Uklanjanje sintetskog bojila metilenskog modrila iz vodenih otopina upotrebom različitih bioadsorbensa

Jurić, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:109:557438

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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

Tamara Jurić

UKLANJANJE SINTETSKOG BOJILA METILENSKOG MODRILA IZ VODENIH OTOPINA UPOTREBOM RAZLIČITIH BIOADSORBENSA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac 2014**.**

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Procesi obradbe otpadnih voda
Tema rada je prihvaćena na IX.sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. lipnja 2014.
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić*
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Tihana Marček*

UKLANJANJE SINTETSKOG BOJILA METILENSKOG MODRILA IZ VODENIH OTOPINA UPOTREBOM RAZLIČITIH BIOADSORBENSA

Tamara Jurić, 198-DI

Sažetak:

U ovom radu ispitana je mogućnost uklanjanja kationskog bojila metilenskog modrila iz vodenih otopina adsorpcijom na različite bioadsorbense.Kao bioadsorbensi korišteni su lignocelulozni otpadni materijali drvne industrije (piljevine topole, hrasta i bukve) i prehrambene industrije (repini rezanci, pivski trop i trop jabuke). Postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine bojila koncentracije 15 mg L^{-1} ($m_{adsorbensa}$ = 1 g, $V_{adsorbata}$= 100 mL, t = 25 ^{0}C, vrijeme kontakta 300 min) iznosio je više od 90% za sve korištene bioadsorbense. Za daljnja istraživanja utjecaja početne koncentracije bojila, mase adsorbensa, temperature i pH na učinkovitost uklanjanja bojila adsorpcijom odabrani su piljevina topole i pivski trop. Smanjenjem početne koncentracije bojila i povećanjem mase adsorbensa došlo je do povećanja postotka uklanjanja, što je najbolje vidljivo u prvih 30 min eksperimenta kada je uklanjanje bojila najintenzivnije, dok je nakon 300 min razlika u postotku uklanjanja vrlo mala za sve provedene eksperimente (uključujući i utjecaj pH i temperature). Temperatura nije imala značajnijeg utjecaja na postotak uklanjanja bojila, dok je smanjenje pH dovelo do smanjenja postotka uklanjanja metilenskog modrila kada je kao adsorbens korišten pivski trop. Biološkom obradom obojenog pivskog tropa pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* uzgajane u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u trajanju od 30 dana došlo je do kontinuiranog porasta ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu.

Ključne riječi: metilensko modrilo, adsorpcija, bioadsorbensi, *T. versicolor*, fermentacija na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 48 stranica
25 slika
3 tablice
2 priloga
50 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. *Marina Tišma* — predsjednik
2. doc. dr. sc. *Natalija Velić* — član-mentor
3. prof. dr. sc. *Damir Hasenay* — član
4. doc. dr. sc. *Mirna Habuda-Stanić* — zamjena člana

Datum obrane: 22. prosinca 2014.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Wastewater treatment processes
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no.9.held on June 18th, 2014.
Mentor: *Natalija Velić*, PhD, assistant prof
Technical assistance: *Tihana Marček*, PhD

REMOVAL OF SYNTHETIC DYE METHYLENE BLUE FROM AQUEOUS SOLUTIONS USING DIFFERENT BIOADSORBENTS

Tamara Jurić, 198 – DI

Summary:

In this study the ability of different bioadsorbents to remove cationic dye methylene blue from aqueous solution was investigated. Lignocellulosic waste materials from wood industry (poplar sawdust, oak sawdust and beech sawdust) and food industry (sugar beet waste, spent beer grains and apple pomace) were used as bioadsorbents. The percentage of methylene blue removal from aqueous solution concentration of 15 mg L^{-1} (*m* adsorbent=1 g, *V* dye solution= 100 mL, *t* =25°C, contact time 300 min) was more than 90% for all tested bioadsorbents. Poplar sawdust and spent beer grains were selected as bioadsorbents for further adsorption experiments investigating the effect of initial dye concentration, adsorbent dosage, temperature and solution pH on dye removal. The percentage of dye removal increased with the decrease of the initial dye concentration and increase of the adsorbent mass, which was the most obvious within the first 30 min of the experiment. After 300 min contact time the percentage removal difference was insignificant for all the experiments (including the effect of temperature and pH on dye adsorption). The temperature had no significant effect on the percentage removal, while the decrease in pH caused reduction of percentage removal of methylene blue when spent beer grains were used as bioadsorbent. Solid-state fermentation of dye-adsorbed spent beer grains was carried out for 30 days using white-rot fungus *T. versicolor*. The continuous increase of total colour change and colour intensity change of fermented samples compared to their abiotic controls was observed.

Key words: methylene blue, adsorption, bioadsorbents, *T. versicolor,* solid-state fermentation

Thesis contains:
48 pages
25 figures
3 tables
2 supplements
50 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Marina Tišma*, PhD, assistant prof. — chair person
2. *Natalija Velić*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Damir Hasenay*, PhD, full prof. — member
4. *Mirna Habuda Stanić*, PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: December 22th, 2014.

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 dr. sc. Nataliji Velić, doc. na nesebičnoj pomoći, dobroj volji i pristupačnosti u svakom trenutku, počevši od planiranja eksperimenata, realizacije, tumačenja rezultata i uobličavanja finalnog oblika ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Tihani Marček, na strpljenju i pomoći u početnim fazama eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Tehničarki Jelki Babić koja je sate provedene u laboratoriju učinila ugodnijim.

Velika zahvala svim mojim prijateljima i kolegicama sa smjera na savjetima i pomoći, a posebno Katarini Petrinović na suradnji i ugodnom druženju tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i sestrama za bezrezervnu pomoć, podršku i razumijevanje.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
2.1. BOJILA 4
2.1.1. Općenito o bojilima 4
2.1.2. Podjela bojila 5
2.1.3. Bazična bojila 6
2.1.4. Metilensko modrilo 7
2.1.5. Utjecaj bojila na okoliš i zdravlje ljudi 7
2.1.6. Zakonodavstvo RH 8
2.2. POSTUPCI UKLANJANJA BOJILA IZ OTPADNIH VODA 9
2.2.1. Adsorpcija 10
2.2.2. Čimbenici koji utječu na adsorpciju bojila 11
2.3. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI KAO ADSORBENSI 11
2.4. PRIMJENA GLJIVA BIJELOG TRULJENJA ZA OBRADU OBOJENIH LIGNOCELULOZNIH SUPSTRATA 14
3. EKSPERIMENTALNI DIO 15
3.1. ZADATAK 16
3.2. MATERIJALI 16
3.2.1. Adsorbensi 16
3.2.2. Adsorbat 17
3.2.3. Mikroorganizam 17
3.2.4. Kemikalije 18
3.3. APARATURA 18
3.3.1.Tehnička i analitička vaga 18
3.3.2. Laboratorijski mlin 18
3.3.3. Inkubator 18
3.3.4. Centrifuga 19
3.3.5. Spektrofotometar 19
3.3.6. pH metar 20
3.3.7. Analizator vlage 20
3.3.8. Autoklav 20

3.3.9. Sušionik 21
3.3.10. Kromametar 21
3.4. METODE 21
3.4.1. Šaržni adsorpcijski eksperimenti 21
3.4.2. Priprema hranjive podloge i uzgoj inokuluma za uzgoj na obojenom pivskom tropu kao čvrstom nosaču 22
3.4.3. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T.versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstom supstratu (obojeni pivski trop) 22
3.4.4. Određivanje udjela vode 23
3.4.5. Određivanje boje uzoraka 23
4. REZULTATI I RASPRAVA 25
4.1. UKLANJANJE METILENSKOG MODRILA IZ VODENIH OTOPINA ADSORPCIJOM NA RAZLIČITE LIGNOCELULOZNE MATERIJALE KAO BIOADSORBENSE 26
4.2. UTJECAJ KONCENTRACIJE BOJILA NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE 28
4.3. UTJECAJ MASE ADSORBENSA NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE 30
4.4. UTJECAJ TEMPERATURE NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE 32
4.5. UTJECAJ pH NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE 34
4.6. BIOLOŠKA OBRADA OBOJENOG PIVSKOG TROPA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *T. versicolor* 35
5. ZAKLJUČCI 39
6. LITERATURA 42
7. PRILOZI 47
Prilog 1 Baždarna krivulja za određivanje koncentracije metilenskog modrila 48
Prilog 2 Apsorpcijski spektri metilenskog modrila snimani pri različitim pH vrijednostima 48

1. UVOD

Intenzivan industrijski razvoj popraćen je sve složenijim sastavom industrijskih otpadnih voda, koje nastaju tijekom različitih proizvodnih procesa. Učinkovita zaštita okoliša i načela održivog razvoja nalažu potrebu unaprijeđenja kvalitete postojećih te uvođenje novih postupaka obrade otpadnih voda, kao iznimno važnog čimbenika u interakciji čovjeka i okoliša (Gudelj i sur., 2011). Sintetska bojila čine važnu skupinu onečišćujućih tvari u vodi su, jer su složene strukture što ih čini stabilnima i teško razgradivima (Gupta i Suhas, 2009). Bojila se moraju ukloniti iz otpadnih voda, jer osim što su toksična, njihova prisutnost uzrokuje vidljivo obojenje vode, što dalje utječe na prijenos svjetla u vodenim sustavima, kao i nanarušavanja metaboličkih procesa u stanicama mikroorganizama, biljnih i životinjskih organizama prisutnih u ekosustavu (Gupta i Suhas, 2009). Budući da su boje po svojoj prirodi ksenobiotici i teško razgradive, njihovo uklanjanje iz otpadnih voda privlači sve veću pozornost istraživača koji djeluju u području zaštite okoliša. Uklanjanje obojenja ne podrazumijeva uvijek i uklanjanje toksičnosti, nepotpuna razgradnja i nastanak sastojaka ragradnje tu toksičnost mogu čak i povećati jer spojevi koji nastaju razgradnjom boja pridonose mutagenosti tla te podzemnih i površinskih voda s kojima dolaze u dodir (Gudelj i sur., 2011). Područja primjene u kojima čovjek dolazi u neposredni dodir s bojama ponajprije su njihova uporaba u prehrambenoj industriji, izradi ambalažnog materijala za prehrambene proizvode i proizvodnji lijekova, a važan je i kontakt preko kože (Gudelj i sur., 2011). Tradicionalne tehnologije obrade otpadnih voda pokazale su se neučinkovitima u uklanjaju bojila zbog velike kemijske stabilnosti samih bojila. Razvijen je širok raspon metoda za uklanjanje sintetičkih bojila kako bi se smanjio njihov utjecaj na okoliš. Neke od metoda su adsorpcija, mikrobiološka ili enzimska razgradnja, dekolorizacija fotokatalizom i/ili oksidacijskim procesima. Korištenje bioadsorbensa za uklanjanje onečišćenja privlači sve više pažnje, jer bioadsorbensi često uključuju materijale klasificirane kao otpad ili nusprodukt različitih industrija bez komercijalne vrijednosti (Forgacsi sur., 2004). Nadalje, biološka obrada obojenih otpadnih voda pomoću mikroorganizama također je zanimljiva zbog niskih troškova procesa, često uz postizanje potpune mineralizacije onečišćujućih tvari uz nastajanje netoksičnih produkata (Gudelj i sur., 2011). U budućnosti se može očekivati raširenija primjena kombiniranih tehnika mikrobiološke razgradnje i kemijsko/fizikalnih tretmana kako bi se poboljšala učinkovitost obrade otpadnih voda (Forgacsi sur., 2004). Uklanjanje boja iz otpadnih voda treba nastojati provoditi radi postizanja: ponovne uporabe pročišćene otpadne vode, što je prednost i s ekološkog i sa stajališta ekonomske isplativosti; smanjenja onečišćenja površinskih voda; smanjenja mogućnosti bioakumulacije boja te drugih kemikalija, kojima je popraćena njihova proizvodnja i primjena u okolišu (Gudelj i sur., 2011).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOJILA

2.1.1. Općenito o bojilima

Bojila su tvari koje apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra te su stoga obojene. Imaju sposobnost bojenja tekstilnih vlakna i drugih materijala manje ili više trajno, ulazeći s bojanim materijalom u kemijsku vezu ili vežući se fizikalnim silama. Tvar je obojena ako selektivno apsorbira vidljivo svjetlo, tj.ako apsorbira elektromagnetsko zračenje stanovitih valnih duljina između 380 i 760 nm, a propušta ili reflektira elektromagnetsko zračenje ostalih valnih duljina u tom dijelu spektra (http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf).

Bojila se sastoje od 3 funkcionalne grupe:

1. kromofora koji je odgovoran za boju
2. auksokroma (elektron donori ili elektron akceptori supstituenti) koji je odgovoran za intenzitet boje i doprinosi većoj topljivosti u vodi,
3. kromogena koji povezuje gore navedene funkcionalne grupe (Christie, 2001).

Najvažniji auksokromi su hidroksilna skupina (-OH), sulfonatna (-SO_3H), karboksilna (-COOH) i amino (-NH_3) (Lončar, 2012).

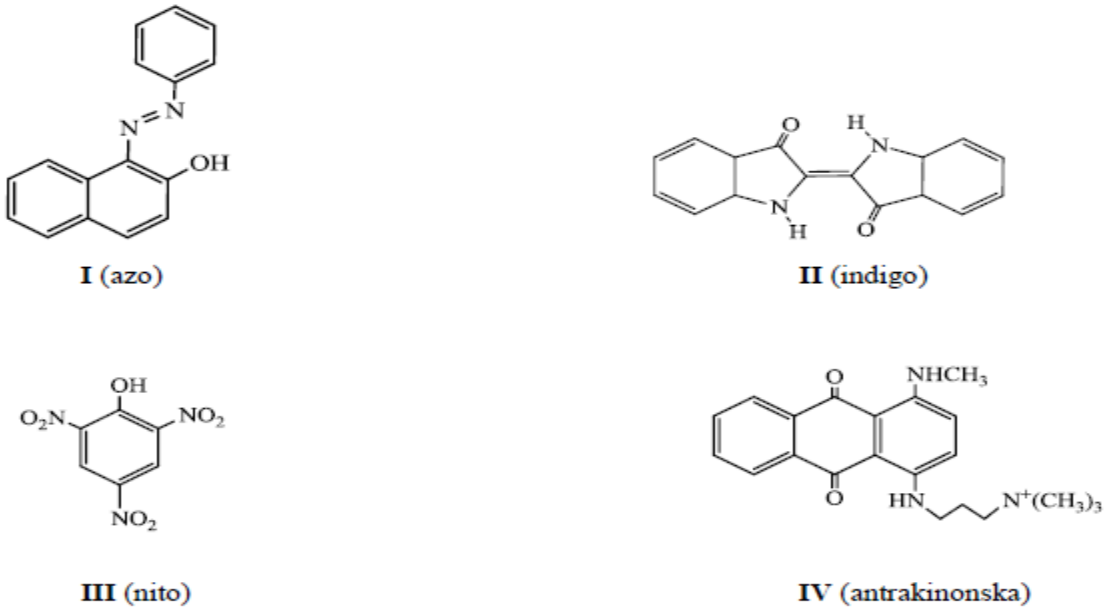
2.1.2. Podjela bojila

Bojila pokazuju značajnu strukturalnu raznolikost pa se mogu klasificirati na više načina, kako je prikazano u **Tablici 1.**

Tablica 1. Podjela bojila (http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf)

BOJILA		
Prirodna bojila		
Biljnog podrijetla Indigo Alizarin Boja modrog drveta	Životinjskog podrijetla Purpur Košenila Lac-dye	
Sintetska bojila		
Podjela prema materijalu	**Podjela prema bojadisarskim značajkama**	**Podjela prema kemijskoj konstituciji**
1. Bojila za tekstil a) za biljna vlakna b) za životinjska vlakna c) za sintetska vlakna d)za miješana vlakna ili tkanine 2. Bojila za kožu 3. Bojila za papir 4. Bojila za plastične mase 5. Bojila za živežne namirnice 6. Bojila za premazna sredstva 7. Bojila za druge specijalne svrhe a) za mikroskopiju b) za fotografiju c) za kozmetiku d) za pirotehniku e) za farmaceutske svrhe f) za kemijske analize (indikatori)	1. Bojila topljiva u vodi a) bazična bojila b) kisela bojila c) kiselo-močilska bojila d) metal-kompleksna bojila e) direktna bojila f) reaktivna bojila g) leuko-esteri reduktivnih bojila (indigosoli) 2. Bojila topljiva u alkoholu 3. Bojila netopljiva u vodi a) reduktivna i sumporna bojila b) disperzijska bojila c) bojila topljiva u mastima i uljima d) pigmentna bojila e) bojeni lakovi 4. Bojila koja se grade na tekstilnom materijalu a) naftol-AS-bojila b)acetatna bojila za razvijanje c) oksidacijska bojila d) bojila koja nastaju u diazotipiji e) bojila za višeslojnu fotografiju u bojama	1. Nitrozo bojila 2. Nitro bojila 3. Azo bojila 4. Stilbenska bojila 5. Difenil-metanska bojila 6. Di- i triaril metanska bojila 7. Ksantenska bojila 8. Akridinska bojila 9. Kinolinska bojila 10. Metinska i polimetinska bojila 11. Tiazolna bojila 12. Azinska bojila 13. Oksazinska bojila 14. Tiazinska bojila 15. Sumporna bojila 16. Antrakinonska bojila 17. Indigoidna bojila 18. Amino-ketonska i hidroksi-ketonska bojila 19. Leuko-esteri reduktivnih bojila 20. Oksidacijska bojila 21. Reaktivna bojila 22. Ftalocijaninska bojila 23. Metalkompleksna bojila

Podjela bojila prema kemijskoj strukturi provodi se isključivo prema vrsti osnovnog kromofora u molekuli, pa razlikujemo **azo I** (monoazo, diazo, triazo, poliazo), difenilmetanska, trifenilmetanska, ksantenska, akridinska, azinska, oksazinska, **indigoidna (II)**, **nitro (III)**, nitrozo, **antrakinonska (IV)**, i druga bojila (**Slika 1.**)



Slika 1 Vrste kromofora (http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf)

2.1.3. Bazična bojila

Bazična bojila, koja se još nazivaju i kationska bojila, skupina su teško razgradljivih sintetskih bojila. Nazivaju se kationska, jer je za njih karakteristično postojanje pozitivnog naboja unutar molekule na kromoforu. Otopljena u vodi tvore kationske soli, koje mogu reagirati s anionskim mjestima na površini adsorbensa. U svojoj strukturi posjeduju kationske funkcionalne skupine poput $–NR_3$ ili $=NR_{2+}$. Auksokromi su amino ili alkilamino skupine (http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf).

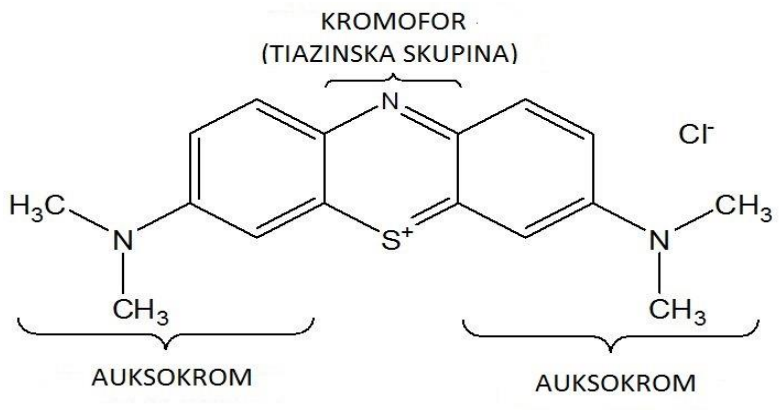
Kationske boje se uglavnom koriste za bojenje papira, poliakrilonitrila, modificiranog najlona i poliestera. Međutim, originalno su korištene za bojenje vune, svile i taninom-fiksiranih/impregniranih pamuka. Obično se dodaje octena kiselina u otopinu boje da bi se

poboljšalo vezivanje boje za vlakna. Glavne kemijske klase su triarilmetanska, cijaninska i hemicijaninska, tiazinska, oksazinska i akridinska (Lončar, 2012).

2.1.4. Metilensko modrilo

Metilensko modrilo je često korišteno bojilo u industriji tekstila, papira, gume, plastike, kože, kozmetike, farmaceutskoj industriji i prehrambenoj industriji, pri čemu kao rezultat njihovih aktivnosti nastaju značajne količine obojene otpadne vode (Ramesh i sur., 2014).

Metilensko modrilo je bazična anilinska boja kemijske formule $C_{18}H_{18}N_3SCl$ (**Slika 2**) Otopljena u vodi daje tamno plavu otopinu. Nalazi se u obliku zelenomodrog praha ili kristala, metalnog sjaja. Ubraja su u skupinu fenotiazinskih spojeva te je najvažniji predstavnik bazičnih tijazinskih bojila. Koristi se za bojenje papira te bojenje novčanica (Ramesh i sur., 2014) rjeđe i za pamuk, lan, konoplju i kožu. Kao biološko bojilo koristi se u mikroskopiji za bojenje bakterija te u medicini kao antiseptik. Lako se reducira u bezbojan oblik, pa se kao akceptor vodika i kemijski indikator koristi u kemiji (http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=40426).



Slika 2 Kemijska struktura metilenskog modrila (Carmo i Ribeiro, 2012).

Metilensko modrilo može izazvati različite štetne učinke kao što su opekline očiju, iritacija gastrointestinalnog trakta sa simptomima mučnine, povraćanja i dijaree. Pored toga može uzrokovati i methemoglobinemiju, cijanozu, grčenje, tahikardiju i dispneju (teško disanje) (Hamdaoui i Chiha, 2007).

2.1.5. Utjecaj bojila na okoliš i zdravlje ljudi

Prisustvo bojila kao onečišćujućih tvari prisutnih u tekstilnim efluentima primjećuje se već pri koncentracijama od 1 mg L^{-1} ili manjim. Otprilike 800000 tona boje se proizvodi godišnje, od čega 40% u Europi (Hessel i sur., 2007). Tijekom procesa bojenja, 2 - 60% od početne boje ili

njenih derivata se ne veže za tekstil i ispušta se kao efluent (Hessel i sur., 2007). Prisustvo boja u vodenom ekosustavu smanjuje prodiranje sunčevih zraka u dublje slojeve, čime se onemogućuje fotosintetska aktivnost, smanjuje kvaliteta vode te smanjuje topljivost plinova. Sve navedeno za posljedicu ima akutno trovanje flore i faune vodenih ekosustava (Nilsson i sur., 1993).

Kod čovjeka bojila mogu uzrokovati alergijski dermatitis, iritaciju kože, disfunkciju bubrega, jetre, mozga, reproduktivnih organa i centralnog živčanog sustava (Mohammed M.A., 2014).

2.1.6. Zakonodavstvo RH

Danas postoji niz zakonskih propisa i regulative koji od proizvođača zahtjevaju definiranje štetnosti svakog proizvoda, uključujući njihovu akutnu toksičnost, iritabilnost kože i očiju, toksičnost nakon višekratne primjene, fotosenzibilnost, mutagenost, kancerogenost i teratogenost (Gudelj i sur., 2011).

U Republici Hrvatskoj Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda Prilog 5. (Granične vrijednosti emisija otpadnih voda iz objekata i postrojenja za proizvodnju i preradu tekstila) navodi da u površinskim vodama i sustavu javne odvodnje ne smiju biti prisutna bojila (http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_80_1681.html).Osim toga provjeravaju se fizikalno kemijski, ekotoksikološki, organski i anorganski pokazatelji.

Proizvođači tekstila, odjeće i ostali koji svoje proizvode žele plasirati na tržište Europske unije suočeni su sa zahtjevima jamstva ekološke prihvatljivosti svojih proizvoda. Ti kriteriji odnose se na vlakna, procese i kemikalije koji mogu dospjeti na tekstil u proizvodnji, preradi i oplemenjivanju te na ekološke zahtjeve vezane uz ponašanje proizvoda pri upotrebi. Na temelju ispunjenih tako definiranih zahtjeva stječe se pravo uporabe EZ-oznake ekološke prihvatljivosti (Zakon o vodama, Uredba o klasifikaciji voda).

U cilju osiguranja čistoće otpadnih voda, zakonskim odredbama ograničena je upotreba toksičnih i kancerogenih bojila i kemikalija koje se upotrebljavaju u procesu tekstilnog oplemenjivanja. U tom smislu Hrvatski sabor je u siječnju 2002. godine prihvatio nacionalnu strategiju zaštite okoliša. S obzirom na onečišćenja voda u procesima oplemenjivanja, posebno težište ekoloških zahtjeva dano je na te procese i kemikalije (Zakon o vodama, Uredba o

klasifikaciji voda, Zakon o zaštiti okoliša). Zahtjevi vezani uz kemikalije uključuju i obvezno označavanje nekom od ovih oznaka definiranih direktivom 67/548/ EEC:

- R40 – granični znakovi kancerogenog djelovanja
- R45 – može uzrokovati rak
- R49 – može izrokovati rak pri udisanju
- R50 i R51 – osobito otrovan za vodene organizme
- R53 – može izazvati dugotrajne nepoželjne učinke
- R60 – može štetiti plodnosti
- R61 – mogući rizik za trudnoću
- R68 – mogući rizik ireverzibilnih učinaka (Jurac Z., 2008).

2.2. POSTUPCI UKLANJANJA BOJILA IZ OTPADNIH VODA

Zahvaljujući slaboj biorazgradljivosti sintetskih bojila, konvencionalni postupci biološke obrade otpadnih voda su neučinkoviti kada je riječ o otpadnim vodama onečišćenim ovim bojilima (Banat i sur., 1996).

Metode pročišćavanja obojenih otpadnih voda mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke. Međutim, svaka od navedenih metoda ima i prednosti i nedostatake, pa se često kombiniraju u cilju postizanja boljeg pročišćavanja (Ghoreishi i Haghighi, 2003).

Fizikalne metode. Najčešće su to postupci filtracije, reverzne osmoze, elektrolize i adsorpcije (Mohammed M.A., 2014). Primjenom fizikalnih postupaka iz otpadne vode se uklanjaju sastojci bez odvijanja kemijskih reakcija (Gudelj i sur., 2011). Od svih fizikalnih postupaka adsorpcija se pokazala najučinkovitijom. Aktivni ugljen se pokazao kao najbolji adsorbent za pročišćavanje onečišćenih podzemnih voda, ali i industrijskih efluenata. Nedostatak mu je visoka cijena zbog troškova proizvodnje i regeneracije. Upravo zato se pribjegava pronalaženju jeftinijih adsorbensa poput kitozana, zeolita, ugljena, papirne pulpe i raznih minerala (Rafatullah i sur., 2010). U zadnje vrijeme sve se više istražuje i predlaže upotreba lignocelulozno poljoprivrednog i industrijskog otpada kao mogućih jeftinih adsorbensa (Crini, 2006).

Kemijske metode. Jedna od također često primjenjivanih metoda za uklanjanje boje iz otpadnih voda je upotreba različitih koagulanata i flokulanata. Takav proces podrazumijeva dodavanje sredstava koja induciraju flokulaciju poput iona aluminija (Al^{3+}), kalcija (Ca^{2+}), ili željeza (Fe^{3+}) u otpadnu vodu. Općenito, proces je ekonomski prihvatljiv (cijena ovisi o cijeni kemikalija) te se postiže zadovoljavajuće uklanjanje dispergiranih, u vodi netopljivih bojila. Glavni nedostatak je stvaranje velikih količina mulja, koji je problematičan za zbrinjavanje. Ne preporučuje se tretiranje visoko topljivih boja, azo boja, reaktivnih boja, kiselih i lužnatih boja ovim metodama (Gupta i Suhas, 2009).

Biološke metode. Ove metode obrade obojenih otpadnih voda sve češće se koriste, zbog sposobnosti nekih mikroorganizama da razgrade različita bojila. Biološke metode obrade obojenih otpadnih voda uključuju postupke biosorpcije bojila na mikrobnu biomasu, obezbojenje vode upotrebom različitih gljiva, odn. njihovih enzima i sl. (Mohammed M.A., 2014). Korištenje mikroorganizma poput kvasaca, bakterija, gljiva i algi u bioremedijaciji temelji se na njihovoj sposobnost akumulacije i razgradnje različitih onečišćujućih tvari, ali su često prisutna različita tehnička ograničenja u njihovoj primjeni. Biološka obrada obojenih otpadnih voda može se provoditi aerobno, anaerobno ili kombinirano, ovisno o vrsti i specifičnostima mikroorganizama koji se koriste za obradu (Bhattacharyya i Sharma, 2004).

2.2.1. Adsorpcija

Pojam adsorpcija podrazumijeva sposobnost neke čvrste tvari zvane adsorbensa da na svojoj graničnoj površini nakuplja (adsorbira) molekule plina ili otopljene tvari iz otopina (adsorbat) (Gupta i Suhas, 2009). Razlikujemo dva osnovna tipa adsorpcije na čvrstim tvarima: fizikalnu i kemijsku. Kod fizikalne adsorpcije sile između čvrstog adsorbensa i molekula adsorbata su slične van der Waals-ovim silama, dok je kemijska adsorpcija rezultat puno jačih sila vezivanja koje se mogu usporediti s onima koje dovode do stvaranja kemijskih spojeva. Adsorpcija se u ovom slučaju može smatrati stvaranjem neke vrste površinskog spoja (Gupta i Suhas, 2009).

Jedna od najvažnijih karakteristika adsorbensa je količina adsorbata koji može nakupiti na površini, a može se izračunati pomoću adsorpcijskih izotermi. Za dobre adsorbense karakteristično je da imaju vrlo veliku površinu.

Neki od najčešće korištenih adsorbensa u obradi otpadnih voda su:

- glina
- silika gel
- aktivni ugljen
- prirodni materijali, poput lignoceluloznih materijala

Osnovni nedostatak procesa adsorpcije, neovisno o tome koriste li se organski ili anorganski adsorbensi, je taj da je adsorpcija relativno neselektivan proces te se osim bojila na adsorbent mogu adsorbirati i drugi sastojci prisutni u otpadnoj vodi, što u konačnici rezultira smanjenjem postotka uklanjanja bojila (Forgacs i sur., 2004).

2.2.2. Čimbenici koji utječu na adsorpciju bojila

Uklanjanje bojila iz otpadnih voda posljedica je djelovanja dva mehanizma: adsorpcije i ionske izmjene (Slokar i Le Marechal, 1997) i na nju utječu razni fizikalno-kemijski čimbenici poput interakcije bojila i adsorbensa, veličine površine adsorbensa, veličine čestica, temperatura, pH i vrijeme kontakta (Kumar i sur., 1998). Osim toga adsorpcija bojila ovisi o svojstvima samog bojila kao i kemijskim skupinama na površini adsorbensa (Noroozi i sur., 2007).

2.3. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI KAO ADSORBENSI

Aktivni ugljen je do sada bio najpopularniji adsorbens korišten u obradi otpadnih voda onečišćenih bojilima, ali njegova visoka cijena predstavlja sve veći problem. Upravo zbog toga javila se potreba za pronalaskom jeftinijih i dostupnijih adsorbensa. Kada se govori o odabiru i usporedbi različitih adsorbensa, osim njihove učinkovitosti glavni parametar je upravo cijena. Jeftinim adsorbensom nazva se tvar koja zahtijeva malu ili neznatnu obradu i može se naći u prirodi u velikim količinama (Bailey i sur., 1999), poput primjerice nusprodukata ili otpadnih materijala raznih industrija koji zahtijevaju odgovarajući način zbrinjavanja ili skladištenja, ako se dalje ne mogu iskoristiti. Prema tome, otpadni materijali iz različitih industrija i poljoprivrednih operacija, kao i ostali prirodni materijali koji se mogu upotrijebiti kao bioadsorbensi predstavljaju potencijalnu ekonomsku alternativu korištenju konvencionalnih adsorbensa (Rafatullah i sur., 2009).

U ovom radu kao bioadsorbensi su korišteni otpadni lignocelulozni materijali iz drvne industrije (piljevine topole, bukve i hrasta) i prehrambene industrije (repini rezanci, pivski trop i trop jabuke).

Udjeli celuloze i lignina, kao osnovnih sastavnica navedenih bioadsorbensa prikazani su u **Tablici 2.**

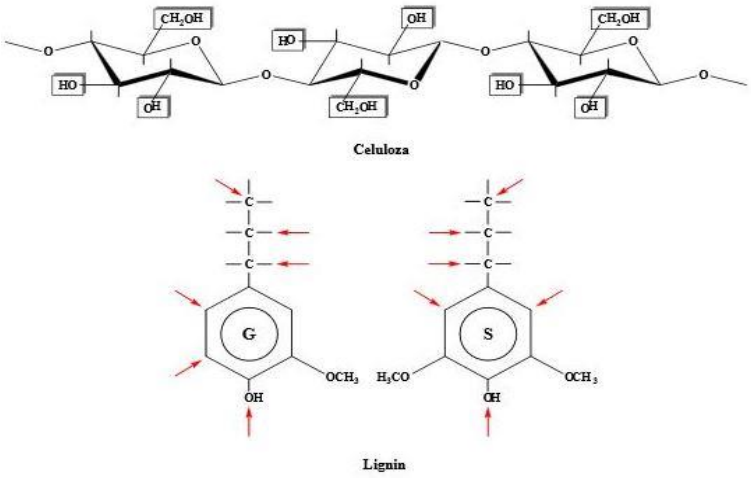
Tablica 2 Udjeli celuloze i lignina u različitim bioadsorbensima

Adsorbens	% Celuloze	% Lignina	Izvor
Topola	47,4	22,5	Žeger T.,2012.
Bukva	45,4	22,7	Žeger T.,2012.
Hrast	38	25	Bednar i Fengel, 1974.
Repini rezanci	22 – 30	10 - 15	Spagnuolo i sur., 1997.
Trop jabuke	30	15	Wang i Thomas, 1989.
Pivski trop	20	28	Mussato i sur., 2006.

Celuloza je glavna komponenta drva i čini 40 - 50% suhe tvari, vodikovim vezama je obavija hemiceluloza s udjelom 30%, a potporu daje lignin (20 - 30% udjela) ovisno o tipu drva (Sjostrom, 1993).

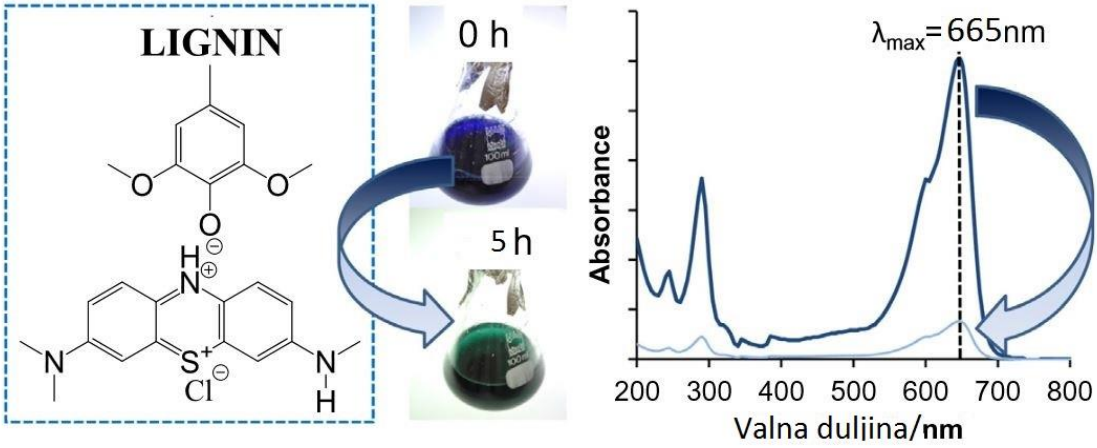
Repini rezanci su uglavnom izgrađeni od polisaharida (75 - 80 %), pri čemu su osim celuloze i lignina značajne sastavnice još i hemiceluloza (25 - 30%) i pektin (25%) (Spagnuolo i sur., 1997). Sličnog sastava je i trop jabuke, koji sadrži 12% hemiceluloze i 9% pektina (Wang i Thomas, 1989). Pivski trop, osim celuloze i lignina, u značajnim količinama (28 - 30%) sadrži još i druge necelulozne saharide (Mussato i sur., 2006).

Ovi materijali su dostupni u prirodi u velikim količinama i mogu se smatrati potencijalnim adsorbensima zbog svojih fizikalno-kemijskih karakteristika i niske cijene. Glavna karakteristika svih otpadnih materijala poljoprivredno/prehrambene industrije je velik broj funkcionalnih skupina dostupnih za vezanje adsorbata (**Slika 3**) (Bhatnagar i Sillanpaa, 2010).



Slika 3 Potencijalna mjesta za kemijske reakcije u celulozi i ligninu (Žeger, 2012).

Upravo zbog velikog udjela celuloze i lignina, kationskim bojilima je dostupan velik broj mjesta za vezanje s hidroksilnim grupama adsorbensa, koje su važne za interakciju adsorbata, poput metilenskog modrila i adsorbensa (**Slika 4**) (O'Connell i sur., 2008).



Slika 4 Grafički prikaz interakcije adosrbensa i adsorbata (Sipponen i sur., 2014).

2.4. PRIMJENA GLJIVA BIJELOG TRULJENJA ZA OBRADU OBOJENIH LIGNOCELULOZNIH SUPSTRATA

Obojene otpadne vode je teško obraditi zbog sintetskog podrijetla i uglavnom aromatske strukture bojila, što otežava njihovu biološku razgradljivost (Mohammed M.A., 2014). Korištenje mikroorganizama za uklanjanje sintetskih bojila nudi značajne prednosti: proces je relativno jeftin, početni troškovi niski, krajnji produkti razgradnje su najčešće netoksični ili manje toksični od početnog spoja. Učinkovitost razgradnje bojila ovisi o kemijskoj strukturi bojila kao i kapacitetu razgradnje mikroorganizma (Forgacs i sur., 2004). Gljive bijelog truljenja rijetki su poznati mikroorganizmi koji imaju kompleksne enzimske sustave za razgradnju lignina (van der Merwe, 2002). One su najčešći organizmi koji uzrokuju truljenje drveta, jer imaju sposobnost degradacije i mineralizacije glavnih komponenti drva: celuloze, hemiceluloze i lignina (Sigoillot i sur., 2012). Enzimi koji sudjeluju u razgradnji lignina i koje gljive bijelog truljenja ekstracelularno proizvode su lakaza, mangan peroksidaza (MnP) i lignin peroksidaza (LiP). Ovi enzimi značajni su kod primjene gljiva bijelog truljenja u bioremedijaciji, gdje su vrlo često korištene vrste *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium* (Forgacs i sur., 2004).

P.chrysosporium je korištena za obradu obojenih otpadnih voda, pri čemu je kroz tjedan dana došlo do 99% uklanjanja bojila (Kirby, 1999). Također može razgraditi i najrašireniju vrstu komercijalnih boja, azo boje koje su inače vrlo teško razgradljive pomoću mikroorganizama (Paszczynski i Crawford, 1995). Mehanizam obezbojenja uključuje aktrivnost lignin peroksidaze i Mn-ovisne peroksidaze ili enzima lakaze (Michel i sur., 1991). Istraživanja su pokazala da je obezbojenje rezultat aktivnosti sekundarnog metabolizma povezanog s razgradnom lignolitičkom aktivnošću gljive (Glenn and Gold, 1983).

T. versicolor ekstracelularno proizvodi izvanstanične enzime lakazu, mangan peroksidazu, lignin peroksidazu i celulazu (Tavares i sur., 2005) i može uspješno razgraditi lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, mješavine različitih polikloriranih bifenila i brojne sintetičke boje (Xavier i sur., 2007).

Tijekom ovog istraživanja gljiva *T. versicolor* uzgajana je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *Solid-state Fermentation*, SSF) na obojenom pivskom tropu (otpadni lignocelulozni materijal) kao nosaču i supstratu. SSF su procesi koji se provode u odsutnosti slobodne vode na materijalima koji nisu topljivi i koji djeluju kao fizički nosač za mikroorganizme ili kao izvor hranjivih tvari.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

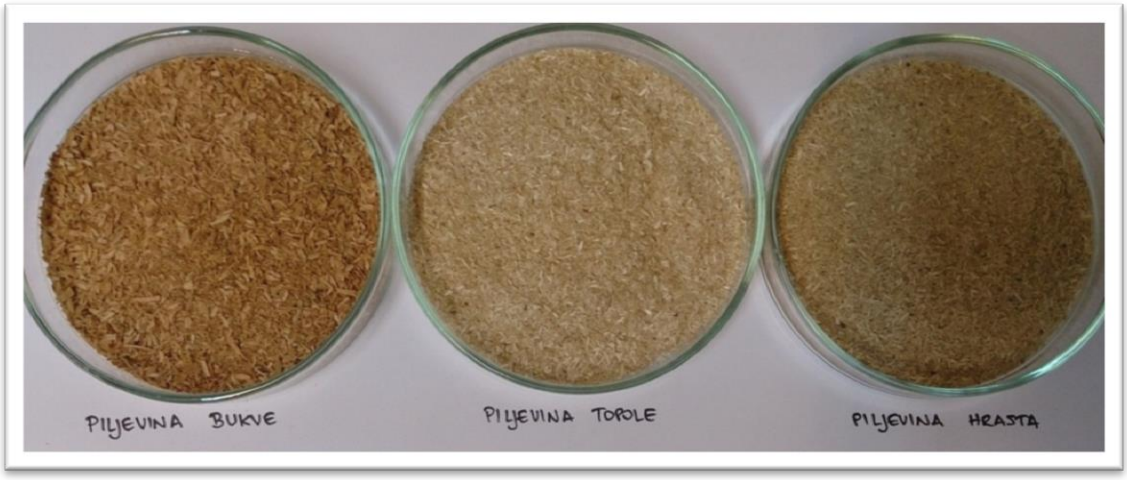
3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti upotrebe šest lignoceluloznih otpadnih materijala (piljevine bukve, hrasta, topole, repini rezanci, pivski trop i jabučni trop) kao bioadsorbensa za uklanjanje sintetskog bojila metilenskog modrila iz vodenih otopina adsorpcijom. Nakon provedene adsorpcije, ispitana je mogućnost obezbojenja obojenog pivskog tropa korištenog kao adsorbensa biološkom obradom s gljivom bijelog truljenja *T. versicolor.*

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Adsorbensi

Adsorbensi korišteni u ovom radu su prikupljeni iz drvne (**Slika 5**) i prehrambene industrije (**Slika 6**). Piljevine bukve (*Fagus sylvatica L*.), hrasta (*Quercus robur L*.) i topole (*Populus alba L*.) donirale su „Hrvatske šume d.o.o.“. Repini rezanci nastali preradom šećerne repe dobiveni su iz tvornice šećera „Sladorana Županja d.d.“, pivski trop iz pivovare „Osječka pivovara d.d.“,dok je trop jabuke dobiven s malog obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva koje se bavi proizvodnjom i preradom jabuka. Svi adsorbensi su sušeni (prvo na sobnoj temperaturi, a zatim u sušioniku pri 60 ºC tijekom 48 sati), samljeveni korištenjem laboratorijskog mlina (MF10 basic, IKA Labortechnik, Njemačka) s otvorom očica 2 mm. Navedeni adsorbensi nisu podvrgnuti nikakvim kemijskim ili fizikalnim tretmanima prije adsorpcijskih eksperimenata. Kao kontrola je korišten aktivni ugljen (SA SUPER 8029-1, Cabot Norit, USA).



Slika 5 Bioadsorbensi podrijetlom iz drvne industrije



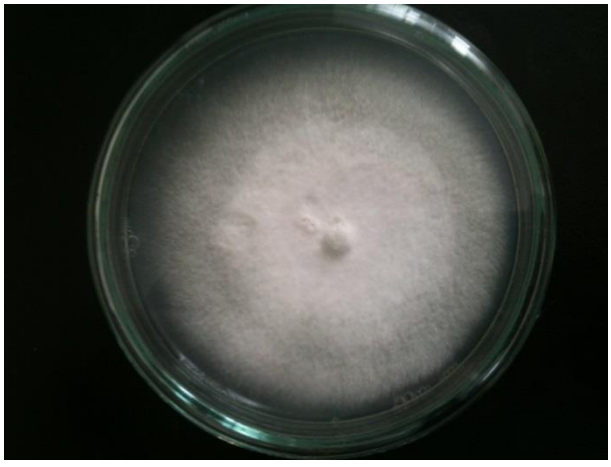
Slika 6 Bioadsorbensi podrijetlom iz prehrambene industrije

3.2.2. Adsorbat

Kao adsorbat je korišteno bojilo metilensko modrilo (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

3.2.3. Mikroorganizam

U eksperimentima kojima je cilj bio istražiti mogućnost obezbojena obojenih bioadsorbenasa biološkom obradom, kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* AG 613 (Culture Collection of *Basidiomycetes*, Prag, Češka) **(Slika 7)**.



Slika 7*Trametes versicolor* AG 613

3.2.4. Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- HCl (Kemika d.d., Zagreb)
- NaOH (Kemika d.d., Zagreb)
- krumpirov agar (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milano, Italija)

3.3. APARATURA

3.3.1.Tehnička i analitička vaga

U radu su korištene analitička vaga (CRYSTAL 200 CE, Gibertini, Italija) i tehnička vaga (WPS 1200/SO, Technik Unitronik, RADWAG, Njemačka).

3.3.2. Laboratorijski mlin

Laboratorijski mlin (IKA Labortechnik, Njemačka) korišten je za usitnjavanje uzoraka, pri čemu je korišteno sito otvora očica 2 mm **(Slika 8)**.



Slika 8 Laboratorijski mlin

3.3.3. Inkubator

Adsorpcijski eksperimenti provedeni su u termostatu/inkubatoru (BD 53#04-63769, Binder, Tuttlingen, Njemačka). Priprema radne mikrobne kulture, kao i fermentacije na čvrstim

nosačima provedene su u inkubatoru (Termo medicinski aparat, BTEST, Bodalec Havoić, Zagreb, Hrvatska).

3.3.4. Centrifuga

Centrifugiranje uzoraka provedeno je na centrifugi (Centric 150,Tehtnica, Slovenija).



Slika 9 Centrifuga

3.3.5. Spektrofotometar

Koncentracija bojila određena je spektrofotometrijski, pomoću UV-VIS spektrofotometra (SHIMADZU, UV-1700 Pharma Spec., Njemačka) **(Slika 10)**.



Slika 10 Spektrofotometar

3.3.6. pH metar

Za mjerenja pH korišten je pH metar (SevenEasy^{TM} pH, Mettler Toledo, Švicarska)

3.3.7. Analizator vlage

Za određivanje vlage uzoraka korišten je halogeni analizator vlage (**Slika 11**) (HR73 Moisture Analyzer" MettlerToledo, Švicarska).



Slika 11 Analizator vlage

3.3.8. Autoklav

Sterilizacija staklenki, supstrata te hranjivih podloga provođena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd).

3.3.9. Sušionik

Sušenje uzoraka provedeno je u sušioniku ST-01/02 (Instrumentaria, Tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb).

3.3.10. Kromametar

Određivanje boje uzorka provedeno je pomoću kromametra Konica Minolta CR 400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) (**Slika 12**).



Slika 12 Kromametar Konica Minolta CR 400

3.4. METODE

3.4.1. Šaržni adsorpcijski eksperimenti

Adsorpcijski eksperimenti su provedeni u Erlenmayerovim tikvicama od 250 mL u koje je dodan 1 g adsorbensa i 100 mL vodene otopine bojila metilenskog modrila (adsorbat) koncentracije 15 mg L^{-1} pri konstantnoj temperaturi od 25 ºC, pri čemu pH nije podešavan već je samo praćen tijekom eksperimenata. Tikvice su stavljene u inkubator kako bi se osigurala konstatntna temperatura od 25 ºC. Vrijeme kontakta između bioadsorbensa i adsorbata iznosilo je 300 min. Svakih 30 min su izuzimani uzorci (2 mL uzorka otopine adsorbata iznad adsorbensa) u čistu mikro epruvetu, kako bi se pratio postotak uklanjanje bojila u ovisnosti o vremenu kontakta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 5 min na 10 000 g. Dobiveni supernatant (1 mL) korišten je za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije bojila. Apsorbancija je određivana pri valnoj duljini od 665 nm.

Postotak uklanjanja bojila izračunava se preko sljedeće jednadžbe:

$$\%\ uklanjanja\ metilenskog\ modrila = \frac{100 \times (\gamma_0 - \gamma)}{\gamma_0}$$

gdje je

γ_0 početna koncentracija otopine bojila [mg L^{-1}]

γ koncentracija otopine bojila nakon određenog vremena [mg L^{-1}]

Adsorpcijski eksperimenti kojima je cilj bio istražiti utjecaj početne koncentracije bojila, mase adsorbensa, temperature i promjene pH na postotak uklanjanja metilenskog modrila provedeni su kao gore opisani eksperimenti, pri čemu su koncentracije bojila iznosile 5, 15, 25, 35 i 50 mg L^{-1}; mase adsorbensa 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 g; temperature 15, 25 i 35 °C te pH otopine bojila 3,55; 5,53 i 7,52. Za korekciju pH korištene su 0,1 i 0,05 M otopine HCl i NaOH.

3.4.2. Priprema hranjive podloge i uzgoj inokuluma za uzgoj na obojenom pivskom tropu kao čvrstom nosaču

Izvagano je 42 g krumpirovog agara i dodano 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 ˚C kroz 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45 ˚C do 50 ˚C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana te razlivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na podlogu je potom nacijepljen mikroorganizam. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

3.4.3. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T.versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstom supstratu (obojeni pivski trop)

Izvagano je 50 g pivskog tropa u staklenke koje su zatim sterilizirane u autoklavu (121 ºC; 0,6 – 0,8 bar; 20 min). Nakon hlađenja u svaku staklenku je dodano 120 mL vodene otopine metilenskog modrila koncentracije 50 mg L^{-1} i sve je dobro izmiješano kako bi se bojilo što ravnomjernije raspodjelilo po pivskom tropu. Nakon 24 h određen je udio vode u tako pripremljenim uzorcima, koji je iznosio od 62 - 65% za sve uzorke. Obojeni pivski trop u staklenkama inokuliran je s pet micelijskih diskova (promjera 6 mm) kulture *T. versicolor* AG 613 izrezanih pomoću sterilnog bušača čepova s prethodno pripremljenih agarnih ploča s navedenom kulturom starom 7 dana. Sadržaj staklenki potom je dobro izmiješan. Svaka staklenka zatvorena je listom sterilnog papirnatog ubrusa pričvršćenog gumicom kako bi se

osigurali aerobni uvjeti i sterilnost unutar tikvice. Abiotičke kontrole nisu nacijepljene radnim mikroorganizmom, već pripremljene kako je navedeno gore i također zatvorene sterilnim ubrusom. Nakon toga, svaka staklenka je označena i stavljena u inkubator, a inkubacija je trajala 10, 20 i 30 dana, pri čemu staklenke nisu protresane.

3.4.4. Određivanje udjela vode

Analizator vlage opremljen je vagom i halogenim grijačem koji generira infracrveno zračenje. U malu aluminijsku posudicu ravnomjerno je raspoređen uzorak (oko 3 g). Određivanje vlage temelji se na termogravimetrijskom principu gdje se uslijed zagrijavanja uzorka i isparavanja vode smanjuje masa uzorka do postizanja konstantne mase kada se proces prekida.

3.4.5. Određivanje boje uzoraka

Tijekom istraživanja biološkog obezbojenja pivskog tropa pomoću *T. versicolor* su praćene *a**, *b** i *L** vrijednosti uzoraka nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije i njihovih pripadajućih abiotičkih kontrola (nakon 10, 20 i 30 dana).

Da bi se u potpunosti definirala boja mora se odrediti:

- vrsta boje: crvena, plava, zelena, žuta; u ovisnosti o prevladavajućoj valnoj duljini,
- zasićenost boje, tj. kroma koja predstavlja intenzitet boje; te reflektiranu ili apsorbiranu svjetlost.

Mjerenja boje uzoraka provedena su pomoću kromametra Minolta CR 400. Ovakav tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Predmet se postavlja na otvor mjerne glave promjera 8 mm. U otvoru se nalazi ksenonska lučna svjetiljka, koja pulsiranjem baca svjetlost okomitu na površinu predmeta. Svjetlost se reflektira, a takvu svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotoćelija. Podatke zapisuje računalo i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; Lab; LCH; Hunter Lab).

U radu je korišten Lab sustav, koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko.

L* - vrijednosti daju ocjenu je li nešto tamno ili svijetlo. Ako je L* = 0, tada je predmet crn, a ako je L* = 100, tada je bijel.

a* - vrijednost može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, tada je rezultat crvena boja; a ako je negativna, rezultat je zelena boja.

b* - vrijednost može, također biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, rezultat je žuta boja; a ako je negativna, rezultat je plava boja.

Ukupna promjena boje (ΔE) je izračunava se prema jednadžbi:

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

te kao promjena boje (C*ab):

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

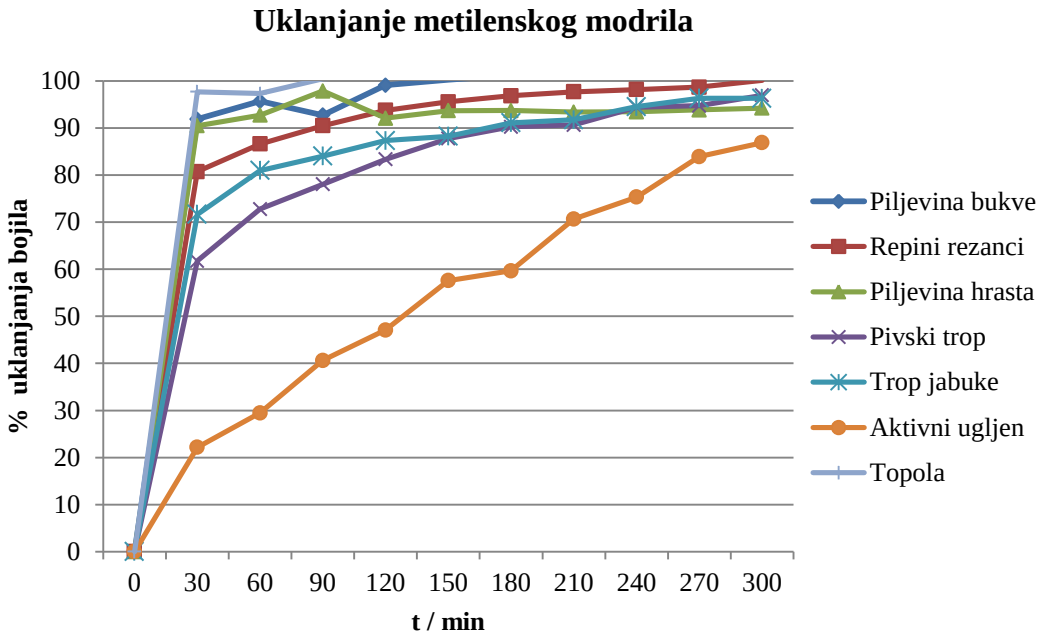
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UKLANJANJE METILENSKOG MODRILA IZ VODENIH OTOPINA ADSORPCIJOM NA RAZLIČITE LIGNOCELULOZNE MATERIJALE KAO BIOADSORBENSE

Bioadsorbensi ispitivani (otpad drvne i prehrambene industrije) u ovom radu odabrani su zbog svog sastava, široke rasprostranjenosti i velikih dostupnih količina. Kao što je već ranije navedeno, celuloza kao osnovna sastavnica svih lignocelulozni materijala je veliki linearni polimerni lanac, na kojem se nalazi velik broj hidroksilnih funkcionalnih skupina koje su dostupne za vezanje adsorbata (Klemm i sur., 2002). Za očekivati je da će bioadsorbensi s većim udjelom celuloze, poput piljevina drveta biti učinkovitiji pri uklanjanju bojila iz obojenih otpadnih voda.

Šaržni adsorpcijski eksperimenti pri 25 °C s nepromjenjivom količinom bioadsorbensa (1 g), koncentracijom adsorbata od 15 mg L^{-1} i kontaktnim vremenom od 300 min, bez podešavanja pH, provedeni su kako bi se istražila mogućnost primjene odabranih lignocelulozni otpadnih materijala kao bioadsorbenasa za uklanjanje sintetskog bojila metilenskog modrila iz vodenih otopina. Postotak uklanjanja metilenskog modrila u ovisnosti o vremenu i bioadsorbensu prikazan je na **Slici 13.**

Nakon 300 min postignut je visok stupanj uklanjanja bojila (> 95%) upotrebom svih bioadsorbensa. Također je vidljivo da je uklanjanje bojila vrlo intenzivno tijekom prvih 30 min provođenja eksperimenta, gdje je za piljevine drveta koje imaju velik udjel celuloze postotak uklanjanja iznosio više od 90%. Nakon 30 min intenzitet uklanjanja bojila se smanjuje, ali postotak uklanjanja raste sve dok ne dođe do zasićenja adsorbensa. To se može objasniti intenzivnijom adsorpcijom na vanjskoj površini adsorbensa, iza koje slijedi otežana adsorpcija unutar pora. Tijekom procesa adsorpcije bojila, u početku molekule bojila moraju doći do graničnog sloja, proći kroz njega sve do površine adsorbensa i na kraju difundirati kroz poroznu strukturu adsorbensa. Ovaj fenomen zahtijeva relativno dugo kontaktno vrijeme (Malik, 2003). Najveći postotak uklanjanja bojila nakon 300 min postignut je upotrebom piljevina bukve i topole te repinih rezanaca i iznosio je 100%. Postotak uklanjanja nakon 300 min za sve ostale korištene adsorbense, uključujući i aktivni ugljen koji je služio kao kontrola, iznosio je od 86 do 97%.



Slika 13 Uklanjanje metilenskog modrila adsorpcijom na različite bioadsorbense ($m_{bioadsorbensa}$ = 1 g, $\gamma_{otopina\ bojila}$ = 15 mg L^{-1}, $V_{otopina\ bojila}$ = 100 mL, t = 25 °C)

Tablica 3 prikazuje promjene pH vrijednosti vodene otopine bojila tijekom provođenja adsorpcijskih eksperimenta.

Tablica 3 Promjene pH tijekom eksperimenata sa bioadsorbensima

Adsorbens (m = 1 g)	**pH**				
	Metilensko modrilo (γ = 15 mg L^{-1}) pH oko 6				
	Kontaktno vrijeme / min				
	0	**30**	**60**	**150**	**300**
Piljevina bukve	7	7	7,2	7,4	7,4
Repini rezanci	6,2	6,3	6,3	6,3	6,3
Piljevina hrasta	5,5	5,5	5,0	5,0	4,9
Pivski trop	6,0	6,1	6,1	6,1	6,1
Trop jabuke	3,9	3,8	3,8	3,7	3,7
Aktivni ugljen	7,0	7,5	7,6	7,7	7,8
Piljevina topole	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7

Tijekom provođenja ovog dijela istraživanja nije podešavana pH vrijednost sustava bioadsorbens/otopina adsorbata, jer se pokušala ispitati učinkovitost bioadsorbensa uz njegove minimalne promjene. pH nije održavan konstantnim tijekom eksperimenata, već je samo praćen, ali nije zabilježena veća promjena pH tijekom provođenja eksperimenata neovisno o upotrijebljenom bioadsorbensu. pH je ovisno o bioadsorbensu iznosio od 3,7 – 7,8. Najveći postotak uklanjanja bojila postignut je primjenom piljevina topole i bukve kao adsorbensa, pri čemu je pH sustava iznosio 7,4 – 7,7.

Istraživanja koja su proveli Batzias i Sidiras (2007) pokazala su da negativno nabijene funkcionalne skupine na površini bioadsorbenasa pogoduju adsorpciji kationskih bojila, kao što je metilensko modrilo. Adsorpcijski kapacitet ukazuje da porastom pH dolazi do poboljšanja adsorptivnih svojstava materijala. Slabija adsorpcija metilenskog modrila u kiselom pH rezultat je prisustva suviška H^+ iona koji se natječu za adsorpcijsko mjesto s kationom bojila. Kako pH sustava raste broj pozitivno nabijenih skupina se smanjuje, dok se broj negativno nabijenih skupina povećava. Negativno nabijene skupine su podložnije adsorpciji kationa bojila zbog elektrostatskih privlačenja.

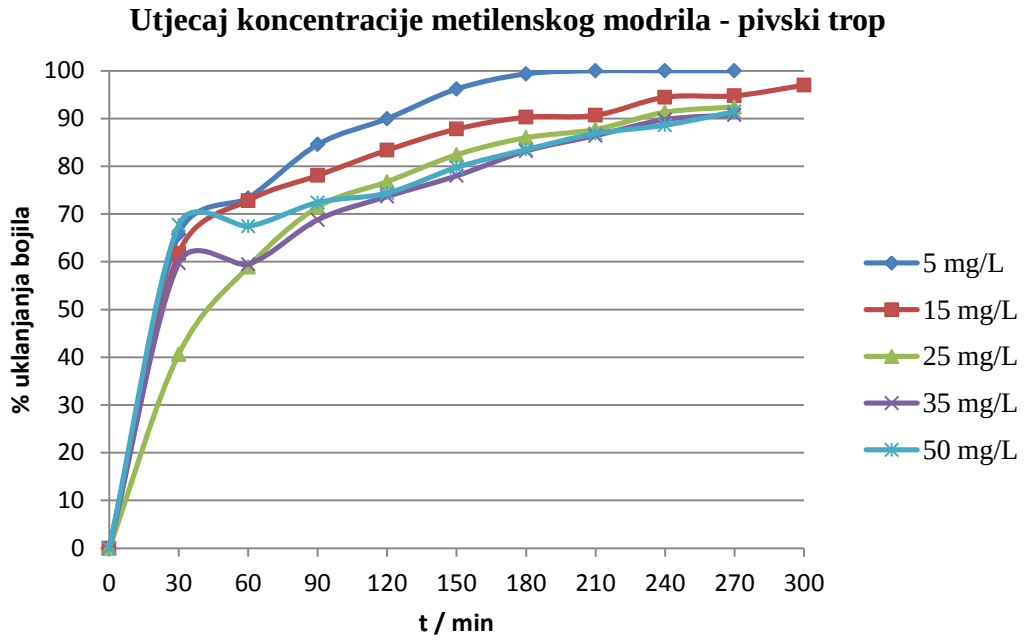
Nakon provođenja ovog dijela istraživanja iz svake skupine bioadosrbensa, ovisno o podrijetlu, odabran je jedan za daljnja istraživanja. Iz skupine otpada drvne industrije korištena je piljevina topole, a iz prehrambene industrije pivski trop. Svi daljnji eksperimenti provedeni su korištenjem ova dva bioadsorbensa.

4.2. UTJECAJ KONCENTRACIJE BOJILA NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

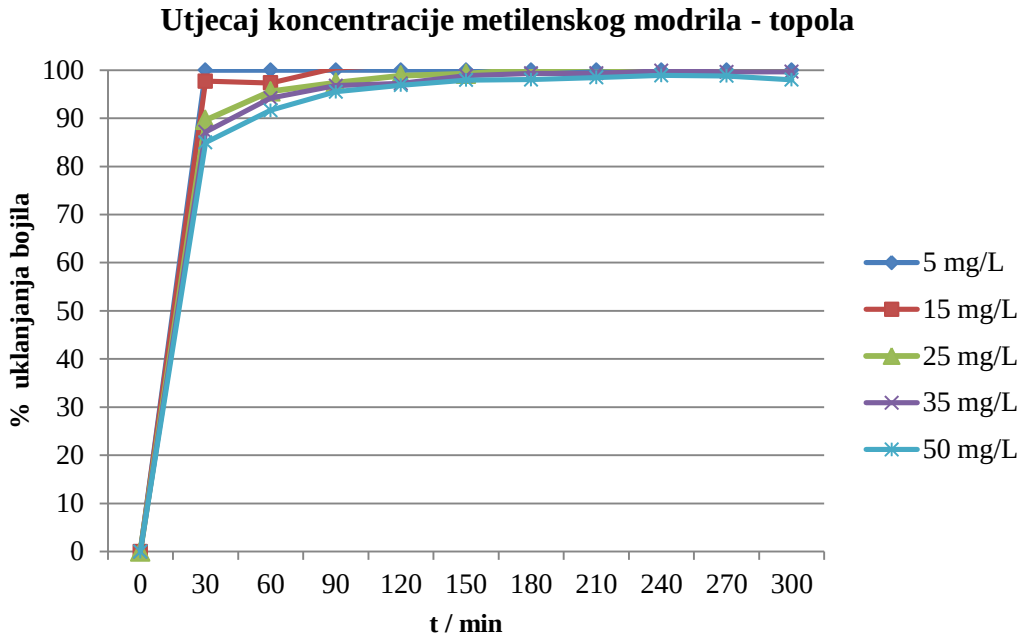
Kako bi se istražio utjecaj koncentracije bojila na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom, provedeni su eksperimenti sa sljedećim koncentracijama bojila: 5, 15, 25, 35 i 50 mg L^{-1}. Rezultati su prikazani na **Slikama 14** i **15.**

Iz **Slika 14** i **15** vidljivo je da se učinkovitost uklanjanja bojila povećava smanjenjem koncentracije bojila kod oba bioadsorbensa. Što je manja koncentracija bojila ono će se učinkovitije ukloniti. Početna koncentracija adsorbata ima važnu ulogu, jer konstantna masa adsorbensa može adsorbirati samo određenu količinu adsorbata. Što je veća koncentracija onečišćujućih tvari (adsorbata) u otpadnoj vodi, manji je volumen vode koji određena masa adsorbensa može pročistiti (Khattri i Singh, 2009.).

Pri koncentraciji 5 m gL^{-1}postotak uklanjanja metilenskog modrila iznosio je 100% za oba upotrijebljena bioadsorbensa. Topola se pokazala učinkovitijim bioadsorbensom, jer je potpuno uklanjanje bojila postignuto i pri koncentracijama 15 i 25 mg L^{-1}. Najveće se razlike u postotku uklanjanja za oba adsorbensa vide u prvih 30 min provođenja eksperimenta, da bi nakon 300 min postotak uklanjanja za svaki adsorbens bio gotovo isti, neovisno o povećanju koncentracije adsorbata. Navedeno je u skladu s istraživanjima koja su proveli Khattri i Singh, 2009. i koja su pokazala da adsorbens ima određeni broj adsorpcijskih mjesta na koje se može vezati bojilo te nakon što dođe do zasićenja tih mjesta, adsorpcija prestaje bez obzira na preostalu količinu bojila.



Slika 14 Utjecaj koncentracije metilenskog modrila na postotak njegova uklanjanja iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}}$ =1g, γ_{bojila} = 5, 15, 25, 35, 50 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t =25 °C)

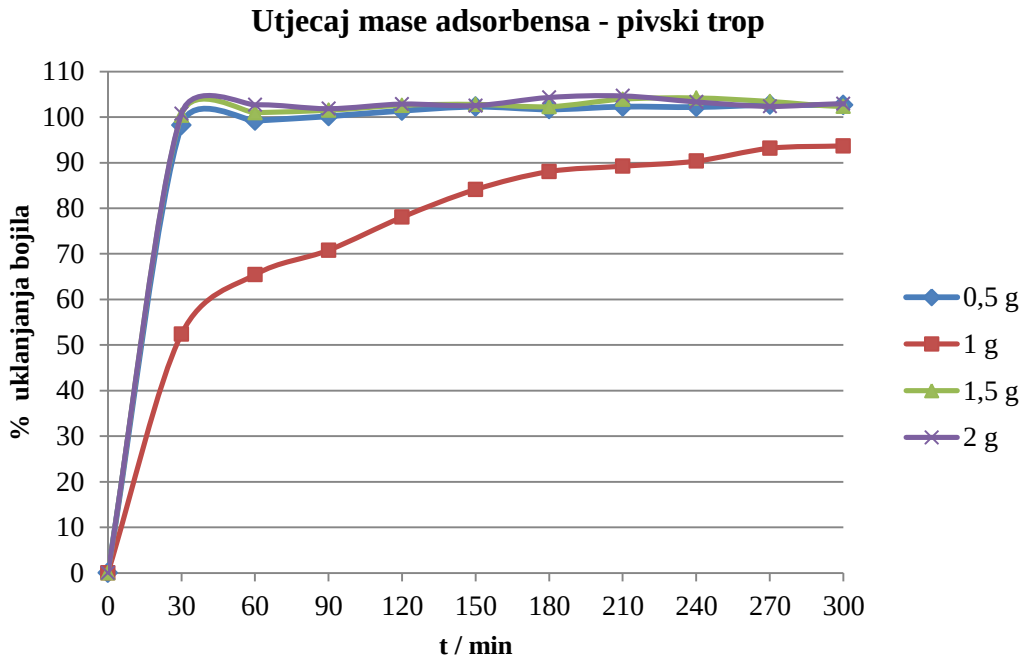


Slika 15 Utjecaj koncentracije metilenskog modrila na postotak njegova uklanjanja iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole ($m_{\text{pivski trop}}$ =1g, γ_{bojila} = 5, 15, 25, 35, 50 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t =25 °C)

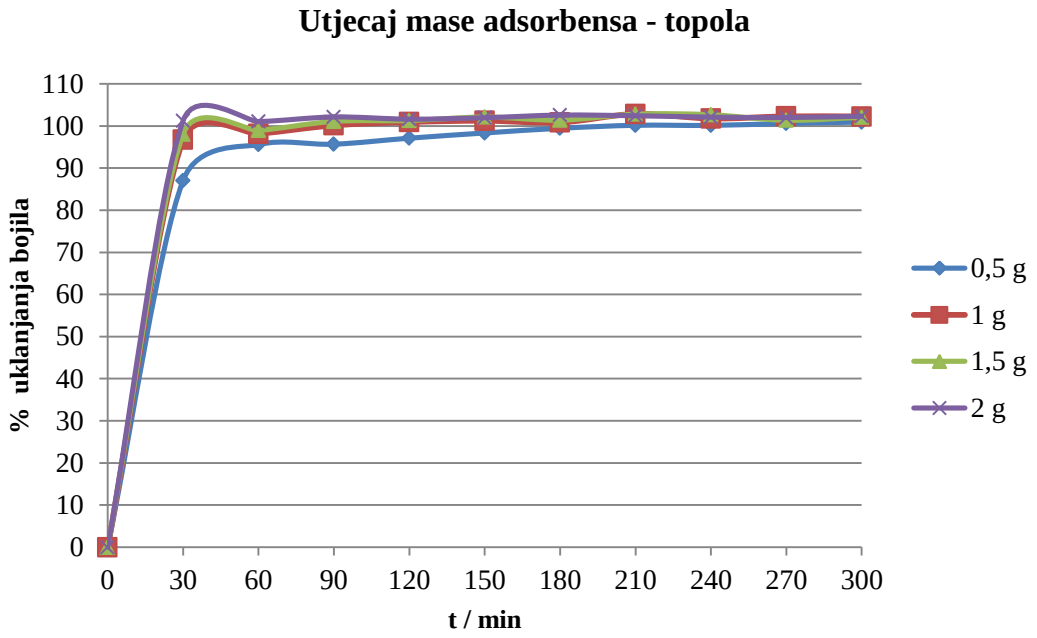
4.3. UTJECAJ MASE ADSORBENSA NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

Kako bi se istražio utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine, provedeni su eksperimenti sa različitim masama adsorbensa: 0,5; 1; 1,5 i 2 g. Iz rezultata istraživanja prikazanih na **Slikama 16** i **17** vidljivo je da se utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja može uočiti samo u početnim fazama eksperimenta (prvih 30 min), što je osobito uočljivo kada je kao bioadsorbens korištena topola. U prvim fazama eksperimenata postotak uklanjanja kontinuirano raste od 87 do 100%, povećanjem mase adsorbensa od 0,5 do 2 g. U kasnijim fazama eksperimenta (nakon 200 min) postignuto je potpuno uklanjanje bojila (100%) neovisno o korištenoj masi adsorbensa. Slični rezultati dobiveni su i primjenom pivskog tropa kao bioadsorbensa. Izuzetak je eksperiment s 1 g pivskog tropa kao bioadsorbensom, koji ne slijedi ovaj trend.

Sastav piljevine topole i pivskog tropa koji uključuje celulozu, hemicelulozu i lignin sadrži velik broj OH^- skupina koje igraju važnu ulogu u adsorpcijskim procesima (O'Connell i sur., 2008). Molekule kationskih bojila poput metilenskog modrila, u vodenim otopinama disociraju na pozitivno nabijene komponente i adsorbiraju se na mjesta za vezanje (hidroksilne skupine) adsorbensa. Fenomen povećanja postotka uklanjanja metilenskog modrila s povećanjem mase adsorbensa može se objasniti većim brojem adsorpcijskih mjesta (Selvaraj et al., 2003).



Slika 16 Utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}}$ = 0,5; 1, 1,5; 2 g, γ_{bojila} = 15 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t = 25 °C)

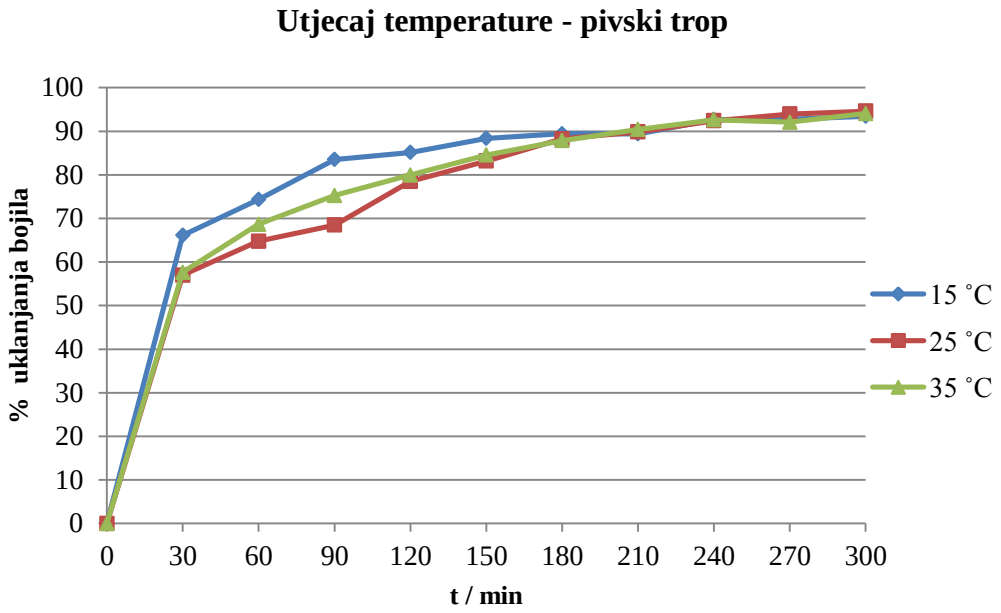


Slika 17 Utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole (m_{topola} = 0,5; 1, 1,5; 2 g, γ_{bojila} = 15 mg L^{-1}, $V_{otopina\ bojila}$ = 100 mL, t = 25 °C)

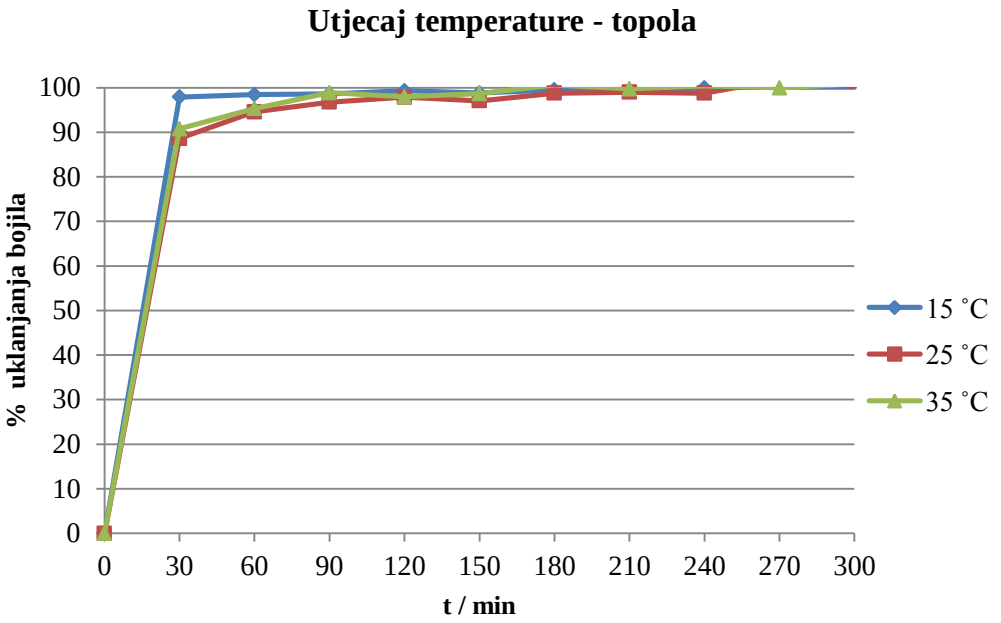
4.4. UTJECAJ TEMPERATURE NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

Kako bi se ispitao utjecaj temperature na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodenih otopina adsorpcijom na pivski trop i piljevinu topole kao bioadsorbense, provedeni su šaržni adsorpcijski eksperimenti pri temperaturama 15, 25 i 35 ºC.

Iz rezultata dobivenih ispitivanjem i prikazanih na **Slikama 18** i **19** je vidljivo da promjenom temperature nije došlo do značajnijeg smanjenja ili povećanja postotka uklanjanja bojila nakon 300 min za oba bioadsorbensa. Razlike u postotku uklanjanja opet se najbolje mogu vidjeti u prvih 30 min eksperimenta, pri čemu je ova razlika najveća, odnosno uklanjanje je najučinkovitije pri 15 ºC za oba bioadsorbensa.



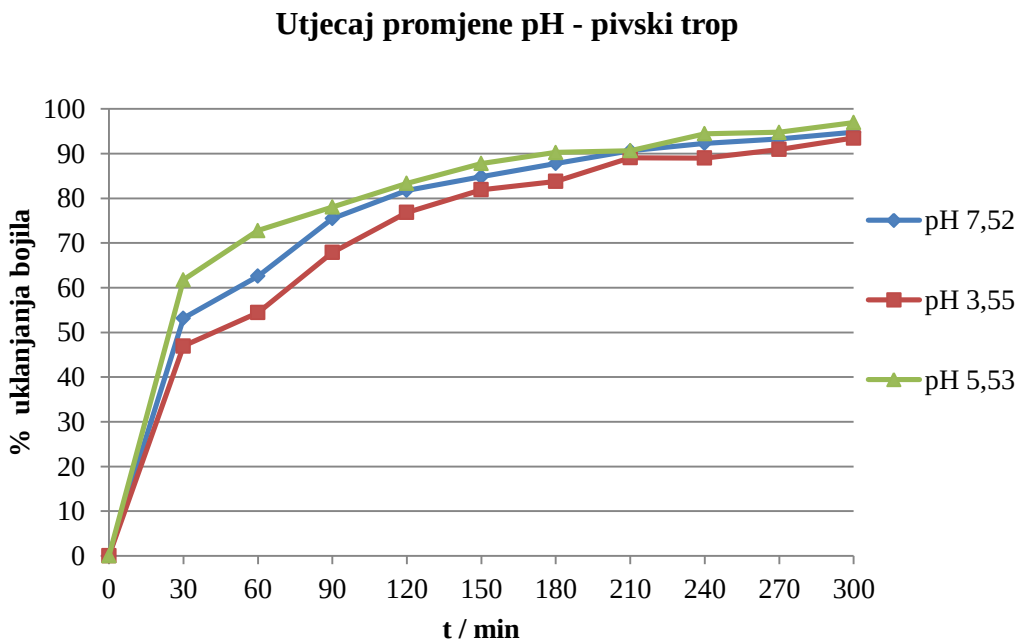
Slika 18 Utjecaj temperature na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop ($m_{\text{pivski trop}}$ = 1 g, γ_{bojila}= 15 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t = 15, 25, 35 °C)



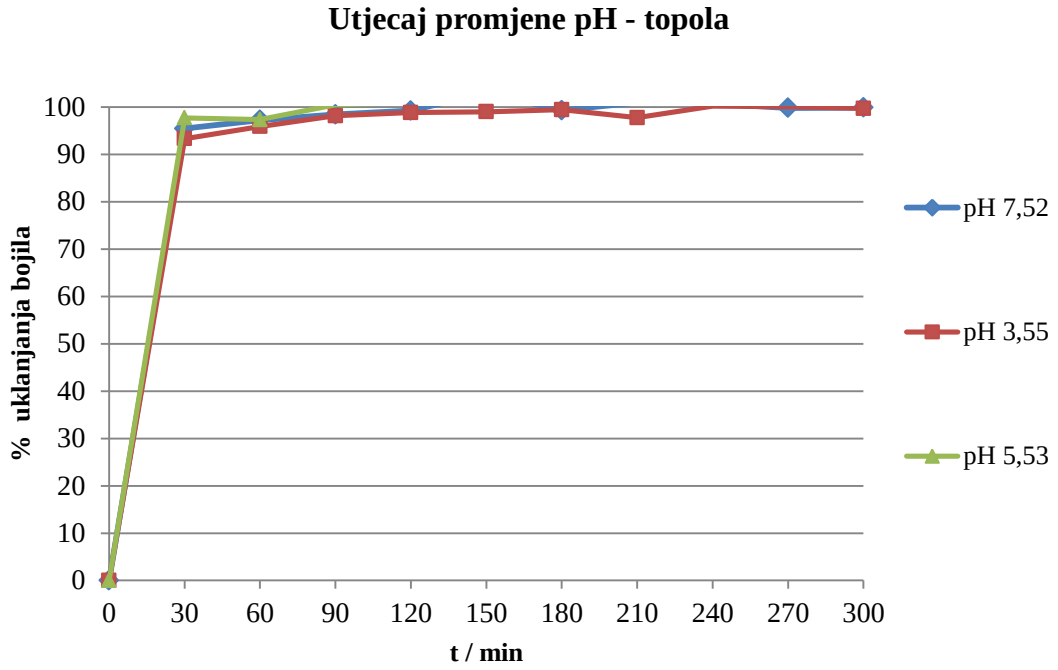
Slika 19 Utjecaj temperature na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole (m_{topola} = 1 g, γ_{bojila} = 15 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t = 15, 25, 35 °C)

4.5. UTJECAJ pH NA POSTOTAK UKLANJANJA METILENSKOG MODRILA IZ VODENE OTOPINE ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP I PILJEVINU TOPOLE KAO BIOADSORBENSE

Utjecaj pH na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodenih otopina ispitan je pri nativnom pH vodene otopina bojila 15 mg L^{-1} bez podešavanja, koji je iznosio 5,53 te pH vrijednostima 3,55 i 7,52. Rezultati su prikazani na **Slikama 20** i **21**. Istraživanja drugih autora pokazaju da pH vodenog okoliša značajno utječe na uklanjanje onečišćujućih tvari iz vodenih otopina (otpadnih voda) adsorpcijom te da promjena pH utječe na adsorpcijski proces preko disocijacije funkcionalnih skupina adsorbata i adsorbensa (Khattri i Singh, 2009.). Kada je kao bioadsorbens korištena topola, nije uočena značajnija razlika u postotku uklanjanja bojila, ovisno o pH vodenog okoliša. Nešto značajnija razlika uočena je kada je kao bioadsorbens korišten pivski trop, pri čemu je pri nižem pH postignut manji postotak uklanjanja bojila, što je posebno uočljivo u prvih 30 min provođenja eksperimenta. Ovo je u skladu s istraživanjima koja su proveli Kavitha i Namasivayam (2007) i koja su pokazala da veća koncentracija H^+ iona pri nižem pH dovodi do njihova natjecanja s kationskim mjestom metilenskog modrila za adsorpcijsko mjesto adsorbensa. I istraživanja drugih autora pokazala su da se postotak uklanjanja metilenskog modrila uglavnom povećava s povećanjem pH vrijednosti vodenog okoliša (Gupta et al., 2004; Singh et al., 2003; Janos, 2003).



Slika 20 Utjecaj pH na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom na pivski trop($m_{\text{pivski trop}}$ = 1 g, γ_{bojila} = 15 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t = 25 °C, pH 3,55; 5,53 i 7,52)



Slika 21 Utjecaj pH na postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine adsorpcijom na piljevinu topole (m_{topola} = 1 g, γ_{bojila} = 15 mg L^{-1}, $V_{\text{otopina bojila}}$ = 100 mL, t = 25 °C, pH 3,55; 5,53 i 7,52)

4.6. BIOLOŠKA OBRADA OBOJENOG PIVSKOG TROPA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *T. versicolor*

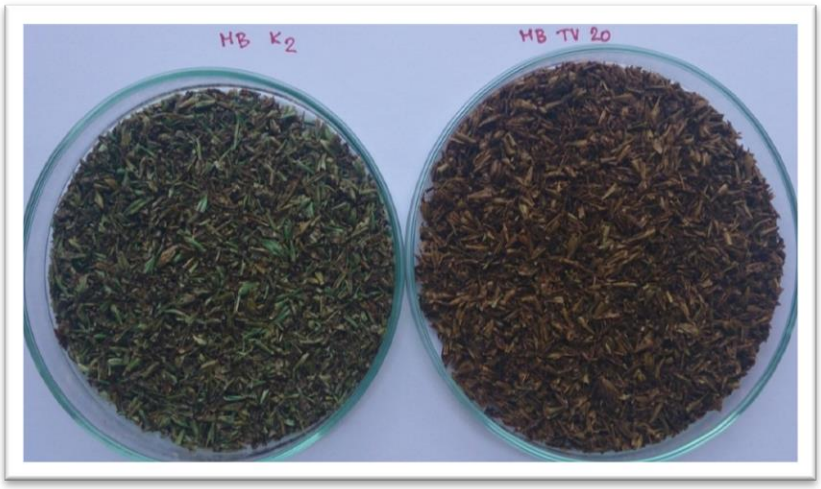
Nakon uklanjanja bojila iz otpadnih voda adsorpcijom na otpadne lignocelulozne materijale, zaostaje obojeni materijal koji se mora zbrinuti na odgovarajući način. Adsorpcija bojila je ekonomičan pristup obradi otpadnih voda (Gupta i Suhas, 2009), ali uklanjanje bojila adsorpcijom iz efluenta ne uklanja bojilo iz okoliša (Kadam i sur., 2013a i Kadam i sur., 2013b). Bojilo je još uvijek je prisutno u okolišu, jer je adsorbirano na supstrat. Fermentacija na čvrstim nosačima nudi uklanjanje adsorbiranog bojila na poljoprivrednom otpadu i osigurava potpuno uklanjanje bojila (Nigam i sur., 2000). Kako bi se istražila mogućnost daljnjeg uklanjanja bojila, odn. njegove razgradnje pomoću mikroorganizama s ciljem dobivanja netoksičnog otpada koji

se može zbrinuti bez negativnih utjecaja po okoliš, proveden je uzgoj gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium i Coriolus versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, gdje je kao nosač/supstrat korišten pivski trop obojen metilenskim modrilom. Ove gljiveodabrane su zbog proizvodnje ekstracelularnih enzima koji sudjeluju kako u razgradnji lignocelulozih sastavnica (smanjujući na taj način volumen otpada), tako i u razgradnji sintetskih bojila do netoksičnih razgradnih produkata.

Na **Slikama 22, 23** i **24** su prikazani uzorci obojenog pivskog tropa nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije pomoću *Trametes versicolor* u odnosu na odgovarajuće abiotičke kontrole (nakon 10, 20 i 30 dana). Usporedbom abiotičke kulture i fermentiranog uzorka vidljivo je obezbojenje već nakon 10 dana, dok nakon 30 dana dolazi do gotovo potpunog obezbojenja fermentiranog uzorka.



Slika 22 Izgled abiotičke kontrole i obojenog fermentiranog uzorka pivskog tropa nakon 10 dana

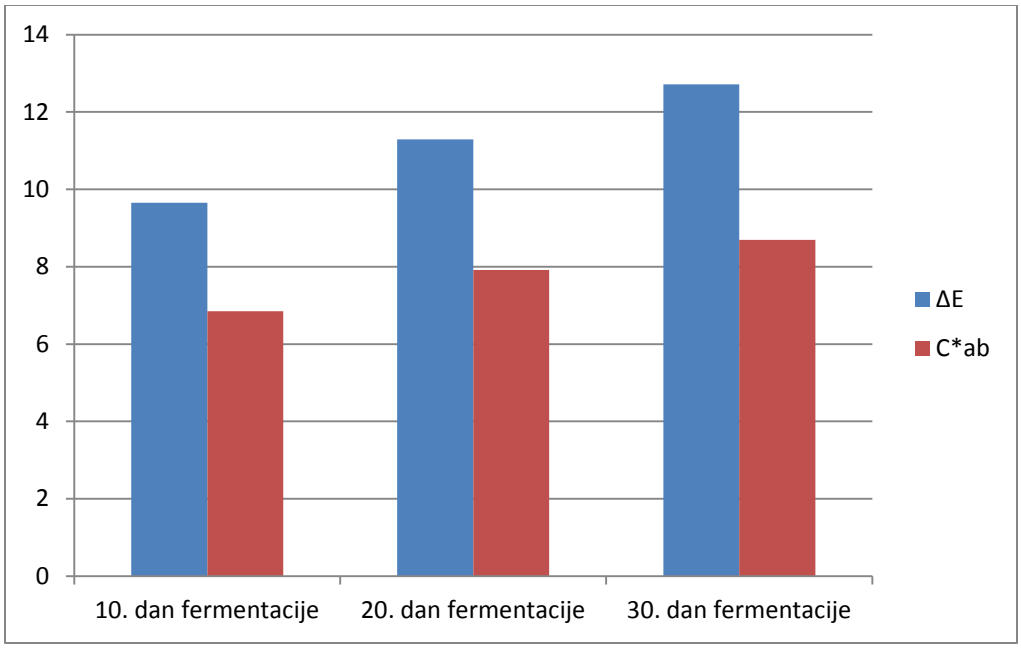


Slika 23 Izgled abiotičke kontrole i obojenog fermentiranog uzorka pivskog tropa nakon 20 dana



Slika 24 Izgled abiotičke kontrole i obojenog fermentiranog uzorka pivskog tropa nakon 30 dana

Slika 25 prikazuju rezultate dobivene kromametrijskim određivanjem boje fermentiranih uzoraka nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije i njihovih pripadajućih abiotičkih kontrola. Iz grafa je vidljiv kontinuirani porast ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije, kao rezultat obezbojenja uzorka obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor*.



Slika 25 Ukupna promjena boje i intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja moguće je izvesti sljedeće zaključke:

Postotak uklanjanja metilenskog modrila iz vodenih otopina adsorpcijom na otpadne lignocelulozne materijale kao bioadsorbense bio je veći od 90% za svih šest ispitivanih materijala, koji su uključivali otpadni materijal iz drvne industrije (piljevine bukve, hrasta i topole) i prehrambene industrije (repini rezanci, trop jabuke i pivski trop).

Uklanjanje bojila bilo je vrlo intenzivno u prvim fazama eksperimenta (prvih 30 min), pri čemu se po učinkovitosti ističu piljevine topole (97%) i bukve (91%). Nakon 300 min došlo je do potpunog uklanjanja metilenskog modrila (100%) kada su kao bioadsorbensi korištene piljevine topole i bukve te repini rezanci. Postotak uklanjanja bojila postignut nakon 300 min korištenjem ostalih adsorbensa, uključujući i aktivni ugljen, iznosio je od 86 do 96%.

Piljevina topole i pivski trop pokazali su se najpogodniji za daljnja istraživanja, pri čemu je ispitan utjecaj početne koncentracije bojila, mase adsorbensa, temperature i pH na postotak uklanjanja metilenskog modrila.

Za oba korištena bioadsorbensa uočena je razlika u postotku uklanjanja bojila za različite koncentracije bojila u prvih 30 min eksperimenta, pri čemu je veći postotak uklanjanja postignut pri manjim koncentracijama bojila (5 i 15 mg L^{-1}). Pri koncentraciji 5 mg L^{-1} postotak uklanjanja metilenskog modrila iznosio je 100% za oba upotrijebljena bioadsorbensa. Nakon 300 min, postotak uklanjanja za svaki adsorbens bio je gotovo isti, neovisno o povećanju koncentracije adsorbata.

Utjecaj mase adsorbensa na postotak uklanjanja bojila može se uočiti samo u početnim fazama eksperimenta (prvih 30 min), što je osobito uočljivo kada je kao bioadsorbens korištena topola. U prvim fazama eksperimenata postotak uklanjanja kontinuirano raste od 87 do 100%, povećanjem mase adsorbensa od 0,5 do 2 g. U kasnijim fazama eksperimenta (nakon 200 min) postignuto je potpuno uklanjanje bojila (100%) neovisno o korištenoj masi adsorbensa.

Povećanjem temperature provođenja adsorpcijskih eksperimenta od 15 do 35 °C nije došlo do značajnijeg povećanja ili smanjenja brzine i postotka uklanjanja bojila za oba korištena bioadsorbensa. Razlike u postotku uklanjanja najbolje se mogu uočiti u prvih 30 min eksperimenta, pri čemu je ova razlika najveća, odnosno uklanjanje je najučinkovitije pri 15 °C za oba bioadsorbensa.

Nije uočena značajnija razlika u uklanjanju metilenskog modrila u ovisnosti o pH vrijednosti vodenog okoliša kada je kao bioadsorbens korištena topola. Nešto značajnija razlika uočena je kada je kao bioadsorbens korišten pivski trop, pri čemu je pri nižem pH postignut manji postotak uklanjanja bojila, što je posebno uočljivo u prvih 30 min provođenja eksperimenta.

Biološkom obradom pivskog tropa obojenog metilenskim modrilom pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* uzgajane u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima došlo je do vizualnog smanjenja intenziteta boje, odn. obezbojenja u fermentiranim uzorcima u odnosu na abiotičku kontrolu. Rezultati mjerenja pokazali su kontinuirani porast ukupne promjene boje i promjene intenziteta boje fermentiranih uzoraka u odnosu na abiotičku kontrolu nakon 10, 20 i 30 dana fermentacije, kao rezultat obezbojenja uzorka obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor*.

6. LITERATURA

Bailey S.E. et al., A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals, *Water Res*:33: 2469-2479, 1999.

Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., Micorbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review: *Bioresource Technology*:58, 217-227, 1996.

Bhatnagar, A., Sillanpää, M., Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment-A review, *Chemical Engineering Journal*: 157(2-3), 277–296, 2010.

Bhattacharyya K.G. and Sharma A., Adsorption of Pb(II) from aqueous solution by Azadirachta indica (Neem) leaf powder. *Journal of Hazardous Materials*: 113, 97–109, 2004.

Batzias F.A., Sidiras D.K. Simulation of dye adsorption by beech sawdust as affected by pH. *Journal of Hazardous Materials*: 141, 668 – 679, 2007.

Bednar, H., and D. Fengel. Holz-Roh Werskt. 32: pp. 99-107, 1974.

Carmo J.P. and Ribeiro J.E.: Optical Techniques for Defect Evaluation in Vehicles. *Intech*, 2012.

Christie R, Colour Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001.

Crini G., Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*: 97, 1061–85, 2006.

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

Garg V.K. et al., Basic dye (Methylene blue) removal from simulated wastewater by adsorption using Indian Rosewood sawdust: atimber industry waste, *Dyes Pigments*: 63, 243-250, 2004.

Glenn, J.K., Gold, M.H., Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degarding basidiomycete Phareochaete shrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*: 45 (6), 1741 – 1747, 1983.

Ghoreishi S.M. and Haghighi R., Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of nonbiodegradable textile effluent, *Chemical Engineering Journal*:95, 163–169, 2003.

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

Gupta V.K., Suhas., Aplication of low cost adsorbents for dye removal – A review. *Journal of Enviromental Management*: 90 2313-2342, 2009.

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

Hessel C, Allegre C, Maisseu M. Charbit F, Moulin P, Guidelines and legislation for dye house effluents. *Journal of Environmental Management*: 83, 171-180, 2007.

Janos P., Sorption of basic dyes onto iron humate, *Environmental Science&Technology*:37, 5792-5798, 2003.

Jurac Z., Felić E., Jurac V., Otpadne vode u pamučnoj industriji Duga Resa. *Stručni rad*. Sigurnost 50 (2) 129-138, 2008.

Kavitha D. and Namasivayam C. (2007), Experimental and kinetic studies on methylene blue adsorption by coir pith carbon, *Bioresource Technology*:98, 14-21.

Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu. Zavod za organsku tehnologiju. Tehnološki procesi organske industrije*, III. Bojila i bojenje*
(http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf, 7.12.2014.)

Klemm, D., Schmauder, H.P., Heinze, T., 2002. Cellulose. In: De Baets, S., Vandamme, E.J., Steinbuchel, A. (Eds.), Polysaccharides II. Polysaccharides from Eukaryotes, *Wiley-VCH, Weinheim*: vol 6, pp. 275–320.

Kadam A.A., Kamatkar, J.D., Khandare, R.V., Jadhav, J.P., Govindwar, S.P., Solid state fermentation: tool for bioremediation of adsorbed textile dyestuff on distillery industry waste-yeast biomass using isolated Bacillus cereus strain EBT1. *Environmental Science and Pollution Research*: 20, 1009–1020, 2013a.

Kadam A.A., Lade, H.S., Patil, S.M., Govindwar, S.P., Low cost CaCl2 pretreatment of sugarcane bagasse for enhancement of textile dyes adsorption and subsequent biodegradation of adsorbed dyes under solid state fermentation. *Bioresource Technology*:132, 276–284, 2013b.

Khattri, S. D., &Singh, M. K.: Removal of malachite green from dye wastewater using neem saw dust by adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 167 (1-3), 1089–94, 2009.

Kirby, N., Bioremediation of textile industry wastewater by white rot fungi. *DPhil Thesis*, University of Ulster, Coleraine, UK, 1999.

Kumar M.N.V.R., Sridhari T.R., Bhavani K.D.,Dutta, P.K., Trends in color removal from textile mill effluents.*Colorage*:40, 25-34, 1998.

Lončar L.N.: Uklanjanje fenola i boja iz otpadne vode prirodnim i rekombinantnim oksidativnim enzimima. *Doktorska disertacija*. Hemijski fakultet. Beograd. 2012.

Merwe van der J.J.: Production of laccase by the white – rot fungus *Pycnoporus sanguineus* ,*MSc thesis*, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Bloemfontein (South Africa), 2002.

Michel Jr., F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A., Reddy, C.A., Role of manganese peroxidaes of Phanerochaete chrysporium in the decolarization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*:57, 2368 – 2375, 1991.

Mussato, S.I., Dragone G., Roberto I.C. Brewers' spent grain:generation, characteristics and potential application, *Journal of Cereal Science*:43, 1-14, 2006.

Mohammed M.A., Shitu A. And Ibrahim A. Removal of Methylene Blue Using Low Cost Adsorbent:A review. *Research Journal of Chemical Sciences* Vol. 4(1), 91-102, 2014.

Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D., &Marchant, R.: Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues*, BioresourceTechnology*: 72, 219–226, 2000.

Nilsson R, Nordlinder R, Wass U, Meding B, Belin L. Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes*. British Jorinal of Industrial Medicine*:50, 65-70, 1993.

Noroozi, B., Sorial, G. A., Bahrami, H. and Arami, M., Equilibrium and kinetic adsorption study of a cationic dye by a natural adsorbent-Silkworm pupa. *Journal of Hazardous Materials*: B139, 167–174, 2007.

O'Connell, D.W., Birkinshaw, C., O'Dwyer, T.F.: Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review, *Bioresource Technology*:99, 243-250, 2008.

Paszczynski A., Crawford R.C., Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress*:11, 368-379, 1995.

Rafatullah M., Sulaiman O., Hashim R. and Ahmad A., *Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review*, *Journal of Hazardous Materials*:177, 70–80, 2010.

Ramesh S.T., Gandhimathi R., Elavarasi T.E., Isai Thamizh R., Sowmya K., Nidheesh P.V., Comparasion of methylene blue adsorption from aqueous solution using spennt tea dust and raw coir pith, *Global NEST Journal*:Vol 16, No1, pp 146-159, 2014.

Sevaraj K., Manonmami S. and Pattabhi S.: Removal of hexavalent chromium using distillery sludge, *Bioresource Technology*:89, 207-211, 2003.

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. *Advances in Bothanical Research*:61, 263-308. Elsevier, Amsterdam, 2012.

Sipponen M.H., Pihlajaniemi V., Litturen K., Pastinen O., Laakso S., Determination of surface accessible acidic hydroxyls and surface area of lignin by cationic dye adsorption. *Bioresource Technology*:169, 80-87,2014.

Sjostrom, E. (1993): *Wood Chemistry. Fundamentals and Application,* 2nd ed.,:Academic press, San Diego, USA, 292.

Slokar Y.M., Le Marechal A.M., Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes Pigments:*37, 335-356, 1998

Spagnuolo, M., Crecchio, C., Pizzigallo, M.D.R., Ruggiero P.: Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. *Bioresource Technology*:60, 215-222, 1997.

Tavares A.M.P., Coelho M.A.Z., Coutinho J.A.P., Xavier A.M.R.B., Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modrlling, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:80, 669 – 676, 2005.

Xavier A.M.R.B., Tavares A.M.P., Ferreira R., Amado F.:Trametes versicolorgrowthand laccase induction with by-products of pulp and paper industry, *Electronic Journal of Biotechnology:* 10, 444 – 451, 2007.

Žeger Tomislav: Određivanje pentozana različitih vrsta drva UV-spektrofotometrijskom analizom. *Završni rad*. Šumarski fakultet, Zagreb, 2012.

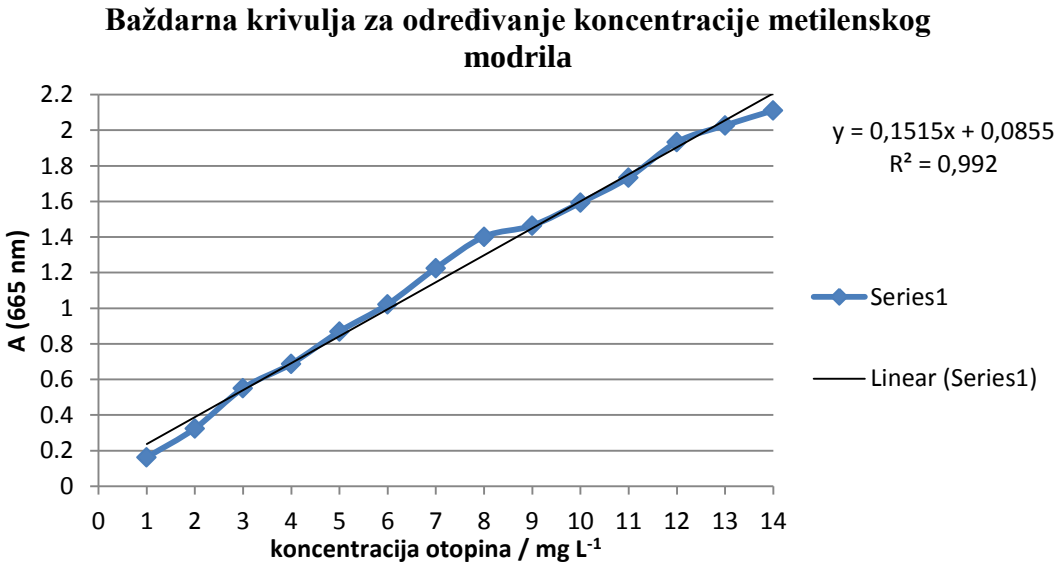
http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=40426 [25.11.2014]

http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_80_1681.html [29.11.2014.]

.

7. PRILOZI

Prilog 1 Baždarna krivulja za određivanje koncentracije metilenskog modrila



Prilog 2 Apsorpcijski spektri metilenskog modrila snimani pri različitim pH vrijednostima

