

UKLANJANJE SINTETSKOG BOJILA MALAHITNOG ZELENILA POMOĆU MICELIJSKIH PELETA *Trametes versicolor*

UDK: 628.316.12

Natalija Velić^{1*}, Kazimir Antunović¹, Hrvoje Pavlović¹, Antonija Kezerle²,
Kristina Mastanjević¹, Darko Velić¹

¹Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

²Vodovod-Osijek d.o.o., Poljski put 1, 31000 Osijek, Hrvatska

izvorni znanstveni rad

Sažetak

U ovom radu istražena je mogućnost upotrebe micelijskih peleta gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* CCBAS AG 613 s ciljem uklanjanja sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodene otopine. Istraživan je utjecaj početne koncentracije biomase, koncentracije malahitnog zelenila i dodatka glukoze u otopinu bojila na postotak uklanjanja bojila. U gotovo svim provedenim pokusima postotak uklanjanja bojila nakon 24 h iznosio je preko 80 %. 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 u vodenu otopinu bojila rezultirao je manjim postotkom uklanjanja bojila. Nadalje, istražena je mogućnost ponovnog korištenja peleta u drugom ciklusu. U ponovljenom testu peleti su zadržali sposobnost uklanjanja bojila iz vodene otopine malahitnog zelenila, ali u nešto manjem postotku nego prilikom prvog korištenja. Ovi preliminarni rezultati upućuju na mogućnost korištenja micelijskih peleta *T. versicolor* CCBAS AG613 za biološku obradu otpadnih voda obojenih malahitnim zelenilom.

Ključne riječi: malahitno zelenilo, micelijski peleti, *T. versicolor*, uklanjanje bojila

Uvod

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, prirodne prijamljivke u koje se ispuštaju nedovoljno pročišćene obojene otpadne vode (Singhi sur., 2011). One tako uzrokuju značajno onečišćenje površinskih i podzemnih voda (Annuaire i organizama koji su 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, nerijetko vrlo mala (Yesilada i sur., 2003).

*natalija.velic@ptfos.hr

Metode za uklanjanje bojila iz otpadnih voda dijele se na fizikalno-kemijske i biološke metode (Robinson, 2001). Fizikalno-kemijske metode, iako najčešće primjenjivane, često su skupe i mogu dovesti do nastajanja toksičnih produkata razgradnje ili različitih (kemijskih) muljeva koje je potrebno dodatno zbrinjavati (Sandhya i sur., 2005). Prednosti bioloških metoda uklanjanja bojila su niska cijena, visoka učinkovitost uklanjanja bojila, mogućnost potpune biorazgradnje 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 te duže vrijeme potrebno za uklanjanje bojila uslijed uzgoja mikroorganizama (Gupta i Suhas, 2009).

Biološke metode uklanjanja bojila uključuju i aerobne i anaerobne procese, kao i kombinaciju istih te različite vrste mikroorganizama: bakterije, gljive, alge. Gljive bijelog truljenja, u koje se ubraja i vrsta *Trametes versicolor* korištena u ovom radu, primjer su mikroorganizama koji se uobičajeno 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) (Forgacs i sur., 2004). Kada se ove gljive uzgajaju submerzno (dubinski) stvaraju specifične morfološke oblike, tzv. pelete pomoću kojih se u bioreaktorima lakše vode procesi (Borràs i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost upotrebe micelijskih peleta gljive bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613 u svrhu uklanjanja sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodene otopine.

Materijali i metode

Mikroorganizam. Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613 (Culture Collection of *Basidiomycetes*, Prag, Češka). Gljiva je uzgajana na krumpirovom agaru s glukozom (Liofilchem, Piane Vomano, Italija) tijekom sedam dana pri 27 °C. Kao inokulum u daljnjim pokusima korišteni su micelijski diskovi promjera 6 mm.

Uzgoj micelijskih peleta *T. versicolor*. Za uzgoj micelijskih peleta korištena je modficirana hranjiva podloga prema Tišma i suradnici (2010). Pripremljena je hranjiva podloga za uzgoj micelijskih peleta sljedećeg sastava: 10 g L⁻¹ glukoze; 0,8 g L⁻¹ KH₂PO₄; 2 g L⁻¹ NH₄NO₃; 0,4 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 0,5g L⁻¹ MgSO₄ × 7H₂O i 2 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta. 40 mL sterilne otopine inokulirano je s 10 mL suspenzije spora radnog mikroorganizma. Suspenzija spora pripremljena je tako što je u 40 mL sterilne vode dodan micelijski disk (promjera 6 mm) s krute hranjive podloge i homogenizirano kroz 15 min. Uzgoj micelijskih peleta proveden je na tresilici (IKA-KS 260 basic, Staufen, Njemačka) pri 120 okr min⁻¹ i sobnoj temperaturi

tijekom 5 dana. Dobiveni micelijski peleti filtracijom su odvojeni od tekuće podloge, obilno isprani sterilnom destiliranom vodom i korišteni u daljnjim eksperimentima.

Uklanjanje bojila. U 50 mL otopine bojila (masene koncentracije 5, 15 i 25 mg L⁻¹) dodani su micelijski peleti (koncentracija biomase 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 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 te centrifugirani pri 6000 okr min⁻¹ (IKA mini G, Staufen, Njemačka) u trajanju od 10 minuta. Dobiveni supernatant korišten je za određivanje koncentracije bojila spektrofotometrijski (SHIMADZU, UV-1700 Pharma Spec., Njemačka) pri valnoj duljini od 623 nm.

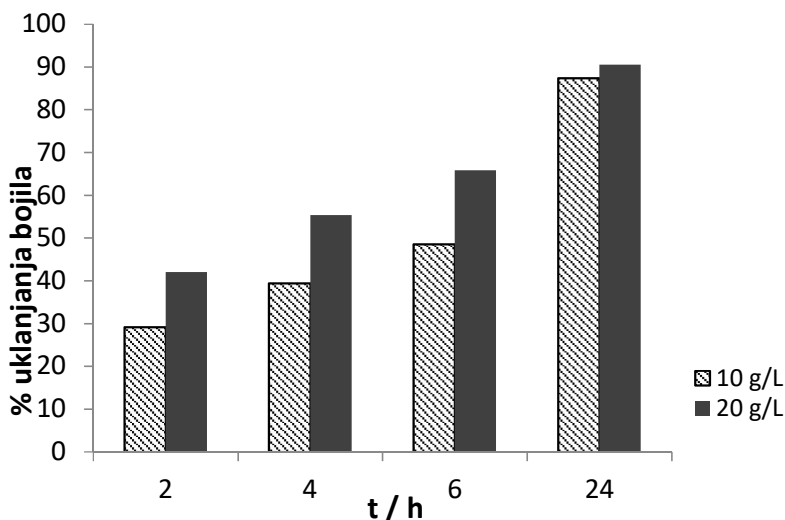
Ponovljeni test uklanjanja proveden je prema gore opisanom postupku, pri čemu su korišteni micelijski peleti iz prvog ciklusa dobiveni filtriranjem otopine bojila nakon 24 h. Postotak uklanjanja bojila izračunat je korištenjem jednadžbe 1:

$$\% \text{ uklanjanja bojila} = 100 (\gamma_0 - \gamma) / \gamma_0 \quad (1)$$

gdje je γ_0 početna koncentracija bojila, a γ koncentracija bojila nakon određenog vremena. Testovi uklanjanja provedeni su u dva ponavljanja, dok je postotak uklanjanja bojila za svaki pojedini test izražen kao prosječna vrijednost tri ponavljanja.

Rezultati i rasprava

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem prikazani su na slikama 1-4. S dobivenim micelijskim peletima *T. versicolor* CCBAS AG613 uspješno su provedeni testovi uklanjanja bojila iz vodene otopine 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. Iz rezultata prikazanih na slici 1 vidljivo je kako je povećanjem početne koncentracije biomase došlo do povećanja postotka uklanjanja bojila. U prvih šest sati eksperimenta postotak uklanjanja je veći kada je upotrijebljena veća početna koncentracija biomase, dok se nakon 24 sata ova razlika 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 (2003) 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 kako mehanizam uklanjanja bojila u početnim fazama eksperimenta uključuje biosorpciju, nakon čega slijedi uklanjanje (obezbojenje) djelovanjem enzima, odnosno mikrobnog metabolizma. Pri većoj početnoj koncentraciji biomase više je sorpcijskih mjesta dostupnih za vezivanje bojila, što se očituje većom učinkovitošću uklanjanja bojila u prvih šest sati eksperimenta.



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

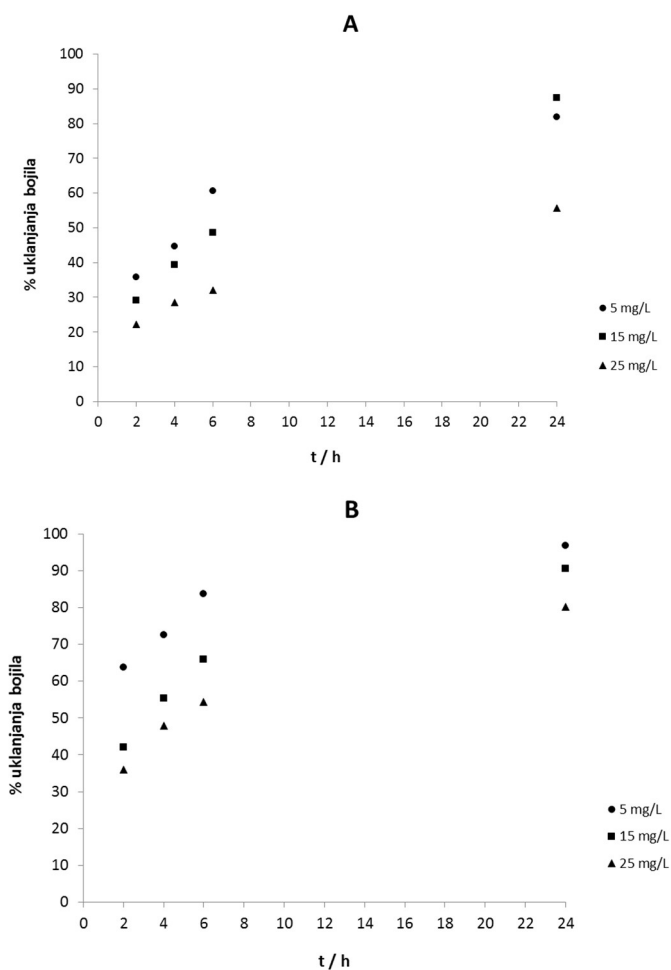
Fig. 1. The effect of initial biomass concentration on dye removal
(temp. = 25 °C, $n = 120 \text{ rpm}$, $\gamma_{\text{dye}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$)

Prema Nigam i suradnicima (2000) koncentracije bojila određene u obojenim otpadnim vodama kreću se u rasponu od 10 – 50 mg L⁻¹. Odabrane koncentracije malahitnog zelenila u ovom istraživanju iznosile su 5, 15 i 25 mg L⁻¹, a rezultati istraživanja utjecaja povećanja koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila pomoću peleta prikazani su na Slici 2. Povećanjem koncentracije bojila, neovisno o početnoj koncentraciji biomase, došlo je do smanjenja postotka uklanjanja bojila. Veće koncentracije bojila mogu djelovati toksično na radni mikroorganizam, što dovodi i do smanjenja učinkovitosti procesa, odnosno povećanje koncentracije bojila dovodi do smanjenja postotka uklanjanja bojila (Yesilada i sur., 2002).

Neka istraživanja pokazala su kako 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. Dodatni izvor ugljika, poput glukoze, pri tome potiče (ubrzava) proces uklanjanja i povećava stabilnost micelijskih peleta (Yesilada i sur., 2003; Knapp i sur., 1997). Tijekom ovog istraživanja dodatak vanjskog izvora ugljika (glukoza u koncentraciji 15 mg L⁻¹) u vodenu otopinu bojila rezultirao je nešto manjim postotkom uklanjanja bojila (Slika 3).

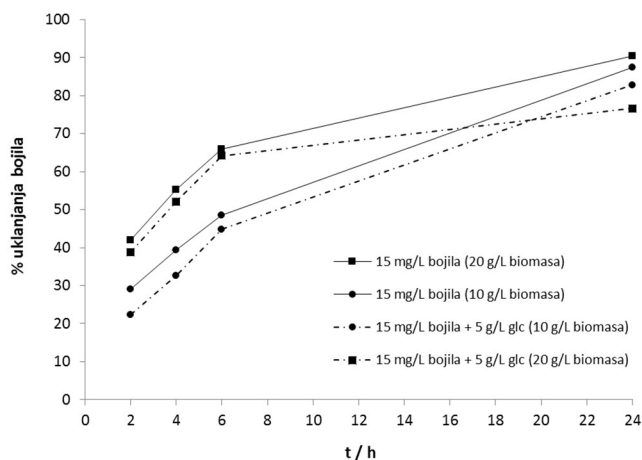
Kako bi se istražila mogućnost ponovnog korištenja peleta, odnosno sposobnost uklanjanja bojila kroz duži vremenski period, provedeni su ponovljeni testovi uklanjanja. Nakon prvog ciklusa u trajanju od 24 sata, peleti su ponovno korišteni u drugom ciklusu, također u trajanju od 24 sata. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 4. Iz rezultata je vidljivo kako u drugom ciklusu 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 kada se uklanjanje odvija biosorpcijom, budući je dio adsorpcijskih mjesta već zauzet bojiлом u prvom ciklusu. 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. Povećanjem početne koncentracije biomase dolazi do povećanja postotka uklanjanja bojila i u ponovljenom testu uklanjanja.



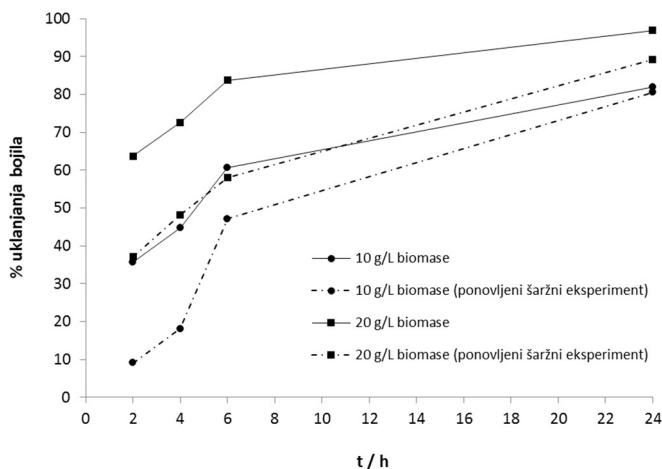
Slika 2. Utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja bojila (temp. = 25 °C, $n = 120$ okr min^{-1}): **a)** $\gamma_{\text{biomasa}} = 10 \text{ g L}^{-1}$, **b)** $\gamma_{\text{biomasa}} = 20 \text{ g L}^{-1}$

Fig. 2. The effect of initial dye concentration on dye removal (temp. = 25 °C, $n = 120$ rpm): **a)** $\gamma_{\text{biomass}} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, **b)** $\gamma_{\text{biomass}} = 20 \text{ g L}^{-1}$



Slika 3. Utjecaj dodatka glukoze na postotak uklanjanja bojila
 (temp. = 25 °C, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{\text{bojilo}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{\text{glukoza}} = 5 \text{ g L}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomasa}} = 10 \text{ i } 20 \text{ g L}^{-1}$)

Fig. 3. The effect of glucose addition on dye removal
 (temp. = 25 °C, $n = 120 \text{ rpm}$, $\gamma_{\text{dye}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{\text{glucose}} = 5 \text{ g L}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomass}} = 10 \text{ and } 20 \text{ g L}^{-1}$)



Slika 4. Ponovljeni test uklanjanja pomoću peleta *T. versicolor*
 (temp. = 25 °C, $n = 120 \text{ okr min}^{-1}$, $\gamma_{\text{bojilo}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomasa}} = 10 \text{ i } 20 \text{ g L}^{-1}$)
Fig. 4. Repeated-batch decolorization test using *T. versicolor* mycelial pellets
 (temp. = 25 °C, $n = 120 \text{ rpm}$, $\gamma_{\text{dye}} = 15 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{\text{biomass}} = 10 \text{ and } 20 \text{ g L}^{-1}$)

Zaključci

Micelijski peleti gljive bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613 pokazali su se učinkoviti u uklanjanju sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodenih otopina u koncentraciji od 5 do 15 mg L⁻¹. U gotovo svim provedenim pokusima postotak uklanjanja bojila nakon 24 h iznosio je preko 80 %. Peleti su uspješno korišteni za uklanjanje bojila u dva uzastopna ciklusa, pri čemu su zadržali sposobnost uklanjanja bojila iz vodene otopine malahitnog zelenila, ali u nešto manjem postotku nego prilikom prvog korištenja, što ukazuje kako je mehanizam uklanjanja vjerojatno kombinacija biosorpcije i mikrobne razgradnje bojila. Preliminarni rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na mogućnost korištenja micelijskih peleta *T. versicolor* CCBAS AG613 za biološku obradu otpadnih voda obojenih malahitnim zelenilom. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se bolje definirao proces, odnosno optimirali uvjeti vođenja procesa (pH, temperatura, intenzitet miješanja, dodatak hranjivih tvari i sl.) te kako bi se identificirali produkti mikrobne razgradnje malahitnog zelenila.

Literatura

- Annuar, 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.
- Borrás, E., Blázquez, P., Sàrra, M., Caminal, G., Vicent, T. (2008): *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochem. Eng. J.* 42, 61.-66.
- Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G.(2004): Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ. Int.* 30, 953-971.
- Gupta, V. K., Suhas (2009): Application of low-cost adsorbents for dye removal--a review. *J. Environ. Manage.* 90(8), 2313-42.
- 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.
- Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D., Marchant, R.(2000): Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technol.* 72, 219-226.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001): Remediation of dyes on textile effluent; a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresource Technol.* 77 (3), 247-255.
- Sandhya, S., Padmavathy, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y.V., Kaul, S.N. (2005): Micro aerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. *Process Biochem.* 40, 885-90.
- Singh, G., Koerner, T., Gelinas, J.-M., Abbott, M., Brady, B., Huet, A.-C., Charlier, C., Delahaut, P., Godefroy, S.B. (2011): Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. *Food Addit. Contam. A* 28, 731-739.
- Tišma, M., Sudar, M., Vasić-Rački, Đ., Zelić, B. (2010): Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33(6), 749-758.
- Yesilada, O., Asma, D., Cing, S. (2003): Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochem.* 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.

REMOVAL OF SYNTHETIC DYE MALACHITE GREEN USING *Trametes versicolor* MYCELIAL PELLETS

Natalija Velić¹, Kazimir Antunović¹, Hrvoje Pavlović¹, Antonija Kezerle²,
Kristina Mastanjević¹, Darko Velić¹

¹Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20,
31000 Osijek, Croatia

²Vodovod-Osijek d.o.o., Poljski put 1, 31000 Osijek, Croatia

original scientific paper

Summary

The aim of this study was to investigate the malachite green removal (decolourisation) ability of white rot fungus *Trametes versicolor* CCBAS AG613 mycelial pellets. The effect of initial biomass concentration, malachite green concentration and glucose addition on dye percentage removal was investigated. The dye percentage removal of more than 80% was achieved after 24 h in almost all runs. An increase in the initial biomass concentration positively affected the removal, resulting in higher dye percentage removal. However, the increase in dye concentration had the opposite effect. The addition of glucose to the dye solution resulted in slightly lower dye percentage removal. Furthermore, the longevity of pellets' decolourisation activity was tested in repeated-batch mode. When used in repeated-batch mode, pellets still exhibited the malachite green decolourisation activity but to a slightly lower extent. These preliminary results indicate that *T. versicolor* CCBAS AG613 mycelial pellets could be effectively used for bioremediation of malachite green coloured wastewaters.

Keywords: malachite green, mycelial pellets, *T. versicolor*, dye removal