

Obezbojenje sintetskih bojila gljivama roda *Ganoderma* i *Trametes*

Silađi, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:109:422931>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Tena Silađi

Obezbojenje sintetskih bojila gljivama roda *Ganoderma* i *Trametes*

diplomski rad

Osijek, listopad 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za bioproceno inženjerstvo

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Nastavni predmet: Boproceni u zaštiti okoliša

Tema rada je prihvaćena na III. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 3. srpnja 2017. godine

Mentor: izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić*

Komentor: izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*

Obezbojenje sintetskih bojila gljivama roda *Ganoderma* i *Trametes*

Tena Silađi, 380-DI

Sažetak: U ovom radu istražena je mogućnost obezbojenja sintetskih bojila metilenskog modrila i malahitnog zelenila pomoću gljiva bijelog truljenja *G. lucidum* (Curtis) P. Karst, *G. resinaceum* Boud. i *T. versicolor* (L). Provedeni su kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva, koji su bili pozitivni za sve gljive korištene u ovom istraživanju te je potvrđena njihova prikladnost za upotrebu u daljnjim eksperimentima obezbojenja sintetskih bojila. Gljive su uzgajane na agarnim pločama s dodatkom bojila u koncentracijama 10, 30, 50, 100 i 150 mg L⁻¹, te je kroz 14 dana mjeren porast gljive i promjer obezbojenja podloge. Nakon 14 dana, vizualno je praćeno obezbojenje podloga koje su čuvane na sobnoj temperaturi do potpunog obezbojenja. Sposobnost potpunog obezbojenja agarnih ploča nakon 28 dana za oba bojila pokazala je samo gljiva *T. versicolor* i to za metilensko modrilo u koncentracijama 10-100 mg L⁻¹, dok je agarne ploče s dodatkom malahitnog zelenila obezbojila u svim koncentracijama. *G. lucidum* potpuno je obezbojila podlogu sa dodatkom metilenskog modrila u koncentracijama 10 i 30 mg L⁻¹, a *G. resinaceum* samo u koncentraciji 10 mg L⁻¹. Rast gljiva je bio snažno inhibiran dodatkom malahitnog zelenila u podlogu, posebice gljiva roda *Ganoderma* koje na ovom bojilu nisu pokazale sposobnost obezbojenja niti za jednu ispitivanu koncentraciju. Također, ispitana je mogućnost obezbojenja sintetskog bojila metilenskog modrila pomoću *T. versicolor* u uvjetima fermentacija na čvrstim nosačima, prilikom čega je kao supstrat i nosač korišten obojeni pivski trop. Gljiva *T. versicolor* dobro je rasla na pivskom tropu obojenom metilenskim modrilom, što se očitovalo porastom udjela proteinskog dušika te gubitkom na masi supstrata od 18 % u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu. Tijekom fermentacije na čvrstim nosačima došlo je do djelomičnog obezbojenja pivskog tropa što je potvrđeno vizualno i mjerenjem promjene parametara boje.

Gljučne riječi: malahitno zelenilo, metilensko modrilo, *Ganoderma*, *Trametes*, fermentacija na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 59 stranica
16 slika
10 tablica
59 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | doc. dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i> | Predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | član-mentor |
| 3. | izv. prof. dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i> | član-komentor |
| 4. | doc. dr. sc. <i>Tihana Marček</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 5. listopada 2017.

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 of Osijek****Faculty of Food Technology Osijek****Department of Process Engineering****Subdepartment of Bioprocess Engineering**

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering**Scientific area:** Biotechnical sciences**Scientific field:** Biotechnology**Course title:** Bioprocesses in Environment Protection**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. III held on 3rd July 2017.**Supervisor:** *Natalija Velić*, PhD, associate prof.**Co-supervisor:** *Hrvoje Pavlović*, PhD, associate prof.**Decolorization of synthetic dyes by fungi of genera *Ganoderma* and *Trametes****Tena Siladi*, 380-DI

Summary: This study investigated three white rot fungi *G. lucidum* (Curtis) P. Karst, *G. resinaceum* Boud. i *T. versicolor* (L.) for their ability to decolorize synthetic dyes methylene blue and malachite green. Qualitative tests for determination of cellulolytic and lignolytic activity were performed and were positive for all investigated fungi. Thus, their applicability for further decolourisation tests was confirmed. The fungi were cultivated on agar plates containing dyes at concentrations of 10, 30, 50, 100 i 150 mg L⁻¹ and over 14 days radial growth and the zone of colour change were measured. After 14 days, agar plates were stored at room temperature and further colour change was observed visually. Only *T. versicolor* showed the ability to completely decolorise both dyes on agar plates after 28 days of cultivation (methylene blue concentrations 10-100 mg L⁻¹, and all applied cncentrations of malachite green). *G. lucidum* was able to completely decolorize agar plates containing methylene blue concentrations of 10 and 30 mg L⁻¹, while *G. resinaceum* showed the same ability only when grown on plates containing methylene blue concentration of 10 mg L⁻¹. Malachite green strongly inhibited mycelial growth of all fungal strains, especially *Ganoderma* species which showed no decolorisation ability of this dye. Furthermore, the ability of *T. versicolor* to decolorise methylene blue with under solid-state cultivation conditions was investigated, during which dye-loaded brewers' spent grain was used as a substrate and carrier. *T. versicolor* grew readily under solid-state conditions, which was confirmed by the increase of protein content and substrate mass loss of 18% compared to abiotic control. During solid state fermentation, partial decolorisation of brewers' spent grain occurred, which was confirmed both visually and measuring the changes of color parameters.

Key words: Methylene blue, malachite green, *Trametes*, *Ganoderma*, solid-state fermentation

Thesis contains: 59 pages
16 figures
10 tables
59 references

Original in: Croatian**Defense committee:**

- | | | |
|----|--|---------------|
| 1. | <i>Kristina Mastanjević</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. | <i>Natalija Velić</i> , PhD, associate prof. | Supervisor |
| 3. | <i>Hrvoje Pavlović</i> , PhD, associate prof. | co-supervisor |
| 4. | <i>Tihana Marček</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: October 5th 2017

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

Zahvaljujem se prije svega roditeljima i sestri na svom razumijevanju, motivaciji i ogromnoj podršci koje su mi pružili kroz sve godine studiranja.

Od srca hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Nataliji Velić na neizmjernom strpljenju, trudu i vremenu uloženom u ovaj rad. Također, veliko hvala komentoru, izv. prof. dr. sc. Hrvoju Pavloviću na svim savjetima, trudu i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Hvala tehničarki Jelki Babić koja je rad u laboratoriju učinila još zanimljivijim, te svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog diplomskog rada.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	1
2.1. Bojila	2
2.1.1. Malahitno zelenilo	3
2.1.2. Metilensko modrilo	4
2.2. Utjecaj bojila na zdravlje i okoliš	5
2.3. Metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda	6
2.3.1. Kemijske metode	6
2.3.2. Fizikalne metode	6
2.3.3. Biološke metode	7
2.4. Gljive	8
2.4.1. Gljive bijelog truljenja	8
2.4.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	10
2.4.3. <i>Ganoderma resinaceum</i>	11
2.4.4. <i>Trametes versicolor</i>	11
2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Zadatak	15
3.2. Materijali	15
3.2.1. Bojila	15
3.2.2. Mikroorganizmi	15
3.2.3. Kemikalije	15
3.2.4. Supstrat	16

3.2.5. Aparatura i pribor	16
3.3. Metode	17
3.3.1. Priprema podloga i uzgoj radnih mikroorganizama	17
3.3.2. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva	17
3.3.3. Testovi obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama	20
3.3.4. Uzgoj gljive <i>T. versicolor</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na obojenom pivskom tropu kao neinertnom nosaču.....	21
3.3.5. Određivanje udjela vlage	22
3.3.6. Određivanje boje uzorka	22
3.3.7. Određivanje proteinskog dušika.....	23
3.3.8. Statistička obrada	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti	26
4.2. Istraživanje sposobnosti obezbojenja sintetskih bojila pomoću <i>G. lucidum</i> , <i>G.</i> <i>resinaceum</i> i <i>T. versicolor</i>	27
4.3. Istraživanje sposobnosti obezbojenja obojenog pivskog tropa pomoću <i>T.</i> <i>versicolor</i> u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima.....	40
5. ZAKLJUČAK.....	42
6. LITERATURA	44

1.UVOD

Sintetska bojila koriste se u velikom broju industrija, posebice tekstilnoj. Globalizacija, konzumerizam te modna industrija doveli su do velike potražnje i naglog rasta tekstilne industrije posljednjih nekoliko desetljeća, što se odrazilo i na okoliš. Pretpostavlja se da oko 17 – 20 % onečišćenja okoliša industrijskim otpadnim vodama dolazi upravo iz tvornica tekstila. U raznim procesima proizvodnje i obrade tekstila koristi se više od 8000 različitih kemikalija od kojih su mnoge opasne za ljudsko zdravlje. Također, proizvodnja tekstila zahtjeva velike količine vode. Prosječna tvornica potroši oko 200 000 L vode po toni tekstila, od čega se 16% iskoristi u bojenju. Ovisno o tipu bojila, u procesu bojenja se potroši od 30 do 50 L po kilogramu materijala, od čega najveći dio završi u otpadnoj vodi. Kemikalije korištene u procesima, a posebice bojila, su vrlo teško razgradive (Kant, 2012.).

Razvoj svijesti ljudi o važnosti zaštite okoliša doveo je do donošenja strožih zakona o pročišćavanju obojenih industrijskih efluenata, prije ispuštanja u okoliš. Potreba za pronalaskom novih, efikasnijih te ekonomski isplativih načina pročišćavanja raste. Razvijen je velik broj različitih metoda: kemijskih, što uključuje koagulaciju, flokulaciju te oksidacijske procese; fizikalnih, u vidu membranskih filtracija i adsorpcije; te bioloških, što podrazumijeva aerobnu i anaerobnu razgradnju pomoću mikroorganizama ili njihovih enzima. Među navedenima, biološke metode se smatraju ekološki najprihvatljivijima zbog toga što mikroorganizmi mogu dovesti do potpune mineralizacije onečišćujućih tvari i to uz niske troškove (Pereira i Alves, 2012.).

U ovome radu istražena je mogućnost obezbojenja agarnih ploča s dodatkom sintetskih bojila malahitnog zelenila i metilenskog modrila pomoću odabranih gljiva bijelog truljenja. Također, ispitana je sposobnost obezbojenja lignoceluloznog materijala u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bojila

Slikovni zapisi u špiljama od prije 30 000 godina govore o prvoj primjeni bojila u povijesti (**Slika 1.**). Dokazi o poznavanju i upotrebi prirodnih pigmenata i bojila pronađeni su i u drevnim civilizacijama u Indiji, Mezopotamiji, Grčkoj, Kini i Egiptu. Tada su se za pripremu bojila koristili razni plodovi, listovi, cvjetovi i korijenje biljaka te kasnije i minerali. Kroz povijest, bojila su pronašla razne primjene: u građevini, umjetnosti, proizvodnji tekstila. Umjetnost bojenja tekstila bila je poznata u Kini i Indiji 2 000 – 3 000 godina prije Krista. (Singh i Bharati, 2014.).



Slika 1. Crteži u špilji Altamira u Španjolskoj

(<http://s.ngm.com/>, 2017.)

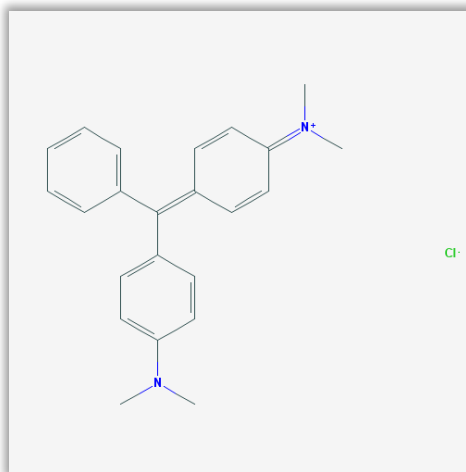
1865. godine, slučajnim otkrićem od strane kemičara Williama Henryja Perkina, nastaje prvo sintetičko bojilo, plavo – ljubičaste boje, nazvano mauvein. Ovo otkriće potaklo je daljnja istraživanja te započinje i industrijski razvoj sintetičkih bojila (Zollinger, 1999.). U usporedbi s prirodnim, sintetička bojila su jeftinija, jednostavnija za proizvodnju i primjenu, bolje su postojanosti i jačeg intenziteta. Zbog svih tih razloga dolazi do naglog pada upotrebe prirodnih bojila (Singh i Bharati, 2014.).

Danas se bojila primjenjuju u skoro svim granama industrije: građevinskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, tekstilnoj, itd. Komercijalno je dostupno preko 100 000 sintetičkih bojila, te se godišnje proizvede 7×10^5 tona bojila (McMullan i sur., 2001.).

Postoji više različitih podijela bojila, prema strukturi, izvoru, boji, topljivosti, primjeni. Prema kemijskoj strukturi najčešće se dijele na: azo, antrakinonska, indigoidna, ftalocijaninska, sumporna, nitro i nitrozo bojila (Gurses i sur., 2016.).

2.1.1. Malahitno zelenilo

Malahitno zelenilo je arilmetansko bojilo ($C_{23}H_{5}N_2$), točnije diamino-trifenilmetan, strukture prikazane na **Slici 2**.



Slika 2. Kemijska struktura malahitnog zelenila

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, 2017.)

Od 1936. u širokoj je primjeni kao fungicid te kao ektoparazicid u uzgajalištima riba. Dostupan je u više oblika, uglavnom kao sol oksalata i hidroklorida (Alderman, 1985.).

Malahitno zelenilo je kristalni prah, boje vrlo slične kristalu malahita po kojem je i dobio ime (**Slika 3.**). Topljiv je u vodi i etanolu te osjetljiv na utjecaj svjetlosti i zraka.



Slika 3. Kristali malahitnog zelenila

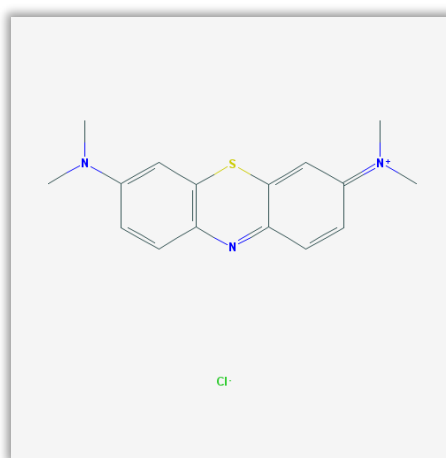
(<https://commons.wikimedia.org>, 2017.)

Osim kao fungicid, koristi se za bojenje tekstila i kože te u medicini kao dezinfekcijsko sredstvo i antihelminetik. Također, primjenjuje se i kao pigment u proizvodnji keramike. U Indiji se često

koristi kao prehrambeno bojilo, iako je za tu upotrebu zabranjen u većini zemalja (Culp i Beland, 1996.).

2.1.2. Metilensko modrilo

Metilensko modrilo (**Slika 4.**) pripada u skupinu fenotiazina. Najčešće dolazi u obliku kristalnog praha zeleno-plave boje koji vodenim ili alkoholnim otopinama daje vrlo tamno plavo obojenje. Sinteza metilenskog modrila se provodi iz dimetilalanina (Encyclopaedia Britannica, 2015.).



Slika 4. Kemijska struktura metilenskog modrila

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, 2017.)

Uobičajeno je bojilo u tekstilnoj industriji, industriji papira, plastike, kože, kozmetike i sl. Metilensko modrilo ima i široku primjenu u medicini i to, najčešće, u liječenju methemoglobinemije gdje se pacijentima kao terapija intravenozno ubrizgavaju male količine bojila (1-2 mg/kg.). Također, zbog svojeg baktericidnog djelovanja, koristi se i u liječenju bakterijskih infekcija urogenitalnog trakta, te u kombinaciji s vitaminom C ima primjenu u terapiji kronične urolitijaze. U upotrebi je i za bojenje bioloških preparata (Clifton i Leikin, 2003.).

2.2. Utjecaj bojila na zdravlje i okoliš

Ispuštanje industrijskih efluenata u okoliš ima znatan utjecaj na onečišćenje vode. Efluenti koji sadrže velike količine bojila mogu utjecati na kemijski sastav i svojstva vode u okolišu (Ejder-Korucu i sur., 2015.). Čak i vrlo male količine bojila mogu uzrokovati veliki intenzitet obojenja te, zbog utjecaja na apsorpciju i refleksiju sunčeve svjetlosti, ometati procese fotosinteze i time značajno utjecati na prehrambeni lanac. Neka bojila su izrazito termo- i fotostabilna, te u okolišu mogu opstati dug vremenski period (Gurses i sur., 2016.).

Od industrija, koje u procesu proizvodnje primjenjuju bojila, tekstilna industrija pokazala se kao najveći zagađivač okoliša. Otpadne vode tekstilne industrije sadrže vrlo velik broj komponenata različitog kemijskog sastava, većinom teško razgradivih i toksičnih (Correia i Judd, 1994.). U procesima proizvodnje tekstila, zbog neefikasnosti provedenog procesa bojenja, u otpadnoj vodi može završiti velika količina bojila. Ovisno o korištenim bojilima, u otpadnoj vodi završava od 2% do 50% primjenjene količine (McMullan, 2001.).

Ovisno o koncentraciji i vremenu izlaganja, bojila mogu imati akutni ili kronični utjecaj na izloženi organizam. Malahitno zelenilo je uvelike istraživano u kontekstu utjecaja na ribe tretirane u uzgajalištima te time i na potencijalan štetni učinak na zdravlje konzumenata. Istraživanja toksičnih učinaka pokazala su, ovisno o vrsti ribe, teratogeno, mutageno i karcinogeno djelovanje. Također, kod nekih vrsta uzrokuje smanjenje plodnosti (Srivastava i sur., 2004.).

Malahitno zelenilo pokazalo je teratogen učinak na zečeve i miševe te povećanje pojavnosti karcinoma jetre (Meyer i Jorgensen 1983., Rao i Fernandes 1996.). Isto tako, na ispitivanim životinjama došlo je do oštećenja bubrega, slezene, srca, pojave lezija na koži, plućima i kostima (Srivastava i sur., 2004.).

Iako se metilensko modrilo u manjim koncentracijama primjenjuje u medicinskim terapijama nekih bolesti, akutna izloženost kod ljudi može dovesti do ubrzanog rada srca, povraćanja, šoka, stvaranja Heinzovih tjelešaca, cijanoze, žutice, kvadriplegije i nekroze tkiva (Kumar i Kumaran, 2005.).

2.3. Metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda

Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 80/2013) propisano je kako tehnološke otpadne vode nastale tijekom proizvodnje i prerade tekstila prilikom ispuštanja iz postrojenja ne smiju sadržavati bojila. Uklanjanje bojila je težak zadatak s obzirom na njihovu kompleksnu strukturu i različitost.

Metode za uklanjanje bojila dijele se na tri velike grupe: kemijske, fizikalne i biološke metode.

2.3.1. Kemijske metode

Uglavnom korištene kemijske metode su: koagulacija i flokulacija u kombinaciji s filtracijom ili flotacijom, precipitacija-flokulacija s Fe, Al ili Ca hidroksidima, elektrokemijski procesi poput elektroflotacije i elektrokoagulacije te oksidacija s oksidirajućim sredstvima (Ejder-Korucu i sur., 2015.).

Zbog jednostavnosti primjene, oksidacija je najčešće korišten postupak među kemijskim metodama dekolracije. Bojilo se uklanja oksidacijom koja dovodi do kidanja strukture aromatskog prstena. Sintetska bojila su vrlo stabilna, pa su za oksidaciju potrebna jaka oksidacijska sredstva poput klora, ozona, Fentonovog reagensa te vodikovog peroksida. Vodikov peroksid je uobičajeno korišteno sredstvo, no prije upotrebe ga je potrebno aktivirati što se, najčešće, vrši UV zračenjem. Klor se pokazao kao dobro oksidacijsko sredstvo u slučaju bojila, međutim, zbog mogućnosti stvaranja štetnih produkata s dušičnim komponentama iz otpadne vode, uglavnom se ne koristi. Fentonov reagens se koristi u oksidaciji toksikanata koji su otporni na biološke procese i inaktiviraju živu biomasu (Anjaneyulu i sur., 2005.).

Iako su ove metode učinkovite, problem predstavlja visoka cijena zbog velike potrošnje električne energije i kemijskih reagenasa zbog kojih može doći i do naknadne kontaminacije.

2.3.2. Fizikalne metode

Fizikalnim metodama se postiže dobro uklanjanje bojila uz vrlo niske operativne troškove. Primjenjuju se adsorpcija, ionska izmjena, filtracija i membranska filtracija (Ejder-Korucu i sur., 2015.).

Membranska filtracija posjeduje niz prednosti nad ostalim metodama. Ovaj postupak ima mogućnost kontinuiranog odvajanja bojila od efluenta, membrane su otporne na utjecaj temperature, nepovoljno kemijsko okruženje i mikrobiološki utjecaj. Nažalost, primjena im je ograničena zbog visoke cijene opreme te mogućnosti začepljenja pora membrana, čija pomjena predstavlja veći problem (Robinson i sur., 2001.).

Relativno jednostavan i vrlo često primjenjivan postupak je adsorpcija. Adsorpciju je moguće provesti na raznim materijalima kao adsorbensima: aktivnom ugljenu, tresetu, drvenim strugotinama, otpatcima u preradi šećerne trske i sl. Prednost upotrebe otpadnih materijala kao adsorbensa je u tome što su ovi materijali lako dostupni i prihvatljive cijene (Anjaneyulu i sur., 2005.), za razliku od dobro definiranih, skupih konvencionalnih adsorbensa.

2.3.3. Biološke metode

Kao dobra alternativa kemijskim i fizikalnim metodama uklanjanja bojila pokazale su se biološke metode. Biološke metode imaju nekoliko prednosti: procesi čišćenja mogu se provesti na samom mjestu kontaminacije, nisu štetni za okoliš, tj. uglavnom ne dolazi do naknadne kontaminacije nastalim produktima te relativno niski troškovi provedbe (Vijayaraghavan i Yun, 2008.).

Bioakumulacija (razgradnja toksikanata živim organizmima) i biosorpcija (adsorpcija toksikanata na inaktivnu biomasu mikroorganizama ili drugih bioloških materijala) su se pokazale kao dvije metode s najviše potencijala u pročišćavanju otpadnih voda. Bioakumulacija se ne preporuča za kontinuirani tretman visoko toksičnih spojeva jer se nakon nekog vremena isti mogu nakupiti u organizmu i uzrokovati smrt stanice. U takvim slučajevima, prednost ima primjena biosorpcije (Vijayaraghavan i Yun, 2008.).

Razne aerobne i anaerobne bakterije, alge te velik broj različitih vrsta gljiva su istraživane u svrhu obezbojenja otpadnih voda. Najefikasnije u uklanjanju sintetskih bojila pokazale su se gljive i to posebice gljive bijelog truljenja, zbog sposobnosti proizvodnje enzima koji razgrađuju lignin, a koji sudjeluju u razgradnji sintetskih bojila (Vasdev, 2011.).

2.4. Gljive

Gljive su eukariotski organizmi koji imaju heterotrofan način ishrane. Hranjive tvari dobavljaju izvanstaničnom razgradnjom uslijed aktivnosti izlučenih enzima koju prati apsorpcija otopljenih produkata. Sveprisutni su organizmi; nalaze se na velikom broju različitih staništa te vrše važnu ulogu u raznim ekosustavima kao saprofiti, simbiotički i paraziti. Širenje na nove izvore hrane olakšano je produkcijom spora, dok je kolonizacija omogućena rastom kao razgranati sustav cijevčica (hifa) koje zajedno čine micelij. Prema morfologiji hifa, vrsti spora i načinu razmnožavanja gljive se dijele na 5 skupina: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes* (Webster i Weber, 2007.).

Gljive posjeduju dobro razvijen sustav enzima koji im omogućava rast na velikom rasponu prirodnih i sintetskih supstrata. Također, za razliku od većine bakterija, gljive mogu preživjeti, rasti i razviti se u toksičnom okruženju (Sardrood i sur., 2013.).

Općenito su vrlo otporne na okolišne uvjete. Njihove stanice su totipotentne te stoga cijeli organizam može nastati ne samo iz spora nego i iz fragmenata hifa. Gljive su poznate zbog svoje sposobnosti da razgrade velik raspon materijala od drva, papira, tekstila i plastike do betona. U ekosustavima, glavni su razgrađivači biljnih polimera (Singh, 2006.).

Zbog velikog broja enzima koje sintetiziraju, mogu razgraditi praktički sve prirodne organske komponente. Neke vrste kao izvor ugljika mogu koristiti pektine, celulozu i hemicelulozu. Određene skupine gljiva mogu razgraditi i teško razgradive prirodne polimere kao što su keratin i lignin (Anastasi i sur., 2013.).

Najčešće korištene gljive u bioremedijaciji su gljive truležnice, posebice gljive bijelog truljenja.

2.4.1. Gljive bijelog truljenja

Nakon razgradnje lignina te celuloze i hemiceluze u drvetu pomoću ovih gljiva, zaostaje bijeli ostatak (**Slika 5.**), prema kojem su i dobile ime.



Slika 5. Bijelo truljenje

(<https://tryoncreek.files.wordpress.com>, 2017.)

Ova raznovrsna skupina se uglavnom sastoji od gljiva iz skupina *Basidiomycetes*, koje su poznate po mogućnosti razgradnje lignina. Razgradnja je omogućena izvanstaničnim enzimima za modifikaciju lignina koji, zbog nespecifičnosti za određeni supstrat, mogu razgraditi i razne ksenobiotike. Lignin modificirajuće enzime, mangan peroksidazu, lignin peroksidazu i lakazu, gljive proizvode tijekom sekundarnog metabolizma jer oksidacijom lignina ne proizvode energiju (Wesenberg i sur., 2003.). Energiju potrebnu za razgradnju lignina uglavnom dobivaju oksidacijom biljnih polisaharida te se pretpostavlja da bi se u industrijskoj primjeni gljiva, kao izvor hranjivih tvari, mogao koristiti otpadni lignocelulozni materijal poput piljevine ili otpada u proizvodnji šećera iz trske i sl. (Ralph i Catcheside, 2002.).

Produkcija enzima za razgradnju lignina može se potaknuti ograničavanjem koncentracije (manjkom) hranjivih tvari, tj. odabirom izvora hranjivih tvari. Također, ne dolazi do smanjenja sinteze enzima kada je koncentracija toksikanta smanjena ispod razine potrebne za indukciju enzima te stoga gljive mogu gotovo u potpunosti razgraditi čak i vrlo male količine toksikanata (Barr i Aust, 1994.).

Gljive bijelog truljenja razgrađuju lignocelulozni materijal na 2 načina: selektivno, gdje dolazi samo do razgradnje lignina dok celuloza ostaje netaknuta te simultano, gdje istovremeno dolazi do razgradnje lignina i svih polisaharida u drvu. Gljive roda *Ganoderma* su, uglavnom, selektivni razgrađivači, dok su gljive roda *Trametes* simultani razgrađivači (Blanchette, 1991.).

2.4.2. *Ganoderma lucidum*

Hrastova sjajnica ili Reishi gljiva (lat. *Ganoderma lucidum*) je gljiva iz skupine *Basidiomycetes*, plosnatog bubrežastog klobuka sjajne crvene boje (**Slika 6.**). Spore otpušta kroz pore koje se nalaze na unutrašnjoj strani klobuka koji, ovisno od starosti gljive, može biti od bijele do smeđe boje (Bibi i sur., 2009.).



Slika 6. *Ganoderma lucidum*

(<http://www.medicalmushrooms.net>, 2017.)

U kineskoj narodnoj medicini ova gljiva se koristi više od 2000 godina. Pripravci u obliku praha ili čaja primjenjuju se u liječenju raznih bolesti: hepatitisa, hipertenzije, hiperkolesterolemije i tumora gastrointestinalnog trakta (Tang i sur., 2007.).

Posljednjih godina, *Ganoderma lucidum* izaziva sve veću pažnju znanstvenika zbog svojih antitumorskih svojstava. Istraživanjima je dokazano kako inhibira rast i inducira apoptozu u različitim stanicama leukemije, limfoma i mijeloma (Muller i sur., 2006). Isti učinak je pokazala i na stanicama karcinoma dojke i prostate (Sliva i sur., 2003.) te na stanicama karcinoma debelog crijeva (Hong i sur., 2004.).

Osim u medicini, ima primjenu i u ekologiji. Zbog prisutnosti enzima za razgradnju lignina, proučavana je u svrhu uklanjanja sintetskih bojila, pri čemu su sama gljiva i njezini izolirani enzimi pokazali dobar potencijal za razgradnju sintetskih bojila (Murugesan i sur., 2007.; Selvakumar i sur., 2013.; Bibi i sur., 2009.).

2.4.3. *Ganoderma resinaceum*

Također pripada skupini *Basidiomycetes*; zbog sličnog izgleda često se zamjenjuje s gljivom *Ganoderma lucidum* (**Slika 7.**). Sezonskog je rasta, te plosnate i nabrane, sjajne površine. Najčešće raste u toplijim područjima, a boja plodnog tijela varira od crveno-smeđe do crno-smeđe, ovisno o podneblju (Steayert, 1980.; Schwarze i Ferner, 2003.).



Slika 7. *Ganoderma resinaceum*

(<https://image.jimcdn.com>, 2017.)

Iako o tome postoji vrlo malo zapisa, gljive se u afričkoj narodnoj medicini koriste već stoljećima. Specifično, *Ganoderma resinaceum* se koristi za liječenje bolesti jetre, te za snižavanje razine šećera u krvi (Oyetayo, 2011.).

Kao i ostale gljive iz roda *Ganoderma*, pokazala je dobar potencijal u obezbojenju nekih sintetskih bojila (Abd El-Zaher, 2010.).

2.4.4. *Trametes versicolor*

Šarena tvrdokoška (lat. *Trametes versicolor*) sastoji se od više plosnatih, tankih klobuka valovitih rubova, veličine 3-5 cm posloženih u nekoliko redova (**Slika 8.**). Gornja površina klobuka je baršunasta s koncentrično raspoređenim pojasevima različitih boja: smeđe, žute, zelene, sive i crne (Cui i Christi, 2003.).



Slika 8. *Trametes versicolor*

(<http://www.mykoweb.com>, 2017.)

Kao i opisane gljive roda *Ganoderma*, *Trametes versicolor* se koristi kao medicinska gljiva. Njezino dokazano imunomodulacijsko djelovanje ima potencijalnu primjenu u terapiji HIV-virusa tipa 1 (Collins i Ng, 1997.) te uz kemoterapiju u liječenju karcinoma (Kidd, 2000.).

Zbog prisutnosti lignolitičkih enzima, moguća je primjena u bioremedijaciji za uklanjanje raznih sintetskih bojila, polikloriranih bifenila te policikličkih aromatskih ugljikovodika koji su među najčešćim onečišćujućim tvarima u okolišu (Novotny i sur., 2004.).

2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation, SSF) je fermentacija materijala u čvrstom stanju bez ili gotovo bez prisutnosti slobodne vode. Ipak, materijal mora sadržavati dovoljan udjel vlage kako bi omogućio rast i metabolizam stanica mikroorganizama (Pandey, 2003.).

Kao inokulum u SSF koriste se čiste kulture ili kombinacija nekoliko kultura, najčešće aerobnih mikroorganizama. Moguća je primjena raznih bakterija i kvasaca, no uglavnom se primjenjuju filamentozne gljive. Filamentozne gljive su idealne za SSF, jer se zbog svojeg načina rasta lako šire i prodiru u supstrat kako bi došle do hranjivih tvari. Također, mogu rasti u sustavima koji sadrže vrlo malo vode i imaju nizak pH (Mitchell i sur., 2002.).

U SSF procesima bitan je odabir odgovarajućeg supstrata, koji uglavnom ovisi o mikroorganizmu i željenom produktu. Kada se kao čvrsti materijal, odnosno nosači za rast

mikroorganizama koriste razni lignocelulozni materijali (otpadni materijali poljoprivredne, prehrambene i drvne industrije) oni su istovremeno i supstrat za rast, za razliku od inertnih nosača poput poliuretanske pjene, koji služe samo kao nosač te se mora dodati supstrat (Pandey, 2003.). Veličina čestica supstrata je također važan faktor s obzirom da utječe na omjer volumena i površine supstrata. Omjerom volumena i površine supstrata se može definirati količina supstrata koja je primarno dostupna mikroorganizmu nakon inokulacije. Optimalna veličina čestica bi bila ona koja omogućuje pristupačnost hranjivih tvari, ali i dovoljnu količinu kisika (Mitchell i sur., 2002.).

SSF se godinama primjenjuju u istočnim kulturama u pripremi nekih tradicionalnih proizvoda. Danas su česte u prehrambenoj industriji gdje se primjenjuju za proizvodnju aroma, enzima, organskih kiselina te ksantan gume (Couto i Sanroman, 2006.). Također, moguća je primjena u biološkoj obradi obojenih lignoceluloznih materijala, zaostalih nakon procesa adsorpcije bojila na otpadni materijal tijekom pročišćavanja obojenih industrijskih efluenata (Nigam i sur, 2000.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je istražiti mogućnost korištenja novih izolata gljiva *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum* i *Trametes versicolor* TV8 s ciljem obezbojenja agarnih ploča s dodatkom sintetskih bojila metilenskog modrila i malahitnog zelenila. Nadalje, pomoću gljive koja je pokazala najbolje rezultate obezbojenja na agarnim pločama istražena je mogućnost uklanjanja bojila metilenskog modrila s obojenog otpadnog lignoceluloznog supstrata u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima.

3.2. Materijali

3.2.1. Bojila

U istraživanju su korištena sintetska bojila:

- metilensko modrilo (Merck, USA)
- malahitno zelenilo (Merck, USA)

3.2.2. Mikroorganizmi

Kao radni mikroorganizmi korištene su sljedeće gljive iz privatne zbirke (Institute for Applied Mycology and Biotechnology, Celje, Slovenija) i izolirane na području Celja i Laškog (Slovenija):

- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst
- *Ganoderma resinaceum* Boud.
- *Trametes versicolor* (L.) TV8

Gljive su uzgajane na krumpirovom agaru (Liofilchem, Italija) tijekom 7 dana pri 27°C, te čuvane u hladnjaku na +4°C.

3.2.3. Kemikalije

- Krumpirov agar (Liofilchem, Italija)
- ABTS (Sigma, USA)
- CuSO₄ (Kemika d.d., Hrvatska)
- Glukoza (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- Amonijev tartarat 99% (Acros, Španjolska)
- Kvašćev ekstrakt (Liofilchem, Italija)
- MgSO₄ × 7H₂O (Kemika d.d., Hrvatska)

- NaCl (Kemika d.d., Hrvatska)
- CaCl₂ (Kemika d.d., Hrvatska)
- FeCl₃ (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- K₃[Fe(CN)₆] (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Lignin (Aldrich Chemistry, USA)
- Tiamin (Acros, Kina)
- Bromfenol modriilo (Fisher bioreagents, India/Belgija)
- Guaiacol 99% (Acros, Kina)
- KH₂PO₄ (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- Karboksimetil celuloza (Aldrich, USA)
- Tehnički agar (Biolife, Italija)
- Kongo crvenilo (Kemika d.d., Hrvatska)

3.2.4. Supstrat

Kao supstrat, odnosno neinertni nosač, korišten za uzgoj na čvrstim supstratima (*Solid-state fermentation*) korišten je pivski trop dobiven iz Osječke pivovare d.o.o. Prije korištenja, pivski trop je pripremljen tako što je ispran vodovodnom vodom do neutralnog pH te osušen na zraku. Nakon toga trop je samljeven na laboratorijskom mlinu (IKA Labortechnik, Njemačka), pri čemu je korišteno sito promjera 1 mm, kako bi se osigurala veličina čestica manja od 1 mm.

3.2.5. Aparatura i pribor

U radu su korištene sljedeće aparature i pribor:

- za vaganje su korištene tehnička vaga (RADWAG, Tehnica unitronik, tip: WPS 1200, Njemačka) te analitička vaga (Shimadzu AW220, Japan).
- za sterilizaciju hranjivih podloga, supstrata i laboratorijskog posuđa korišten je autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Srbija)
- za termostatiranje sterilinih agarnih podloga korištene su vodene kupelji (GFL Gesellschaft für Labortechnik D-30938, Njemačka).
- za homogenizaciju otopina i podloga korišten je vibrirajući mješač (Vibromix 10, Tehnica, Slovenija)
- kako bi se osigurala sterilnost pri radu korišten je mikrobiološki zaštitni kabinet
- za inkubaciju radnih mikroorganizama korišten je termostat (Termo medicinski aparati, BTEST, Bodalec Havočić, Hrvatska)

- za mjerenje promjera kolonija i zona obezbojenja na agarnim pločama korišteno je digitalno pomično mjerilo
- za mljevenje pivskog tropa korišten je laboratorijski mlin (MF10 Basic, IKA Labortechnik, Njemačka)
- za određivanje udjela vlage i suhe tvari pivskog tropa korišten je halogeni analizator vlage (HR73 MoistureAnalyzer, MettlerToledo, Švicarska)
- za određivanje proteinskog dušika korišten je uređaj Kjeltect™ 2300 Analyzer Unit (FOSS Analytical, Danska)
- za određivanje boje obojenog pivskog tropa korišten je kromametar (Konica Minolta CR400, Japan)

3.3. Metode

3.3.1. Priprema podloga i uzgoj radnih mikroorganizama

Izvagano je 42 g krumpirovog agara, dodano 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja te sterilizirano u autoklavu pri 121°C, 15 min. Podloga je potom ohlađena na temperaturu od 45°C do 50°C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana i razlivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Ovako pripremljene podloge naciepljene su micelijskim diskovima (5 mm) radnih mikroorganizama. Inkubacija je trajala 7 dana pri 27°C. Micelijski diskovi promjera 5 mm ovako pripremljenih kulture korišteni su dalje kao inokulum u kvalitativnim testovima za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti te testovima obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama. Svi testovi provedeni su u pet ponavljanja (kvalitativni testovi enzimske aktivnosti), odnosno 3 ponavljanja (testovi obezbojenja). Svaki test uključivao je i odgovarajuću biotičku (gljiva na osnovnoj podlozi) te abiotičku kontrolu (nenaciepljena podloga s dodatkom indikatorskih spojeva za kvalitativne testove enzimske aktivnosti, odnosno bojila za testove obezbojenja).

3.3.2. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva

3.3.2.1. Celulolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom karboksimetil-celuloze

Karboksimetil-celuloza (CMC) je supstrat za endoglukanazu, pa se može koristiti za kvalitativni test aktivnosti endoglukanaze i β -glukozidaze. Kako mnoge gljive sintetiziraju endoglukanaze

u velikim količinama, ovaj test može poslužiti kao dobar pokazatelj njihove celulolitičke sposobnosti (Pointing, 1999.). Test je proveden prema postupku koji je opisao Pointing (1999).

Osnovna podloga za provođenje testa bila je sljedećeg sastava: 5 g L⁻¹ amonijevog tartarata; 1 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄×7H₂O; 0,001 g L⁻¹ CaCl₂×2H₂O i 0,1 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta.

U 500 mL pripremljene osnovne podloge dodano je 10 g karboksimetil-celuloze i 8 g tehničkog agara. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121°C tijekom 15 min te nakon hlađenja na 45° - 50°C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja podloge su naciepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te ostavljene na inkubaciji pri 27 °C 2-5 dana, odnosno do porasta gljive od oko 30 mm promjera. Podloge su zatim natopljene 1% vodenom otopinom kongo crvenila te je nakon 15 min višak bojila ispran destiliranom vodom. Podloge su potom natopljene otopinom NaCl koncentracije 1 mol dm⁻³ i ostavljene 15 min, nakon čega je izliven višak otopine.

Žuto-narančasto obojenje oko micelija potvrda je razgradnje CMC i aktivnosti endoglukanaza, dok je nerazgrađena CMC ostala crvene boje.

3.3.2.2. Lignolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS)

Bezbojni agar s dodatkom ABTS-a oboji se zeleno do ljubičasto uslijed oksidacije ABTS-a u prisutnosti lignolitičkog enzima lakaze (Pointing, 1999.). Test je proveden prema modificiranom postupku koji su opisali Levasseur i sur. (2010.).

Pripremljeno je 500 mL osnovne podloge za uzgoj na način da je odvagano 21 g krumpirovog agara i dodano 500 mL destilirane vode. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min. Nakon sterilizacije, podloga je ohlađena na 65°C te je u nju sterilno dodano 5 mL otopine ABTS-a koncentracije 0,2 mmol L⁻¹ i 0,5 mL otopine CuSO₄ koncentracije 100 mmol L⁻¹. Podloga s dodatkom ABTS-a je zatim razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja podloge su naciepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom stavljene na inkubaciju 24-48 h u termostatu pri temperaturi od 27°C. Pojava zelenog do ljubičastog obojenja oko zone rasta micelija potvrda je aktivnosti lakaze.

3.2.2.3. Lignolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom gvajakola

Gvajakol kao sintetski fenolni spoj može poslužiti kao pokazatelj aktivnosti lakaze (Kiiskinen i sur., 2004.) Test je proveden prema modificiranom postupku koji su opisali Kiiskinen i sur. (2010.).

Pripremljeno je 500 mL podloge za uzgoj na način da je odvagano 21 g krumpirovog agara, dodano 500 mL destilirane vode te gvajakol u koncentraciji 0,01%. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121°C tijekom 15 min te nakon hlađenja na 45°-50°C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja, podloge su naciepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom stavljene na inkubaciju termostata pri temperaturi od 27°C, do pojave narančasto-smeđeg obojenja oko zone rasta micelija, kao potvrda aktivnosti lakaze.

3.3.2.4. Lignolitička aktivnost: obezbojenje agarnih ploča s dodatkom bromfenol modrila

Test je proveden prema modificiranom postupku koji su opisali Tekere i sur. (2004).

Pripremljeno je 500 mL podloge za uzgoj na način da je odvagano 21 g krumpirovog agara, dodano 500 mL destilirane vode te bromfenol modrilo u koncentraciji 0,2 g L⁻¹. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121°C tijekom 15 min te nakon hlađenja na 45°-50°C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja, podloge su naciepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te stavljene na inkubaciju termostata pri temperaturi od 27°C, do pojave obezbojenja plavog obojenja podloge, kao potvrda aktivnosti lakaze.

3.3.2.5. Lignolitička aktivnost: kvalitativni test sposobnosti razgradnje lignina

Test je proveden prema jednostavnoj metodi za utvrđivanje lignolitičke aktivnosti koji su razvili Sundman i Nase (1971.).

Pripremljeno je 500 mL hranjive podloge sastava kako slijedi: 20 g L⁻¹ agara; 5 g L⁻¹ glukoze; 5 g L⁻¹ amonijevog tartarata; 1 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄ × 7 H₂O; 0,1 g L⁻¹ NaCl; 0,01 g L⁻¹ CaCl₂; 0,01 g L⁻¹ FeCl₃; 0,01 g L⁻¹ lignina (Kraft) te 1 mg L⁻¹ tiamina. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121°C tijekom 15 min te nakon hlađenja na 45°-50°C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja, podloge su naciepljene

micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te stavljene na inkubaciju termostat pri temperaturi od 27°C, do porasta gljive od oko 30 mm promjera.

Pripravljena su otopine FeCl_3 i $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, koncentracije 10 g L^{-1} , koje su zatim izmiješane u omjeru 1:1. Ovako pripremljenim reagensom, koji reagira s ligninom dajući zeleno obojenje, prelivene su agarne ploče s gljivama. Na mjestima gdje je lignin ostao nerazgrađen vidljivo je tamnozeleno obojenje, dok je na mjestima gdje je došlo do razgradnje lignina to obojenje vrlo slabo ili ga nema.

3.3.3. Testovi obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama

U bočice od 250 mL odvagano je 8,4 g krumpirova agara i dodano 200 mL destilirane vode. Ovako pripremljene podloge su sterilizirane u autoklavu pri temperaturi 121°C kroz 15 min te potom ohlađene na temperaturu od 50°C i, do dodatka bojila, držane u termostatiranoj vodenoj kupelji. Osnovne otopine bojila (stock) pripremljene su tako što je u sterilne bočice od 5 mL sterilno odvagano 0,1 g bojila te dodano 3 mL sterilne destilirane vode. Otopine su zatim homogenizirane na vibrirajućem mješaču te je, nakon potpunog otapanja bojila, u tikvice s termostatiranim sterilnim krumpirovim agarom dodan odgovarajući volumen bojila prema shemi u **Tablici 1**. Po 20 mL podloge s dodatkom različitih koncentracija bojila razlivene su u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Nakon hlađenja, podloge su naciepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te stavljene na inkubaciju termostat pri temperaturi od 27°C kroz 14 dana. Rast gljiva i promjena boje hranjive podloge praćeni su svaka dva dana, mjerenjem promjera kolonije gljive i promjera zone obezbojenja (promjene intenziteta boje) podloge pomoću digitalnog pomičnog mjerača. Nakon što je micelij gljive prerastao cijelu površinu Petrijeve zdjelice, vizualno je praćeno obezbojenje podloga koje su čuvane na sobnoj temperaturi do potpunog obezbojenja.

Tablica 1. Priprava obojenih hranjivih podloga s dodatkom različitih koncentracija bojila.

Volumen osnovne otopine bojila dodan u 200 mL hranjive podloge / μL	Konačna koncentracija bojila u podlozi / mg L^{-1}
60	10
180	30
300	50
600	100
900	150

3.3.4. Uzgoj gljive *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na obojenom pivskom tropu kao neinertnom nosaču

Priprema inokuluma za fermentaciju na čvrstim nosačima. Pripremljena je hranjiva podloga sljedećeg sastava: 42 g L^{-1} krumpirovog agara, 2 g L^{-1} samljevenog pivskog tropa te 50 mg L^{-1} metilenskog modrila. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121°C kroz 15 min te nakon hlađenja na temperaturu $45^\circ\text{--}50^\circ\text{C}$ razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja, agarne ploče nacijepljene su micelijskim diskovima (5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te stavljene na inkubaciju u termostatu pri temperaturi od 27°C tijekom 7 dana. Nakon toga, gljiva je s podloge s dodatkom 50 mg L^{-1} metilenskog modrila na gore opisan način precijepljena na podlogu s dodatkom 100 mg L^{-1} bojila (pripremljenu na gore opisan način). Nakon inkubacije pri 27°C u trajanju od 7 dana, postupak je ponovljen još jednom te je gljiva precijepljena na podlogu s dodatkom 150 mg L^{-1} bojila. Nakon inkubacije pri 27°C u trajanju od 7 dana, ovako uzgojena kultura korištena je za inokulaciju.

Fermentacija na čvrstim nosačima. Uzgoj gljive *T. versicolor* TV8 na pivskom tropu obojenom metilenskim modrilom proveden je u staklenkama volumena 750 mL. U svaku staklenku odvagano je 15 g supstrata te dodano 20 mL otopine metilenskog modrila koncentracije 150 mg L^{-1} , kako bi se osigurala vlažnost od 60%. Staklenke su zatim sterilizirane u autoklavu pri 121°C u trajanju od 15 minuta. Nakon hlađenja, staklenke su inkulirane na sljedeći način: dva micelijska diska (promjer 5 mm) 7 dana stare kulture uzgajane na podlozi s dodatkom bojila dodana su u 5 mL sterilne destilirane vode, izmješani na vibrirajućem mješaču kroz 10 min te dodani u staklenku s obojenim pivskim tropom. Na isti način inokulirana je i biotička kontrola,

koja je sadržavala neobojeni trop. Abiotička kontrola sadržavala je samo obojeni trop te nije inokulirana. Staklenke su zatvorene pripadajućim metalnim poklopcima koji su na sredini imali rupu promjera 3 cm, zatvorenu čepom od akvarijske vate, kako bi se osigurala aeracija. Sadržaj staklenki dnevno je ručno izmiješan. Inkubacija pri 27 °C je trajala 21 dan. Nakon završene inkubacije, sadržaj staklenki je steriliziran te osušen u sušioniku pri 80 °C. U uzorcima prije i nakon provedenog uzgoja određeni su masa, udjel suhe tvari (vlažnost), proteinski dušik te boja.

3.3.5. Određivanje udjela vlage

Po 2 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 masa uzorka više ne mijenja (sušenje do konstantne mase).

3.3.6. Određivanje boje uzorka

U istraživanju su praćene a^* , b^* , L^* vrijednosti uzoraka prije i nakon 21 dana fermentacije te njihovih kontrola, mjereno kromametrom. Kromametar mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Uzorak kojem se mjeri boja postavlja se 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, sustav koji daje vrijednosti slične onima koje pokazuje ljudsko oko.

Na osnovu dobivenih mjerenja pomoću odgovarajućih jednadžbi izračunavaju se ukupna promjena boje (ΔE):

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

odnosno promjena boje (C^*_{ab}):

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

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 radi se o crvenoj boji, ako je negativna o zelenoj boji

b^* - vrijednost koja može biti pozitivna ili negativna, ukoliko je pozitivna radi se o žutoj boji, a ukoliko je negativna o plavoj boji.

3.3.7. Određivanje proteinskog dušika

Udjel proteina u uzorcima pivskog tropa prije i nakon fermentacije određen je metodom po Kjeldahlu (HRN ISO 1871, 1999). Udjel proteina određuje se indirektno iz udjela dušika.

Izvaže se 1 g (s točnošću $\pm 0,01$ g) homogeniziranog uzorka na listić aluminijske folije, umota i ubaci u epruvetu za spaljivanje. Epruvete za spaljivanje moraju biti čiste i osušene. U svaku epruvetu je dodano 15 mL koncentrirane sumporne kiseline, 2 tablete Kjeldahl katalizatora i 5 mL H_2O_2 te se lagano miješa kako bi se uzorak potpuno navlažio. Stalak sa epruvetama se potom stavlja u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključi se sistem za odvod para. Uzorci se spaljuju na temperaturi od 400°C tijekom 40-60 minuta. Mineralizacija je gotova nakon što tekućina u epruvetama postane bistra i svijetlo zelene boje. Nakon hlađenja, uzorci su razrijeđeni dodatkom 75 mL destilirane vode i postavljeni u aparat Tecator Kjetec System 1002. U Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 25 mL borne kiseline te je stavljena na postolje destilacijske jedinice tako što je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta se stavi na svoje mjesto i zatvore se sigurnosna vratašca. Uzorci se automatski destiliraju uz dodatak 60 mL 40% otopine NaOH u trajanju od 4 minute. Destilat u Erlenmeyerovoj tikvici uz prisutnost amonijaka postaje zelene boje. Destilat mora biti hladan jer bi u protivnom došlo do gubitka amonijaka.

Destilat se titrira klorovodičnom kiselinom (0,2 mM) do prelaska zelene boje u ružičastu, te se prema volumenu utrošene kiseline za titraciju izračuna postotak dušika i udio proteina u uzorcima, i to prema formulama:

$$\% N = \frac{[(U - S) \times N \times 1,4007]}{m}$$

$$\% \text{ proteina} = \%N \times F$$

gdje je:

U - volumen HCl utrošen za titraciju uzorka (mL)

S - volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

N – molaritet kiseline

m- masa uzorka (g)

F – faktor za preračunavanje dušika u proteine (6,25)

3.3.8. 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).

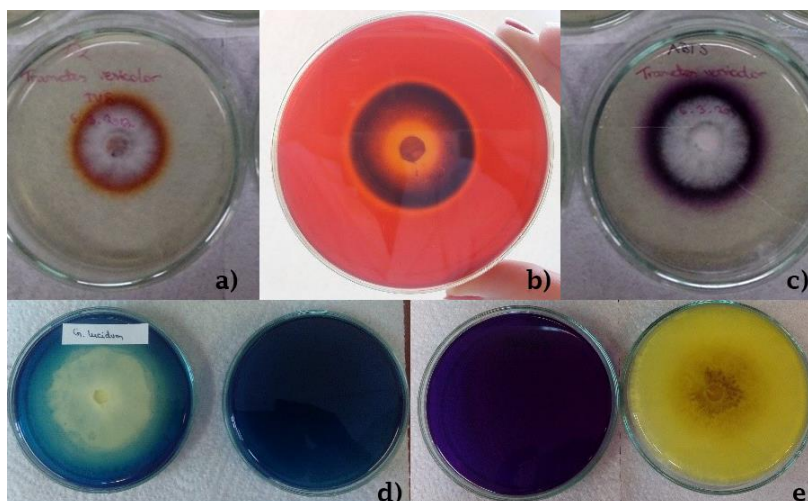
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti

Kvalitativni testovi za određivanje enzimске aktivnosti su vrlo učinkoviti u istraživanjima koja uključuju velik broj različitih izolata nekog mikroorganizma (u ovom slučaju gljiva) s ciljem potvrde produkcije određenih enzima – primjerice enzima uključenih u razgradnju lignoceluloznih materijala. Reagensi koji se pri tome koriste su najčešće široko dostupni i jeftini, a sam postupak provedbe testova je relativno jednostavan. Izražavanje rezultata uključuje samo potvrdu je li test pokazao pozitivan ili negativan rezultat (Pointing, 1999.). Rezultati provođenja kvalitativnih testova za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva korištenih u ovom istraživanju prikazani su u **Tablici 2.** te na **Slici 9.** Iz rezultata je vidljivo kako je za sve korištene gljive rezultat provođenja svakog pojedinog kvalitativnog testa bio pozitivan, čime je potvrđena njihova sposobnost proizvodnje celulolitičkih i lignolitičkih enzima. Kako su najvažniji enzimi koji sudjeluju u procesu biorazgradnje bojila pomoću gljiva bijelog truljenja upravo enzimi uključeni u razgradnju lignina (lignolitički enzimi) (Santos i Corso, 2014.; Eichlerová i sur., 2008), istraživane gljive pokazale su se dobrim kandidatima za daljnja istraživanja obezbojenja malahitnog zelenila i metilenskog modrila na agarnim pločama.

Tablica 2. Rezultati kvalitativnih testova za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti

Radni mikroorganizam	Celulolitička aktivnost	Lignolitička aktivnost			
	CMC	ABTS	Gvajakol	Bromfenol modrilo	Lignin
<i>Ganoderma lucidum</i>	+	+	+	+	+
<i>Ganoderma resinaceum</i>	+	+	+	+	+
<i>Trametes versicolor</i>	+	+	+	+	+



Slika 9. Pozitivni testovi za određivanje enzimske aktivnosti: **a)** smeđe obojenje agarne ploče s dodatkom gvajakola, **b)** svijetliji prsten (žuto) oko kolonije na agarnoj ploči s dodatkom karboksimetil-celuloze, **c)** ljubičasto obojenje agarne ploče s dodatkom ABTS-a, **d)** test sposobnosti razgradnje lignina: lijevo je agarna ploča s gljivom koja pokazuje sposobnost razgradnje lignina (obezbojeni dio), desno je abiotička kontrola **e)** obezbojenje agarne ploče s dodatkom bromfenol modrila, lijevo je abiotička kontrola

4.2. Istraživanje sposobnosti obezbojenja sintetskih bojila pomoću *G.*

lucidum, *G. resinaceum* i *T. versicolor*

Tijekom istraživanja ispitana je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila metilenskog modrila i malahitnog zelenila pomoću tri odabrane gljive bijelog truljenja *G. lucidum*, *G. resinaceum* i *T. versicolor* TV8. U **Tablicama 3.-10.** prikazan je rast gljiva i sposobnost obezbojenja bojila na agarnim pločama s dodatkom bojila.

Tablice 3. i 4. pokazuju indeks obezbojenja korištenih bojila pomoću odabranih gljiva u periodu od 2. do 14. dana uzgoja. Indeks obezbojenja izražen je kao omjer promjera obezbojenja (mm) i promjera kolonije (mm) te bi stoga veća vrijednost indeksa obezbojenja trebala ukazati na bolju sposobnost gljive za razgradnju bojila (Jayasinghe i sur., 2008). Ipak, pri razmatranju indeksa obezbojenja treba uzeti u obzir inhibiciju rasta mikroorganizma zbog dodatka bojila u podloge te tako velika vrijednost indeksa obezbojenja, uz istovremenu snažnu inhibiciju rasta, može rezultirati obezbojenjem tek dijela ukupne površine obojene agarne ploče.

Tablica 3. Indeks obezbojenja metilenskog modrila pomoću gljiva bijelog truljenja

Metilensko modrilo															
$\gamma_{\text{bojila}}/$ mg L^{-1}	<i>Ganoderma lucidum</i>					<i>Ganoderma resinaceum</i>					<i>Trametes versicolor</i>				
	2. dan	6. dan	8. dan	10. dan	14. dan	2. dan	6. dan	8. dan	10. dan	14. dan	2. dan	6. dan	8. dan	10. dan	14. dan
10	0,00	0,77	0,92	1,0	1,0	0,00	0,68	0,80	1,0	1,0	0,00	nm	nm	nm	1,0
30	0,00	0,68	0,86	0,87	0,89	0,00	0,71*	0,72*	0,27	0,97	0,00	0,45*	0,65*	0,83*	1,0
50	0,00	0,34	0,83*	0,85*	0,46	0,00	0,50*	0,75*	0,89*	0,87	0,00	0,35*	0,62*	0,77*	1,0
100	0,00	0,68*	0,84*	0,86*	0,35	0,00	0,54*	0,73*	0,99*	0,77	0,00	0,41*	0,45*	0,75*	0,41*
150	0,00	0,71*	0,75*	0,81*	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

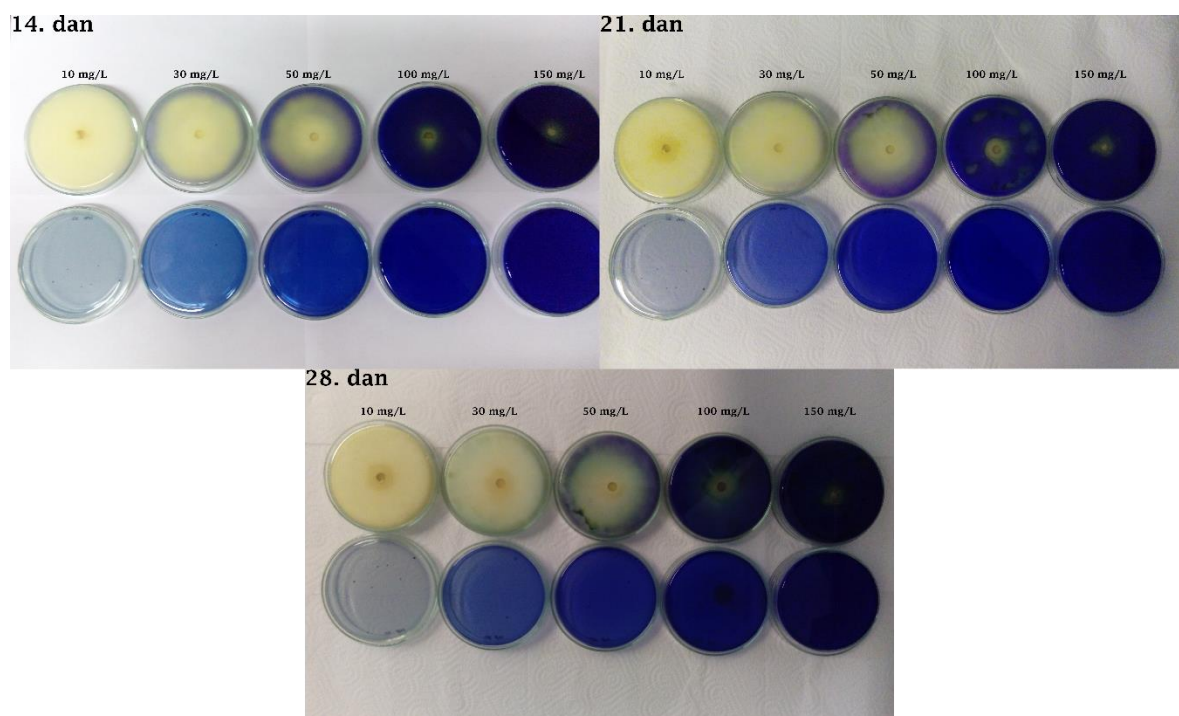
* djelomično obezbojenje, K: kontrola, nm: nije mjerljivo, indeks obezbojenja = Zona obezbojenja/Zona rasta

Tablica 4. Indeks obezbojenja malahitnog zelenila pomoću gljiva bijelog truljenja

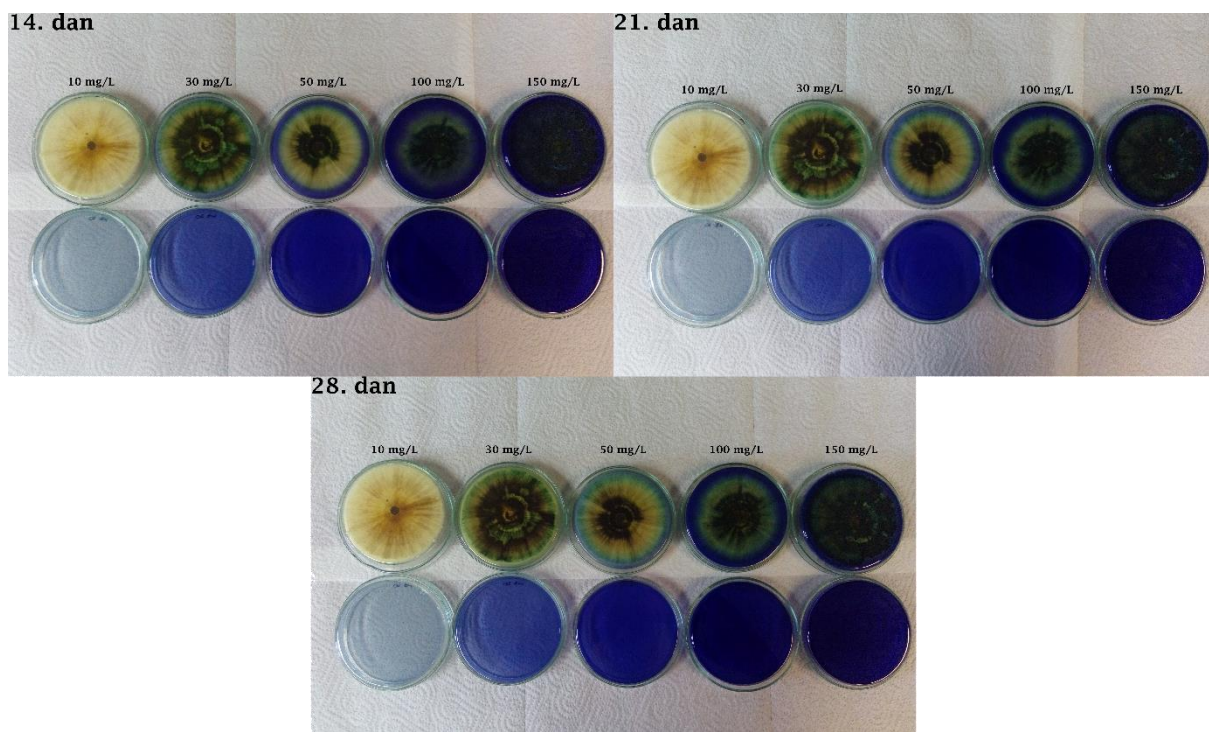
Malahitno zelenilo															
$\gamma_{\text{bojila}}/$ mg L^{-1}	<i>Ganoderma lucidum</i>					<i>Ganoderma resinaceum</i>					<i>Trametes versicolor</i>				
	2. dan	6. dan	8. dan	10. dan	14. dan	2. dan	6. dan	8. dan	10. dan	14. dan	2. dan	6. dan	8. dan	10. dan	14. dan
10	0,00	2,11	2,10	2,23	1,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,63	1,06	1,08	1,06	1,0
30	0,00	1,75	1,42	1,21	1,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	1,11	1,16	1,07	1,08
50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,83	1,04	1,19	1,08	1,09
100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,68	1,27	1,34	1,08	1,08
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,41	1,34	1,43	1,21	1,09

K: kontrola, indeks obezbojenja = Zona obezbojenja/Zona rasta

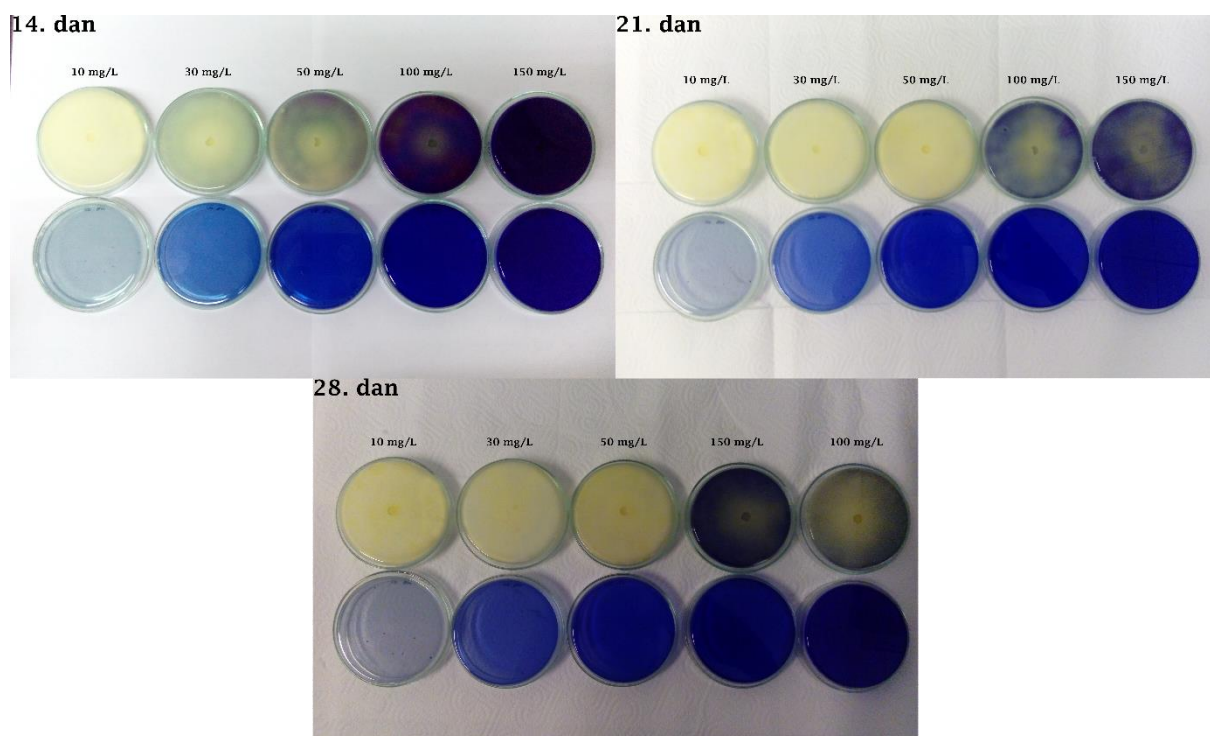
Metilensko modrilo nije inhibiralo rast gljiva na podlogama s dodatkom bojila. Iz **Tablice 3.** i **Slika 10.-13.** vidljivo je kako su sve korištene gljive nakon 14 dana uzgoja do određene mjere potpuno obezbojile metilensko modrilo dodano u podlogu u koncentraciji manjoj od 150 mg L⁻¹. Međutim, sposobnost potpunog obezbojenja podloge s bojom u koncentraciji od 150 g L⁻¹ nakon 14 dana uzgoja pokazala je jedino gljiva *G. lucidum*, ali vrlo mali indeks obezbojenja koji iznosi 0,25 pokazuje kako je potpuno obezbojena tek mala površina. Iako gljiva *T. versicolor* nakon 14 dana uzgoja nije pokazala sposobnost potpunog obezbojenja podloge s dodatkom metilenskog modrila u koncentracijama od 100 i 150 mg L⁻¹, indeksi obezbojenja za ostale koncentracije (10-50 mg L⁻¹) iznosili su 1, što ukazuje na potpuno obezbojenje cijele površine Petrijeve zdjelice (**Slika 12.**). Indeks obezbojenja 1 nakon 14 dana uzgoja za ostale gljive bio je samo pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji bojila od 10 mg L⁻¹. Nakon 28. dana uzgoja samo je gljiva *T. versicolor* pokazala potpuno obezbojenje cijele površine agarne ploče za koncentracije bojila u podlozi od 10 do 100 mg L⁻¹. *G. lucidum* pokazala je sposobnost potpunog obezbojenja cijele površine agarne ploče za koncentracije bojila u podlozi od 10 i 30 mg L⁻¹, dok je gljiva *G. resinaceum* sposobnost potpunog obezbojenja pokazala samo za koncentraciju bojila u podlozi od 10 mg L⁻¹. Niti jedna gljiva nije u potpunosti obezbojila cijelu površinu agarne ploče pri koncentraciji bojila u podlozi od 150 mg L⁻¹. Metilensko modrilo je teško biorazgradivo bojilo, što su osim ovog istraživanja potvrdila i istraživanja koja su proveli Jayasinghe i suradnici (2008.). Naime, od 10 vrsta gljiva bijelog truljenja korištenih u njihovom istraživanju, tek su dvije gljive pokazale dobru sposobnost obezbojenja podloga s dodatkom metilenskog modrila u koncentraciji od 100 mg L⁻¹. Nadalje, dodatak bojila u podlogu imao je za posljedicu umjeren do jak inhibitorni učinak na rast svih 10 vrsta korištenih u istraživanju. Statistička obrada rezultata rasta kolonija istraživanih gljiva na agarnim pločama s dodatkom metilenskog bojila pokazuje kako, tijekom ovog istraživanja, nije došlo do inhibicije rasta gljiva na podlogama s dodatkom bojila (**Tablice 5.-7.**), osim u slučaju gljive *T. versicolor* i to u prvim danima uzgoja.



Slika 10. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću gljive *G. lucidum* nakon 14., 21. i 28. dana uzgoja



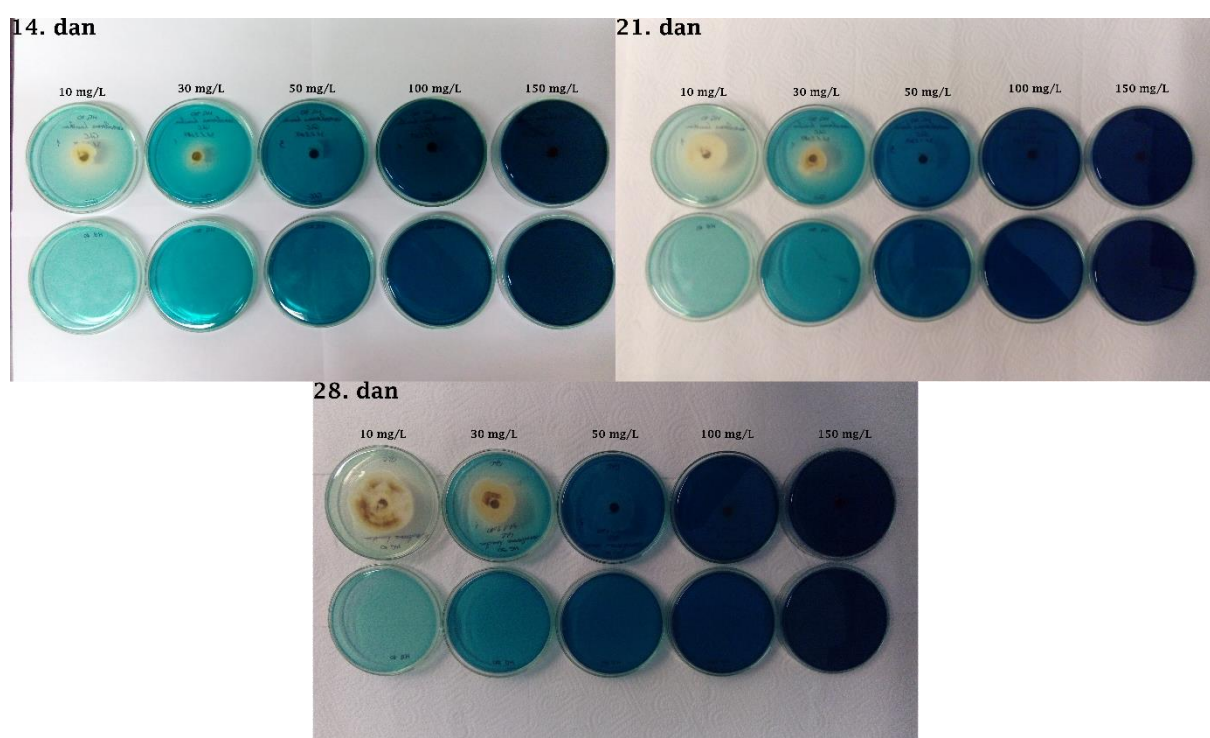
Slika 11. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću gljive *G. resinaceum* nakon 14., 21. i 28. dana uzgoja.



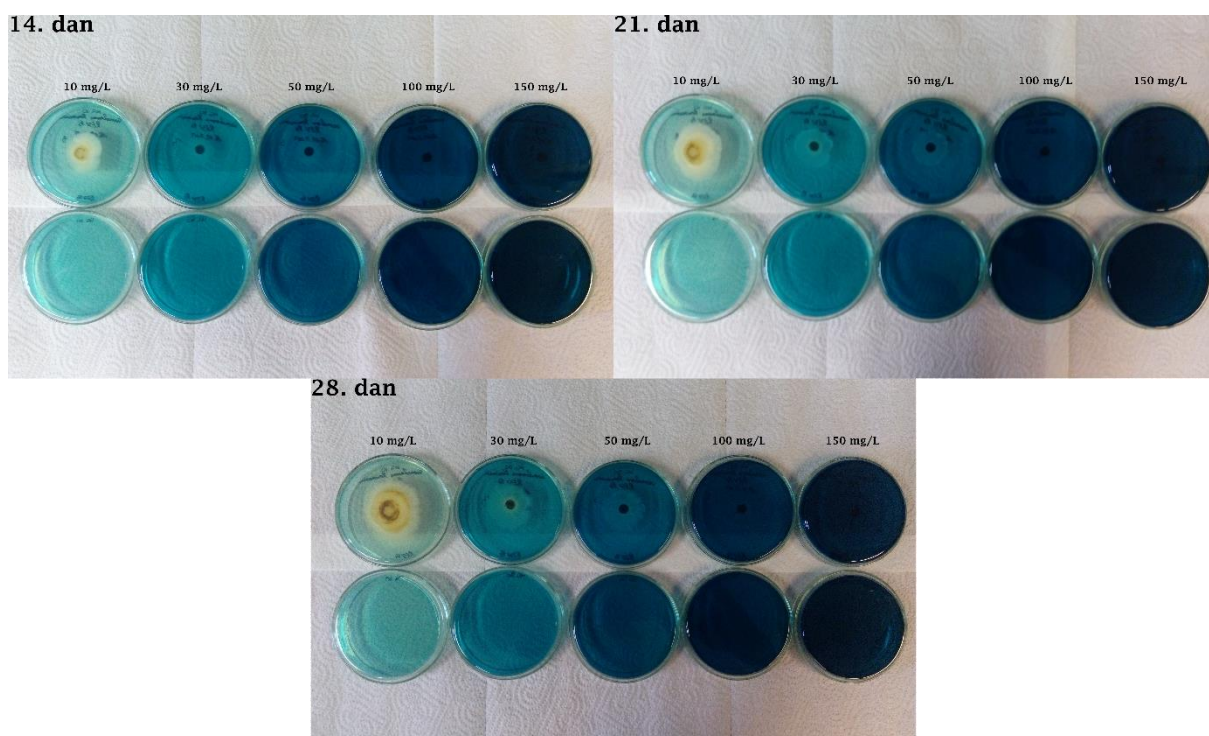
Slika 12. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću gljive *T. versicolor* TV8 nakon 14., 21. i 28. dana uzgoja.

Za razliku od metilenskog modrila, statistička obrada rezultata rasta kolonija istraživanih gljiva na agarnim pločama s dodatkom malahitnog zelenila ukazuje na snažnu inhibiciju rast gljiva roda *Ganoderma* ovim bojilom, dok je rast gljive *T. versicolor* TV8 inhibiran u značajno manjoj mjeri, ali je jasnije vidljiva statistički značajna razlika između primijenjenih koncentracija bojila. Naime, povećanjem koncentracije bojila dodane u podlogu, povećava se stupanj inhibicije zone rasta gljive *T. versicolor* TV8 (**Tablice 8.-10.**). Iz vrijednosti indeksa obezbojenja (**Tablica 4.**) može se primjetiti kako je nakon 14 dana uzgoja samo vrsta *T. versicolor* TV8 učinkovito u potpunosti obezbojila ovo bojilo, pri čemu su indeksi obezbojenja iznosili preko 1 za sve primijenjene koncentracije. *G. lucidum* je potpuno obezbojila podlogu samo pri koncentracijama 10 i 30 mg L⁻¹, uz visok indeks obezbojenja, ali tek manji dio potpuno obezbojene površine Petrijeve zdjelice zbog snažne inhibicije rasta. *G. resinaceum* nije pokazala sposobnost potpunog obezbojenja malahitnog zelenila niti pri jednoj primijenjenoj koncentraciji, što vidljivo iz vrijednosti indeksa obezbojenja koji je iznosio 0 za sve koncentracije. Iz **Slika 13.-15.** vidljivo je kako je nakon 28. dana uzgoja samo gljiva *T. versicolor* TV8 u potpunosti obezbojila cijelu površinu agarne ploče s dodatkom bojila u svim

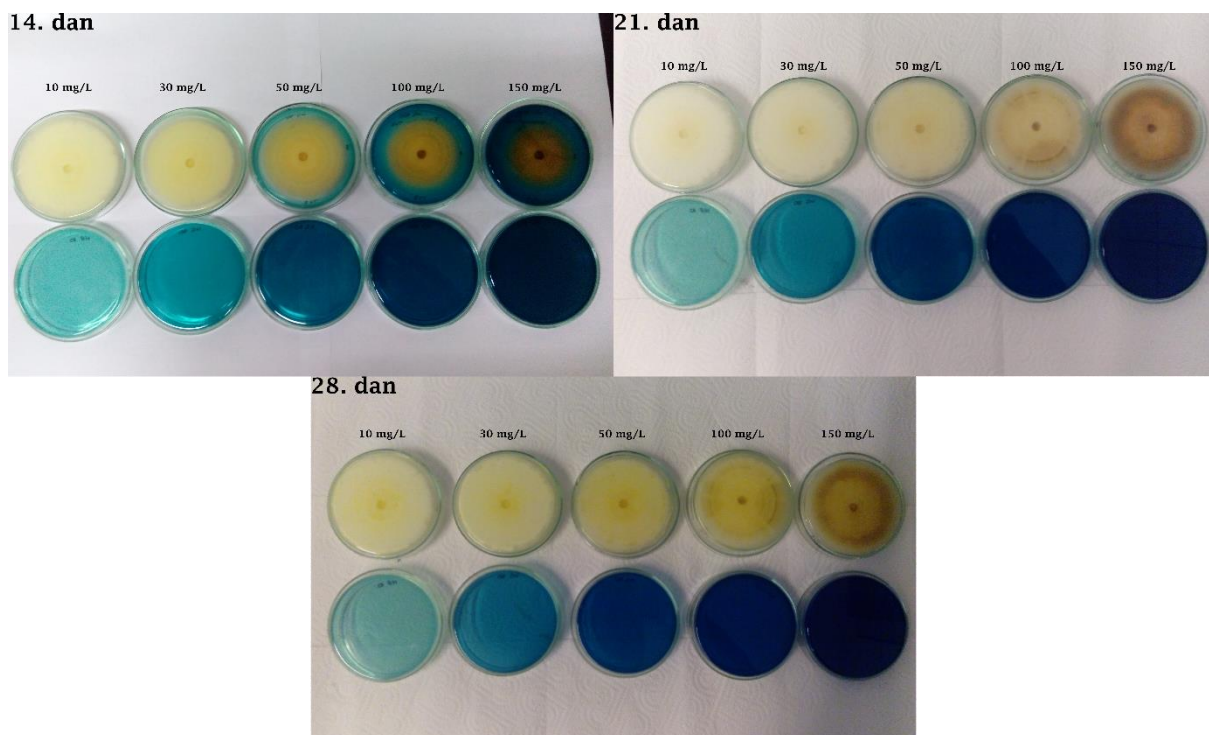
primijenjenim koncentracijama, dok gljive roda *Ganoderma* nisu pokazale tu sposobnost niti za jednu primijenjenu koncentraciju. Ovo je uskladu s istraživanjima drugih autora koji također navode snažni inhibitorni učinak malahitnog zelenila na neke vrste gljiva bijelog truljenja. Eichlerová i suradnici (2006.) istraživali su sposobnost obezbojenja agranih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću različitih vrsta gljiva bijelog truljenja, pri čemu su koncentracije malahitnog zelenila u podlozi iznosile su od 50 do 1000 mg L⁻¹. Rast gljiva bio je u potpunosti inhibiran dodatkom bojila u podlogu, osim u slučaju gljive *D. squalens* za koju je primijećen vrlo spor rast i obezbojenje agarnih ploča pri najmanjoj koncentraciji malahitnog zelenila u podlozi. Jayasinghe i suradnici (2008.) u svom istraživanju navode potpuni izostanak rasta 4 od 10 vrsta gljiva bijelog truljenja na agarnim pločama s malahitnim zelenilom (100 mg L⁻¹), dok je rast ostalih 6 vrsta bio snažno inhibiran uz dobru sposobnost obezbojenja agarnih ploča s dodatkom bojila.



Slika 13. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću gljive *G. lucidum* nakon 14., 21. i 28. dana uzgoja.



Slika 14. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću gljive *G. resinaceum* nakon 14., 21. i 28. dana uzgoja.



Slika 15. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću gljive *T. versicolor* TV8 nakon 14., 21. i 28. dana uzgoja.

Tablica 5. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću *G. lucidum*

	<i>Ganoderma lucidum</i>														
Metilensko modrilo	0. dan	2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		12. dan		14. dan	
Koncentracija	ZR	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO
Kontrola	5,00	21,63 ^a	-	50,34 ^a	-	75,68 ^a	-	90,00	-	90,00	-	90,00	-	90,00	-
10 ppm	5,00	22,74 ^a	0,00	55,31 ^{ab}	0,00	74,85 ^a	57,93 ^a	90,00	83,14 ^a	90,00	90,00 ^a	90,00	90,00 ^a	90,00	90,00 ^a
30 ppm	5,00	23,01 ^a	0,00	54,35 ^{ab}	0,00	72,11 ^a	49,36 ^b	90,00	77,17 ^a	90,00	78,50 ^b	90,00	73,96 ^b	90,00	80,25 ^b
50 ppm	5,00	23,75 ^a	0,00	54,28 ^{ab}	0,00	73,73 ^a	25,10 ^c	90,00	0,00 ^c	90,00	0,00 ^d	90,00	37,52 ^c	90,00	41,33 ^c
100 ppm	5,00	22,22 ^a	0,00	52,50 ^{ab}	0,00	73,33 ^a	0,00 ^d	90,00	16,45 ^b	90,00	22,19 ^c	90,00	0,00 ^d	90,00	15,30 ^d
150 ppm	5,00	20,19 ^a	0,00	50,49 ^{ab}	0,00	65,85 ^b	0,00 ^d	90,00	0,00 ^c	90,00	0,00 ^d	90,00	0,00 ^d	90,00	0,00 ^e

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje

Tablica 6. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću *G. resinaceum*

	<i>Ganoderma resinaceum</i>														
Metilensko modrilo	0. dan	2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		12. dan		14. dan	
Koncentracija	ZR	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO
Kontrola	5,00	13,47 ^a	-	31,21 ^a	-	50,83 ^a	-	70,85 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00	-	90,00	-
10 ppm	5,00	18,47 ^a	0,00	37,93 ^a	22,29 ^a	61,45 ^a	41,68 ^a	80,38 ^a	64,49 ^a	90,00 ^a	90,00 ^a	90,00	90,00 ^a	90,00	90,00 ^a
30 ppm	5,00	14,39 ^a	0,00	30,81 ^a	13,88 ^b	51,31 ^a	36,28 ^a	72,81 ^a	0,00 ^b	84,79 ^a	23,26 ^b	90,00	27,97 ^{ab}	90,00	27,99 ^{ab}
50 ppm	5,00	16,55 ^a	0,00	35,27 ^a	0,00 ^c	56,73 ^a	0,00 ^b	77,76 ^a	0,00 ^b	88,96 ^v	0,00 ^b	90,00	66,10 ^a	90,00	78,37 ^a
100 ppm	5,00	16,54 ^a	0,00	33,73 ^a	0,00 ^c	55,13 ^a	0,00 ^b	75,06 ^a	0,00 ^b	88,50 ^a	0,00 ^b	90,00	0,00 ^b	90,00	69,21 ^a
150 ppm	5,00	15,62 ^a	0,00	32,34 ^a	0,00 ^c	53,50 ^a	0,00 ^b	72,15 ^a	0,00 ^b	85,22 ^a	0,00 ^b	90,00	0,00 ^b	90,00	0,00 ^b

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje

Tablica 7. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću *T. versicolor* TV8

	<i>Trametes versicolor</i>														
Metilensko modrilo	0. dan	2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		12. dan		14. dan	
Koncentracija	ZR	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO
Kontrola	5,00	30,54 ^a	-	65,07 ^a	-	81,58 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-
10 ppm	5,00	27,37 ^a	0,00	58,91 ^b	0,00	NM ^{ab}	0,00	NM	0,00	NM	0,00	NM	60,00 ^a	NM	90,00 ^a
30 ppm	5,00	26,04 ^a	0,00	56,71 ^{bc}	0,00	77,99 ^{ab}	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	77,73 ^b	90,00 ^a	90,00 ^a
50 ppm	5,00	27,40 ^a	0,00	57,14 ^{bc}	0,00	79,79 ^{ab}	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	45,79 ^c	90,00 ^a	90,00 ^a
100 ppm	5,00	28,49 ^a	0,00	54,60 ^{bc}	0,00	78,80 ^{ab}	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	30,08 ^d	90,00 ^a	36,80 ^b
150 ppm	5,00	27,00 ^a	0,00	51,96 ^c	0,00	74,31 ^b	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	0,00	90,00 ^a	0,00 ^e	90,00 ^a	0,00 ^c

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje, NM – nije mjerljivo

Tablica 8. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću *G. lucidum*

	<i>Ganoderma lucidum</i>														
Malahitno zelenilo	0. dan	2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		12. dan		14. dan	
Koncentracija	ZR	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO
Kontrola	5,00	21,63 ^a	-	50,34 ^a	-	75,68 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-
10 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^b	17,12 ^a	8,55 ^b	18,10 ^a	11,20 ^b	23,51 ^a	12,24 ^b	27,27 ^a	16,39 ^b	28,34 ^a	19,49 ^b	37,43 ^a
30 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	6,57 ^b	10,41 ^b	6,86 ^b	12,05 ^b	8,82 ^{bc}	12,53 ^b	12,07 ^b	14,83 ^b	14,93 ^b	17,63 ^b	15,57 ^b	25,63 ^b
50 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^b	0,00 ^c	6,16 ^b	0,00 ^c	9,35 ^{bc}	0,00 ^c	11,56 ^b	0,00 ^c	14,59 ^b	0,00 ^c	16,93 ^b	0,00 ^c
100 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^b	0,00 ^c	5,00 ^b	0,00 ^c	6,18 ^{bc}	0,00 ^c	9,75 ^b	0,00 ^c	12,83 ^b	0,00 ^c	13,37 ^b	0,00 ^c
150 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^c	0,00 ^c	5,00 ^b	0,00 ^c	5,00 ^c	0,00 ^c	6,97 ^b	0,00 ^c	7,40 ^b	0,00 ^c	11,52 ^b	0,00 ^c

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje

Tablica 9. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću *G. resinaceum*

	<i>Ganoderma resinaceum</i>														
Malahitno zelenilo	0. dan	2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		12. dan		14. dan	
Koncentracija	ZR	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO
Kontrola	5,00	13,47 ^a	-	31,21 ^a	-	50,83 ^a	-	70,85 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-
10 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	7,71 ^b	0,00	13,06 ^b	0,00	18,13 ^b	0,00	22,31 ^b	0,00	27,38 ^b	0,00	34,07 ^b	0,00
30 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^b	0,00	7,41 ^{cd}	0,00	10,43 ^{bc}	0,00	12,33 ^{bc}	0,00	16,14 ^c	0,00	20,26 ^c	0,00
50 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	7,72 ^b	0,00	9,58 ^{bc}	0,00	13,04 ^{bc}	0,00	14,51 ^{bc}	0,00	16,34 ^{bc}	0,00	20,38 ^c	0,00
100 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	6,42 ^b	0,00	7,54 ^{cd}	0,00	9,00 ^c	0,00	11,02 ^{bc}	0,00	14,29 ^{cd}	0,00	17,51 ^{cd}	0,00
150 ppm	5,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^b	0,00	5,00 ^d	0,00	5,00 ^c	0,00	5,00 ^c	0,00	5,00 ^d	0,00	5,00 ^d	0,00

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje

Tablica 10. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću *T. versicolor*

	<i>Trametes versicolor</i>														
Malahitno zelenilo	0. dan	2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		12. dan		14. dan	
Koncentracija	ZR	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO	ZR	PO
Kontrola	5,00	30,54 ^a	-	65,07 ^a	-	81,58 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^a	-	90,00 ^{ab}	-
10 ppm	5,00	13,78 ^b	22,50 ^a	25,80 ^b	33,57 ^a	41,18 ^b	43,64 ^a	57,52 ^b	62,28 ^a	71,61 ^{ab}	76,22 ^a	82,56 ^{ab}	90,00 ^a	90,00 ^a	90,00 ^a
30 ppm	5,00	10,98 ^{bc}	16,43 ^{ab}	16,16 ^c	26,77 ^{ab}	29,23 ^c	32,41 ^b	43,16 ^c	50,19 ^{ab}	56,05 ^{bc}	59,90 ^{ab}	67,51 ^{bc}	75,12 ^{ab}	76,54 ^{ab}	82,36 ^{ab}
50 ppm	5,00	10,29 ^c	18,82 ^{ab}	16,07 ^c	26,17 ^{ab}	27,0 ^{cd}	28,26 ^{bc}	38,81 ^{cd}	46,38 ^{ab}	51,89 ^c	55,85 ^{ab}	59,88 ^{cd}	64,34 ^{bc}	72,08 ^{bc}	78,23 ^{ab}
100 ppm	5,00	9,29 ^c	15,57 ^{ab}	13,92 ^c	22,54 ^b	19,14 ^d	24,39 ^c	27,54 ^d	36,89 ^b	39,42 ^c	42,63 ^b	47,03 ^d	50,89 ^c	58,14 ^c	62,72 ^b
150 ppm	5,00	9,97 ^c	14,11 ^b	14,01 ^c	21,31 ^b	21,14 ^{cd}	28,37 ^{bc}	29,57 ^d	42,33 ^{ab}	39,86 ^c	48,15 ^{ab}	48,80 ^d	51,26 ^c	57,54 ^c	62,99 ^b

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje

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

Kao što je već rečeno, adsorpcija je jedana od najčešće primjenjivanih metoda uklanjanje bojila iz otpadnih voda na realnim sustavima. Pri tome se, u novije vrijeme, sve više kao mogući adsorbensi istražuju različiti otpadni lignocelulozni materijali, što bi proces adsorpcije učinilo ekonomski isplativijim. Međutim, nakon adsorpcije bojila na lignocelulozne adsorbense/ otpadne materijale, problem predstavlja odgovarajuće zbrinjavanje obojenog adsorbensa. Nigam i suradnici (2000.) ponudili su rješenje ovog problema u vidu korištenja obojenih supstrata za uzgoj gljiva bijelog truljenja *Phanerochaeta chrysosporium* i *Coriolus versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Tijekom uzgoja, djelovanjem enzima koje ove gljive produciraju, došlo je do obezbojenja supstrata i smanjenja njegovog volumena.

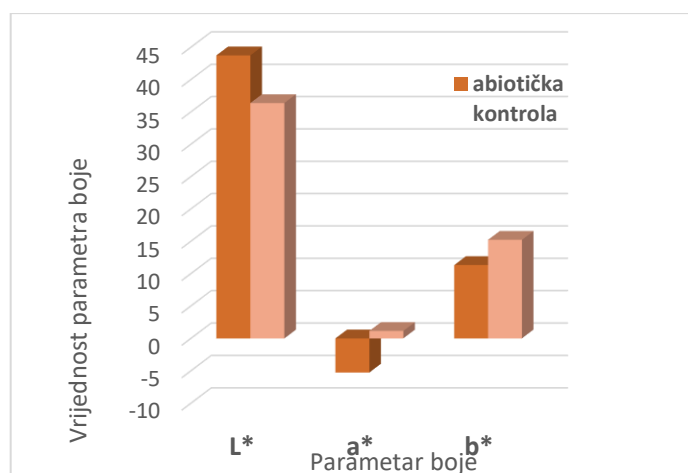
U ovom dijelu rada istražena je sposobnost obezbojenja pivskog tropa obojenog metilenskim modrilom pomoću gljive *Trametes versicolor* TV8 u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Obojeni pivski trop, pri tome, je služio kao neinertni nosač, odnosno i kao nosač biomase i kao supstrat. Gljiva *Trametes versicolor* TV8 dobro je rasla na obojenom pivskom tropu, što je, osim vizualne potvrde u vidu pojave bijelog micelija, naknadno potvrđeno analizom pivskog tropa nakon provedene fermentacije u trajanju od 21 dana te pripadajućih biotičkih i abiotičkih kontrola. Rezultati analize udjela vlage, gubitka na masi supstrata, udjela proteina te promjene boje uzoraka prikazani su u **Tablici 10.**, te na **Slici 16.**

Tablica 10. Promjene prilikom uzgoja gljive na čvrstim nosačima

Uzorak	Udio vlage (%)		Gubitak na masi supstrata (%)	Udio proteina (%)
	početno	21 dan		
Biotička kontrola	62,54	65,78	18,16	24,00
Abiotička kontrola	57,11	52,39	0	20,00
Obojeni pivski trop	60,89	66,94	18,34	23,73

Iz **Tablice 10.** vidljiva je promjena udjela vlage kod ispitivanog uzorka i biotičke kontrole koji je porastao u odnosu na abiotičku kontrolu, kao posljedica mikrobiološke aktivnosti, odnosno oslobađanja metaboličke vode. Nadalje, isto se može zaključiti i za povećanje udjela

proteinskog dušika za oba uzorka u odnosu na abiotičku kontrolu, gdje nije bilo mikrobnog rasta. Gubitak na masi supstrata bio je sličan i u slučaju biotičke kontrole, kao i uzorka nakon fermentacije, i iznosio je oko 18%. gubitak na masi supstrata također ukazuje na metaboličku aktivnost gljive, uslijed koje dolazi do razgradnje lignoceluloznih sastavnica pivskog tropa, što se očituje kao gubitak na masi supstrata (Valášková i Baldrian, 2006). **Slika 16.** prikazuje promjenu parametara boje uzorka obojenog pivskog tropa dobivenog nakon biološke obrade pomoću gljive *T. versicolor* TV8 u trajanju od 21 dan u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu. Iz slike je vidljivo kako je nakon 21 dan fermentacije došlo do smanjenja parametra L^* (lightness) u odnosu na abiotičku kontrolu podvrgnutu istim okolišnim uvjetima, što upućuje na zaključak kako je došlo do potamnjenja uzorka tijekom fermentacije. Nadalje, parametar a^* (crveno vs. zeleno) iz negativne vrijednosti zabilježene za abiotičku kontrolu prelazi u pozitivnu vrijednost za fermentirani uzorak, odnosno dolazi do promjene nijanse boje od zelenoplave prema svijetlijoj crvenoj, što upućuje na zaključak kako je vjerojatno došlo do razgradnje plavog pigmenta metilenskog modrila u prisutnosti *T. versicolor* TV8. Parametar boje b^* (žuto vs. plavo) također opisuje promjenu nijanse od žute prema plavoj, pri čemu je abiotička kontrola u odnosu na uzorak više plava, što također upućuje na razgradnju boje u fermentiranom uzorku. Istraživanja koja su proveli Kezerle i suradnici (2016.) na pivskom tropu obojenim metilenskim modrilom i biološki obrađenim s gljivom bijelog truljenja *T. versicolor* CCBAS AG613, također su pokazala smanjenje ukupne promjene boje i smanjenje intenziteta boja u fermentiranim uzorcima nakon 10, 20 i 30 dana uzgoja u odnosu na pripadajuće abiotičke kontrole.



Slika 16. Promjene parametara boje uzorka obojenog pivskog tropa biološki obrađenog pomoću gljive *T. versicolor* TV8 u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu.

5. ZAKLJUČAK

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

1. Svi provedeni kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva bili su pozitivni za sve gljive korištene u ovom istraživanju te je potvrđena njihova prikladnost za upotrebu u daljnjim eksperimentima obezbojenja sintetskih bojila.
2. Sposobnost potpunog obezbojenja cijele površine agarne ploče s dodatkom metilenskog modrila nakon 28 dana uzgoja pokazala je samo gljiva *T. versicolor* TV8 za primjenjene koncentracije bojila u podlozi od 10 – 100 mg L⁻¹. *G. lucidum* pokazala je sposobnost potpunog obezbojenja cijele površine agarne ploče za koncentracije bojila u podlozi od 10 i 30 mg L⁻¹, dok je gljiva *G. resinaceum* sposobnost potpunog obezbojenja pokazala samo za koncentraciju bojila u podlozi od 10 mg L⁻¹. Dodatak metilenskog modrila u podlogu nije rezultirao statistički značajnom inhibicijom rasta gljiva.
3. Sposobnost potpunog obezbojenja cijele površine agarne ploče s dodatkom malahitnog zelenila nakon 28 dana uzgoja pokazala je samo gljiva *T. versicolor* TV8 za sve primjenjene koncentracije bojila u podlozi. Gljive roda *Ganoderma* nisu pokazale tu sposobnost niti za jednu primijenjenu koncentraciju. Dodatak malahitnog zelenila u podlogu rezultirao je statistički značajnom inhibicijom rasta odabranih gljiva, pri čemu je rast gljiva roda *Ganoderma* bio izrazito snažno inhibiran, dok je rast gljive *T. versicolor* TV8 bio inhibiran u puno manjoj mjeri.
4. Gljiva *T. versicolor* TV8 dobro je rasla na pivskom tropu obojenom metilenskim modrilom kao nosaču i supstratu u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima, što se očitovalo porastom udjela vlage i proteinskog dušika te gubitkom na masi supstrata od 18 % u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu.
5. Tijekom fermentacije na čvrstim nosačima došlo je do djelomičnog obezbojenja obojenog pivskog tropa, što je potvrđeno kako vizualno tako i mjerenjem promjene parametara boje L*, a* i b* u odnosu na abiotičku kontrolu.
6. Dobiveni rezultati upućuju na biotehnološki potencijal gljive *T. versicolor* TV8 za primjenu u procesima biorazgradnje sintetskih bojila, poglavito teško biorazgradivog metilenskog modrila, iz okoliša.

6. LITERATURA

- Abd El-Zaher EHF: Biodegradation of reactive dyes using soil fungal isolates and *Ganoderma resinaceum*. *Annals of Microbiology*, 60:269-278, 2010.
- Alderman DJ: Malachite green: a review. *Journal of Fish Diseases*. 8:289-298, 1985.
- Anastasi A, Tigini V, Varese GC: The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi. *Soil Biology*, 32:29-51, 2013.
- Anjaneyulu Y, Chary NS, Raj SSD: Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies - a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4:24-273, 2005.
- Barr DP, Aust SD: Pollutant Degradation by White Rot Fungi. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 138:49-72, 1994.
- Bibi I, Bhatti HN, Asgher M: Decolourisation of Direct Dyes With Manganese Peroxidase From White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*-IBL-5. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 87:435-440, 2009.
- Blanchette RA: Delignification by Wood-decay Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 29:381-398, 1991.
- Clifton J II, Leikin JB: Methylene Blue. *American Journal of Therapeutics*, 10:289-291, 2003.
- Collins RA, Ng TB: Polysaccharopeptide From *Coriolus Versicolor* has Potential for Use Against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Life Sciences*, 60:383-387, 1997.
- Correia VM, Stephenson T, Judd SJ: Characterization of Textile Wastewaters – A Review. *Environmental Technology*, 15:917-929, 1994.
- Cui J, Chisti Y: Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21:109-122, 2003.
- Culp SJ, Beland FA: Malachite green: A Toxicological Review. *Journal of the American College of Toxicology*, 15:219-238, 1996.
- Cuota SR, Sanroman MA: Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 76:291-302, 2006.
- Eichlerová I, Homolka L, Lisa L, Nerud F: Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* and *Pleurotus calypttratus*. *Chemosphere*, 60:398-404, 2005.

- Eichlerová I, Homolka L, Nerud F: Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments*, 75:38-44, 2007.
- Ejder-Korucu M, Gürses A, Doğar Ç, Sharma SK, Açıkyıldız M: Removal of Organic Dyes from Industrial Effluents: An Overview of Physical and Biotechnological Applications. U: *Green Chemistry for Dyes Removal from Wastewater*, str. 1-34, Scrivener Publishing, USA, 2015.
- Encyclopaedia Britannica* Ultimate Reference Suite (2015.) Methylene Blue, Chicago: Encyclopaedia Britannica.
- Gürses A, Açıkyıldız M, Güneş K, Gürses SM: *Dyes and Pigments*. Springer International Publishing, Švicarska, 2016.
- Hong KJ, Dunn DM, Shen CL, Pence BC: Effects of *Ganoderma lucidum* on Apoptotic and Anti-inflammatory Function in HT-29 Human Colonic Carcinoma Cells. *Phytotherapy Research*, 18:768-770, 2004.
- HRN ISO 1871:1999, Poljoprivredni prehrambeni proizvodi- Općenite upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom (ISO 1871:1975)
- <http://s.ngm.com/2015/01/first-artists/img/altamira-cave-paintings-615.jpg> (8.9.2017.)
- <http://www.medicalmushrooms.net/uploads/c4108050209/reishi-ganoderma-lucidum-lingzhi.jpg> (8.9.2017.)
- http://www.mykoweb.com/CAF/photos/large/Trametes_versicolor_fs-01.jpg (8.9.2017.)
- https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malachite_green_oxalate.jpg#/media/File:Malachite_green_oxalate.jpg (8.9.2017.)
- <https://image.jimcdn.com/app/cms/image/transf/dimension=2048x2048:format=jpg/path/sa0966573a1fb5091/image/icd0e4fe6e7d3b9b0/version/1493133035/image.jpg> (8.9.2017.)
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11294#section=Top> (8.9.2017.)
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6099#section=2D-Structure> (8.9.2017.)
- <https://tryoncreek.files.wordpress.com/2015/10/8.jpg> (8.9.2017.)

- 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.
- Kant R: Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural Science*, 4:22-26, 2012.
- Kezerle A, Jurić T, Velić N, Hasenay D, Marček T, Velić D: Adsorptive removal of methylene blue from aqueous solutions using lignocellulosic waste materials and biological treatment of dye-absorbed biosorbent. *Proceedings & abstracts of 9th International scientific/professional conference Agriculture in nature and environment protection*, str. 204-208. Glas Slavonije d.d., Osijek, 2016.
- Kidd PM: The Use of Mushroom Glucans and Proteoglycans in Cancer Treatment. *Alternative Medicine Review*, 5:4-27, 2000.
- Kiiskinen LL, Rättö M, Kruus K: Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 97:640-646, 2004.
- Kumar KV, Kumaran A: Removal of Methylene Blue by Mango Seed Kernel Powder. *Biochemical Engineering Journal*, 27:83-93, 2005.
- Levasseur A, Saloheimo M, Navarro D, Andberg M, Pontarotti P, Kruus K, Record E: Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. *BMC Biochemistry*, 11:32, 2010.
- McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF: Microbial Decolourisation and Degradation of Textile Dyes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:81-87, 2001.
- Meyer FP, Jorgenson TA: Teratological and Other Effects of Malachite Green on Development of Rainbow Trout and Rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112:818-824, 1983.
- Mitchell DA, Berovič M, Krieger N: Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8:183-225, 2002.
- Muller CI, Kumagai T, O'Kelly J, Seeram NP, Heber D, Koeffler HP: *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Research*, 30:841-848, 2006.

- Murugesan K, Nam IH, Kim YM, Chang YS: Decolorization of reactive dyes by thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1662-1672, 2007.
- 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.
- Novotny Č, Svobodova K, Erbanova P, Cajthaml T, Kasinath A, Aparna; Lang E, Sasek V: Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1545-1551, 2004.
- Oyetayo OV: Medicinal Uses of Mushrooms in Nigeria: Towards Full and Sustainable Exploitation. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 8:267-274, 2011.
- Pandey A: Solid-state Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13:81-84, 2003.
- Pereira L, Alves M: Dyes-Environmental Impact and Remediation. U: *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*, str. 112-154, Springer, USA, 2012.
- Pointing SB: Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*, 2:17-33, 1999.
- Ralph JP, Catchside DEA: Biodegradation by White-Rot Fungi. U: *The Mycota X. Industrial Application*, str. 303-326, 2002.
- Rao KV, Fernandes CL: Progressive effects of malachite green at varying concentrations on the development of N-nitrosodiethylamine induced hepatic preneoplastic lesions in rats. *Tumori*, 82:280-286, 1996.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P: Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77:247-255, 2001.
- Santos GC, Corso CR: Comparative Analysis of Azo Dye Biodegradation by *Aspergillus oryzae* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225:20-26, 2014.
- Sardrood BP, Goltapeh EM, Varma A: An Introduction to Bioremediation. *Soil Biology*, 32:3-29, 2013.

- Schwarze FWMR, Ferner D: *Ganoderma* on trees-differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal*, 27:59-77, 2003.
- Selvakumar S, Manivasagan R, Chinnappan K: Biodegradation and decolourization of textile dye wastewater using *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology*, 3:71-79, 2013.
- Singh H: *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, John Wiley & Sons Inc., SAD, 2006.
- Singh HB, Bharati KA: *Handbook of Natural Dyes and Pigments*. Woodhead Publishing India, Indija, 2014.
- Sliva D, Sedlak M, Slivova V, Valachovicova T, Lloyd FP, Ho NWY: Biologic Activity of Spores and Dried Powder from *Ganoderma lucidum* for the Inhibition of Highly Invasive Human Breast and Prostate Cancer Cells. *The Journal of Alternative and Complementary medicine*, 9:491-497, 2003.
- Srivastava S, Sinha R, Roy D: Toxicological Effects of Malachite Green. *Aquatic Toxicology*, 66:319-329, 2004.
- Steayert RL: Study of Some *Ganoderma* Species. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België*, 50:135-186, 1980.
- Sundman V, Nase L: A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Paper and Timber*, 2:67-71, 1971.
- Tang YJ, Zhu LW, Li HM, Li DS: Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors-Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technology and Biotechnology*, 45:221-229, 2007.
- Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS: Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:420-426, 2001.
- 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.
- Vasdev K: Decolorization of Triphenylmethane Dyes by Six White-Rot Fungi Isolated from Nature. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 2:128, 2011.

- Vijayaraghavan K, Yun YS: Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26:266-291, 2008.
- Webster J, Weber RWS: *Introduction to Fungi (third edition)*. Cambridge University Press, SAD, 2007.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN: White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22:161-187, 2003.
- Zollinger H: *Color: A Multidisciplinary Approach*. Wiley- VCH/VHCA, Švicarska, 1999.