjecaj svjetlosti, što uzrokuje njihovo dugo zadržavanje u okolišu. Nadalje, sintetska bojila često su vrlo otporna na razgradnju pomoću mikroorganizama, što čini konvencionalne metode biološke obrade otpadnih voda neučinkovitima za uklanjanje/biorazgradnju bojila. Kao alternativa skupim konvencionalnim metodama uklanjanja bojila, poput koagulacije, flokulacije, oksidacije, ozoniranja ili membranskih procesa, razvijene su mnoge nove metode, uključujući i biološke metode uklanjanja pomoću mikroorganizama. Cilj ovog rada bio je preliminarno istražiti mogućnost upotrebe peleta gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* CCBAS AG 613 u svrhu obezbojenja (uklanjanja) sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodene otopine. Postotak uklanjanja bojila pomoću peleta nakon 24 h iznosio je preko 80 % u gotovo svim provedenim pokusima. Istražen je utjecaj početne koncentracije biomase, koncentracije malahitnog zelenila i dodatka glukoze na postotak uklanjanja bojila. Nadalje, istražena je mogućnost ponovnog korištenja peleta u ponovljivom šaržnom testu obezbojenja. Povećanjem početne koncentracije biomase došlo je do povećanja postotka uklanjanja bojila; dok je povećanje koncentracije bojila, neovisno o početnoj koncentraciji biomase, imalo suprotan učinak. Dodatak glukoze kao vanjskog izvora ugljika u vodenu otopinu bojila rezultirao je nešto manjim postotkom uklanjanja bojila. Ponovnim korištenjem u drugom ciklusu, peleti su zadržali sposobnost obezbojenja vodene otopine malahitnog zelenila, ali u nešto manjem postotku nego prilikom prvog korištenja. Preliminarni rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na mogućnost korištenja micelijskih peleta *T. versicolor* CCBAS AG 613 u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda.

Ključne riječi: sintetsko bojilo, obezbojenje, *T. versicolor*, peleti gljiva, malahitno zelenilo

Decolourisation of synthetic dyes by fungal pellets

Summary:

Discharge of highly coloured effluents, containing different synthetic dyes, is considered to be an important source of surface and ground waters contamination. The presence of dyes in industrial effluents (namely wastewater) is a major concern due to their high thermal stability and photo stability, i.e. their persistence in the environment for an extended period of time. Furthermore, synthetic dyes exhibit recalcitrance towards removal/biodegradation by conventional biological wastewater treatment methods. Many alternative removal methods, including promising biological methods, have been developed towards highly cost conventional approaches such as coagulation-flocculation, oxidation or ozonation and membrane separation. The aim of this study was to preliminary investigate the dye (malachite green) decolourisation ability of white rot fungus *Trametes versicolor* CCBAS AG 613 mycelial pellets. Fungal pellets used could remove more than 80 % of the colour within 24 h. Effect of initial biomass concentration, malachite green concentration and glucose addition on dye percentage removal was tested. Furthermore, the longevity of this decolourisation activity was tested in repeated-batch mode. An increase in the initial biomass concentration positively affected the decolourisation, resulting in higher dye percentage removal. However, the increase in dye concentration had the opposite effect. Glucose addition to the dye solution resulted in slightly lower dye percentage removal. When used in repeated-batch mode, pellets exhibited lower dye percentage removal but still remained over 80 % after 24 h. These preliminary results indicate that white rot fungal pellets could effectively be used for bioremediation of coloured wastewater.

Keywords: synthetic dye, decolourisation, *T. versicolor*, fungal pellets, malachite green

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1.0 Uvod | 1 |
| 2.0 Teorijski dio | 2 |
| 2.1. Bojila | 2 |
| 2.1.1. Malahitno zelenilo | 3 |
| 2.2. Metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda | 4 |
| 2.2.1. Fizikalno - kemijske metode | 4 |
| 2.2.3. Biološke metode | 5 |
| 2.3. Gljive | 6 |
| 2.3.1. Sistematika, klasifikacija i morfologija | 6 |
| 2.3.2. Gljive bijelog truljenja | 7 |
| 3.0 Eksperimentalni dio | 10 |
| 3.1. Zadatak | 10 |
| 3.2. Materijali | 10 |
| 3.2.1. Radni mikroorganizam | 10 |
| 3.2.2. Kemikalije | 11 |
| 3.3. Aparatura | 11 |
| 3.3.1. Tehnička i analitička vaga | 11 |
| 3.3.2. Autoklav | 11 |
| 3.3.3. Inkubator | 12 |
| 3.3.4. Tresilica | 12 |
| 3.3.5. Centrifuga | 12 |
| 3.3.6. Spektrofotometar | 12 |
| 3.3.7. Analizator vlage | 13 |
| 3.4 Metode | 14 |
| 3.4.1. Priprema hranjive podloge i uzgoj radnog mikroorganizma | 14 |
| 3.4.2. Priprema tekuće hranjive podloge i uzgoj micelijskih peleta | 14 |
| 3.4.3. Test obezbojenja | 15 |
| 3.4.5. Određivanje suhe tvari biomase | 16 |
| 4.0 Rezultati i rasprava | 17 |
| 4.1. Utjecaj početne koncentracije biomase na postotak uklanjanja bojila | 17 |
| 4.2. Utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila | 18 |

| | |
|--|----|
| 4.3. Utjecaj dodatka glukoze na postotak uklanjanja bojila | 20 |
| 4.4. Ponovljivi šaržni test obezbojenja | 21 |
| 5.0 Zaključci | 23 |
| 6.0 Literatura | 24 |

1.0 Uvod

U različitim industrijskim procesima svakodnevno nastaju velike količine obojenih otpadnih voda, koje se često uz minimalnu obradu ispuštaju u prirodne prijemnike. Komercijalno je dostupno preko 10 000 različitih vrsta bojila čija je ukupna godišnja proizvodnja preko $7 \cdot 10^8$ kg, pri čemu oko 5 – 10 % navedene količine završi u otpadnim vodama (Yesilada i sur., 2003). Ispuštanje obojenih otpadnih voda u prirodne prijemnike (rijeke, jezera, mora) ima za posljedicu smanjeno prodiranje svjetlosti u prijemnik, što dovodi do smanjenja fotosintetske aktivnosti i koncentracije kisika. To može dovesti do uspostavljanja anaerobnih uvjeta i odumiranja aerobnih organizama u tom vodenom ekosustavu. Nadalje, mnoga bojila pokazuju toksičan i genotoksičan učinak na organizme u vodenim ekosustavima (Annuar i sur., 2009; Erkurt i sur., 2007). Uklanjanje bojila iz otpadnih voda najčešće se provodi fizikalno-kemijskim postupcima, koji imaju svoja ograničenja poput visoke cijene. Stoga je pronalaženje učinkovite i ekonomski prihvatljivije alternative ovim postupcima od velikog značaja. Biološke metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda pomoću odabranih vrsta mikroorganizama intenzivno se istražuju i predstavljaju navedenu alternativu.

Bojila, posebice tekstilna bojila, često su vrlo otporna na razgradnju pomoću mikroorganizama koji su odgovorni za biološku obradu otpadnih voda. Bojila su takve strukture (zbog svoje primjene koja zahtijeva njihovu postojanost) da do njihove biološke razgradnje ne dolazi brzo. Stoga je učinkovitost uklanjanja bojila na konvencionalnim uređajima za biološku obradu otpadnih voda, gdje je zadržavanje vode u sustavu relativno kratko, vrlo mala (Yesilada i sur., 2003).

Biološke metode uklanjanja bojila uključuju i aerobne i anaerobne procese, kao i kombinaciju istih te različite vrste mikroorganizama: bakterije, gljive, alge.

Gljive bijelog truljenja primjer su mikroorganizama koji se često koriste u bioremedijaciji, jer mogu razgraditi velik broj strukturno različitih onečišćujućih tvari, uključujući i velik broj različitih bojila. Oksidativna sposobnost ovih gljiva povezuje se s njihovim enzimskim sustavom (unutarstaničnim te posebice izvanstaničnim). Kada se ove gljive uzgajaju submerzno (dubinski) često stvaraju specifične morfološke oblike, tzv. pelete koji olakšavaju vođenje bioprocesa s ovim gljivama u bioreaktorima (Borràs i sur., 2008).

2.0 Teorijski dio

2.1. Bojila

Upotreba različitih bojila široko je rasprostranjena u industrijama poput tekstilne, farmaceutske, prehrambene, proizvodnji kože, papira i celuloze, elektromaterijala, itd. (Seyis i Subasioglu, 2008.; Maurya i sur., 2006.). Bojilo se može definirati kao tvar koja daje boju supstratu na koji je aplicirana. Prema podrijetlu bojila se dijele na prirodna i sintetska (Gudelj i sur., 2011.). Prirodna bojila dobivaju se iz različitih dijelova biljki te nekih insekata, ali se zbog visoke cijene proizvodnje i slabije učinkovitosti bojanja danas vrlo rijetko koriste. Sintetska bojila dobivaju se kemijskom sintezom, a karakterizira ih značajno niža cijena proizvodnje, veća učinkovitost i veća raznolikost nijansi u odnosu na prirodna bojila. Većinu sintetskih bojila čine organska sintetska bojila aromatske strukture benzenskog i/ili naftalenskog tipa.

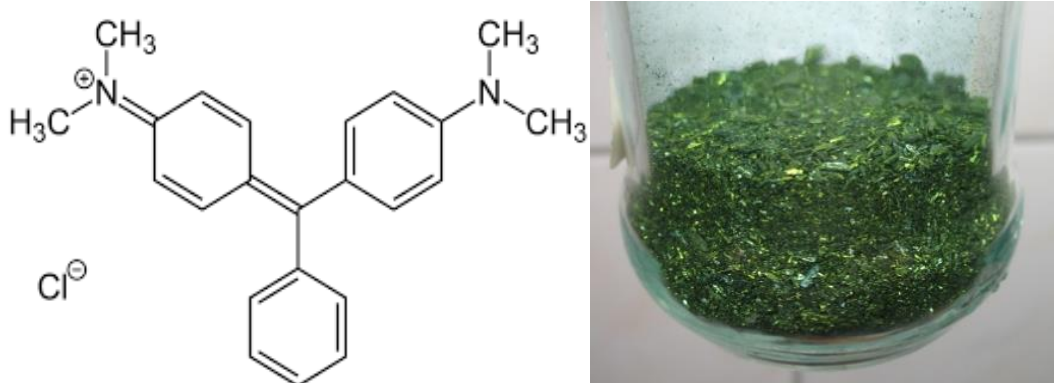
Zajedničko kemijsko svojstvo svih tvari koje pokazuju obojenost je nezasićenost veza u strukturi njihove molekule (Gudelj i sur., 2011.) Nadalje, kemijska struktura bojila uključuje prisutnost dviju funkcionalnih skupina: kromoforne, koja je odgovorna za boju i auksokromne koja određuje intenzitet boje i omogućuje vezanje bojila za podlogu (Ali, 2010.; Wong i sur., 2013.). Bojila se s obzirom na njihovu općenitu kemijsku strukturu i upotrebu mogu grubo podijeliti na anionska (direktna, kisela i reaktivna bojila), kationska (bazična bojila) i ne-ionska (disperzivna bojila) (Lowi sur., 2011.). Ovo je samo jedna od mnogih podjela bojila.

Sintetska bojila koje se koriste u tekstilnoj i farmaceutskoj industriji, kao i u industriji papira, kože i hrane često onečišćuju otpadne vode iz ovih industrija te posljedično i prirodne prijamnike u koje se ispuštaju otpadne vode (Singhi sur., 2011.). Obojene otpadne vode uzrokuju značajno onečišćenje površinskih i podzemnih. Povećane koncentracije bojila u vodi uzrokuju smanjenje koncentracije otopljenog kisika, što posljedično utječe na floru i faunu vodenih ekosustava (Annuari sur., 2009.). Nadalje, obojene otpadne vode smanjuju prodiranje svjetlosti u dublje slojeve vode što dovodi do smanjenja fotosintetske aktivnosti te dostupnosti hrane za organizme koji su prisutni u vodenim ekosustavima. Kao rezultat njihove složene strukture i izražene otpornosti na djelovanje svjetlosti, mikroorganizma i temperature, bojila se dugo zadržavaju u

okolišu te putem hranidbenog lanca mogu ugroziti i zdravlje čovjeka. Mnoga bojila pokazuju mutageni i kancerogeni učinak na čovjeka (Erkurt i sur., 2007.). Zbog svega navedenoga, uklanjanje bojila iz otpadnih voda, kao i njihova razgradnja do manje toksičnih spojeva, područje je intenzivne istraživačke aktivnosti (Seyis i Subasioglu, 2008.).

2.1.1. Malahitno zelenilo

Malahitno zelenilo je bazičan organski spoj čija boja podsjeća na kristale malahita i koji se ubraja u skupinu trifenilmetanskih sintetskih bojila. Kemijska formula malahitnog zelenila je $[\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2]\text{Cl}$ (**Slika 2.1.**). Dobiva se iz benzaldehida i dimetilalinina te se pojavljuje kao sitni sjajni zeleni kristalići koji se otapaju u alkoholu i vodi (Encyclopaedia Britannica, 2013.).



Slika 2.1. Strukturna formula i kristali malahitnog zelenila

(https://en.wikipedia.org/wiki/Malachite_green#/media/File:Malachite_green_oxalate.jpg)

Koristi se u tekstilnoj industriji kao bojilo za pamuk, svilu i kožu, ali i u industriji celuloze i papira. Nadalje, koristi se kao aditiv u prehrambenoj industriji te učinkoviti fungicid na uzgajalištima riba. U medicini i mikrobiologiji malahitno zelenilo koristi se kao fungicid i baktericid te za bojenje bioloških preparata. Malahitno zelenilo općenito se smatra toksičnim i kancerogenim, budući da produkti njegove razgradnje pokazuju mutageno djelovanje (Cheriaa, 2012.).

2.2. Metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda

Niz zakonskih propisa iz područja zaštite okoliša osiguravaju zaštitu i očuvanje kakvoće površinskih i podzemnih voda te obvezuju proizvođače koji u proizvodnom procesu koriste bojila da ista uklone iz otpadnih voda prije ispuštanja u prirodne prijemnike. Tako Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda Prilog 5. (Granične vrijednosti emisija otpadnih voda iz objekata i postrojenja za proizvodnju i preradu tekstila) navodi da u površinskim vodama i sustavu javne odvodnje ne smiju biti prisutna bojila (NN 87/10).

Primjenom konvencionalnih procesa mehaničke i biološke obrade obojenih otpadnih voda ne postiže se zadovoljavajuća učinkovitost uklanjanja bojila (Yesilada i sur., 2003.). Zbog toga je razvijen niz metoda koje se koriste u kombinaciji s konvencionalnim procesima za obradu obojenih otpadnih voda koje su, kao posljedica tehnološkog proizvodnog procesa, osim bojilom često opterećene i drugim organskim i anorganskim onečišćenjima (npr. teškim metalima).

Metode za uklanjanje bojila iz otpadnih voda mogu se podijeliti na fizikalno-kemijske i biološke metode (Karthik i sur., 2014; Robinson, 2001). Fizikalne i kemijske metode, iako najčešće primjenjivane, često su skupe i dovode do nastajanja toksičnih produkata razgradnje ili različitih (kemijskih) muljeva koje treba dodatno zbrinjavati (Sandhya i sur., 2005.). Biološki postupci uklanjanja bojila jeftiniji su od gore navedenih postupaka, ali je praćenje i kontrola procesa teža.

2.2.1. Fizikalno - kemijske metode

Ove metode uključuju adsorpciju, primjenu membranskih procesa, elektrokemijsku obradu, ionsku izmjenu, elektrolizu, oksidaciju s klorom, ozonom ili vodikovim peroksidom (napredni oksidacijski procesi), reakcije redukcije te koagulacije, flokulacije i filtracije.

Od svih navedenih metoda adsorpcija se najčešće koristi u realnim sustavima, jer je učinkovita i upotrebom odgovarajućeg adsorbensa daje efluent koji je u skladu s

propisanom kakvoćom efluenta za ispušt u prirodne prijamnike različitih kategorija. Pri tome ne dolazi do nastajanja različitih razgradnih toksičnih produkata. Najčešće se kao adsorbens koristi aktivni ugljen ili neki drugi dobro definirani i visoko učinkoviti konvencionalni adsorbens. Osnovni nedostatak upotrebe konvencionalnih adsorbensa je njihova visoka cijena, zbog čega se sve više istražuje mogućnost primjene različitih otpadnih materijala (otpadni lignocelulozni materijali) kao jeftinih nekonvencionalnih adsorbensa (Kyzas i sur., 2013.).

Primjena membranskih procesa također je ograničena zbog visoke cijene opreme, ali i problema sa začepljivanjem membrana koje je uslijed toga potrebno često čistiti i mijenjati, čime se smanjuje ekonomska prihvatljivost ovih postupaka.

Napredni oksidacijski procesi temelje se na dovođenju kemijske, električne ili radioaktivne energije, pri čemu nastaju vrlo reaktivni radikali. Reaktivni radikali su čestice s visokim oksidacijskim potencijalom koje brzo i neselektivno reagiraju (odnosno dovode do razgradnje ili transformacije početnog spoja) s većinom organskih tvari (Vujević, 2007.). Najčešći napredni oksidacijski procesi koji se primjenjuju su oksidacija vodikovim peroksidom katalizirana željezovim solima (Fentonov proces), oksidacija ozonom, UV-fotoliza, fotokataliza uz titanov (IV) oksida, elektrokemijska oksidacija, radioliza vode i druge (Vujević, 2007.).

Kemijske metode koje se često koriste su koagulacija i flokulacija. Ovi procesi uključuju dodatak aluminijevih, kalcijevih ili željezovih soli obojenoj otpadnoj vodi, uz nastajanje velikih količina koncentriranih muljeva, što je uz relativno visoku cijenu i osnovni nedostatak ovih procesa (Gupta i Suhas., 2009.).

2.2.3. Biološke metode

Biološka obrada obojenih otpadnih voda u ekonomskom smislu predstavlja najbolja alternativu kemijskim i fizikalnim metodama uklanjanja bojila iz obojenih otpadnih voda. Biološke metode uklanjanja bojila uključuju procese biosorpcije (adsorpcija bojila na živu ili inaktivnu biomasu mikroorganizama), biorazgradnje i biotransformacije. Sposobnost obezbojenja i mineralizacije (potpune razgradnje bojila) bojila istraživana je za velik broj različitih mikroorganizama, pri čemu su i uvjeti pri

kojima su ti procesi vođeni bili različiti aerobni (upotrebom aerobnih bakterija, gljiva, algi), anaerobni (anaerobne bakterijske vrste) ili su bili kombinirano aerobno-anaerobni (Gupta i Suhas, 2009.).

Prednosti bioloških metoda uklanjanja bojila su niska cijena, visoka učinkovitost uklanjanja bojila, često potpuna biorazgradnja bojila (mineralizacija) ili nastajanje razgradnih produkata koji su najčešće manje toksični od polaznog spoja. Osnovi nedostaci su različita tehnička ograničenja poput smanjene mogućnosti kontrole procesa, zahtijevanih većih površina za opremu u kojoj se odvija proces, veća osjetljivost na promjene okolišnih uvjeta (pH, temperatura, koncentracija kisika, prisutnost različitih toksičnih spojeva), manja fleksibilnost dizajniranja i vođenja procesa, duže vrijeme potrebno za uklanjanje bojila uslijed uzgoja mikroorganizama (vrijeme potrebno za uzgoj i razgradnju bojila). Sve navedeno još uvijek predstavlja prepreku za širu primjenu ovih metoda na uređajima za biološku obradu otpadnih voda (Gupta i Suhas, 2009.).

2.3. Gljive

Mikologija je znanstvena disciplina koja se bavi izučavanjem gljiva. Gljive su svoju primjenu pronašle kako u medicini (proizvodnja antibiotika i drugih lijekova koji se temelje na biološki aktivnim tvarima iz gljiva), tako i u prehrambenoj industriji (fermentirani proizvodi poput vina, piva, kruha, mliječnih i mesnih proizvoda), ali i proizvodnji tinte i boja. Gljive su među najrasprostranjenijim organizmima na Zemlji te imaju važnu ulogu održavanju ekološke ravnoteže.

2.3.1. Sistematika, klasifikacija i morfologija

Gljive (fungi) su posebna skupina organizama koja obuhvaća približno 250.000 vrsta, koje uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, tzv. mesnate gljive (Duraković, 2003.). Svaka vrsta gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina (razreda) koji se razlikuju prema vrsti spora, morfologiji hifa i

spolnom ciklusu: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes*. Za identifikaciju i klasifikaciju gljiva potrebno je poznavati način razmnožavanja gljiva, tip micelija, i nastanak staničnih struktura (Duraković, 2003.).

Gljive su eukariotski, heterotrofni organizmi, a mogu živjeti kao: paraziti, saprofiti i simbionti. Zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu. Uglavnom za svoj rast trebaju blago kisele supstrate, zbog čega su česti paraziti na biljkama (Miličević, 2006.). Gljive mogu biti jednostanične ili višestanične. Kvasci su jednostanične gljive, dok su plijesni i više gljive predstavnici višestaničnih gljiva. Karakterizira ih filamentozan rast u oblik hifa (stanične tvorevine nitastog oblika) čiji ukupanobim nazivamo micelij (Duraković, 2003.). Filamentozne gljive koriste se u biotehnološkim procesima za proizvodnju primarnih i sekundarnih metabolita, antibiotika, enzima, polisaharida i vitamina (Borrás i sur., 2008.)

Pri submerznom (dubinskom) uzgoju filamentoznih gljiva velik broj čimbenika (vrsta gljive, sastav hranjive podloge, pH, temperatura, mehanička sila) utječe na razvoj specifičnih morfoloških oblika koji mogu varirati od disperznih micelijskih filamenta do guste isprepletene micelijske mase različite kompaktnosti, zvane peleti. Rast kulture u obliku disperznih micelijskih filamenta dovodi do povećanja viskoznost u bioreaktoru, posebice pri intenzivnom miješanju. To posljedično dovodi do smanjenog prijenosa kisika i hranjivih tvari, kao i do pojačanog rasta biomase po stijenkama bioreaktora, mješala i senzora koji se nalaze u bioreaktoru. Kada se u bioprocesu koriste peleti, viskoznost je mala i ne dolazi do rasta biomase po gore navedenim površinama (Borrás i sur., 2008.). Prijenos tvari i energije također može predstavljati problem prilikom rasta gljiva u obliku peleta, što može uzrokovati nejednak porast peleta. Tako je kod velikih peleta njihova vanjska površina metabolički aktivna, dok se u unutrašnjost pronalaze "mrtve" zone (García, 2006.).

2.3.2. Gljive bijelog truljenja

Poznate su mnoge vrste gljiva, no samo neke od njih imaju sposobnost razgradnje i mineralizacije glavnih sastavnica (polimera) drva - celuloze, hemiceluloze i lignina. Gljive koje imaju sposobnost razgradnje drva (gljive truležnice) dijele se na gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja, ovisno o karakteristikama drva koje razgrađuju i

razgradnih produkata nastalih razgradnjom lignoceluloznih sastavnica (Sigoillot i sur., 2012.).

Razgradnja polimera odvija se djelovanjem različitih hidrolitičkih i oksidativnih enzima koje ove gljive sintetiziraju, pri čemu su najvažniji izvanstanični enzimi esencijalni za razgradnju lignina: ligninperoksidaza, mangan peroksidaza i lakaza (Elisashavili et al., 2009.).

Ovisno o redoslijedu razgradnje polimera drveta, utvrđena su dva načina bijelog truljenja: simultano i selektivno truljenje (Mahajan, 2011., Liese, 1970.). Simultano bijelo truljenje karakterizira simultana razgradnja svih sastavnica u početnim i završnim fazama bijelog truljenja. Primjeri gljiva sa sposobnošću simultanog bijelog truljenja su *Fomesfomentarius*, *Phellinusrobustus* i *Trametes versicolor* (**Slika 2.2.**) (Mahajan, 2011., Blanchette, 1994., Blanchette, 1984.).



Slika 2.2. *Trametes versicolor*

(https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor#/media/File:Trametes.versicolor.Lindsley-cropped.jpg)

Selektivno bijelo truljenje karakterizira razgradnja lignina i hemiceluloze u početnim fazama truljenja, pri čemu celuloza ostaje intaktna. Tek u kasnijim fazama dolazi do razgradnje celuloze. *Ceriporiopsis subvermispora* i *Phlebia radiata* su ponajbolje istražene gljive koje se ubrajaju u ovu skupinu (Mahajan, 2011., Fackler i sur., 2010., Blanchette, 1991., Eriksson, 1977.).

Općenito, sposobnost biorazgradnje strukturno različitih spojeva koji su inače teško biorazgradivi gljive bijelog truljenja mogu zahvaliti upravo njihovom jedinstvenom enzimskom sustavu za razgradnju lignina. Gljive bijelog truljenja koje su često korištene u istraživanjima s ciljem obrade (obezbojenja), odnosno bioremedijacije obojenih otpadnih voda su *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*, zbog njihove sposobnosti razgradnje velikog broja ksenobiotika (Forgacs i sur., 2004.).

3.0 Eksperimentalni dio

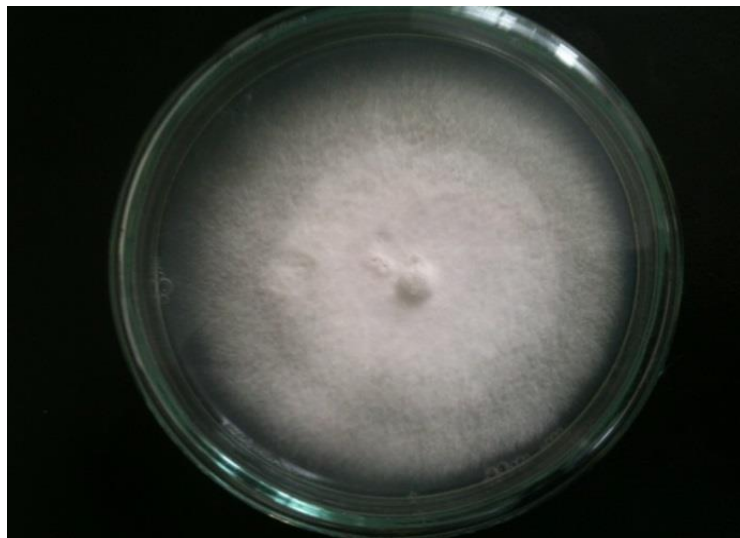
3.1. Zadatak

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost upotrebe peleta gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u svrhu obezbojenja (uklanjanja) sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodene otopine.

3.2. Materijali

3.2.1. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* CCBAS AG 613 (Culture Collection of *Basidiomycetes*, Prag, Češka) (**Slika 3.1.**). Gljiva je uzgajana na krumpirovom agaru tijekom sedam dana pri 27 °C. Kao inokulum u daljnjim pokusima korišteni su micelijski diskovi promjera 6 mm.



Slika 3.1. Radni mikroorganizam *T. versicolor* CCBAS AG 613 na krumpirovom agaru

3.2.2. Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- glukoza (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- KH_2PO_4 (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- NH_4NO_3 (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- Na_2HPO_4 (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka)
- krumpirov agar (Biolifeltalianasrl, Milano, Italija)
- kvašчев ekstrakt (Biolifeltalianasrl, Milano, Italija)
- malahitno zelenilo (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

3.3. Aparatura

3.3.1. Tehnička i analitička vaga

U radu su za vaganje korištene tehnička vaga (RADWAG, Tehnicaunitronik, tip: WPS 1200, Njemačka) te analitička vaga (EXPLORER, Ohaus, Švicarska).

3.3.2. Autoklav

Za sterilizaciju laboratorijskog posuđa, hranjive podloge i otopine bojila korišten je autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd). (**Slika 3.2.**)



Slika 3.2. Autoklav

3.3.3. Inkubator

Priprema radne mikrobne kulture provedena je u inkubatoru (BD 53#04-63769, Binder, Tuttlingen, Njemačka).

3.3.4. Tresilica

Za submerzan uzgoj radnog mikroorganizma te eksperimente obezbojenja korištena je orbitalna tresilica (IKA-KS 260 basic, Staufen, Njemačka).

3.3.5. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na centrifugi IKA mini G (Staufen, Njemačka) (**Slika 3.3.**)



Slika 3.3.Centrifuga

3.3.6. Spektrofotometar

Koncentracija bojila određena je spektrofotometrijski pomoću UV-VIS spektrofotometra (SHIMADZU, UV-1700 Pharma Spec., Njemačka) (**Slika 3.4.**).



Slika 3.4. Spektrofotometar

3.3.7. Analizator vlage

Za određivanje udjela suhe tvari biomase (peleta) korišten je halogeni analizator vlage (HR73 MoistureAnalyzer", MettlerToledo, Švicarska) (**Slika 3.5.**).



Slika 3.5. Halogeni analizator vlage

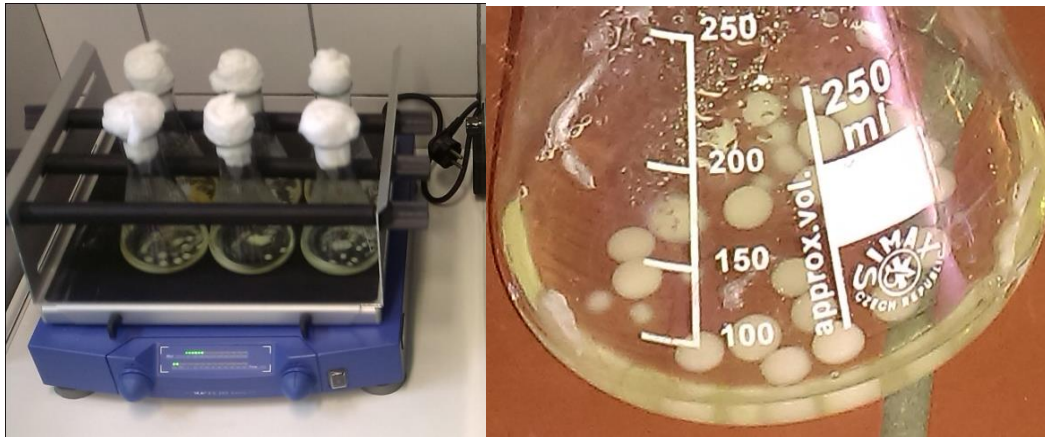
3.4. Metode

3.4.1. Priprema hranjive podloge i uzgoj radnog mikroorganizma

Izvagano je 42 g krumpirovog agara, dodano 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45 °C do 50 °C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana i razlivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Ovako pripravljene podloge korištene su za uzgoj radnog mikroorganizama *T. versicolor*. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

3.4.2. Priprema tekuće hranjive podloge i uzgoj micelijskih peleta

Pripremljena je hranjiva podloga za uzgoj inokuluma sljedećeg sastava: 10 g L⁻¹ glukoze, 0,8 g L⁻¹ KH₂PO₄, 2 g L⁻¹ NH₄NO₃, 0,4 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄ x 7H₂O i 2 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta. Po 40 mL ovako pripravljene otopine u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 300 mL sterilizirano je u autoklavu na temperaturi 121 °C pri tlaku od 2,1 atmosfere kroz 20 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja podloga je inokulirana s 10 mL suspenzije spora radnog mikroorganizma. Suspenzija spora pripravljena je na način da je u 40 mL sterilizirane vode sterilno prenesen micelijski disk (promjera 6 mm) s krute hranjive podloge te je sve dobro homogenizirano kroz 15 min. Tikvice s 40 mL hranjive podloge i 10 mL suspenzije spora zatvorene su vatenim čepovima i ostavljene na tresilici pri 120 okr min⁻¹ i sobnoj temperaturi (**Slika 3.6.**). Nakon 5 dana uzgojena kultura u obliku micelijskih peleta profiltrirana je na filter papiru, obilno isprana destiliranom vodom i korištena u daljnjim testovima sposobnosti obezbojenja.



a)

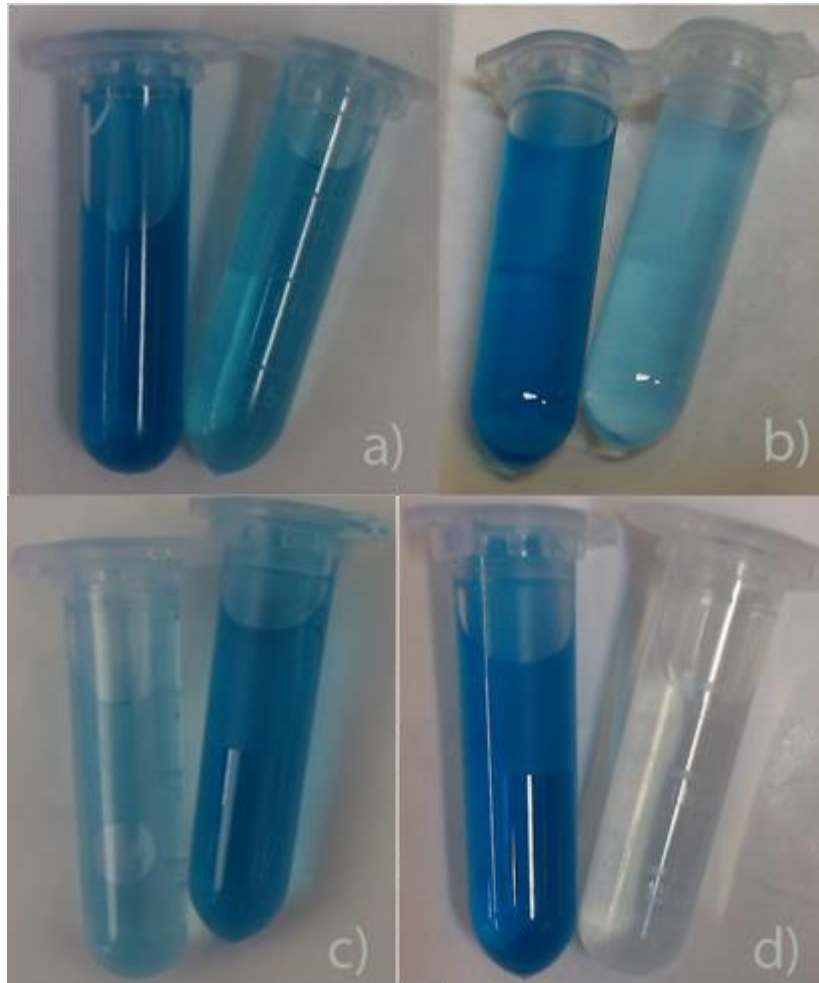
b)

Slika 3.6. Submerzni uzgoj gljive *T. versicolor* (uzgoj peleta) na tresilici (a) i izgled peleta (b)

3.4.3. Test obezbojenja

U Erlenmeyerove tikvice od 300 mL dodano je 50 mL otopine bojila (masene koncentracije 5, 15 i 25 mg L⁻¹). Nakon toga u otopine bojila dodana su micelijski peleti (početna koncentracija biomase) u koncentraciji 10 i 20 g L⁻¹ (izraženo kao g mokre biomase / V otopine bojila). Slijepa proba sadržavala je samo 50 mL otopine bojila, bez dodatka micelijskih peleta. Tikvice su zatvorene vatenim čepovima te su ostavljene na tresilici pri 120 okr min⁻¹ i sobnoj temperaturi. Uzorci za određivanje koncentracije bojila izuzimani su nakon 2, 4, 6 i 24 sata. Uzorci su zatim centrifugirani na 6000 okr min⁻¹ u trajanju od 5 minuta te je supernatant korišten za određivanje koncentracije bojila spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 623 nm.

Ponovljivi šaržni test obezbojenja proveden je prema gore opisanom postupku, osim što su korišteni već korišteni micelijski peleti dobiveni filtriranjem obezbojene otopine bojila nakon 24 h.



Slika 3.7. Obezbojenje nakon: **a)** 2 h, **b)** 4 h, **c)** 6 h i **d)** 24 h

3.4.5. Određivanje suhe tvari biomase

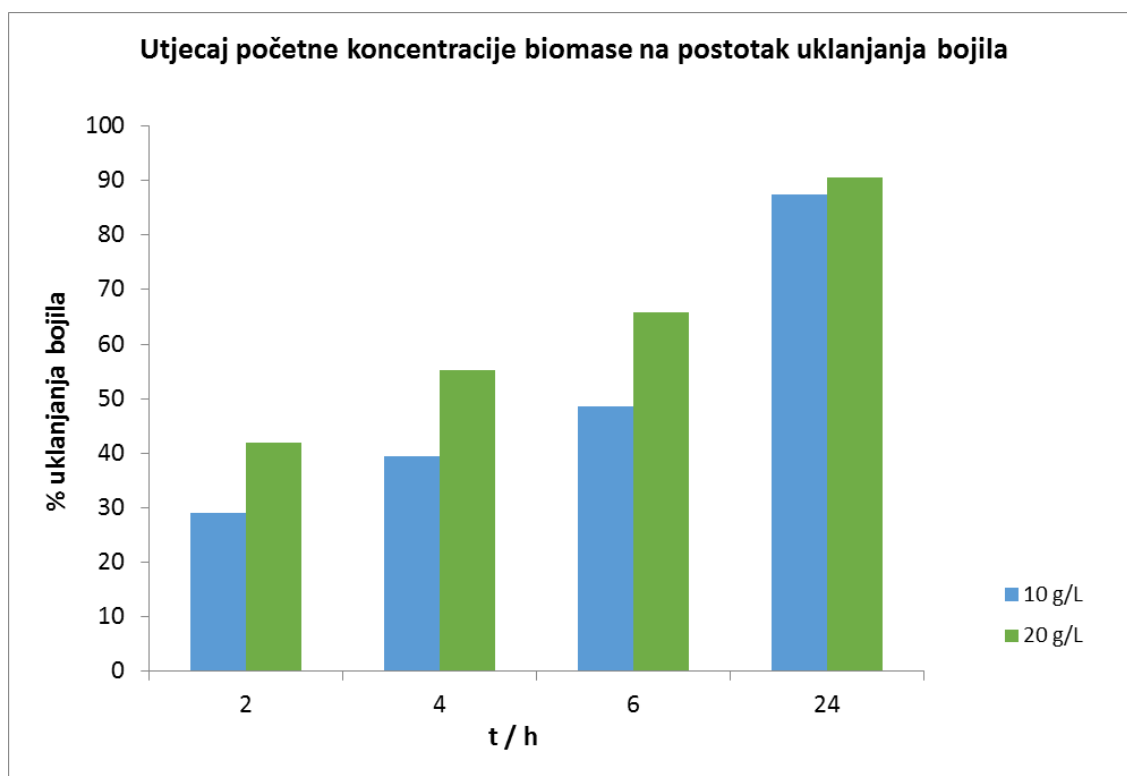
Uzorci peleta mase 2 g preneseni su na aluminijske posudice halogenog analizatora vlage. Halogeni analizator vlage opremljen je vagom te izvorom topline koji generira infracrveno zračenje. Generirana toplina dovodi do isparavanja vode iz uzorka, što kao posljedicu ima smanjenje mase uzorka koja se kontinuirano mjeri te prikazuje na zaslonu uređaja. Sušenje se provodi do konstantne mase.

4.0 Rezultati i rasprava

U ovom radu filamentozna gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG 613 uzgajana je submerzno (dubinski) s ciljem dobivanja peleta - guste isprepletene micelijske mase. Istraživana je sposobnost obezbojenja vodene otopine sintetskog bojila malahitnog zelenila dodatkom peleta *T. versicolor*. Zbog njezine sposobnosti razgradnje velikog broja strukturno različitih spojeva, od kojih su mnogi ksenobiotici, *T. versicolor* je gljiva koja je često korištena u istraživanjima u svrhu bioremedijacije obojenih otpadnih voda (Forgacs i sur., 2004.). Tijekom istraživanja ispitan je utjecaj početne koncentracije biomase, koncentracije bojila te dodatka glukoze u vodenu otopinu bojila na postotak uklanjanja bojila nakon 2, 4, 6 i 24 sata uzgoja. Kako bi se istražilo radi li se o biosorpciji bojila ili mehanizam obezbojenja uključuje i djelovanje fungalnih enzima proveden je ponovljeni test obezbojenja upotrebom već korištenih peleta.

4.1. Utjecaj početne koncentracije biomase na postotak uklanjanja bojila

Iz rezultata prikazanih na slici 4.1. vidljiv je kontinuirani porast postotka uklanjanja bojila iz vodene otopine s vremenom. Pri tome je u prvih šest sati eksperimenta postotak uklanjanja veći kada je upotrijebljena veća početna koncentracija biomase (udjel suhe tvari biomase iznosio je 4,25 %). Nakon 24 sata ova razlika se smanjuje i postotak uklanjanja je vrlo sličan za obje početne koncentracije biomase i iznosi oko 90 %. Ovo je u skladu s istraživanjem koje su proveli Yesilada i suradnici (2002.) koji su istraživali uklanjanje bojila *Astrazon Red FBL* pomoću micelijskih peleta gljive bijelog truljenja *Funalia trogii*, kao i s istraživanjem koje su proveli Zheng i suradnici (1999) s *Penicillium* izolatom i bojom *Poly R-478*. Oba istraživanja pokazala su da mehanizam obezbojenja bojila u početnim fazama eksperimenta uključuje biosorpciju, nakon čega slijedi obezbojenje djelovanjem enzima, odnosno mikrobnog metabolizma. Pri većoj početnoj koncentraciji biomase više je adsorpcijskih mjesta dostupnih za vezivanje bojila, što se očituje većom učinkovitošću uklanjanja bojila u prvih šest sati eksperimenta.



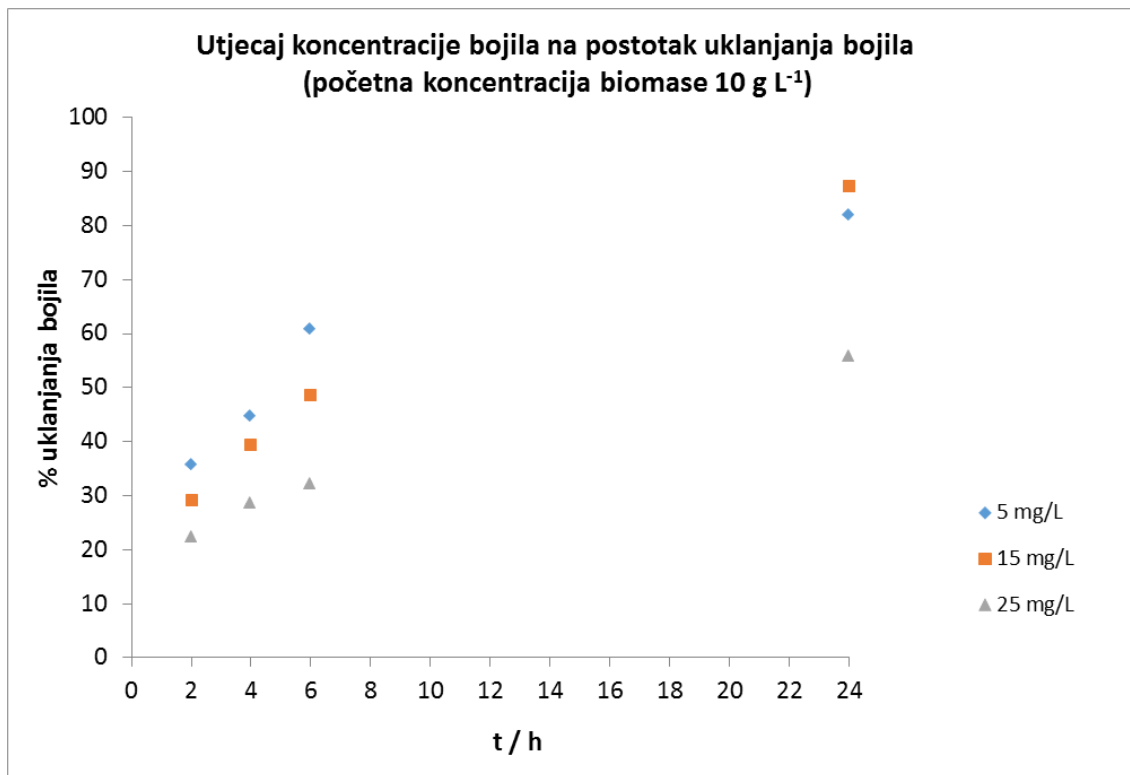
Slika 4.1. Utjecaj početne koncentracije biomase na postotak uklanjanja bojila ($T = 25$
 $^{\circ}\text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{\text{malahitno zelenilo}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$)

4.2. Utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila

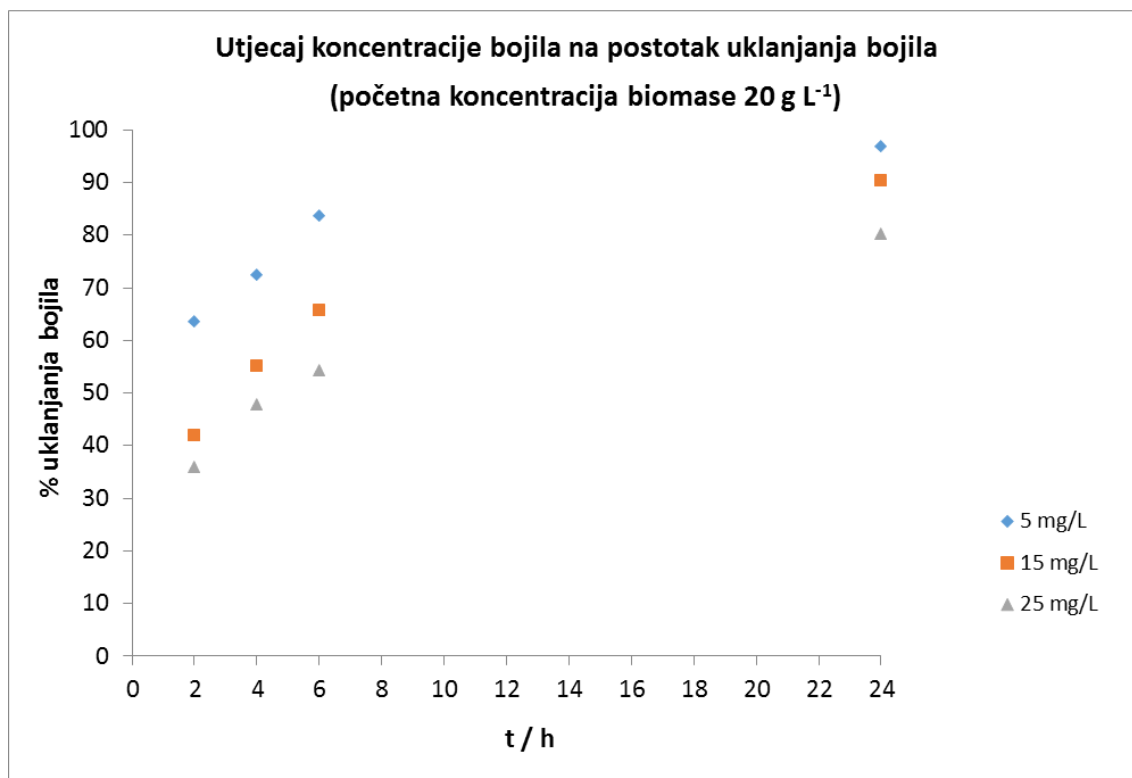
Koncentracije bojila određene u obojenim otpadnim vodama kreću se u rasponu od $10 - 50 \text{ mg L}^{-1}$ (Nigam i sur., 2000.). Odabrane koncentracije malahitnog zelenila u ovom istraživanju iznosile su $5, 15$ i 25 mg L^{-1} , pri čemu je istraživana utjecaj povećanja koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila pomoću peleta, budući da se malahitno zelenilo u mikrobiologiji koristi i kao fungicid. Rezultati su prikazani na slikama 4.2. i 4.3.

Veći postotak uklanjanja za sve odabrane koncentracije malahitnog zelenila postignut je pri većoj početnoj koncentraciji biomase (20 g L^{-1}), što je u skladu s već spomenutom konstatacijom o dvojakom mehanizmu uklanjanja bojila: biosorpcijom i mikrobnim metabolizmom. Povećanjem koncentracije bojila došlo je do smanjenja učinkovitosti uklanjanja bojila, neovisno o upotrijebljenoj početnoj koncentraciji biomase. Ovo smanjenje posebno je vidljivo pri početnoj koncentraciji biomase 10 g L^{-1} i koncentraciji

malahitnog zelenila 25 mg L^{-1} , kada je postignut najniži postotak uklanjanja bojila nakon 24 h od 55,71 %. Za istu početnu koncentraciju biomase postotak uklanjanja pri koncentraciji bojila 5 mg L^{-1} nakon 24 h iznosio je 81 %, a pri koncentraciji bojila 15 mg L^{-1} 87 %. Kada je početna koncentracija biomase iznosila 20 g L^{-1} najveći postotak uklanjanja nakon 24 h iznosio je 96,86 %, dok je pri koncentraciji bojila od 25 mg L^{-1} taj postotak iznosio 80,24 %. Ovo je u skladu s istraživanjima koja su pokazala da velike koncentracije bojila mogu imati toksičan učinak na radni mikroorganizam, što dovodi do smanjenja učinkovitosti procesa, odnosno povećanje koncentracije bojila dovodi do smanjenja postotka uklanjanja bojila (Yesilada i sur., 2002., Yang i Yu, 1996.).



Slika 4.2. Utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila ($T = 25 \text{ }^{\circ} \text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomasa}} = 10 \text{ g L}^{-1}$)



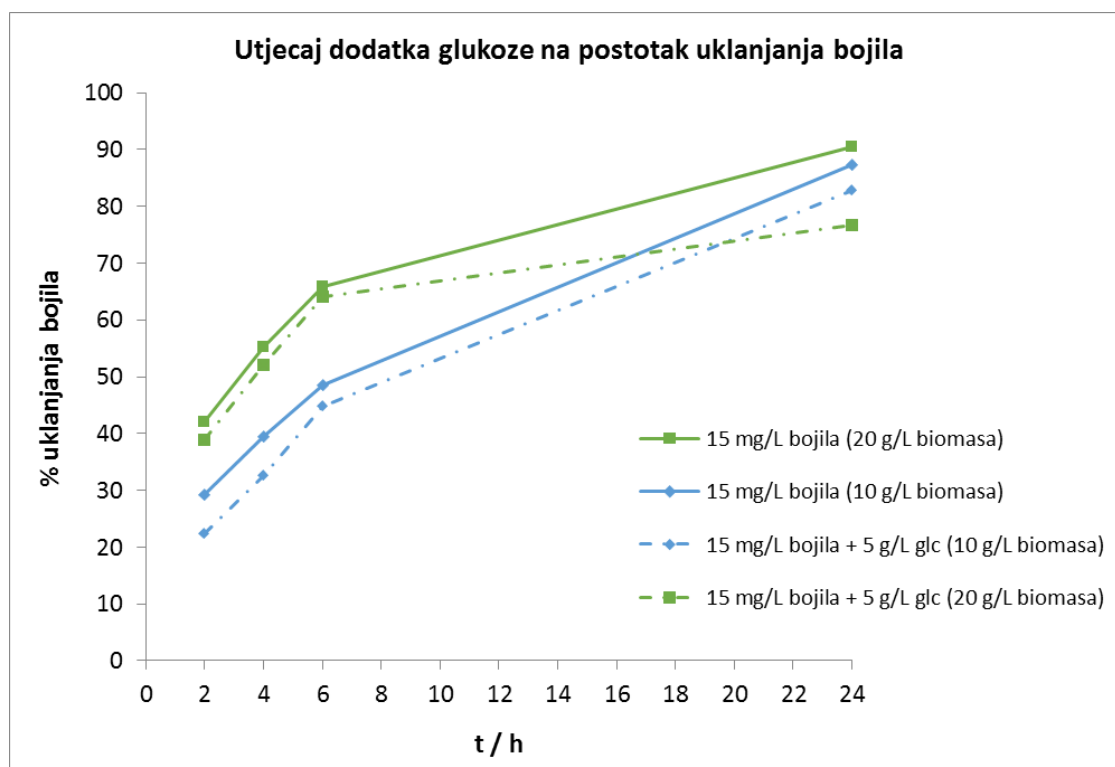
Slika 4.3. Utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila ($T = 25^{\circ} \text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $y_{\text{biomasa}} = 20 \text{ g L}^{-1}$)

4.3. Utjecaj dodatka glukoze na postotak uklanjanja bojila

Neka istraživanja pokazala su da se dodatkom vanjskog izvora ugljika, ali i hranjivih tvari (dušika i fosfora) u otopinu bojila koja sadrži micelijske pelete gljiva povećava učinkovitost uklanjanja bojila, posebice kada se peleti višekratno koriste (ponovljivi test obezbojenja). Dodatni izvor ugljika, poput glukoze, pri tome potiče (ubrzava) proces obezbojenja i povećava stabilnost micelijskih peleta (Yesilada i sur., 2003.; Knapp i sur., 1997.). Kako bi se istražio utjecaj dodatka glukoze na postotak uklanjanja malahitnog zelenila pomoću peleta *T. versicolor*, pripravljena je otopina bojila koncentracije 15 mg L^{-1} uz dodatak 5 g L^{-1} glukoze, pri čemu je i početna koncentracija biomase varirala. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 4.4.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je pri obje početne koncentracije biomase došlo do smanjenja postotka uklanjanja bojila kada je u otopinu bojila dodan vanjski izvor ugljika, odnosno glukoza. U prvih 6 sati provođenja eksperimenta veći postotak

uklanjanja postiže se pri većoj početnoj koncentraciji biomase, dok je u kasnijim fazama eksperimenta (nakon 24 h) vidljivo naglo povećanje postotka uklanjanja pri manjoj početnoj koncentraciji biomase. Pri tome se postotak uklanjanja približava najvećoj vrijednosti od 90,51 % postignutoj pri početnoj koncentraciji biomase od 20 g L⁻¹ i bez dodatka glukoze u vodenu otopinu bojila.

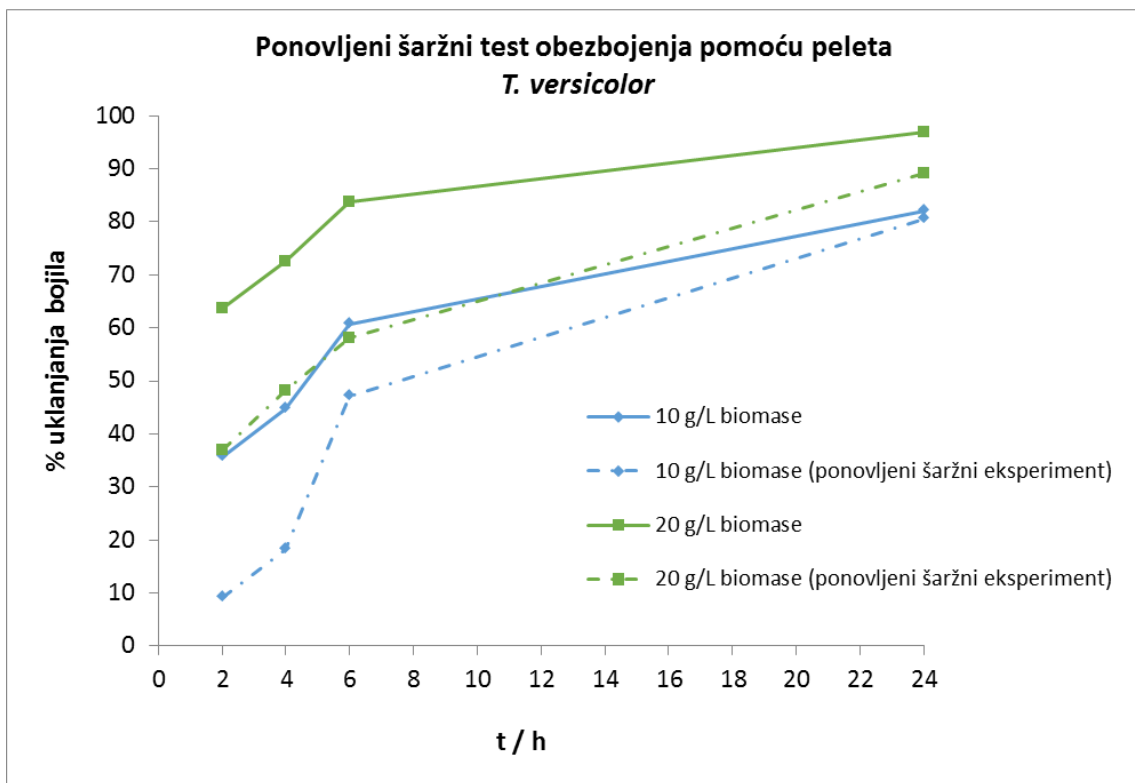


Slika 4.4. Utjecaj dodatka glukoze na postotak uklanjanja bojila ($T = 25^{\circ} \text{C}$, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{\text{malahitno zelenilo}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{\text{glukoza}} = 5 \text{ g L}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomasa}} = 10 \text{ i } 20 \text{ g L}^{-1}$)

4.4. Ponovljivi šaržni test obezbojenja

Kako bi se istražila mogućnost ponovnog korištenja peleta u testovima obezbojenja, odnosno sposobnost obezbojenja bojila kroz duži vremenski period, provedeni su ponovljivi šaržni testovi obezbojenja. Nakon prvog ciklusa (testa obezbojenja) u trajanju od 24 sata, peleti su ponovno korišteni u drugom ciklusu također u trajanju od 24 sata. Ponovljivi šaržni test obezbojenja proveden je pri različitim početnim koncentracijama biomase i koncentraciji bojila od 5 mg L⁻¹. Dobiveni

rezultati prikazani su na slici 4.5. Iz rezultata je vidljivo da u drugom ciklusu obezbojenja dolazi do kontinuiranog smanjenja postotka uklanjanja bojila, bez obzira na početnu koncentraciju biomase, što je u skladu s literaturom (Yesilada i sur., 2003.). Ovi rezultati su očekivani, posebice u prvim fazama pokusa kad se uklanjanje odvija biosorpcijom, budući da je dio adsorpcijskih mjesta već zauzet adsorbatom (bojilom) u prvom ciklusu obezbojenja. U kasnijim fazama (nakon 24 h) kada prevladava uklanjanje mikrobnim metabolizmom, odnosno djelovanjem enzima, smanjuje se razlika u postotku uklanjanja za prvi i drugi ciklus obezbojenja. Povećanjem početne koncentracije biomase dolazi do povećanja postotka uklanjanja bojila i u ponovljivom šaržnom testu obezbojenja.



Slika 4.5. Ponovljivi šaržni test obezbojenja pomoću peleta *T. versicolor* ($T = 25^{\circ} \text{C}$, $n = 120$ okr min^{-1} , $\gamma_{\text{malahitno zelenilo}} = 5 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomasa}} = 10 \text{ i } 20 \text{ g L}^{-1}$)

5.0 Zaključci

Na osnovi dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Submerzni uzgoj *Trametes versicolor* CCBAS AG 613 na tresilici rezultirao je rastom ove gljive u obliku specifičnog morfološkog oblika, tzv. micelijskih peleta.

S dobivenim micelijskim peletima *T. versicolor* CCBAS AG 613 uspješno su provedeni testovi obezbojenja vodene otopine sintetskog bojila malahitnog zelenila različitih koncentracija. Postotak uklanjanja nakon 24 h iznosio je preko 80 % u gotovo svim provedenim pokusima. Najveći postotak uklanjanja bojila od 96,86 % postignut je pri početnoj koncentraciji biomase od 20 gL⁻¹ i koncentraciji bojila od 5 mg L⁻¹.

Povećanjem početne koncentracije biomase došlo je do povećanja postotka uklanjanja bojila.

Povećanjem koncentracije bojila, neovisno o početnoj koncentraciji biomase, došlo je do smanjenja postotka uklanjanja bojila.

Dodatak vanjskog izvora ugljika (glukoza) u vodenu otopinu bojila rezultirao je nešto manjim postotkom uklanjanja bojila.

Micelijski peleti gljive *T. versicolor* CCBAS AG 613 višekratno su korišteni (2 ciklusa), pri čemu su zadržali sposobnost obezbojenja vodene otopine malahitnog zelenila u nešto manjem postotku nego prilikom prvog korištenja.

Preliminarni rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na mogućnost korištenja micelijskih peleta *T. versicolor* CCBAS AG 613 u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se bolje definirao proces, odnosno optimirali uvjeti vođenja procesa (pH, *T*, intenzitet miješanja, dodatak hranjivih tvari i sl.) te kako bi se identificirali produkti mikrobne razgradnje malahitnog zelenila.

6.0 Literatura

- "malachitegreen." Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica Ultimate Reference Suite. Chicago: Encyclopædia Britannica, 2013.
- Ali H (2010) Biodegradation of synthetic dyes. *Water, Air & Soil Pollution* 213 (1-4): 251-273
- Annur, M.S.M., Adnan, S., Vikineswary, S., Chisti Y. (2009): Kinetics and energetics of azo dye decolorization by *Pycnoporus sanguineus*, *Water, Air Soil Poll.* 202, 179-188.
- Blanchette, R.A. (1984) Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin
- Blanchette, R.A. (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annual Reviews of Phytopathology* 29:381-398
- Blanchette, R.A., Obst, J.R., Timell, T.E. (1994) Biodegradation of compression wood and tension wood by white and brown-rot fungi. *Holzforschung* 48: 34-42.
- Borrás E., Blànzeq P., Sàrra M., Caminal G., Vicent T.: *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up, *Biochemical Engineering Journal* 42, 2008., 61.-66.
- Cheriaa J., Khairredine M., Rouabhia M., Bakhrouf A.: Removal of Triphenylmethane Dyes by Bacterial Consortium, *The Scientific World Journal*, 9 pages, 2012. degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (3):647-653
- Duraković S., Duraković L.: *Mikrobiologija u biotehnologiji*, Kugler, Zagreb, 2003.
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Khardziani, T., Agathos S. N. (2009): Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25(2), 331–339.
- Emrah A. Erkurt, Ali Ünyayar, Halil Kumbur: Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry* 42: 1429–1435, 2007.

- Eriksson K.E., Ander P., (1977.) Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiology Plant* 41:239-248
- Fackler K., Stevanic J., Ters T., Hinterstoisser B., Schwanninger M., Salmén L. (2010.) Localisation and characterisation of incipient brown-rot decay within spruce wood cell walls using FTIR imaging microscopy. *Enzyme and Microbial Technology* 47 (6):257-267
- Forgacs E., Cserhati T., Oros G., Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International* 30, 953-971, 2004.
- García-Soto Mariano J., Botello-Álvarez Enrique, Jiménez-Islas Hugo, Navarrete-Bolaños José, Barajas-Conde Eloy and Rico-Martínez Ramiro: Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures, *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 2006: 17-34.
- George Z. Kyzas, Margaritis Kostoglou, Nikolaos K. Lazaridis and Dimitrios N. Bikiaris: Decolorization of Dyeing Wastewater Using Polymeric Absorbents - An Overview. Department of Oenology and Beverage Technology, Technological Educational Institute of Kavala, Greece: 177-206, 2013.
- Gudelj I., Hrenović J., Landeka T., Dragičević, Delaš F., Šoljan V. i Gudelj H: Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnoške strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, Volume 62, Stranice 91.-100.*, 2011.
- Gupta, V. K., Suhas. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal--a review. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2313–42.
- Isil Seyis i Tugba Subasioglu: Comparison of live and dead biomass of fungi on decolorization of methyl orange. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (13), pp.: 2212-2216, 2008.
- Knapp, J.S., Zhang, F.M., Tapley, K.N., 1997. Decolourisation of Orange II by wood-rotting fungus. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 289-296.
- Liese W. (1970) Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration as reported in wood and tree fungi by Schmidt Olaf; 2006. *Ann Rev Phytopath* 8:231-258

- Low L.W., Teng T.T., Ahmad A., Morad N., Wong Y.S. (2011) A novel pretreatment method of lignocellulosic material as adsorbent and kinetic study of dye waste and sorption. *Water, Air, Soil Pollut* 218: 293-306
- Miličević T.: Mikrobiologija morfologija i sistematika fitopatogenih gljiva. Zagreb, 2006.
- Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D. & Marchant, R.: Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues, *Bioresource Technology*, 72, 219–226, 2000.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, Narodne novine 87/10
- Sandhya S., Padmavathy S., Swaminathan K., Subrahmanyam YV, Kaul SN: Micro aerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. *Process Biochem*, 40:885-90, 2005.
- Sigoillot J.C., Berrin J.G., Bey M., Lesage-Meessen L., Levasseur A., Lomascolo A., Record E., Uzan-Boukhris E.: Fungal Strategies for Lignin Degradation. In Lapierre C., Jouanin L. (Eds) *LIGNINS: BIOSYNTHESIS, BIODEGRADATION AND BIOENGINEERING* in: *Advances in Botanical Research*, 61:263-308. Elsevier, Amsterdam, 2012.
- Singh G., Koerner T., Gelinas J.-M., Abbott M., Brady B., Huet A.-C., Charlier C., Delahaut P., Godefroy S.B.: Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. *Food Addit. Contam. A* 28, 731-739, 2011.
- Sonam Mahajan: Characterization of the White-rot Fungus, *Phanerochaetecarnosa*, through Proteomic Methods and Compositional Analysis of Decayed Wood Fibre 0-11, 2011.
- Steven D. Aust: Mechanisms of Degradation by White Rot Fungi, *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 5): 59-61, 1995.
- Toh, Y.C., LinYen, J.J., Obbard, J.P., Ting, Y.P., 2003. Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 569–575.
- V. Karthik, K. Saravanan, P.Bharathi, V.Dharanya, C. Meiaraj: An overview of treatments for the removal of textile dyes. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*: 301-307, 2014.

- Vujević D., Uklanjanje organskih tvari iz obojenih otpadnih voda primjenom naprednih oksidacijskih procesa, Disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2007.
- Wong YC, Senan MSR, Atiqah NA (2013) Removal of methylene blue and malachite green dye using different form of coconut fibre as absorbent. *Journal of Basic & Applied Sciences* 9: 172-177
- Yang, F.-C., Yu, J.-T., 1996. Development of bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolorization. *Bioproc. Eng.* 15, 307-310.
- Yesilada, O., Asma, D., & Cing, S. (2003). Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*, 38(6), 933–938
- Zheng, Z., Levin, R.E., Pinkham, J.L., Shetty, K., 1999. Decolorization of polymeric dyes by novel *Penicillium* isolate. *Process Biochem.* 34, 31-37.