Obezbojenje sintetskih bojila na agarnim pločama odabranim gljivama

Pavičić, Mirjana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:888938

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

Mirjana Pavičić

Obezbojenje sintetskih bojila na agarnim pločama odabranim gljivama

diplomski rad

Osijek, prosinac 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Procesi obradbe otpadnih voda
Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2014./2015. održanoj 26. svibnja 2015. godine
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić* (mentor)
Komentor: izv.prof.dr.sc. *Hrvoje Pavlović*

Obezbojenje sintetskih bojila na agarnim pločama odabranim gljivama

Mirjana Pavičić, 247/DI

Sažetak: U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja pet sintetskih bojila (kongo crvena, malahitno zelenilo, fuksin, kristal violet i metilensko modrilo) pomoću tri vrste (četiri soja) odabranih gljiva bijelog truljenja: *P. chrysosporium* CCBAS 570, *T. versicolor* CCBAS AG613, *T. versicolor* TV6 i *C. subvermispora*. Gljive su uzgajane na agarnim pločama s dodatkom bojila u koncentracijama 50, 100 i 150 mg L^{-1} te je praćen njihov rast i obezbojenje bojila tijekom 9 (odnosno 10) dana uzgoja pri 27 ^{o}C. Sposobnost obezbojenja azo bojila kongo crvene pokazali su sojevi vrste *T. versicolor* i *C. subvermispora*. Kongo crvena nije značajno inhibirala rast odabranih vrsta gljiva. Malahitno zelenilo snažno je inhibiralo rast svih vrsta, ali su sve vrste pokazale dobru sposobnost obezbojenja ovog bojila, što je vidljivo iz velikog indeksa obezbojenja (promjer obezbojenja/promjer kolonije) u rasponu od 2,42 do 6,04. Sposobnost obezbojenja kristal violeta pokazale su sve vrste gljiva, pri čemu je rast vrsta *P. chrysosporium* i *C. subvermispora* bio snažno inhibiran ovim bojilom. Fuksin je inhibirao rast odabranih gljiva samo tijekom prvih dana uzgoja. Sposobnost obezbojenja fuksina pokazale su sve vrste, ali indeks obezbojenja nije bio velik (0,24 – 1). Metilensko modrilo nije inhibiralo rast gljiva, ali je sposobnost obezbojenja ovog bojila pokazala jedino vrsta *T. versicolor* TV6. Utvrđeno je kako primijenjene koncentracije bojila u podlozi statistički značajno utječu na rast kolonija gljiva, ali nije utvrđena statistički značajna razlika u sposobnosti obezbojenja (izraženo kao promjer obezbojenja oko kolonije).

Ključne riječi: sintetska bojila, *P. chrysosporium, T. versicolor*, *C. subvermispora*, obezbojenje

Rad sadrži: 43 stranica
13 slika
7 tablica
66 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 17. prosinca 2015.

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. VIII held on 26th May 2015
Supervisor:	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.
Co-supervisor:	*Hrvoje Pavlović, PhD*, associate prof.

Synthetic dyes decolorization on agar plates by selected fungi

Mirjana Pavičić, 247/DI

Summary: This study tested three white rot fungi (four strains) *P. chrysosporium* CCBAS 570, *T. versicolor* CCBAS AG613, *T. versicolor* TV6 and *C. subvermispora* for their ability to decolorize five synthetic dyes (Congo Red, Malachite Green, Crystal Violet, Fuchsine and Methylene Blue). The fungi were cultivated at 27 ^{o}C for 9 (10) days on agar plates containing dyes at final concentrations of 50, 100 and 150 mg L-1. The radial growth and the zone of colour change on the agar plates were measured regularly every three days. Both *T. versicolor* strains, as well *C. subvermispora* were able to decolorize azo dye Congo Red to some extent. Congo Red did not inhibit the mycelial growth of investigated fungi. Malachite Green strongly inhibited the mycelial growth of all fungal strains. However, high decolourization index (decolourization diameter/mycelial diameter) ranging from 2.42 to 6.04 for all species indicates very good decolourization ability. All fungi were able to decolorize Crystal Violet to some extent. However, apart from *P. chrysosporium*, growth of all other strains was strongly inhibited by this dye. Fuchsine inhibited the mycelial growth only during the first days of cultivation. All strains were able to decolorize fuchsine, but not as effectively as other two dyes of triphenylmethane group (decolourization index ranging from 0.24 to 1). Only *T. versicolor* TV6 decolorized Methylene Blue to some extent, even though this dye did not inhibit the mycelial growth of the tested fungal strains. The influence of agar plate dye concentration on fungal growth was statistically significant, while no statistical significance was observed regarding the decolourization ability.

Key words: synthetic dyes, *P. chrysosporium, T. versicolor, C. subvermispora* , decolourization

Thesis contains: 43 pages
13 figures
7 tables
66 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Marina Tišma*, PhD, assistant prof.	chair person
2.	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.	supervisor
3.	*Hrvoje Pavlović*, PhD, associate prof.	co-supervisor
4.	*Mirna Habuda-Stanić*, PhD, assistant prof.	stand-in

Defense date: 17. December 2015.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Velić na pristupačnosti, ljubaznosti, poticanju, savjetima te ogromnoj pomoći prilikom izrade ekperimentalnog i teorijskog dijela diplomskog rada.

Veliko hvala komentoru izv. prof. dr. sc. Hrvoju Pavloviću na želji, vremenu, znanju, trudu i pomoći koje je uložio u izradu ekperimentalnog i teorijskog dijela diplomskog rada..

Zahvaljujem braći što su me spriječili svaki put kada bih počela sumnjati u sebe.

Posebno se zahvaljujem roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, odricanju, podršci, razumjevanju te što su mi sve ove godine davali potreban „vjetar u leđa".

Hvala prabaki Jelici...

SADRŽAJ

1.UVOD 1

1. UVOD 2

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Bojila 4

2.1.1. Podjela bojila 4

2.1.1.1. Kongo crvena 6

2.1.1.2. Malahitno zelenilo 7

2.1.1.3. Fuksin 7

2.1.1.4. Kristal violet 8

2.1.1.5. Metilensko modrilo 9

2.1.2. Utjecaj sintetskih bojila na okoliš 9

2.1.3. Uklanjanje bojila iz obojenih otpadnih voda 10

2.2. Gljive 12

2.2.1. Gljive bijelog truljenja i njihova primjena za uklanjanje bojila 13

2.2.1.1. Phanerochaete chrysosporium 15

2.2.1.2. Trametes versicolor 15

2.2.1.3. Ceriporiopsis subvermispora 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO 17

3.1. Zadatak 18

3.2. Materijali 18

3.2.2. Bojila 18

3.2.2. Mikroorganizmi 18

3.2.3. Kemikalije 18

3.2.4. Aparatura i pribor 19

3.3. Metode 19
3.3.1. Priprema podloge i uzgoj radnog mikroorganizma 19
3.3.2. Priprema obojenih hranjivih podloga za istraživanje sposobnosti obezbojenja 20
3.3.3. Statistička obrada 21
4. REZULTATI I RASPRAVA 22
5. ZAKLJUČCI 35
6. LITERATURA 37

1.UVOD

1. UVOD

Sintetska bojila ubrajaju se u skupinu vrlo opasnih onečišćujućih tvari, koje putem industrijskih otpadnih voda dospijevaju u okoliš. Kako se radi o kemijski vrlo stabilnim spojevima, njihovo uklanjanje iz okoliša zahtijeva primjenu složenih i dugotrajnih procesa. Bojila smanjuju prodiranje svjetlosti u vodu, što rezultira smanjenom koncentracijom kisika u vodotocima. Nadalje, ona djeluju toksično i genotoksično na vodene ekosustave te, također, pokazuju mutageni i kancerogeni učinak na ljude (Saratale i sur., 2011). Zbog svega navedenog, važno je ukloniti bojila iz obojenih otpadnih voda prije njihova ispuštanja u okoliš.

Najčešće se za uklanjanje bojila iz otpadnih voda koriste fizikalno-kemijske metode poput adsorpcije, koagulacije, filtracije, kemijske razgradnje, primjene naprednih oksidacijskih procesa, itd. Primjena ovih metoda često je financijski, metodološki i vremenski vrlo zahtjevna, pri čemu se, nužno, ne postiže visoka učinkovitost. Biološke metode uklanjanja bojila iz obojenih otpadnih voda koje uključuju razgradnju, transformaciju ili adsorpciju bojila pomoću mikroorganizama predmet su intenzivnih istraživanja. Gljive bijelog truljenja skupina su mikroorganizama koja se najintenzivnije proučavaju u tu svrhu, ali i u druge svrhe poput razgradnje ksenobiotika, razgradnje lignocelulolozniih materijala s ciljem proizvodnje biogoriva, proizvodnje enzima, itd. (Eichlerová i sur., 2006; Forgacs i sur., 2004; Wesenberg i sur., 2003). Enzimski sustavi ovih gljiva, koji uključuju izvanstanične enzime odgovorne za razgradnju lignina, omogućuju im razgradnju različitih ksenobiotika poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila, pesticida i sintetskih bojila (Elisashavili i sur., 2009). U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja različitih sintetskih bojila pomoću odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja na agarnim pločama, što je metoda koja se koristi za probir vrsta koje posjeduju potencijal za daljnju biotehnološku primjenu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bojila

Bojila su tvari koje imaju sposobnost apsorpcije svjetlosti u vidljivom dijelu spektra, odnosno svjetlosnih valnih duljina u rasponu od 380 do 760 nm. Koriste se za bojenje različitih materijala kao što su tekstilna vlakna, koža, papir, polimerni materijali, farmaceutski preparati, itd. Neka tvar pokazuje obojenost ako apsorbira dio svjetlosti koja na nju pada, dok njezina boja ovisi o preostalom dijelu svjetlosti koji se propušta ili reflektira (Klarić, 2008). Tvari koje pokazuju obojenost povezuje zajedničko kemijsko svojstvo, a to je nezasićenost veza u strukturi njihovih molekula. Nadalje, molekule bojila sastoje se od kromofornih skupina, koje su odgovorne za selektivnu apsorpciju svjetlosti i nositelji su obojenosti. Najvažnije kromoforne skupine su karbonilna (–C=O), etilenska (–C=C–) i nitrozo-skupina (–N=O), azo-skupina (–N=N–). Spoj koji sadrži kromofornu skupinu i konjugirane dvostruke veze naziva se kromogen. Međutim, kromogen je tvar koja ne posjeduje posebni afinitet prema tekstilnom ili nekom drugom materijalu, pa se kao takvi ne koriste za bojanje. Tek kada se uvede tzv. auksokromna skupina kromogen postaje tehničko bojilo. Amino ($-NH_2$), hidroksilna (−OH), karboksilna (−COOH) i sulfonska ($-SO_3H$) skupina su najvažnije auksokromne skupine (Vujević, 2007).

2.1.1. Podjela bojila

Bojila se dijele prema podrijetlu na prirodna i sintetska (Vujević, 2007). Prirodna bojila mogu se dalje prema podrijetlu podijeliti na biljna, mineralna i životinjska. Prirodna bojila se, danas, vrlo malo koriste zbog visoke cijene i slabe učinkovitosti u odnosu na sintetska bojila. Sintetska bojila dobivaju se kemijskom sintezom u velikim količinama te su stoga znatno jeftinija od prirodnih bojila, ali ih odlikuje i već spomenuta kemijska stabilnost i visoka učinkovitost bojenja različitih materijala. Postoje različite podjele sintetskih bojila, od kojih se često koriste podjele prema kemijskim svojstvima te načinu primjene.

Ovisno o kemijskom svojstvima (kromoforne grupe, struktura, način dobivanja) sintetska bojila je moguće podijeliti u sljedeće skupine:

- azo: monoazo, diazo, poliazo
- trifenilmetanska

- tiazolna
- nitrozo
- nitro
- pirazolonska
- ksantenska
- antrakinonska
- kinoniminska
- ketonimidna
- indigoidna
- kinolinska
- sumporna (https://www.ktf.unist.hr/index.php/zot1/nastavni-materijalizot/nastavni-materijali?download=2338:procesi-organske-industrije-predavanja-i-dio).

Prema načinima primjene, bojila dijelimo na:

- bojila koja se otapaju u vodi (bazična, kisela, kiselomočilska, reaktivna, metalokompleksna, leuko-esterska, supstantivna ili direktna)
- bojila koja se ne otapaju u vodi (redukcijska, pigmentna, disperzna, topljiva u mastima i ulju, obojeni lakovi)
- bojila koja se grade na vlaknu (oksidacijska bojila, bojila tipa naftola AS i bojila za fotografije u boji) (Venkataraman, 1970).

Sintetska bojila, većinom, su organske prirode i aromatske strukture (benzenski i/ili naftalenski tip) (Gudelj i sur., 2011) te spadaju u skupinu ksenobiotičkih spojeva koji se teško razgrađuju u okolišu (Yu i Wen, 2005). Između ostalih svojstava, bojila moraju biti postojana tijekom pranja i otporna na kemijsko i mikrobiološko djelovanje te na djelovanje svjetlosti, što za posljedicu ima njihovo dugo zadržavanje u okolišu, odnosno tešku razgradnju (Adedayo i sur, 2004).

Najvažniju skupinu sintetskih bojila čine *azo bojila*, koje karakterizira postojanje jedne ili više dušičnih veza (–N=N–) između aromatskih prstenova te koja čine 70 % svih bojila koja se koriste (Adedayo i sur, 2004). Azo bojila imaju širok spektar primjene i to u tekstilnoj

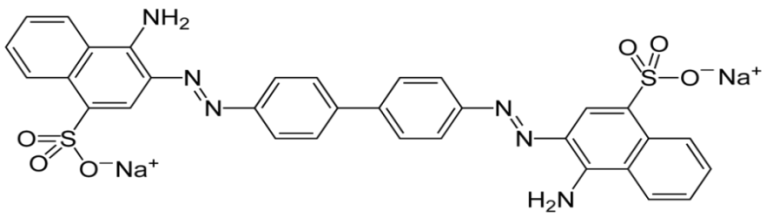
industriji (za bojanje sintetskih i prirodnih materijala), industriji kože, papira, plastičnih masa i sl. (Lubs, 1955). *Kongo crvena* primjer je diazo bojila.

Trifenilmetanska bojila produkti su trifenilmetana, čine ih tri arilne skupine koje su supstituirane s hidroksilnim, amino ili sulfonskim skupinama (https://www.ktf.unist.hr/index.php/zot1/nastavni-materijali-zot/nastavni materijali?download=2338:procesi-organske-industrije-predavanja-i-dio). Posjeduju negativan utjecaj na okoliš te se generalno smatraju kancerogenim i toksičnima (Azimi i sur., 1998; Cheriaa i sur., 2012; https://www.ktf.unist.hr/index.php/zot1/nastavni-materijali-zot/nastavnimaterijali?download=2338:procesi-organske-industrije-predavanja-i-dio). U skupinu trifenilmetanskih bojila ubrajaju se *malahitno zelenilo*, *fuksin* i *kristal violet* koji su korišteni u ovom radu.

Tijazinska (bazična) bojila sadrže tijazinsku skupinu u kromofornom dijelu. Ne otapaju se u vodi te stoga tvore koloidnu otopinu. Tijazinska bojila su pogodna za bojenje celuloznih vlakana te se često koriste za bojanje tkanina (http://thiazoledyeschemistry.blogspot.hr/). U bazična tijazinska bojila ubraja se *metilensko modrilo* također korišteno u eksperimentalnom dijelu ovoga rada.

2.1.1.1. Kongo crvena

Kongo crvena je smeđecrveni prah bez mirisa, kemijske formule $C_{32}H_{22}O_6N_6S_2Na_2$ (**Slika 1**). Ubraja se u skupinu azo bojila (Spadaro i sur., 1992) a dobiva se iz naftionske kiseline i benzidina. Koristi se za bojenje preparata u medicini, za bojenje celuloznih vlakna poput pamuka i druga regeneriranih biljnih vlakna te kao indikatorsko bojilo (http://enciklopedija.lzmk.hr/clanak.aspx?id=19913).

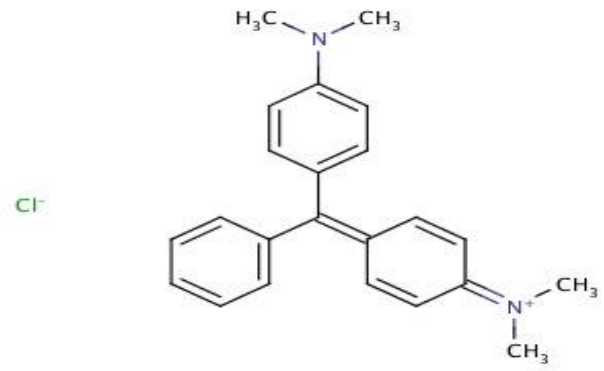


Slika 1 Strukturna formula kongo crvene

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

2.1.1.2. Malahitno zelenilo

Malahitno zelenilo kristalni je prah kemijske formule $[C_6H_5C(C_6H_4N(CH_3)_2)_2]Cl$ (**Slika 2**). Boja mu je nalik na kristal malahit (Cheriaa, 2012). Malahitno zelenilo bazično je bojilo trifenilmetanskog reda. Kao bojilo se koristi u tekstilnoj industriji za bojenje pamuka, svile, vune, jute, a koristi se i u industriji papira i kože. Malahitno zelenilo ima primjenu i u kozmetičkoj industriji, prehrambenoj industriji kao prehrambeni aditiv, a koristiti se i u mikrobiologiji kao baktericid i fungicid (Ogugbue, 2011; Azmi, 1998; Cheriaa, 2012). Malahitno zelenilo je toksično i kancerogeno te negativno utječe na okoliš (Cheriaa, 2012.). Posjeduje štetan utjecaj na jetru, crijeva, bubrege i spolne žlijezde vodenih organizama (Srivastva i sur., 2004). Kod gutanja ili udisanja malahitno zelenilo može u ljudi uzrokovati iritacije gastrointestinalnog trakta, a u kontaktu s kožom izaziva iritacije (Garg i sur., 2004).

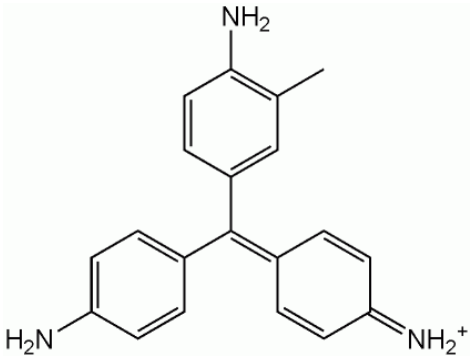


Slika 2 Strukturna formula malahitnog zelenila

(http://www.scbt.com/datasheet-211766-malachite-green.html).

2.1.1.3. Fuksin

Fuksin je bojilo trifenilmetanskog reda, koje je u čvrstom stanju sjajne zelene boje, dok je vodena otopina fuksina intenzivne crvene boje. Kemijska formula fuksina je $C_{20}H_{21}ClN_3$ (**Slika 3**). Poznat je kao jedno od prvih katranskih bojila za tekstil, međutim zbog svoje slabe postojanosti danas se koristi kao bojilo za papir te za bojenje u mikrobiologiji (http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=20798).

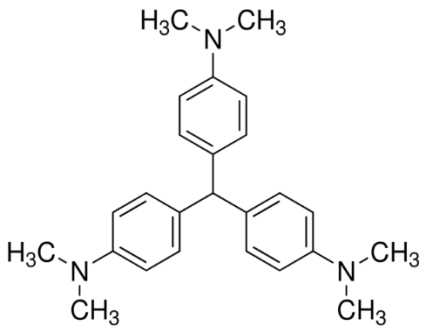


Slika 3 Strukturna formula fuksina

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

2.1.1.4. Kristal violet

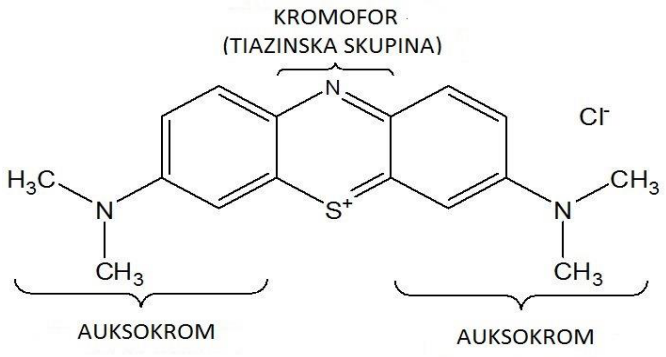
Kristal violet je u čvrstom stanju tamnozeleni prah, kemijske formule $C_{25}H_{31}N_3$ te se ubraja u skupinu trifenilmetanskih bojila (**Slika 4**). Za razliku od prethodno navedenih bojila, kristal violet se ne koristi se kao boja za tekstil. Umjesto toga, koristi se za bojanje papira, kao komponenta za dobivanje mornarsko plave boje te crne tinte za tiskanje. Koristi se i kao boja za kemijske okovke, printere te za bojanje detergenata i kožnih jakni. Kao i fuksin koristi se za bojenje mikrobioloških preparata. Kristal violet posjeduje antibakterijsko i antifungalno djelovanje te se prije koristio i kao antiseptik (http://www.nationalbiochem.com/pdf/pis/MC3886%20PS.pdf).



Slika 4 Strukturna formula kristal violeta
(https://www.mpbio.com/product.php?pid=05207550&country=53).

2.1.1.5. Metilensko modrilo

Metilensko modrilo je anilinska bazična boja koja otopljena u vodi daje tamno plavu boju. Kemijska formula metilenskog modrila je $C1_8H_{18}N_3SCl$ (**Slika 5**). Na sobnoj temperaturi je u obliku praha ili kristala i metalnog je sjaja. Spada u skupinu fenotijazinskih spojeva i predstavnik je bazičnih tijazinskih bojila (Ramesh i sur., 2014).



Slika 5 Kemijska struktura metilenskog modrila (prema Carmo i Ribeiro, 2012).

Metilensko modrilo upotrebljava se kao bojilo za papir, rječe i za pamuk, lan, konoplju i kožu, u mikroskopiji za bojenje bakterija, u medicini kao antiseptik. Lako se reducira u bezbojan oblik pa kao akceptor vodika i kemijski indikator služi u istraživanju bioloških redoks-reakcija (http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=40426).

Metilensko modrilo može biti štetno po zdravlje ljudi. Ako dođe u dodir s očima može izazvati opekline, ako se proguta može dovesti do iritacije gastrointestinalnog trakta te može prouzročiti cijanozu, grčenje, tahikardiju i dr. (Hamdaoui i Chiha, 2007).

2.1.2. Utjecaj sintetskih bojila na okoliš

Kako je već navedeno, sintetska bojila su po svojoj prirodi ksenobiotici, velike kemijske stabilnosti i otpornosti na razgradnju, što dovodi do njihova nakupljanja i zadržavanja u okolišu (Anjaneyulu i sur., 2005; Yu i Wen, 2005).

Posljednjih godina poraslo je zanimanje za otpadne vode koje u sebi sadrže bojila i njihove razgradne produkte, jer su mnogi od tih spojeva kancerogeni, mutageni te mogu izazvati alergijske reakcije kod čovjeka (Adedayo i sur., 2004; Cristóvão i sur., 2008). Toksičnost bojila općenito raste s brojem benzenskih prstenova u njihovoj strukturi (Bamforth i Singleton, 2005).

Tekstilna industrija najveći je onečišćivač vodenih ekosustava bojilima, jer se tijekom bojenja tekstila koriste velike količine vode i bojila. Pri tome u otpadnoj vodi završi oko 10 – 15 % od ukupne količine bojila upotrjebljenog u procesu bojenja (Yesilada i sur., 2003). Bojila mogu prouzroči velike štete okolišu, poput nastajanja toksičnih aromatskih amina prilikom anaerobne razgradnje bojila koje provode određene bakterijske vrste. Pri tome dolazi do obezbojenja bojila, ali nastaju spojevi koji su još toksičniji od polaznog spoja (Eichlerová i sur., 2006). Nadalje, mnoga bojila u svojoj strukturi sadrže teške metale, što može dovesti do akumulacije tih metala u organizmima vodenih ekosustava (alge, vodene biljke, ribe). Bojila svojom prisutnošću izazivaju promjene na samom početku hranidbenog lanca jer utječu na prijenos svijetla i fotosintezu (Slokar i Le Marechal, 1998).

Obojene otpadne vode nisu samo problem tekstilne industrije već i industrije papira, kozmetike, farmaceutske industrije te prehrambene industrije. Prije ispuštanja, otpadnu vodu je potrebno pročistiti jer i male količine bojila (manje od 1 ppm) ispuštene u prirodne prijemnike izazivaju vidljivu obojenost i mogu imati negativan utjecaj na vodeni okoliš (Singh, 2006).

2.1.3. Uklanjanje bojila iz obojenih otpadnih voda

Ako se obojene otpadne vode ispuštaju u vodotoke bez prethodne odgovarajuće obrade, mogu nanijeti štetu okolišu u koji su ispuštene, kako je već opisano. *Biološka obrada otpadnih voda* temelji se na sposobnosti mikroorganizama da koriste otopljene organske tvari iz otpadne vode kao izvore ugljika i energije. Ipak, primjenom konvencionalnih procesa mehaničke i biološke obrade (tehnologija aktivnog mulja) obojenih otpadnih voda ne postiže se zadovoljavajuća učinkovitost uklanjanja bojila (Yesilada i sur., 2003).

Mnogo je metoda kojima je moguće obraditi otpadnu vodu koja u sebi sadrži bojila, a općenito se mogu se podijeliti na fizikalno-kemijske i biološke metode. *Fizikalno-kemijske*

metode koje se primjenjuju uključuju adsorpciju, primjenu membranskih procesa, elektrokemijsku obradu, ionsku izmjenu, elektrolizu, oksidaciju s klorom, ozonom ili vodikovim peroksidom (napredni oksidacijski procesi), reakcije redukcije te koagulacije, flokulacije i filtracije (Sandhya i sur., 2005). Nedovoljna učinkovitost uklanjanja bojila, nastajanje toksičnih muljeva te visoka cijena neki su od nedostataka navedenih metoda (Asgher i Bhatti, 2007). *Biološke metode* predstavljaju alternativu fizikalno-kemijskim metodama i uključuju procese biosorpcije (adsorpcija bojila na živu ili inaktivnu biomasu mikroorganizama), biorazgradnje i biotransformacije te bioakumulacije. Mikroorganizmi koji se istražuju u ovu svrhu uključuju aerobne i anaerobne vrste bakterija, neke alge i velik broj različitih vrsta gljiva, koje su se pokazale najučinkovitijima za primjenu u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda – posebno skupina lignolitičkih gljiva bijelog truljenja (Gupta i Suhas, 2009). Mješovite mikrobne kulture pokazale su se učinkovitijima za uklanjanje bojila od čistih mikrobnih kultura (Cristóvão i sur., 2008; Asgher i Bhatti, 2007). Osnovne prednosti primjene bioloških metoda su niska cijena, visoka učinkovitost, često potpuna biorazgradnja bojila ili nastajanje produkata manje toksičnosti od polaznog spoja. Osnovni nedostaci, u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama, su manja mogućnost kontrole i dugotrajnost bioprocesa, što je, još uvijek, prepreka široj primjeni ovih metoda na realnim sustavima (Gupta i Suhas, 2009).

2.2. Gljive

Gljive ili fungi (jed. fungus) su skupina organizama koja uključuje kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama, koje nazivamo mesnatim gljivama. Gljive su eukariotski, nefotosintetički organizmi koji, zajedno s bakterijama, sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu. Gljive su kemoorganotrofi, a prema načinu iskorištavanja organske tvari, gljive dijelimo na saprofite i parazite (Lisjak, 1984). Gljive su biokemijski i metabolički vrlo raznolike, što omogućuje njihovu komercijalnu primjenu u različitim gospodarskim granama, poput proizvodnje enzima, antibiotika, polisaharida, vitamina, proteina; biotehnološke proizvodnje hrane (pivo, vino, fermentirani mliječni proizvodi) te zaštite okoliša (mikoremedijacija) (Borrás i sur., 2008). Neke vrste gljiva uzročnici su kvarenja hrane, a patogene gljive uzročnici su bolesti biljaka, životinja i ljudi te često sintetiziraju toksične sekundarne metabolite poznate kao mikotoksini (Duraković i Duraković, 2003)

Za identifikaciju i klasifikaciju gljiva potrebno je poznavati način razmnožavanja, tip micelija (morfologija hifa) te nastanak staničnih struktura (vrsta spora).

Većina gljiva su višestanične, iako mogu biti i jednostanične, pri čemu su pojedinačne stanice promjera 1 do 30 μm. Mikroskopske gljive kvasci i plijesni dolaze u obliku pojedinačnih stanica (kvasci), odnosno u obliku velikih nakupina razgranatih vlaknastih stanica, tzv. hifa (plijesni). Kod nekih mikroskopskih gljiva primijećena je sposobnost rasta u oba oblika, u ovisnosti o uvjetima okoline, što se naziva dimorfizmom. Tijelo ili vegetativna struktura gljive naziva se micelij i razlikuje se u sastavu i veličini ovisno o tome radi li se o mikroskopskim ili makroskopskim gljivama (Duraković i Duraković, 2003)

Gljive dobro rastu u tamnom i vlažnom okolišu s dostupnim otopljenim organskim sastojcima koje apsorbiraju. Gljive su kemoorganotrofi, odnosno kao izvor ugljika, energije i elektrona koriste organske kemijske spojeve. Većina gljiva su saprofiti, odnosno hranjive tvari pribavljaju od mrtve organske tvari, ali postoje i vrste koje su paraziti te simbionti. Gljive su većinom aerobi, ali mogu biti i fakultativni anaerobi kao što su neki kvasci (npr. *Saccharomyces cerevisiae*) te neke anaerobne gljive koje obitavaju u buragu preživača. Odlikuje ih rast na površini supstrata, blago kiselo pH područje rasta (pH 5) te manja potreba

za dušikom u odnosu na bakterije. Posjeduju sposobnost rasta u okolišu s visokim koncentracijama šećera ili soli te manjim sadržajem vode. Zbog izvanstaničnih enzima koje sintetiziraju, za rast mogu koristiti složene polimere poput celuloze i lignina (Duraković i Duraković, 2003). Sposobnost prilagodbe na različite izvore hrane i okolišne uvjete omogućuje im preživljavanje na mjestima gdje se ne očekuje mikrobni rast.

Gljive se mogu razmnožavati spolno i nespolno. Nespolno razmnožavanje događa se dijeljenjem roditeljske stanice na dvije stanice kćeri, stvaranjem pupova na somatskim vegetativnim stanicama (karakteristično za kvasce) i tvorbom nespolnih spora (artrospore, klamidospore, sporangiospore, konidiospore i blastospore) u pojedinačnim gljivama tijekom mitoze. Spolno razmnožavanje uključuje mejozu te nastanak spolnih spora (zigospora, askospora, bazidiospora i oospora), koje gljive ipak tvore puno rjeđe u usporedbi s nespolnim sporama. Spore gljivama omogućuju preživljavanje nepovoljnih okolišnih uvjeta te njihovo širenje, dok su nama važne su zbog identifikacije pojedinih gljiva do vrste (Duraković i Duraković,2003).

2.2.1. Gljive bijelog truljenja i njihova primjena za uklanjanje bojila

Gljive bijelog truljenja ubrajaju se u skupinu gljiva truležnica koje uzrokuju truljenje drveta uslijed razgradnje drvnih polimera (celuloze, hemiceluloze i lignina), što je sposobnost koju pokazuje vrlo mali broj mikroorganizama (Sigoillot i sur., 2012). Gljive truležnice posjeduju važnu ulogu u procesu kruženja tvari u prirodi i sposobnost razgradnje drvne biomase do jednostavnih produkata: CO_2, H_2O i minerala. Gljive bijelog truljenja, uglavnom, pripadaju razdjelu *Basidiomycota*. Razgradnja polimera odvija se djelovanjem različitih hidrolitičkih i oksidativnih enzima koje ove gljive sintetiziraju, pri čemu su najvažniji izvanstanični enzimi neophodni za razgradnju lignina: lignin peroksidaza, mangan peroksidaza i lakaza (Elisashavili et al., 2009.). Dva su tipa bijelog truljenja, ovisno o redoslijedu razgradnje polimera: simultana (istovremena) razgradnja svih polimera u drvetu i selektivna razgradnja lignina u drvetu. Predstavnici vrsta koje provode simultanu razgradnju su *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*. Tijekom simultane razgradnje više različitih fungalnih enzima djeluje istovremeno razgrađujući celulozu, hemicelulozu i lignin (Sigoillot i sur., 2012). *Ceriporiopsis subvermispora* predstavnik je skupine koja provodi puno rjeđi proces selektivne

razgradnje lignina, tijekom kojeg fungalni enzimi uklanjaju lignin i necelulozne polisaharide bez veće razgradnje celuloze (Tanaka, 2009).

Upravo sposobnost sinteze izvanstaničnih enzima odgovornih za razgradnju lignina omogućuje biotehnološku primjenu ovih gljiva u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda, odnosno primjenu za razgradnju velikog broja ksenobiotika, uključujući i sintetska organska bojila (Cuoto, 2009; Quaratino i sur., 2007; Boer i sur., 2004). U navedenu svrhu najviše su istraživane i najčešće korištene gljive *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor* (Forgacs i sur., 2004,). Kako bi se otkrilo koje gljive najučinkovitije uklanjaju (razgrađuju) različita bojila, provode se istraživanja koja uključuju probiranje na agarnim pločama (eng. *screening*) onih vrsta koje najbrže i najučinkovitije obezboje agarne ploče s dodatkom bojila. Na ovaj način moguće je izvršiti probir na velikom broju vrsta gljiva i bojila (**Tablica 1**) (Eshghi i sur., 2011; Eichlerová i sur., 2007, Eichlerová i sur., 2006b, Eichlerová i sur., 2006a).

Tablica 1 Probir (*screening*) gljiva koje imaju sposobnost razgradnje bojila.

Vrsta	Bojilo	Referenca
Dichomitus squalens *Ischnoderma resinosum* *Pleurotus cylyptratus*	Remazol brilijant plavo R(RBBR) Orange G	Eichlerová i sur., 2005
Dichomitus squalens	Orange G Aramant Orange I RBBR Kristal violet Poly R-478 Malahitno zelenilo	Eichlerová i sur., 2006
Ischnoderma resinosum	Orange G Amarant Cu -ftalocijanin Poly R Malahitno zelenilo Kristal Violet	Eichlerová i sur., 2006a
Pleurotus calyptratus CCBAS 461 *Pleurotus citrinopileatus* CCBAS 691 *Pleurotus cystidiosus* CCBAS 466 *Pleurotus dryinus* CCBAS 468 *Pleurotus eryngii* CCBAS 471 *Pleurotus ostreatus* CCBAS 473 *Pleurotus pulmonarius* CCBAS 479	Orange G (RBBR)	Eichlerová i sur., 2006b
Bjerkandera adusta CCBAS 232 *Phanerochaete chrysosporium* CCBAS 571 *Pleurotus ostreatus* CCBAS 473	Orange G Amarant RBBR Cu -ftalocijanin Poly R-478	Eichlerová i sur., 2007
Trametes hirusta *Trametes gibbosa* *Trametes biforme*	metilensko modrilo malahitno zelenilo Remazol crno 5 (RB5)	Eshghi i sur. 2011

2.2.1.1. Phanerochaete chrysosporium

Phanerochaete chrysosporium najbolje je istražena i opisana gljiva bijelog truljenja, jer se koristi kao modelni organizam u razjašnjavanju metaboličkih puteva za razgradnju lignina. Kako je već navedeno, isti mehanizmi uključeni su i u razgradnju ksenobiotika i ostalih toksičnih spojeva (Mielgo i sur., 2003; Rodriguez Couto i sur., 2000). Ova gljiva je sporogena, dobro raste pri temperaturama mezofilnog područja (do 40 °C), ali plodno tijelo izgleda poput kore - nije uobičajenog oblika za jestive gljive (**slika 6**).



Slika 6 Plodno tijelo *P. chrysosporium* na drvnom materijalu (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phanerochaete_chrysosporium)

P. chrysosporium je prva gljiva iz razdjela Basidiomycota čiji je cijeli genom sekvencioniran (Martinez i sur., 2004).

2.2.1.2. Trametes versicolor

Trametes versicolor poznata je i kao „puranov rep“, zbog specifičnog izgleda plodnog tijela nalik puranovom repu (Slika 7). Rast na agarnim pločama odlikuje pojava bijelog, čupavog micelija. Spore ove gljive bijele su do svijetložute boje. *T. versicolor* simultano razgrađuje polimere drveta, uključujući i lignin, što joj omogućuje i razgradnju ostalih teško biorazgradljivih spojeva poput polikloriranih bifenilna, policikličkih aromatskih ugljikovodika te brojnih sintetskih bojila (Xavier i sur., 2007).



Slika 7 Plodno tijelo *T. versicolor* (http://www.medicalmushrooms.net/uploads/c4108050209/trametes-versicolor-turkey-tail.jpg)

2.2.1.3. Ceriporiopsis subvermispora

Ceriporiopsis subvermispora, za razliku od prethodno opisanih gljiva, provodi selektivnu razgradnju drvnih polimera, pri čemu brzo razgrađuje lignin dok celuloza ostaje gotovo netaknuta. Ova gljiva sintetizira mangan peroksidazu (MnP) i lakazu, ali ne i lignin peroksidazu (Ruttimann i sur., 1992; Ruttimann-Johnson i sur., 1994), što ne utječe na njezinu lignolitičku aktivnost. Mehanizam selektivne razgradnje još uvijek je nedovoljno istražen (http://genome.jgi.doe.gov/Cersu1/Cersu1.home.html).



Slika 8 Plodno tijelo *Ceriporiopsis subvermispora* (http://www.aranzadi.eus/fileadmin/images/micologia/Eskaneatuak/11_digital/Ceriporiopsis_subvermispora_jmr_110315.jpg)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je istražiti sposobnost obezbojenja pet odabranih sintetskih bojila (kongo crvena, malahitno zelenilo, fuksin, kristal violet i metilensko modrilo) na agarnim pločama pomoću tri vrste (četiri soja) odabranih gljiva bijelog truljenja: *Phanerochaete chrysosporium* CCBAS 570, *Trametes versicolor* CCBAS AG613*, Trametes versicolor* TV6 i *Ceriporiopsis subvermispora*.

3.2. Materijali

3.2.2. Bojila

U radu su korištena sljedeća bojila: kongo crvena, malahitno zelenilo, fuksin, kristal violet i metilensko modrilo (sve Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska).

3.2.2. Mikroorganizmi

U radu su korištene 3 vrste gljiva bijelog truljenja, od čega su od jedne vrste korištena dva različita soja: *P. chrysosporium* 570 (Culture Collection of Basidiomycetes, Prag, Češka), *T. versicolor* AG 613 (Culture Collection of Basidiomycetes, Prag, Češka), *T. versicolor* TV-6 (MZKI, Culture Collection of the National Institute of Chemistry Ljubljana, Slovenija) i *C. subvermispora* (MZKI, Culture Collection of the National Institute of Chemistry Ljubljana, Slovenija).

Gljive su održavane u Petrijevim zdjelicama na krumpirovom agaru i čuvane pri pri +4°C u hladnjaku.

3.2.3. Kemikalije

Tijekom izvođenja eksperimenata korišten je krumpirov agar (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milano, Italija) za pripremanje hranjive podloge te etilni alkohol za sterilizaciju radnog prostora.

3.2.4. Aparatura i pribor

U radu su za vaganje korištene tehnička vaga (RADWAG, Tehnicaunitronik, tip: WPS 1200, Njemačka) te analitička vaga (EXPLORER, Ohaus, Švicarska).

Za sterilizaciju hranjivih podloga, vode te laboratorijskog posuđa i pribora korišten je autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd i Varioklav® Dampfsterillisatoren Typ 500, HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Njemačka).

Za precjepljivanja kultura i za nacjepljivanje agarnih ploča korišten je mikrobiološki zaštitni kabinet – laminarij.

Uzgoj radnih mikroorganizama i istraživanje sposobnosti obezbojenja bojila provedeno je u inkubatoru (Termo medicinski aparat, BTEST, Bodalec Havoić, Zagreb, Hrvatska).

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

Za mjerenje promjera kolonija i obezbojenog područja korišteno je digitalno pomično mjerilo.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema podloge i uzgoj radnog mikroorganizma

Za pripremu hranjive podloge za uzgoj gljiva bijelog truljenja izvagano je 42 g krumpirovog agara, zatim je dodano 1000 mL destilirane vode te zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu na temperaturi 121 ˚C kroz 15 minuta. Nakon provedene sterilizacije, podloga je ohlađena na temperaturu od 45 ˚C do 50 ˚C. Ohlađena hranjiva podloga razlivena je u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Na tako pripremljene podloge nacijepljeni su radni mikroorganizmi (micelijski disk promjera 5 mm postavljen u središte zdjelice) te su inkubirani na temperaturi 27 °C kroz 7 dana. Kao inokulum, u daljnjim pokusima obezbojenja bojila, korišteni su micelijski diskovi (promjera 5 mm) kulture stare 7 dana.

3.3.2. Priprema obojenih hranjivih podloga za istraživanje sposobnosti obezbojenja

Osnovne otopine istraživanih bojila pripremljene su odvagom 0,1 g bojila i dodatkom 3 mL sterilne demineralizirane vode u sterilnu epruvetu. Nakon otapanja, uz intenzivnu homogenizaciju na vibrirajućem mješaču, iz osnovnih su otopina preneseni odgovarajući volumeni otopljenih bojila u tikvice sa sterilnim krumpirovim agarom (Liofilchem, Italija) radi postizanja konačnih koncentracija bojila u hranjivim podlogama od 50 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1} i 150 mg L^{-1}. Za biotičku kontrolu pripremljene su hranjive podloge bez dodatka bojila. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121°C/15 minuta i ohlađena u vodenoj kupelji na 50°C. Nakon hlađenja, u tikvice su dodani odgovarajući volumeni osnovnih otopina bojila te je nakon homogenizacije po 20 mL ovako pripremljenih podloga razliveno u sterilne prazne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Nakon skrutnjavanja podloge, agarne ploče su nacijepljene odabranim gljivama. Sterilnim bušačem za čepove su s ruba kolonije starih 7 dana izrezani micelijski diskovi promjera 5 mm i sterilnom pincetom preneseni na ploče s bojilima. Kao abiotička kontrola korištene su nenacijepljene obojene hranjive podloge dok je kao biotička kontrola korištena hranjiva podloga bez dodatka bojila i nacijepljena na isti način kao obojene podloge. Sve Petrijeve zdjelice inkubirane su pri 27 ˚C kroz 9 dana (**Slika 9**) te je praćen rast radnog mikroorganizma i promjena boje hranjive podloge svaka 2, odnosno 3 dana mjerenjem promjera kolonije radnog mikroorganizma i obezbojenog područja digitalnim pomičnim mjerilom.



Slika 9 Inkubacija nacijepljenih obojenih agarnih ploča u termostatu

3.3.3. Statistička obrada

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

4. REZULTATI I RASPRAVA

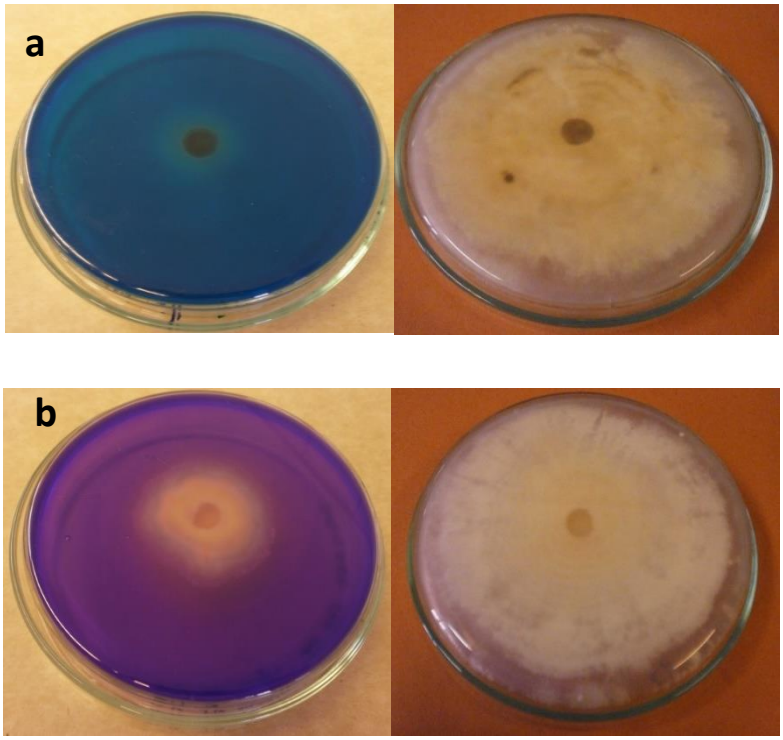
Tijekom istraživanja ispitana je sposobnost obezbojenja strukturno različitih sintetskih bojila na agarnim pločama pomoću tri vrste (četiri soja) odabranih gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* CCBAS 570, *T. versicolor* CCBAS AG613*, T. versicolor* TV6 i *C. subvermispora*.

Gljive bijelog truljenja često se zbog svoje sposobnosti razgradnje teško biorazgradljivih spojeva koriste u istraživanjima s ciljem biorazgradnje različitih sintetskih bojila. Najvažniji enzimi u procesu biorazgradnje bojila koje sintetiziraju ove vrste su enzimi uključeni u razgradnju lignina: lakaza, lignin peroksidaza i mangan peroksidaza (Santos i Corso, 2014; Eshghi i sur., 2011; Jayasinghe i sur., 2008; Eichlerová i sur., 2007)

Bojila odabrana za ovo istraživanje uključivala su azo bojilo kongo crvenu, tri bojila trifenilmetanskog reda - malahitno zelenilo, fuksin i kristal violet te bazično tijazinsko bojilo metilensko modrilo. Rast gljiva i sposobnost obezbojenja bojila na agarnim pločama s navedenim bojilima prikazani su u **tablicama 2. – 7.**

Tablica 2. prikazuje indeks obezbojenja korištenih bojila pomoću odabranih gljiva izražen kao omjer promjera obezbojenja (mm) i promjera kolonije (mm) izmjerenog 9., odnosno 10. dana uzgoja. Veći indeks obezbojenja ukazuje na bolju sposobnost gljive za razgradnju bojila (Jayasinghe i sur., 2008), ali pri razmatranju indeksa obezbojenja valja voditi računa i o brzini rasta mikroorganizma (inhibiciji rasta zbog dodatka bojila). Velik indeks obezbojenja, uz istovremenu snažnu inhibiciju rasta, rezultirat će obezbojenjem tek dijela ukupne površine obojene agarne ploče. Nadalje, važno je napomenuti kako je do potpunog obezbojenja cijele površine agarnih ploča za većinu bojila došlo tek nakon 20 do 30 dana uzgoja (**slika 10.**).

Indeks obezbojenja određen nakon 9, odnosno 10 dana uzgoja omogućuje probir onih vrsta koje će brže i učinkovitije provesti razgradnju bojila.



Slika 10. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila (a) i kristal violeta (b) (koncentracija 100 mg L^{-1}) pomoću gljive *T. versicolor* AG613 nakon 9 i 30 dana uzgoja

Iz rezultata prikazanih u **tablici 2.** vidljivo je da su svi mikroorganizmi tijekom 9. odnosno 10. dana uzgoja, do određene mjere, obezbojili bojila iz skupine trifenilmetanskih bojila – malahitno zelenilo, fuksin i kristal violet. Pri tome je obezbojenje malahitnog zelenila najučinkovitije, što se vidi iz izrazito velikog indeksa obezbojenja. Malahitno zelenilo ujedno je i bojilo koje je najjače inhibiralo rast svih gljiva (**tablica 4.**).

Eichlerová i suradnici (2006a, 2006) istraživali su sposobnost obezbojenja agranih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću gljiva bijelog truljenja *Dichomitus squalens*, *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *T. versicolor*. Koncentracije malahitnog zelenila u podlozi iznosile su od 50 do 1000 mg L^{-1}, što je dovelo do potpune inhibicije rasta. Izuzetak je bila gljiva *D. squalens* za koju je primijećen vrlo spor rast i obezbojenje agarnih ploča pri najmanjoj koncentracije malahitnog zelenila u podlozi. Jayasinghe i suradnici (2008) također su zabilježili potpuni izostanak rasta na agarnim pločama s malahitnim zelenilom (100 mg L^{-1}) u slučaju 4 od 10 vrsta gljiva bijelog truljenja koje su istraživali, dok su ostale rasle značajno sporije od kontrola, ali su pokazale dobru sposobnost obezbojenja agarnih ploča.

Tablica 2. Indeks obezbojenja različitih bojila pomoću gljiva bijelog truljenja

		Kongo crvena	Malahitno zelenilo	Fuksin	Kristal violet	Metilensko modrilo
Mikroorganizam	**γ_{bojilo}/mg L^{-1}**	**Indeks obezbojenja***				
***P. chrysosporium* CCBAS 570**	50	0,00	4,40	1,00	4,44	0,00
	100	0,00	4,44	0,42	4,46	0,00
	150	0,00	4,30	0,00	4,45	0,00
***T. versicolor* CCBAS AG613**	50	1,05	2,42	0,69	1,55	0,00
	100	1,13	2,94	0,49	1,57	0,00
	150	1,12	3,44	0,58	1,52	0,00
***T. versicolor* TV6**	50	1,05**	3,01	0,73	1,04	0,52
	100	1,08**	6,01	0,65	1,02	0,27
	150	1,12**	5,43	0,60	1,19	0,37
C. subvermispora	50	na***	5,31	0,24**	2,92	0,00
	100	0,42**	6,04	na	3,03	0,00
	150	0,66**	5,77	na	3,62	0,00

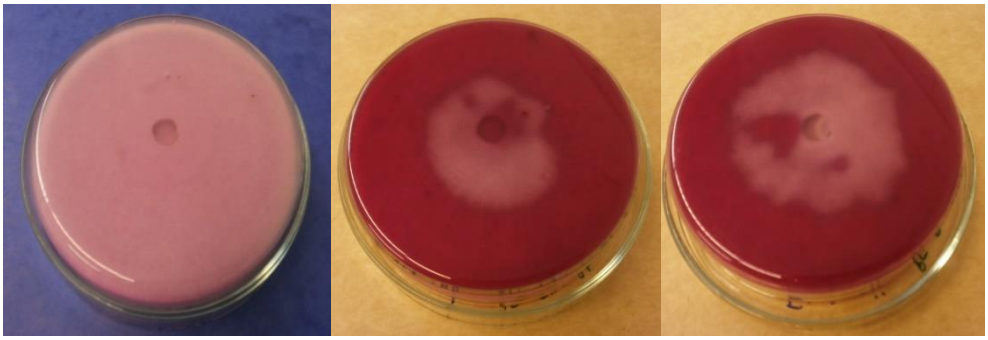
* indeks obezbojenja izražen kao promjer obezbojenja/promjer kolonije 9. dana uzgoja, odnosno 10. dana uzgoja za *P. chrysosporium* i *T. versicolor* AG 613 na kongo crvenoj, malahitnom zelenilu i metilenskom modrilu

** 3. dan uzgoja

*** na (eng. *not applicable*) nije bilo moguće očitati promjer obezbojenja

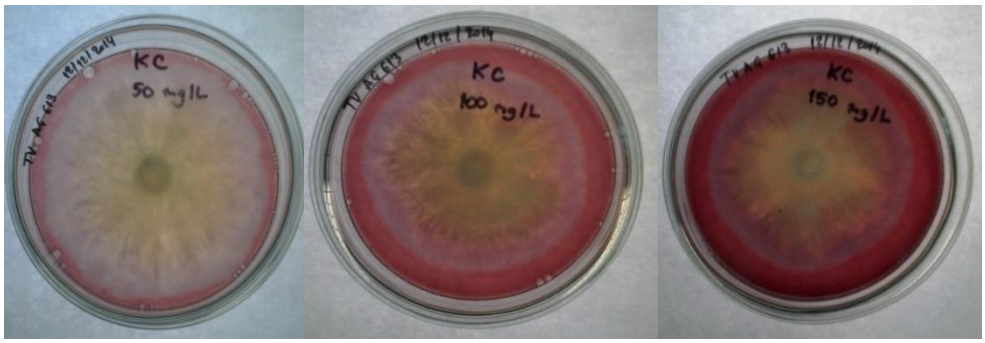
Iz **tablice 2.** nadalje je vidljivo da su odabrane gljive učinkovito obezbojile kristal violet. Manje vrijednosti indeksa obezbojenja u odnosu na malahitno zelenilo djelomično su posljedica činjenice da je inhibicija rasta ovim bojilom bila manja. Indeks obezbojenja za vrste *P. chrysosporium* i *C. subvermispora* je vrlo velik za sve koncentracije kristal violeta te je rast ovih gljiva također snažno inhibiran dodatkom kristal violeta u podlogu (tablica 6.). U sličnom istraživanju koje su proveli Eichlerová i suradnici (2006) dodatak kristal violeta u podloge na kojima su uzgajane gljive *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *T. versicolor* u koncentracijama od 100 i 500 mg L^{-1} imao je za posljedicu inhibiciju rasta ili potpuni izostanak rasta ovih gljiva. U koncentraciji 50 mg L^{-1} kristal violet je uzrokovao usporeni rast, ali je došlo do obezbojenja podloge.

Fuksin je bojilo koje su sve gljive tijekom ovog istraživanja obezbojile, do određene mjere (**slika 11.**), ali je učinkovitost obezbojenja bila nešto manja u odnosu na druga dva bojila iz iste skupine.



Slika 11. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom fuksina (koncentracije s lijeva na desno 50, 100 i 150 mg L^{-1}) pomoću gljive *P. chrysosporium* 570 AG613 nakon 9 dana uzgoja

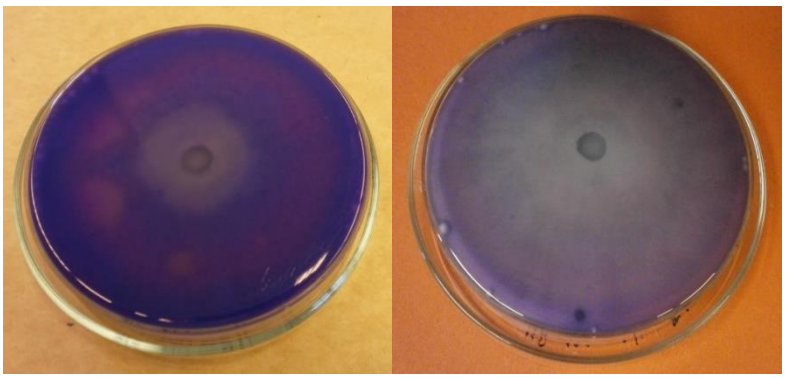
Iz vrijednosti indeksa obezbojenja za azo bojilo kongo crvenu može se primijetiti kako je samo gljiva *T. versicolor* AG613 učinkovito obezbojila ovo bojilo (**slika 12**.). Takav rezultat je očekivan, s obzirom na činjenicu kako se azo bojila ubrajaju se u skupinu izuzetno teško biorazgradljivih spojeva podložnih bioakumulaciji te su zbog svojih kancerogenih, mutagenih i teratogenih svojstava nerijetko prijetnja zdravlju ljudi i očuvanju kakvoće okoliša (Gudelj i sur., 2011).



Slika 12. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvene (koncentracije 50 -150 mg L^{-1}) pomoću gljive *T. versicolor* AG613 nakon 9 dana uzgoja

Indeks obezbojenja za *T. versicolor* TV6 i *C. subvermispora* za 3. dan uzgoja ukazuje na sposobnost obezbojenja kongo crvene, ali je 6. donosno 9. dana rasta bilo teško uočiti i izmjeriti jasnu zonu obezbojenja (**tablica 3.**). Gljiva *P. chrysosporium* nije pokazala sposobnost obezbojenja kongo crvene, što se vidi iz indeksa obezbojenja koji iznosi 0. Za razliku od malahitnog zelenila, kongo crvena nije značajno inhibirala rast odabranih gljiva, osim *T. versicolor* CCBAS AG613. Istraživanje koje su proveli Jayasinghe i suradnici (2008) također je pokazalo kako je kongo crvena imala slabiji inhibitorni učinak na rast gljiva bijelog truljenja od malahitnog zelenila.

Jedina gljiva koja je tijekom 10. dana uzgoja pokazala sposobnost obezbojenja metilenskog modrila je *T. versicolor* TV6 (**slika 13.**). Pri tome je vidljiva zona obezbojenja primijećena tek između 6. i 9. dana uzgoja, za razliku od svih ostalih bojila kada je obezbojenje primijećeno već između 2. i 3. dana uzgoja (**tablice 3.-7.**). Indeks obezbojenja manji od 1 ukazuje na slabiju sposobnost obezbojenja metilenskog modrila pomoću ove gljive u odnosu na sposobnost obezbojenja drugih bojila. Ovo je posebice očigledno kada se uzme u obzir činjenica kako dodatak metilenskog modrila u podloge nije rezultirao značajnijom inhibicijom rasta u odnosu na kontrolu.



Slika 13. Obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila (koncentracija 50 mg L^{-1}) pomoću gljive *T. versicolor* TV6 nakon 9 i 30 dana uzgoja

Kako je metilensko modrilo teško biorazgradljivo bojilo pokazuje i istraživanje Jayasinghe i suradnika (2008) u kojem su samo 2 od 10 korištenih gljiva bijelog truljenja pokazale dobru sposobnost obezbojenja metilenskog modrila, odnosno indeks obezbojenja veći od 1. Pri tome je dodatak metilenskog modrila u podlogu za posljedicu imao umjeren do jak inhibitorni učinak na rast odabranih 10 vrsta gljiva bijelog truljenja.

Statistička obrada rezultata rasta kolonija istraživanih gljiva na agarnim pločama s dodatkom bojila ukazuje na sljedeće: bojila djeluju inhibitorno na rast kolonija gljiva, pri čemu veće koncentracije bojila inhibiraju rast kolonija u većoj mjeri (**tablice 3. – 7.**).

Tablica 3. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvene odabranim gljivama

Kongo crvena		2. dan		3. dan		6. dan		9.* dan	
Mikroorganizam	**γ_{bojilo}/mg L^{-1}**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**
***P. chrysosporium* CCBAS 570**	0			90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-
	50			68,73 ^{b}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
	100			59,11 ^{c}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
	150			74,96 ^{b}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
***T. versicolor* CCBAS AG613**	0			49,79 ^{a}	-	79,84 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50			27,25 ^{b}	30,05 ^{b}	48,06 ^{b}	51,38 ^{b}	79,10 ^{b}	82,90 ^{b}
	100			24,86 ^{bc}	28,51 ^{bc}	43,11 ^{c}	47,85 ^{c}	64,10 ^{c}	72,58 ^{c}
	150			23,21 ^{c}	28,43 ^{c}	41,91 ^{c}	46,8 ^{c}	63,26 ^{c}	70,90 ^{c}
***T. versicolor* TV6**	0	23,24 ^{a}	-	31,33 ^{a}	-	75,96 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	20,31 ^{b}	10,15 ^{b}	28,33 ^{b}	29,80 ^{b}	60,20 ^{b}	na**	81,09 ^{a}	na
	100	18,29 ^{b}	9,15 ^{c}	26,59 ^{bc}	28,76 ^{b}	54,95 ^{b}	na	76,88 ^{a}	na
	150	18,24 ^{b}	9,12 ^{c}	25,54 ^{c}	28,73 ^{b}	53,77 ^{b}	na	82,98 ^{a}	na
C. subvermispora	0	71,59 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-
	50	58,62 ^{ab}	24,59 ^{b}	90,00 ^{a}	na ^{a}	90,00	na	90,00	na
	100	41,27 ^{bc}	23,39 ^{bc}	77,34 ^{a}	32,41 ^{b}	90,00	na	90,00	na
	150	28,248 ^{c}	22,07 ^{c}	45,6 ^{b}	30,51 ^{b}	90,00	na	90,00	na

* 10. dan za *P. chrysosporium* CCBAS 570 i *T. versicolor* CCBAS AG613

** na (eng. *not applicable*) nije bilo moguće očitati promjer obezbojenja

Tablica 4. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila odabranim gljivama

Malahitno zelenilo		2. dan		3. dan		6. dan		9.* dan	
Mikroorganizam	**γ_{bojilo}/mg L^{-1}**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**
***P. chrysosporium* CCBAS 570**	0			90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50			10,10 ^{b}	15,71 ^{b}	10,51 ^{b}	36,21 ^{b}	10,92 ^{b}	48,07 ^{b}
	100			9,64 ^{b}	14,90 ^{b}	9,94 ^{b}	39,11 ^{b}	10,33 ^{b}	45,89 ^{b}
	150			9,53 ^{b}	13,41 ^{b}	10,08 ^{b}	35,15 ^{b}	10,33 ^{b}	44,36 ^{b}
***T. versicolor* CCBAS AG613**	0			49,79 ^{a}	-	79,84 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50			12,19 ^{b}	15,83 ^{b}	12,98 ^{b}	17,21 ^{b}	20,69 ^{b}	50,07 ^{b}
	100			12,35 ^{b}	16,63 ^{c}	12,71 ^{b}	18,77 ^{b}	17,59 ^{b}	51,68 ^{b}
	150			11,38 ^{b}	14,80 ^{d}	12,43 ^{b}	20,21 ^{b}	14,18 ^{b}	48,76 ^{b}
***T. versicolor* TV6**	0	23,24 ^{a}	-	31,33 ^{a}	-	75,96 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	8,32 ^{b}	28,39 ^{b}	8,53 ^{b}	33,59 ^{b}	8,78 ^{b}	44,9 ^{b}	18,17 ^{b}	54,66 ^{b}
	100	8,51 ^{b}	28,90 ^{b}	8,51 ^{b}	34,28 ^{b}	8,77 ^{b}	45,18 ^{b}	8,74 ^{c}	52,51 ^{b}
	150	8,50 ^{b}	28,83 ^{b}	8,61 ^{b}	34,22 ^{b}	8,60 ^{b}	46,07 ^{b}	10,06 ^{c}	54,60 ^{b}
C. subvermispora	0	71,59 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	8,93 ^{b}	23,83 ^{b}	9,11 ^{b}	28,53 ^{b}	9,54 ^{b}	43,75 ^{b}	10,07 ^{b}	53,40 ^{b}
	100	8,42 ^{b}	23,29 ^{b}	8,90 ^{b}	27,46 ^{bc}	8,64 ^{b}	42,96 ^{b}	8,88 ^{b}	53,64 ^{b}
	150	8,37 ^{b}	22,38 ^{b}	8,92 ^{b}	25,81 ^{c}	8,80 ^{b}	41,90 ^{b}	8,94 ^{b}	51,61 ^{b}

* 10. dan za *P. chrysosporium* CCBAS 570 i *T. versicolor* CCBAS AG613

Tablica 5. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom fuksina odabranim gljivama

Fuksin		2. dan		3. dan		6. dan		9. dan	
Mikroorganizam	**γ_{bojilo}/mg L^{-1}**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**
***P. chrysosporium* CCBAS 570**	0	23,24 ^{a}	-	31,33 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-
	50	49,98 ^{b}	0,00	90,00 ^{b}	0,00	90,00	90,00	90,00	90,00 ^{b}
	100	32,29 ^{c}	0,00	60,45 ^{c}	0,00	90,00	0,00	90,00	37,77 ^{c}
	150	27,50 ^{a}	0,00	52,51 ^{d}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
***T. versicolor* CCBAS AG613**	0	24,39 ^{a}	-	35,67 ^{a}	-	77,62 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	20,23 ^{b}	0,00	30,89 ^{a}	0,00	58,45 ^{b}	21,27 ^{b}	83,00 ^{b}	56,91 ^{b}
	100	15,44 ^{c}	0,00	20,23 ^{b}	0,00	44,08 ^{c}	21,56 ^{b}	67,13 ^{c}	33,16 ^{c}
	150	14,60 ^{b}	0,00	22,76 ^{b}	0,00	45,31 ^{c}	0,00	70,48 ^{c}	41,21 ^{bc}
***T. versicolor* TV6**	0	23,24 ^{a}	-	31,33 ^{a}	-	75,96 ^{a}	-	90,00	
	50	19,19 ^{b}	0,00	30,86 ^{a}	0,00	66,62 ^{b}	35,59 ^{b}	90,00	65,54 ^{b}
	100	18,03 ^{b}	0,00	28,06 ^{b}	0,00	58,81 ^{bc}	23,79 ^{c}	90,00	58,59 ^{bc}
	150	16,69 ^{b}	0,00	26,66 ^{b}	0,00	55,13 ^{c}	24,79 ^{c}	86,00	51,49 ^{c}
C. subvermispora	0	71,59 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00	-
	50	64,20 ^{a}	32,10	90,00 ^{a}	20,30	90,00 ^{a}	21,7	90,00	na
	100	51,34 ^{ab}	na*	87,97 ^{a}	na	87,97 ^{a}	na	90,00	na
	150	34,84 ^{b}	na	70,51 ^{b}	na	70,51 ^{b}	na	90,00	na

* na (eng. *not applicable*) nije bilo moguće očitati promjer obezbojenja

Tablica 6. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kristal violeta odabranim gljivama

Kristal violet		2. dan		3. dan		6. dan		9. dan	
Mikroorganizam	**γ_{bojilo}/mg L^{-1}**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**
***P. chrysosporium* CCBAS 570**	0	69,20 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	10,4 ^{b}	23,6^{b}	11,03 ^{b}	30,11 ^{b}	11,25 ^{b}	43,15 ^{b}	11,92 ^{b}	52,86 ^{b}
	100	10,80 ^{b}	24,1^{b}	10,30 ^{b}	29,46 ^{b}	11,12 ^{b}	42,07 ^{b}	12,29 ^{b}	54,79 ^{b}
	150	10,31 ^{b}	24,7^{b}	11,01 ^{b}	30,75 ^{b}	11,02 ^{b}	42,45 ^{b}	12,14 ^{b}	54,02 ^{b}
***T. versicolor* CCBAS AG613**	0	24,39 ^{a}	-	35,67 ^{a}	-	77,62 ^{s}	-	90,00 ^{a}	-
	50	15,40 ^{b}	21,69 ^{b}	16,43 ^{b}	27,11 ^{b}	25,50 ^{b}	42,06 ^{b}	35,12 ^{b}	54,43 ^{b}
	100	14,15 ^{b}	22,91 ^{b}	15,06 ^{b}	27,93 ^{b}	25,73 ^{b}	42,15 ^{b}	33,95 ^{b}	53,39 ^{b}
	150	14,74 ^{b}	21,82 ^{b}	16,72 ^{b}	26,72 ^{b}	23,65 ^{b}	41,79 ^{b}	34,35 ^{b}	52,33 ^{b}
***T. versicolor* TV6**	0	23,24 ^{a}	-	31,33 ^{a}	10,50	75,96 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	12,17 ^{b}	25,18 ^{b}	11,99 ^{b}	28,85 ^{b}	32,42 ^{b}	39,99 ^{b}	53,80 ^{b}	56,12 ^{b}
	100	10,59 ^{b}	25,27 ^{b}	12,80 ^{b}	27,97 ^{bc}	36,32 ^{c}	40,11 ^{b}	60,53 ^{b}	61,50 ^{b}
	150	9,19 ^{b}	24,34 ^{b}	9,41 ^{c}	25,59 ^{c}	22,09 ^{d}	37,59 ^{b}	41,84 ^{c}	49,65 ^{c}
C. subvermispora	0	71,59 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-
	50	8,82 ^{b}	22,02 ^{b}	10,08 ^{b}	25,28 ^{b}	12,76 ^{b}	40,01 ^{b}	17,10 ^{b}	49,99 ^{b}
	100	9,65 ^{b}	22,24 ^{b}	10,74 ^{b}	27,75 ^{b}	11,75 ^{b}	42,39 ^{b}	17,04 ^{b}	51,57 ^{b}
	150	9,33 ^{b}	21,38 ^{b}	10,68 ^{b}	26,70 ^{b}	11,16 ^{b}	40,18 ^{b}	13,55 ^{b}	49,05 ^{b}

Tablica 7. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila odabranim gljivama

Metilensko modrilo		2. dan		3. dan		6. dan		9.* dan	
Mikroorganizam	**γ_{bojilo}/mg L^{-1}**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**	**$d_{kolonija}$/mm**	**$d_{obezbojenje}$/mm**
***P. chrysosporium* CCBAS 570**	0			90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-
	50			81,13 ^{b}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
	100			75,49 ^{b}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
	150			51,71 ^{c}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
***T. versicolor* CCBAS AG613**	0			49,79 ^{a}	-	79,84 ^{a}	-	90,00	-
	50			37,54 ^{b}	0,00	68,49 ^{b}	0,00	90,00	0,00
	100			38,91 ^{b}	0,00	66,47 ^{b}	0,00	90,00	0,00
	150			35,99 ^{b}	0,00	65,81 ^{b}	0,00	90,00	0,00
***T. versicolor* TV6**	0	23,24 ^{a}	-	31,33 ^{a}	-	75,96 ^{a}	-	90,00	-
	50	23,39 ^{a}	0,00	33,91 ^{a}	0,00	68,56 ^{a}	0,00	90,00	47,21 ^{b}
	100	22,06 ^{a}	0,00	31,34 ^{a}	0,00	74,33 ^{a}	0,00	90,00	24,66 ^{cd}
	150	22,88 ^{a}	0,00	32,87 ^{a}	0,00	67,32 ^{a}	0,00	90,00	32,90 ^{bd}
C. subvermispora	0	71,59 ^{a}	-	90,00 ^{a}	-	90,00	-	90,00	-
	50	55,50 ^{ab}	0,00	90,00 ^{a}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00
	150	44,25 ^{b}	0,00	68,42 ^{b}	0,00	90,00	0,00	90,00	0,00

* 10. dan za *P. chrysosporium* CCBAS 570 i *T. versicolor* CCBAS AG6

Gotovo redovito je promjer kolonije kontrolnih uzoraka (bez dodatka bojila u podlogu) veći, u usporedbi s promjerom kolonije koja raste na bojilima, što je potvrđeno statističkim testom analize varijance ANOVA uz post-hock Bonterroni-ijev test utvrđivanja razlike između podataka. U nekim slučajevima, najmanja koncentracija bojila ne utječe na inhibiciju rasta gljive, tj. nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka i primijenjene koncentracije bojila od 50 mgL^{-1} (npr. **tablica 4**.; malahitno zelenilo u 9. danu uzgoja za *P. chrysosporium* CCBAS 570 i *T. versicolor* CCBAS AG613). No, kako kolonije gljiva rastu, tako se i razlika u porastu kontrolnih uzoraka i uzoraka s bojilima smanjuje. Za pretpostaviti je kako se gljiva prilagođava supstratu te, nakon izvjesnog vremena prilagodbe, rast završava slično kao i kontrolni uzorak, bez bojila.

S druge strane, većinom nema statističke razlike između obezbojenja ploča s bojilima bez obzira na tri različite koncentracije bojila (od najniže koncentracije od 50 mgL^{-1} do tri puta snažnije koncentracije bojila od 150 mgL^{-1}). Iako je rast gljiva inhibiran dodatkom bojila, čini se kako istražene koncentracije bojila nisu utjecale i na smanjenje ekspresije enzima koji su odgovorni za obezbojenje. U nekim slučajevima u prvim danima uzgoja (npr. **tablica 3.**; kongo crvena 2. dan uzgoja za *T. versicolor* TV6) primijećena je statistički značajna razlika između koncentracija 50 te 100 i 150 mgL^{-1} istraženog bojila, no ta razlika već u idućem danu mjerenja više nije prisutna te su sve agarne ploče obezbojene u istoj mjeri.

Dobiveni rezultati upućuju na potrebu daljnjih istraživanja kako bi se ispitao utjecaj većih koncentracija bojila, za koje se očekuje snažniji utjecaj bojila na rast kolonija. Nadalje, bilo bi zanimljivo utvrditi minimalnu koncentraciju bojila koja istovremeno inhibira rast i utječe na sprječavanje ekspresije enzima koji sudjeluju u obezbojenju.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Sposobnost obezbojenja azo bojila kongo crvene pokazala su oba soja vrste *T. versicolor*, pri čemu je soj *T. versicolor* CCBAS AG613 bio učinkovitiji. *C. subvermispora* pokazala je značajno slabiju sposobnost obezbojenja ovog bojila, dok *P. chrysosporium* CCBAS 570 nije pokazala obezbojenje. Kongo crvena nije značajnije inhibirala rast odabranih gljiva.
2. Sposobnost učinkovitog obezbojenja malahitnog zelenila pokazale su sve četiri vrste gljiva korištene u ovom istraživanju (što je vidljivo iz velikog indeksa obezbojenja u rasponu od 2,42 do 6,04), ali je to ujedno i bojilo koje je najsnažnije inhibiralo rast svih gljiva. Najveći indeks obezbojenja malahitnog zelenila pokazala je vrsta *C. subvermispora*, a najmanji *T. versicolor* CCBAS AG613.
3. Vrste *P. chrysosporium* i *C. subvermispora* vrlo su učinkovito obezbojile kristal violet (velik indeks obezbojenja 2,92 – 4,46), ali je njihov rast snažno inhibiran ovim bojilom. Oba soja vrste *T. versicolor* slabije su obezbojila kristal violet, ali je njihov rast bio i manje inhibiran bojilom.
4. Sposobnost obezbojenja fuksina pokazale su sve vrste, iako indeks obezbojenja nije bio vrlo velik (0,24 -1). Inhibicija rasta koja je bila vidljiva u prvim danima uzgoja, do kraja uzgoja u potpunosti je prevladana.
5. Sposobnost obezbojenja metilenskog modrila pokazale je jedino vrsta *T. versicolor* TV6 (indeks obezbojenja 0,27 – 0,52), pri čemu nije došlo do značajnije inhibicije rasta ove, ali niti drugih korištenih vrsta gljiva bojilom.
6. Primijenjene koncentracije bojila statistički značajno utječu na rast kolonija gljiva. S porastom koncentracije bojila, raste i inhibicija rasta kolonije na agarnoj ploči.
7. Nije utvrđena statistički značajna razlika u utjecaju tri različite koncentracije istraženih bojila na indeks obezbojenja bojila.

6. LITERATURA

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

Anjaneyulu Y, Sreedhara CN, Samuel Suman RD: Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 4:245-273, 2005.

Asgher M, Bhatti HN: Decolorization potential of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs. *Biodegradation* 18:311-316, 2007.

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

Bamforth SM, Singleton I: Bioremidiation of polycyclic aromatic hydrocarbons-current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80:734-736, 2005.

Boer CG, Obici L, de Siuza CG, Peralta RM: Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus)* edodes producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology* 94:107-112, 2004.

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.

Carmo JP, Ribeiro JE: Optical Techniques for Defect Evaluation in Vehicles. *Intech*, 2012.

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

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

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

Duraković S, Duraković L: Mikologija u biotehnologiji, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Kugler, Zagreb, 2003.

Eichlerová I, Homolka L, Lisa´ 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: Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinosum. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33: 759–766, 2006a.

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, 2006b.

Eichlerová I, Homolka L, Nerud F: Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments* 75:38-44, 2007.

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

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

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.

Eshghia H, Alishahib Z, Zokaeib M, Daroodia A, Tabasib E: Decolorization of methylene blue by new fungus: *Trichaptum biforme* and decolorization of three synthetic dyes by *Trametes hirsuta* and *Trametes gibbosa. European Journal of Chemistry* 2:463-468*, 2011.*

Forgacs E, Cserhati T, Oros G: Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Enviroment International* 30:953-971, 2004.

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

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

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

Hamdaoui O, Chiha M: Removal of methylene blue from aqueous solutions by wheat bran. *Acta Chimica Slovenica* 54:407-418, 2007.

http://enciklopedija.lzmk.hr/clanak.aspx?id=19913 [06.10.2015.]

http://genome.jgi.doe.gov/Cersu1/Cersu1.home.html [27.11.2015.]

http://thiazoledyeschemistry.blogspot.hr/ [15.11.2015.]

http://www.aranzadi.eus/fileadmin/images/micologia/Eskaneatuak/11_digital/Ceriporiopsis_subvemispora_jmr_110315.jpg [27.11.2015.]

http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=20798 [06.10.2015.]

http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=40426 [01.10. 2015.]

http://www.medicalmushrooms.net/uploads/c4108050209/trametes-versicolor-turkey-tail.jpg [27.11.2015.]

http://www.nationalbiochem.com/pdf/pis/MC3886%20PS.pdf [27.11.2015.]

http://www.scbt.com/datasheet-211766-malachite-green.html [05.10. 2015.]

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fuchsine.png [06.10.2015.]

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fuchsine.png [06.10.2015.]

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phanerochaete_chrysosporium [27.11.2015.]

https://www.mpbio.com/product.php?pid=05207550&country=53 [07.10.2015.]

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.

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

Lisjak Z: *Uzgoj gljiva*. ITD Gaudeamus, Slavonska Požega, 1984.

Lubs HA*: The Chemistry of Synthetic Dyes and Pigments*. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1955.

Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Sollewijn Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsa D: Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, 22:695-700, 2004.

Mielgoa I, Palmaa C, Guisanb JM, Fernandez-Lafuenteb R, Moreiraa MT, Feijooa G, Lemaa JM: Covalent immobilization of manganese peroxidases (MnP) from *Phanerochaete Chrysosporium and Bjerkandera sp*.BOS 555. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 769–775, 2003.

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

Quaratino D, Federici F, Petruccioli M, Fenice M, D'Annibale A: Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology*, 91:57-69, 2007.

Ramesh ST, Gandhimathi R, Elavarasi TE, Isai Thamizh R, Sowmya K, Nidheesh PV: Comparasion of methylene blue adsorption from aqueous solution using spennt tea dust and raw coir pith. *Global NEST Journal* 16:146-159, 2014.

Rodriguez Couto S, Rivela I, Munoz MR, Sanroman A: Lignolytic enzyme production and the ability of decolorization of poly R-478 in packed-bed bioreactore by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 23:287–93, 2000.

Ruttimann C, Schwember E, Salas L, Cullen D, Vicuna R: Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 16: 64-76, 1992.

Ruttimann-Johnson C, Cullen D, Lamar RT: Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:599-605, 1994.

Sandhya S, Padmavathy S, Swaminathan K, Subrahmanyam YV, Kaul SN: Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. *Process Biochemistry* 40:885-90, 2005.

Santos GC, Corso CR: Comparative Analysis of Azo Dye Biodegradation by *Aspergillus oryzae* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Water, Air, & Soil Pollution* 225:2026, 2014.

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

Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E: Fungal Strategies for Lignin Degradation. In Lapierre C., Jouanin L. (Eds) LIGNINS: BIOSYNTHESIS, BIODEGRADATION AND BIOENGIEERING in: *Advancesin Bothanical Research*, 61:263-308. Elsevier, Amsterdam, 2012.

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

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

Spadaro JT, Gold MH, Renganathan V: Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2397-401, 1992.

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

Tanaka H, Koike K, Itakura S, Enoki A: Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme and Microbial Technology* 45:384–390, 2009.

Tehnologija bojila i pigmenata, Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženerstva i tehnologije, Interna skripta https://www.ktf.unist.hr/index.php/zot1/nastavni-materijali-zot/nastavni materijali? download= 2338:procesi-organske-industrije-predavanja-i-dio [6.10. 2015]

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

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

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

Xavier AMRB, Tavares AMP, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growthand laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 10:444- 451, 2007.

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

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