

# Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive *Fomitopsis pinicola* uklapanjem u kalcijev alginat

---

Habschied, Hana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:565933>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



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

**Hana Habschied**

**Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive  
*Fomitopsis pinicola* uklapanjem u kalcijev alginat**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, rujan 2022.**

## 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 Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Nastavni predmet: Procesi obradbe otpadnih voda

Tema rada je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 14. rujna 2021. godine

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

**Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive *Fomitopsis pinicola* ukapljanjem u kalcijev alginat**

*Hana Habschied*

**Sažetak:** U ovom radu ispitana je mogućnost pripreme novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive *Fomitopsis pinicola* ukapljanjem u kalcijev alginat. Novi biosorbensi su pripremljeni ukapljanjem inaktivne biomase gljive u 1% i 2% kalcijev alginat, pri čemu je biomase gljive dodana u različitim količinama u odnosu na masu natrijevog alginata korištenog u postupku imobilizacije (10%, 20% i 30% gljive na masu alginata te u omjerima 1:1, 1:1,5 i 1:2 u odnosu na masu natrijevog alginata). Dobiveni biosorbensi su osušeni te su prije i nakon sušenja određivani promjer i udio vlage te stupanj bubrenja mikrosfera biosorbensa. Nadalje, ispitana je učinkovitost uklanjanja sintetskog bojila kongo crvenila iz vodenih otopina korištenjem dobivenih biosorbensa. Rezultati su pokazali kako je dodatak inaktivne biomase gljive utjecao na povećanje promjera te smanjenje udjela vode dobivenih mikrosfera biosorbensa u odnosu na mikrosfere biosorbensa bez dodatka biomase gljive. Svi biosorbensi pokazali su se učinkovitima za uklanjanje kongo crvenila (i do 80 %) iz vode pri odabranom vremenu kontakta od 6 h. Biosorbensi sa smanjenim udjelom natrijeva alginata (1%) te povećanim udjelom biomase gljive također su se pokazali učinkovitima za uklanjanje kongo crvenila, ali nije postignuto očekivano povećanje učinkovitosti u odnosu na uzorak bez dodatka biomase gljive. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na mogućnost upotrebe otpadne inaktivne gljive *Fomitopsis pinicola* za pripremu biosorbensa, ali i na potrebu provođenja daljnjih istraživanja koja će uključivati detaljniju fizikalno-kemijsku i morfološku karakterizaciju biosorbensa te opsežnije biosorpcijske eksperimente.

**Ključne riječi:** kongo crvenilo, *Fomitopsis pinicola*, kalcijev alginat, imobilizacija, biosorpcija

**Rad sadrži:** 38 stranica  
10 slika  
1 tablica  
0 priloga  
79 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

1.	prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek- Barron</i>	Predsjednik
2.	prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i>	član
4.	doc. dr. sc. <i>Marija Stjepanović</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 26. rujna 2022.

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** Process Engineering**Scientific area:** Biotechnical sciences**Scientific field:** Biotechnology**Course title:** Wastewater Treatment Processes**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI. held on 14<sup>th</sup> September 2021.**Supervisor:** *Natalija Velić*, PhD, full prof.**Preparation of New Biosorbents by Immobilisation of inactive Biomass of *Fomitopsis pinicola* in Calcium Alginate***Hana Habschied*

**Summary:** In this study, the possibility of preparing new biosorbents by immobilizing the inactive biomass of the fungus *Fomitopsis pinicola* by incorporating it into calcium alginate was tested. New biosorbents were prepared by liquefying inactive mushroom biomass in 1% and 2% calcium alginate, where the mushroom biomass was added in different amounts in relation to the mass of sodium alginate used in the immobilization process (10%, 20% and 30% of mushroom to the mass of alginate and in ratios of 1:1, 1:1.5 and 1:2 in relation to the mass of sodium alginate). The obtained biosorbents were dried, before and after drying, the diameter and moisture content and degree of swelling of the biosorbent microspheres were determined. Furthermore, the effectiveness of removing the synthetic dye Congo red from aqueous solutions using the obtained biosorbents was tested. The results showed that the addition of inactive mushroom biomass had an effect on increasing the diameter and reducing the water content of the obtained biosorbent microspheres compared to biosorbent microspheres without the addition of mushroom biomass. All biosorbents proved effective for removing Congo red (up to 80%) from water at the selected contact time of 6 h. Biosorbents with a reduced proportion of sodium alginate (1%) and an increased proportion of mushroom biomass also proved to be effective for the removal of Congo red, but the expected increase in efficiency compared to the sample without the addition of mushroom biomass was not achieved. The results obtained from this research point to the possibility of using waste inactive fungus *Fomitopsis pinicola* for the preparation of biosorbents, but also to the need for further research that will include more detailed physico-chemical and morphological characterization of biosorbents and more extensive biosorption experiments.

**Key words:** Congo red, *Fomitopsis pinicola*, calcium alginate, immobilisation, biosorptionThesis contains: 38 pages  
10 figures  
1 table  
0 supplements  
79 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- |    |  |              |
|----|--|--------------|
| 1. | Lidija Jakobek-Barron, PhD, full prof.   | chair person |
| 2. | Natalija Velić, PhD, full prof.          | supervisor   |
| 3. | Hrvoje Pavlović, PhD, full prof.         | member       |
| 4. | Marija Stjepanović, PhD, assistant prof. | stand-in     |

Defense date: September 26, 2022

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 svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Velić na nesebičnoj pomoći, strpljenju i posvećenom vremenu prilikom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Indiri Kosović na pomoći i na stvaranju ugodne radne atmosfere u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na podršci i savjetima tijekom studiranja. Posebno hvala mojim dragim kolegama Tanji Jurić i Matiji Hećimoviću koji su mi dane studiranja učinili nezaboravnima i lakšima.*

## Sadržaj

UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Biosorpcija .....	2
2.1.1. Mikrobnna biomasa kao biosorbens .....	3
2.1.2. Imobilizirana mikrobnna biomasa kao biosorbens.....	4
2.1.3. Otpadna biomasa ljekovitih gljiva kao biosorbens.....	6
2.2. Onečišćujuće tvari u otpadnim vodama: sintetska bojila.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	12
3.1. ZADATAK.....	12
3.2. MATERIJALI.....	12
3.2.1. Kemikalije .....	12
3.2.2. Instrumenti.....	12
3.2.3. Inaktivna biomasa gljive <i>Fomitopsis pinicola</i> .....	13
3.3. METODE.....	14
3.3.1. Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive <i>F. pinicola</i> uklapanjem u kalcijev alginat .....	14
3.3.2. Određivanje promjera mikrosfera biosorbensa .....	15
3.3.3. Određivanje udjela vode .....	15
3.3.4. Određivanje stupnja bubrenja pripremljenih biosorbensa .....	16
3.3.5. Priprema otopine kongo crvenila .....	16
3.3.6. Šaržni adsorpcijski eksperimenti .....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
4.1. Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive <i>f. pinicola</i> uklapanjem u kalcijev alginat .....	18
4.2. Učinkovitost uklanjanja sintetskog bojila kongo crvenila primjenom dobivenih biosorbensa ..	20
5. ZAKLJUČCI .....	26
6. LITERATURA .....	27

## 1. UVOD

Razvoj industrije doveo je do nastanka povećane količine otpadnih voda. Industrijske otpadne vode u svom sastavu imaju veliku količinu organskih i anorganskih onečišćujućih tvari, poput bojila, teških metala, pesticida, lijekova i aromatskih spojeva. Ispuštanje neobrađenih otpadnih voda moglo bi uzrokovati veliku štetu okolišu i utjecati na zdravlje ljudi. Postoje različite metode za obradu ovih otpadnih voda: oksidacija, elektroliza, ozonizacija, filtracija, reverzna osmoza, flokulacija, koagulacija, biosorpcija, biološka obrada pomoću mikroorganizama ili enzima (Franco i Dotto, 2020).

Zbog nedovoljne učinkovitosti konvencionalnih metoda za pročišćavanje otpadnih voda, biosorpcija je način pročišćavanja koji se sve više istražuje. Niski troškovi, visoka učinkovitost, smanjeno korištenje kemikalija, mogućnosti korištenja biosorbensa koji su široko dostupni, te manja proizvodnja sekundarnog mulja i toksičnih krajnjih proizvoda pridonose velikom zanimanju znanstvenika za ovaj mehanizam uklanjanja onečišćujućih tvari iz vode (Forgacs i sur., 2004).

Početa istraživanja potencijalnih novih biosorbensa najčešće uključuju korištenje nativnog, nemodificiranog materijala u usitnjenom, često i praškastom obliku, što može predstavljati problem prilikom odvajanja biosorbensa nakon završenog procesa biosorpcije. Navedeni problem ograničava i primjenu biosorbensa u ovom obliku u realnim uvjetima, odnosno ograničava mogućnost njihove komercijalizacije. Iz tog razloga istražuju se mogućnosti imobilizacije biosorbensa korištenjem različitih polimera poput alginata, hitozana, hitina i dr.

U ovom radu istražena je mogućnost pripreme novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive *Fomitopsis pinicola* ukapljanjem u kalcijev alginat te učinkovitost uklanjanja kongo crvenila iz vode pomoću dobivenih biosorbensa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biosorpcija

Adsorpcija je pojava povećanja koncentracije neke tvari (adsorbata), na površini krute tvari (adsorbensa) te se odvija na granici faza, tj. na granici faza krutina/plin ili krutina/tekućina. Čimbenici koji utječu na adsorpciju uključuju površinu i strukturu pora adsorbensa, veličinu čestica adsorbensa, karakteristike adsorbata, pH, temperaturu te kemijski sastav adsorbensa. Adsorpcijski procesi mogu biti fizikalni ili kemijski, što ovisi o prirodi privlačnih sila između adsorbensa i adsorbata (Velić, 2017).

Kada se opisuju procesi adsorpcije koji uključuju primjenu adsorbensa biološkog podrijetla (koji se tada nazivaju biosorbensi), poput različitih lignoceluloznih materijala, žive ili inaktivne biomase mikroorganizama ili nekog drugog biološkog materijala (npr. kosti, perje) ti se procesi opisuju pojmom **biosorpcija** i to je najjednostavnija definicija biosorpcije. Ipak, definicije biosorpcije mogu biti različite. Šire definiran pojam biosorpcije opisuje procese uklanjanja različitih onečišćujućih tvari koji, ovisno o primijenjenom biosorbensu, mogu uključivati različite mehanizme: fizikalnu (fizisorpcija) ili kemijsku (kemisorpcija) adsorpciju, apsorpciju, ionsku izmjenu, elektrostatske interakcije, keliranje i mikrotaloženje.

Nadalje, kada se kao biosorbens koristi živa biomasa mikroorganizama, mehanizmi, osim već gore navedene adsorpcije (koja se u tom slučaju definira kao biosorpcija), uključuju i bioakumulaciju i biodegradaciju (biorazgradnju). Biosorpcija je proces koji uključuje vezanje otopljene onečišćujuće tvari (adsorbata) na površinu mikrobne biomase (odnosno stanice) te se odvija i na površini žive i inaktivne mikrobne biomase. Biosorpcija ne uključuje potrošnju energije za transport kroz staničnu membranu ili metaboličke procese (Tobin i sur., 1994), za razliku od bioakumulacije koja uključuje nakupljanje onečišćujuće tvari unutar stanice (Aksu i Karabayir, 2008) ili biorazgradnje koja uključuje enzimsku razgradnju pojedinih onečišćujućih tvari, poput bojila. Mikroorganizmi koji su korišteni kao biosorbensi su određene vrste bakterija, mikroskopskih i makroskopskih gljiva te mikroalge (Gadd, 2009). Pri tome je važno da se radi o vrstama koje se jednostavno uzgajaju te nisu patogene ili toksikogene.

Biosorbens, korišten kao mikrobna biomasa u većini znanstvenih radova, korišten je za uklanjanje teških metala, kao čestih onečišćujućih tvari iz vode. Uklanjanje teških metala biosorpcijom odvija se uslijed fizikalno-kemijskih interakcija između metala i funkcionalnih



skupina prisutnih na površini biosorbensa. Proces interakcije, a koji nije povezan s metabolizmom, uključuje fizikalnu i kemijsku adsorpciju te ionsku izmjenu. Stanične stijenke mikroorganizama izgrađene su od polisaharida, proteina i lipida te sadrže hidroksilne, karboksilne, fosfatne i amino skupine koje s metalima tvore veze (Derco i Vrana, 2018). Biosorpcija teških metala je brz proces, koji može biti i povratan (Mustapha i Halimoon, 2015). Za razliku od metala, organske onečišćujuće tvari značajno se razlikuju u strukturi, stoga na biosorpciju utječu veličina molekule, naboj, topljivost, hidrofobnost i reaktivnost. Također, na sam proces biosorpcije utječu i vrsta biosorbensa i sastav otpadnih voda (Fomina i Gadd, 2014). Lipofilna priroda nekih hidrofobnih spojeva omogućuje im prolazak kroz staničnu membranu i adsorpciju u organski stanični matriks (Gadd, 2009). Prednosti biosorpcije korištenjem mikrobne biomase su niski troškovi, visoka učinkovitost, smanjeno korištenje kemikalija te mogućnost regeneracije biosorbensa (Paska i sur., 2014).

### **2.1.1. Mikrobna biomasa kao biosorbens**

Osnovne karakteristike biosorbensa koje vode k njegovoj komercijalizaciji su niska cijena i laka dostupnost. Nadalje, biosorbens mora biti kemijski i mehanički stabilan, što ima posebnu važnost prilikom njegove primjene u kontinuiranim sustavima. Važna fizikalno-kemijska i morfološka svojstva uključuju veliku površinu i volumen pora te prisutnost velikog broja onih funkcionalnih skupina koje će dovesti do vezivanja adsorbata. Iako su sve ove karakteristike važne za njegovu primjenu, teško je razviti biosorbens sa svim nevedenim značajkama (Dotto i McKay, 2020).

Kako je već navedeno, kada se mikrobna biomasa koristi kao biosorbens ona može biti živa ili inaktivna. Inaktivacija biomase provodi se sterilizacijom, sušenjem ili različitim kemijskim tretmanima. Osnovna prednost korištenja inaktivne mikrobne biomase kao biosorbensa u odnosu na živu biomasu je da nije potrebno osigurati opskrbu biomase supstratom, hranjivim tvarima ili kisikom (u slučaju aerobnih vrsta) za rast tijekom biosorpcijskog procesa (Derco i Vrana, 2018). Nadalje, na učinkovitost inaktivne biomase kao biosorbensa ne utječe negativno prisutnost toksičnih onečišćujućih tvari te ona sama ne sintetizira toksine i druge metabolite koji mogu izazvati sekundarno onečišćenje vode koja se pročišćava procesom biosorpcije (Abdallah i Taha, 2012). Odnosno, kako proces ne ovisi o metabolizmu mikrobne biomase, jer

je inaktivirana, nema niti enzimske aktivnosti niti inhibicije iste zbog prisutnosti toksičnih tvari. Sve navedeno čini inaktivnu mikrobnu biomasu kao biosorbens bezopasnom, jeftinom, ekološki prihvatljivom te, često, vrlo učinkovitom u uklanjanju velikog broja strukturno različitih onečišćujućih tvari (Patel, 2016). S druge strane, prednosti korištenja žive mikrobne biomase kao biosorbensa ogledaju se u činjenici da su osim mehanizma adsorpcije (biosorpcije) često uključeni i drugi mehanizmi, odnosno bioakumulacija i biorazgradnja koji su karakteristika žive biomase, jer su ovisni o metabolizmu. Navedeni mehanizmi su posebno važni za uklanjanje ksenobiotika (poput, primjerice, sintetskih bojila), odnosno spojeva koji se teško razgrađuju u okolišu, jer osim njihova fizičkog uklanjanja adsorpcijom, mogu rezultirati njihovim nakupljanjem unutar stanica ili enzimskom razgradnjom do manje toksičnih spojeva.

Od mikrobnih vrsta koje su korištene kao biosorbensi u istraživanjima koja su za cilj imala pročišćavanje otpadnih voda iz prehrambene i farmaceutske industrije najviše su zastupljene filamentozne gljive (rodovi *Alternaria*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*), kvasci (npr. otpadna biomasa vrsta *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pastorianus* iz proizvodnje piva, vina i alkohola) te određene vrste makroskopskih gljiva koje pripadaju skupini gljiva truležnica, koje mogu razgraditi lignocelulozne sastavnice. Osim što se koriste u bioremedijaciji različitih teško biorazgradivih onečišćujućih tvari, mnoge gljive truležnice ubrajaju se u skupinu ljekovitih gljiva, zbog biološki aktivnih tvari koje sintetiziraju.

### **2.1.2. Imobilizirana mikrobna biomasa kao biosorbens**

U ovom diplomskom radu, za pripremu biosorbensa, korištena je inaktivna mikrobna biomasa gljive smeđeg truljenja *Fomitopsis pinicola*, koja ima ljekovita svojstva te o kojoj će biti riječ u nastavku rada. Korištena je otpadna biomasa gljive zaostala nakon ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz osušenog i samljevenog plodišta gljive u obliku filtracijske pogače, koja je ponovo samljevana. Kako vrlo mala veličina čestica biosorbensa (što je slučaj s korištenjem mikrobne biomase) može predstavljati problem prilikom odvajanja biosorbensa nakon završenog procesa biosorpcije, sve više se provode istraživanja koja uključuju njegovu imobilizaciju korištenjem različitih polimera poput alginata, hitozana, hitina i dr., kako bi se dobio robusniji biosorbens koji ima veću mehaničku čvrstoću i otpornost, lakše ga je čuvati, dozirati, ali i izdvojiti nakon procesa biosorpcije te se povećava mogućnost njegove regeneracije (Naga Babu i sur., 2019; Bishnoi i sur., 2007 ).

Imobilizacija predstavlja opći pojam koji opisuje fizičko ograničenje živih mikrobnih stanica na određeno definirano područje prostora (nosač) kako bi se ograničila slobodna migracija i stvorile hidrodinamičke karakteristike različite od onih u okolnom okolišu, dok stanice pritom zadržavaju svoje katalitičke aktivnosti tijekom ponovne uporabe (Martins i sur., 2013).

Ključan korak je odabrati pogodan nosač tijekom procesa imobilizacije. Za proces obrade otpadnih voda nosači moraju biti: netopljivi, biološki nerazgradljivi, netoksični za okoliš, moraju biti fleksibilni i lagani, imati visoku mehaničku i kemijsku stabilnost, te, ako je moguće, nisku cijenu. Nosači se dijele na anorganske (poput zeolita, gline, antracita, poroznog stakla, aktivnog ugljena i keramike) i organske polimere. Anorganski nosači su stabilniji i otporniji na mikrobnu razgradnju, stoga se koriste za imobilizaciju mikroorganizama (Cassidy i sur., 1996; Verma i sur., 2006). Organski polimerni nosači su zastupljeniji od anorganskih nosača i dijele se na prirodne i sintetske polimerne nosače. Najčešće korišteni polimeri su prirodni polimeri alginat i karagenan, ali su oni manje stabilni u otpadnim vodama od sintetskih polimera (Cassidy i sur., 1996).

Općenito pojam imobilizacija se odnosi na čin ograničavanja kretanja, tj. usporavanja kretanja. Tako, primjerice, imobilizacija biokatalizatora, neovisno radi li se o cijelim stanicama mikroorganizama ili čistim enzimima, omogućuje njihovu ponovnu upotrebu, ali i lakše izdvajanje te omogućuju razvoj kontinuiranih bioprocasa (Yu-Qung, 2004). Imobilizacija biomase postupkom umrežavanja, tj. hvatanje živih ili inaktivnih stanica na čvrste materijale koji služe kao nosači ili unutar matriksa, najčešće korištenjem polimernih matriksa, koristi se za pročišćavanje otpadnih voda. Imobilizacija može biti na površini ili unutar matrice nosača. Pričvršćivanje na površinu nosača postiže se ili jednostavnom adsorpcijom ili stvaranjem kovalentnih veza (Cassidy i sur., 1996). Plastika, polipropilen, polivinil klorid nosači su koji se obično koriste za pričvršćivanje biomase. Zarobljavanje se postiže jednostavnim umrežavanjem, a smjesa polimera i biomase rezultira imobilizacijom biomase u gel matrici. Također, u smjesu se dodaju određeni aditivi koji kapsulirani zajedno s biomasom poboljšavaju razgradnju, stabilnost i svojstva održivosti imobilizirane biomase. Prednosti imobilizacije su jednostavna ponovna upotreba biomase, lakše odvajanje tekućine i krutine te minimalno začepljenje u sustavima s kontinuiranim protokom (Arica i sur., 1993). Imobilizirane kulture obično imaju viši stupanj aktivnosti i otpornije su na okolišne poremećaje kao što je pH ili izlaganje toksičnim spojevima, nego suspenzijske kulture (Shin i sur., 2002).

### 2.1.3. Otpadna biomasa ljekovitih gljiva kao biosorbens

Gljive su organizmi koji se hrane heterotrofno, apsorbiranjem (web 1). Zbog nemogućnosti obavljanja fotosinteze, koriste organske supstrate kao izvor ugljika i energije za rast i metaboličku aktivnost (Sađ, 2001). Prema načinu uzimanja organske tvari, gljive se dijele na parazite i saprofitne. Paraziti su one vrste organizama koje crpe asimilate živih organizama, a saprofiti oni koji kao hranu koriste mrtve organske tvari (Lisjak, 1989). Također, gljive mogu biti simbiotičke, gdje u privremenoj ili trajnoj životnoj zajednici s drugim organizmima, članovi mogu imati koristi ili štetu (web 4). Gljive imaju značajnu ulogu u odvijanju ekoloških procesa u kopnenim ekosustavima, posebno u šumskim. Razgradnjom mrtve organske tvari, omogućavaju kruženje materije, bez koje život nije moguć. Nadalje imaju dominantnu ulogu u razgradnji biljnih ostataka (celuloze, hemiceluloze, pektina), a nezamjenjivu ulogu u razgradnji lignina, koja je isključivo zadaća gljiva. U ulozi parazita, napadaju oslabljene i stare organizme te na taj način ubrzavaju kruženje tvari u prirodi i povećanje raznolikosti šumskih staništa (web 5).

Gljive sintetiziraju velik broj metabolita, biološki aktivnih spojeva, koji im omogućavaju preživljavanje među drugim organizmima. Konzumiranjem ovih spojeva s jedne strane može dovesti do trovanja ili loših učinaka po ljudsko zdravlje, a s druge strane gljive mogu biti ljekovite i imati pozitivne učinke po ljudsko zdravlje. Stanični zid gljiva vrlo je kompleksna makromolekularna struktura koja sadrži hitin, proteine, glukozid zajedno s lipidima, polisaharide i pigmente (Crini i Badot, 2008), pri čemu su za učinkovitost procesa biosorpcije, osim već navedenih funkcijskih skupina, važne komponente hitin, hitozan te ostali derivati hitina (Uttariya i sur., 2018).

Gljive truležnice su gljive koje uzrokuju truljenje i razlaganje drva na kojem obitavaju (web 2). Vrlo su važan čimbenik u procesu kruženja tvari u prirodi jer imaju sposobnost razgradnje složenih na jednostavne spojeve. Enzimi koje posjeduju i pomoću kojih razgrađuju lignocelulozne sastavnice, odgovorni su i za biološku razgradnju sintetskih bojila, što ih čini predmetom istraživanja u procesima pročišćavanja otpadnih voda.

*Fomitopsis pinicola*, poznata kao crvenoruba guba, najrasprostranjenija je gljiva truležnica u crnogoričnim šumama sjeverne polutke. Parazit je i saprofit, na drveću uzrokuje smeđu trulež,

razarajući bijelu celulozu koja čini da se drvo lomi u prah. U narodnoj medicini, crvenoruba guba se koristila za liječenje neuralgije, glavobolje i mučnina, te bolesti jetre. Njome su se tretirale rane i zaustavljalo krvarenje, a također se koristila za ublažavanje malarične groznice, kronične dijareje i dizenterije, prekomjernog mokrenja, žutice te tuberkulozne groznice. Suvremena istraživanja dokazala su brojna ljekovita svojstva crvenorube gube – antioksidativno, antimikrobno, hepatoprotektivno, antidiabetičko, antitumorsko te protuupalno (Pravica, 2018).



**Slika 1.** *Fomitopsis pinicola* (Pravica, 2018)

## **2.2. Onečišćujuće tvari u otpadnim vodama: sintetska bojila**

Bojila su tvari koje apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra te imaju sposobnost bojanja tekstilnih vlakna ili drugih materijala, stvarajući s materijalom kemijsku vezu ili vežući se na njega fizikalnim silama (web 3). Zajedničko kemijsko svojstvo svih tvari koje pokazuju obojenost jest nezasićenost veza u strukturi njihove molekule (Siva, 2007). Sama obojenost ovisi o broju i razmještaju dvostrukih veza i kromofora (npr. azo, nitro, nitrozo, karbonilna), odnosno o kemijskoj strukturi molekule tvari. Prema podrijetlu, bojila se dijele na prirodna i sintetska te se ova podjela temelji na kemijskoj strukturi te području i metodama primjene (Gudelj i sur., 2011). Prirodna bojila dobivaju se iz biljnih ili životinjskih sastojaka, kao što su

npr. lišće, korijenje, puževi ili kukci. Sintetska bojila svoju primjenu dobila su nakon sintetiziranja anilina, koje je proveo William Henry Perkin, 1856. Prema kemijskoj građi bojila razlikuju se nitro-bojila, indigoidna, antrakinonska, azinska, oksazinska, stilbenska, sumporna i dr. (web 3).

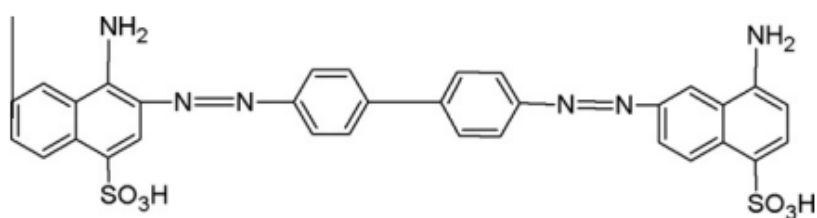
Azo bojila, najveća su, najvažnija i najraznolikija skupina sintetskih bojila koja imaju široku industrijsku primjenu. Pripadaju skupini umjetnih bojila koju karakterizira jedna ili više dušikovih veza (-N=N-) između aromatskih prstenova. Prema broju azo-veza u molekularnoj strukturi dijele se na: monoazo, diazo, triazo, tetraazo i poliazo-bojila (Hunger 2003, Web 3).

**Kongo crvenilo** je anionsko bojilo koje pripada azo klasi bojila, koja se dobivaju iz benzidina i naftionske kiseline. Smeđe-crveni je prah bez mirisa te se upotrebljava u ispitivanju slobodne klorovodične kiseline u želučanom sadržaju u dijagnostici amiloidoze kao indikator pH (Mittal i sur., 2009).



**Slika 2.** Kongo crvenilo (web 7)

Vrlo je raširena uporaba u industriji tekstila, papira, plastike i gume. Također se koristi u mikrobiologiji za bojenje, te bojenje amiloida u tkivima pacijenata u dijagnostičke svrhe, u medicini (Kezerle i sur, 2018). Vrlo je štetno bojilo jer metabolizira u kancerogene tvari, nadražuje kožu, oči, gastrointestinalni trakt, a može utjecati i na zgrušavanje krvi, pospanost i respiratorne probleme (Mittal i sur., 2009).



**Slika 3.** Strukturna formula kongo crvenila (Patel i Vashi, 2012)

*Utjecaj sintetskih bojila na okoliš i zdravlje čovjeka.* Bojila se učestalo koriste u tekstilnoj industriji za bojanje raznih odjevnih materijala, međutim metaboliti bojila, kao što su aromatski amini, potencijalno su kancerogeni, mutageni i uzrokuju alergije i iritacije kože i osipe prema izloženim organizmima (Bayramoglu i sur., 2006). Bojila iz otpadnih voda tekstilne industrije osim estetskog štetnog utjecaja na vodena tijela, onemogućavaju prodiranje sunčeve svjetlosti te na taj način utječu na redukciju procesa fotosinteze te smanjenje razine kisika što utječe na vodeni život (Imran i sur., 2015). Otpuštene tvorničke vode se u nekim zemljama u razvoju koriste za navodnjavanje u poljoprivredi te na taj način štetna onečišćivala ulaze u hranidbeni lanac (Rehman i sur., 2018). Također, navodnjavanje onečišćenom vodom nepovoljno utječe na mikroorganizme u tlu, a onda posljedično i na klijanje i rast biljaka (Rehman i sur., 2018). U prisutnosti anoksičnih spojeva dolazi do redukcije azo spojeva te stvaranja štetnih aromatičnih spojeva, amina. Također u kombinaciji sa sintetičkim spojevima kao međuproduktima nastaju mutageni i kancerogene spojevi (Vikrant i sur., 2018). Ovisno o koncentraciji bojila i trajanju izloženosti nekog organizma bojilu mogu nastupiti akutni ili toksični učinci (Gudelj i sur., 2011). Kada bojilo dođe u dodir s kožom ili očima može uzrokovati iritacije te razne zdravstvene probleme kao što su dermatitis, konjuktivitis, alergijski rinitis ili astmu (Uttariya i sur., 2018).

*Metode za uklanjanje sintetskih bojila iz otpadnih voda.* Obojenje industrijskih otpadnih voda može biti uzrokovano prisutnošću različitih sastojaka, no posebna se pozornost posvećuje prisutnosti bojila i spojeva nastalih njihovom razgradnjom, koji se zbog svoje složene kemijske strukture ne mogu razgraditi u okolišu (Anjaneyulu i sur., 2005). Metode za uklanjanje bojila iz otpadnih voda mogu se podijeliti na fizikalno-kemijske i biološke.

*Kemijske metode* sastoje se od tehnika koagulacije, flokulacije u kombinaciji s flotacijom i filtracijom, precipitacijske flokulacije sa željezovim, aluminijskim i kalcijevim hidroksidima, elektroflotacije, elektrokinetičke koagulacije, konvencionalnih metoda oksidacije pomoću oksidacijskih sredstava, zračenja ili elektrokemijskih procesa. Međutim, često je primjena ovih kemijskih tehnika vrlo skupa i uzrokuje nakupljanje mulja, što predstavlja problem prilikom zbrinjavanja. Također, pretjeranom upotrebom kemikalija, može doći do problema sekundarnog onečišćenja (Ejder-Korucu i sur., 2015). U novije vrijeme pojavljuje se tehnika oksidacije ozonom, koja osigurava dobivanje bezbojne otpadne vode s malom vrijednošću kemijske potrošnje kisika (KPK), prikladne za ispuštanje u okoliš (Slokar i Le Marechal, 1998). Glavna prednost oksidacije ozonom je u tome što se primjenjuje ozon u plinovitom stanju i stoga se ne povećava volumen otpadne vode i mulj. No, iako su ove metode učinkovite, vrlo su skupe i komercijalno neatraktivne. Velika potrošnja električne energije i potrošnja kemijskih reagensa su uobičajeni problemi (Ejder-Korucu i sur., 2015).

*Fizikalne metode* imaju široku primjenu u industriji zbog visokog stupnja uklanjanja boje i niskih operativnih troškova. Najprimjenjivije fizikalne metode u obradi tekstilnih otpadnih voda u postrojenjima su adsorpcija, ionska izmjena, filtracija i membranska filtracija (nanofiltracija, reverzna osmoza, elektrodijaliza) (Dabrowski, 2001). Membranski procesi imaju velike nedostatke, poput ograničenog vijeka trajanja i velikih troškova prilikom zamjene. Stoga najpopularnija metoda za uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda te pročišćavanje onečišćenih voda je *adsorpcija* u tekućoj fazi. Utvrđeno je da je adsorpcija superiornija u odnosu na druge metode zbog manjih troškova, fleksibilnosti, jednostavnosti rada, neosjetljivosti na otrovne onečišćujuće tvari te ne dovodi do stvaranja štetnih tvari (Kumar, 1998). Međutim, početna cijena i potražnja za aktivnim ugljenom kao najčešće korištenim komercijalnim adsorbensom te problemi s njegovom regeneracijom čine ga manje ekonomski isplativim (Wycliffe i sur., 2014).

*Biološke metode* obrade otpadnih voda prihvatljivije su zbog ekonomičnosti, količine mulja koji nastaje tijekom procesa obrade i ekološke prihvatljivosti (Asghe i Bhatti, 2007). Većina sintetskih bojila ubraja se u skupinu ksenobiotika, koji nisu biorazgradivi (Vandervivere i sur., 1998) te je biološka obrada izazovna. Mješovite mikrobne kulture, zbog međudjelovanja više kultura, pogodnije su za obradu obojenih otpadnih voda od čistih monokultura (Kapdan i sur., 2000). Proces biorazgradnje može se ubrzati dodatkom kosupstrata (glukoze, laktoze i kvaščeva



ekstrakta) jer će se na taj način mikroorganizme opskrbiti redukcijskim ekvivalentom elektrona potrebnih za razaranje azo-veze (Barragán i sur., 2007).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. ZADATAK**

Cilj ovog rada bio je pripremiti nove biosorbense imobilizacijom inaktivne biomase gljive *Fomitopsis pinicola* uklapanjem u kalcijev alginat te ispitati učinkovitost uklanjanja sintetskog bojila kongo crvenila iz vodenih otopina korištenjem pripremljenih biosorbensa.

### **3.2. MATERIJALI**

#### **3.2.1. Kemikalije**

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Natrijev alginat (SIGMA- ALDRICH, Njemačka i Appli Chem, Njemačka)
- Kalcijev klorid bezvodni ( Gram - mol, Zagreb, Hrvatska)
- Kongo crvenilo (Carlo Erba Reagents, Njemačka)

#### **3.2.2. Instrumenti**

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su sljedeći uređaji:

- Standardni laboratorijski mlin, MF10 Basic, IKA Labortechnik, Njemačka
- Analitička vaga (NBL- 84i, ae ADAM, SAD) i tehnička vaga (KERN, Njemačka)
- Digitalna pomična mjerka (Powerfix Profi, Njemačka)
- Uređaj za mjerenje vlage (DAB 200-2, KERN, Njemačka)
- Termostatirana tresilica (ES- 20, BIOSAN, SAD) i tresilica (RS-LS20, Phoenix Instrument, Njemačka)
- Centrifuga (IKA mini G, Njemačka)
- Magnetna mješalica (IKA Big squid, Njemačka)
- Spektrofotometar (S-220, BOECO, Njemačka)

### 3.2.3. Inaktivna biomasa gljive *Fomitopsis pinicola*

U radu je korištena otpadna inaktivna biomasa gljive *Fomitopsis pinicola* (slika 4) u obliku filtracijske pogače zaostale nakon ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz osušenog i samljevenog plodišta gljive. Ekstrakcija je provedena na način da je osušeno plodište gljive (čista kultura gljive iz privatne zbirke Institute for Applied Mycology and Biotechnology, Celje, Slovenija) samljeveno na mlinu (veličina čestice < 1,5 mm) te je 100 g ovako pripremljenog plodišta gljive macerirano u 10 dm<sup>3</sup> etanola kroz 12 h pri temperaturi od 20 °C. Nakon maceracije slijedila je filtracija preko vakuum nuč-filtra te je nakon toga zaostala filtracijska pogača s nuč-filtra isprana s 20 dm<sup>3</sup> etanola, osušena i dodana u 10 dm<sup>3</sup> demineralizirane vode. Ovako pripremljen materijal je steriliziran pri 121 °C i 1 bar te nakon sterilizacije filtriran preko filter papira sa staklenim vlaknima (veličine pora 100 µm). Filtracijska pogača dobivena nakon filtracije je osušena i samljevena na laboratorijskom mlinu, kako bi se mogla koristiti za pripremu novih biosorbensa (slika 4).



**Slika 4.** Inaktivna biomasa gljive *F. pinicola* korištena za pripremu novih biosorbensa u obliku filtracijske pogače prije mljevenja (A) te nakon mljevenja (B).

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive *F. pinicola* uklapanjem u kalcijev alginat

Pripremljene su dvije skupine biosorbensa. Prva skupina pripremljena je imobilizacijom inaktivne biomase korištenjem 2% otopine natrijeva alginata, pri čemu je masa inaktivne gljive iznosila 10, 20 i 30% od mase natrijevog alginata korištenog za pripremu 2% otopine. U 100 mL demineralizirane vode zagrijane pri 60 °C dodano je 2 g natrijeva alginata uz stalno miješanje do potpunog otapanja. U tako pripremljene otopine dodano je 0,2 g (uzorak S 10%), 0,4 g (uzorak S 20%) i 0,6 g (uzorak S 30%) inaktivne biomase gljive, uz kontinuirano miješanje staklenim štapićem kako bi se dobila homogena suspenzija.

Druga skupina biosorbensa pripremljena je imobilizacijom inaktivne biomase korištenjem 1% otopine natrijeva alginata, pri čemu su omjeri mase natrijeva alginata i mase inaktivne gljive iznosili 1:1, 1:1,5 i 1:2. U 100 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode zagrijane pri 60 °C dodan je 1 g natrijeva alginata uz stalno miješanje do potpunog otapanja te su nakon toga pripremljene homogene suspenzije inaktivne biomase gljive dodatkom 1 g (uzorak S 1:1), 1,5 g (uzorak S 1:1,5) i 2 g (uzorak S 1:2) biomase gljive u otopinu natrijeva alginata.

Homogene suspenzije (po 100 cm<sup>3</sup> od svake) pripremljene kako je opisano gore zatim su pomoću modificiranog lijevka za odjeljivanje (donji dio vrata lijevka modificiran je na način da mu je promjer značajno smanjen, kako bi se dobila uska cjevčica) s visine oko 15 cm dokapavane u čašu s 200 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> otopine kalcijeva klorida uz kontinuirano lagano miješanje (korištenjem magnetske miješalice), kako bi se formirale mikrosfere inaktivne biomase gljive uklopljene u u kalcijev alginat (**slika 5**). Dobivene mikrosfere ostavljene su preko noći u otopini kalcijeva klorida uz konstantno miješanje te su nakon toga odvojene od otopine filtracijom, obilno isprane demineraliziranom vodom te sušene 24 h pri 40 °C.



**Slika 5.** Aparatura za provođenje postupka imobilizacije (A) i izgled dobivenih mikrosfera biosorbensa prije i nakon sušenja (B).

### **3.3.2. Određivanje promjera mikrosfera biosorbensa**

Promjer mikrosfera biosorbensa dobivenih postupkom imobilizacije određen je korištenjem digitalnog pomičnog mjerila odmah po završetku imobilizacije (promjer mokrih mikrosfera) te nakon sušenja mikrosfera (promjer suhih mikrosfera). Od svake vrste pripremljenih biosorbensa provedeno je 30 mjerenja te je rezultat izražen kao srednja vrijednost.

### **3.3.3. Određivanje udjela vode**

Udio vode određen je termogravimetrijskom metodom korištenjem analizatora vlage. Analizator vlage sastoji se od jedinice za vaganje i jedinice za zagrijavanje (sušenje) te se određuje udio vode u uzorku sušenjem do konstantne mase (mjeri se gubitak mase uzorka tijekom sušenja). Kada uzorak prestane gubiti na težini, instrument se isključuje i izračunava udio vode.

### 3.3.4. Određivanje stupnja bubrenja pripremljenih biosorbensa

Stupanj bubrenja biosorbensa određen je gravimetrijskom metodom. U staklene bočice s čepom stavljeno je 2 g uzorka biosorbensa te je dodano 2,5 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode, kako bi cijeli uzorak bio pokriven. Temperatura je održavana konstantnom i iznosila je 25 °C. Nakon 2 sata, uzorak je izvađen iz bočice, oprezno obrisao filter papirom i izvagan. Postupak je ponavljan svaka 2 sata u vremenu od 12 sati, a zatim svaka 24 sata u ukupnom trajanju od 72 sata. Stupanj bubrenja izračunat je prema jednadžbi.

$$\alpha = \frac{(m - m_0)}{m_0} \cdot 100$$

gdje su  $m$  i  $m_0$  početna masa uzorka (g) i masa uzorka u nekom vremenu.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva ponavljanja.

### 3.3.5. Priprema otopine kongo crvenila

Otopina bojila koncentracije 50 mg/dm<sup>3</sup> pripremljena je otapanjem 50 mg kongo crvenila u 1 dm<sup>3</sup> ultračiste vode.

### 3.3.6. Šaržni adsorpcijski eksperimenti

U Erlenmeyerove tikvice volumena 100 cm<sup>3</sup> dodana je određena masa biosorbensa (koncentracija biosorbensa od 0,5 do 10 g/dm<sup>3</sup>) i 50 cm<sup>3</sup> otopine bojila koncentracije 50 mg/dm<sup>3</sup>. Tikvice su stavljene na tresilicu i pri sobnoj temperaturi, vremenu biosorpcije od 4 do 24 h i brzini miješanja od 150 okr/min provedeni eksperimenti. Nakon proteka odabranog vremena provođenja eksperimenta, sadržaj Erlenmeyerovih tikvica profiltriran je kroz nabrani filter papir i dio filtrata je centrifugiran na 6000 okr/min kroz 5 min, kako bi se dobio bistri supernatant za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije kongo crvenila (pri valnoj duljini od 498 nm) nakon procesa biosorpcije.

Postotak uklanjanja bojila izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ uklanjanja bojila} = \frac{(\gamma_0 - \gamma_t)}{\gamma_0} \cdot 100\%$$

gdje su  $\gamma_0$  i  $\gamma_t$  početna i konačna masena koncentracija bojila ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ).

Količina bojila adsorbirana po jedinici mase biosorbensa u vremenu  $t$  izračunata je korištenjem jednadžbe:

$$q_t = \frac{(\gamma_0 - \gamma_t)}{m} \cdot V$$

gdje je  $q_t$  količina bojila adsorbirana po jedinici mase biosorbensa u vremenu  $t$  ( $\text{mg}/\text{g}$ ),  $\gamma_0$  i  $\gamma_t$  su početna masena koncentracija bojila i koncentracija nakon vremena  $t$  ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ),  $m$  je masa biosorbensa ( $\text{g}$ ), a  $V$  volumen otopine bojila ( $\text{dm}^3$ ).

Rezultati šaržnih biosorpcijskih eksperimenata, koji su provedni u najmanje dva ponavljanja, izraženi su kao srednja vrijednost provedenih mjerenja.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprema novih biosorbensa imobilizacijom inaktivne biomase gljive *F. pinicola* uklapanjem u kalcijev alginat

Inaktivna biomasa gljive *F. pinicola* korištena u radu predstavlja proizvodni ostatak, odnosno otpad iz proizvodnje ekstrakta biološki aktivnih spojeva te kao takav može predstavljati opterećenje za okoliš prilikom njegova zbrinjavanja. Sve veća potražnja za proizvodima dobivenim ekstrakcijom ljekovitih gljiva, poput *F. pinicola*, rezultira povećanim količinama otpadne biomase koju je potrebno zbrinuti na odgovarajući način ili pronaći načine njezine daljnje uporabe. Slično navode Yang i suradnici (2020) i za biomasu jestive i ljekovite gljive shiitake (*Lentinula edodes*) koja se, kao svježa, u velikim količinama proizvodi i konzumira u Kini. Nakon što prođe rok trajanja, gljiva se smatra nejestivom i završava na odlagalištima otpada. S obzirom na već spomenutu činjenicu da su mnoga istraživanja pokazala kako se inaktivna biomasa različitih mikroorganizama, uključujući i gljive, pokazala kao učinkovit biosorbens za uklanjanje onečišćujućih tvari iz vode, to je jedna od mogućih primjena za obje navedene vrste otpada. Problem odvajanja vrlo malih čestica mikrobne biomase nakon završenog procesa biosorpcije (kada se koristi u suspendiranom obliku), pokušava se riješiti imobilizacijom biomase uklapanjem u neki od prirodnih polimera, poput alginata (Naga Babu i sur., 2019; Bishnoi i sur., 2007).

U radu su pripremljeni biosorbensi imobilizacijom otpadne inaktivne biomase gljive *F. pinicola* uklapanjem u kalcijev alginat. U pripremi su korištene 2% i 1% otopina natrijevog alginata te različite mase inaktivne biomase gljive dodane u otopine natrijevog alginata. Određen je promjer i udio vode mikrosfera biosorbensa prije i nakon sušenja (u trajanju 24 h) te stupanj bubrenja dobivenih biosorbensa. Rezultati su prikazani u **tablici 1**.

Iz rezultata je vidljivo da je dodatak inaktivne biomase gljive utjecao na povećanje promjera dobivenih mikrosfera biosorbensa u odnosu na mikrosfere biosorbensa bez dodatka biomase gljive (uzorci S Ca-A 2% i S Ca-A 1%), dok je suprotan učinak imao na udio vode u dobivenim mikrosferama biosorbensa. Veći udio vode imale su mikrosfere biosorbensa bez dodatka inaktivne biomase gljive. Uobičajeno se za imobilizaciju biomase mikroorganizama uklapanjem u kalcijev alginat tijekom pripreme koriste otopine natrijeva alginata od 2% ili veće (Bishnoi i sur., 2007; Arica i sur., 2004; Kacar i sur., 2002). S obzirom na cijenu natrijeva alginata, korištenje 1% otopine te dodatak veće mase inaktivne biomase gljive (koja je jeftini,



otpadni materijal) tijekom pripreme biosorbensa pokazalo se opravdanim. Daljnje smanjenje koncentracije natrijevog alginata (0,5%) uz povećanje mase inaktivne biomase gljive rezultiralo je nastajanjem mikrosfera biosorbensa koje nisu bile zadovoljavajućih karakteristika (nepravilan oblik i nedovoljna čvrstoća), pa ti rezultati nisu prikazani u radu niti su dobiveni biosorbensi uključeni u daljnja istraživanja učinkovitosti za uklanjanje kongo crvenila.

**Tablica 1.** Karakteristike dobivenih biosorbensa.

Uzorak	Promjer / mm		Udio vode		Stupanj bubrenja					Udio vode nakon 72 h bubrenja
	Prije sušenja	Poslije sušenja	Prije sušenja	Poslije sušenja	2 h	4 h	24 h	48 h	72 h	
<b>S Ca-A 2%</b>	3,4	1,47	98,09	13,98	62,52	52,67	41,63	42,42	40,61	57,70
<b>S 10%</b>	3,43	1,51	95,83	12,85	46,27	35,21	28,11	23,72	22,68	56,17
<b>S 20%</b>	3,45	1,65	95,76	12,20	42,88	33,36	28,31	25,55	24,71	54,55
<b>S 30%</b>	3,44	1,7	95,13	11,92	52,34	42,49	36,94	32,80	31,86	53,41
<b>S Ca-A 1%</b>	2,59	1,45	96,06	20,29	35,37	22,63	12,41	7,60	6,63	55,88
<b>S 1:1</b>	2,94	1,52	94,92	19,41	34,72	26,41	23,89	23,51	24,25	59,50
<b>S 1:1,5</b>	3,1	1,71	94,41	15,49	49,35	44,00	41,85	43,71	44,79	62,62
<b>S 1:2</b>	3,15	1,79	93,87	13,10	67,97	61,72	59,77	63,30	64,38	65,37

Natrijev alginat je topljiv u vodi (daje jako viskoznu otopinu), dok je kalcijev alginat gotovo netopljiv u vodi (Belalia i Djelali, 2016), što je karakteristika koja se koristi prilikom imobilizacije mikrobne biomase uklapanjem u mrežu kalcijeva alginata. Alginat u vodenim otopinama bubri, što može imati utjecaja na proces biosorpcije bojila (Kyzas i sur., 2012). Kakav će taj utjecaj biti ovisi kako o vrsti biosorbensa, tako i o vrsti adsorbata.

Iz rezultata prikazanih u **tablici 1** vidljivo je kako je stupanj bubrenja mikrosfera čistog 2% kalcijevog alginata (S Ca-A 2%) veći u odnosu na stupanj bubrenja mikrosfera pripremljenih s 2% natrijevim alginatom uz dodatak inaktivne biomase gljive, pri čemu se stupanj bubrenja uzoraka s dodatkom inaktivne biomase gljive povećava s povećanjem postotnog udjela biomase gljive. Stupanj bubrenja mikrosfera čistog 1% kalcijevog alginata (S Ca-A 1%) je značajno manji od stupnja bubrenja uzoraka s dodatkom biomase gljive, pri čemu se također stupanj bubrenja povećava s povećanjem količine dodane biomase gljive. S obzirom na već navedenu činjenicu kako bubrenje materijala može utjecati na proces biosorpcije, podatak

kako se s povećanjem količine dodane biomase gljive povećava stupanj bubrenja materijala je važan sa stajališta provedbe eksperimenata u koloni sa slojem biosorbensa. U tom slučaju biosorbens u koloni je u konstantnom kontaktu s otopinom adsorbata, jer se radi o dinamičnom kontinuiranom postupku (Kopsidas, 2016.; web 6) te bubrenje biosorbensa postaje izraženije nego u slučaju šaržnih adsorpcijskih eksperimenata čije je trajanje vremenski ograničeno.

Nakon pripreme biosorbensa i preliminarnog određivanja njihovih osnovnih karakteristika, daljnje aktivnosti svakako će uključiti njihovu detaljniju fizikalno-kemijsku i morfološku karakterizaciju.

## **4.2. Učinkovitost uklanjanja sintetskog bojila kongo crvenila primjenom dobivenih biosorbensa**

Adsorpcija, odnosno biosorpcija je najekonomičnija i jedna od najjednostavnijih metoda (s obzirom na primjenjivost) za uklanjanje bojila iz otpadnih voda. Sve su češća istraživanja kojima je za cilj istražiti potencijal prirodnih polimera (poput alginata ili hitozana) kao biosorbensa, koji bi mogli zamjeniti relativno skupe komercijalne adsorbense (Kyzas i sur., 2012).

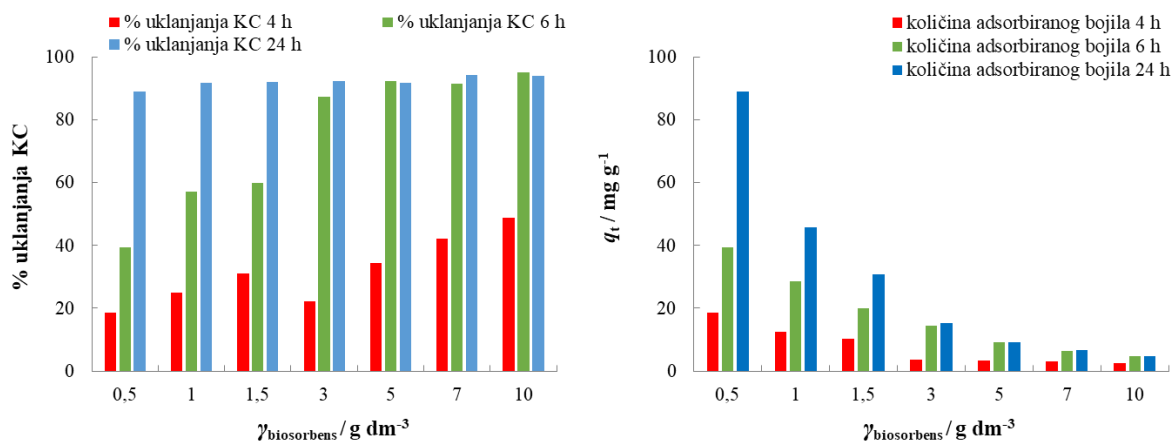
Kako bi se provjerila primjenjivost, odnosno učinkovitost dobivenih materijala kao biosorbensa, u sklopu rada su provedeni preliminarni biosorpcijski eksperimenti s ciljem uklanjanja sintetskog bojila kongo crvenila iz modelnih vodenih otopina. Provedena je serija eksperimenata koji su za cilj imali istražiti utjecaj koncentracije biosorbensa na proces biosorpcije te procijeniti okvirno vrijeme potrebno za uspostavljanje ravnotežnog stanja za potrebe provođenja budućih detaljnih biosorpcijskih eksperimenata. Uvjeti provođenja eksperimenta bili su kako slijedi:  $\gamma_{\text{biosorbens}} = 0,5 - 10 \text{ g/dm}^3$ ,  $\gamma_{\text{bojilo}} = 50 \text{ mg/dm}^3$ ,  $t = 4 - 24 \text{ h}$ ,  $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $v_{\text{miješanja}} = 150 \text{ okr/min}$ .

Dobiveni rezultati prikazani su na **slikama 6 – 10**.

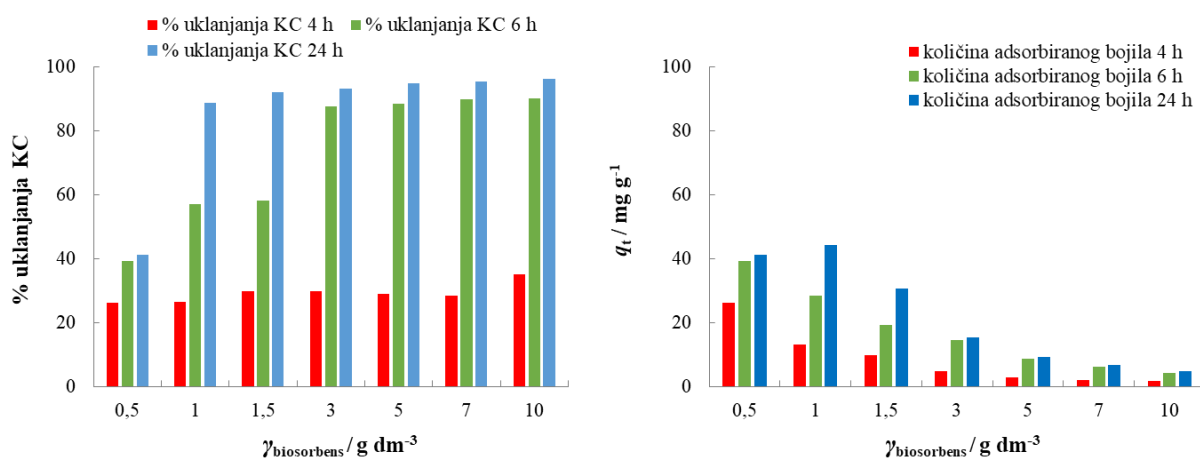
Koncentracija adsorbensa (biosorbensa) je važan parametar koji utječe na sam proces adsorpcije te definira adsorpcijski kapacitet adsorbensa (biosorbensa) pri odabranoj početnoj koncentraciji adsorbata (Bulut i Aydun, 2006). Povećanjem koncentracije adsorbensa, povećava se površina dostupna za vezanje adsorbata, odnosno povećava se broj adsorpcijskih

mjesta. S tehnološkog stajališta poželjno je da se što veća količina adsorbata ukloni iz vode, međutim, s ekonomskog stajališta, povećanje koncentracije adsorbensa je neopravdano pa je pravilan odabir koncentracije adsorbensa vrlo važan (Kukić, 2016). Još jedan važan parametar procesa je vrijeme kontakta između adsorbensa i adsorbata, pri čemu dobre adsorbense karakterizira brza adsorpcija adsorbata iz tekuće faze te brzo uspostavljanje ravnotežnog stanja.

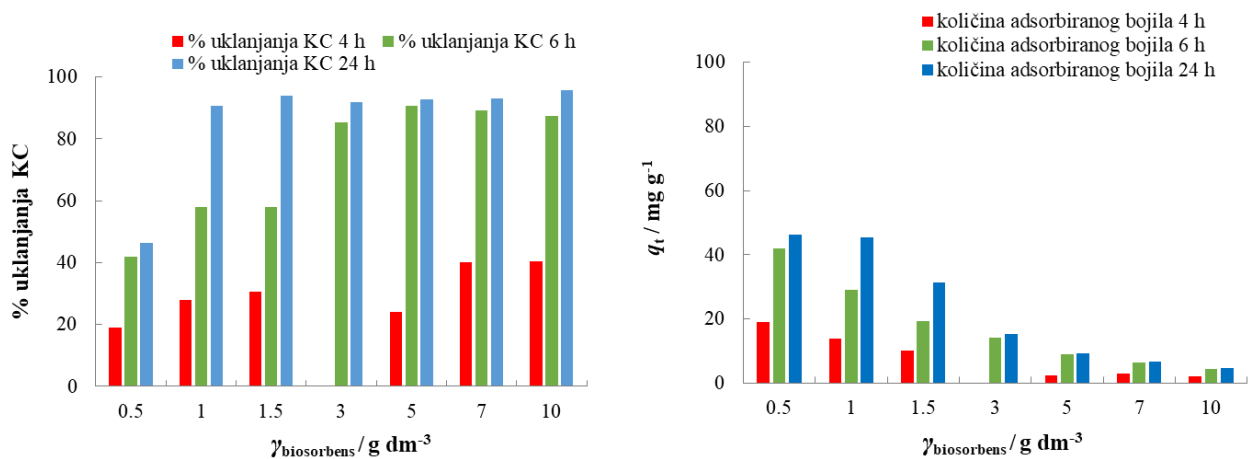
Prva serija biosorpcijskih eksperimenata provedena je s prvom skupinom biosorbensa (**slike 6 – 9**) koji su pripremljeni imobilizacijom biomase gljiva s 2% otopinom natrijeva alginata. Svi su eksperimenti provedeni pri tri različita vremena kontakta 4, 6 i 24 h i koncentracijama biosorbensa od 0,5 do 10 g/dm<sup>3</sup>. Usporedbom dobivenih rezultata vidljivo je kako je u gotovo svim eksperimentima nakon 24 h postignuto uklanjanje bojila veće od 85%, što je gotovo potpuno uklanjanje. Izuzetak su uzorci s dodatkom biomase gljiva (S 10% - S 30%) pri najmanjoj koncentraciji biosorbensa. Kako se veliki postotak uklanjanja postiže i pri malim koncentracijama biosorbensa, u slučaju ovako dugog vremena kontakta biosorbensa i adsorbata, povećanje koncentracije biosorbensa nije opravdano. Nadalje, povećanjem koncentracije biosorbensa došlo je do smanjenja količine bojila adsorbirane po jedinici mase biosorbensa ( $q_t$ ) u svim eksperimentima pri svim ispitanim vremenima kontakta. Pri vremenu kontakta od 4 h postotak uklanjanja bojila uglavnom se povećava s povećanjem koncentracije biosorbensa, ali je u svim eksperimentima iznosio manje od 40%. Pri vremenu kontakta od 6 h postotak uklanjanja bojila povećava se u svim eksperimentima od 40 do 60% s povećanjem koncentracije biosorbensa od 0,5 do 1,5 g/dm<sup>3</sup>. Daljnje povećanje koncentracije biosorbensa od 3 do 10 g/dm<sup>3</sup> nije rezultiralo značajnijim povećanjem postotka uklanjanja bojila u odnosu na onaj postignut pri koncentraciji 3 g/dm<sup>3</sup>, koji je iznosio preko 80% u svim eksperimentima.



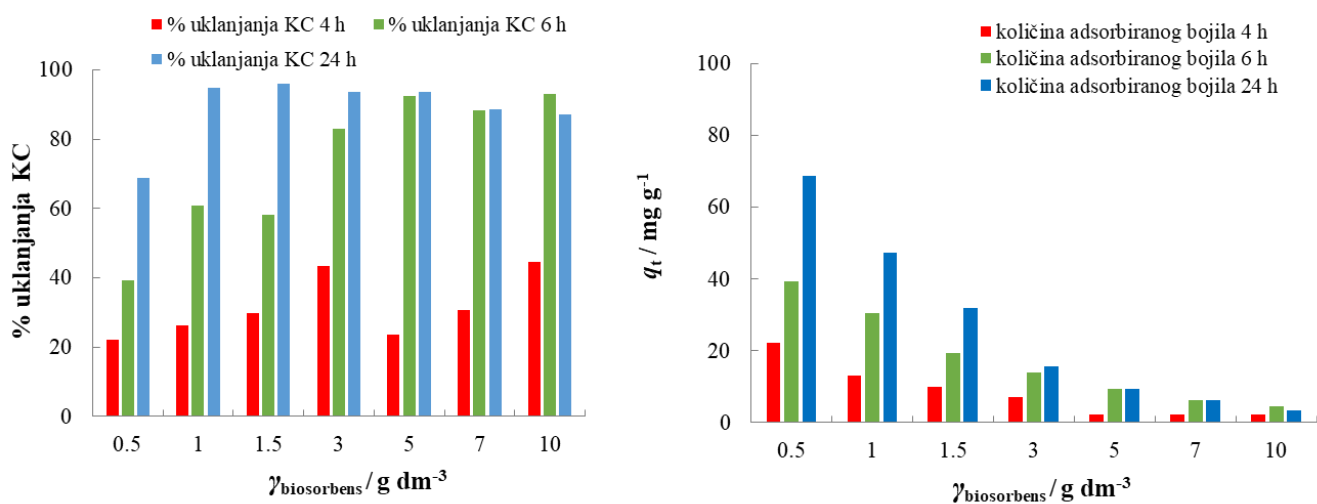
**Slika 6.** Utjecaj koncentracije biosorbensa **S Ca-A 2%** i vremena kontakta na postotak uklonjanja kongo crvenila i količinu adsorbiranog kongo crvenila po jedinici mase biosorbensa u određenom vremenu ( $\gamma_{\text{bojilo}} = 50 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $v_{\text{miješanja}} = 150 \text{ okr min}^{-1}$ )



**Slika 7.** Utjecaj koncentracije biosorbensa (**S 10%**) i vremena kontakta na postotak uklonjanja kongo crvenila i količinu adsorbiranog kongo crvenila po jedinici mase biosorbensa u određenom vremenu ( $\gamma_{\text{bojilo}} = 50 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $v_{\text{miješanja}} = 150 \text{ okr min}^{-1}$ )

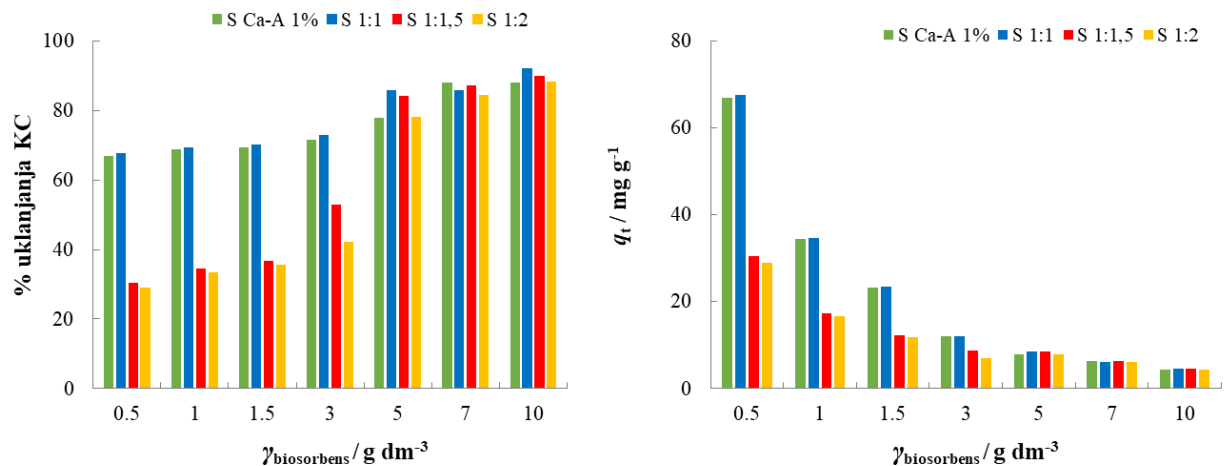


**Slika 8.** Utjecaj koncentracije biosorbensa (**S 20%**) i vremena kontakta na postotak uklanjanja kongo crvenila i količinu adsorbiranog kongo crvenila po jedinici mase biosorbensa u određenom vremenu ( $\gamma_{\text{bojilo}} = 50 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $v_{\text{miješanja}} = 150 \text{ okr min}^{-1}$ )



**Slika 9.** Utjecaj koncentracije biosorbensa (**S 30%**) na postotak uklanjanja kongo crvenila i količinu adsorbiranog kongo crvenila po jedinici mase biosorbensa ( $\gamma_{\text{bojilo}} = 50 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $v_{\text{miješanja}} = 150 \text{ okr min}^{-1}$ )

S obzirom na sve navedeno, u drugoj seriji eksperimenata koja je provedena s drugom skupinom biosorbensa (biosorbensi pripremljeni s 1% otopinom natrijeva alginata) za vrijeme kontakta između biosorbensa i adsorbata odabrano je vrijeme od 6 h, dok su ostali eksperimentalni uvjeti bili isti kao u prvoj seriji eksperimenata. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 10.



**Slika 10.** Utjecaj koncentracije biosorbensa na postotak uklanjanja kongo crvenila i količinu adsorbiranog kongo crvenila po jedinici mase biosorbensa ( $\gamma_{\text{bojilo}} = 50 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $t = 6 \text{ h}$ ,  $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $v_{\text{miješanja}} = 150 \text{ okr min}^{-1}$ )

Drugi autori koji su istraživali uklanjanje metala i bojila primjenom inaktivne biomase gljiva imobilizirane uklapanjem u kalcijev alginat navode kako su biosorbensi s dodatkom biomase gljive učinkovitiji (postigne se veći postotak uklanjanja bojila te veći  $q_t$ ) u odnosu na čisti kalcijev alginat kao biosorbens (Bishnoi i sur., 2007; Arica i sur., 2004; Kacar i sur., 2002). Kako rezultati dobiveni u prvoj seriji eksperimenata ovog istraživanja nisu potvrdili navedene rezultate drugih autora, pripravljena je druga skupina biosorbensa s otopinom natrijeva alginata manje koncentracije (1%) te sa značajno većom masom inaktivne biomase gljive, u odnosu na prvu skupinu biosorbensa. Na taj način pokušala se povećati učinkovitost biosorbensa s dodatkom biomase gljive, uz istovremeno smanjenje količine skupog natrijeva alginata korištenog za pripremu biosorbensa. Unatoč činjenici kako se inaktivna biomasa *F. pinicola* korištena kao biosorbens u suspendiranom obliku pokazala vrlo učinkovitom za uklanjanje kationskih bojila

metilenskog modrila i malahitnog zelenila (Katić, 2020.; Kamenjaš, 2022), iz **slike 10** je vidljivo kako njezinom imobilizacijom uklapanjem u 1% kalcijev alginat nije postignuto očekivano povećanje učinkovitosti u odnosu na čisti kalcijev alginat. Od svih pripremljenih uzoraka jedino je uzorak S 1:1, u čijoj je pripremi dodana najmanja količina biomase gljive, pokazao neznatno veću učinkovitost u odnosu na uzorak čistog kalcijevog alginata S Ca-A 1%. Ostali uzorci su pri manjim koncentracijama biosorbensa od 0,5 do 3 g/dm<sup>3</sup> pokazali značajno manju učinkovitost od uzorka S Ca-A 1%, dok su pri većim koncentracijama biosorbensa od 5 do 10 g/dm<sup>3</sup> bili jednako učinkoviti. Kao i u prvoj seriji eksperimenata, povećanjem koncentracije biosorbensa došlo je do smanjenja količine bojila adsorbirane po jedinici mase biosorbensa, što je očekivani rezultat.

Svi rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na potrebu daljnjih istraživanja koja će uključivati detaljnije biosorpcijske eksperimente, u kojima će se ispitati učinkovitost pripremljenih biosorbensa pri različitim početnim koncentracijama bojila, različitim pH vrijednostima okoline te različitim temperaturama. Nadalje, potrebno je usporediti i učinkovitost biosorbensa prije sušenja i nakon sušenja.

## 5. ZAKLJUČCI

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

- Novi biosorbensi pripremljeni su imobilizacijom različitih masa otpadne inaktivne biomase gljive *F. pinicola* uklapanjem u 1% i 2% kalcijev alginat
- Dodatak inaktivne biomase gljive utjecao je na povećanje promjera te smanjenje udjela vode dobivenih mikrosfera biosorbensa u odnosu na mikrosfere biosorbensa bez dodatka biomase gljive
- Stupanj bubrenja mikrosfera biosorbensa s dodatkom inaktivne biomase gljive povećava se s povećanjem udjela biomase gljive
- Primjenjivost dobivenih materijala kao biosorbensa ispitana je provedbom preliminarnih biosorpcijskih eksperimenata s ciljem uklanjanja sintetskog bojila kongo crvenila iz modelnih vodenih otopina, pri čemu je ispitan utjecaj koncentracije biosorbensa i vrijeme kontakta između biosorbensa i adsorbata
- Korištenjem biosorbensa pripremljenih s 2% otopinom natrijeva alginata pri vremenu kontakta 24 h postignut je postotak uklanjanja bojila veći od 85% u svim eksperimentima. Pri vremenu kontakta 6 h postignut je postotak uklanjanja bojila veći od 80%, kada je koncentracija biosorbensa bila veća ili jednaka  $3 \text{ g/dm}^3$
- Uspješno su pripremljeni biosorbensi sa smanjenim udjelom natrijeva alginata (1%) i povećanim udjelom biomase gljive te je ispitana njihova učinkovitost kao biosorbensa. Iako su svi dobiveni biosorbensi pri koncentracijama većima od  $3 \text{ g/dm}^3$  pokazali velik postotak uklanjanja bojila, nije postignuto očekivano povećanje učinkovitosti u odnosu na uzorak bez dodatka biomase gljive (S Ca-A 1)
- Od svih pripremljenih uzoraka jedino je uzorak S 1:1, u čijoj je pripremi dodana najmanja količina biomase gljive, pokazao neznatno veću učinkovitost u odnosu na uzorak čistog kalcijevog alginata S Ca-A 1%
- Svi rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na potrebu daljnjih istraživanja koja će uključivati detaljniju fizikalno-kemijsku i morfološku karakterizaciju biosorbensa te provedbu opsežnijih biosorpcijskih eksperimenata



## 6. LITERATURA

- Abdallah R, Taha S: Biosorption of methylene blue from aqueous solution by nonviable *Aspergillus fumigatus*. *Chemical Engineering Journal* 195-196:69-76, 2012.
- Aksu Z, Karabayir G: Comparison of biosorption properties of different kinds of fungi for the removal of Gryfalan Black RL metal-complex dye. *Bioresource Technology* 99: 7730-7741, 2008.
- Anjaneyulu Y, Chary NS, Suman Raj DS: Decolorization of industrial effluents – available methods and emerging technologies. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4:245-273, 2005.
- Arica MY, Bayramoğlu G, Yılmaz M, Bektaş S, Genç O: Biosorption of  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$  by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia trogii*. *Journal of Hazardous Materials* 109: 191-199, 2004.
- Arica MY, Sharif FA, Alaeddinoglu NG, Hasirci N, Hasirci V: Covalent immobilization of *Aspergillus-niger* on phema membrane—application to continuous flow reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 58:281–5, 1993.
- Asgher M, Bhatti HN: Decolorization potential of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs. *Biodegradation* 18:311-6, 2007.
- Barragán BE, Costa C, Márquez MC: Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments* 75:73-81, 2007.
- Bayramoglu, G, Celik G, Arica MY: Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. *Journal of Hazardous Materials B137* 137(3):1689-97, 2006.
- Belalia F, Djelali NE: Investigation of swelling/adsorption behavior of calcium alginate beads. *Revue Roumaine de Chimie* 61:747-754, 2016.
- Bishnoi NR, Rajender K, Bishnoi K: Biosorption of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca-alginate beads. *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 657-664, 2007.

Bulut Y, Aydin H: A kinetics and thermodynamics study of methylene blue adsorption on wheat shells. *Desalination* 194: 259-267, 2006.

Cassidy MB, Lee H, Trevors JT: Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 79–101, 1996.

Clarck BJ, Morris M: *Wastewater Engineered, Treatment, Disposal and Reuse*, 3rd edition, New York, Metcalf and Eddy Inc, 1991.

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

Crini G, Badot PM: Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. *Progress in Polymer Science* 33(4): 399-447, 2008.

Cristóvão RO, Tavares APM, Ribeiro AS, Loureiro JM, Boaventura RAR, Macedo EA: Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresource Technology* 99:4768-74, 2008.

Dabrowski A: Adsorption: From theory to practice. *Advances in Colloid and Interface Science* 93: 135–224, 2001.

Derco J, Vrana B: Introductory Chapter: Biosorption, *Biosorption*, Intech Open, Slovačka, 2018.

Dotto GL, McKay G: Current scenario and challenges in adsorption for water treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8:4, 2020.

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*, Scrivener Publishing, Beverly, MA, USA, 2015.

Fomina M, Gadd GM: Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology* 160:3-14, 2014.

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

Franco DSP, Dotto GL: A Short Analysis of Biosorbents and its Potential Removal Contaminants from Aqueous Media. *Global Journal of Engineering Sciences* 5:2, 2020.

Gadd GM: Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:13-28, 2009.

Georgiou D, Melidis P, Aivasidis A: Use of a microbial sensor-inhibition effect of azo-reactive dyes on activated sludge. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25: 79-83, 2002.

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

Gupta S, Sundarajan M, Rao KVK: Tumor promotion by metanil yellow and malachite green during rat hepatocarcinogenesis is associated with dysregulated expression of cell cycle regulatory proteins. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 23:301–312, 2003.

Hunger K: Application. *Industrial Dyes-Chemistry, Properties*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003.

Imran M, Crowley DE, Khalid A, Hussain S, Waseem Mumtaz M, Arshad M: Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14:73-92, 2015.

Kaçar Y, Arpa Ç, Tan S, Denizli A, Genç Ö, Arica MY: Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 37(6) 601-610, 2002.

Kamenjaš M: Uklanjanje kationskog bojila malahitnog zelenila iz vode biosorpcijom na otpadnu inaktivnu biomasu gljive *Fomitopsis pinicola*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.

Kapdan IK, Kargi F, McMullan G, Marchant R: Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dye by *C. Versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 26:381-7, 2000.

Katić M: Biosorpcijski potencijal inaktivne biomase gljive *Fomitopsis pinicola* za uklanjanje metilenskog modrila iz modelnih otopina. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2020.

Kumar MNV, Sridhari TR, Bhavani KD, Dutta PK: Trends in color removal from textile mill effluents. *Bioresource Technology* 77:25–34, 1998.

Kukić D: Biosorpcija jona teških metala iz vode izluženim rezancima šećerne repe. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2016.

Kyzas GZ, Lazaridis NK, Kostoglou M: Modelling the effect of pre-swelling on adsorption dynamics of dyes by chitosan derivatives. *Chemical Engineering Science* , 81:220-230, 2012.

Leenen E, DosSantos VAP, Grolle KCF, Tramper J, Wijffels RH: Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research* 12: 2985-2996, 1996.

Lisjak Z: Uzgoj gljiva. Zadružna štampa, Zagreb, 1989.

Longhinotti E, Pozza F, Furlan L, Sanchez MNM, Klug M, Laranjeira MCM, Fávere VT: Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 99:435–440, 1998.

Lopez A, Lazaro N, Marques AM: The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads. *The Journal of Microbiological Methods* 30:231-234, 1997.

Mahmoud DAR, Helmy WA: Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production (Review Article). *Journal of Applied Sciences Research* 5(12):2466-2476, 2009.

Mallick N: Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals* 15:377-390, 2002.

Martins SCS, Martins CM, Fiúza LMCG, Santaella ST: Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology* 12(28): 4412-4418, 2013.

Mittal A, Mittal J, Malviya A, Gupta VK: Adsorptive removal of hazardous anionic dye "Congo red" from wastewater using waste materials and recovery by desorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 340:16-26, 2009.

Mustapha MU, Halimoon N: Microorganisms and biosorption of heavy metals in the environment. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 7:253-256, 2015.

Naga Babu A, Raja Sree T, Srinivasa Reddy D, Suresh Kumar G, Krishna Mohan GV: Experimental and Statistical Analysis of As(III) Adsorption from Contaminated Water using Activated Red mud Doped Calcium-Alginate Beads. *Environmental Technology*, 2019.

Oakes J, Gratton P: Kinetic investigations of azo dye oxidation in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 9:1857-64, 1998.

Paska OM, Pecurariu C, Muntean S: Kinetic and thermodynamic studies on methylene blue biosorption using corn-husk. *RSC Adv.* 4: 62621–62630, 2014.

Patel H, Vashi RT: Removal of Congo Red dye from its aqueous solution using natural coagulants. *Journal of Saudi Chemical Society* 16:131-136, 2012.

Patel SJ: Review on Biosorption of Dyes by Fungi. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 5:1115-1118, 2016.

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

Pravica J: Fomitopsis pinicola – crvenoruba guba (<http://nuta-ljekovite-gljive.hr/blog-crvenoruba-guba.html>), 2018.

Raghuvanshi, SP, Singh R, Kaushik CP: Kinetics study of methylene blue dye Bioadsorption on baggase. *Applied Ecology and Environmental Research* 2:35–43, 2004.

Ramakrishna SV, Prakasha RS: Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*. 77:87-100, 1999.

Rehman K, Shahzad T, Sahar A, Hussain S, Mahmood F, Siddique MH, Siddique MA, Rashid MI: Effect of reactive 5 azo dye on soil processes related to C and N cycling. *PeerJ*, 6, e4802, 2018.

Sağ Y: Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: A Review. *Separation and Purification Methods* 30:1-48, 2001.

Shin M, Nguyen T, Ramsay J: Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:218–23, 2002.

Siva R: Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science* 92:916-925, 2007.

Slokar YM, Le Marechal AM: Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes and Pigments* 37:335–356, 1998.

Supaka N, Juntongjin K, Damronglerd S, Delia ML: Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chemical Engineering Journal* 99:169-76, 2004.

Štrkalj, A: Onečišćenje i zaštita voda. Nastavni materijali, Metalurški fakultet, Sisak, 2014.

Tobin JM, White C, Gadd GM: Accumulation by fungi: applications in environment biotechnology. *Journal of industrial microbiology* 13:126-130, 1994.

Unlu M, Yukseler H, Yetis U: Desalination, 240:178–185, 2009.

Uttariya R, Manna S, Sengupta S, Das P, Datta S, Mukhopadhyay A, Bhowal A: Dye removal using microbial biosorbents. *Green adsorbents for pollutant removal*, str. 253-280, 2018.

Vandervivere PC, Bianchi R, Verstraete W: Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 72:289-302, 1998.

Velić N: Uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda upotrebom lignoceluloznog otpada prehrambene industrije kao adsorbensa. Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije, 203-226, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2017.

Verma M, Brar SK, Blais JF, Tyagi RD, Surampalli RY: Aerobic biofiltration processes-advances in wastewater treatment. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 10:264-276, 2006.

Vikrant K, Giri BS, Raza N, Roy K, Kim KH, Rai NB, Singh RS, Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresource Technology*, 253:355-367, 2018.

Wycliffe CW, Mmari Onyari J, Mwanza Shiundu P: Adsorption of Congo Red Dye from Aqueous Solutions Using Roots of *Eichhornia crassipes*: Kinetic and Equilibrium Studies. *Energy Procedia* 50: 862-869, 2014.

Yang K, Li Y, Zheng H, Luan X, Li H, Wang Y, Du Q, Sui K, Li H, Xia Y: Adsorption of Congo red with hydrothermal treated shiitake mushroom. *Materials Research Express* 7, 2019.

Zacheus OM, Iivanainen EK, Nissinen TK, Lehtola MJ, Martikainen PJ: Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Water Research* 34:63-70, 2000.

Web 1: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22411>

Web 2: [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/gljive\\_truleznice](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/gljive_truleznice)

Web 3: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=8466>

Web 4: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=5599>

Web 5: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22411>

Web 6: <https://www.researchgate.net/profile/Odysseas>

[Kopsidas/publication/322223640\\_SCALE\\_UP\\_OF\\_ADSORPTION\\_IN\\_FIXED-BED\\_COLUMN\\_SYSTEMS/links/5a4ca7520f7e9b8284c3e666/SCALE-UP-OF-ADSORPTION-IN-FIXED-BED-COLUMN-SYSTEMS.pdf](https://www.researchgate.net/publication/322223640_SCALE_UP_OF_ADSORPTION_IN_FIXED-BED_COLUMN_SYSTEMS/links/5a4ca7520f7e9b8284c3e666/SCALE-UP-OF-ADSORPTION-IN-FIXED-BED-COLUMN-SYSTEMS.pdf)

Web 7: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Kongo\\_crvenilo](https://hr.wikipedia.org/wiki/Kongo_crvenilo)