Sposobnost obezbojenja sintetskih bojila novih izolata gljiva roda Trametes

Antunović, Kazimir

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:109:778080

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

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

Kazimir Antunović

Sposobnost obezbojenja sintetskih bojila novih izolata gljiva roda *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 bioprocesno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Biotehnologija
Nastavni predmet:	Boprocesi 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*

Sposobnost obezbojenja sintetskih bojila novih izolata gljiva roda Trametes

Kazimir Antunović, 358-DI

Sažetak: U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila (fuksin, kongo crvenilo i kristal violet) pomoću novih, do sada neistraženih izolata gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* (L.) i *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. Istraživanjima sposobnosti obezbojenja prethodili su kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti koji su bili pozitivni za obje vrste gljiva. 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 praćen njihov porast i promjer obezbojenja. Nakon 14 dana, pri sobnoj temperaturi, nastavljeno je praćenje obezbojenje podloga do potpunog obezbojenja cijele agarne površine. Nakon 28 dana uzgoja gljiva *T. versicolor* TV8 je u potpunosti obezbojila cijelu površinu agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila u svim odabranim koncentracijama te agarnih ploča s dodatkom fuksina i kristal violeta u svim koncentracijama, osim 150 mg L^{-1}. Gljiva *T. gibbosa*, potpuno je obezbojila cijelu površinu agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila osim u najvećoj koncentraciji od 150 mg L^{-1}. U slučaju fuksina potpuno su obezbojene samo agarne ploče s dodatkom bojila u koncentracijama 10 i 30 mg L^{-1}, a ploče s dodatkom kristal violeta samo u koncentraciji od 10 mg L^{-1}. Nadalje, ispitana je mogućnost obezbojenja kongo crvenila pomoću *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pri čemu je kao supstrat i nosač korišten obojeni pivski trop. Tijekom uzgoja u trajanju od 21 dan, došlo je do porasta udjela proteina u uzorku te gubitka na masi supstrata od 17% u odnosu na abiotičku kontrolu. Tijekom fermentacije na čvrstim nosačima došlo je do djelomičnog obezbojenja pivskog tropa što je potvrđeno vizualno i određivanjem promjene parametara boje.

Ključne riječi: sintetska bojila, *Trametes versicolor, Trametes gibbosa, obezbojenje*

Rad sadrži:
50 stranica
16 slika
11 tablica
52 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

1.	doc. dr. sc. *Kristina Mastanjević*	Predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*	član-komentor
4.	doc. dr. sc. *Tihana Marček*	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.

Synthetic dyes decolorization

Kazimir Antunović, 358-DI

Summary: This study investigated the ability of newly isolated white rot fungi *Trametes versicolor* (L.) and *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. to decolorize synthetic dyes (fuchsine, congo red and crystal violet). Prior to decolorization tests, qualitative test for determination of cellulolytic and lignolytic activity were performed and were positive for both fungi. The fungi were cultivated on agar plates containing dyes at concentrations of 10, 30, 50, 100 and 150 mg L^{-1} for 14 days. The radial growth and the zone of colour change on the agar plates were measured regularly every two days. The agar plates were then stored at room temperature and the change of colour was monitored visually for another 14 days. After 28 days, *T. versicolor* TV8 completely decolorize all agar plates containing congo red at all the applied concentrations. Apart from agar plates with the addition of 150 mg L^{-1} fuchsine and crystal violet, all other agar plates with the adition of fuchsine and crystal violet were successfully decolorized. *T. gibbosa*completely decolorized all agar plates containing congo red except at the highest concentration of 150 mg L^{-1}. Complete decolorization of agar plates containing fuchsine was only noted for concentrations of 10 and 30 mg L^{-1}, while in case of crystal violet the complete decolorization only occurred on agar plates with added concentration of crystal violet of 10 mg L^{-1}. Furthermore, *T. versicolor* was cultivated under solid-state conditions using congo red loaded brewers' spent grain as a carrier and substrate. *T. versicolor* grew readily under solid-state conditions, which was confirmed by the increase of protein content and substrate mass loss of 17% compared to abiotic control. Only partial decolorisation of congo red was observed, which was confirmed visually and by measuring the changes of color parameters.

Key words: synthetic dyes, *Trametes versicolor, Trametes gibbosa, decolourization*

Thesis contains:
50 Pages
16 figures
11 tables
52 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Kristina Mastanjević*, PhD, assistant prof.	chair person
2.	*Natalija Velić*, PhD, associate prof.	supervisor
3.	*Hrvoje Pavlović*, PhD, associate prof.	co-supervisor
4.	*Tihana Marček*, PhD, assistant prof.	stand-in

Defense date: 5th October 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 svima koji su me na bilo koji način morali podnositi u tijeku izrade ovog rada.

Sadržaj

1.UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Bojila 4

2.1.1. Fuksin 6

2.1.2. Kongo crvenilo 6

2.1.3. Kristal violet 7

2.2. Utjecaj bojila na zdravlje i okoliš 8

2.3. Metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda 9

2.3.1. Kemijske metode 10

2.3.2. Fizikalne metode 10

2.3.3. Biološke metode 11

2.4. Gljive 12

2.4.1. Gljive bijelog truljenja 12

2.4.2. *Trametes versicolor* 13

2.4.3. *Trametes gibbosa* 14

2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima 15

3. EKSPERIMENTALNI DIO 17

3.1. Zadatak 18

3.2. Materijali 18

3.2.1. Bojila 18

3.2.2. Mikroorganizmi 18

3.2.3. Kemikalije 18

3.2.4. Supstrat 19

3.3. Aparatura i pribor 19
3.3.1. Tehnička i analitička vaga 19
3.3.2. Autoklav 20
3.3.3. Vodena kupelj 20
3.3.4. Vibrirajući mješač 20
3.3.5. Mikrobiološki zaštitni kabinet 20
3.3.6. Termostat 20
3.3.7. Digitalno pomično mjerilo 20
3.3.8. Laboratorijski mlin 20
3.3.9. Analizator vlage 21
3.3.10. Uređaj za destilaciju i titraciju 21
3.3.11. Kromametar 21
3.4. Metode 21
3.4.1. Priprema podloga i uzgoj radnih mikroorganizama 21
3.4.2. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva 22
3.4.3. Testovi obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama 25
3.4.4. Uzgoj gljive *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na obojenom pivskom tropu kao neinertnom nosaču 26
3.4.5. Određivanje udjela vlage 26
3.4.6. Određivanje boje uzorka 27
3.4.7. Određivanje proteinskog dušika 28
3.4.8. Statistička obrada 29
4. REZULTATI I RASPRAVA 30
4.1. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti 31

4.2. Istraživanje sposobnosti obezbojenja sintetskih bojila pomoću *T. versicolor i T. gibbosa* 33

4.3. Istraživanje sposobnosti obezbojenja obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima 45

5. ZAKLJUČCI 48

6. LITERATURA 50

1.UVOD

Kao posljedica porasta svjetske populacije došlo je do znatnog povećanja ponude i potražnje, što uvelike podupire konzumeristički način života. Takav moderan stil života u mnogim zemljama uzrokuje nastanak i nagomilavanje sve veće količine otpadnih materijala koji ometaju prirodne mehanizme samočišćenja (Vujević, 2007). Pozornost ovog rada usredotočena je na sintetska bojila, odnosno obojene otpadne vode koje, unatoč zakonskoj regulativi, na mnogim područjima i dalje neobrađene dospjevaju u prirodne prijemnike. Već i vrlo male koncentracije bojila (1 mg L^{-1}) bit će jasno vidljive u vodi prirodnog prijemnika (Couto, 2009; Gonçalves i sur., 2000; O'Neill i sur., 1999). Prisutnost bojila u vodi smanjuje prodor svjetlosti u prijemnik ometajući pri tome proces fotosinteze i negativno utječući na koncentraciju kisika (Malik i Grohmann, 2011). Nadalje, mnoge komponente bojila pokazale su toksičan, mutagen i kancerogen učinak na vodeni ekosustav (Eichlerová, 2005). Sintetska bojila konstruirana su s ciljem da budu otporna na degradaciju, stoga ne čudi što mnoge metode nisu učinkovite pri uklanjanju bojila iz efulenta. Konvencionalne metode, koje se koriste u obradi otpadnih voda, su kemijske (koagulacija ili flokulacija kombinirano sa filtracijom, flotacijom) te fizikalne (obično obuhvaćaju membranske procese te adsorpciju). Premda su konvencionalne metode efikasne pri separaciji bojila od vode, osim što su izrazito skupe, imaju niz problema i nedostataka te često stvaraju dodatan otpad kojega je potrebno zbrinuti na odgovarajući način. Dobra alternativa konvecionalnim metodama su biološke metode pročišćavanja otpadnih voda, koje su relativno jeftine i ekološki prihvatljive. Biološke metode obuhvaćaju dekolorizaciju upotrebom gljiva ili drugih mikroorganizama, adsorpciju na živoj ili mrtvoj biomasi, te upotreba sustava za bioremedijaciju. U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja različitih sintetskih bojila na čvrstim supstratima pomoću gljiva bijelog truljenja roda *Trametes*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bojila

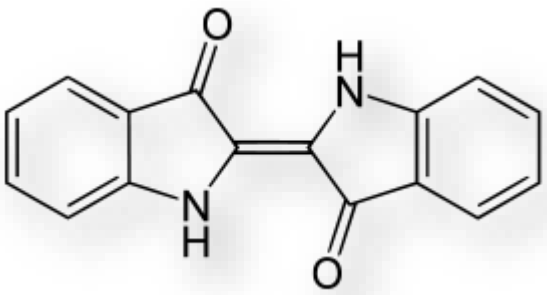
Boja je oduvijek fascinirala čovjeka, kako zbog estetskih, tako i društvenih razloga. Još od davnina ljudi su znali pripremati bojila koristeći razne biljke, životinje i minerale. Prve bojane tkanine zabilježene su još u prapovijesnom dobu, a bojila za njih spravljala su se od plodova voća, latica cvijeća, kore drveta i korijenja (Gürses i sur., 2016). Kroz povijest boje i pigmenti (**Slika 1**.) predstavljalju glavno sredstvo razmjene, ali i vodeće sredstvo zarade bogatih.



Slika 1. Pigmenti

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

Proizvodnja gotovo svih komercijalnih proizvoda uključuje primjenu neke boje, u najmanje jednoj od faza proizvodnje. Danas se koristi više od 9000 raznih bojila s preko 50000 trgovačkih imena (Encyclopædia Britannica, 2015). Ona se najviše koriste u industrijama kao što su tekstilna, kožna, farmaceutska, prehrambena, papira i celuloze, elektromaterijala itd. (Maurya i sur., 2006). Bojilo se može definirati kao tvar koja daje boju supstratu na koji je aplicirana. Prema podrijetlu, bojila se dijele na prirodna i sintetska (Gudelj i sur., 2011). Sve do 1850. godine gotovo sva bojila dobivala su se iz prirode (drveće, biljke, lišajevi, kukci) (Encyclopædia Britannica, 2015). Najstarije poznato prirodno bojilo je indigo dobiveno iz lišća biljaka roda *Indigofera*. Proizvodilo se tako da su se svežnjevi lišća stavljali u posude s vrućom vodom pri čemu bi se kroz vremenski period od 10 do 15 sati iz lišća ekstrahirao gotovo bezbojan indoksil. Potom bi se mehaničkim djelovanjem (veslima), uz prisutnost zraka, oksidacijom indoksila dobivalo indigo (**Slika 2**.) (Clark i sur., 1993).



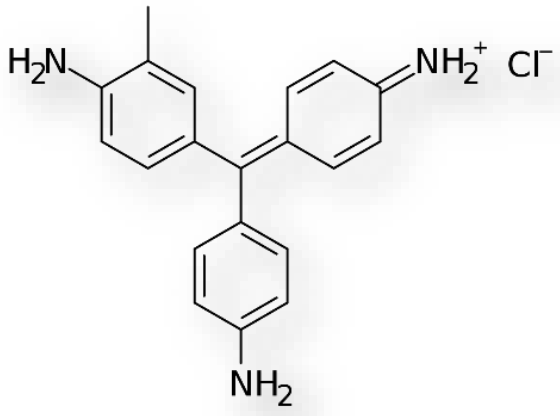
Slika 2. Strukturna formula indigo bojila

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

1856. godine britanski kemičar William Henry Parkin bio je prvi koji je uspješno sintetizirao bojilo. Naime, pokušavajući sintetizirati lijek protiv malarije iz anilina je slučajno sintetizirao mauvein (svijetlo ljubičasto bojilo). Ovo otkriće, te industrijska revolucija igraju ključnu ulogu u razvoju i komercijalizaciji sintetskih bojila (Encyclopædia Britannica, 2015). Danas su sintetska bojila gotovo potpuno zamjenila prirodna stoga što je sam proces sinteze jeftin i što je moguće pripremiti veliku paletu raznolikih nijansi boja. Sintetska bojila klasificiramo kao azo, antrakinonska, heterociklična, trifenilmetanska i ftalocianinska (Erkurt, 2007). Posebno velik zagađivač je tekstilna idustrija zbog upotrebe velike količine azo bojila, koja su vrlo toksična te se izrazito teško uklanjaju kemijskim, fizikalnim ili biološkim metodama (Seyis i Subasioglu, 2008; Sadhasivam i sur., 2005). Azo bojila pripadaju u veliku skupinu bojila koja u svojoj molekularnoj strukturi sadrže dušik u obliku azo funkcionalne skupine (−N=N−). Više od polovice komercijalnih bojila danas pripada ovoj skupini. Ovisno o kemijskim svojstvima, ova bojila se dijele u nekoliko skupina definirana vlaknima za koja imaju afinitet ili metodama kojima se primjenjuju (Encyclopædia Britannica, 2015). Trifenilmetanska bojila karakterizira izuzetna briljantnost te intenzivna obojenost. Molekularna struktura im se temelji na ugljikovodiku trifenilmetanu zbog čega imaju slabu otpornost prema svjetlosti i kemijskim izbjeljivačima. Uglavnom se koriste u kopiranju papira, hektografskim i tiskarskim tintama, ali i u tekstilnoj industriji. Raspon boja im nije potpun, ali uključuje crvene, ljubičaste, plave i zelene nijanse (Encyclopædia Britannica, 2015).

2.1.1. Fuksin

Perkinovo slučajno otkriće mauveina iz anilina motiviralo je kemičare diljem svijeta da ispitaju oksidacijska svojstva anilina s nizom drugih reagensa. Negdje između 1858. i 1859. godine, francuski kemičar François-Emmanuel Verguin otkrio je da reakcija anilina s kositrovim (IV) kloridom daje ružičasto bojilo koje naziva fuksin. Fuksin je prvo bojilo trifenilmetanskog reda i njegovim otkrićem se pokreće druga faza u komercijalizaciji industrije sintetskih bojila (Encyclopædia Britannica, 2015). U čvrstom stanju fuksin je sjajno zelene boje, a njegova kemijska formula je $C_{20}H_{21}ClN_3$ (**Slika 3**.). Danas se fuksin koristi kao bojilo za tekstil kao što je pamuk, umjetna vlakna, koža i papir (Lan i sur., 2013). Koristi se još u medicini i mikrobiološkim istraživanjima pri bojanju kolagena, tkiva, mitohondrija (Gupta i sur., 2007; Luna 1968). Gutanje i/ili udisanje ovog bojila može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme gastrointestinalnog sustava, mučnine, povraćanje te iritacije respiratornog sustava. Trajnim izlaganjem fuksin uzrokuje oštećuje živčani sustav. Također, utvrđeno je da na ljude i životinje ima kancerogeno i mutageno djelovanje (Gupta i sur., 2007; Puglisi i sur., 2017).



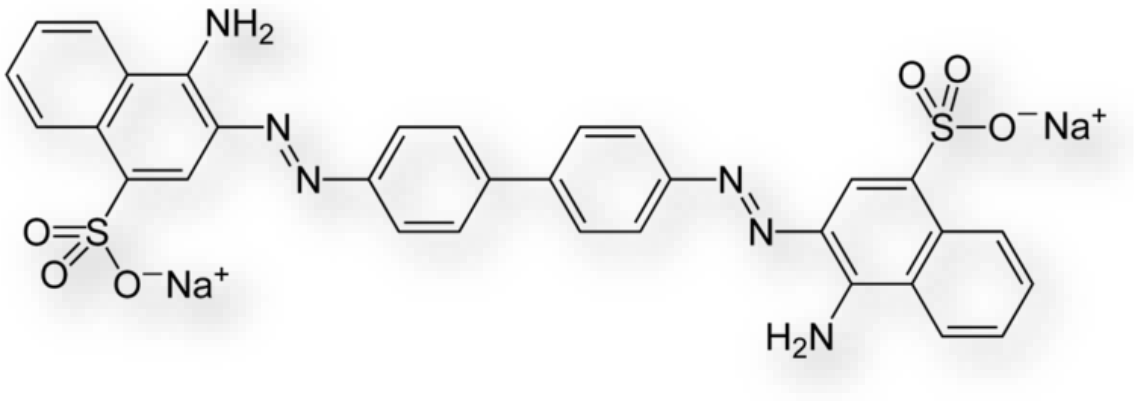
Slika 3. Strukturna formula fuksina

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

2.1.2. Kongo crvenilo

Kongo crvenilo je prvo bojilo direktnog tipa, tj. ne zahtjeva dodatna sredstva kako bi se fiksirao za vlakna. Otkriveno je 1884. godine, a pripada azo bojilima sintetiziranih iz benzidina. Nekoć se koristilo za bojanje pamuka, ali je potisnuto bojilima otpornijim na ispiranje i svjetlost. Danas se, još uvijek, koristi u histologiji za mikroskopska ispitivanja i u mikrobiologiji

kao indikator jer pri kiselim pH uvjetima prelazi u plavu boju, dok je pri lužnatim uvjetima crven (Encyclopædia Britannica, 2015). Također, kongo crvenilo se najčešće nalazi u efluentu industrija papira i printanja, ali i u raznim industrijama bojanja tekstila i kože u čijim efluentima zaostaje i do čak 15% (Chatterjee, 2009; Han i sur., 2008). Benzidin, na kojega se ovo bojilo u prirodi razgrađuje, ima karcenogeno djelovanje na ljude, dok izravno izlaganje bojilu moze uzrokovati alergijske reakcije (Chatterjee, 2009). Kongo crvenilo je topivo u vodi, a u čvrstom stanju je prah smeđe-crvene boje. Njegova kemijska formula je $C_{32}H_{22}O_6N_6S_2Na_2$ (**Slika 4**.).

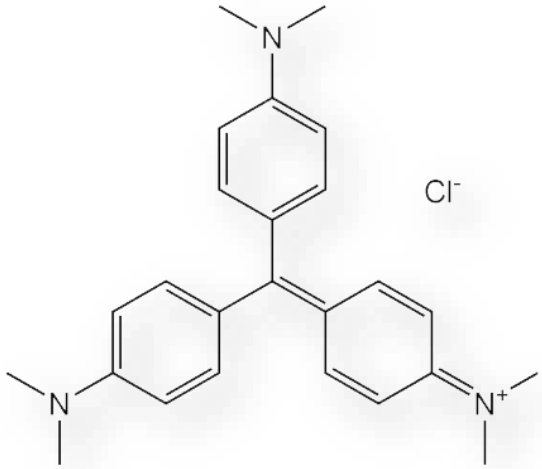


Slika 4. Strukturna formula konga crvenog

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

2.1.3. Kristal violet

Kristal violet pripada trifenilmetanskim bojilima kemijske formule $C_{25}H_{30}N_3Cl$ (**Slika 5**.). Također je poznat pod imenima gencijan violet ili metil violet 10B. Koristi se kao pH indikator, a boju iz ljubičaste u žutu mijenja pri pH 1.6. Također, koristi se za bojanje mikrobioloških preparata po Gramu (Mittal i sur., 2009). Štetne količine se u organizam mogu unjeti udisanjem i gutanjem, ali se može apsorbirati i preko kože. Također, poznato je da kristal violet može trajno oštetiti rožnicu, a u ekstremnim slučajevima uzrokovati i trajnu sljepoću (Ahmad, 2009).



Slika 5. Strukturna formula kristal violeta

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

2.2. Utjecaj bojila na zdravlje i okoliš

Dva posto od ukupne proizvodnje sintetskih bojila izravno se ispušta u vodene prijemnike, a naknadnih 10% u tijeku procesa bojanja iz raznih industrija koja koriste sintetska bojila. Ako se uzme u obzir da je godišnja prozivodnja bojila preko 7×10^5 tona, razmjer problema jasno je vidljiv (Pearce, 2003; Robinson i sur., 2001). U svijetu zagađivača vodenih tokova, uzimajući u obzir volumen i sastav efluenta, otpadna voda tekstilne idustrije na vrhu je ljestvice (Vandeviver, 1997). Povećana opća svijest o potencijalnim štetnim učincima industrijskih efluenata zasićenih raznim onečišćujućim tvarima, uključujući i bojila, učinila je javnost sve više osjetljivom na zaštitu okoliša (Gürses i sur., 2016; Yadav i sur., 2012). Iako je brza industrijalizacija najbolji način postizanja brzog gospodarskog rasta, ona izravno ili neizravno utječe na zdravlje ljudi ispuštanjem onečišćujućih tvari u prirodne recipijente. Nažalost, velika većina industrija svoje otpadne vode pročišćava tek konvencionalnim metodama (Gürses i sur., 2016; Karthik i sur., 2014). Molekule bojila u svojoj strukturi sadrže kromagen tj. aromatski spoj koji apsorbira vidljivu svjetlost i zaslužan je za vezanje bojila na vlakna u raznim procesima bojanja. Bojila se proizvode s namjerom da što manje degradiraju i stoga ne čudi da ih konvencionalne metode teško odstranuju. Te se metode oslanjaju na aerobnu degradaciju aktivnim muljem, no kako njihov učinak nije značajan, takav efluent ostaje obojen (Vandeviver, 1997). Općenito, efluenti tekstilne industrije su bazični, izrazito

neugodnog mirisa, visoke temperature i obojeni bojilima koja su se koristila u procesu proizvodnje. Neke od tvari koje se koriste u proizvodnji sintetskih bojila su toksična ili smanjuju razinu dostupnog kisika za floru i faunu vodenih ekosistema ugrožavajući time vodeni život i, općenito, narušavajući kvalitetu vode. Problemi koja bojila mogu uzrokovati u prirodi:

- Ovisno o vremenu izloženosti i koncentraciji, bojila mogu imati akutne i/ili kronične posljedice na izložene organizme.
- Čak su i male koncentracije bojila u vodi (manje od 1 mg L^{-1}) intenzivno vidljive.
- Najveći problem s bojilima u vodi je njihova sposobnost refleksije sunčevih zraka koje ulaze u vodu. Na taj način se ometa prirodni ciklus fotosinteze vodenog bilja narušavajući prehrambeni lanac.
- Bojila se, zbog svoje visoke termalne i fotostabilnosti, dugo zadržavaju u prirodi
- Mnoga su bojila i njihovi razgradni produkti kancerogeni, mutageni i/ili toksični za organizme. U prirodu, najčešće, dospjevaju industrijskim efluentima. Uočena je češća pojava karcinoma bubrega, mokraćnog mjehura i jetre kod radnika u doticaju sa bojlima.
- Uzrokuju respiratorne bolesti i alergije poput kontaktnog dermatitisa, iritacije očiju i kože, iritacije sluznica i respiratornog trakta (Gürses i sur., 2016).

2.3. Metode uklanjanja bojila iz otpadnih voda

Niz zakonskih propisa iz područja zaštite okoliša osiguravaju zaštitu i očuvanje kakvoće površinskih i podzemnih voda te obvezuju proizvođače koji u proizvodnom procesu koriste bojila da ista uklone iz otpadnih voda, prije ispuštanja u prirodne prijemnike. Tako Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda Prilog 5. (Granične vrijednosti emisija otpadnih voda iz objekata i postrojenja za proizvodnju i preradu tekstila) navodi da u površinskim vodama i sustavu javne odvodnje ne smiju biti prisutna bojila (NN 80/13). Međutim, obrada otpadne vode koja sadrži bojilo i druge otpadne tvari nije jednostavna. Širok raspon pH vrijednosti, visoke koncentracije soli i drugih kemikalija samo su neki od problema. Tehnologije uklanjanja bojila iz otpadnih voda dijele se u iduće kategorije: biološke, kemijske i fizikalne (Karthik i sur., 2014; Robinson, 2001). Sve one imaju svoje prednosti i nedostatke,

te niti jedna metoda samostalno najčešće nije prikladna u obradi otpadne vode, zbog čega se često koriste u kombinaciji.

2.3.1. Kemijske metode

Kemijske metode uključuju koagulaciju ili flokulaciju, kombinirano s flotacijom i filtracijom, precipitacija-flokulacija sa Fe(II)/$Ca(OH)_2$, elektroflotacijom, elektrokinetičkom koagulacijom, konvencionalne metode oksidacije s oksidativnim agensima (ozon) te zračenjem ili elektrokemijskim procesom. Ove metode su, načelno, vrlo skupe, premda se njima boja iz efluenta djelotvorno uklanja, akumulacija koncentriranog mulja stvara problem u odlaganju istog. Također, postoji mogućnost stvaranja sekundarnih onečišćivača zbog prekomjernog korištenja kemikalija. Pojavile su se i nove tehnike poznate kao napredni oksidativni procesi, koji se temelje na stvaranju vrlo snažnog oksidirajućeg agensa, kao što je hidroksil radikal, koje uspješno degradiraju štetne tvari u vodi. Iako se ovim metodama uspješno uklanjaju bojila iz vode, zbog svoje cijene komercijalno su neprivlačne. Visoka razina potrošnje elektirčne energije i kemijskih reagensa uobičajeni su problemi ovih metoda (Kyzas i sur., 2013).

2.3.2. Fizikalne metode

Pored kemijskih, rasprostranjene su i razne fizikalne metode poput procesa membranske filtracije (nanofiltracija, reverzna osmoza, elektrodijaliza) te tehnika adsorpcije. Glavni nedostatak membranskih procesa je činjenica da brzo dolazi do začepljenja membrana koje je potom potrebno mijenjati što smanjuje ekonomsku prihvatljivost ovog postupka. Adsorpcija je među najpopularnijim metodama za uklanjaje onečišćenja iz otpadne vode budući da pravilno provođenje procesa daje efluent visoke kakvoće. Adsorpcija predstavlja dobru alternativu za obradu otpadnih voda, pogotovo ako je adsorbens jeftin, te ga nije potrebno predhodno posebno tretirati. U vidu ponovnog iskorištenja vode, adsorpcija prednjači niskom početnom cijenom, fleksibilnošću, jednostavnošću vođenja procesa te neosjetljivošću na toksične kontaminante. Također, adsorpcija ne uzrokuje stvaranje sekundarnih onešišćivača (Kyzas i sur., 2013).

2.3.3. Biološke metode

Biološki tretman otpadnih voda ekonomski je najbolja alternativa u usporedbi s kemijskim i fizikalnim metodama. Metode biodegradacije, kao što su fungalna dekolorizacija, mikrobna degradacija, adsorpcija na živu ili inaktiviranu mikrobnu biomasu te sustavi za bioremedijaciju, mogu se koristiti pri obradi industrijskih efluenata, jer mnogi mikroorganizmi (bakterije, gljive) imaju sposobnost razgradnje raznih onečišćivala. Međutim, njihova je primjena često ograničena radi tehničkih poteškoća. Tretman biološkim metodama zahtjeva velike površine te je osjetljiv na vremenske promjene i toksičnost pojedinih kemikalija. Osim toga, premda se mnoge organske molekule razgrađuju u procesu, mnoge zaostaju zbog kompleksne molekularne strukture i sintetskog porijekla. To se osobito vidi na primjeru azo bojila (Kyzas i sur., 2013). Biološke metode remedijacije imaju potencijal pretvorbe, tj. razgrađivanja tvari koje onečišćuju okoliš do vode, ugljičnog dioksida te raznih anorganskih soli. Dakle, biološkim se metodama, unazad nekoliko godina, zbog povoljnog djelovanja na okoliš, posvećuje posebna pozornost.

Gljive bijelog truljenja najučinkovitiji su mikroorganizmi pri uklanjanju sintetskih bojila iz efluenta raznih industrija, ali i drugih organskih onečišćivala. To im omogućava jedinstvena sposobnost enzimske razgradnje lignina. Osim lignina, gljive bijelog truljenja mogu razgraditi i složene spojeve koje se također mogu naći u efluentu poput škroba, pektina, lignoceluloze. U razgradnji ovih spojeva koriste lignolitičke enzime koji kataliziraju oksidacijsku depolimerizaciju, odnosno razgradnju lignina. Glavni enzimi u razgradnji lignina su lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP) i lakaze (Lacc) (Toh i sur., 2003). Gljive bijelog truljenja ove enzime proizvode kao sekundarne metabolite. Obzirom da oksidacija lignina katalizira pretvorbu, tj. razgradnju aromatskih bojila (precipitacijom ili otvaranjem aromatskih prstena), gljive bijelog truljenja ne zahtjevaju dodatne izvore energije (Husain, 2010). Sinteza te izlučivanje tih enzima potaknutno je nedostatkom uobičajenih izvora energije poput ugljika i dušika (Barr i Aust, 1994). U svrhu znanstvenih istraživanja najčešće se koriste gljive zbog njihove otpornosti na toksično djelovanje visoke koncentracije onečišćivala, premda se u svrhu biološkog pročišćavanja mogu upotrebljavati i razni drugi mikroorganizmi (Sardrood i sur., 2013).

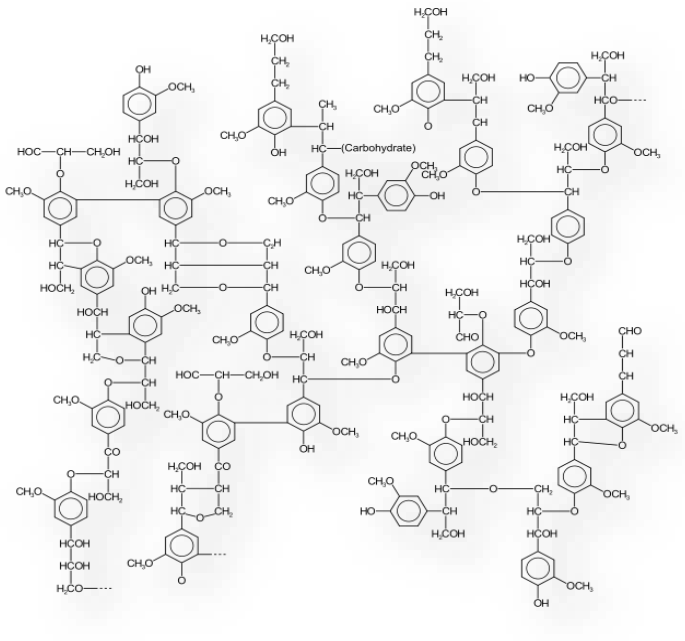
2.4. Gljive

Gljive (fungi) su posebna skupina organizama koja obuhvaća približno 250 000 vrsta, koje uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, tzv. mesnate gljive (Duraković, 2003). Svaka vrsta gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina (razreda) koji se razlikuju prema vrsti spora, morfologiji hifa i spolnom ciklusu: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes*. Za identifikaciju i klasifikaciju gljiva potrebno je poznavati način razmnožavanja gljiva, tip micelija i nastanak staničnih struktura (Duraković, 2003). Gljive su eukariotski, heterotrofni organizmi, a mogu živjeti kao: paraziti, saprofiti i simbionti. Zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu. Uglavnom za svoj rast trebaju blago kisele supstrate, zbog čega su česti paraziti na biljkama (Miličević, 2006). Gljive mogu biti jednostanične ili višestanične. Kvasci su jednostanične gljive, dok su plijesni i više gljive predstavnici višestaničnih gljiva. Karakterizira ih filamentozan rast u oblik hifa (stanične tvorevine nitastog oblika) čiji ukupan obim nazivamo micelij (Duraković, 2003).

Filamentozne gljive koriste se u biotehnološkim procesima za proizvodnju primarnih i sekundarnih metabolita, antibiotika, enzima, polisaharida i vitamina (Borrás i sur., 2008).

2.4.1. Gljive bijelog truljenja

Poznate su mnoge vrste gljiva, no samo neke od njih imaju sposobnost razgradnje i mineralizacije glavnih sastavnica (polimera) drva - celuloze, hemiceluloze i lignina (**Slika 6**.). Gljive koje imaju sposobnost razgradnje drva (gljive truležnice) dijele se na gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja, ovisno o karakteristikama drva koje razgrađuju i razgradnih produkata nastalih razgradnjom lignoceluloznih sastavnica (Sigoillot i sur., 2012). Razgradnja polimera odvija se djelovanjem različitih hidrolitičkih i oksidativnih enzima koje ove gljive sintetiziraju, pri čemu su najvažniji izvanstanični enzimi esencijalni za razgradnju lignina: lignin peroksidaza, mangan peroksidaza i lakaza (Elisashavili i sur., 2009).



Slika 6. Strukturna formula lignina

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

Ovisno o redoslijedu razgradnje polimera drveta, utvrđena su dva načina bijelog truljenja: simultano i selektivno truljenje (Mahajan, 2011; Liese, 1970). Simultano bijelo truljenje karakterizira simultana razgradnja svih sastavnica u početnim i završnim fazama bijelog truljenja. Primjeri gljiva sa sposobnošću simultanog bijelog truljenja su *Fomes fomentarius*, *Phellinus robustus*, *Trametes versicolor* (Mahajan, 2011; Blanchette, 1994; Blanchette, 1984). Selektivno bijelo truljenje karakterizira razgradnja lignina i hemiceluloze u početnim fazama truljenja, pri čemu celuloza ostaje netaknuta. Tek u kasnijim fazama dolazi do razgradnje celuloze. *Ceriporiopsis subvermispora* i *Phlebia radiata* su ponajbolje istražene gljive koje se ubrajaju u ovu skupinu (Mahajan, 2011; Fackler i sur., 2010; Blanchette, 1991; Eriksson, 1977).

2.4.2. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor (**Slika 7**.) jedna je od najbolje istraženih gljiva bijelog truljenja (Jönsson i sur., 1977). Naziva se još i „puranov rep“ jer njezino plodno tijelo sliči istom. Pripada skupini *Basidiomycetes* i proizvodi lignolitičke enzime kojima učinkovito razgrađuje lignin,

policiklične aromatske ugljikovodike (PAH), poliklorirane bifenile (PCB) i mnoga sintetska bojila (Barreto i sur., 2006). Također, utvrđena je njezina sposobnost adsorpcije teških metala (Jarosz-Wilkolazka i sur., 2001). Njezina upotreba nije ograničena samo na ekologiju, u medicini je iz njezinog polisaharopeptida razvijen uspješan lijek u borbi protiv karcinoma i bolesti imunodeficijencije (Wang i sur., 2017).



Slika 7. *Trametes versicolor*

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

2.4.3. *Trametes gibbosa*

Trametes gibbosa (**Slika 8**.) je gljiva bijelog truljenja koja pripada skupini *Basidiomycetes*. U mezofilnim uvjetima proizvodi lignolitičke enzime kojima uspješno degradira sintetska bojila (Adanan i sur., 2014). U prirodi je lako prepoznatljiva jer joj je plodno tijelo prekriveno zelenim obojenjem zbog prisutnosti algi. Spore ispušta na donjoj strani plodnog tijela kojeg karateriziraju izdužene tj. ovalne pore. Vrlo je kompetitivna i lako će prerasti druge gljive truležnice na većini susptrata (Johnsy i Kaviyarasan, 2011).



Slika 8. *Trametes gibbosa*

(http://www.rysch.com, 2017.)

2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija je proces u kojemu mikroorganizmi koriste hranjive tvari, proizvode metabolite i provode druge fiziološke aktivnosti u aerobnim ili anaerobnim uvjetima. U tijeku procesa fermentacije nagomilava se željeni mikroorganizam ili metabolit (Chen, 2013). Fermentacija na čvrstim nosačima (eng. „Solid-state fermentation“, SSF) počela se koristiti još početkom ljudske civilizacije, najčešće je povezana s proizvodnjom hrane. Obuhvaća rast mikroorganizama na vlažnim i čvrstim supstratima u odsutnosti slobodne vode. Premda se kapljice vode mogu nalaziti između čestica susptrata ili se pojaviti kao tanak sloje vode na površini nosača, ipak najveći dio prostora ispunjava plinovita faza. Glavnina vode u sustavu apsorbirana je u čvrstom susptratu, a na taj način osiguran je rast, razvoj i metabolizam radnog mikroorganizma (Mitchell, 2006). Čvrsti nosači se dijele prema razgradivosti u dvije skupine: biorazgradivi nosači ili interni nosači. U biorazgradive nosače pripadaju razni usjevi (pšenične mekinje, sjemenke soje, itd.) ili otpadni materijal iz poljoprivrede i šumarstva (slama, nusprodukti u preradi šećerne repe, piljevina, itd.). Takvi nosači, uz ulogu fizikalne potpore za rast mikroorganizma, izvor su ugljika, dušika i drugih čimbenika rasta (Chen, 2013, Singhania i sur., 2010). Inertni nosači su porozne strukture, kemijski inertni i teško razgradivi djelovanjem mikroorganizama. Kao inertni nosači koriste se poliuretanska pjena, mikroporozna smola,

vermikulit i dr. Njihova uloga pri fermentaciji je isključiva fizikalna potpora, a mikroorganizmi hranjive tvari crpe iz tekućeg medija koji je raspršen u porozni nosač (Chen, 2013; Wu, 2006). Odabir pogodnog susptrata ovisi o nekoliko čimbenika koji su, uglavnom, povezani s troškovima i dostupnosti te stoga može uključiti probiranje nekoliko agro-industrijskih ostataka. Među tim faktorima najvažniji su veličina čestica nosača i razina vlage, tj. aktivitet vode. Manje čestice pružaju veću površinu za razvoj mikroorganizma, međutim, presitne čestice nosača uzrokuju aglomeraciju istog, time sputavajući respiraciju i aeraciju koje su ključne za pravilan rast mikroorganizma. Također, velike čestice nosača osiguravaju bolju respiraciju i aeraciju, ali ograničavaju površinu za rast (Pandey i sur., 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj ovog rada bio je istražiti sposobnost obezbojenja sintetskih bojila fuksina, kongo crvenila i kristal violeta novim, do sada neistraživanim, izolatima gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV8 i *Trametes gibbosa*. Istraživanja sposobnosti obezbojenja provodila su se u uvjetima uzgoja na na agarnim pločama. Nadalje, pomoću gljive koja je pokazala najbolje rezultate obezbojenja na agarnim pločama istražena je mogućnost uklanjanja bojila kongo crvenila s obojenog otpadnog lignocelulozno supstrata.

3.2. Materijali

3.2.1. Bojila

Za ovaj rad korištena su sljedeća bojila:

- fuksin (Serva, Njemačka)
- kongo crvenilo (Kemika d.d., Hrvatska)
- kristal violet (Kemika d.d., Hrvatska)

3.2.2. Mikroorganizmi

Za radni mikroorganizam korištene su gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (L.) i *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. Dobivene su iz privatne zbirke (Institute for Applied Mycology and Biotechnology, Celje, Slovenija) i izolirane na području Celja i Laškog (Slovenija). Gljive su uzgajane na krumpirovom agaru (Liofilchem, Italija) u trajanju od sedam dana pri 27°C. Kulture su čuvane u hladnjaku na +4°C. Kao inokulum u daljnjim pokusima korišteni su micelijski diskovi promjera 5 mm.

3.2.3. Kemikalije

- Krumpirov agar (Liofilchem, Italija)
- ABTS (Sigma, USA)
- $CuSO_4$ (Kemika d.d., Hrvatska)
- Glukoza (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)

- Amonij tartarat 99% (Acros, Španjolska)
- Kvaščev ekstrakt (Liofilchem, Italija)
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Kemika d.d., Hrvatska)
- NaCl (Kemika d.d., Hrvatska)
- CaCl2 (Kemika d.d., Hrvatska)
- $FeCl_3$ (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- $K_3[Fe(CN)_6]$ (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Lignin (Aldrich Chemistry, USA)
- Tiamin (Acros, Kina)
- Bromfenol modrilo (Fisher bioreagens, India/Belgija)
- Gvajakol 99% (Acros, Kina)
- KH_2PO_4 (Gram-mol d.o.o, Hrvatska)
- Karboksimetil celuloza (Aldrich, USA)
- Tehnički agar (Biolife, Italija)

3.2.4. Supstrat

Za eksperimente na čvrstim supstratima (Solid-state fermentation), kao supstrat, tj. neinertni nosač, korišten je pivski trop dobiven iz Osječke pivovare d.o.o. Prije korištenja trop je više puta ispiran vodovodnom vodom, do neutralnog pH, te osušen na zraku i samljeven na laboratorijskom mlinu (IKA Labortechnik, Njemačka). Kako bi se osigurala veličina čestica manja od 1mm korišteno je sito promjera 1mm.

3.3. Aparatura i pribor

3.3.1. Tehnička i analitička vaga

U radu su za vaganje korištene tehnička vaga (RADWAG,Tehnicaunitronik, tip: WPS 1200, Njemačka) te analitička vaga (Shimadzu AW220, Japan).

3.3.2. Autoklav

Za sterilizaciju hranjivih podloga, susptrata i laboratorijskog posuđa korišten je autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Srbija).

3.3.3. Vodena kupelj

Sterilne agarne podloge termostatirane su na 50°C u vodenoj kupelji (GFL Gesellshaft für labortechnik D-30938, Germany).

3.3.4. Vibrirajući mješač

Za homogenizaciju podloga i otopina korišten je vibrirajući mješač (Vibromix 10, Tehtnica, Slovenija).

3.3.5. Mikrobiološki zaštitni kabinet

Kako bi se osigurala sterilnost pri radu korišten je mikrobiološki zaštitni kabinet.

3.3.6. Termostat

Za inkubaciju radnih mikroorganizama korišten je termostat (Termo medicinski aparati, BTEST, Bodalec Havoić, Hrvatska).

3.3.7. Digitalno pomično mjerilo

Za mjerenje promjera kolonije i zone obezbojenja na agarnim pločama korišteno je digitalno pomično mjerilo.

3.3.8. Laboratorijski mlin

Za mljevenje pivskog tropa korišten je laboratorijskom mlinu (IKA Labortechnik, Njemačka).

3.3.9. Analizator vlage

Za određivanje udjela suhe tvari i vlage supstrata korišten je halogeni analizator vlage (HR73 „Moisture Analyzer", Mettler Toledo, Švicarska).

3.3.10. Uređaj za destilaciju i titraciju

Za određivanje proteinskog dušika korišten je uređaj za destilaciju i titraciju (KjeltecTM 2300 Analyzer Unit, FOSS Analytical, Danska).

3.3.11. Kromametar

Za određivanje boje pivskog tropa korišten je kromametar (Konica Minolta CR400, Japan).

3.4. Metode

3.4.1. 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 90mm. Ovako pripremljene podloge nacijepljene su micelijskim diskovima (5 mm) radnih mikroorganizama. Inkubacija je trajala 7 dana pri 27°C. Micelijski diskovi ovako pripremljenih kulture korišteni su dalje kao inokulum u kvalitativnim testovima za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti u 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 (nenacijepljena podloga s dodatkom indikatorskih spojeva za kvalitativne testove enzimske aktivnosti, odnosno bojila za testove obezbojenja).

3.4.2. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva

3.4.2.1. 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).

Pripremljena je osnovna podloga:

- 5 g L^{-1} amonij tartarata
- 1 g L^{-1} KH_2PO_4
- 0,5 g L^{-1} $MgSO_4 \times 7H_2O$
- 0,001 g L^{-1} $CaCl_2$
- 0,1 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta.

U 500 mL pripremljene osnovne podloge za uzgoj dodano je 10 g karboksimetil-celuloze i 8 g tehničkog agara. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121°C tijekom 15 min, te nakon hlađenja na 45°- 50°C razlivena u laminaru u Petrijeve zdjelice (po 20 mL). Nakon hlađenja podloge su nacjepljene micelijskim diskovima promjera 5 mm 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom stavljene na inkubaciju pri 25 °C, 2 – 5 dana (do porasta oko 30 mm). Nakon što su radni mikroorganizmi porasli do potrebnog promjera, podloge su 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 potvrđuje razgradnju CMC i aktivnosti endoglukanaza, dok je nerazgrađena CMC zadržala crveno obojenje.

3.4.2.2. Lignolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-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).

Za pripremu 500 mL osnovne podloge za uzgoj odvagano je 21 g krumpirovog agara i dodano 500 mL destilirane vode. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu na 121°C tijekom 15 min. Nakon sterilizacije, podlogu je potrebno ohladiti na 65°C, te sterilno dodati 5 mL otopine ABTS-a koncentracije 0,2 mmol L^{-1} i 0,5 mL otopine $CuSO_4$ koncentracije 100 mmol L^{-1}. U laminaru je zatim sterilno razliveno po 20 mL podloge u svaku Petrijevu zdjelicu. Nakon hlađenja podloge su nacjepljene s micelijskim diskovima promjera 5 mm 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom inkubirane 24-48 sati u termostatu pri temperaturi od 27°C. Aktivnost lakaze potvrdila je pojava zelenog do ljubičastog obojenja oko zone rasta micelija.

3.4.2.3. 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).

Za pripremu 500 mL podloge za uzgoj odvagano je 21 g krumpirovog agara i dodano 500 mL destilirane vode, te gvajakol u koncentraciji 0,01%. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121°C tijekom 15 min, te nakon hlađenja na 45°- 50°C razlivena u laminaru u Petrijeve zdjelice (po 20 mL). Nakon hlađenja podloge su nacjepljene s micelijskim diskovima promjera 5 mm 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom stavljene na inkubaciju u termostat pri temperaturi od 27°C, do pojave narančasto-smeđeg obojenja oko zone rasta micelija koja potvrđuje aktivnost lakaze.

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

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

Za pripremu 500 mL podloge za uzgoj odvagano je 21 g krumpirovog agara, dodano 500 mL destilirane vode i bromfenol modrilo u koncentraciji od 0,2 g L^{-1}. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121°C tijekom 15 min, te nakon hlađenja na 45°-50°C razlivena u laminaru u Petrijeve zdjelice (po 20 mL). Nakon hlađenja podloge su nacjepljene s micelijskim diskovima promjera 5 mm 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom stavljene na inkubaciju u termostat pri temperaturi od 27°C, do obezbojenja modro plave boje podloge što potvrđuje aktivnost lakaze.

3.4.2.5. Lignolitička aktivnost: kvalitativni test sposobnosti razgradnje lignina

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

Za 500 mL hranjive podloge pripremljeno je:

- 20 g L^{-1} krumpirovog agara
- 5 g L^{-1} glukoze
- 5 g L^{-1} amonijevog tartarata
- 1 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta
- 0,5 g L^{-1} $MgSO_4 \times 7$ H2O
- 0,1 g L^{-1} NaCl
- 0,01 g L^{-1} $CaCl_2$
- 0,01 g L^{-1} $FeCl_3$
- 0,01 g L^{-1} lignina (Kraft)
- 1 mg L^{-1} tiamina

Podloga je potom sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121°C, 15 min, te nakon hlađenja na 45°- 50°C razlivena u laminaru u Petrijeve zdjelice (po 20 mL). Nakon hlađenja podloge su nacjepljene s micelijskim diskovima promjera 5 mm 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su potom stavljene na inkubaciju u termostat pri temperaturi od 27°C, do porasta gljiva od oko 30 mm promjera. Pripravljena su otopine $FeCl_3$ i $K_3[Fe(CN)_6]$, koncentracije 10 g L^{-1}, koje su zatim pomiješane 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 vidi se tamnozeleno obojenje, dok je na mjestima gdje je došlo do razgradnje lignina to obojenje vrlo slabo ili ga nema.

3.4.3. Testovi obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama

Odvagano je 8,4 g krumpirova agara i dodano 200 mL destilirane vode u Schottove bočice od 250 mL. Ovako pripremljene podloge su sterilizirane u autoklavu na temperaturi 121°C, 15 minuta, a potom ohlađene u termostatu na temperaturu od 50°C. Osnovne otopine bojila (stock) pripremljene su kako slijedi: 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**. U sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm razliveno je 20 mL podloge s dodatkom različitih koncentracija bojila. Nakon hlađenja podloge su nacjepljene s micelijskim diskovima promjera 5 mm 7 dana starih kultura gljiva. Podloge su zatim inkubirane u termostatu pri temperaturi od 27°C u trajanju od 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 pri 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

3.4.4. 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} kongo crvenila. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121°C kroz 15 min te nakon hlađenja na teperaturu 45°-50°C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja podloge su nacjepljene s micelijskim diskovima promjera 5 mm (7 dana starih kultura) radnog mikroorganizma. Podloge su zatim stavljene na inkubaciju u termostat pri temperaturi od 27°C tijekom 7 dana. Nakon toga, gljiva je s podloge s dodatkom 50 mg L^{-1} kongo crvenila, na gore opisan način, precijepljena na podlogu s dodatkom 100 mg L^{-1} bojila. 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, tako uzgojena kultura korištena je za inokulaciju.

Fermentacija na čvrstim nosačima. Uzgoj gljive *T. versicolor* TV8 na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom proveden je u staklenkamavolumena 750 mL. U svaku staklenku odvagano je 15 g supstrata te, kako bi se osigurala vlažnost od 60%, je dodano 20 mL otopine kongo crvenila koncentracije 150 mg L^{-1}. Staklenke su zatim sterilizirane u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta, potom ohlađene. Dva micelijska diska promjera 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 je takav inokulum dodan 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. Kako bi se osigurala aeracija u sustavu, na metalnim poklopcima staklenki probušena je rupa promjera 3 cm te je ista zatvorena akvarijskom vatom. Sadržaj staklenki dnevno je ručno izmiješan. Inkubacija na 27°C je trajala 21 dan. Nakon završene inkubacije, sadržaj staklenki je steriliziran te osušen u sušioniku na 80°C. U uzorcima prije i nakon provedenog uzgoja određeni su masa, udjel suhe tvari (vlažnost), proteinski dušik te boja.

3.4.5. 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).

3.4.6. 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. To je 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):

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

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 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 boje.

3.4.7. 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 ± 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 kocentrirane 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 svjetlo 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 na način da 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:

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

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

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)

3.4.8. 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

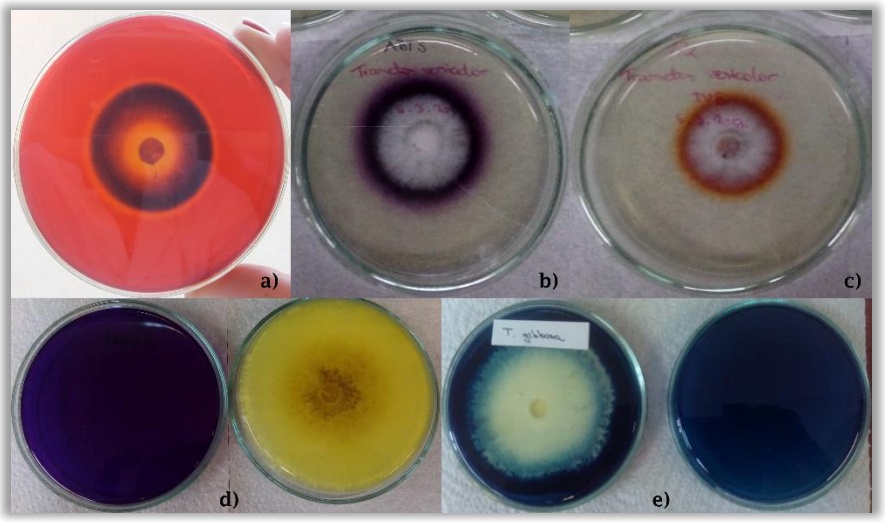
U slučaju kada se istražuje sposobnost gljiva za produkciju enzima odgovornih za razgradnju lignoceluloznih materijala te nije važna kvantifikacija enzima, već samo potvrda specifične enzimske aktivnosti enzima, kvalitativni testovi su se pokazali vrlo učinkovitima. Reagensi koji se primjenjuju u testovima su široko dostupni i jeftini, postupak je jednostavan, a rezultati se izražavaju samo kao pozitivni ili negativni (Pointing, 1999.).

Rezultati provođenja kvalitativnih testova za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljiva *T. versicolor* i *T. gibbosa*, korištenih u ovom istraživanju dani su u **Tablici 2**.

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

Radni mikroorganizam	**Celulolitička aktivnost**	**Lignolitička aktivnost**			
	CMC	***ABTS***	***Gvajakol***	***Bromfenol modrilo***	**Lignin**
Trametes versicolor	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
Trametes gibbosa	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**

Rezultat provođenja svih kvalitativnih testova za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti bio je pozitivan za obje istraživane gljive. Na **Slici 9.** prikazani su pozitivni rezultati svakog pojedinog testa, koji potvrđuju sposobnost produkcije enzima uključenih u razgradnju celuloze i lignina. Santos i Corso (2014) navode kako su najvažniji enzimi uključeni u proces biološke razgradnje bojila pomoću gljiva bijelog truljenja lignolitički enzimi, što gljive korištene u ovom istraživanju čini dobrim kandidatima za primjenu u bioremedijaciji primjerice obojenih otpadnih voda.



Slika 9. Rezultati kvalitativnih testova za određivanje enzimske aktivnosti:
a) obojenje agarne ploče s dodatkom karboksimetil-celuloze – svijetliji žuti prsten oko kolonije ukazuje na celulolitičku aktivnost,
b) ljubičasto obojenje agarne ploče s dodatkom ABTS-a,
c) smeđe obojenje agarne ploče s dodatkom gvajakola,
d) obezbojenje agarne ploče s dodatkom bromfenol modrila, lijevo je abiotička kontrola,
e) test sposobnosti razgradnje lignina: lijevo je agarna ploča s gljivom koja pokazuje sposobnost razgradnje, desno je abiotička kontrola

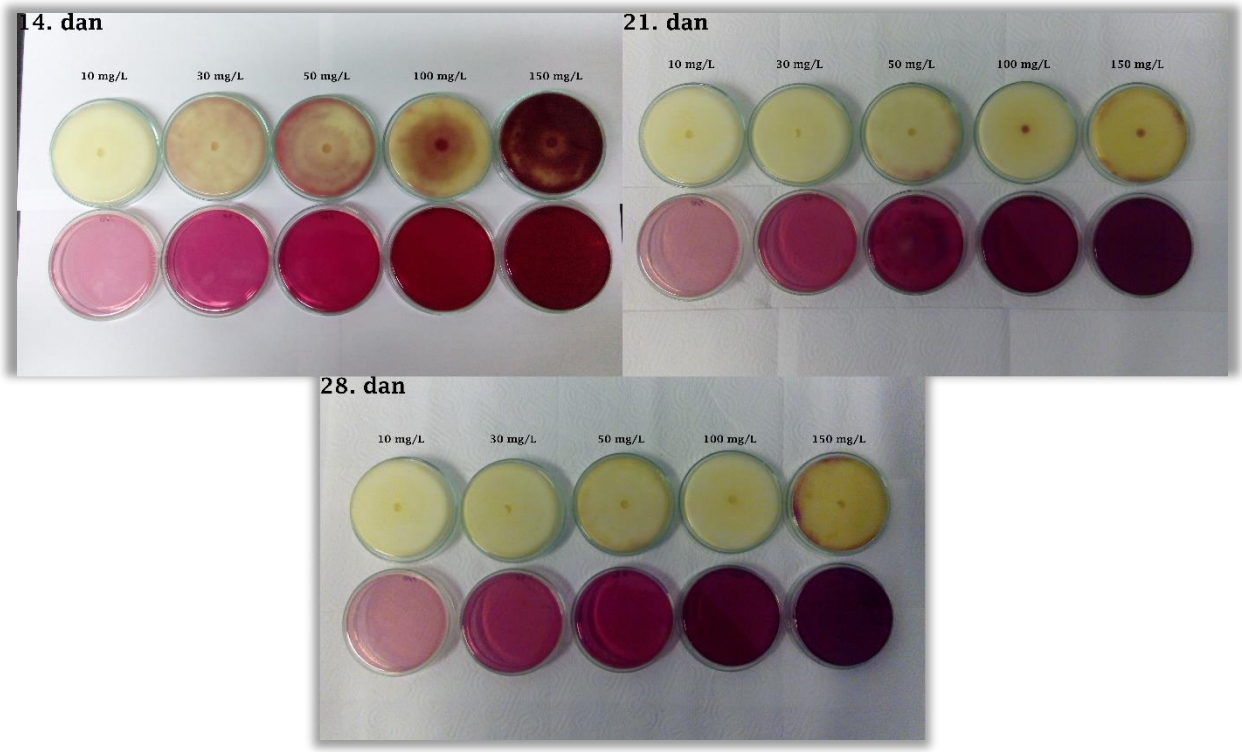
4.2. Istraživanje sposobnosti obezbojenja sintetskih bojila pomoću *T. versicolor* i *T. gibbosa*

U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila pomoću dvije gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (L.) i *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. Bojila odabrana za ovo istraživanje uključivala su fuksin, kongo crvenilo i kristal violet. Rast gljiva i sposobnost obezbojenja agarnih ploča s dodatkom ovih bojila prikazani su u **Tablicama 3. - 10.** te na **Slikama 10.-15.**

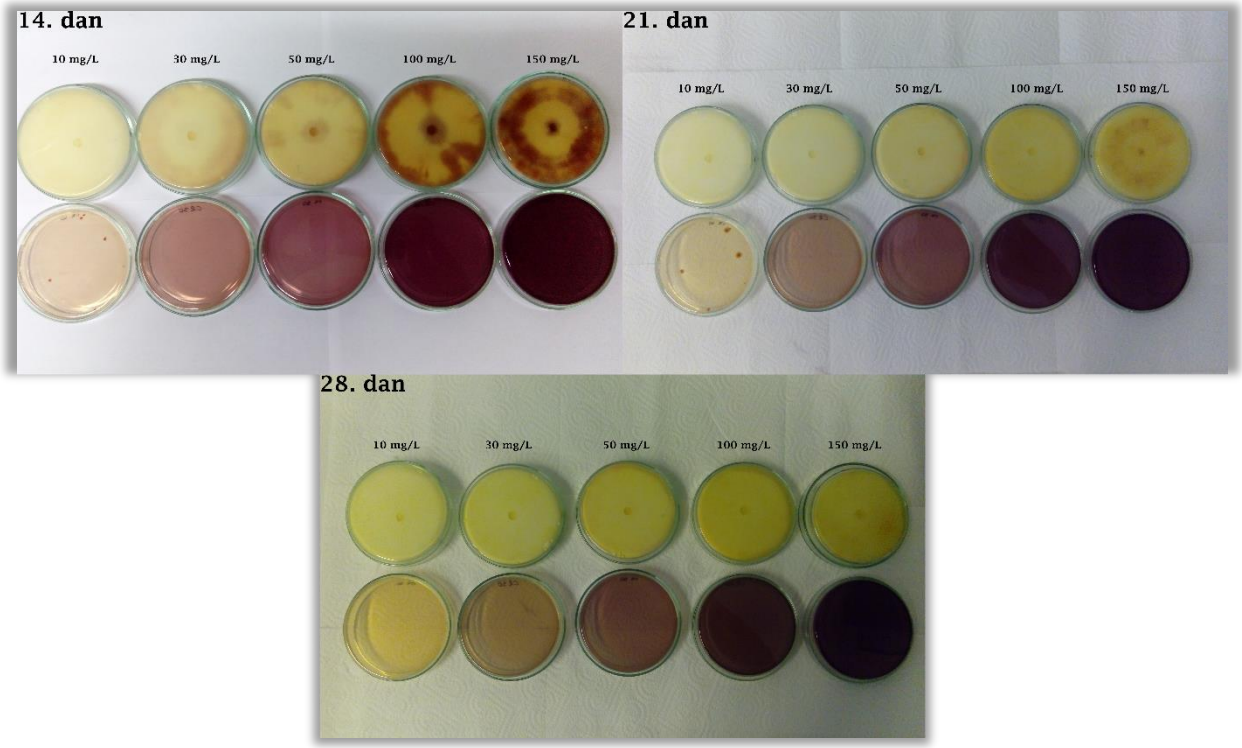
Tablice 3. i 4. pokazuju indeks obezbojenja u periodu od 2. do 14. dana uzgoja. Indeks obezbojenja se izražava kao omjer promjera obezbojenja (mm) i promjera kolonije (mm). Veća vrijednost indeksa obezbojenja ukazuje na bolju sposobnost gljive za razgradnju bojila, no pri tome treba uzeti u obzir i inhibiciju rasta mikroorganizma zbog dodatka bojila u podlogu (Jayasinghe, 2008).

Iz **Tablice 3.** vidljivo je kako je nakon 14 dana uzgoja gljiva *T. versicolor* potpuno obezbojila cijelu površinu Petrijeve zdjelice s dodatkom sva tri bojila pri najmanjoj koncentraciji od 10 mg L^{-1} te podloge s dodatkom kongo crvenila i pri koncentracijama 30 i 50 mg L^{-1}, pri čemu je indeks obezbojenja iznosio 1. U svim ostalim slučajevima došlo je samo do djelomičnog obezbojenja podloga. Iz statističke obrade rezultata rasta kolonija gljive *T. versicolor* na agarnim pločama s dodatkom bojila (**Tablice 5.-7.**) vidljivo je kako je dodatak fuksina i kongo crvenila u podlogu inhibirao rast ove gljive samo u prvim danima uzgoja, dok razlika u zoni rasta u odnosu na kontrolu u kasnijim danima uzgoja nije statistički značajna. Nasuprot tome, dodatak kristal violeta u podlogu za uzgoj snažno je inhibirao rast gljive *T. versicolor*, pri čemu su veće koncentracije bojila u većoj mjeri inhibirale rast kolonija. Ovo je u skladu s istraživanjima koje su proveli Eichlerová i suradnici (2006) koji su uzgajali gljive bijelog truljenja *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *T. versicolor* na podlozi s dodatkom kristal violeta u koncentracijama od 100 i 500 mg L^{-1} , što je za posljedicu imalo inhibiciju rasta ili potpuni izostanak rasta ovih gljiva.

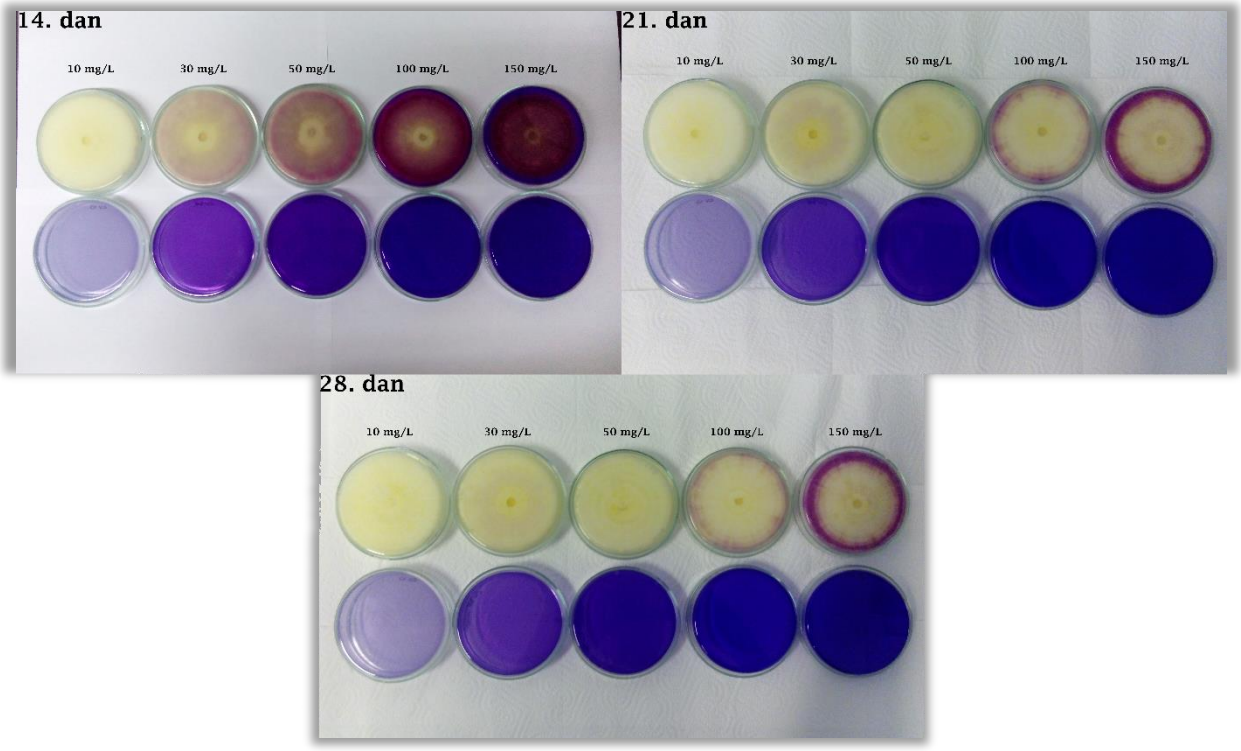
Iz **Slika 10.-12.** vidljivo je kako je nakon 28 dana uzgoja gljiva *T. versicolor* u potpunosti obezbojila cijelu površinu Petrijevih zdjelica s dodatkom kongo crvenila u svim odabranim koncentracijama te agarnih ploča s dodatkom fuksina i kristal violeta u svim koncentracijama, osim u najvećoj koncentraciji od 150 mg L^{-1}.



Slika 10. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom fuksina pomoću *T. versicolor*



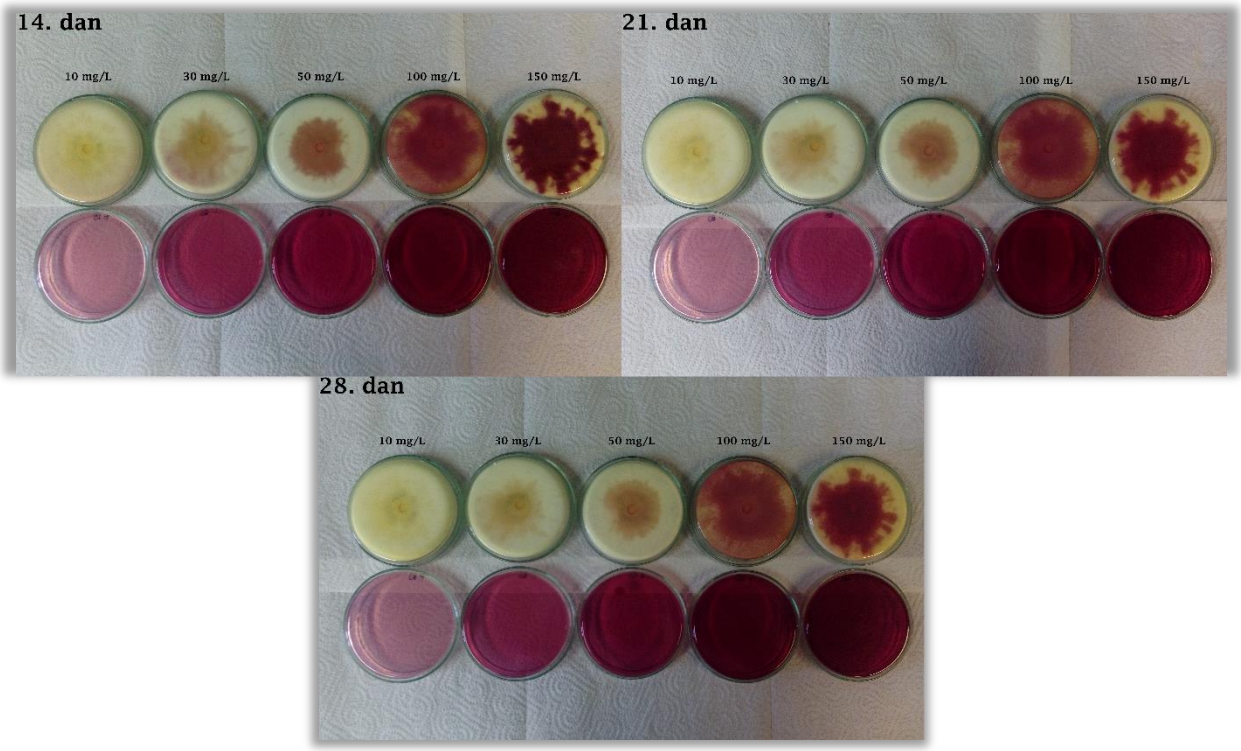
Slika 11. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila pomoću *T. versicolor*



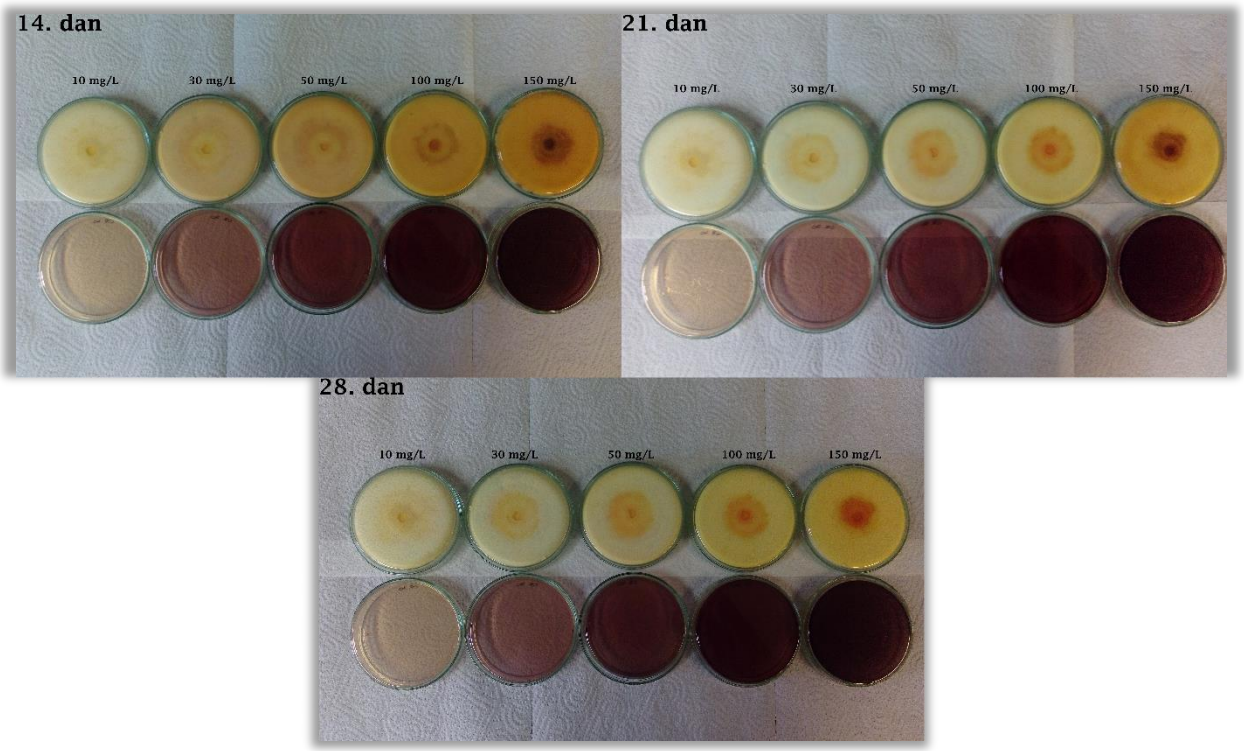
Slika 12. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kristal violeta pomoću *T. versicolor*

Tablica 4. daje prikaz indeksa obezbojenja fuksina, kongo crvenila i kristal violeta pomoću gljive *T. gibbosa*. Iz tablice je vidljivo kako su podloge s dodatkom svih bojila obezbojene u određenoj mjeri u svim primijenjenim koncentracijama, pri čemu su vrijednosti indeksa potpunog ili djelomičnog obezbojenja bile 1. Ovakav indeks obezbojenja ukazuje na dobru sposobnost obezbojenja. Ipak, u slučaju podloga s dodatkom kristal violeta gdje je primjećena značajnija inhibicija rasta gljive bojilom, nije došlo do potpunog (djelomičnog) obezbojenja cijele površine Petrijeve zdjelice, već samo dijela površine. **Tablice 8.-10.** prikazuju statističku obradu rezultata rasta kolonija gljive *T. gibbosa* na agarnim pločama s dodatkom bojila. Kao i u slučaju uzgoja *T. versicolor* na obojenim agarnim pločama, iz tablica je vidljivo kako dodatak fuksina i kongo crvenila u podlogu nije inhibirao rast gljive *T. gibbosa*, dok je dodatak kristal violeta u podlogu statistički značajno inhibirao rast gljive u odnosu na njezin rast na podlozi bez dodatka bojila. Povećanje koncentracije kristal violeta u podlozi rezultiralo je snažnijom inhibicijom rasta *T. gibbosa*. **Slike 13.-15.** pokazuju kako je nakon 28 dana uzgoja došlo do potpunog obezbojenja cijele površine agarne ploče s dodatkom kongo crvenila u svim

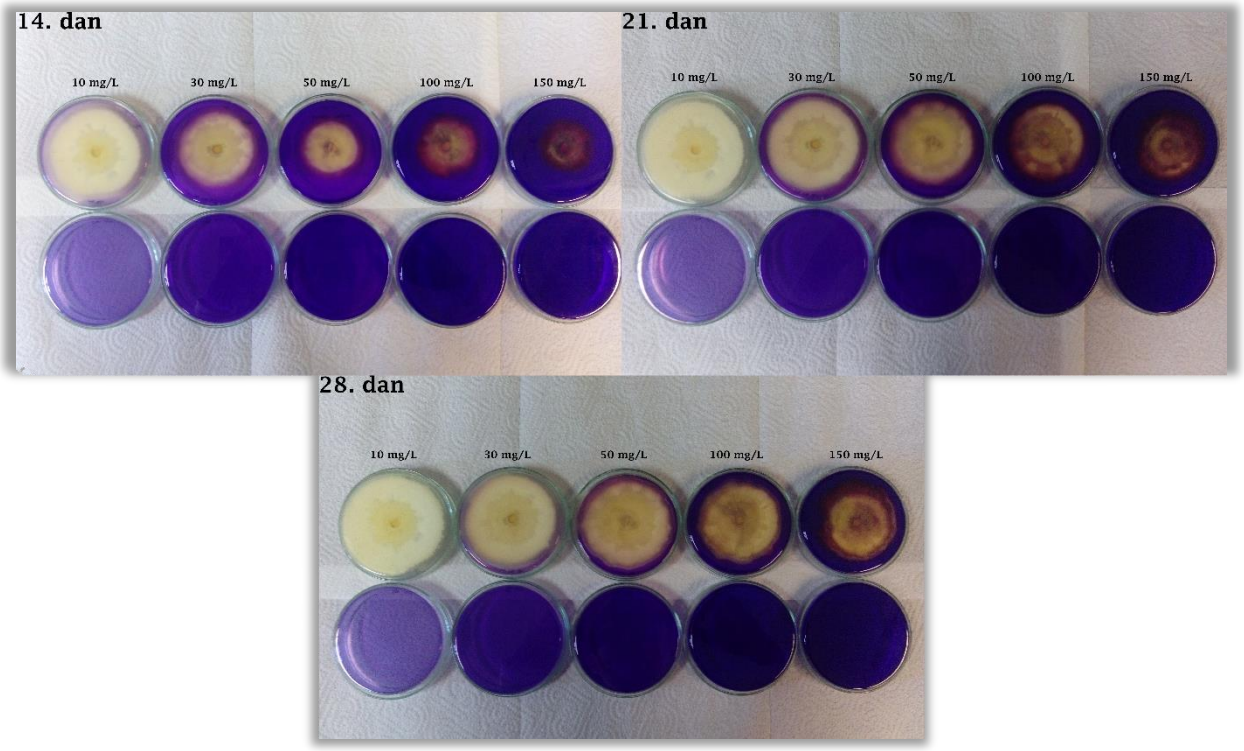
primijenjenim koncentracijama, osim 150 mg L^{-1}. Kongo crvenilo ubraja se u skupinu azo bojila koja su izuzetno teško biorazgradiva, podložna bioakumulaciji te predstavljaju prijetnju zdravlju ljudi i očuvanju okoliša zbog svojih kancerogenih, mutagenih i teratogenih svojstava (Gudelj i sur., 2011). Obje gljive pokazale su dobru sposobnost obezbojenja diazo bojila kongo crvenila. Nakon 28 dana uzgoja, podloge s dodatkom fuksina u potpunosti su obezbojene cijelom površinom za slučajeve kada je dodana koncentracija bojila iznosila od 10 do 30 mg L^{-1}. Samo podloge s dodatkom kristal violeta u koncentraciji od 10 mg L^{-1} bile su potpuno obezbojene cijelom površinom.



Slika 13. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom fuksina pomoću *T. gibbosa*



Slika 14. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila pomoću *T. gibbosa*



Slika 15. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kristal violeta pomoću *T. gibbosa*

Tablica 3. Indeks obezbojenja različitih bojila pomoću *T. versicolor*

Trametes versicolor															
γ_{bojila}/ mg L^{-1}	**Fuksin**					**Kongo crvenilo**					**Kristal violet**				
	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	0,45*	0,71*	0,90*	1,0	0,00	0,47	0,81	0,85	1,0	1,46*	1,03*	1,08*	1,04*	1,0
30	0,00	0,36*	0,65*	0,74*	1,0*	0,00	0,42	0,76	0,81	1,0	1,72*	1,07*	1,06*	1,02*	1,0*
50	0,00	0,33*	0,53*	0,67*	1,0*	0,00	0,42	0,67	0,70	1,0	1,68*	1,13*	1,08*	1,03*	1,0*
100	0,00	0,44*	0,64*	0,80*	1,0*	0,00	0,46	0,64	0,71	1,0	1,63*	1,27*	1,13*	1,02*	0,82*
150	0,00	0,31*	0,41*	0,61*	1,0*	0,00	0,44	0,63	0,57	1,0*	1,84*	1,41*	1,21*	1,06*	0,76*

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

Tablica 4. Indeks obezbojenja različitih bojila pomoću *T. gibbosa*

Trametes gibbosa															
γ_{bojila}/ mg L^{-1}	**Fuksin**					**Kongo crvenilo**					**Kristal violet**				
	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	0,61	0,85	1,0	1,0	1,0	0,44	1,0	1,0	1,0	4,29*	1,11	1,05	1,01	1,10
30	0,00	0,50	0,69	0,88	1,0	1,22*	0,51*	0,48*	1,0*	1,0*	3,93*	0,68	1,04	1,0	1,01
50	0,00	0,47*	0,70*	0,85*	1,0*	1,19*	0,52*	0,41*	1,0*	1,0*	4,28*	0,47	0,74	0,76	0,88
100	0,00	0,54*	0,70*	0,76*	1,0*	1,44*	0,52*	0,66*	1,0*	1,0*	0,00	1,67	0,70	0,76	0,79
150	0,00	0,00	0,55*	0,65*	1,0*	1,48*	0,38*	0,45*	0,98*	1,0*	0,00	1,86	1,32	1,01	0,83

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

Tablica 5. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom fuksina pomoću *Trametes versicolor*

	Trametes versicolor														
Fuksin	**0. dan**	**2. dan**		**4. dan**		**6. dan**		**8. dan**		**10. dan**		**12. dan**		**14. dan**	
γ_{bojila}/ mg L^{-1}	**ZR**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**
Kontrola	5,00	30,54 ^{a}	-	65,07 ^{a}	-	81,58 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-	90,00	-
10	5,00	28,69 ^{a}	0,00	60,52 ^{ab}	19,15* ^{a}	81,28 ^{a}	36,79* ^{a}	90,00 ^{a}	64,22* ^{a}	90,00	80,90* ^{a}	90,00	90,00* ^{b}	90,00	90,00 ^{b*}
30	5,00	26,72 ^{a}	0,00	60,29 ^{ab}	13,14 ^{b}	79,32 ^{a}	28,59 ^{ab}	90,00 ^{a}	58,15 ^{ab}	90,00	66,99 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00 ^{b}
50	5,00	27,96 ^{a}	0,00	59,45 ^{ab}	12,05 ^{b}	79,54 ^{a}	26,09 ^{ab}	90,00 ^{a}	47,94 ^{ab}	90,00	60,61 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00 ^{b}
100	5,00	23,78 ^{a}	0,00	53,29 ^{b}	0,00 ^{c}	78,37 ^{a}	34,39 ^{a}	86,67 ^{a}	55,88 ^{ab}	90,00	71,74 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}
150	5,00	23,86 ^{a}	0,00	52,33 ^{b}	0,00 ^{c}	73,22 ^{a}	22,83 ^{b}	86,72 ^{a}	35,73 ^{ab}	90,00	54,54 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}

ZR- zona rasta, DO- djelomično obezbojenje, * potpuno obezbojenje

Tablica 6. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila pomoću *Trametes versicolor*

	Trametes versicolor														
Kongo crvenilo	**0. dan**	**2. dan**		**4. dan**		**6. dan**		**8. dan**		**10. dan**		**12. dan**		**14. dan**	
γ_{bojila}/ mg L^{-1}	**ZR**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**
Kontrola	5,00	$30,54^{a}$	-	$65,07^{a}$	-	$81,58^{ab}$	-	$90,00^{a}$	-	90,00	-	90,00	-	90,00	-
10	5,00	$26,58^{ab}$	0,00	$59,12^{b}$	0,00	$82,37^{a}$	$38,89^{a}$	$90,00^{a}$	$72,78^{a}$	90,00	$76,53^{a}$	90,00	90,00	90,00	90,00
30	5,00	$24,63^{ab}$	0,00	$57,08^{b}$	0,00	$80,66^{ab}$	$33,90^{a}$	$90,00^{a}$	$68,60^{a}$	90,00	$72,83^{a}$	90,00	90,00	90,00	90,00
50	5,00	$24,57^{ab}$	0,00	$56,16^{b}$	0,00	$81,01^{ab}$	$34,42^{a}$	$90,00^{a}$	$60,42^{a}$	90,00	$63,11^{a}$	90,00	90,00	90,00	90,00
100	5,00	$25,65^{ab}$	0,00	$55,13^{b}$	0,00	$76,10^{b}$	$34,83^{a}$	$90,00^{a}$	$57,37^{a}$	90,00	$63,96^{a}$	90,00	90,00	90,00	90,00
150	5,00	$23,08^{b}$	0,00	$43,54^{c}$	0,00	$65,10^{c}$	$28,42^{a}$	$80,95^{b}$	$51,12^{a}$	90,00	$51,68^{a}$	90,00	90,00	90,00	90,00*

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje, * djelomično obezbojenje

Tablica 7. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kristal violeta pomoću *Trametes versicolor*

	Trametes versicolor														
Kristal violet	**0. dan**	**2. dan**		**4. dan**		**6. dan**		**8. dan**		**10. dan**		**12. dan**		**14. dan**	
γ_{bojila}/ **mg L^{-1}**	**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	5,00	16,95 ^{b}	0,00	34,97 ^{b}	0,00	53,34 ^{b}	0,00	64,79 ^{b}	0,00	79,87 ^{b}	0,00	90,00 ^{a}	90,00 ^{a}	90,00 ^{a}	90,00 ^{a}
30	5,00	13,65 ^{cd}	0,00	29,12 ^{bc}	0,00	45,62 ^{c}	0,00	62,36 ^{bc}	0,00	75,84 ^{c}	0,00	84,49 ^{b}	66,23 ^{b}	90,00 ^{a}	90,00* ^{a}
50	5,00	14,03 ^{c}	0,00	28,54 ^{c}	0,00	43,08 ^{c}	0,00	59,77 ^{c}	0,00	74,32 ^{c}	0,00	82,83 ^{c}	60,90 ^{c}	90,00 ^{a}	90,00 *^{a}
100	5,00	12,40 ^{cd}	0,00	22,03 ^{d}	0,00	36,72 ^{d}	0,00	51,25 ^{d}	0,00	65,40 ^{d}	0,00	75,28 ^{d}	50,75 ^{d}	84,87 ^{b}	69,53 ^{b}
150	5,00	11,49 ^{d}	0,00	20,05 ^{d}	0,00	31,82 ^{e}	0,00	45,28 ^{e}	0,00	58,70 ^{e}	0,00	68,62 ^{e}	0,00 ^{e}	79,48 ^{c}	60,49 ^{c}

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje, * djelomično obezbojenje

Tablica 8. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom fuksina pomoću *Trametes gibbosa*

	Trametes gibbosa														
Fuksin	**0. dan**	**2. dan**		**4. dan**		**6. dan**		**8. dan**		**10. dan**		**12. dan**		**14. dan**	
γ_{bojila}/ **mg L^{-1}**	**ZR**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**
Kontrola	5,00	14,37 ^{b}	-	50,93 ^{abc}	-	82,99 ^{ab}	-	90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-	90,00	-
10	5,00	21,89 ^{a}	0,00	51,37 ^{a}	30,44 ^{a}	81,65 ^{a}	50,18 ^{a}	90,00 ^{a}	76,84 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00
30	5,00	20,79 ^{a}	0,00	43,79 ^{bc}	15,13 ^{b}	79,29 ^{a}	39,39 ^{b}	90,00 ^{a}	62,43 ^{b}	90,00	79,61 ^{b}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00
50	5,00	20,54 ^{a}	0,00	49,04 ^{ab}	0,00 ^{c}	81,32 ^{a}	0,00 ^{c}	90,00 ^{a}	0,00 ^{c}	90,00	0,00 ^{c}	90,00	90,00 ^{a}	90,00	90,00*
100	5,00	19,76 ^{a}	0,00	44,59 ^{bc}	0,00 ^{c}	65,09 ^{c}	0,00 ^{c}	82,03 ^{b}	0,00 ^{c}	90,00	0,00 ^{c}	90,00	0,00 ^{b}	90,00	90,00*
150	5,00	17,72 ^{a}	0,00	41,59 ^{c}	0,00 ^{c}	65,76 ^{bc}	0,00 ^{c}	86,67 ^{ab}	0,00 ^{c}	90,00	0,00 ^{c}	90,00	0,00 ^{b}	90,00	90,00*

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje, * djelomično obezbojenje

Tablica 9. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila pomoću *Trametes gibbosa*

	Trametes gibbosa														
Kongo crvenilo	**0. dan**	**2. dan**		**4. dan**		**6. dan**		**8. dan**		**10. dan**		**12. dan**		**14. dan**	
γ_{bojila}/ mg L^{-1}	**ZR**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**	**ZR**	**DO**
Kontrola	5,00	14,37 ^{b}	-	50,93 ^{ab}	-	82,99 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-	90,00	-
10	5,00	21,00 ^{a}	0,00	47,26 ^{a}	0,00	81,82 ^{a}	0,00	90,00 ^{a}	90,00 *^{a}	90,00	90,00 *^{a}	90,00	90,00* ^{a}	90,00	90,00 *^{a}
30	5,00	17,08 ^{ab}	20,87 ^{a}	34,99 ^{ab}	23,38	60,95 ^{b}	30,91	84,40 ^{ab}	40,27 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}
50	5,00	16,79 ^{ab}	20,02 ^{ab}	33,84 ^{ab}	24,16	57,61 ^{bc}	29,80	82,69 ^{ab}	33,89 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}
100	5,00	13,27 ^{ab}	19,10 ^{ab}	24,64 ^{b}	30,56	51,32 ^{bc}	26,90	72,69 ^{b}	48,19 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}
150	5,00	12,60 ^{ab}	18,67 ^{b}	25,50 ^{ab}	23,75	49,19 ^{c}	18,83	71,44 ^{b}	32,30 ^{b}	86,77	85,81 ^{b}	87,74	88,13 ^{b}	90,00	90,00 ^{b}

ZR- zona rasta, DO- djelomično obezbojenje, * potpuno obezbojenje

Tablica 10. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kristal violeta pomoću *Trametes gibbosa*

	Trametes gibbosa														
Kristal violet	**0. dan**	**2. dan**		**4. dan**		**6. dan**		**8. dan**		**10. dan**		**12. dan**		**14. dan**	
γ_{bojila}/ mg L^{-1}	**ZR**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**	**ZR**	**PO**
Kontrola	5,00	14,37 ^{a}	-	50,93 ^{a}	-	82,99 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
10	5,00	0,00 ^{b}	0,00	18,42 ^{b}	23,07 ^{a}	28,93 ^{b}	32,19 ^{a}	41,33 ^{b}	43,43 ^{a}	55,02 ^{b}	55,48 ^{a}	63,06 ^{b}	69,28 ^{a}	76,98 ^{b}	84,40 ^{a}
30	5,00	0,00 ^{b}	0,00	13,79 ^{c}	0,00 ^{b}	22,93 ^{c}	15,58 ^{b}	32,33 ^{c}	33,74 ^{b}	40,78 ^{c}	40,91 ^{b}	52,48 ^{c}	54,40 ^{b}	65,06 ^{c}	65,49 ^{b}
50	5,00	0,00 ^{b}	0,00	13,77 ^{c}	0,00 ^{b}	23,20 ^{c}	10,90 ^{bc}	31,65 ^{c}	23,47 ^{c}	39,42 ^{c}	29,77 ^{c}	47,45 ^{c}	33,99 ^{cd}	56,54 ^{cd}	49,92 ^{c}
100	5,00	0,00 ^{b}	0,00	13,84 ^{c}	0,00 ^{b}	21,54 ^{c}	0,00 ^{c}	28,57 ^{cd}	20,13 ^{c}	34,68 ^{cd}	26,51 ^{c}	38,68 ^{cd}	35,25 ^{c}	48,79 ^{de}	38,67 ^{d}
150	5,00	0,00 ^{b}	0,00	11,99 ^{c}	0,00 ^{b}	18,35 ^{c}	0,00 ^{c}	24,91 ^{d}	0,00 ^{d}	30,57 ^{d}	0,00 ^{d}	33,57 ^{d}	29,72 ^{d}	40,60 ^{e}	33,89 ^{d}

ZR- zona rasta, PO- potpuno obezbojenje

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

Adsorpcija je jedna od najčešće korištenih metoda za uklanjanje bojila iz otpadnih voda. Ako se kao adsorbens upotrijebe lako dostupni i jeftini lignocelulozni materijali poput otpada iz prehrambene industrije, poljoprivrednih ostataka i slično, proces postaje ekonomski puno isplativiji. Problem kod ovog postupka predstavlja zbrinjavanje ostatka nakon adsorpcije i njihovo uklanjanje iz okoliša. Nekoliko istraživanja ponudilo je riješenje ovog problema. Različiti materijali korišteni za adsorpciju primjenjivani su u vidu supstrata za uzgoj gljiva bijelog truljenja u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Prilikom uzgoja djelovanjem lignolitičkih enzima došlo je do obezbojenja supstrata te smanjenja njegovog volumena (Nigam i sur., 2000.).

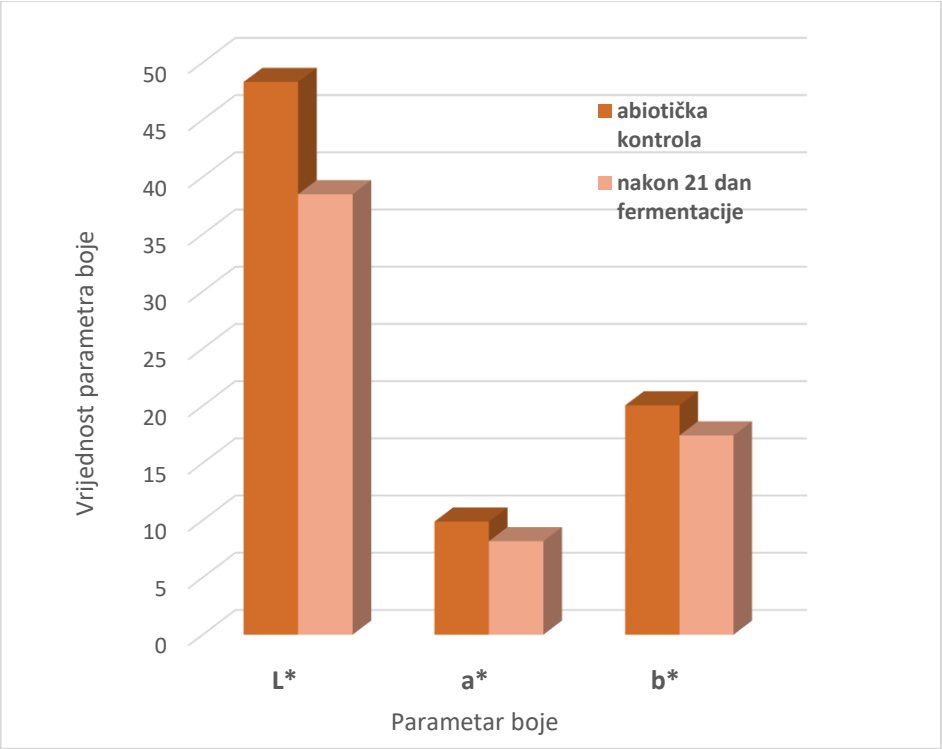
U ovom dijelu rada istražena je sposobnost obezbojenja pivskog tropa obojenog kongo crvenilom pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV8 u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Gljiva je uzgajana na neinertnom nosaču (pivskom tropu) kroz 21 dan te su nakon završenog procesa uzgoja provedene analize uzorka fermentiranog pivskog tropa kako slijedi: promjena udjela vlage, gubitak na masi supstrata, udjel proteina te promjena boje uzorka. Rezultati analiza prikazani su u **Tablici 11.** te na **Slici 16.**

Rast gljive *T. gibbosa* potvrđen je vizualno uočavanjem pojave bijelog micelija na obojenom pivskom tropu. Nadalje, povećanje udjela vlage u fermentiranom uzorku u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu javlja se kao posljedica oslobađanja metaboličke vode, kao posljedica mikrobiološke aktivnosti. Povećanje udjela vlage uočeno je i u biotičkoj kontroli, što također ukazuje na mikrobnu aktivnost. Povećanje udjela proteina u odnosu na abiotičku kontrolu također je potvrda mikrobne aktivnosti, odnosno rasta gljive na obojenom pivskom tropu kao suspstratu i nosaču. Gubitak na masi susptrata, koji je posljedica razgradnje lignoceluloznih komponenti pivskog tropa pomoću gljive (Valášková i Baldrian, 2006), iznosio je oko 17%.

Tablica 11. Rezultati uzgoja na čvrstim nosačima

Uzorak	Udjel vlage (%)		Gubitak na masi supstrata (%)	Udjel proteina (%)
	početno	21 dan		
Biotička kotrola	62,54	65,78	18,16	24,00
CR abiotička kontrola	65,69	59,26	0	14,40
CR	61,31	63,60	17,12	19,68

Slika 16. prikazuje promjenu parametara boje fermentiranog uzorka obojenog pivskog tropa nakon 21 dana biološke obrade pomoću gljive *T. versicolor* TV8. Nakon 21 dan fermentacije došlo do smanjenja parametra L* (lightness) u odnosu na abiotičku kontrolu podvrgnutu istim okolišnim uvjetima, odnosno došlo je do potamnjenja uzorka tijekom fermentacije. Promjene vrijednosti parametra a* (crveno vs. zeleno) uzorka u odnosu na abiotičku kontrolu upućuju na zaključak kako dolazi do promjene nijanse boje od crvene prema plavim nijansama, odnosno do razgradnje crvenog pigmenta kongo crvenila u prisutnosti *T. versicolor* TV8. Parametar boje b* (žuto vs. plavo) također opisuje promjenu nijasne od žute prema plavoj, pri čemu je abiotička kontrola u odnosu na uzorak više žuta, što također upućuje na promjenu boje u fermentiranom uzorku.



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

5. ZAKLJUČCI

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

1. Provođenjem kvalitativnih testova za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti utvrđeno je kako obje korištene gljive imaju sposobnost produkcije navedenih enzima te su stoga prikladni kandidati za daljnja istraživanja sposobnosti obezbojenja sintetskih bojila.
2. Nakon 28 dana uzgoja gljiva *T. versicolor* TV8 je u potpunosti obezbojila cijelu površinu agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila u svim odabranim koncentracijama te agarnih ploča s dodatkom fuksina i kristal violeta u svim koncentracijama, osim u najvećoj koncentraciji od 150 mg L^{-1}. Dodatak fuksina i kongo crvenila u podlogu nije inhibirao je rast ove gljive, dok je dodatak kristal violeta u podlogu za uzgoj uzrokovao snažnu inhibiciju rast. Veće koncentracije bojila uzrokovale su snažniju inhibiciju rasta kolonija gljive.
3. Gljiva *T. gibbosa* u potpunosti je, nakon 28 dana uzgoja, obezbojila cijelu površinu agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila u svim primijenjenim koncentracijama, osim 150 mg L^{-1}. Podloge s dodatkom fuksina u potpunosti su obezbojene cijelom površinom za slučajeve kada je dodana koncentracija bojila iznosila od 10 do 30 mg L^{-1}. Samo podloge s dodatkom kristal violeta u koncentraciji od 10 mg L^{-1} bile su potpuno obezbojene cijelom površinom. Dodatak fuksina i kongo crvenila u podlogu nije inhibirao rast gljive *T. gibbosa*, dok je dodatak kristal violeta u podlogu statistički značajno inhibirao rast gljive u odnosu na njezin rast na podlozi bez dodatka bojila.
4. Gljiva *T. versicolor* TV8 dobro je rasla na pivskom tropu obojenom kongo crvenilom 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 17% 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 mogućnost korištenja gljive *T. versicolor* TV8 za biološku obradu lignoceluloznih materijala obojenih kongo crvenilom.

6. LITERATURA

Adanan LA, Mohd Yusoff AR, Hadibarata T, Khundhair B: Biodegradation of bis-azo dye reactive black 5 by white-rot fungus *Trametes gibbosa sp.* WRF 3 and its metabolite characterization. *Water, Air, & Soil Pollution* 225:2119, 2014.

Ahmad R: Studies on adsorption of crystal violet dye from aqueous solution onto coniferous pinus bark powder (CPBP). *Journal of Hazardous Materials* 171:761-773, 2009.

Barr DP, Aust SD: Pollutant degradation by white rot fungi. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 138:49-72, 1994.

Barreto Xavier AMR, Mora Tavares AP, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 10:3, 2006.

Borrás E, Blànquez P, Sàrra M, Caminal G, Vicent T: *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal* 42:61-66, 2008.

Chatterjee S, Lee MW, Wooa SH: Adsorption of congo red by chitosan hydrogel beads impregnated with carbon nanotubes. *Bioresource Technology* 101:1800-1806, 2009.

Chen H: Modern solid state fermentation, Springer International Publishing, Nizozemska, 2013.

Clark RJH, Cooksey CJ, Daniels MAM, Withnall R: Indigo, woad, and Tyrian Purple: important vat dyes from antiquity to the present. *Endeavour* 4:191-199, 1993.

Couto SR: Dye removal by immobilising fungi. *Biotechnology Advances* 27:227-235, 2009.

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

Eichlerová I, Homolka L, Lisá L, Nerud F: Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* 60:398-404, 2005.

Eichlerová I, Homolka L, Nerud F: Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochemistry* 41:941-946, 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* 25:331-339, 2009.

Encyclopædia Britannica Ultimate Reference Suite: Azo dye, Chicago: Encyclopædia Britannica, 2015.

Encyclopædia Britannica Ultimate Reference Suite: Congo red, Chicago: Encyclopædia Britannica, 2015.

Encyclopædia Britannica Ultimate Reference Suite: Dye, Chicago: Encyclopædia Britannica, 2015.

Encyclopædia Britannica Ultimate Reference Suite: Triphenylmethane dye, Chicago: Encyclopædia Britannica, 2015.

Erkurt EE, Ünyayar A, Kumbur H: Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry* 42:1429-1435, 2007.

Gudelj I, Hrenović J, Landeka Dragičević T, Delaš F, Šoljan V i Gudelj H: Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnološke strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 62:91-100, 2011.

Gupta VK, Mittal A, Gajbe V, Mittal J: Adsorption of basic fuchsin using waste materials - bottom ash and deoiled soya - as adsorbents. *Journal of Colloid and Interface Science* 319:30-39, 2007.

Gürses A, Açıkyıldız M, Güneş K, Gürses MS: Dyes and Pigments, Springer International Publishing, Švicarska, 2016.

HRN ISO 1871:1999, Poljoprivredni prehrambeni proizvodi - Općenite upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom (ISO 1871:1975).

http://www.rysch.com/pilze/Trametes_gibbosa.htm (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Congo-red-2D-skeletal.png (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indian_pigments.jpg (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indigo_skeletal.svg (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Methyl_Violet_10B.png (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rosaniline_hydrochloride.svg (08.09.2017.).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schmetterlingstramete_Trametes_versicolor_004.jpg (08.09.2017.).

Husain Q: Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 9:117-140, 2010.

Jarosz-Wilkolazka A, Malarczyk E, Pirszel J, Skowronski T, Leonowicz A: Uptake of cadmium ions in white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of Cd (II) ions on the activity of laccase. *Cell Biology International* 26:605-613, 2001.

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.

Johnsy G, Kaviyarasan V: Antimicrobial and antioxidant properties of *Trametes gibbosa* (pers) Fr. *Journal of Pharmacy Research* 11:3939-3942, 2011.

Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrat NO, Hahn-Hägerdal B: Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:691-697, 1977.

Karthik V, Saravanan K, Bharathi P, Dharanya V, Meiaraj C: An overview of treatments for the removal of textile dyes. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* 7:301-307, 2014.

Kiiskinen LL, Rättö M, Kruus K: Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology,* 97:640-646, 2004.

Kyzas GZ, Kostoglou M, Lazaridis NK, Bikiaris DN: Decolorization of dyeing wastewater using polymeric absorbents - An overview. Department of Oenology and Beverage Technology, Technological Educational Institute of Kavala, Grčka, 2013.

Lan RJ, Li JT, Chen BH: Ultrasonic degradation of fuchsin basic in aqueous solution: Effects of operating parameters and additives. *International Journal of Photoenergy*, Article ID 893131:1-7, 2013.

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.

Mahajan S: Characterization of the white-rot fungus, *Phanerochaete carnosa*, through proteomic methods and compositional analysias of decayed wood fibre. Doctorate, Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Toronto, 2011.

Malik A, Grohmann E: Environmental protection strategies for sustainable development. Springer, Nizozemska, 2011.

Maurya NS, Mittal AK, Cornel P, Rother E: Biosorption of dyes using dead macro fungi: Effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresource Technology* 97:512-521, 2006.

Miličević T: Mikrobiologija morfologija i sistematika fitopatogenih gljiva, Zagreb, 2006.

Mitchell DA, Krieger N, Berovič M: Solid-State fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation, Springer Science & Business Media, Njemačka, 2006.

Mittal A, Mittal J, Malviya A, Kaur D, Gupta VK: Adsorption of hazardous dye crystal violet from wastewater by waste materials. *Journal of Colloid and Interface Science* 343:463-473, 2009.

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

Pandey A, Soccol CR, Mitchell D: New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35:1153-1169, 2000.

Pointing SB: Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2:17-33, 1999.

Santos GC, Corso CR: Comparative analysis of azo dye biodegradation by *Aspergillus oryzae* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Water, Air, & Soil Pollution* 225:2026, 2014.

Sardrood BP, Goltapeh EM, Varma A: An introduction to bioremediation. *Soil Biology* 32:3-29, 2013.

Seyis I, Subasioglu T: Comparison of live and dead biomass of fungi on decolorization of methyl orange. *African Journal of Biotechnology* 7:2212-2216, 2008.

Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E: Fungal strategies for lignin degradation. *Lignins: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering* 61:263-308, 2012.

Sundman V, Nase L: A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Paper and Timber* 2:67-71, 1971.

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.

Toh YC, Lin Yen JJ, Obbard JP, Ting YP: Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme and Microbial Technology* 33:569-575, 2003.

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.

Vandevivere PC, Bianchi R, Verstraete W: Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 72:289-302, 1997.

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

Wang KF, Sui KY, Guo C, Liu CZ: Quorum sensing molecule-farnesol increased the production andbiological activities of extracellular polysaccharide from *Trametes versicolor*. *International Journal of Biological Macromolecules* 104:377-383, 2017.