Obezbojenje kongo crvenila i malahitnog zelenila pomoću Trametes versicolor na čvrstim supstratima

Novoselić, Kasandra

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:936930

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Kasandra Novoselić

Obezbojenje kongo crvenila i malahitnog zelenila pomoću *Trametes versicolor* na čvrstim supstratima

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za Procesno inženjerstvo
Katedra za bioprocesno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Bioprocesi u zaštiti okoliša
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 28. lipnja 2016.
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić (mentor)*
Pomoć pri izradi: *izv.prof.dr.sc. Hrvoje Pavlović*

Obezbojenje kongo crvenila i malahitnog zelenila pomoću *Trametes versicolor* na čvrstim supstratima

Kasandra Novoselić, 302/DI

Sažetak: U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila kongo crvenila i malahitnog zelenila u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima - agarnim pločama i obojenom lignoceluloznom supstratu, pomoću gljive *Trametes versicolor* CCBAS AG613. Gljiva je uzgajana na agarnim pločama s dodatkom bojila u koncentracijama od 50 do 300 mg L^{-1}, te je praćen njezin rast i obezbojenje bojila tijekom 16 (kongo crvenilo) do 38 (malahitno zelenilo) dana uzgoja pri 27 °C. Rast promjera i promjena zone obezbojenja praćene su (u dva okomita smjera) svaka dva dana. Gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613 pokazala je sposobnost obezbojenja bojila pri rastu na obojenim agarnim pločama, ali je do potpunog obezbojenja došlo samo u slučaju kada je u podlogu dodano malahitno zelenilo u koncentraciji 50 mg L^{-1}. Obojeni pivski trop (250 g tropa u 350 mL otopine bojila koncentracije 150 mg L^{-1}) korišten je kao supstrat za rast gljive u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Uzgoj je proveden u horizontalnom-cilindričnom laboratorijskom staklenom reaktoru pri sobnoj temperaturi. Temperatura i promjena mase supstrata praćeni su kontinuirano, dok su relativna vlažnost i boja uzoraka određivani nakon 7, 14 i 21 dan fermentacije. Gljiva *T. versicolor* CCBAS AG613 dobro je rasla na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom i malahitnim zelenilom kao supstratu, što se očitovalo povećanjem temperature u sloju supstrata te gubitkom na masi supstrata u iznosu od 32,20% za kongo crvenilo, odnosno 37,49% za malahitno zelenilo. Iako nije došlo do potpunog obezbojenja uzorka, došlo je do kontinuiranog porasta ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na njihove abiotičke kontrole.

Ključne riječi: kongo crvenilo, malahitno zelenilo, *Trametes versicolor*, obezbojenje, fermentacija na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 53 stranica
24 slike
2 tablice
70 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Natalija Velić*	član-mentor
3.	prof. dr. sc. *Darko Velić*	član
4.	doc. dr. sc. *Marina Tišma*	zamjena člana

Datum obrane: 19. rujna, 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of Bioprocess Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Bioprocesses in environmental protection
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 28th 2016.
Mentor: *Natalija Velić*, PhD, assistant prof.
Technical assistance: *Hrvoje Pavlović, PhD*, associate prof.

Discoloration of Congo red and Malachite green using *Trametes versicolor* on solid substrates

Kasandra Novoselić, 302/DI

Summary: This work investigated the ability of fungus *Trametes versicolor* CCBAS AG613 to decolorize synthetic dyes congo red and malachite green under solid-state substrate cultivation conditions - on agar plates and dye-loaded lignocellulosic substrate. Fungus was cultivated on agar plates with the addition of dyes at final concentrations from 50 to 300 mg L^{-1}, during 16 (congo red) and 38 (malachite green) days of cultivation at 27 °C. The diameter growth and the change of discoloration zone were recorded (in two perpendicular directions) every two days. White rotting fungus *T. versicolor* CCBAS AG613 showed the ability to decolorize dyes during cultivation on dyed agar plates, but the complete discoloration was achieved only in the case when malachite green was added at the concentration of 50 mg L^{-1}. Dyed brewers' spent grain (250 g brewers' spent grain in 350 ml of dye solution, concentration of 150 mg L^{-1}) was used as a substrate for solid-state fermentation. Cultivation was done in the horizontal-cylindrical laboratory glass reactor at room temperature. The temperature and the change of substrate mass were recorded continuously, while the relative humidity and the sample colour were ascertained after 7, 14 and 21 days of fermentation. Fungus *T. versicolor* CCBAS AG613 has shown noticeable growth on brewers' spent grain substrate dyed with congo red and malachite green, which was evident in the temperature increase of the substrate layer and the substrate mass loss of 32.2% for congo red dye, and 37.49% for malachite green dye. Total discoloration (bleaching) was not detected. However, colour detection showed continuous increase in the change of colour and colour intensity of fermented samples compared to the abiotic control samples.

Key words: congo red, malachite green, *Trametes versicolor*, discoloration, solid state fermentation
Thesis contains: 53 pages
24 figures
2 tables
70 references
Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Hrvoje Pavlović*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Natalija Velić,* PhD, associate prof. — supervisor
3. *Darko Velić,* PhD, associate prof. — member
4. *Marina Tišma,* PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: September 19th 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Želim izraziti veliko hvala svima koji su na bilo koji način pridonijeli ostvarenju ovog diplomskoga rada.

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Velić na pristupačnosti, ljubaznosti, bezgraničnom strpljenju i ogromnoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Hrvoju Pavlović na trudu, volji i pomoći tijekom izrade teorijskog i eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Darku Velić na velikoj pomoći, strpljenju i ljubaznosti prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem baki Anici i uji Draženu na velikoj podršci i pomoći tijekom studiranja.

Zahvaljujem svom dečku Mateju na podršci i motivaciji koju mi je pružio tijekom studiranja.

Zahvaljujem svojoj obitelji, a najviše roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, odricanju, razumijevanju te velikoj potpori. Bez Vas ovo ne bi bilo moguće.

Table of Contents

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. BOJILA 4

2.1.1. Podjela bojila 5

2.1.1.1. Kongo crvenilo 7

2.1.1.2. Malahitno zelenilo 8

2.1.2. Utjecaj bojila na zdravlje ljudi i okoliš 10

2.1.3. Uklanjanje bojila iz obojenih otpadnih voda 11

2.2. GLJIVE 13

2.2.1. Gljive bijelog truljenja 14

2.3. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA 18

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. ZADATAK 20

3.1.1. Bojila 20

3.1.2. Mikroorganizmi 20

3.1.3. Supstrat 21

3.1.4. Kemikalije 21

3.1.5. Aparatura i pribor 21

3.2. METODE 23

3.2.1. Priprema podloge i uzgoj radnog mikroorganizma 23

3.2.2. Priprema obojenih hranjivih podloga 23

3.2.3. Uzgoj gljive *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskom horizontalno – cilindričnom staklenom bioreaktoru 24

3.2.4. Određivanje udjela vlage 25

3.2.5. Određivanje boje uzorka 25

3.2.6. Statistička obrada 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 27

4.1.1. Istraživanje sposobnosti obezbojenja bojila pomoću *T.* versicolor na agarnim pločama 28

2.1.2. Istraživanje sposobnosti obezbojenja obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima 33

5. ZAKLJUČCI 39

6. LITERATURA 41

1. UVOD

Sintetska bojila svoju su primjenu našla u velikom broju industrija – tekstilnoj, papirnoj, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i drugim. Obojene otpadne vode koje nastaju tijekom proizvodnog procesa navedenih industrija predstavljaju veliku opasnost za okoliš, ako se nepročišćene ispuštaju u prirodne prijemnike (recipijente). Naime, prisutnost bojila u vodenim ekosustavima kao posljedicu ima smanjenje koncentracije kisika te sprječavanje prodiranja svjetlosti u dublje slojeve, što djeluje nepovoljno na život u ekosustavu. Nadalje, bojila djeluju toksično te mutageno i kancerogeno na zdravlje ljudi (Saratale i sur., 2011). Uklanjanje bojila iz okoliša je dugotrajan i složen proces zbog njihove izrazite stabilnosti koja je, također, razlogom njihova nakupljanja u okolišu. Zbog svega navedenog, važno je ukloniti bojila iz otpadnih voda prije njihova ispuštanja u okoliš.

Metode za uklanjanje bojila uključuju fizikalno-kemijske metode te biološke metode uklanjanja. Od fizikalno-kemijskih metoda najčešće se koristi adsorpcija. Novija istraživanja bave se primjenom otpadnih lignoceluloznih materijala kao adsorbensa. Prednost korištenja ovih materijala je njihova učinkovitost, niska cijena te široka dostupnost u odnosu na konvencionalne adsorbense (Rafatullah i sur., 2010).

Biološke metode temelje se na primjeni mikroorganizama koji imaju sposobnost razgradnje (metaboliziranja) bojila i predmet su brojnih istraživanja (Gudelj i sur., 2010). Jedna od skupina mikroorganizama, koja se najviše istražuje u te svrhe, je skupina gljiva bijeloga truljenja. Gljive bijeloga truljenja proizvode enzime koji razgrađuju celulozu, hemicelulozu i lignin (Sigoillot i sur., 2012). Ove gljive intenzivno se istražuju u svrhu uklanjanja/razgradnje sintetskih bojila iz otpadnih voda, ali i u svrhu razgradnje ksenobiotika, predobrade lignoceluloznih materijala za proizvodnju biogoriva, proizvodnje enzima, itd. (Wesenberg i sur., 2003).

Fermentacije na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation) su proces pri kojima mikroorganizmi rastu u odsutnosti slobodne vode na površini vlažnih nosača, koji ujedno mogu služiti i kao supstrat, odnosno izvor hranjivih tvari za rast mikroorganizama. Pri tome se kao radni mikroorganizam najčešće koriste filamentozne gljive, budući da i u prirodi rastu u sličnim uvjetima. (Durand, 2003).

U ovom radu istražena je mogućnost obezbojenja sintetskih bojila kongo crvenila i malahitnog zelenila u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima - agarnim pločama i obojenom lignoceluloznom supstratu (pivski trop), pomoću gljive *Trametes versicolor* CCBAS AG613.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOJILA

Još od prapovijesnih vremena čovjek se zanimao za boje. Najstariji zapis o uporabi boja pronađen u Kini iz vremena 2600 g. prije nove ere. Pri tome su korištene prirodne boje izolirane iz životinja, minerala i biljaka. Određene tvari imaju vlastitu boju ukoliko imaju sposobnost apsorbirati dio svjetlosti koja pada na njih. Boja tvari ovisit će o preostalom dijelu svjetlosti koju tvari difuzno reflektiraju ili propuštaju (Vujević, 2007). Bojila su tvari koje imaju sposobnost apsorpcije svjetlosti u vidljivom dijelu spektra, odnosno u rasponu od 380 do 760 nm. Ona se fizikalnim silama ili kemijskim vezama vežu na materijale, poput papira, kože, tekstilnih i polimernih vlakana, itd., te ih na taj način oboje (Klarić, 2008). Zajedničko kemijsko svojstvo boja je velik broj nezasićenih veza u molekulskoj strukturi. Obojenost tvari ovisit će o razmještaju dvostrukih veza i o njihovom broju, te o kemijskoj strukturi molekula određene tvari, odnosno o kromofornim skupinama. Kromoforne skupine, od kojih se sastoji molekula bojila, nositelji su obojenosti jer su odgovorne za selektivnu apsorpciju svjetlosti. Najvažnije kromoforne skupine prema Wittu, koji je prvi otkrio vezu između obojenosti tvari i njene kemijske strukture prikazane su u **Tablici 1** (Vujević, 2007).

Tablica 1 Najvažnije kromoforne skupine (Vujević, 2007)

Etilenska	—CH=CH—
Azometinska	—N=CH—
Azo	—N=N—
Karbonilna	—C(=O)—
Nitrozo	—N=O
Azoksi	—N=N—O—
Nitro	—N(=O)=O
Kinoidna	

Nadalje, kromogen je spoj koji sadrži kromofornu skupinu i najčešće konjugiranu dvostruku vezu. Ne koristi se kao bojilo jer ne sadrži posebni afinitet prema nekome materijalu. Kromogen nije bojilo u tehničkom smislu, no to može postati ako se uvede tzv. auksokromna skupina. Od auksokromnih skupina najvažnije su hidroksilna (-OH), amino (-NH_2), sulfonska (-SO_3H) i karboksilna (-COOH) skupina. Kao takve, auksokromne skupine djeluju na dva načina: uzrokuju batokromni pomak u vidljivom dijelu spektra, odnosno dolazi do mijenjanja nijansi boja od žute do zelene, te svojstva primjene bojila vezivanja na različite materijale, kao što su npr. papir, koža, vlakna. Topljivost bojila u vodi povećat će prisustvo sulfonskih (-SO_3H) i karboksilnih (-COOH) skupina (Vujević, 2007).

2.1.1. Podjela bojila

Prema podrijetlu bojila se mogu podijeliti na sintetska i prirodna (Vujević, 2007). Ova podjela temelji se na području i metodama primjene, te na kemijskoj strukturi. Prirodna bojila se dalje dijele na životinjska, mineralna i biljna. Učinkovitost prirodnih bojila i njihova zastupljenost na tržištu je puno manja od sintetskih bojila (Gudelj i sur., 2011). Sintetska bojila dobivaju se kemijskom sintezom. Iz toga razloga, cijena im je znatno manja u odnosu na prirodna bojila. Sintetska bojila se odlikuju kemijskom stabilnošću te visokom učinkovitosti bojanja. Postoji velik broj različitih načina podjele sintetskih bojila, od kojih se najčešće koriste podjele prema načinu primjene i prema kemijskim svojstvima (Pavičić, 2015). Smatra se da je danas tržišno dostupno više od 100 000 umjetnih bojila (Gudelj i sur., 2011).

Na osnovu kemijskih svojstava, sintetska bojila mogu se podijeliti u sljedeće skupine:

- azo (monoazo, diazo, poliazo),
- trifenilmetanska,
- nitro,
- nitrozo,
- tiazolna,

- ksantenska,
- pirazolonska,
- kinoniminska,
- antrakinonska,
- ketonimidna,
- kinolinska,
- indigoidna i
- sumporna (https://www.ktf.unist.hr, 20.07.2016.)

Nadalje, bojila se prema načinu primjene dijele na:

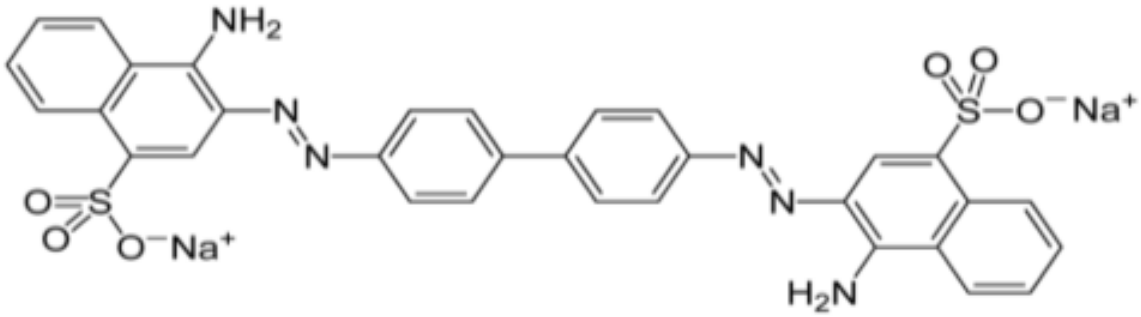
- bojila koja se ne mogu otopiti u vodi, odnosno disperzna, redukcijska, pigmentna bojila, obojeni lakovi, bojila topljiva u mastima i ulju,
- bojila koja se mogu otapati u vodi, odnosno kisela, bazična, kiselomočilska, reaktivna, leuko – esterska, metalokompleksna, direktna bojila i
- bojila koja se grade na vlaknu, odnosno bojila za fotografije i boje, oksidacijska bojila, bojila tipa naftola AS (Venkataraman, 1970).

Sintetska bojila pripadaju skupini ksenobiotičkih spojeva koji se teško razgrađuju u okolišu (Yu i Wen, 2005), odnosno aromatske su strukture te organske prirode (Gudelj i sur., 2011). Važna odlika bojila je da moraju biti otporna na mikrobiološko i kemijsko djelovanje, te na djelovanje svjetlosti što dovodi do teške razgradljivosti i dugog zadržavanja u okolišu. Osim toga, bojila trebaju biti postojana tijekom pranja (Adedayo i sur., 2004).

70% ukupnih bojila koja se koriste u različitim industrijskim procesima čine azo bojila, te tako čine skupinu najzastupljenijih komercijalnih bojila (Zollinger, 1961). Ova skupina uključuje strukturno različite spojeve čija je zajednička karakteristika prisutnost jedne ili više azo skupina (-N=N-) (Vujević, 2007). Ovisno o broju azo veza u molekulskoj strukturi, azo bojila se dijele na: monoazo, diazo, triazo, tetraazo i poliazo (Gudelj i sur., 2011).

2.1.1.1. Kongo crvenilo

Najznačajniji primjer diazo bojila je kongo crvenilo kemijske formule $C_{32}H_{22}O_6N_6S_2Na_2$ (**Slika 1**) (http://enciklopedija.lzmk.hr, 21.07.2016.) Kongo crvenilo prvi je sintetizirao Botiger 1883. godine, no tvrtka za koju je radio nije priznala boju zbog jakog crvenila. Ipak, 1885. godine naziv „Congo“ crveno uveden je u Berlinu kao prvi od ekonomskih unosnih tekstilnih bojila (Steensma, 2001).



Slika 1 Strukturna formula kongo crvenilo (https://commons.wikimedia.org, 21.07.2016.)

Kongo crvenilo je crvenosmeđi prah (**Slika 2**), bez mirisa, te se dobiva iz benzidina i naftionske kiseline (http://enciklopedija.lzmk.hr, 21.07.2016.).



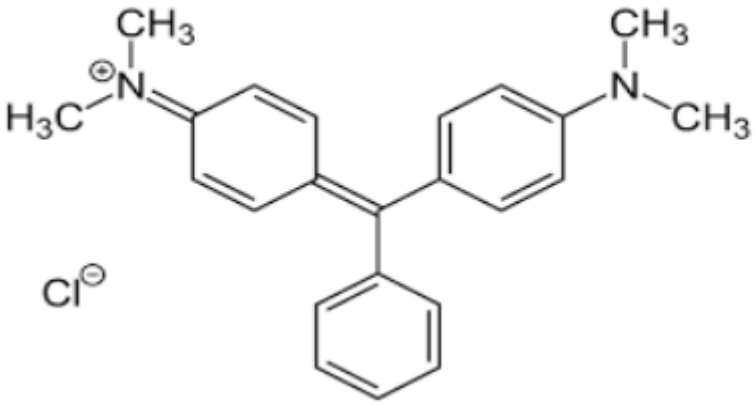
Slika 2 Prikaz kongo crvenila u prahu (http://www.fibre2fashion.com, 21.07.2016.)

Najčešće se primjenjuje za bojanje celuloznih vlakana, odnosno pamuka, regeneriranih vlakana, medicinskih preparata, te se koristi kao indikatorsko bojilo za područje pH vrijednosti od 3,0 do 5,2 u kojem se događa promjena boje (http://enciklopedija.lzmk.hr, 21.07.2016.). Pri velikim koncentracijama kongo crvenilo ima sklonost agregaciji u vodenim i organskim otopinama. Pokazuje fluorescentna svojstva kada se veže na amiloidna vlakna. Često se koristi u mikrobiološkim ispitivanjima prisutnosti bakterije *Shigella flexneri* (Steensma, 2001).

2.1.1.2. Malahitno zelenilo

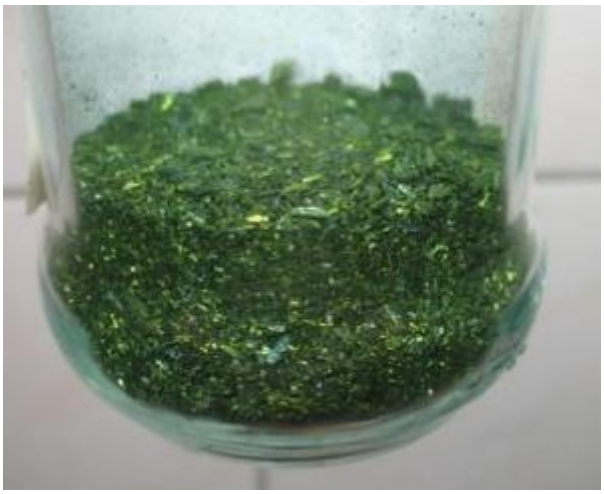
Malahitno zelenilo pripada trifenilmetanskoj skupini bojila, koje odlikuju tri arilne skupine koje su ujedno i supstituirane amino, sulfonskim ili hidroksilnim skupinama (https://www.ktf.unist.hr, 21.07.2016.). Trifenilmetanska bojila smatraju se kancerogenim i toksičnim jer produkti njihove razgradnje imaju mutageno djelovanje, te imaju negativan utjecaj na okoliš (Azimi i sur., 1998; Cheriaa i sur., 2012).

Malahitno zelenilo je kristalno-zeleni prah kemijske formule $[C_6H_5C(C_6H_4N(CH_3)_2)_2]Cl$ (**Slika 3**) (Cheriaa i sur., 2012).



Slika 3 Prikaz kemijske strukture malahitno zelenilo (Petrinović, 2014)

Dobiva se iz dimetilanilina i benzaldehida. Pojavljuje se kao sjajni kristali (**Slika 4**), koji se otapaju u vodi i alkoholu (http://www.britannica.com, 21.07.2016.). Malahitno zelenilo pripada skupini bazičnih bojila. Najveća primjena malahitnog zelenila je u tekstilnoj industriji za bojanje vune, jute, svile, pamuka te se koristi u industriji kože i papira. Osim toga, ima značajnu primjenu u kozmetičkoj industriji, mikrobiologiji kao fungicid i baktericid te u prehrambenoj industriji kao prehrambeni aditivi (Ogugbue i Savidis, 2011; Azimi i sur., 1998; Cheriaa i sur., 2012). Otkriveno je kako štetno utječe na crijeva, jetru, bubrege i spolne žlijezde vodenih organizama (Srivastava, 2004). Nadalje, opasan je za zdravlje ljudi ukoliko se udahne ili proguta, jer može doći do iritacije gastrointestinalnog traka (Garg i sur., 2004).



Slika 4 Prikaz kristala malahitno zelenilo (Antunović, 2011)

2.1.2. Utjecaj bojila na zdravlje ljudi i okoliš

Industrija proizvodnje sintetskih bojila u stalnom je porastu, pri čemu je kontrola uporabe često teška i povećava se opasnost od njihova negativnog utjecaja na ljude i okoliš u cjelini (Gredelj, 2013). Svako novo proizvedeno bojilo je novi kemijski spoj koji mora proći odgovarajuću evaluaciju, kako bi se definirao njegov utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje. Često je za očitovanje njihova negativnog utjecaja potrebno dugo vremena (http://greencotton.wordpress.com, 22.07.2016.). Veliki broj bojila posjeduje aromatsku strukturu naftalenskog i/ili benzenskog tipa, te su takvi spojevi kancerogeni (Gudelj i sur.,2011), mutageni i izazivaju alergijske reakcije kod ljudi (Cristóvão i sur., 2008). Toksičnost spoja raste povećanjem broja benzenskih prstenova u molekuli (Gudelj i sur., 2011). Sintetska bojila se ubrajaju u ksenobiotike složenih struktura te trebaju biti stabilna kako bi ispunjavala svoju funkciju. Kao posljedica kemijske i fizikalne stabilnost bojila, ona se teško razgrađuju, te dolazi do njihova nakupljanja (bioakumulativnost) i zadržavanja (perzistentnost) u okolišu. Određena bojila u svojoj strukturi sadrže teške metale koji se mogu akumulirati u organizmima vodenih ekosustava. Osim toga, bojila utječu na fotosintezu i prijenos svijetla, što izaziva promjene na početku hranidbenog lanca (Slokar i Le Marechal, 1998). Dokazano je da i male količine bojila, manje od 1 mg L^{-1}, koje se ispuštaju u

prirodne izvore mogu štetno djelovati na okoliš (Singh, 2006). Zbog svega navedenoga potrebno ih je ukloniti prije ispuštanja u okoliš.

Proces uklanjanja bojila iz otpadnih voda, koje su najveći izvor bojila u okolišu, često je složen, dugotrajan i skup, te se u područjima koja nemaju stalnu kontrolu otpadnih struja iz industrija, obojene otpadne vode nepročišćene ispuštaju izravno u prirodne recipijente (http://greencotton.wordpress.com, 22.07.2016.). Najveći onečišćivač vodenih ekosustava bojilima je zasigurno tekstilna industrija. Tijekom procesa bojenja koristi velike količine bojila i vode pri čemu oko 10 do 15 % ukupne količine bojila uporabljene u procesu završi u otpadnoj vodi (Yesilada i sur., 2003). Odlike ovih otpadnih voda su velike vrijednosti BPK (biološka potrošnja kisika), KPK (kemijska potrošnja kisika) i koncentracije suspendiranih tvari, što dodatno otežava njihovo pročišćavanje (George i sur., 2004). Otpadne vode pokazuju obojenost i pri vrlo malim koncentracijama bojila, te se ona moraju ukloniti do prihvatljive razine, odnosno koncentracija bojila ne bi trebala biti veća od 1 mg L^{-1} (http://www.mzt.hr, 23.07.2016.). Osim tekstilne industrije, bojila se u velikoj količini koriste i u industriji papira, farmaceutskoj industriji, kozmetičkoj industriji, itd. Otpadna voda iz kućanstava također sadrži bojila, koja potječu iz brojnih proizvoda u svakodnevnoj uporabi (kozmetika, lijekovi, sredstva za čišćenje, hrana). Iako je njihova koncentracija mala, ne treba zanemariti njihov doprinos onečišćenju vodenih ekosustava bojilima (Gredelj, 2013).

2.1.3. Uklanjanje bojila iz obojenih otpadnih voda

Metode koje se mogu primijeniti u obradi obojenih otpadnih voda, općenito, se dijele na: fizikalno – kemijske i biološke metode.

Fizikalno - kemijske metode temelje se na koncentriranju boje u talog i ugušćivanju, odnosno na apsolutnom razaranju molekulske strukture boje. U ovu skupinu procesa ubrajaju se: adsorpcija, koagulacija, flokulacija, membranski procesi, precipitacija, zračenje, ionska izmjena, kemijska oksidacija i Fentonov proces (Gudelj i sur., 2011). Fizikalno-kemijske metode često nisu dovoljno učinkovite ili je njihova primjena složena i skupa (Pearce i sur.,

2003). *Adsorpcija* je najčešće korištena metoda uklanjanja bojila na realnim sustavima. To je pojava nakupljanja neke tvari (adsorbat) na površini krute tvari ili tekućine (adsorbens). Odvija se na granici faza između krutine i tekućine ili krutine i plina (Gupta i Suhas, 2009). Adsorbensi koji se najčešće koriste u obradi obojenih otpadnih voda su aktivni ugljen, silika gel, glina, te različiti prirodni materijali. Konvencionalni adsorbensi su učinkoviti, ali često skupi. Cijena adsorbensa važan je čimbenik za odabir adsorbensa i poželjno je da bude što niža uz istu učinkovitost. Jeftinim adsorbensom možemo nazvati tvar koja zahtjeva malu ili neznatnu obradu i može se naći u prirodi u velikim količinama (Baileyi sur., 1999). Otpadni lignocelulozni materijali zadovoljavaju sve navedene kriterije(Reife i Freeman, 1996).

Lignocelulozni materijal se ubraja u primarne obnovljive organske tvari (Alonso i sur., 2005) koje nastaju u velikim količinama tijekom cijele godine. To su materijali poput trave, slame, pivskog tropa, lišća, ljusaka voća i povrća, otpadnog papira, piljevine drva, i sl. Lignocelulozni materijal, u najvećoj mjeri, čine tri skupine polimera – celuloza, hemiceluloza i lignin. Navedeni polimeri zajedno tvore složenu strukturu koja štiti materijal od mikrobiološke razgradnje. Udjel polimera u materijalu ovisi o vrsti biljke (Janušić i sur., 2008). Osim polimera sadrže još i male količine vode, cikličkih ugljikovodika, pepela te anorganskih i organskih tvari prisutnih kao ekstraktivne tvari (Cagnon i sur., 2009). Različiti lignocelulozni materijali korišteni su za uklanjanje bojila iz vodenih otopina, sintetskih otpadnih voda i realnih industrijskih efluenata, pri čemu je potvrđeno da takvi materijali imaju potencijal zamijeniti komercijalne adsorbense. Nakon adsorpcije bojila na lignocelulozne materijale bojilo, još uvijek, nije u potpunosti uklonjeno iz okoliša - zaostaje obojeni materijal kojeg je potrebno prikladno zbrinuti. Moguće rješenje je biološka obrada obojenog otpadnog materijala (adsorbensa), odnosno njegovo korištenje kao supstrata za uzgoj mikroorganizama koji imaju sposobnost razgradnje bojila. U tu svrhu, do sada, su korištene gljive bijelog truljenja, koje se uzgajaju na obojenim adsorbensima u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (Nigam i sur., 2000; Li i sur., 2014). Pri tome, istovremeno, dolazi do razgradnje bojila i razgradnje, odnosno smanjenja mase lignoceluloznog materijala.

Biološke metode obrade obojenih otpadnih voda temelje se na biosorpciji, odnosno adsorpciji bojila na inaktivnu ili živu biomasu mikroorganizama, bioakumulaciji, biotransformaciji i biorazgradnji. Mikroorganizmi koji se koriste u biološkoj obradi otpadnih voda uključuju aerobne i anaerobne vrste bakterija, različite vrste gljiva i neke alge (Pavičić,

2015). Istraživanja su pokazala kako je posebno učinkovita skupina lignolitičkih gljiva bijelog truljenja (Gupta i Suhas, 2009). Kako bi se povećala učinkovitost mikrobne razgradnje različitih bojila, provode se istraživanja kojima je cilj dobiti genetički preinačene (modificirane) mikroorganizme (GMO) boljih bioremedijacijskih karakteristika (Dafale i sur., 2008). Visoka učinkovitost, nastajanje produkata koji su manje toksični od polaznog spoja, potpuna biorazgradnja bojila i niska cijena neke su od osnovnih prednosti bioloških metoda obrade obojenih otpadnih voda, dok su nedostaci dugotrajnost procesa, manja mogućnost kontrole, veća osjetljivost na promjene okolišnih uvjeta, veća površina za opremu, manja fleksibilnost dizajniranja i vođenja procesa (Gupta i Suhas, 2009).

2.2. GLJIVE

Mikologija je jedna od najstarijih mikrobioloških znanost, a bavi se proučavanjem gljiva. Pretpostavlja se kako postoji preko 1,5 milijuna vrsta gljiva (Webster i Weber, 2007). Gljive ili fungi su heterotrofni eukariotski mikroorganizmi koji uključuju plijesni, kvasce i skupinu makroskopskih organizama (mesnate gljive). Mogu biti jednostanične ili višestanične, te mogu živjeti kao saprofiti, simbionti i paraziti. Za svoj rast zahtijevaju blago kisele supstrate te vlažna i tamna mjesta. Karakterizira ih filamentozni rast u obliku hifa. Velik broj hifa čini vegetativne tubularne strukture nazvane micelij (Duraković i Duraković, 2003). Gljive se razmnožavaju spolno i nespolno te tvore spore (nespolne i spolne). Prema vrsti spora, morfologiji hifa i spolnom ciklusu gljive se svrstavaju u pet taksonomskih skupina (razreda): *Deuteromycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes* i *Oomycetes*.

2.2.1. Gljive bijelog truljenja

Mali broj mikroorganizama ima sposobnost razgradnje drveta, odnosno lignina. Skupina gljiva nazvanih gljive truležnice imaju tu sposobnost i dijele se u tri podskupine: gljive bijelog truljenja, gljive mekog truljenja i gljive smeđeg truljenja (Sigoillot i sur., 2012).

Gljive bijelog truljenja imaju sposobnost mineralizacije i degradacije glavnih komponenti drveta: lignina, celuloze i hemiceluloze, te su najčešći uzročnici truljenja drveta. Definira ih opsežna razgradnja lignina, pri čemu drvo postaje izbijeljeno, mekano (spužvasto) i vlažno. Postoje dva načina bijeloga truljenja, a to su: selektivna i simultana razgradnja. Kod simultane (istovremene) razgradnje, razgrađuju se svi gore navedeni polimeri te ju provode primjerice vrste *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor.* Prilikom selektivne razgradnje celuloza ostaje nerazgrađena, dok se lignin i hemiceluloza razgrađuje. Selektivnu razgradnju provodi primjerice *Dichomitus squalens* i *Ceriporiopsis subvermispora* (Sigoillot i sur., 2012). U razgradnju lignina, hemiceluloze i celuloze uključeni su različiti oksidativni i hidrolitički enzimi, od kojih su najvažniji ekstracelularni enzimi odgovorni za razgradnju lignina: mangan peroksidaza (MnP), ligninperoksidaza (LiP) i lakaza (Elisashvili i sur., 2009). Navedeni enzimi su u značajnoj mjeri odgovorni i za sposobnost gljiva bijelog truljenja za razgradnju strukturno različitih, teško biorazgradljivih spojeva, poput bojila (Forgacs i sur., 2004).

Osim u industriji papira za biološko izbjeljivanje pulpe drva te za proizvodnju enzima, gljive bijelog truljenja upotrebljavaju se uklanjanja bojila iz otpadnih voda, odnosno i za uklanjanje/razgradnju ksenobiotika (Wesenberg i sur., 2003; Couto i Sanroman, 2006; Boer i sur., 2004). Najčešće korištene gljive u navedenu svrhu su *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium* (Forgacs i sur., 2004). **Tablica 2** prikazuje rezultate istraživanja koje je uključivalo probir (eng.screening) na agarnim pločama onih vrsta gljiva koje imaju sposobnost najučinkovitijeg i najbržeg obezbojenja agarnih ploča s dodatkom bojila (Eichlerová i sur., 2006).

Tablica 2 Prikaz probira gljiva koje imaju sposobnost razgradnje bojila (Eichlerová i sur., 2006).

Vrsta	Bojilo
Dichomitus squalens *Ischnoderma resinosum* *Pleurotus cylyptratus*	Remazol brilijant plavo R(RBBR) Orange G
Dichomitus squalens	Orange G Amarant Orange I RBBR Kristal violet Poly R-478 Malahitno zelenilo
Ischnoderma resinosum	Orange G Amarant RBBR Cu-ftalocijan Poly R Malahitno zelenilo Kristal violet

Pleurotus calyptratus CCBAS 461 *Pleurotus citrinopileatus* CCBAS 691 *Pleurotus cornucopiae* CCBAS 464 *Pleurotus cystidiosus* CCBAS 466 *Pleurotus dryinus* CCBAS 468 *Pleurotus eryngii* CCBAS 471 *Pleurotus ostreatus* CCBAS 473 *Pleurotus pulmonarius* CCBAS 479	Orange G (RBBR)
Bjerkandera adusta CCBAS 232 *Phanerochaete chrysosporium* CCBAS 571 *Pleurotus ostreatus* CCBAS 473	Orange G Amarant RBBR Cu-ftalocijanin Poly R-478
Trametes hirusta *Trametes gibbosa* *Trametes biforme*	Metilensko modrilo Malahitno zelenilo Remazol crno 5 (RB5)

2.2.1.1. Trametes versicolor

Trametes versicolor je gljiva bijeloga truljenja koja se još naziva „puranov rep“ zbog svog specifičnog plodnog izgleda koji podsjeća na puranov rep (**Slika 5**)**.** Ubraja se u razred *Basidiomycetes* (Webster i Weber, 2007).



Slika 5 Prikaz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (http://curbstonevalley.com, 24.07.2016.)

T. versicolor raste na stabljikama, deblima te otpalim granama raspadajućeg drveća. Ponekad se nalazi na ranama živog drveta, na način da stvara redove, nakupine ili se preklapaju (Tišma i sur., 2013). Otporna je na visoke temperature te raste pri niskoj relativnoj vlažnosti (Webster i Weber, 2007). Rast na agarnim pločama prepoznatljiv je po čupavom, bijelom miceliju. Proizvodi sve enzime koji su potrebni za učinkovitu razgradnju lignina, polikloriranih bifenila, policikličkih aromatskih ugljikovodika i sintetičkih bojila. Osim toga, koristi se u antikancerogenoj terapiji jer proizvodi glikopeptide (Tišma i sur., 2013). *T. versicolor* najčešće se koristi u industriji papira za proizvodnju pulpe, za proizvodnju enzima i za bioremedijaciju (Xavier i sur., 2007).

U ovom radu, gljiva *T.versicolor* uzgajana je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na obojenom pivskom tropu kao lignoceluloznom nosaču i supstratu.

2.3. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Fermentacije na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation) su procesi pri kojima se mikroorganizmi uzgajaju na površini čvrstih materijala, u odsutnosti slobodne vode. Čvrsti materijali, osim kao nosači, mogu služiti i kao supstrati (izvor hranjivih tvari) te tada govorimo o neinertnim nosačima (npr. lignocelulozni materijali). Kada služe samo kao nosači (npr. smola, vlakna, staklo), govorimo o inertnim nosačima (Pandey, 2003). Obje vrste nosača definira velika površina po jedinici volumena. Ukoliko se odvija lagano miješanje i kompresija, zadržat će svoju strukturu (Mitchell i sur., 2006).

Fermentacije na čvrstim nosačima najčešće se primjenjuju u proizvodnji hidrolitičkih enzima, hrane, biopesticida i organskih kiselina (Raimault, 1998). U prirodi se fermentacije na čvrstim nosačima neprestano odvijaju i osiguravaju stalnu „reciklaciju“ organskih spojeva (Rahardjo, 2005). Posljednjih godina povećan je interes za provođenje fermentacija na čvrstim nosačima s ciljem obrade čvrstoga otpada, proizvodnje sekundarnih metabolita te proizvodnje funkcionalne hrane (Zweistra-Hoogschagen, 2007). Kao radni mikroorganizam najčešće se koriste filamentozne gljive, nešto rjeđe bakterije i kvasci (Mitchell i sur., 2006).

U odnosu na submerzne fermentacije koje još uvijek prevladavaju u biotehnološkoj industriji, fermentacije na čvrstim nosačima imaju mnogobrojne prednosti: veći prinos proizvoda, jednostavnost izvedbe bioreaktora i procesa, ekonomičnija i bolja aeracija, veća otpornost na kontaminaciju, mala potrošnja energije, uvjeti uzgoja približno jednaki uvjetima prirodnih staništa mikroorganizama, jednostavno izdvajanje proizvoda, olakšana inokulacija sporama raspršivanjem inokuluma unutar supstrata, jednostavna obrada ili mogućnost korištenja ostatka zaostalog nakon fermentacije. No, postoje i određeni nedostaci fermentacije na čvrstim nosačima, a to su: kao posljedica disanja i metabolizma mikroorganizama stvaraju se vruće točke, heterogenost sustava kao posljedica otežanog miješanja, često neophodan predtretman supstrata, upotreba mikroorganizama koji rastu pri niskom aktivitetu vode, veći zahtijevani volumen inokuluma i dugotrajnost procesa (Ali i Zulkali, 2011; Couto i Sanroman, 2006; Mussatto i sur., 2012; Pejin, 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

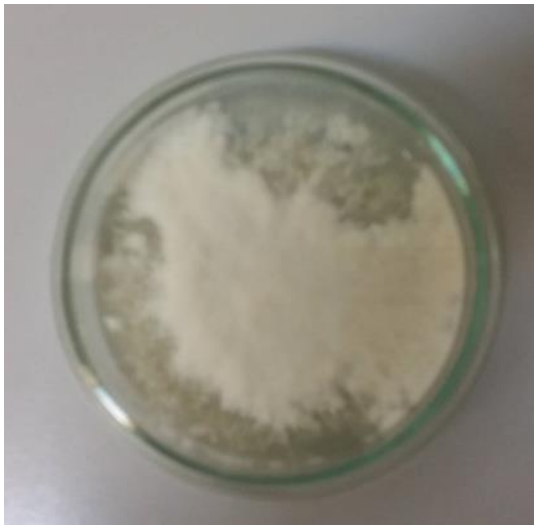
Zadatak ovog rada bio je istražiti mogućnost obezbojenja sintetskih bojila kongo crvenila i mlahitnog zelenila u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima - agarnim pločama i obojenom lignoceluloznom supstratu, pomoću gljive *T. versicolor* CCBAS AG613.

3.1.1. Bojila

U istraživanju su korištena sintetska bojila kongo crvenilo i malahitno zelenilo (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska).

3.1.2. Mikroorganizmi

Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijeloga truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613 (Culture Collection of Basidiomycetes, Prag, Češka). Gljiva je uzgajana na krumpirovom agaru (Biolife Italiana, Milano, Italija) pri 27°C tijekom sedam dana (**Slika 6**). U daljnjem istraživanju su kao inokulum korišteni micelijski diskovi promjera 6 mm.



Slika 6 Prikaz radnog mikroorganizma *T. versicolor*

3.1.3. Supstrat

Za potrebe istraživanja biološke obrade obojenog lignoceluloznog materijala, korišten je osušeni pivski trop (**Slika 7**) kao supstrat, odnosno neinertni nosač.



Slika 7 Prikaz osušenog pivskog tropa

3.1.4. Kemikalije

Etilni alkohol za sterilizaciju pribora i radnog prostora.

3.1.5. Aparatura i pribor

U radu su korištene sljedeće aparature i pribor:

- za vaganje su korištene tehnička vaga (RADWAG, Tehnicaunitronik, tip: WPS 1200, Njemačka) i analitička vaga (EXPLORER, Ohaus, Švicarska),
- za sterilizaciju laboratorijskog posuđa i pribora, hranjivih podloga i vode korišten je autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd i Varioklav® Dampfsterillisatoren Typ 500, HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Njemačka),
- za homogenizaciju otopina i podloga korišten je vibrirajući mješač (Vibromix 10, Tehtnica, Zelezniki, Slovenija),
- za osiguravanje sterilnosti pri radu korišten je laminarij AV100-CV100 – mikrobiološki zaštitni kabinet (TELSTAR, Španjolska),
- uzgoj mikroorganizama na agarnim pločama proveden je u inkubator (Termo medicinski aparat, BTEST, Bodalec Havoić, Zagreb, Hrvatska),

- za mjerenje promjera kolonija i obezbojenja korišteno je digitalno pomično mjerilo,
- za istraživanje biološke obrade obojenog lignoceluloznog materijala korišten je laboratorijski horizontalno – cilindrični bioreaktor,
- za mjerenje temperature i relativne vlažnosti tijekom fermentacije na čvrstim supstratima korišteni su uređaji Testo 635 i Testo 350 (Testo Inc., Sparta, New Jersey, USA) (**Slika 8**),



Slika 8 Prikaz uređaja Testo 350 i Testo 635 za mjerenje temperature i relativne vlažnosti

- za određivanje udjela suhe tvari korišten je halogen analizator vlage Halogen Moisture Analyzer HR 73 (Mettler Toledo, Švicarska)
- za sušenje pribora korišten je sušionik ST-01/02 (Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb) i
- za određivanja boje korišten je kromametar Konica Minolta CR 400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) (**Slika 9**)



Slika 9 Prikaz kromametra Konica Minolta CR 400

3.2. METODE

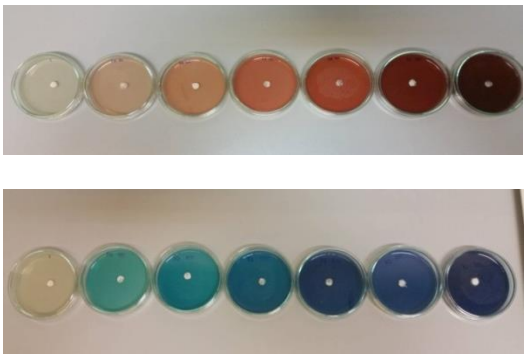
3.2.1. Priprema podloge i uzgoj radnog mikroorganizma

Hranjiva podloga za uzgoj gljive bijeloga truljenja *T. versicolor* pripremljena je tako što je izvagano je 42 g krumpirovog agara, te je dodano 1000 mL destilirane vode. Potom je otopina zagrijana do vrenja, te sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C kroz 15 minuta. Poslije sterilizacije, podloga je ohlađena na temperaturu od 45 °C. Po završetku hlađenja, podloga je razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Na pripremljene hranjive podloge nacijepljen je radni mikroorganizam, tako što je micelijski disk promjera 6 mm (kulture stare 7 dana) postavljen u sredinu zdjelice. Inkubacija je trajala 7 dana na 27 °C.

3.2.2. Priprema obojenih hranjivih podloga

Otopine bojila za istraživanje pripremljene su odvagom 0,1 g bojila i dodatkom 3 mL sterilne demineralizirane vode u sterilnu epruvetu. Otopina je intenzivno homogenizirana na vibrirajućem mješaču te je, nakon otapanja, prenesen odgovarajući volumen u tikvice sa sterilnim krumpirovim agarom (kako bi se postigla konačna koncentracija bojila u hranjivim podlogama od 50 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1}, 150 mg L^{-1}, 200 mg L^{-1}, 250 mg L^{-1} i 300 mg L^{-1}. Nakon homogenizacije, po 20 mL ovako pripremljenih podloga različitih koncentracija razliveno je u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Nakon skrutnjavanja, podloge su nacijepljene micelijskim diskovima gljive *T. versicolor* kako je već prethodno opisano (**Slika 10**). Kao biotička kontrola,

pripremljene su hranjive podloge bez dodatka bojila koje su nacijepljene na isti način. Kao abiotička kontrola poslužile su Petrijeve zdjelice s obojenim agarom, koje nisu nacijepljene gljivom. Inkubacija pri temperaturi od 27 °C je trajala od 16 (kongo crvenilo) do 38 dana (malahitno zelenilo), pri čemu je praćen rast radnog mikroorganizma i promjena boje hranjive podloge svaka dva dana, mjerenjem promjera kolonije radnog mikroorganizma i obezbojenja (promjene intenziteta boje) područja pomoću digitalnog pomičnog mjerača.



Slika 10 Prikaz nacijepljenih hranjivih podloga s dodatkom različitih koncentracija bojila kongo crvenila i malahitnog zelenila.

3.2.3. Uzgoj gljive *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskom horizontalno – cilindričnom staklenom bioreaktoru

Uzgoj *T. versicolor* na obojenom pivskom tropu kao čvrstom nosaču proveden je u laboratorijskom horizontalno–cilindričnom staklenom bioreaktoru volumena 4,25 L, opremljenom potrebnim osjetilima (ubodne temperaturne sonde Tip K, uređaji Testo 350 i Testo 635). Bioreaktor je napunjen s 250 g pivskoga tropa i 350 mL otopine bojila koncentracije 150 mg L^{-1} , te je steriliziran u autoklavu jedan sat na temperaturi od 121°C. Nacjepljivanje je provedeno dodatkom 25 micelijskih diskova (promjera 6 mm) kulture *T. versicolor* stare 7 dana. Uzgoj je proveden pri sobnoj temperaturi tijekom 21 dana uz aeraciju sterilnim zrakom, koja je provođena kontinuirano pri protoku od 30 L h^{-1}. Sadržaj bioreaktora ručno je miješan svakih 24 sata kroz pet minuta. Za vrijeme istraživanja praćene su promjene procesnih parametara: relativna vlažnost zraka u bioreaktoru, temperatura u bioreaktoru, temperatura sloja supstrata, okolna temperatura, promjene mase supstrata, promjene boje supstrata. Na **Slici 11** prikazan je bioreaktor s pripadajućom potrebnom

opremom. Laboratorijska staklenka volumena 1 L, napunjena obojenim pivskim tropom služila je kao abiotička kontrola pri mjerenju razlike u boji na početku i na kraju uzgoja.



Slika 11 Prikaz laboratorijskog horizontalno – cilindrično staklenog bioreaktora s pripadajućom opremom

3.2.4. Određivanje udjela vlage

Po 3 g uzorka postavljeno je u aluminijsku posudicu analizatora vlage te je određivan udjel vlage. Analizator vlage sadrži vagu i halogene grijače koji generiraju infracrveno zračenje. Određivanje vlage temelji se na termogravimetrijskom principu. Proces se prekida kada se uslijed zagrijavanja i isparavanja vode smanjuje masa uzorka do konstantne mase.

3.2.5. Određivanje boje uzorka

U istraživanju su praćene a*, b*, L* vrijednosti uzoraka nakon 7, 14 i 21 dan fermentacije i njihovih kontrola. Kromametar je uređaj za mjerenje boje uzorka. Radi na principu da mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Predmet koji želimo izmjeriti se postavlja na otvor mjerne glave 8 mm. U otvoru se nalazi ksenonska lučna svjetiljka koja na površinu predmeta svjetlost baca pulsiranjem. Šest osjetljivih silikonskih fotoćelija mjeri reflektiranu svjetlost. Računalo zapisuje dobivene podatke i izražava ih u pet sustava. Za potrebe istraživanja korišten je Lab sustav. To je sustav koji daje slične vrijednosti kao i ljudsko oko.

Jednadžba za izračunavanje ukupne promjene boje (ΔE):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)\ 2 + (\Delta a^*)\ 2 + (\Delta b^*)\ 2]^{1/2} ,$$

odnosno kao promjena boje (C*ab):

$$Cab^* = [(\Delta a^*)\ 2 + (\Delta b^*)\ 2]^{1/2}$$

L* - vrijednosti daju ocjenu je li nešto tamno ili svijetlo; predmet je crn ukoliko je L*=0, a bijel ukoliko je L*=100

a* - vrijednost koja može biti pozitivna ili negativna, ako je pozitivna tada je rezultat crvene boje, ako je negativna tada je rezultat zelene boje

b* - vrijednost koja može biti pozitivna ili negativna, ukoliko je pozitivna tada je rezultat žuta boja, a ukoliko je negativna tada je rezultat plave boje.

3.2.6. Statistička obrada

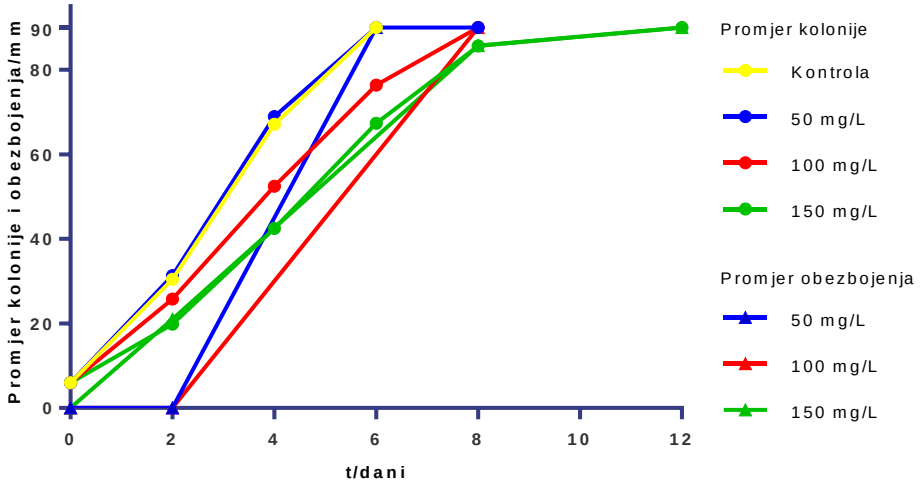
Za statističku obradu rezultata korišteni su programi Microsoft Excel 2013 (Microsoft Excel 2013, Redmond, Washington, SAD) te GraphPad Prism ver. 6 za računalni sustav Windows (GraphPad Software, La Jolla, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1.1. Istraživanje sposobnosti obezbojenja bojila pomoću *T.* versicolor na agarnim pločama

U ovom dijelu rada ispitana je sposobnost obezbojenja strukturno različitih sintetskih bojila, azo bojila kongo crvenila i trifenilmetanskog bojila malahitnog zelenila, na agarnim pločama pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613. Rast gljive i sposobnost obezbojenja bojila prikazani su na **slikama 12–17**.

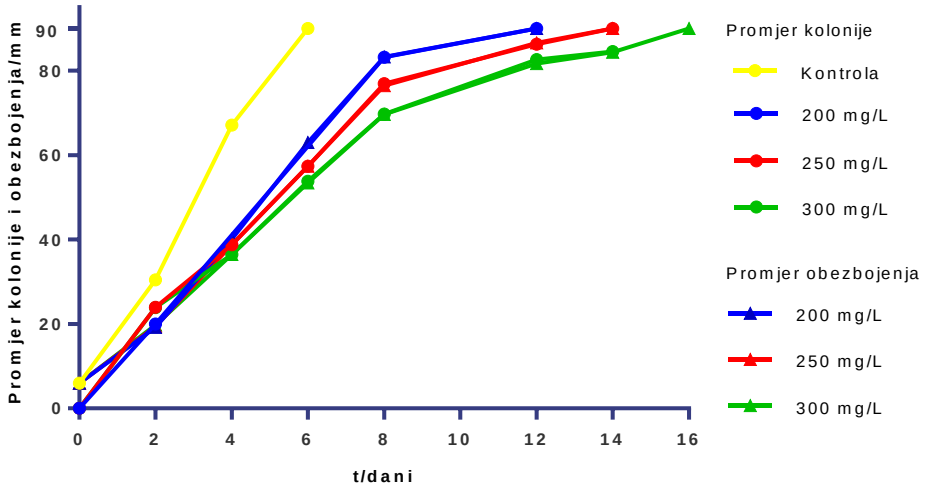
Slika 12 prikazuje promjer kolonije i zonu obezbojenja kongo crvenila za koncentracije od 50 do 150 mg L^{-1}. Iz krivulja je vidljivo kako rast gljive *T. versicolor* nije snažno inhibiran dodatkom bojila u podlogu. Pri dodatku bojila u podlogu u koncentraciji od 50 mg L^{-1}, krivulja se preklapa s krivuljom kontrole, što ukazuje na jednaku brzinu rasta gljive na podlozi s dodatkom i bez dodatka bojila. Nadalje, krivulje promjera obezbojenja bojila pokazuju kako do prve vidljive promjene intenziteta boje dolazi tek od 6. dana uzgoja, pri čemu se promjer obezbojenja ne razlikuje značajno od promjera porasta kolonije.



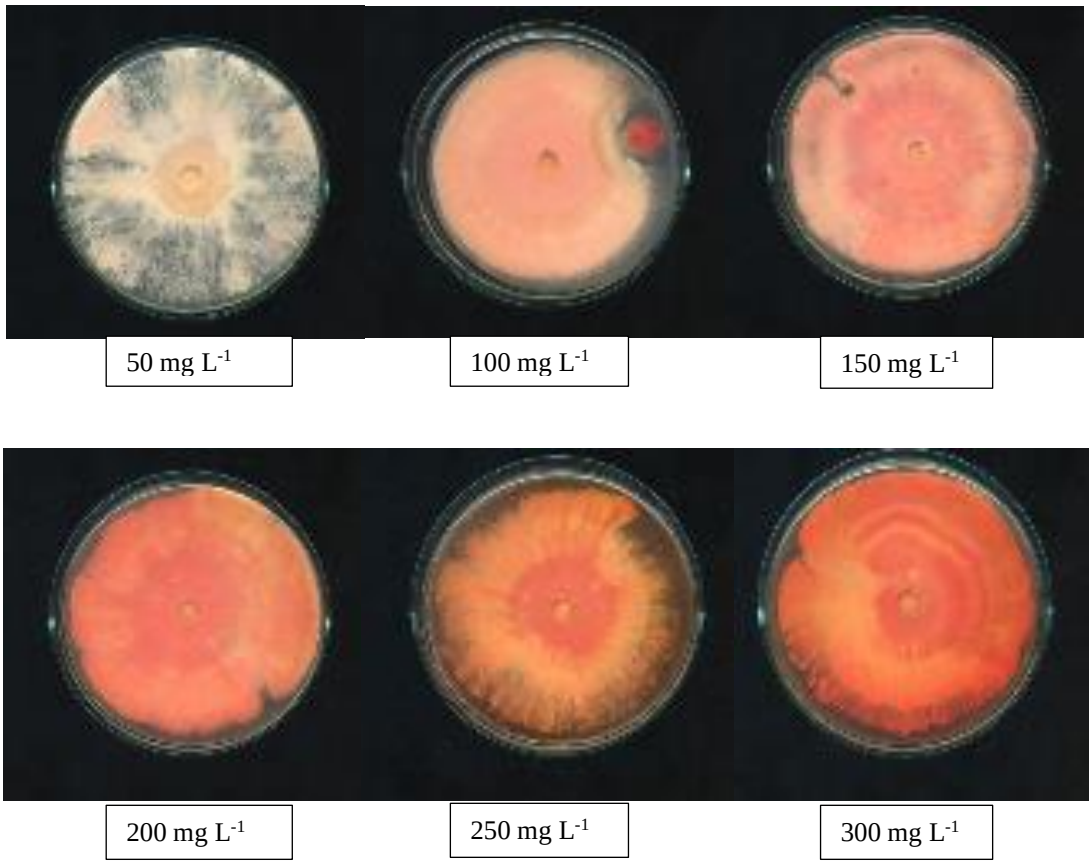
Slika 12 Promjer kolonije *T. versicolor* CCBAS AG613 i zona obezbojenja agarnih pločama s dodatkom kongo crvenila (koncentracije 50 – 150 mg L^{-1})

Dodatak kongo crvenila u podlogu za uzgoj u koncentracijama od 200 do 300 mg L^{-1} snažnije inhibira rast gljive u odnosu na niže primijenjene koncentracije bojila, što je vidljivo iz krivulja prikazanih na **slici 13** koje se samo u prvim danima uzgoja ne razlikuju značajno od kontrole. Kao i kod nižih koncentracija, krivulje promjera obezbojenja preklapaju se pri svim koncentracijama s krivuljama promjera kolonije.

Iako je pri svim istraživanim koncentracijama kongo crvenila u podlozi tijekom uzgoja došlo do promjene intenziteta boje agarne podloge u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu, niti pri jednoj koncentraciji nije došlo do potpunog obezbojenja (**slika 14**). Ovo ne iznenađuje s obzirom na činjenicu kako se radi o aromatskom spoju koji pripada skupini azo bojila, vrlo teško biorazgradljivih spojeva koji time imaju tendenciju bioakumulacije u okolišu (Gudelj i sur., 2011; Jayasinghe i sur., 2008)

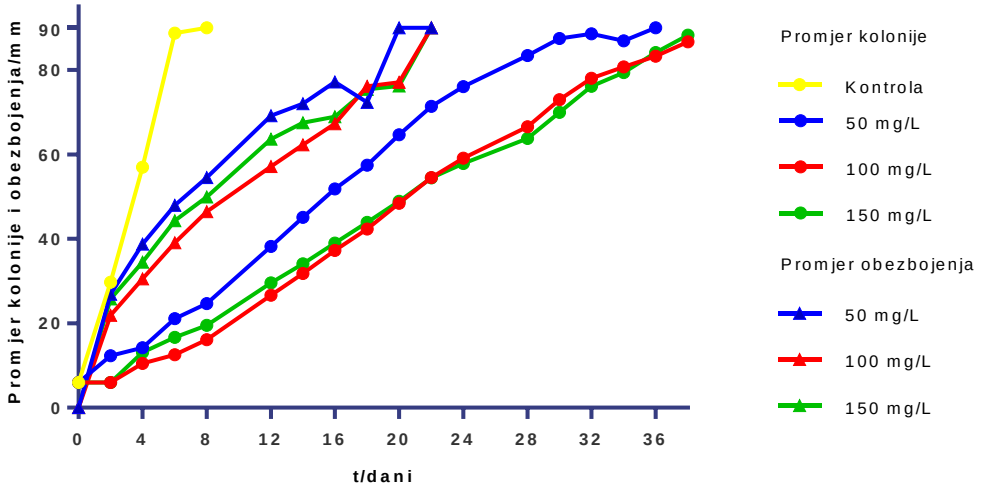


Slika 13 Promjer kolonije *T. versicolor* CCBAS AG613 i zona obezbojenja agarnih pločama s dodatkom kongo crvenila (koncentracije 200 – 300 mg L^{-1})

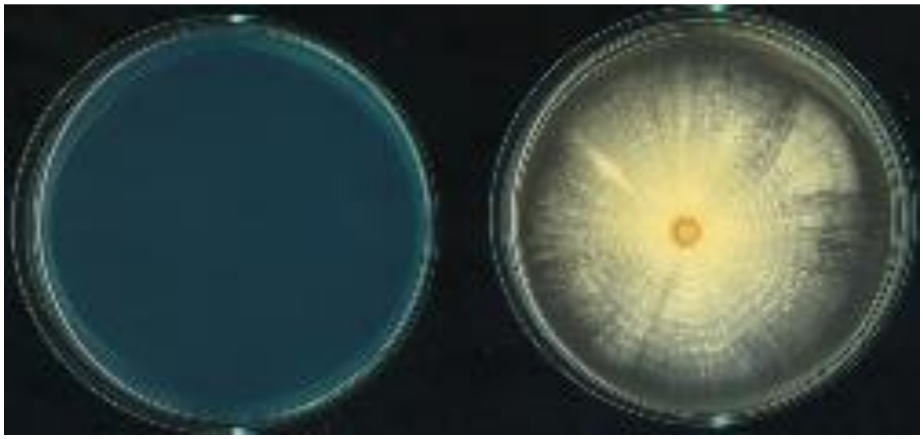


Slika 14 Obezbojenje kongo crvenila na agarnim pločama s različitim koncentracijama bojila pomoću *T. versicolor* CCBAS AG613

Na **slici 15** prikazani su promjer kolonije i zona obezbojenja malahitnog zelenila za koncentracije 50, 100 i 150 mg L^{-1}. Iz grafa je vidljivo da je porast kolonije praćen odgovarajućim porastom zone obezbojenja, odnosno promjene boje. Pri tome je promjer obezbojenja veći od promjera rasta kolonije te do promjene boje (smanjenje intenziteta) cijele površine agarne ploče (90 mm) za sve navedene koncentracije dolazi nakon 22 dana. Potpuno obezbojenje agarnih ploča primijećeno je samo za koncentraciju 50 mg L^{-1} (**slika 16**).



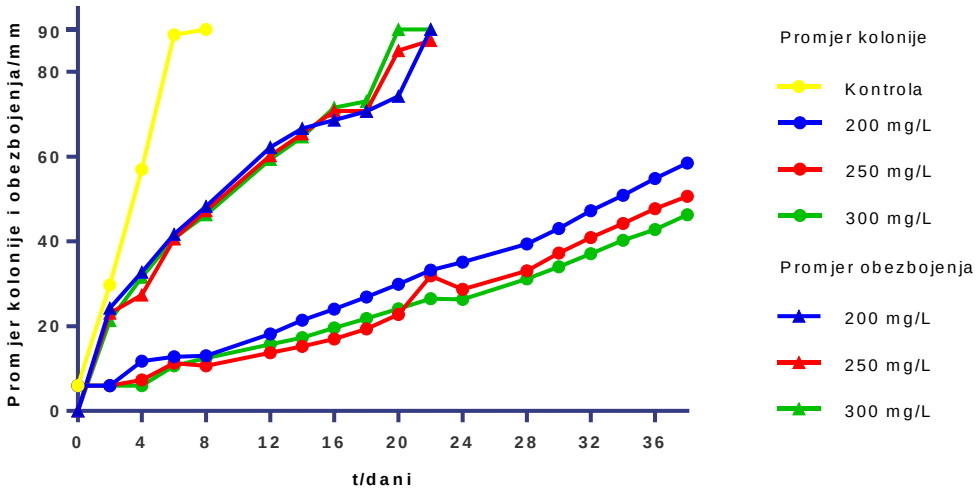
Slika 15 Promjer kolonije *T. versicolor* CCBAS AG613 i zona obezbojenja agarnih pločama s dodatkom malahitnog zelenila (koncentracije 50 – 150 mg L^{-1})



Slika 16 Potpuno obezbojenje agarne ploče s dodatkom malahitnog zelenila u koncentraciji 50 mg L^{-1} pomoću *T. versicolor* CCBAS AG613 nakon 22 dana

Na **slici 17** prikazani su promjer kolonije i zona obezbojenja malahitnog zelenila za koncentracije 200, 250 i 300 mg L^{-1}. Iz grafa se može zamijetiti kako je pri navedenim koncentracijama promjer kolonija u odnosu na promjer zone obezbojenja manji, odnosno rast gljive snažnije je inhibiran dodatkom bojila u podlogu, što se očituje kroz sporiji rast. Promjer zona obezbojenja, pri tome, ostaje na razini onih zabilježenih pri nižim koncentracijama bojila u podlozi, što ukazuje na dobru sposobnost obezbojenja korištenog

soja gljive *T. versicolor*. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima drugih istraživača koji također navode snažan inhibitorni učinak malahitnog zelenila na rast gljiva bijelog truljenja (2008; Eichlerová i sur., 2006; Eichlerová i sur., 2006a), uz dobru sposobnost obezbojenja agarnih ploča (Jayasinghe i sur., 2008).



Slika 17 Promjer kolonije *T. versicolor* CCBAS AG613 i zona obezbojenja agarnih pločama s dodatkom malahitnog zelenila (koncentracije 200 – 300 mg L^{-1})

Promjer kolonije kontrolnih uzoraka (bez dodatka bojila u podlogu) veći je od promjera kolonija koje su rasle na podlogama s dodatkom oba bojila, što je potvrđeno statističkim testom analize varijance ANOVA uz post-hock Bonterroni-ijev test utvrđivanja razlike između podataka. U prvim danima uzgoja utvrđena je statistički značajna razlika između svih primijenjenih koncentracija na rast gljive (promjer rasta) za oba korištena bojila (osim za malahitno zelenilo u koncentraciji 50 mg L^{-1}), no u kasnijim danima uzgoja razlika je vidljiva samo između skupine manjih primijenjenih koncentracija (50-150 mg L^{-1}) u odnosu na skupinu većih koncentracija (200-300 mg L^{-1}). S druge strane, nije utvrđena statistički značajna razlika u utjecaju različitih koncentracije bojila na promjer obezbojenja bojila.

2.1.2. Istraživanje sposobnosti obezbojenja obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima

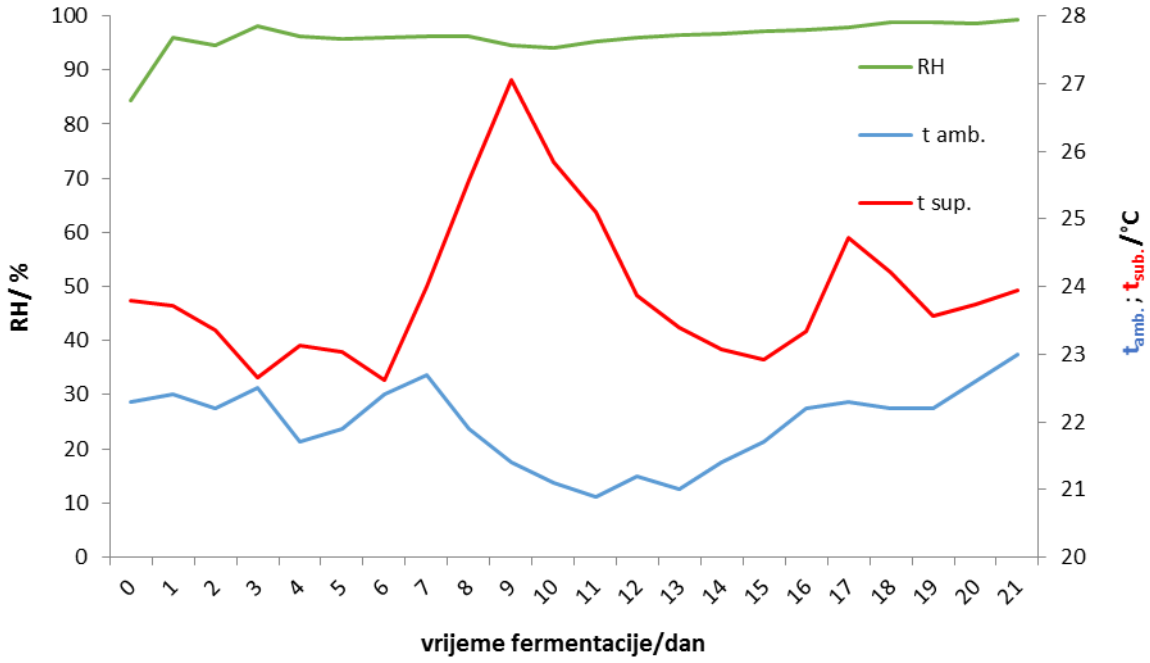
U ovom dijelu rada je istraživana sposobnost obezbojenja pivskog tropa obojenog sintetskim bojilima kongo crvenilom i malahitnim zelenilom (koncentracija 150 mg L^{-1}) pomoću gljive *T. versicolor* CCBAS AG613 u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Obojeni pivski trop pri tome je služio kao neinertni nosač radnog mikroorganizma, odnosno i kao nosač i kao supstrat. Rezultati ovog dijela istraživanja prikazani su na **slikama 18 – 24.**

Gljiva *T. versicolor* CCBAS AG613 dobro je rasla na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom i malahitnim zelenilom. Osim vizualne potvrde rasta gljive u vidu pojave bijelog micelija (**slika 18**), porast temperature u sloju obojenog supstrata u odnosu na okolnu temperaturu također ukazuje na intenzivan rast gljive. Povećanje temperature tijekom fermentacije na čvrstim nosačima, ukoliko nema dobrog miješanja, posljedica je metaboličke aktivnosti u sloju supstrata (Kaminski i sur., 2000).

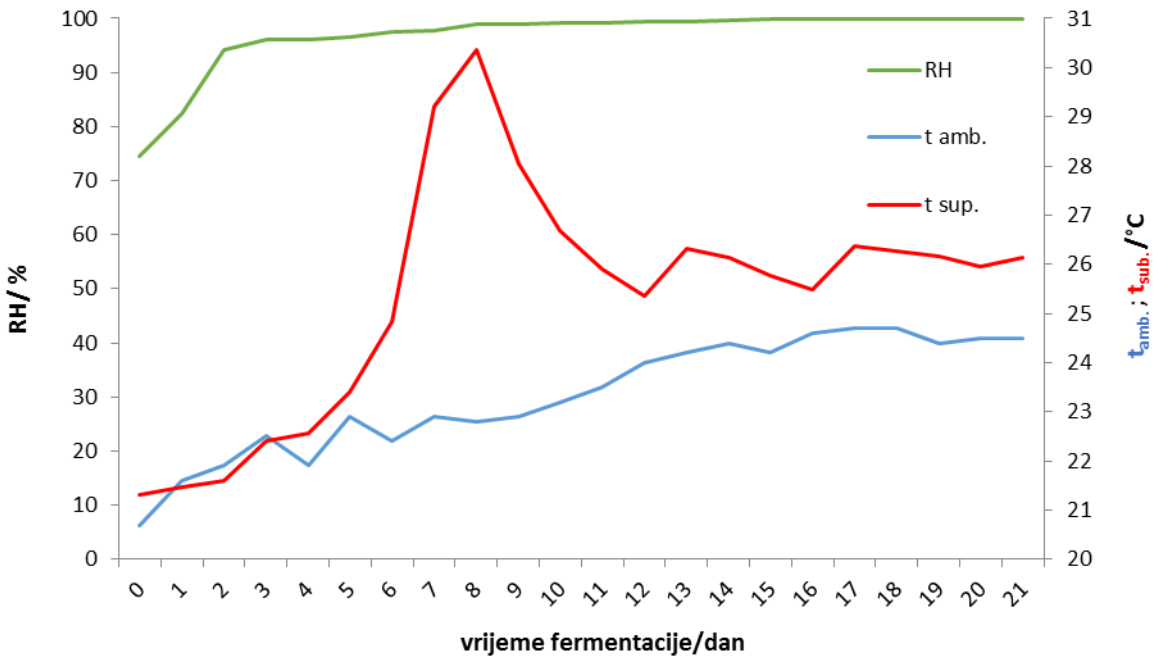


Slika 18 Izgled micelija gljive *T. versicolor* CCBAS AG613 pri rastu na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom

Najveća temperatura u sloju obojenog supstrata izmjerena je 9. dan za kongo crvenilo (**slika 19**), odnosno 8. dan za malahitno zelenilo (**slika 20**), pri čemu je za malahitno zelenilo razlika u odnosu na ambijentalnu temperaturu bila nešto veća nego u slučaju kada je kao supstrat korišten pivski trop obojen kongo crvenilom. Iz grafova je također vidljivo kako je relativna vlažnost u laboratorijskom bioreaktoru u oba eksperimenta bila uravnotežena.

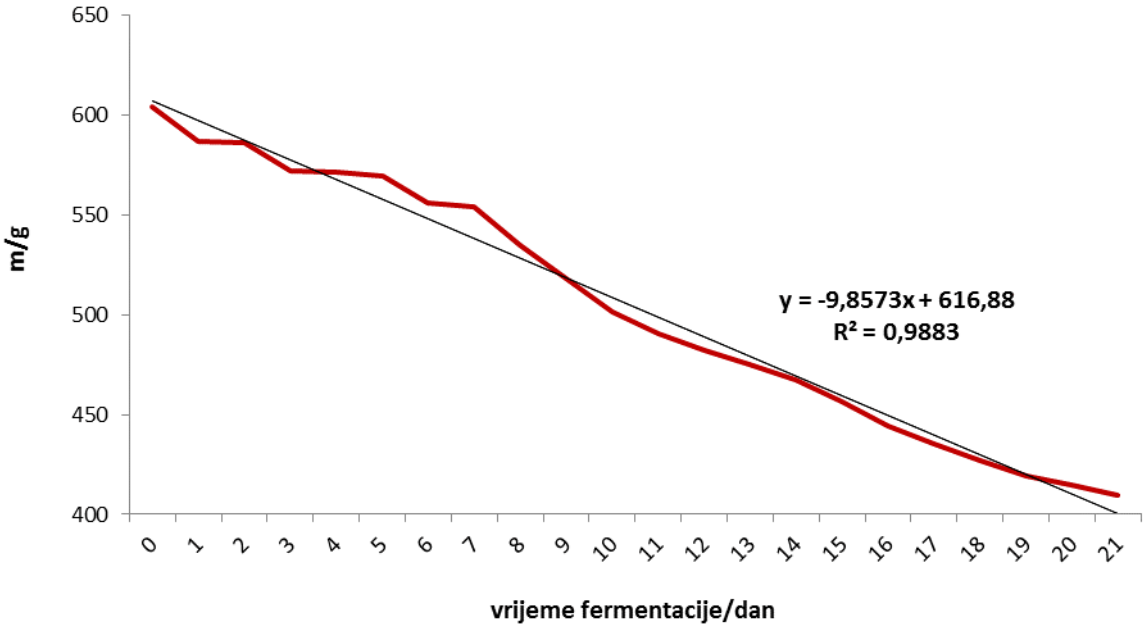


Slika 19 Promjene temperature u sloju supstrata ($t_{sup.}$) i okolne temperature ($t_{amb.}$) te relativne vlažnosti (%RH) u laboratorijskom bioreaktoru tijekom fermentacije na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom

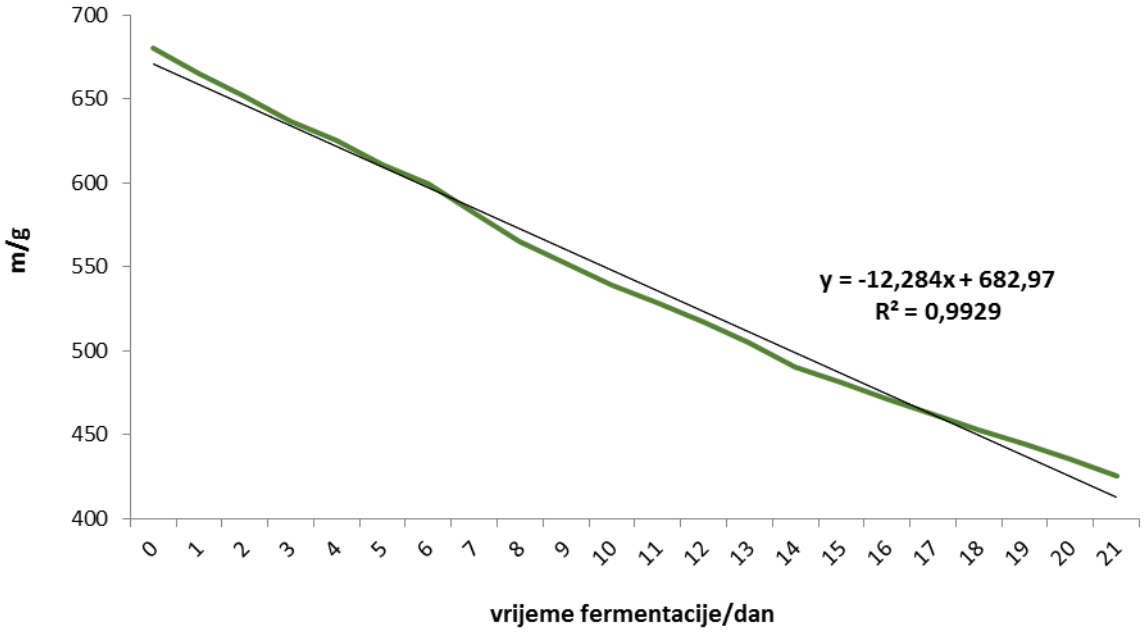


Slika 20 Promjene temperature u sloju supstrata ($t_{sup.}$) i okolne temperature ($t_{amb.}$) te relativne vlažnosti (%RH) u laboratorijskom bioreaktoru tijekom fermentacije na pivskom tropu obojenom malahitnim zelenilom

Slike 21 i 22 prikazuju promjenu mase supstrata, odnosno pivskog tropa obojenog kongo crvenilom i malahitnim zelenilom, tijekom fermentacije. Iz grafova je vidljivo kontinuirano smanjenje mase tijekom fermentacije, koja je na kraju eksperimenta iznosila 32,20 % kada je kao supstrat korišten pivski trop obojen kongo crvenilom, odnosno 37,49 % kada je kao supstrat korišten pivski trop obojen malahitnim zelenilom. Ovo također ukazuje na metaboličku aktivnost gljive, koja ima sposobnost razgradnje lignoceluloznih sastavnica supstrata, što se očituje kao gubitak na masi (Valášková i Baldrian, 2006).

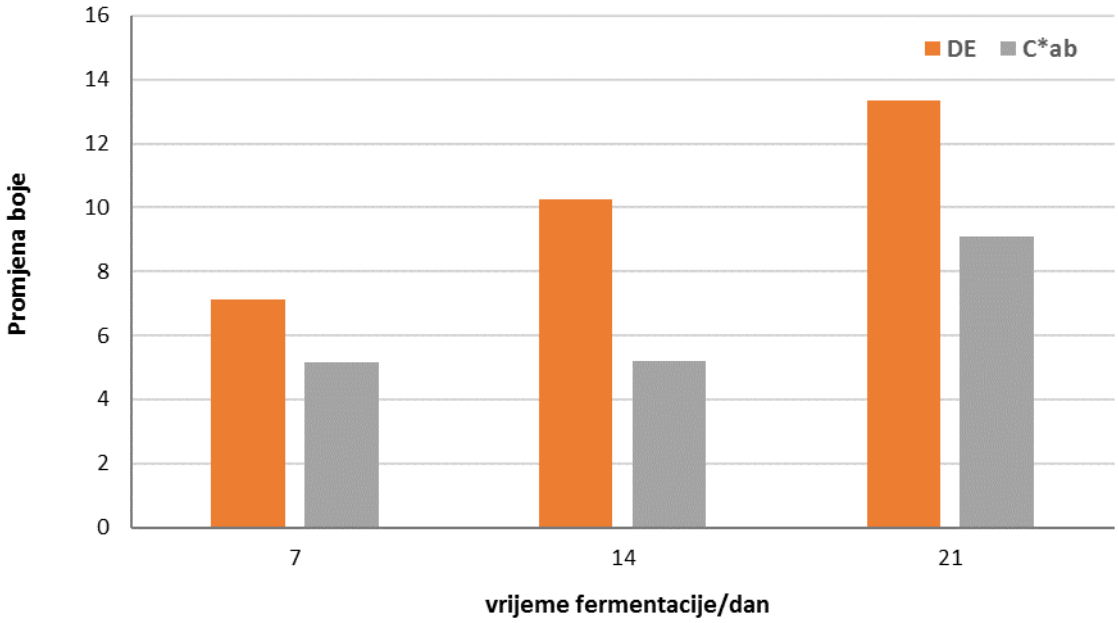


Slika 21 Promjena mase pivskog tropa obojenog kongo crvenilom tijekom fermentacije u laboratorijskom bioreaktoru

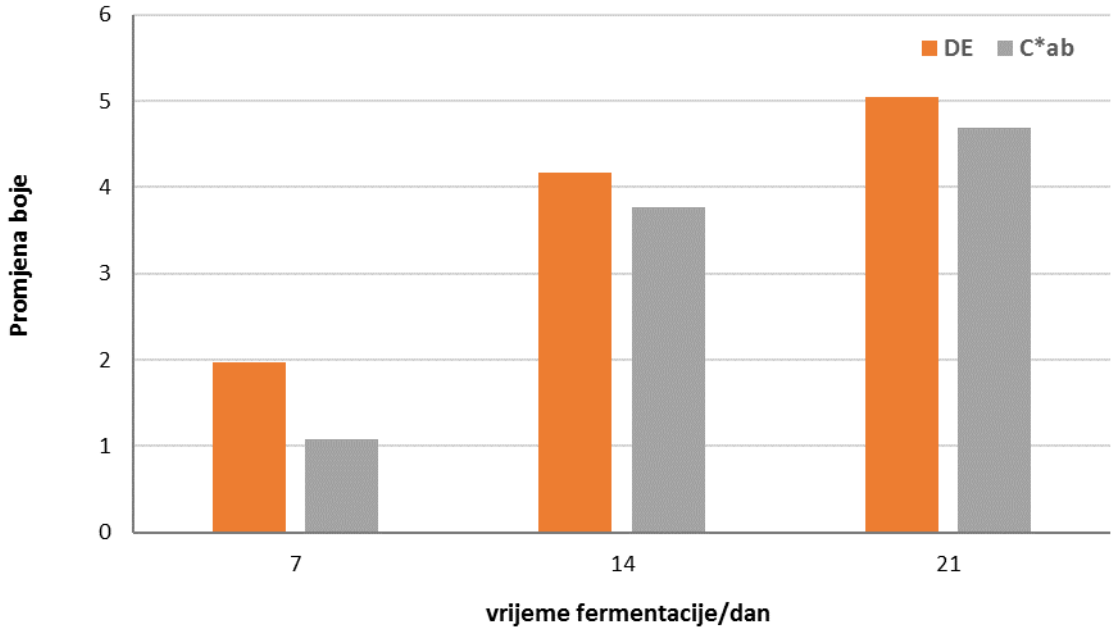


Slika 22 Promjena mase pivskog tropa obojenog malahitnim zelenilom tijekom fermentacije u laboratorijskom bioreaktoru

Slike 23 i **24** prikazuju promjenu boje supstrata (obojenog pivskog tropa) tijekom fermentacije. Boja je izražena kao ukupna promjena boje te promjena intenziteta boje u odnosu na abiotičke kontrole nakon 7, 14 i 21 dan fermentacije. Iako u oba eksperimenta nije došlo do potpunog obezbojenja pivskog tropa, iz grafova je vidljiv kontinuirani porast ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje, odnosno došlo je do djelomičnog obezbojenja supstrata. Ovo je vjerojatno posljedica produkcije ekstracelularnih enzima odgovornih za razgradnju lignoceluloznih sastavnica, poglavito lignina, jer su isti enzimi uključeni i u razgradnju ksenobiotika poput sintetskih bojila (Boer i sur., 2004).



Slika 23 Ukupna promjena boje (ΔE) i promjena intenziteta boje (C*ab) uzoraka pivskog tropa obojenog kongo crvenilom u usporedbi s abiotičkom kontrolom nakon 7, 14 i 21 dan fermentacije.



Slika 24 Ukupna promjena boje (ΔE) i promjena intenziteta boje (C*ab) uzoraka pivskog tropa obojenog malahitnim zelenilom u usporedbi s abiotičkom kontrolom nakon 7, 14 i 21 dan fermentacije.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Tijekom rasta na agarnim pločama s dodatkom sintetskih bojila kongo crvenila i malahitnog zelenila dodanih u koncentracijama od 50 do 300 mg L^{-1} , gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613 pokazala je sposobnost obezbojenja bojila.

2. Do potpunog obezbojenja agarnih ploča nacijepljenih radnim mikroorganizmom došlo je samo u slučaju kada je u podlogu dodano malahitno zelenilo u koncentraciji 50 mg L^{-1} nakon 22 dana uzgoja. Pri svim ostalim primijenjenim koncentracijama došlo je samo do djelomičnog obezbojenja, odnosno smanjenja intenziteta boje agarnih ploča.

3. Primijenjene koncentracije bojila statistički su značajno utjecale na rast gljive, posebno u prvim danima uzgoja. S druge strane, nije utvrđena statistički značajna razlika u utjecaju šest različitih koncentracija istraženih bojila na promjer obezbojenja bojila.

4. Gljiva *T. versicolor* CCBAS AG613 dobro je rasla na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom i malahitnim zelenilom kao supstratu u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima, što se očitovalo u povećanju temperature u sloju supstrata te gubitkom na masi supstrata u iznosu od 32,20 % za kongo crvenilo, odnosno 37,49 % za malahitno zelenilo.

5. Tijekom fermentacije na čvrstim nosačima došlo je do vizualnog djelomičnog obezbojenja obojenog pivskog tropa te je izmjeren kontinuirani porast ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje obojenih fermentiranih uzoraka u odnosu na pripadajuće abiotičke kontrole nakon 7, 14 i 21 dan fermentacije.

6. Dobiveni rezultati upućuju na biotehnološki potencijal gljive *T. versicolor* CCBAS AG613 kao radnog mikroorganizma u procesima biorazgradnje i uklanjanja kongo crvenila i malahitnog zelenila iz okoliša.

6. LITERATURA

Abdolali A, Ngo HH, Guo WS, Lee DJ, Tung KL, Wang XC: Development and evaluation of a new multi-metal binding biosorbent. *Bioresource Technology*, 160:98–106, 2014.

Adedayo O, Javadpour S, Taylor C, Anderson WA, Moo-Young M: Decolourization and detoxification of methyl red bay aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:545-550, 2004.

Ali H K Q, Zulkali M M D: Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 25, 255–2662011.

Alonso D, Martins B, Ferreira H, Simões R, Leite R, Ferreira H, Souza MM: Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. *U Integrated Waste Management* - Volume II. Mr. Sunil Kumar (Ed.), InTech, Brazil, 2005.

Antunović K: Obezbojenje sintetskih bojila pomoću peleta gljiva. Završni rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2015.

Azmi W, Sani RK, Banerjee UC: Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 22:185-191, 1998.

Bailey SE, Olin TJ, Bricka RM, Adrian DD: A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, 33:2469–2479, 1999.

Boer CG, Obici L, de Siuza CG, Peralta RM: Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula* (*Lentinus*) edodes producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*, 94:107-1122004.

Cagnon B, Py X, Guillot A, Stoeckli F, Chambat G: Contributions of hemicellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. *Bioresource Technology*, 100:292–298, 2009.

Cheriaa J, Khaireddine M, Rouabhia M, Bakhrouf A: Removal of Triphenylmethane Dyes by Bacterial Consortium. *The Scientific World Journal*, 2012:9, 2012.

Couto SR, Sanroman MA: Application of solid-state fermentation to food industry: a review. *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, Elsevier, 2006.

Cristóvão OR,Tavares APM, Ribeiro AS, Loureiro JM, Boaventura RAR, Macedo EA: Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresource Technology*, 99:4768-4774, 2008.

Curbstonevalley, 2010.

http://curbstonevalley.com/wp-content/uploads/2010/02/TversicolorLg.jpg [24.07.2016.]

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. *Bioresource Technology*, 99:2552-8, 2008.

Duraković S, Duraković L: Mikrobiologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb, 2003

Durand A: Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 113–125, Elsevier, 2003.

Eichlerová I, Homolka L, Nerud F: Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in Ischnoderma resinosum. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 759–766, 2006.

Eichlerová I, Homolka L, Nerud F: Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology*, 97:2153–2159, 2006.

Elisashvili V, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Khardziani T, Agathos SN: Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 331–339, 2009.

Enciklopedija Britannica Online:

http://www.britannica.com/EBchecked/topic/174980/dye [21.07.2016.]

Eshghia H, Alishahib Z, Zokaeib M, Daroodia A, Tabasib E: Decolorization of methylene blue by new fungus: *Trichaptum biforme* and decolorization of three synthetic dyes by

Trametes hirsuta and *Trametes gibbosa*. *European Journal of Chemistry*, 2:463-468, 2011.

Forgacs E, Cserháti T, Oros G: Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*, 30:953–971, 2004.

Garg VK, Amita M, Kumar R, Gupta R: Basic dye (methylene blue) removal from simulated wastewater by adsorption using Indian Rosewood sawdust: a timber industry waste. *Dyes Pigments*, 63:243-50, 2004.

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

Gredelj A: Organska sintetska bojila u odabranim proizvodima za osobnu higijenu – negativan utjecaj na zdravlje i okoliš. Sveučilište u Zagrebu, Geotehnički fakultet, Varaždin 2013.

Gudelj I, Hrenović J, Landeka Dragičević T, Delaš F, Šoljan V, Gudelj H: Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnološke strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 62:91-101, 2011.

Gupta VK, Suhas: Application of low-cost adsorbents for dye removal--a review. *Journal of Environmental Management*, 90:2313-2342, 2009.

http://enciklopedija.lzmk.hr/clanak.aspx?id=19913 [21.07.2016.]

http://greencotton.wordpress.com/2008/06/18/synthetic-dyes-a-look-at-the-goodthe-bad-and-the-ugly/ [22.07.2016.]

http://www.fibre2fashion.com/ak-chemidyes/products.asp [21.07.2016.]

http://www.mzt.hr/projekti9095/2/14/037/rad_h.htm [23.07.2016.]

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Congo-red-2D-skeletal.png [21.07.2016.]

Janušić V, Ćurić D, Krička T, Voća N, Matin A: Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. Stručni članak, 2008.

Jayasinghe C, Imtiaj A, Lee GW, Im KH, Hur H, Lee MW, Yang HS, Lee TS: Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes. *Mycobiology* 36:114-120, 2008.

Kaminski P, Hedger J, Williams J, Bucke C, Swadling: Dielectric permittivity as a method for the real time monitoring of fungal growth during a solid substrate food fermentation of Quinoa grains, U: Progress in Biotechnology 17, Food Biotechnology, Bielecki S., Tramper J. i Polak J. urednici, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Nizozemska, pp.396, 2000.

Klarić I: Tehnološki proces organske industrije (I.dio). Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2008.

Li H-X, Zhang R-J, Tang L, Zhang J-H, Mao Z-G: Use of Cassava Residue for the Removal of Congo Red from Aqueous Solution by a Novel Process Incorporating Adsorption and In Vivo Decolorization. *BioResources*, 9:6682–6698, 2014.

Mitchell D A, Krieger N, Berovič M: Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation. Springer, Heidelberg, 2006.

Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Marchant R: Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology*, 72:219–226, 2000.

Ogugbue CJ, Sawidis T: Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent. *Biotechnology Research International*, 2011:11, 2011.

Pandey A: Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13:81-84, 2003.

Pavičić M: Obezbojenje sintetskih bojila na agarnim pločama odabranim gljivama. Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek. 2015.

Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT: The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigments*, 58:179-96, 2003.

Pejin D J: Industrijska mikrobiologija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2003.

Petrinović K: Uklanjanje sintetskog bojila malahitnog zelenila iz vodenih otopina upotrebom različitih bioadsorbensa. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek, 2014.

Rafatullah M, Sulaiman O, Hashim R, Ahmad A: Adsorption of methylene blue on lowcostadsorbents: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 70–80, 2010.

Rahardjo, YSP: Fungal Mats in Solid-State Fermentation. Doktorski rad, 90-8504-212-7. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands , 2005.

Raimbault M: General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, Universidad Católica de Valparaíso – Chile, *Electronic Journal of Biotechnology*, 0717-3458, 1998.

Reife A, Freeman HS: Environmental Chemistry of Dyes and Pigments. *JWRS*, New York, 3, 6-7, 18, 43-46, 50-51, 56-58, 1996.

Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP: Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42: 138-157, 2011.

Sigoillot JC, Berrin JG, 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 bioengieering. *Advancesin Bothanical Research*, Elsevier, Amsterdam, 2012.

Singh H: Mycoremediation: Fungal Bioremediation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.

Slokar YM, Le Marechal M: Methods of decolorization of textile wastewaters. *Dyes and Pigments*, 37:335-356, 1998.

Srivastava S, Sinha R, Roy D: Toxicological effects of Malachite Green. *Aquatic Toxicology* 66:319-29, 2004.

Steensma D: „Congo red: Out of Africa. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125:250–252, 2001.

Tehnologija bojila i pigmenata, Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženerstva i tehnologije, Interna skripta https://www.ktf.unist.hr/index.php/zot1/nastavni-materijali-zot/nastavni materijali?download= 2338:procesi-organske-industrije-predavanja-i-dio [20.07.2016.]

Tišma M, Panjičko M, Zelić B, Velić N: Razgradnja lignoceluloznega materiala s pomočjo gliv bele trohnobe. Ekolist, 2013.

Tušar B., Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, str. 24. CROATIA KNJIGA, Zagreb, 2004.

Valášková V, Baldrian P: Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases, *Microbiology* 152, 3613–3622, 2006.

Velić N: Uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda upotrebom lignoceluloznog otpada prehrambene industrije kao adsorbensa. Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Venkataraman K: The Chemistry of Synthetic Dyes. Academic Press, London, 1970.

Vujević D: Uklanjanje organskih tvari iz obojenih otpadnih voda primjenom naprednih oksidacijskih procesa. Disertacija. Fakultet kemisjkog inženjerstva i tehlologije, Zagreb, 2007.

Webster J, Weber R: Introduction to Fungi. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N: White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22, 161–187, Elsevier, 2003.

Xavier A M R B, Tavares A P M, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 10, No. 3, 2007.

Yesilada O, Asma D, Cing S: Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*, 38:933-938, 2003.

Yu Z, Wen X: Screening and indentification of yeast for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56:109-114, 2005.

Zollinger H: Azo and Diazo Chemistry Aliphatic and Aromatic Compounds*, Intercience Publishers*, Inc., 1961., str. 27.

Zweistra-Hoogschagen Marisca: Macroscopic modelling of solid-state fermentation. Doktorski rad. Wageningen Universiteit, Wageningen, 2007.