Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

i

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Zaštita prirode i okoliša

Antonija Kezerle

UKLANJANJE SINTETSKIH BOJILA METILENSKOG MODRILA I KONGO CRVENILA IZ VODENIH OTOPINA ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorska disertacija**
Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Zaštita prirode i okoliša

Znanstveno područje: Interdisciplinarno
Znanstveno polje: 4.05. prehrambena tehnologija i 1.04. kemija

UKLANJANJE SINTETSKIH BOJILA METILENSKOG MODRILA I KONGO CRVENILA IZ VODENIH OTOPINA ADSORPCIJOM NA PIVSKI TROP

Antonija Kezerle, dipl. ing. preh. tehn.

Doktorska disertacija je izrađena u: RJ Ekolaboratorij, PJ Odvodnja, Vodovod-Osijek d.o.o. i na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek

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

Sažetak doktorske disertacije:
U ovom radu istražena je mogućnost korištenja lignoceluloznog proizvodnog ostatka iz industrije piva, pivskog tropa (PT), kao adsorbensa za uklanjanje sintetskih bojila metilenskog modrila (MM) i kongo crvenila (KC) iz vodenih otopina šaržnim postupkom. Provedena je karakterizacija PT koja je uključivala fizikalno-kemijsku karakterizaciju, određivanje elementnog sastava (CHN-analiza), morfološku karakterizaciju primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) te analizu funkcijskih skupina infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR). Po završenoj karakterizaciji istražen je utjecaj različitih čimbenika koji utječu na proces adsorpcije: veličine čestica i koncentracije adsorbensa, vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila te pH, temperature i ionske jakosti. Eksperimentalni podatci dobiveni provođenjem šaržnih adsorpcijskih eksperimenata analizirani su primjenom ravnotežnih adsorpcijskih modela (Freundlich i Langmuir) te primjenom odgovarajućih kinetičkih modela (model pseudo-prvog reda i model pseudo-drugog reda) te modela unutarčestične difuzije. Rezultati su pokazali kako se PT može primijeniti kao jeftini adsorbens za uklanjanje MM i KC iz vodenih otopina, pri čemu su veći postotci uklanjanja i veći adsorpcijski kapacitet postignuti za uklanjanje MM. Nadalje, ispitana je mogućnost biološke obrade obojenog pivskog tropa, koji zaostaje nakon uklanjanja bojila, pomoću gljive *Trametes versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima, na osnovu praćenja gubitaka na masi supstrata i promjene boje uzoraka nakon 28 dana uzgoja. Provedeno je i određivanje akutne toksičnosti uzoraka biološki obrađenog obojenog PT, određivanjem imobilizacije slatkovodnog račića *D. magna*. Dobiveni rezultati upućuju na biotehnološki potencijal gljive *T. versicolor* za primjenu u procesima biološke obrade obojenih lignoceluloznih materijala, odnosno biorazgradnje sintetskih bojila u uvjetima uzgoja na čvrstim neinertnim nosačima.

Broj stranica: 138
Broj slika: 35
Broj tablica: 19
Broj priloga:0
Broj literaturnih navoda: 236
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: adsorpcija, biološka obrada gljivama, kongo crvenilo, lignocelulozni materijali, metilensko modrilo, pivski trop, *T. versicolor*

Datum obrane: 30. listopada 2020.

Povjerenstvo za obranu:
1. izv. prof. dr. sc. Maja Dutour Sikirić, viši znan. sur., Institut Ruđer Bošković, Zagreb
2. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
3. dr. sc. Tamara Jakovljević, znan. savjetnik, Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko
4. izv. prof. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3 ,Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strssmayer University of Osijek **PhD thesis**
Ruđer Bošković Institute, Zagreb
University PostGraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Enviromental Protection and Nature Conservation

Scientific Area: Interdisciplinary
Scientific Field: 4.05. Food Technology and 1.04. Chemistry

REMOVAL OF SYNTHETIC DYES METHYLENE BLUE AND CONGO RED FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY ADSORPTION ON BREWERS` SPENT GRAIN

Antonija Kezerle, MSc

Thesis performed at : RJ Ekolaboratorij, PJ Odvodnja, Vodovod-Osijek d.o.o. and Faculty of Food Technology Osijek

Supervisor: Natalija Velić, PhD, Associate Professor

Summary:
In this work, the possibility of using lignocellulosic residue from beer production, brewers` spent grain (BSG), as an adsorbent for the removal of synthetic dyes Methylene Blue (MB) and Congo Red (CR) from aqueous solutions in a batch process was investigated. BSG characterization included physico-chemical characterization, elemental composition determination (CHN analysis), morphological characterization using scanning electron microscopy (SEM), and functional groups analysis by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Upon characterization, the effect of various factors influencing the adsorption process was investigated, namely adsorbent particle size and concentration, adsorption time, initial dye concentration, pH, temperature and ionic strength. The experimental data obtained by batch adsorption experiments were analyzed by adsorption equilibrium models (Freundlich and Langmuir), kinetic models (pseudo-first-order model and pseudo-second-order model) and intraparticle diffusion model. The results showed that BSG could be used as a low-cost adsorbent for adsorptive removal of MB and CR from aqueous solutions, with higher removal percentages and higher adsorption capacity for MB removal. Furthermore, the possibility of biological treatment of dye-loaded BSG, that remains after adsorptive dye removal, was investigated using *Trametes versicolor* cultivated under solid-state conditions. The mass loss and colour change of the dye-loaded samples were determined after 28 days of cultivation. Acute toxicity of biologically treated dye-loaded BSG samples was evaluated by immobilisation of freshwater planktonic crustacean *Daphnia magna.* The obtained results indicate the biotechnological potential of the fungus *T. versicolor* for application in biological treatment of dyed lignocellulosic materials, i. e. biodegradation of synthetic dyes by fungi cultivated under solid-state conditions on non-inert carriers.

Number of pages: 138
Number of figures: 35
Number of tables: 19
Number of supplements:0
Number of references: 236
Original in: Croatian
Key words: adsorption, biological treatment using fungi, brewers` spent grain, Congo Red, Methylene Blue, lignocelullosic material, *T. versicolor*

Date of the thesis defense: 30 October 2020

Reviewers:
1. Maja Dutour Sikirić, PhD, Associate Professor, Ruđer Bošković Institute, Zagreb
2. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, Assistant Professor, Department of Chemistry, Josip Juraj Strssmayer University of Osijek
3. Tamara Jakovljević, PhD, scientific advisor, Croatian Forest Research Institute, Jastrebarsko
4. Mirna Habuda-Stanić, PhD, Assiociate Professor, Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strssmayer University of Osijek (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; JosipJuraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Tema rada naslova „Uklanjanje sintetskih bojila metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina adsorpcijom na pivski trop“ prihvaćena je na sjednici Sveučilišnog vijeća za poslijediplomske interdisciplinarne sveučilišne (doktorske) studije dana 6. rujna 2018. godine.

Disertacija je izrađena pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Natalije Velić kojoj se ovim putem zahvaljujem.

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi disertacije.

U Osijeku, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Cilj istraživanja i temeljne hipoteze 3
2. TEORIJSKI DIO 4
   2.1. Bojila 5
      2.1.1. Metilensko modrilo 7
      2.1.2. Kongo crvenilo 7
   2.2. Utjecaj bojila prisutnih u obojenim otpadni vodama na okoliš i ljudsko zdravlje 8
   2.3. Zakonska regulativa vezana za bojila 10
   2.4. Metode obrade otpadnih voda koje sadrže sintetska bojila 11
      2.4.1. Adsorpcija 14
         2.4.1.1. Čimbenici koji utječu na adsorpciju 16
         2.4.1.2. Adsorpcijska ravnoteža i kinetika adsorpcije 16
         2.4.1.3. Primjena lignoceluloznih materijala kao adsorbensa 20
   2.5. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom gljivama bijelog truljenja 27
3. MATERIJALI I METODE 30
   3.1.Materijali 31
      3.1.1. Kemikalije 31
      3.1.2. Instrumenti 33
      3.1.3. Lignocelulozni otpadni meterijal – adsorbens 34
      3.1.4. Mikroorganizmi korišteni u biološkoj obradi obojenog pivskog tropa 34
   3.2. Metode 34
      3.2.1. Priprema i karakterizacija adsorbensa 34
      3.2.2. Adsorpcijski eksperimenti 37
         3.2.2.1. Priprava modelnih otopina bojila te sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila 37
         3.2.2.2. Provedba šaržnih adsorpcijskih eksperimenata i određivanje koncentracije bojila 39
      3.2.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa gljivama bijelog truljenja 41
         3.2.3.1.Priprava hranjivih podloga za uzgoj odabranih vrsta gljiva na čvrstim hranjivim podlogama (agarnim pločama) 41
         3.2.3.2. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti odabranih vrsta gljiva 41
         3.2.3.3. Testovi obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama 43
         3.2.3.4. Biološka obrada obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima 43
         3.2.3.5. Određivanje promjene boje uzoraka 45
         3.2.3.6. Određivanje akutne toksičnosti uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa – određivanje inhibicije pokretljivosti vodene buhe *Daphnia magna* 45
      3.2.4. Obrada rezultata 46
4. REZULTATI 47
   4.1. Karakterizacija adsorbensa 48
   4.2. Adsorpcija metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina na pivski trop 56

4.2.1. Utjecaj veličine čestica adsorbensa na proces adsorpcije 56
4.2.2. Utjecaj koncentracije adsorbensa na proces adsorpcije 59
4.2.3. Utjecaj vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila na proces adsorpcije 61
4.2.4. Utjecaj pH na proces adsorpcije 65
4.2.5. Utjecaj temperature na proces adsorpcije 67
4.2.6. Utjecaj ionske jakosti otopine na proces adsorpcije 69
4.2.7. Adsorpcijske izoterme i kinetika adsorpcije 71
4.2.8. Uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila iz sintetskih i realnih otpadnih voda dodatkom pivskog tropa 80
4.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom 85
4.3.1. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke
4.3.2. aktivnosti odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja 85
4.3.3. Testovi obezbojenja metilenskog modrila i kongo crvenila na agarnim pločama pomoću odabranih vrsta gljiva 86
4.3.4. Biološka obrada obojenog pivskog tropa pomoću *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima 94
4.3.5. Određivanje akutne toksičnosti uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa – određivanje imobilizacije slatkovodnog račića *Daphnia magna* 99
5. RASPRAVA 101
5.1. Karakterizacija adsorbensa 102
5.2. Adsorpcija metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina na pivski trop 104
5.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom 110
6. ZAKLJUČCI 115
7. LITERATURA 118
8. ŽIVOTOPIS 135

1. UVOD

1. UVOD

Bojila se koriste u mnogim industrijama poput tekstilne, kožarske, papirne, prehrambene, farmaceutske, kozmetičke i druge. Smatra se kako je komercijalno dostupno preko 10 000 različitih vrsta sintetskih bojila (Gürses i sur., 2016). Ispuštanje neobrađenih ili nedovoljno obrađenih obojenih industrijskih efluenata u okoliš znatno utječe na kemijski sastav i svojstva vode prirodnog prijemnika, odnosno vodenog ekosustava u koji se efluent ispušta (Ejder-Korucu i sur., 2015). Kao rezultat njihove složene strukture i izražene otpornosti na djelovanje svjetlosti, mikroorganizma i temperature, bojila se dugo zadržavaju (nakupljaju) u okolišu te putem hranidbenog lanca mogu ugroziti i zdravlje čovjeka (Abdolali i sur., 2014).

Uklanjanje bojila je često teško uslijed njihove kompleksne kemijske strukture, pri čemu je učinkovitost uklanjanja bojila na konvencionalnim sustavima za biološku obradu otpadnih voda najčešće mala (Yesilada i sur., 2003). Za uklanjanje bojila iz otpadnih voda razvijene su i istražuju se brojne metode, ali se zbog visoke učinkovitosti, jednostavnosti provođenja i sposobnosti uklanjanja velikog broja strukturno različitih bojila, još uvijek najčešće koristi adsorpcija (Crini, 2006). Kako bi se skupi konvencionalni adsorbensi zamijenili jeftinijima te često i ekološki prihvatljivijima, u novije vrijeme se intenzivno istražuju različiti lignocelulozni proizvodni ostatci i otpadni materijali iz poljoprivredne, prehrambene i šumarske industrije, kao nekonvencionalni adsorbensi za uklanjanje bojila iz otpadnih voda. Funkcijske skupine prisutne u lignoceluloznim materijalima (adsorbensima) ostvaruju interakciju s različitim vrstama bojila, što je temelj za uklanjanje bojila iz vodenih otopina. Kako se radi o materijalima koji su često široko dostupni, neki i tijekom cijele godine, prednost njihove primjene kao adosorbensa za obradu otpadnih voda u odnosu na konvencionalne adsorbense ogleda se kako u niskoj cijeni, tako i u činjenici kako nema potrebe za regeneracijom adsorbensa.

Različiti otpadni lignocelulozni materijali korišteni su u istraživanjima kao adsorbensi za uklanjanje bojila iz vodenih otopina, sintetskih otpadnih voda i realnih industrijskih efluenata, pri čemu su bojila uklonjena u velikim postotcima. Većina istraživanja potvrđuje hipotezu kako bi jeftini, lokalno dostupni lignocelulozni materijali, mogli biti korišteni kao zamjena za komercijalne adsorbense. Neki od otpadnih lignoceluloznih materijala koji su do sada korišteni za uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina uključuju: pivski trop, jabučni trop, bagasu šećerne trske, izlužene repine rezance, piljevine različitih vrsta drveća, koru naranče, koru banane, ljusku bijelog luka, jabučni trop i mnoge druge (de Araújo i sur., 2020; Kezerle i sur., 2018; Velić i sur., 2015; Guimarães Gusmão i sur., 2012; Low i sur., 2011.; Hameed i Ahmad, 2009; Annadurai i sur., 2002.)

Pivski trop, proizvodni lignocelulozni ostatak pivarske industrije, čini 85 % ukupne količine proizvodnih ostataka i otpada koji nastaju u pivovarama te je dostupan u velikim količinama tijekom cijele godine. Do sada je pivski trop korišten većinom kao stočna hrana ili je zbrinjavan na odlagalištima otpada, pri čemu njegov potencijal kao vrijedne obnovljive sirovine ostaje nedovoljno iskorišten (Mussato i sur., 2006). Istraživanja koja su se bavila korištenjem pivskog tropa kao jeftinog adsorbensa za uklanjanje sintetskih bojila uključivala su uklanjanje metilenskog modrila, kongo crvenila, malahitnog zelenila, kiselih bojila – zelene, žute, plave i narančaste te nekih reaktivnih bojila (de Araújo i sur., 2020; Chanzu i sur., 2019; da Silva i sur., 2019; Juchen i sur., 2018; Velić i sur., 2015; Contreras i sur., 2012; Jaikumar i sur., 2009; Silva

i sur., 2004). Za razliku od navednih istraživanja, u sklopu ovog doktorskog rada osim adsorpcijskih karakteristika pivskog tropa razmatran je i problem izluživanja topljivih organskih spojeva prisutnih u pivskom tropu, koji mogu dovesti do sekundarnog onečišćenja otpadne vode. Nadalje, istražena je i mogućnost biološke obrade obojenog adsorbensa korištenjem gljiva

Nakon završenog procesa adsorpcije bojila korištenjem lignoceluloznih materijala zaostaje obojeni materijal, koji je potrebno zbrinuti. Mogućnost ekološki prihvatljivog zbrinjavanja koja se intenzivno istražuje je biološka obrada obojenog lignoceluloznog materijala pomoću gljiva, posebno gljiva bijelog truljenja (Li i sur., 2014; Carletto i sur., 2008; Boer i sur., 2004; Nigam i sur., 2000). Tijekom navedene obrade istovremeno dolazi do razgradnje osnovnih polimernih sastavnica materijala (lignin, celuloza i hemiceluloza) i razgradnje bojila, pri čemu nastali razgradni produkti najčešće nisu toksičniji od polaznog spoja, odnosno samog bojila. Gljiva bijelog truljenja šarena tvrdokoška (*Trametes versicolor*) se zbog sposobnosti sinteze lignolitičkih enzima primjenjuje u bioremedijaciji za uklanjanje sintetskih bojila, polikloriranih bifenila te policikličkih aromatskih ugljikovodika koji su među najčešćim onečišćujućim tvarima u okolišu (Novotný i sur., 2004). Najvažniji enzimi u procesu biorazgradnje bojila koje sintetiziraju gljive bijelog truljenja su enzimi uključeni u razgradnju lignina: lakaza, lignin peroksidaza i mangan peroksidaza (Santos i Corso, 2014).

1.1. Ciljevi rada i temeljne hipoteze

Ciljevi rada određeni su kako slijedi:

a) provesti fizikalno-kemijsku i morfološku karakterizaciju pivskog tropa te istražiti mogućnost njegova korištenja kao adsorbensa za uklanjanje dva strukturno različita sintetska bojila (metilensko modrilo i kongo crvenilo) iz vodenih otopina,

b) utvrditi utjecaj različitih uvjeta provođenja adsorpcije na učinkovitost uklanjanja bojila te analizirati dobivene podatke primjenom odgovarajućih ravnotežnih adsorpcijskih modela i kinetičkih modela,

c) provesti biološku obradu zaostalog obojenog materijala s ciljem njegove razgradnje te moguće razgradnje adsorbiranog bojila.

Nakon definiranja ciljeva rada, postavljene su sljedeće hipoteze:

a) pivski trop korišten kao adsorbens učinkovito uklanja metilensko modrilo i kongo crvenilo iz vodenih otopina, pri čemu se proces adsorpcije može opisati odgovarajućim ravnotežnim adsorpcijskim modelima i kinetičkim modelima,

b) biološka obrada zaostalog obojenog materijala rezultirat će razgradnjom materijala, odnosno gubitkom na masi materijala i razgradnjom bojila.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bojila

Fascinacija čovjeka bojom, kako iz estetskih tako i iz sociooloških razloga, prisutna je od davnina te su ljudi izolirali bojila koristeći razne biljne, životinjske i mineralne izvore. Kroz povijest ljudske civilizacije, bojila i pigmenti bili su važno sredstvo razmjene, ali i sredstvo za stjecanje zarade (Gürses i sur., 2016).

Bojila su tvari koje se koriste za bojenje različitih materijala, poput tekstila, kože, krzna, papira, polimernih materijala (plastike), živežnih namirnica, farmaceutskih preparata i sl. Danas gotovo ne postoje proizvodni procesi u kojima se u nekom trenutku ne koriste bojila. Za razliku od boja i lakova, koji se u tankom sloju nanose na površinu materijala, bojila ulaze u materijal, ostvarujući s njim kemijsku vezu, vežući se fizikalnim (privlačnim) silama ili unutar materijala tvore netopljive spojeve (Fahlman, 2011). Tvari pokazuju obojenost ukoliko apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra (od 380 nm do 760 nm), a propuštaju ili reflektiraju elektromagnetsko zračenje ostalih valnih duljina u tom dijelu spektra.

Vezu između kemijske strukture bojila i obojenosti iznio je 1876. godine O. Witt (Parac-Osterman i sur., 2013) koji je utvrdio kako je zajedničko svojstvo svih obojenih tvari prisutnost nezasićenih veza u strukturi bojila te postavio teoriju o kromofornim i auksokromnim skupinama u molekuli bojila. Kromoforne skupine su nezasićene atomske skupine koje uzrokuju obojenost organskih spojeva, a odgovorne su za selektivnu apsorpciju svjetlosti i nositelji su obojenosti. Najvažnije kromoforne skupine su karbonilna skupina (>C=O), nitrozo-skupina (–N=O), nitro-skupina ($–NO_2$), azo-skupina (–N=N–) i dr.. Spoj koji uvođenjem kromofora može postati obojen naziva se kromogen, a uporabna svojstva u smislu bojila dobiva tek uvođenjem auksokromne skupine, koja omogućuje vezanje kromogena za materijal (Aljamali, 2015). Neke od najvažnijih auksokromnih skupina su amino ($−NH_2$), hidroksilna (−OH), karboksilna (−COOH) i sulfonska ($−SO_3H$) skupina (Vujević, 2007).

Osnovna podjela bojila je prema podrijetlu te se bojila dijele na prirodna i sintetska. Prirodna bojila od davnina se koriste za bojanje tijela, hrane, zidova špilja, tekstila, kože i predmeta za svakodnevnu upotrebu. Najčešće se dobivaju izolacijom iz korijenja, kore, plodova ili lišća biljaka te iz različitih insekata. Prirodna bojila dijele se na bojila biljnog podrijetla poput indiga i alizarina, na bojila životinjskog podrijetla poput purpura, košenila i lac-bojila te na bojila mineralnog podrijetla. Prirodna bojila, iako dugo poznata, danas se rijetko koriste za bojenje tekstila, zbog visoke cijene i slabe učinkovitosti u odnosu na sintetska bojila. Još uvijek se primjenjuju (uz sintetska bojila) za bojenje živežnih namirnica, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda.

Prvo sintetsko bojilo, mauvein, sintetizirao je iz anilina 1856. godine britanski kemičar William H. Perkin tražeći lijek za malariju. Zbog jednostavne i jeftine sinteze, ali i zbog postojanosti, izrazite otpornosti na utjecaj svjetlosti, temperature i biološku razgradnju te zbog veće raznolikosti nijansi u odnosu na prirodna bojila, sintetska bojila su vrlo brzo zamijenila prirodna bojila (Couto, 2009). Procjenjuje se kako se više od 10 000 komercijalno dostupnih vrsta sintetskih bojila svakodnevno koristi u različitim industrijskim procesima, pri čemu se godišnje proizvede više od 700 000 tona sintetskih bojila (Gürses i sur., 2016).

Sintetska bojila mogu se podijeliti prema materijalu koji se boja, prema primjenskim svojstvima i kemijskim svojstvima (strukturi). Prema materijalu koji se boja razlikujemo bojila

za tekstil, kožu, papir, plastične mase, živežne namirnice, premazna sredstva i druge specijalne svrhe. Prema primjenskim svojstvima razlikujemo bojila topljiva u vodi (bazna, kisela i kiselo-močilska, direktna, reaktivna), bojila topljiva u alkoholu, bojila netopljiva u vodi (npr. disperzijska, pigmentna, topljiva u mastima i uljima) te bojila koja se grade na vlaknu (oksidacijska bojila, naftol-AS-bojila, acetatna bojila za razvijanje i bojila za fotografije u boji) (Venkataraman, 1970). Podjela prema kemijskim svojstvima temelji se na strukturi, kromofornim grupama, kemijskom karakteru bojila te na svojstvima vezanim uz sam način bojenja. Ova klasifikacija uzima u obzir i postupak dobivanja bojila te dijeli bojila u sljedeće skupine:

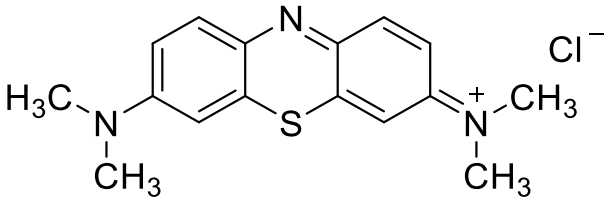
nitrozo bojila
nitro bojila
azo-bojila
stilbenska bojila
difenil-metanska bojila
pirazolonska bojila
tiazolna bojila
tiazinska bojila
oksazinska i azinska bojila
trifenilmetanska bojila
ketonimidna bojila
ksantenska bojila
antrakinonska bojila
kinoniminska bojila
akridinska bojila
kinolinska bojila
sumporna bojila
oksidacijska bojila
reaktivna bojila
indigoidna bojila
(Gürses i sur., 2016)

Sintetska bojila većinom su organske prirode i aromatske strukture (benzenski i/ili naftalenski tip) (Gudelj i sur., 2011) te se ubrajaju u skupinu teško biorazgradljivih spojeva – ksenobiotika (Yu i Wen, 2005). Najvažniju skupinu sintetskih bojila čine azo bojila, zbog relativno jednostavne sinteze i gotovo neograničenog broja supstituenata. Ova bojila sadrže najmanje jednu azo-skupinu, –N=N–, vezanu na aromatsku jezgru te jednu auksokromnu skupinu. Uobičajeno se dijele prema broju azo-skupina u molekuli, o čemu ovisi i njihova boja. Azo-bojila su najbrojnija skupina sintetskih organskih bojila te čine 70 % svih bojila koja se koriste u različitim industrijama (Adedayo i sur, 2004). Najviše se koriste za bojenje vune i pamuka, ali i svile, kemijskih vlakana i živežnih namirnica. Kongo crvenilo primjer je diazo bojila.

Jedinstven sustav klasifikacije bojila i pigmenta koji se koristi na globalnoj razini od strane proizvođača bojila, znanstvenika i krajnjih korisnika bojila i pigmenata naziva se *Colour Index*^{TM}. Prvi put je objavljen 1924. godine, a publiciraju ga asocijacije *Society of Dyers and Colourists* (SDC) i *American Association of Textile Chemists and Colourists*. *Colour Index*^{TM} opisuje bojilo ili pigment na osnovu primjene i kemijske strukture, dodjeljujući im odgovarajuće CIGN i CICN oznake. C.I. generičko ime (CIGN) odnosi se na područje primjene i način bojenja, dok se C.I. konstitucijski broj (CICN) odnosi na strukturu bojila, topljivost i podatke o sintezi (https://colour-index.com/)

2.1.1. Metilensko modrilo

Metilensko modrilo ili metiltioninijev klorid naziv je za 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazin-5-ijev klorid, spoj formule $C_{18}H_{18}N_3SCl$ i molarne mase 319,85 g mol^{-1} (**slika 2.1.1.1.**). Maksimalna apsorbancija metilenskog modrila u vodenim otopinama je između 663 nm i 668 nm. Prvi ga je sintetizirao Heinrich Caro, 1876. i od tada se koristi kao lijek, bojilo i indikator. Metilensko modrilo je fenotiazinski spoj, najvažniji predstavnik (baznih) tijazinskih bojila, koji je na sobnoj temperaturi u obliku zelenomodre kristalne tvari metalna sjaja. Otopljen u vodi daje tamno plavo obojenje.

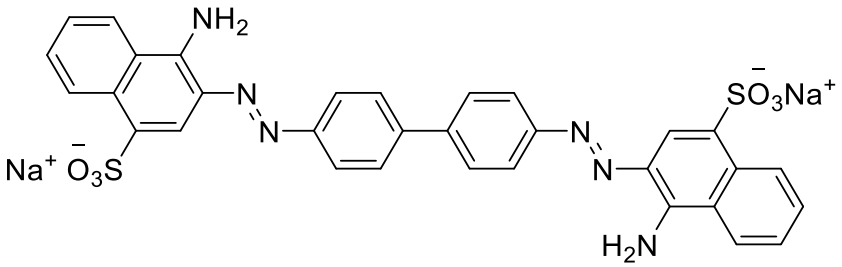


Slika 2.1.1.1. Strukturna formula metilenskog modrila.

Metilensko modrilo ima široku primjenu u medicini i farmaciji, primjerice kao terapija u liječenju methemoglobinemije, u liječenju urogenitalnih infekcija te u liječenju kronične urolitijaze (Clifton i Leikin, 2003). Ono je i prvi u potpunosti sintetski spoj koji se koristio kao lijek. Guttmann i Erlich uveli su ga u terapiju malarije još 1891. godine (Zorc i Pavić, 2016). Široko je zastupljeno u raznim granama industrije, kao bojilo za papir, tekstil (pamuk, lan, konoplju), kožu, plastiku, kozmetiku i sl. Osim toga, ima primjenu i u mikroskopskim istraživanjima, primjerice kao reagens za bojenje bakterija, dok se kao indikator koristi u istraživanjima bioloških redoks-reakcija budući da se lako reducira u bezbojan oblik (Kiernan, 2006). Metilensko modrilo može biti štetno po zdravlje ljudi. U dodiru s očima izaziva opekline, a gutanje može izazvati iritaciju gastrointestinalnog trakta te može prouzročiti cijanozu, grčenje, tahikardiju i dr. (Hamdaoui i Chiha, 2007).

2.1.2. Kongo crvenilo

Kongo crvenilo pripada skupini anionskih diazo direktnih bojila koje sadrži $–NH_2$ i $–SO_3$ skupine. To bojilo otkrio je 1883. njemački kemičar Paul Bottinger (Linke, 2006). To je. smeđe-crveni prah bez mirisa, kemijske formule $C_{32}H_{22}O_6N_6S_2Na_2$, molarne mase 696,665 g mol^{-1} (**slika 2.1.2.1.**). Maksimalna apsorbancija kongo crvenila u vodenim otopinama je između 497 nm i 500 nm. Kongo crvenilo se sintetizira iz naftionske kiseline i benzidina, a smatra se prvim bojilom direktnog tipa što znači da se samostalno (bez ikakvih dodatnih sredstava) učinkovito fiksira na vlakna.



Slika 2.1.2.1. Strukturna formula kongo crvenila

Kongo crvenilo se često koristilo za bojanje pamuka, ali zbog slabije otpornosti na ispiranje i svjetlost u novije vrijeme zamijenjeno je otpornijim bojilima. Primjenjuje se u izradi histoloških preparata i u mikrobiološkim istraživanjima kao pH indikator (pri nižem pH daje plavo obojenje, dok pri višim pH vrijednostima daje crveno obojenje). Kongo crvenilo i dalje ima veliku primjenu u industriji papira i papirnih boja te za bojenje tekstila i kože (Chatterjee, 2009; Han i sur., 2008). Iako se kongo crvenilo pokazalo dobrim bojilom sa širokim spektrom primjene, ono ima štetan učinak na zdravlje ljudi. Naime, izravno izlaganje tom bojilu u nekih ljudi može izazvati alergijske reakcije, a benzidin, konačni proizvod razgradnje kongo crvenila u prirodi, klasificiran je kao karcinogen (Chatterjee, 2009). Uzrokuje iritacije kože, očiju i gastrointestalnog sustava te probleme sa zgrušavanjem krvi, spavanjem i disanjem (Khaniabadi i sur., 2017; Alam i sur., 2015). Toksično je za mnoge organizme, a neka istraživanja navode i da je kancerogen i mutagen (Khaniabadi i sur., 2017)

2.2. Utjecaj bojila prisutnih u obojenim otpadnim vodama na okoliš i ljudsko zdravlje

Ispuštanje neobrađenih obojenih industrijskih otpadnih voda u okoliš negativno utječe na kemijski sastav i svojstva prirodnog prijemnika (Ejder-Korucu i sur., 2015). Prisutnost bojila već u vrlo maloj koncentraciji od 1 mg dm^{-3} izaziva vidljivu obojenost vode prijemnika (Singh, 2006; Couto, 2009). Kako je već navedeno, sintetska bojila ubrajaju se u skupinu ksenobiotika, koji se zbog velike kemijske stabilnosti i otpornosti na mikrobiološku razgradnju zadržavaju i nakupljaju u okolišu (Yu i Wen, 2005). Obojene industrijske otpadne vode najčešće su višekomponentna smjesa bojila koja se gube tijekom proizvodnog procesa bojenja i niza drugih onečišćujućih tvari, što za posljedicu ima veliko organsko opterećenje obojene otpadne vode (velike vrijednosti pokazatelja kakvoće otpadne vode – biokemijske i kemijske potrošnje kisika, BPK_5 i KPK). Najznačajniji onečišćivač je tekstilna industrija, jer se tijekom procesa bojenja tekstila koriste velike količine bojila, ali i vode. Yesilada i suradnici (2003) navode kako se tijekom tog procesa izgubi oko 10 – 15 % od ukupne količine bojila upotrijebljenog u procesu bojenja.

Prisutnost bojila u vodenim tijelima dovodi do povećanja njihove BPK_5 vrijednosti te se smanjuje koncentracija kisika, što negativno utječe na razvoj fotoautotrofnih organizama. Nadalje, obojene otpadne vode toksične su za vodene organizme i ometaju prirodnu ravnotežu

inhibirajući proces fotosinteze (Venkatamohan i sur., 2002). Zbog vidljive obojenosti vode dolazi do smanjenog prodora svjetlosti kroz vodu, čime se ograničava proces fotosinteze, smanjuje koncentracija kisika u vodi i negativno utječe na biološke cikluse u vodenim tijelima (Bharathi i sur., 2013) te time izazivaju negativne promjene na samom početku hranidbenog lanca (Slokar i Le Marechal, 1998). Tijekom anaerobne razgradnje bojila, koju provode određene bakterijske vrste, uobičajeno prisutne u vodenim ekosustavima, dolazi do obezbojenja bojila, ali može doći i do nastajanja aromatskih amina koji mogu biti toksičniji od polaznog spoja, odnosno samog bojila (Eichlerová i sur., 2006). U svojoj strukturi mnoga bojila imaju teške metale, što može dovesti do njihova nakupljanja u vodenim organizmima (npr. algama, vodenim biljkama, ribama). Bojila prisutna u vodenim tijelima mogu imati teratogeni, mutageni i karcinogeni učinak na organizme u vodenom okolišu (Mathur i Bhatnagar, 2007; Novotny i sur., 2006). Sve navedeno problem prisutnosti bojila u okolišu čini još težim, jer se negativan učinak ne izražava odmah, već dolazi do postupne promjene genetičkog materijala vodenih organizama.

Mnoga sintetska bojila mogu izazvati akutnu toksičnost (toksičnost koja se razvija odmah ili vrlo brzo nakon izloženosti bojilu) i kroničnu toksičnost (neželjeni učinak koji se razvija tjednima, mjesecima ili godinama nakon izlaganja) za ljude, pri čemu toksičnost bojila uglavnom raste s porastom broja aromatskih prstenova u njihovoj strukturi (Bamforth i Singleton, 2005). Akutna toksičnost bojila očituje se kao iritacija kože i očiju te različite promjene na koži, ali i kao glavobolja, povraćanje i akutna dijareja (Roy i sur., 2018; Gupta i sur., 2000). Mnoga reaktivna bojila uzrokuju pojavu dermatitisa, alergijskog konjuktivitisa, rinitisa, astme i drugih alergijskih reakcija (Roy i sur., 2018). Simptomi akutne toksičnosti koji se mogu javiti nakon izloženosti nekim kationskim bojilima uključuju ubrzani puls, povraćanje, cijanoze, žuticu i nekrozu tkiva kod ljudi (Nohyneka i sur., 2004). Kroničnu toksičnost uzrokuju bojila s azo, tri-fenilmetanskim, tri-fenilaminskim, ketoniminskim, difenil metanskim, nitrosaminskim i nitro skupinama. Ta bojila pokazuju genotoksičnost, karcinogenost i mutagenost za ljude (Roy i sur., 2018). Bojila koja sadrže azo, amino, nitrozaminske, aminske i hidroksilaminske prekursore kemijski reagiraju s nukleofilnom DNA, pri čemu dolazi do nastajanja nitrenij iona koji je poznati karcinogen i koji uzrokuje mutacije te stoga i negativan utjecaj na stanice (Roy i sur., 2018). Od svih bojila, najopasnija su azo bojila, budući da uzrokuju mutagenost i karcinogenost u ljudi i životinja. Vodotopljiva azo bojila, poput kongo crvenila, predstavljaju posebnu opasnost, jer njihova dugotrajna prisutnost u vodenim ekosustavima dovodi do akumulacije u prehrambenom lancu te na taj način dospijeva i u ljudski organizam (Roy i sur., 2018). Dugotrajna izloženost nekim vrstama azo bojila povezana je s nastajanjem sarkoma, tumorima mokraćnog mjehura i oštećenjima kromosoma u stanicama sisavaca (Percy i sur., 1989; Medvedev i sur., 1988).

Hassaan i Nemr (2017) navode kako nije potvrđen negativan utjecaj sintetskih bojila na zdravlje radnika koji su im izloženi u industrijskom okruženju i u količinama koje se koriste u različitim proizvodnim procesima, kada se s njima rukuje na pravilan način i kada se poduzimaju sve potrebne zaštitne mjere. Ipak, dugotrajna izloženost ili kratkotrajna izloženost velikim koncentracijama bojila, bez odgovarajuće zaštite opasna je po zdravlje.

2.3. Zakonska regulativa vezana za bojila

Danas je aktualan cijeli niz zakonskih propisa kojima se od proizvođača zahtijeva definiranje štetnosti i/ili toksičnosti proizvoda te utjecaj na zdravlje (Gudelj i sur., 2011). Na taj su način proizvođači koji svoje proizvode plasiraju na tržište Europske unije (EU) suočeni sa zahtjevima jamstva ekološke prihvatljivosti proizvoda, a temeljem ispunjenosti tih zahtjeva stječe se pravo uporabe EZ-oznake ekološke prihvatljivosti.

Većina europskih zemalja uskladila je svoju zakonsku regulativu s odgovarajućim direktivama Europske unije koje navode liste bojila s njihovim specifičnim primjenama u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i drugim industrijama. Primjerice, Europska direktiva 94/36/EC koja je na snazi od 1994. godine i koja propisuje korištenje bojila u prehrambenoj industriji trenutno se primjenjuje na području cijele EU. Ova je direktiva modificirana 2007. godine te je Europska komisija (EC) dodijelila „E“ brojeve svim bojilima koja su odobrena za korištenje kao prehrambeni aditivi. Nadalje, EC je odobrila i uobičajenu autorizacijsku proceduru povezanu s aditivima, enzimima i aromama koje se koriste u prehrambenoj industriji koja je opisana u regulativi europskog parlamenta broj 1331/2008.

Kako bi omogućili bolje razumijevanje problematike zaštite voda, Europski Parlament i Vijeće donijeli su 2000. godine Direktivu 2000/60/EC (Okvirna Direktiva o vodama, ODV), kojom se uspostavlja okvir za djelovanje EU na području politike voda. Ta direktiva je najznačajniji dio europske legislative o vodi do današnjeg dana, a njezin cilj je poboljšanje i integracija načina upravljanja vodnim tijelima diljem Europe (Šikić, 2016) te uspostavljanje pravih uvjeta za poticanje uspješne i učinkovite zaštite vode na lokalnoj razini (kroz zajednički pristup i zajedničke ciljeve). Termin „dobro stanje“ voda uključuje stanje neke cjeline površinske vode kada se njeno ekološko i kemijsko stanje ocjenjuje barem kao "dobro", što se osigurava kroz opsežan biološki monitoring (praćenje). Mehanizmi i specifične mjere potrebne za postizanje ‘’dobrog stanja’’ ostavljeni su na odluku svakoj državi članici EU-e i u odgovornost su nadležnih vlasti imenovanih na državnoj razini (http://www.wfd-croatia.eu). Osim te direktive na snazi su i drugi propisi, koji osiguravaju odgovarajuću zaštitu vodenih tijela, poput Direktive o pročišćavanje otpadnih voda.

U Republici Hrvatskoj na snazi je Zakon o vodama (NN 66/19) te Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/20). I zakon i pravilnik usklađeni su s direktivama EU (posebno s ODV i Direktivom o pročišćavanju otpadnih voda). Pravilnik definira granične vrijednosti emisija otpadnih voda iz objekata i postrojenja za proizvodnju i preradu tekstila te za bojila navodi da se u površinske vode kao i u sustav javne odvodnje smiju ispuštati samo otpadne vode bez prisutnosti bojila. Pravilnikom nisu posebno definirani zahtjevi za uklanjanje bojila iz obojenih otpadnih voda drugih industrija.

2.4. Metode obrade otpadnih voda koje sadrže sintetska bojila

Otpadne vode su vode kojima je ljudskim djelovanjem (ispuštanjem ili odlaganjem hranjivih i drugih tvari, toplinske energije te drugih onečišćenja) promijenjena kakvoća, odnosno kojima su promijenjene prvobitne fizikalne, kemijske i mikrobiološke karakteristike. Ispuštanje neobrađenih obojenih industrijskih otpadnih voda utječe na kemijski sastav i svojstva vode prirodnog prijemnika, odnosno vodenog ekosustava u koji se otpadna voda ispušta (Ejder-Korucu i sur., 2015). Uklanjanje bojila iz otpadnih voda je teško zbog njihove složene kemijske strukture, ali i zbog činjenice kako osim smjese različitih bojila, obojene otpadne vode mogu sadržavati i druge onečišćujuće tvari iz procesa bojenja, poput različitih soli i metala. Većina konvencionalnih sustava za biološku obradu otpadnih voda temelji se na sposobnosti mikroorganizama da koriste otopljene organske tvari iz otpadne vode kao izvore ugljika i energije. Ipak, učinkovitost navedenih sustava za uklanjanje bojila (posebno u vodi topljivih reaktivnih bojila) je najčešće mala i zahtijeva dodatnu obradu vode po završenom procesu pročišćavanja (Mondal i sur., 2018; Yesilada, 2003.). Uklanjanje obojenja vode, pri tome, ne podrazumijeva uvijek i smanjenje toksičnosti otpadne vode, odnosno bojila kao polaznog spoja. Nepotpuna razgradnja i nastanak još toksičnijih razgradnih spojeva predstavljaju dodatan problem u obradi otpadnih voda koje sadrže sintetska bojila (Eichlerova i sur., 2007). Zakonska regulativa vezana za otpadne vode, pa tako i za bojila stalno se pooštrava, kako bi se na taj način potaklo proizvođače da odgovornije i učinkovitije upravljaju svojim otpadnim vodama. Nadalje, na taj se način potiče i provođenje znanstvenih istraživanja koja će dovesti do razvoja novih, jeftinijih, visoko učinkovitih i prije svega ekološki prihvatljivih metoda za obradu obojenih otpadnih voda.

Postupci obrade obojenih otpadnih voda mogu se grubo podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke, pri čemu svaki postupak ima svoje prednosti i nedostatke, koji se ponekad mogu nadići kombinacijom više postupaka (Kyzas i sur., 2013). Pregled metoda obrade obojenih otpadnih voda te njihovih prednosti i nedostataka dan je u **tablici 2.4.1.**

Tablica 2.4.1. Prednosti i nedostatci metoda za obradu obojenih otpadnih voda (prema Adegoke i Bello, 2015 i Crini, 2006).

Metoda	Prednosti	Nedostatci
Fizikalne metode		
adsorpcija na aktivni ugljen	visoka učinkovitost, jednostavna provedba, mogućnost uklanjanja različitih vrsta bojila, kakvoća obrađene vode velika	visoka cijena, neučinkovita za uklanjanje dispergiranih i netopljivih bojila
membranska filtracija	mogućnost uklanjanja svih vrsta bojila, kakvoća obrađene vode velika	rad pri visokim tlakovima, visoka cijena, nepogodna za velike količine vode, nastajanje koncentriranog mulja
ionska izmjena	visoka učinkovitost, mogućnost regeneracije adsorbensa	nije učinkovita za sva bojila, cijena
zračenje	učinkovita oksidacija u laboratorijskom mjerilu	zahtijeva velike količine otopljnog kisika
koagulacija / flokulacija	jednostavnost, ekonomska isplativost	nastajanje velike količine mulja, zbrinjavanje mulja
Kemijske metode		
oksidacija	jednostavnost provedbe, visoka učinkovitost, velika brzina procesa	visoki energetski troškovi, velik utrošsak kemikalija
oksidacija Fentonovim reagensom	visoka učinkovitost	nastajanje mulja
napredni oksidacijski procesi	nema nastajanja mulja, mali ili nikakav utrošak kemikalija, mogućnost uklanjanja različitih vrsta bojila	neekonomično, nastajanje nusprodukata, tehnička ograničenja
ozonizacija	ozon se može primijeniti u plinovitom stanju te ne dolazi do povećanja volumena otpadne vode i mulja	kratko poluvrijeme raspada (20 min)
fotokemijska razgradnja	nema nastajanja mulja	nastajanje sporednih produkata
obrada natrijevim hipokloritom	inicira i ubrzava razgradnju azo-veze	nastajanje aromatskih amina
elektrokemijska razgradnja	nema nastajanja mulja, nema utroška kemikalija	povećanje protoka dovodi do smanjenja učinkovitosti uklanjanja bojila
Biološke metode		
biosorpcija na živu ili inaktivnu mikrobnu biomasu	niski troškovi, visoka učinkovitost, određena bojila imaju poseban afinitet za vezanje na mikrobnu biomasu	nije učinkovita za sva bojila
biorazgradnja gljivama	enzimska razgradnja bojila, mineralizacija nekih bojila, visoka učinkovitost i selektivnost, niski troškovi	sinteza fungalnih enzima može biti nepouzdan proces
biorazgradnja bakterijama	brzo obezbojenje bojila (24-30 h)	teška razgradnja azo-bojila pri anaerobnim uvjetima

Fizikalne metode obrade obojenih otpadnih voda su se pokazale visoko učinkovitima, uz istovremene niske operativne troškove. Te metode uključuju adsorpciju, membransku filtraciju, ionsku izmjenu, koagulaciju/flokulaciju (Ejder-Korucu i sur., 2015). *Adsorpcija* je pojava nakupljanja neke tvari (adsorbata), na površini krute tvari (adsorbensa). Adsorpcija je često prva metoda odabira u realnim sustavima za obradu otpadnih voda, jer je odlikuju visoka učinkovitosti, jednostavnost provođenja i mogućnost uklanjanja velikog broja strukturno različitih onečišćujućih tvari (Gupta i sur., 2009). Ta metoda bit će detaljnije opisana u nastavku rada. *Membranska filtracija* podrazumijeva procese tlačnog filtriranja u kojemu je filtarski medij membrana. Koristi se kao tehnika razdvajanja kapljevitih smjesa, većinom koloidnih sustava pomoću membrana. Membrane su otporne na utjecaj temperature, nepovoljno kemijsko okruženje i mikrobiološki utjecaj, ali im je primjena često ograničena zbog visoke cijene opreme te začepljenja pora membrana (Robinson i sur., 2001).
Ionska izmjena je reverzibilni proces, pri kojemu se ioni izmjenjuju između čvrste i tekuće faze bez bitnih strukturnih promjena u čvrstoj fazi. Čvrsta faza je ionski izmjenjivač, koji može biti kationski ili anionski i prilikom njegove primjene dolazi do izmjena iona analita s ionima ionskoga izmjenjivača. U obradi otpadnih voda važno mjesto zauzimaju koagulacija i flokulacija. *Koagulacija* je sjedinjavanje ili združivanje čestica tvari, fino raspršenih u tekućini, radi taloženja ili uklanjanja filtracijom; dok je *flokulacija*, stvaranje nakupina čvrstih koloidnih čestica iz koloidnih disperzija uz dodatak sredstava za flokulaciju (Habuda-Stanić i sur., 2013).

Kemijske metode koje se najčešće koriste su oksidacija, primjena naprednih oksidacijskih procesa (*Advanced Oxidation Processes*, AOP), fotokemijska razgradnja, obrada natrijevim hipokloritom te elektrokemijska razgradnja (Ejder-Korucu i sur., 2015). *Oksidacijski procesi* se najčešće koriste zbog jednostavne provedbe. Oksidacija bojila dovodi do kidanja strukture aromatskog prstena. Zbog već spomenute velike kemijske stabilnosti sintetskih bojila, potrebno je upotrijebiti jaka okidacijska sredstva poput klora, ozona, Fentonovog reagensa te vodikovog peroksida. Vodikov peroksid se često koristi, ali ga je prije upotrebe potrebno aktivirati što se najčešće provodi UV zračenjem. *Napredni oksidacijski procesi* uključuju dovođenje kemijske, električne ili radioaktivne energije, pri čemu nastaju vrlo reaktivni radikali, tj. čestice s visokim oksidacijskim potencijalom, koje brzo i neselektivno reagiraju s većinom organskih tvari (Vujević, 2007). Najčešće korišteni napredni oksidacijski procesi su proces ozonizacije, Fentonov proces i proces fotokatalize, koji se ujedno smatraju i najučinkovitijim procesima za obradu otpadnih voda. Fentonov reagens, kao i ozonizacija se koriste za oksidaciju spojeva (npr. ksenobiotika) koji su otporni na mikrobiološku razgradnju ili djeluju toksično na mikroorganizame (Anjaneyulu i sur., 2005). Iako se radi o metodama koje su visoko učinkovite, visoka cijena i velika potrošnja električne energije i kemikalija čine ih komercijalno neprivlačnima (Kyzas i sur., 2013).

Biološke metode uključuju procese biosorpcije (adsorpcija bojila na živu ili inaktivnu biomasu mikroorganizama), biorazgradnje i/ili biotransformacije te bioakumulacije. Biosorpcija i bioakumulacija pokazale su se kao metode s najviše potencijala za primjenu u obradi obojenih otpadnih voda (Vijayaraghavan i Yun, 2008). Mikroorganizmi koji se koriste

za bioremedijaciju obojenih otpadnih voda uključuju aerobne i anaerobne vrste bakterija, neke alge i velik broj različitih vrsta gljiva (Gupta i sur., 2009). Upravo su se gljive pokazale najučinkovitijima, posebno gljive truležnice koje rastu na drvnoj biomasi te imaju sposobnost razgradnje polimernih sastavnica drveta. Gljive bijelog truljenja, manja podskupina unutar gljiva truležnica, pokazuju najveći potencijal za razgradnju sintetskih bojila (Vasdev, 2011). Biološka obrada otpadnih voda na konvencionalnim sustavima za biološku obradu (uklanjanje C, N i P) uobičajeno se provodi mješovitim mikrobnim kulturama, odnosno aktivnim muljem, stoga ne čudi da su se mješovite mikrobne kulture pokazale učinkovitijima i za uklanjanje bojila od čistih mikrobnih kultura (Asgher i Bhatti, 2007). Kao osnovne prednosti primjene bioloških metoda Gupta i sur. (2009) navode visoku učinkovitost, nisku cijenu, uglavnom nastajanje produkata manje toksičnosti od polaznog spoja (posebno u slučaju aerobnih procesa obrade) te mogućnost potpune biorazgradnje (mineralizacije) bojila. Osnovni nedostaci, u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama, su osjetljivost mikroorganizama na uvjete okoline (druge onečišćujuće tvari prisutne u otpadnoj vodi koje mogu biti toksične), manja mogućnost kontrole procesa i vrijeme trajanja bioprocesa, koje je puno duže od većine fizikalno-kemijskih procesa. Navedeni nedostatci ujedno su i najveća prepreka široj primjeni tih metoda na realnim sustavima (Kyzas i sur., 2013).

2.4.1. Adsorpcija

Između različitih dostupnih metodologija za uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda, adsorpcija se smatra boljom od ostalih konvencionalnih metoda zbog visoke učinkovitosti, ekonomičnosti i ekološke prihvatljivosti (Varghese i sur., 2018). Adsorpcija je fizikalno – kemijski proces u kojem čestice plina ili kapljevine (atomi, molekule i ioni) bivaju privučene na površinu krutog tijela. Odvija se u graničnom području faza, odnosno na granici faza krutina/plin ili krutina/tekućina. Kruta tvar na čijoj se površini odvija adsorpcija naziva se adsorbens, a tvar koja se adsorbira adsorbat. Prilikom adsorpcije dolazi do povećanja koncentracije adsorbata na površini adsorbensa. Pri tome se govoreći o površini ne misli na geometrijsku površinu, nego na površinu u unutrašnjosti pora, sitnih pukotina itd. više ili manje poroznog adsorbensa (Dabrowski, 2001).

Primjena adsorpcije spominje se još 450 godina pr. Kr., kada su se prema hinduskim zapisima za pročišćavanje vode koristili filtri ispunjeni ugljenom i pijeskom. Adsorpciju je prvi istraživao 1773. Scheele (Masschelein, 1992), dok je Kayser 1881. godine po prvi puta uveo pojam *adsorpcija*, kako bi se razlikovalo površinsko nakupljanje neke tvari od intermolekularnog sažimanja (Gupta i sur., 2009). U drugom svjetskom ratu aktivni ugljen se koristio u plinskim maskama za zaštitu vojnika od otrovnih plinova te je time primjena adsorbensa u industriji postala uobičajena.

Kao proces, adsorpcija je nespecifična i može se koristiti za uklanjanje velikog broja strukturno različitih onečišćujućih tvari. Prijelaz molekula adsorbata iz tekućine na površinu adsorbensa pri kontaktu otopine adsorbata s adsorbensom događa se sve dok se u sustavu ne uspostavi ravnotežno stanje. Sile koje adsorbat vežu na površinu adsorbensa mogu biti fizikalne i kemijske, pa razlikujemo *fizikalnu adsorpciju* kod koje se molekule adsorbata vežu za

površinu adsorbensa silama sličnim van der Waalsovim silama i *kemijsku adsorpciju* (*kemisorpciju*), pri kojoj molekule adsorbata reagiraju s molekulama adsorbensa dajući kemijski spoj. Iako ta podjela nije striktna, ipak je teorijski i praktično korisna zbog različitih ponašanja sustava u tipičnim slučajevima. Fizikalna adsorpcija je reverzibilna, a proces se odvija na čitavoj površini adsorbensa. Pri fizikalnoj adsorpciji razvija se toplina koja je mala (20 kJ mol^{-1} do 40 kJ mol^{-1}) u usporedbi s toplinom koja se razvija prilikom kemisorpcije (200 kJ mol^{-1} do 400 kJ mol^{-1}) i koja je približna onoj pri nastanku kemijske veze. Kao što je već rečeno, kemisorpcija podrazumijeva nastajanje kemijske veze, odnosno kemijsku reakciju adsorbensa i adsorbata, što uključuje svladavanje energije aktivacije, pa do kemisorpcije obično dolazi tek pri povišenim temperaturama. Kemisorpcija je ireverzibilan proces, a kemisorbirane molekule su vezane na točno određenim mjestima na adsorbensu. Zbog jakih veza nastalih u kemisorpciji, teško je ukloniti kemisorbirane tvari s površine adsorbensa (Gupta i sur., 2009). Fizikalna adsorpcija je obično vrlo brza (osim u slučajevima kad je površina adsorbensa uglavnom u vrlo uskim kapilarama), dok je kemisorpcija u pravilu sporija, zbog već spomenute energije aktivacije koju je potrebno svladati. Fizikalna adsorpcija je vrlo česta i općenita pojava, jer se gotovo svaki plin ili tekućina može pri povoljnim uvjetima adsorbirati na čvrstim površinama. Kemisorpcija je, naprotiv, vrlo specifična i događa se samo u slučajevima kada adsorbat i adsorbens mogu stvarati površinski kompleks ili spoj (Adamović i sur., 2017).

Adsorbensi su materijali koje odlikuje velika specifična površina (površina po jedinici mase) (Masschelein, 1992; Linsen, 1970), kao posljedica poroznosti ili usitnjavanja. Brzo postizanje adsorpcijske ravnoteže jedna je od odlika dobrog adsorbensa, jer to pretpostavlja i brzo uklanjanje onečišćujućih tvari adsorpcijom. Najčešće korišteni adsorbensi u obradi otpadnih voda su učinkoviti i dobro karakterizirani konvencionalni adsorbensi, poput aktivnog ugljena, aktivne gline, silikagela, raznih oksida, alumosilikata, zeolita i dr.

Aktivni ugljen uspješno je primijenjen za uklanjanje različitih onečišćujućih tvari poput metalnih iona (Deliyanni i sur., 2015; Gabaldón i sur., 2000; Carrott i sur., 1998), fenola (Xie i sur., 2020; Mourao i sur., 2006; Carrott i sur., 2005; Paprowicz, 1990), bojila (Herrera-González i sur., 2019; Al-Degs i sur., 2001; Pelekani i Snoeyink, 2000; Walker i Weatherley, 1999), pesticida (Derylo-Marczewska i sur., 2019; Humbert i sur., 2008; Hu i sur., 1998; Pirbazari i Weber, 1984), detergenata (Malhas i sur., 2002) i mnogih drugih tvari. Veliku primjenu aktivni ugljen ima u pripremi vode za ljudsku potrošnju, odnosno vode za piće (Marsh i Rodrigez – Reinoso, 2006). Pročišćavanjem vode korištenjem aktivnog ugljena kao adsorbensa uklanjanjaju se mirisi, okusi, boje, toksični spojevi, a smanjenjuje se i koncentracija slobodnog klora i dr.

Iako se konvencionalni adsorbensi, poput aktivnog ugljena odlikuju visokom učinkovitošću i kakvoćom obrađene vode te mogućnošću uklanjanja velikog broja različitih onečišćujućih tvari, visoka cijena i potreba za regeneracijom adsorbensa njihov su veliki nedostatak. Kako bi se skupi konvencionalni adsorbensi zamijenili jeftinijima, ali jednako učinkovitim, u novije vrijeme intenzivno se istražuju različiti otpadni lignocelulozni materijali iz poljoprivredne, prehrambene i šumarske industrije kao jeftini, nekonvencionalni adsorbensi za uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda (De Araujo i sur., 2020; Chahm i sur., 2018; Munagapati i sur., 2018; Chand i sur., 2015; Yakout i Daifullah, 2013; Abdolali i sur., 2010; Akhtar i sur., 2009; Forgacs i sur., 2004).

2.4.1.1. Čimbenici koji utječu na adsorpciju

Prilikom uklanjanja bojila iz otpadnih voda djeluju dva mehanizma: adsorpcija i ionska izmjena (Slokar i Le Marechal, 1997) i na nju utječu razni fizikalno-kemijski čimbenici poput karakteristika adsorbata, karakteristika adsorbensa (površina i struktura pora, veličina čestica, kemijski sastav), te karakteristika medija u kojem se odvija adsorpcija (temperatura, pH) (Noroozi i sur., 2007).

Karakteristike adsorbata. Topljivost adsorbata najviše utječe na kapacitet adsorpcije. Veća topljivost adsorbata rezultira slabijom učinkovitošću adsorpcije.

Morfološke i fizikalno-kemijske karakteristike površine adsorbensa. Adsorpcijski kapacitet adsorbensa, a time i njegova mogućnost upotrebe, određen je u prvom redu poroznošću strukture, prisutnošću pora, kao i brojem i vrstom specifičnih funkcijskih skupina prisutnih na površini adsorbensa.

Veličina čestica adsorbensa. Površina neporoznih adsorbensa povećava se proporcionalno sa smanjenjem veličine njihovih čestica. Posljedica je povećanje adsorpcijskog kapaciteta uz smanjenje promjera čestica (Vujević, 2007).

Površina i struktura pora adsorbensa. Adsorpcijski kapacitet adsorbensa ovisan je o specifičnoj površini i samoj strukturi adsorbensa, tako da učinkovitost adsorpcije raste s povećanjem specifične površine.

Temperatura. Povećanje temperature može dovesti do povećanja ili smanjenja učinkovitosti adsorpcije, ali također ne mora utjecati na učinkovitost (Loganathan i sur., 2013). Ako prilikom adsorpcije bojila na neki adsorbens povećanjem temperature dolazi do smanjenja učinkovitosti uklanjanja bojila, radi se o egzotermnom procesu, dok se u suprotnom slučaju radi o endotermnom procesu (Chanzu i sur., 2019; Jain i Sikarwar, 2014).

pH otopine. pH se općenito smatra vrlo važnim čimbenikom provođenja adsorpcije, jer može dovesti do promjene aktivnog mjesta adsorbensa, kao i do promjene naboja samog bojila.

Utjecaj koncentracije adsorbata. Utjecaj koncentracije adsorbata je potrebno poznavati radi pravilne i učinkovite provedbe procesa adsorpcije, budući da različiti adsorbensi imaju različit adsorpcijski kapacitet za isti adsorbat (Dwivedi i sur., 2010).

2.4.1.2. Adsorpcijska ravnoteža i kinetika adsorpcije

Adsorpcijske izoterme opisuju kako se molekule adsorbata raspodijeljuju između čvrste i tekuće faze u ravnotežnom stanju te daju uvid u adsorpcijski kapacitet primijenjenog adsorbensa (Hameed i Ahmad, 2009). Adsorpcijska izoterma grafički je prikaz ovisnosti ravnotežne količine adsorbata po jedinici mase adsorbensa o koncentraciji, pri konstantnoj temperaturi. Modeliranjem eksperimentalno dobivenih vrijednosti primjenom adsorpcijskih

ravnotežnih modela (izotermi) može se predvidjeti mehanizam adsorpcije te na taj način poboljšati sam proces adsorpcije (Chen, 2015). Adsorpcijsku ravnotežu opisuje relacija za funkciju (1):

$$f(n_a, p, T) = 0 \qquad (1)$$

gdje je n_a broj molova adsorbirane tvari koji se odnose na jedinicu mase ili površine, p tlak (s tim da se u otopinama tlak zamjenjuje koncentracijom c), a T temperatura. Pri mjerenju uvijek je jedna varijabla konstantna, čime se pri konstantnoj temperaturi dobiva adsorpcijska izoterma, pri konstantnom tlaku adsorpcijska izobara, a pri konstantom broju molova adsorbata adsorpcijska izostera. Najčešće se primjenjuju adsorpcijske izoterme (Brdička, 1969). Iako je predloženo mnogo izraza za adsorpcijsku izotermu, nijedan od njih ne definira sve slučajeve adsorpcije. Postoji velik broj različitih adsorpcijskih ravnotežnih modela, kao npr. Langmuirov, Freundlichov, Dubinin-Radushkevichev, Tempkinov, Flory-Hugginsov, Hilovl, Redlich-Petersonov, Sipsov, Tothov, Koble-Corriganov, Khanov, Brunauer-Emmett-Tellerov, Radke-Prausnitzov, Frenkel-Halsey-Hillov, McMillan-Tellerov i mnogi drugi (Anijiofor i sur., 2018). Ipak, najčešće se za modeliranje eksperimentalnih podataka koriste Langmuirova i Freundlichova adsorpcijska izoterma, koje dobro opisuju adsorpciju otopljene tvari na čvrsti adsorbens, ali i zbog jednostavnih i korisnih parametara modela (Tran i sur., 2017).

Langmuirova adsorpcijska izoterma temelji se na teoriji koja pretpostavlja da je adsorpcija reverzibilna, molekule se adsorbiraju samo u jednom sloju, ne mogu se kretati po površini adsorbensa, entalpija je jednaka za sve molekule adsorbata neovisno o njihovom broju, a sva adsorpcijska mjesta adsorbensa jednako su aktivna. Model pretpostavlja dostupnost određenog broja adsorpcijskih mjesta (Langmuir, 1918; Bharathi i Ramesh, 2013). Langmuirov model opisan je jednadžbama (2) i (3):

$$q_\mathrm{e} = \frac{q_\mathrm{m} \times K_\mathrm{L} \times C_\mathrm{e}}{1 + K_\mathrm{L} \times C_\mathrm{e}} \qquad (2)$$

$$q_\mathrm{e} = \frac{1}{q_\mathrm{m}} + \left(\frac{1}{q_\mathrm{m} \times K_\mathrm{L}}\right) \times \frac{1}{C_\mathrm{e}} \qquad (3)$$

gdje je

q_e – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
q_m – maksimalni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
K_L – Langmuirova konstanta (dm^{-3} mg^{-1})
c_e – ravnotežna koncentracija adsorbirane tvari (mg dm^{-3})

Freundlichova adsorpcijska izoterma koristi se za opisivanje adsorpcije u višemolekularnom sloju gdje postoje interakcije među česticama adsorbata (Freundlich, 1906). Ta izoterma prikazuje ovisnost količine adsorbata o koncentraciji otopine i prikazana je jednadžbom (4)

$$q_e = K_f c_e^{1/n} \quad (4)$$

gdje su K_f i $1/n$ empirijske konstante karakteristične za pojedini par adsorbens-adsorbirana tvar. Transformacijom jednadžbe (4) dobije se linearni oblik prikazan jednadžbom (5), pomoću kojeg se određuju vrijednosti konstanti, odnosno parametri Freundlichovog modela adsorpcije:

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log c_e \quad (5)$$

gdje je

q_e - ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
c_e - ravnotežna koncentracija adsorbirane tvari (mg dm^{-3})
n - parametar koji se odnosi na jačinu adsorpcije
K_f - Freundlichova konstanta (mg g^{-1})(mg dm^{-3})$^{-1/n}$

Langmuirova izoterma bolje opisuje proces adsorpcije iz monokomponentnih otopina, dok je Freundlichova primjerenija za višekomponentne otopine.

Adsorpcijska kinetika opisuje odvijanje adsorpcije u ovisnosti o vremenu sve do uspostave ravnotežnog stanja. Proces adsorpcije obuhvaća prijenos mase i topline. Prijenos mase dijeli se na 1) prijenos adsorbata iz tekuće faze na graničnu površinu oko adsorbensa; 2) prijenos kroz graničnu površinu, tzv. difuzija u filmu; 3) nasumičan prijenos u pore adsorbensa difuzijom (difuzija kroz pore); 4) interakcije s aktivnim mjestima adsorbensa. Prijenos topline dijeli se na prijenos unutar adsorbensa i prijenos kroz granični sloj (Kammerer i sur., 2011). Najčešće korišteni modeli su kinetički modeli, model pseudo-prvog reda i model pseudo-drugog reda te difuzijski model unutarčestične difuzije.

Model pseudo-prvog reda. Lagergrenova jednadžba prvog reda nazvana je jednadžbom pseudo-prvog reda (Lagergren, 1898; Qiu i sur., 2009). Opisuje jednomolekularni proces temeljen na reverzibilnoj ravnotežnoj reakciji (Kammerer i sur., 2011) koja se može opisati jednadžbom (6):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_{m1} - q_t) \quad (6)$$

Integriranjem jednadžbe pri graničnim uvjetima $q_t = 0$ i $q_t = q_t$ pri $t = t$, dobije se jednadžba (7):

$$\ln\left(\frac{q_{m1}}{q_{m1} - q_t}\right) = k_1 t \quad (7)$$

Jednadžba (7) može se zapisati kao jednadžba (8):

$$\ln(q_{m1} - q_t) = \ln q_{m1} - k_1 t \quad (8)$$

gdje je

q_{m1} – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
q_t – adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1})
t – vrijeme (min)
k_1 – koeficijent brzine adsorpcije pseudo-prvog reda (min^{-1})

Model pseudo-drugog reda . Kinetički model pseudo-drugog reda opisuje kemisorpciju drugog reda, a jednadžba modela pseudo-drugog reda uspješno je primijenjena na adsorpciju metala, bojila, herbicida, ulja i organskih tvari iz vodenih otopina (Qiu i sur., 2009). Ho i McKay (1999) su model pseudo-drugog reda prikazali jednadžbom (9):

$$\frac{d\,q_t}{d_t} = k_2(q_{m2} - q_t)^2 \qquad (9)$$

Razdvajanjem varijabli iz jednadžbe (9) dobije se jednadžba (10):

$$\frac{dq_t}{(q_{m2}-q_t)^2} = k_2\,dt \qquad (10)$$

Integriranjem jednadžbe pri graničnim uvjetima $t = 0$ do $t = t$ i $q_t = 0$ do $q_t = q_t$ dobije se izraz (11):

$$\frac{1}{(q_{m2} - q_t)} = \frac{1}{q_{m2}} + k_2 t \qquad (11)$$

Jednadžba (11) može se prikazati i kao jednadžba (12):

$$q_t = \frac{k_2 q_{m2}^2 t}{1 + k_2 q_{m2} t} \qquad (12)$$

Linearizacijom jednadžbe (12) dobije se izraz (13):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_{m2}^2} + \frac{t}{q_{m2}} \qquad (13)$$

gdje je:

q_{m2} – ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1})
q_t – adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1})
t – vrijeme (min)
k_1 – konstanta brzine adsorpcije pseudo-drugog reda (g mg^{-1} min^{-1})

Model unutarčestične difuzije. Model unutarčestične difuzije prikazuje jednadžba (14) (Guler i Sarioglu, 2014.):

$$q_t = k_{\mathrm{id}} t^{0.5} + C \qquad (14)$$

gdje je

q_t – adsorpcijski kapacitet u vremenu t (mg g^{-1})
k_{id} – konstanta brzine međučestične difuzije (mg g^{-1} $min^{-0,5}$)
C – odsječak

Konstante u modelu međučestične difuzije, mogu se odrediti grafički, iz nagiba pravca i odsječka pravca koji prikazuje ovisnost q_t i $t^{0,5}$. Prema jednadžbi (14), ovisnost q_t i $t^{0,5}$, trebala bi biti linearna ($C = 0$), pod uvjetom da je međučestična difuzija jedini proces koji utječe na brzinu adsorpcije. Ukoliko pravac ne prolazi kroz ishodište ($C \neq 0$), adsorpcijski proces se odvija u više koraka različitom brzinom (međučestična difuzija i utjecaj graničnog sloja). Što je veći C, veći je utjecaj graničnog sloja (Guler i Sarioglu, 2014).

2.4.1.3. Primjena lignoceluloznih materijala kao adsorbensa

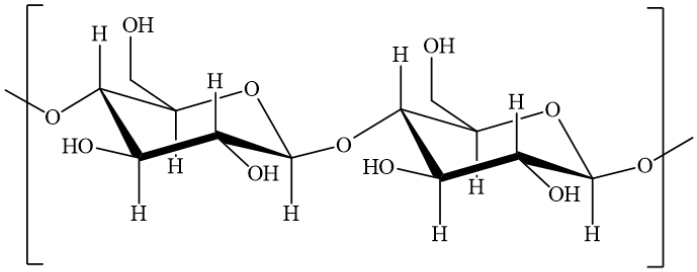
Adsorbens se smatra jeftinim ako ne zahtijeva obradu ili zahtijeva neznatnu obradu, u prirodi je prisutan u velikim količinama ili je kao proizvodni ostatak iz različitih industrija dostupan u velikim količinama tijekom cijele godine (Rafatullah i sur., 2010). Lignocelulozni proizvodni ostatci zadovoljavaju sve navedene kriterije te se mogu smatrati jeftinim adsorbensima. Adsorpcija na različite nekonvencionalne adsorbense biološkog podrijetla, poput aktivne ili inaktivne mikrobne biomase, lignoceluloznog biljnog materijala, životinjskih materijala (kosti, perje i sl.) i sl. opisuje se i pojmovima „biosorpcija“ i „biosorbens“.

Lignocelulozni materijali su primarni izvor obnovljive organske tvari na Zemlji i nastaju u velikim količinama tijekom cijele godine (Alonso i sur., 2005). Sastoje se od tri vrste polimera: celuloze, hemiceluloze i lignina koji formiraju složenu strukturu koja štiti materijal od mikrobiološke razgradnje gljivama ili bakterijama i čiji udjeli ovise o vrsti lignoceluloznog materijala (Janušić i sur., 2008). **Tablica 2.4.1.3.1.** daje prikaz udjela lignoceluloznih sastavnica različitih materijala.

Tablica 2.4.1.3.1. Udjeli lignoceluloznih sastavnica različitih materijala.

Vrsta otpada	Lignocelulozna sastavnica %			Izvor
	Celuloza	*Lignin*	*Hemiceluloza*	
pivski trop	20	28	28 - 30	Mussato i sur., 2006
repini rezanci	22 - 30	3 - 4	24,32	Spagnuolo i sur., 1997
kora banane	12	10	26	Sanchèz Orozco i sur., 2014
kora naranče	12	2	15	Sanchèz Orozco i sur., 2014
piljevina drveta	40-45	20 - 30	30	Sjostrom, 1993

Celuloza (**slika 2.4.1.3.1.**) je polisaharid s bruto formulom $(C_6H_{10}O_5)_n$, pri čemu je *n* stupanj polimerizacije. Izgrađena je od linearno povezanih molekula D-glukoze međusobno povezanih β-(1,4)-glikozidnom vezom. Skupine celuloznih lanaca povezanih vodikovim vezama i van der Waalsovim silama formiraju mikrofibrile, koji izgrađuju celulozno vlakno. Ona je strukturni materijal koji biljkama daje karakterističnu čvrstoću i elastičnost. Celuloza je bijela vlaknasta tvar, bez okusa i mirisa. Netopljiva je u vodi i organskim otapalima, a topljiva u jakim kiselinama i lužinama. Oko 65 % celuloze ima kristaliničnu strukturu, a 35 % celuloze čine amorfni lanci povezani s hemicelulozom i ligninom. Kemijska reaktivnost i stabilnost celuloze rezultat su najvećim dijelom prisutnosti velikog broja funkcionalnih –OH skupina (Abdolali i sur., 2014).



Slika 2.4.1.3.1. Strukturna formula celuloze

Hemiceluloza je heterogena skupina dugolančastih polisaharida koji se po sastavu te kemijskoj strukturi razlikuju od celuloze. Osnovnu im građu čini niz povezanih molekula ksiloze, na koje su kao ogranci vezani drugi šećeri (arabinoza, manoza, galaktoza). Zajedno s celulozom grade stanične stijenke biljaka, dajući im čvrstoću.To je heterogeni, nekristalinični polisaharid, čija struktura i sastav ovise o izvoru (Abdolali i sur., 2014), a uključuju pentoze, heksoze, heksauronske kiseline i deoksiheksoze. Ako je glavni lanac izgrađen od samo jedne

vrste monosaharida definira se kao homopolimer, odnosno heteropolimer ako je izgrađen od više vrsta monosaharida. Hemiceluloza je topljiva u vodi pri povišenim temperaturama.

Lignin je neugljikohidratni polifenolni polimer, koji povezuje celulozna vlakna u vrlo čvrstu izvanstaničnu strukturu. Biljna stanica sintetizira lignin i pohranjuje ga na unutarnju stranu celulozne stijenke. Ovaj polimer sastoji se od tri monomera: koniferilnog alkohola, sinapilnog alkohola i *p*-kumarilnog alkohola. Amorfne je strukture, vrlo stabilan i otporan na kemijsku i biološku razgradnju (Iqbal i sur., 2013).

Kada se lignocelulozni materijali koriste kao adsorbensi, dolazi do interakcije adsorbata s funkcijskim skupinama tih materijala. Vrsta funkcijskih skupina je uglavnom ista za sve lignocelulozne materijale, ali broj varira. Što je veći broj funkcijskih skupina dostupnih za vezanje adsorbata, učinkovitost adsorpcije će biti veća. Stoga se često provodi modifikacija lignoceluloznih materijala s ciljem povećavanja broja funkcijskih supina. Modifikacija može biti fizikalna ili kemijska, a neki od postupaka uključuju usitnjavanje, toplinsku obradu, obradu kiselinama, lužinama, solima i oksidaciju organskim otapalima (Nguyen i sur., 2013). Procesom pirolize može se iz jeftinih lignocelulozних materijala dobiti aktivni ugljen, ali je upitna ekonomska isplativost takvog procesa obrade. Sve metode modifikacije adsorbensa mijenjaju neke od svojstava materijala, poput hidrofilnosti/hidrofobnosti, elastičnosti, higroskopnosti, adsorpcijskih karakteristika, termostabilnosti i otpornosti prema mikrobiološkoj razgradnji (O'Connell i sur., 2008).

Osnovni nedostatci primjene lignocelulozних materijala kao adsorbensa, posebno kada se koriste u svom nativnom obliku – nemodificirani, su manji adsorpcijski kapacitet u odnosu na komercijalne adsorbense te moguća pojava sekundarnog onečišćenja otpadnih voda, zbog izluživanja (otpuštanje organskih i anorganskih spojeva) materijala. Sekundarno onečišćenje najčešće se očituje kroz povećanje vrijednosti kemijske potrošnje kisika, biokemijske potrošnje kisika ili ukupnog organskog ugljika otpadne vode koja se obrađuje (Wan Ngah i Hanafiah, 2008).

Iako su nemodificirani i modificirani lignocelulozni materijali do sada tijekom istraživanja korišteni za uklanjanje cijelog niza onečišćujućih tvari poput teških metala, sintetskih bojila, fenolnih spojeva, nitrata, pesticida i slično (Gupta i sur., 2009), čini se kako je najveći broj istraživanja proveden s ciljem uklanjanja bojila i teških metala.

Bojila se mogu uspješno ukloniti adsorpcijom na lignocelulozne materijale, pri čemu se često visok učinak adsorpcije postiže i bez modifikacije adsorbensa. Pri tome su osnovni adsorpcijski mehanizmi stvaranje kelatnih kompleksa, ionska izmjena i vezanje s funkcionalnim skupinama uz nastajanje hidronijevog iona (Abdolali i sur., 2014). U **tablicama 2.4.1.3.2.** i **2.4.1.3.3** dan je pregled lignocelulozних proizvodnih ostataka i otpadnih materijala korištenih za uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina adsorpcijom.

U ovom radu je kao lignocelulozni adsorbens korišten pivski trop, proizvodni ostatak zaostao nakon proizvodnje piva. Pivski trop čini 85 % ukupne proizvodnje otpada u pivovari (Mussato i sur, 2006), što ga čini široko dostupnim tijekom cijele godine. Od 100 kg slada utrošenog za proizvodnju sladovine dobije se od 100 kg do 130 kg tropa udjela vlage od 70 % do 80 %, dok se na 100 litara proizvedenog piva dobije oko 20 kg pivskog tropa (Pejin i sur. 2013). Do sada se pivski trop uglavnom koristio kao hrana za životinje ili se odlagao na odlagališta otpada, pri čemu su mogućnosti njegova iskorištenja kao vrijednog obnovljivog resursa zanemarene

(Vanreppelen i sur., 2014). Kao još neke od mogućnosti korištenja pivskog tropa Pejin i suradnici (2013) navode sljedeće: dodatak proizvodima za ljudsku ishranu, sirovina za proizvodnju građevinskog materijala, proizvodnja papira i energije, biotehnološka sirovina i adsorbens. Pregled dosadašnje primjene pivskog tropa kao adsorbensa za uklanjanje sintetskih bojila iz vodenih otopina dan je u **tablici 2.4.1.3.4**.

Nakon završenog procesa adsorpcije bojila korištenjem lignoceluloznih materijala, zaostaje obojeni materijal koji je potrebno zbrinuti na odgovarajući način, imajući u vidu činjenicu kako se radi o otpadu koji je potencijalno opasan (zbog već navedenog utjecaja sintetskih bojila na okoliš i zdravlje čovjeka). Osim uobičajenih načina zbrinjavanja poput odlaganja na odlagališta ili spaljivanja, jedna mogućnost (koja je još uvijek predmetom istraživanja) je i biološka obrada obojenog lignoceluloznog materijala pomoću gljiva bijelog truljenja. Tijekom uspješne provedbe biološke obrade istovremeno dolazi do razgradnje osnovnih polimernih sastavnica materijala i razgradnje bojila (Li i sur., 2014; Ozmen i Yesilada, 2012; Carletto i sur., 2008; Nigam i sur., 2000).

Tablica 2.4.1.3.2. Pregled lignoceluloznih proizvodnih ostataka i otpadnih materijala korištenih za uklanjanje metilenskog modrila iz vodenih otopina adsorpcijom.

Adsorbat (bojilo)	Adsorbens	Priprema / modifikacija adsorbensa	q_{max} / mg g^{-1}	% uklanjanja	Referenca
METILENSKO MODRILO	otpad voća *Rapanea ferruginea*	mljevenje, prosijavanje, impregnacija s H_2SO_4	33	-	Chahm i sur., 2018
	graviola	usitnjavanje, obrada s Na-hipokloritom (100 mg dm^{-3})	-	80,0 – 90,0	Meili i sur., 2018
	rižina ljuska	pranje, sušenje	25	-	Patil i sur., 2017
	piljevina američkog borovca	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje	10,3	99,9	Salazar-Rabago i sur., 2017
	Sabal palma	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	71	90,9	Papegawata i syed, 2017
	stabljika duhana	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	89,4 - 4,63	44,7 - 88,2	Reddy i sur., 2017
	kora krastavca	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	122,4 - 20,4	49,0 - 81,1	Shakoor i Nasar, 2017
	ljuska oraha	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	51,55	26,8 - 99,8	Tang i sur., 2017
	kora kokosa	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	-	92,1 - 99,5	Etim i sur., 2016
	kora limete	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	227,3	94,6 - 97,1	Shakoor i Nasar, 2016
	bagasa šećerne trske	obrada s H_2SO_4	56,5	99,5	Low i sur., 2011
	ljuska lješnjaka	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	76,9	-	Ferrero, 2007
	piljevina cedra	sušenje, mljevenje, prosijavanje	142,36	-	Hamdaoui, 2006
	stabljike suncokreta	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	205	80,0	Sun i Xu, 1997

Tablica 2.4.1.3.3. Pregled lignoceluloznih proizvodnih ostataka i otpadnih materijala korištenih za uklanjanje kongo crvenila iz vodenih otopina adsorpcijom.

Adsorbat (bojilo)	Adsorbens	Priprema / modifikacija adsorbensa	q_{max} / mg g^{-1}	% uklanjanja	Referenca
KONGO CRVENILO	prah bananine kore	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	11,8 - 164,6	-	Munagapati i sur., 2018
	kora banane	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	1,721	97,3	Mondal i Kar, 2018
	iskorišteni crni čaj	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	-	>80,0	Khan i sur., 2018
	piljevina limunskog eukaliptusa	ispiranje u 0,1 mol dm^{-3} HCl i NaOH, mljevenje, prosijavanje			Ribeiro i sur., 2018
	aktivni ugljen pripravljen od lišća *Aloe vere*	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje žarenje na 550°C kroz 20 minuta	91	-	Khaniabadi i sur., 2017
	ostaci vlakana kokosa	sušenje, obrada heksanom i HCl (2 mol dm^{-3})	128,94	98,9	Rani i sur., 2017
	piljevina bora (*Abies nordmanniana*)	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	28,1	86,0	Burca i sur., 2017
	ljuske graha	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	-	78,0	Jirekar i sur., 2016
	vlakna jute	ispiranje, centrifugiranje, sušenje, prosijavanje	8,116		Roy i sur., 2013
	aktivirana oduljena gorušica	ispiranje, sušenje pri 80°C kroz 2 h, obrada s 30 % H_2O_2 kroz 24 h, ispiranje, sušenje pri 100 °C 1 h, mljevenje, prosijavanje		98,8	Jain i Sikarwar, 2013
	aktivni ugljen ljuske riže	ispiranje, aktiviranje visokom temp. pare kroz 4 sata	-	10,8 - 99,1	Sharma i Janveja, 2008
	stabljike suncokreta	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	37,78	80,0	Sun i Xu, 1997

Tablica 2.4.1.3.4. Pregled korištenja pivskog tropa kao adsorbensa za uklanjanje različitih bojila iz vodenih otopina adsorpcijom.

Adsorbens	Adsorbat (bojilo)	Priprema / modifikacija adsorbensa	q_{max} / mg g^{-1}	% uklanjanja	Referenca
PIVSKI TROP	metilensko modrilo	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje	95,2		De Araujo i sur., 2020
	kongo crvenilo	ispiranje dest. H_2O, sušenje, prosijavanje		74,2-94,1	Chanzu i sur., 2019
	malahitno zelenilo	ispiranje dest. H_2O, sušenje, prosijavanje		55,1-96,2	Chanzu i sur., 2019
	malahitno zelenilo	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje		86,9-97,9	Reis i sur., 2018
	134 % BR2	sušenje, mljevenje, prosijavanje		>93	da Silva i sur., 2018
	reaktivna plava BF-5G	sušenje, mljevenje, prosijavanje	18-20		Juchen i sur., 2018
	TGL 185 % (OS-TGL)	sušenje, mljevenje, prosijavanje		>95	Fontana i sur., 2015
	osnovna plava 41	sušenje do 10 % vlage, mljevenje, prosijavanje	32,4		Contreras i sur., 2012
	reaktivna crna 5	sušenje do 10 % vlage, mljevenje, prosijavanje	22,3		Contreras i sur., 2012
	kisela plava 1	sušenje do 10 % vlage, mljevenje, prosijavanje	19,8		Contreras i sur., 2012
	malahitno zelenilo	ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje, obrada polilaktičnom kiselinom		80-87,2	Chanzu i sur., 2012
	kisela zelena AG25	obrada s H_2SO_4, ispiranje dest. H_2O, sušenje, mljevenje, prosijavanje		86-98	Jaikumar i sur., 2009
	kisela narančasta 7	sušenje		<90	Silva i sur., 2004

2.5. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom gljivama bijelog truljenja

Danas je poznato više od milijun vrsta gljiva, ali samo mali broj posjeduje sposobnost razgradnje drvne biomase (gljive truležnice). Tri su glavne vrste gljiva koje razgrađuju drvo: gljive mekog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja, a podjela se temelji na svojstvima drva koje razgrađuju i nastalim razgradnim produktima (Sigoillot i sur., 2012). Gljive truležnice imaju važnu ulogu u procesu kruženja tvari u prirodi. Zbog izuzetno složene strukture lignina, sposobnost njegove razgradnje pokazuje vrlo mali broj mikroorganizama (Sigoillot i sur., 2012), pri čemu gljive bijelog truljenja imaju sposobnost potpune razgradnje lignina (mineralizacije) do CO_2 i H_2O (Gold i Alic, 1993). Razgradnja lignoceluloznih polimera odvija se djelovanjem različitih hidrolitičkih i oksidativnih enzima koje ove gljive sintetiziraju tijekom sekundarnog metabolizma (Lankinen, 2004), pri čemu su najvažniji izvanstanični enzimi koji provode razgradnju lignina: lakaza, lignin peroksidaza i mangan peroksidaza (Elisashavili et al., 2009). Činjenica kako energiju potrebnu za razgradnju lignina dobivaju oksidacijom biljnih polisaharida, ukazuje na moguću primjenu lignoceluloznih materijala kao izvora hranjivih tvari u industrijskoj primjeni (Ralph i Catcheside, 2002). Enzimi celulaze (endoglukanaze, celobiohidrolaze i β-glukozidaze) i hemicelulaze kataliziraju reakcije hidrolize ovih polimera do jednostavnih šećera potrebnih kao izvor ugljika i energije za rast gljiva (Gargano i sur., 2017).

Razgradnja lignina gljivama bijelog truljenja rezultira izbijeljenim izgledom istrulog drveta. Dva su tipa bijelog truljenja, ovisno o redoslijedu razgradnje polimera: simultana (istovremena) razgradnja svih polimera u drvetu i selektivna razgradnja lignina u drvetu. Tijekom simultane razgradnje dolazi do istovremene razgradnje celuloze, hemiceluloze i lignina (Sigoillot i sur., 2012), a važni predstavnici te skupine su vrste *Trametes versicolor* (šarena tvrdokoška) i *Phanerochaete chrysosporium*. Proces selektivne razgradnje lignina puno je rjeđi i karakterizira ga enzimska razgradnja lignina i hemiceluloze, pri čemu celuloza ostaje nerazgrađena. Predstavnik ove skupine je vrsta *Ceriporiopsis subvermispora* (Tanaka, 2009).

Primjena gljiva bijelog truljenja uključuje proces proizvodnje pulpe u industriji papira, biološko izbjeljivanje pulpe drveta, proizvodnju enzima te, sve češće, uklanjanje/razgradnju ksenobiotika, uključujući i sintetska organska bojila (Grelska i Noszczynska, 2020; Periasamy i sur., 2019; Cuoto, 2009; Quaratino i sur., 2007; Kandelbauer i Guebitz, 2005). Primjena gljiva bijelog truljenja u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda temelji se upravo na sposobnosti sinteze izvanstaničnih enzima odgovornih za razgradnju lignina, koji zbog nespecifičnosti za određeni supstrat mogu razgraditi i razne ksenobiotike (Periasamy i sur., 2019; Elisashavili i sur., 2009). U tu svrhu najviše su istraživane i najčešće korištene vrste *P. chrysosporium* i *T. versicolor* (Forgacs i sur., 2004).

U ovom radu korišteni su novi izolati četiri vrste gljiva bijelog truljenja: *T. versicolor, T. gibbosa, Ganoderma lucidum i G. resinaceum* (**slika 2.5.1.**) te je proveden njihov uzgoj na agarnim pločama (hranjivim podlogama) s dodatkom bojila, kako bi se odabrala ona vrsta koja pokazuje najbolju sposobnost razgradnje metilenskog modrila i kongo crvenila. Takav probir često je prvi korak u primjeni gljiva bijelog truljenja u remedijaciji obojenih otpadnih voda, jer iz velikog broja izolata omogućuje probir onih vrsta koje će najbrže i najučinkovitije obezbojiti

agarne ploče s dodatkom bojila i koje stoga pokazuju potencijal za daljnju primjenu (Eshghi i sur., 2011; Eichlerová i sur., 2007, Eichlerová i sur., 2006).

Slika 2.5.1. Gljive bijelog truljenja korištene tijekom istraživanja: *T. versicolor, T. gibbosa, G. lucidum i G. resinaceum*

Vrsta *T. versicolor* nakon probira je u radu korištena za biološku obradu obojenog pivskog tropa zaostalog nakon adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop, na način da je uzgajana u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima (*Solid State Fermentation,* fermentacije na čvrstim nosačima), pri čemu je obojeni pivski trop služio kao neinertni nosač. Fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskim ili industrijskim uvjetima oponašaju prirodne mikrobiološke procese poput kompostiranja i siliranja (Rodríguez Couto i Sanromán, 2006), što ih čini primjenjivim i za oponašanje drugog prirodnog mikrobiološkog procesa u laboratorijskim ili industrijskim uvjetima - biorazgradnju polimernih sastavnica obojenog lignoceluloznog supstrata gljivama bijelog truljenja, uz istovremenu razgradnju bojila.

Uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima (fermentacije na čvrstim nosačima) označava procese koji se provode gotovo ili potpuno u odsutnosti slobodne vode na materijalima koji nisu topljivi i koji djeluju kao fizički nosač za mikroorganizme. Ti se procesi svakodnevno odvijaju u okolišu, npr. truljenje voća ili pojava pljesnivosti kruha te tako osiguravaju stalno kruženje organskih spojeva (Singh i sur., 2008) Čvrsti materijali, osim kao nosači, mogu služiti i kao supstrati (izvor ugljika, energije i hranjivih tvari) te se tada govori o neinertnim nosačima. Primjer takvih nosača su lignocelulozni materijali. Inertni nosači za uzgoj gljiva služe samo kao nosači (npr. smola, vlakna, staklo) (Pandey, 2003). Kao radni mikroorganizam u fermentacijama na čvrstim nosačima koriste se čiste kulture ili mješovite kulture, najčešće aerobnih mikroorganizama i to poglavito filamentoznih gljiva (iako se mogu koristiti i bakterije

i kvasci). Filamentozne gljive se zbog svog načina rasta lako šire i prodiru u supstrat, kako bi došle do hranjivih tvari te također mogu rasti u sustavima koji sadrže vrlo malo vode i imaju nizak pH (Mitchell i sur., 2002). Fermentacije na čvrstim nosačima uspješno se primjenjuju za mikrobiološku razgradnju lignocelulozne biomase, odnosno za obradu čvrstog otpada, proizvodnju enzima, proizvodnju sekundarnih metabolita, proizvodnju goriva, proizvodnju hrane (Zweistra-Hoogschagen, 2007). Korištenjem otpadnih lignoceluloznih materijala kao nosača za uzgoj gljiva, ostvaruje se i proizvodnja vrijednih metabolita i smanjenje količine lignoceluloznog otpada uslijed njegove razgradnje (Philippoussis, 2009).

Šarena tvrdokoška, *T. versicolor*, poznata i kao „puranov rep" jedna je od najbolje istraženih gljiva bijelog truljenja. Pokazala se uspješnom u razgradnji policikličnih aromatskih ugljikovodika (PAHs), polikloriranih bifenila (PCBs) i sintetskih bojila (Barreto i sur., 2006) te ima dobru sposobnost adsorpcije teških metala (Jarosz-Wilkolazka i sur., 2001). Uzgoj *T. versicolor* na obojenom pivskom tropu kao nosaču kao mogući postupak zbrinjavanja obojenog adsorbensa zaostalog nakon procesa adsorpcije bojila slijedi metodu koju su predložili Nigam i suradnici (2000). Metoda se sastoji od dva koraka: prvi korak uključuje provođenje fizičkog uklanjanja bojila iz vodenog medija adsorpcijom na različite lignocelulozne adsorbense, dok drugi korak uključuje korištenje obojenih adsorbensa kao neinertnih nosača za uzgoj gljiva bijelog truljenja u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima, s ciljem razgradnje lignoceluloznih sastavnica i razgradnje bojila (obezbojenja obojenog materijala).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U disertaciji su korištene kemikalije prikazane u **tablici 3.1.1.1.** za provedbu adsorpcijskih eksperimenata te u **tablici 3.1.1.2.** za provođenje bioloških eksperimenata.

Tablica 3.1.1.1. Kemikalije korištene za pripravu otopina tijekom karakterizacije adsorbensa te provođenja adsorpcijskih eksperimenata

Kemikalija	Formula	M / g mol^{-1}	Stupanj čistoće	Proizvođač
nitratna kiselina	HNO_3	63,013	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
etanol	C_2H_5OH	46,07	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
benzen	C_6H_6	78,11	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
octena kiselina	CH_3COOH	60,052	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
sulfatna kiselina	H_2SO_4	98,078	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
kalijev sulfat	K_2SO_4	174,259	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
selen	Se	78,96	p. a.	Merck, Njemačka
natrijev hidroksid	NaOH	40	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
metilensko crvenilo	$C_{15}H_{15}N_3O_2$	269,3	p. a.	Merck, Njemačka
bromkrezol zeleno	$C_{21}H_{14}Br_4O_5S$	698,01	p. a.	Merck, Njemačka
borna kiselina	H_3BO_3	61,83	p. a.	Kemika d. d., Hrvatska
kalijev nitrat	KNO_3	101,105	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
kloridna kiselina	HCl	36,46	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
natrijev klorid	NaCl	58,44	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
metilensko modrilo	$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 2H_2O$	355,89	p. a.	Merck, Njemačka
kongo crvenilo	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6$	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6$	p. a.	Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo
pepton				Biolife,Italija
ekstrakt mesa				Merck, Njemačka

Tablica 3.1.1.1. Kemikalije korištene za pripravu otopina tijekom karakterizacije adsorbensa te provođenja adsorpcijskih eksperimenata nastavak

Kemikalija	Formula	*M* / g mol^{-1}	Stupanj čistoće	Proizvođač
urea	$CO(NH_2)_2$	60,06	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
dikalijev hidrogenfosfat	K_2HPO_4	228,23	p. a	Kemika d.d., Hrvatska
kalcijev klorid dihidrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	114,02	p. a	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	p. a	Kemika d.d., Hrvatska
živin(II) sulfat	$HgSO_4$	296,65	p. a	Kemika d.d., Hrvatska
srebro sulfat	Ag_2SO_4	311,799	p. a	Merck, Njemačka
željezov(II) sulfat heptahidrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	277,91	p. a	Kemika d.d., Hrvatska
1,10- fenantrolin	$C_{12}H_8N_2$	180,21	p. a	Kemika d.d., Hrvatska
amonijev željezo(II) sulfat heksahidrat	$(NH_4)_2Fe(SO_4) \cdot 6H_2O$	392,14	p. a	Kemika d.d., Hrvatska

Tablica 3.1.1.2. Kemikalije korištene za pripravu otopina i hranjivih podloga korištenih za provođenje bioloških eksperimenata

Kemikalija	Formula	M / g mol^{-1}	Stupanj čistoće	Proizvođač
krumpirov agar				Liofilchem, Italija
karboksimetil celuloza			p. a.	Aldrich, USA
amonijev tartarat	$C_4H_6O_6$	150,087	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	136,086	p. a.	Gram-mol d.o.o.,Hrvatska
kvaščev ekstrakt				Liofilchem, Italija
tehnički agar				Biolife, Italija
ABTS	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	514,62	p. a.	Sigma, USA
bakrov sulfat	$CuSO_4$	159,609	p. a.	Kemika d.d., Hrvatska
Gvajakol 99 %	$C_7H_8O_2$	124,14	p. a.	Acros, Kina
bromfenol modrilo	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	669,96	p. a.	Fisher bioreagens, India/Belgija
glukoza	$C_6H_{12}O_6$	180,156	p. a.	Gram-mol d.o.o., Hrvatska
željezov(III) klorid	$FeCl_3$	162,2	p. a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
lignin			p. a.	Aldrich Chemistry, USA
tiamin	$C_{12}H_{17}N_4OS^+$	265,35	p. a.	Acros, Kina
kalijev heksacijanoferat(III)	$K_3[Fe(CN)_6]$	329,24	p. a.	Sigma-Aldrich, Njemačka

3.1.2. Instrumenti

Tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela disertacije korišteni su sljedeći instrumenti:

- laboratorijski pH metar MP230, Mettler Toledo, Švicarska
- laboratorijski pH metar s ubodnom elektrodom ProfiLine pH 3210, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Njemačka
- sušionik ST- 01/02, Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb
- standardni laboratorijski mlin, MF10 Basic, IKA Labortechnik, Njemačka
- halogeni analizator vlage, HR73 MoistureAnalyzer, MettlerToledo, Švicarska
- fluorescentni svjetlosni mikroskop, Olympus BX51 system microscope, camera DP 25
- analitički vibrirajući uređaj za prosijavanje AS200, Retsch GmbH, Njemačka
- analitička vaga, AT 201, Mettler Toledo, Švicarska
- analitička vaga Perkin Elmer AD 6 , SAD
- CHNS/O elementni analizator Seria II analyzer 2400, Perkin Elmer, SAD.
- mikrovalna pećnica, Start D, Milestone, BrØndby, Danska
- atomsko-apsorpcijski spektrofotometar, AA600 Perkin Elmer, SAD
- induktivno spregnuta plazma - optičko emisijski spektrometar ICP-OES, DV-2100 Perkin Elmer, SAD
- žarna peć, Nabertherm 30-3000°C,Controller B 170, Njemačka
- sustav za ekstrakciju Soxtec system 1040 Extraction Unit Foss Tecator, Danska
- vodene kupelji ,GFL Gesellshaft für labortechnik D-30938, Njemačka
- autoklav ,TIP 7510945, Sutjeska, Srbija
- spektrofotometar Lambda 25, Perkin Elmer, SAD
- sustav za određivanje proteinskog dušika KjeltecTM 8100 Analyzer Unity FOSS Analytical, Danska
- pretražni elektronski mikroskop, JOEL JSM-7000F, Jeol, Japan
- infracrveni spektroskop s Fourierovom transformacijom, Cary 630, Agilent Technologies, SAD
- termostatska tresilica Innova 4340, New Brunswick Scietific, SAD
- centrifuga Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- termostat ,Termo medicinski aparati, BTEST, Bodalec Havoić, Hrvatska
- kromametar Konica Minolta CR 400 ,Konica Minolta, Osaka, Japan
- vibrirajuća mješalica Vibromix 10, Tehtnica, Zelezniki
- mikrobiološki zaštitni kabinet, Telstar® AV100-CV100, Azbil grupa, Japan
- digitalno pomično mjerilo, Würth, Njemačka

3.1.3. Lignocelulozni proizvodni ostatak-adsorbens

Pivski trop dobiven je iz pivovare „Pivovara Osijek“ d.o.o., Osijek, Hrvatska. Za sve eksperimente provedene u sklopu ovog doktorskog rada korišten je isti uzorak pivskog tropa, dobiven iz istog proizvodnog postupka.

3.1.4. Mikroorganizmi korišteni u istraživanjima biološke obrade obojenog pivskog tropa

U radu su korišteni novi izolati gljiva dobiveni iz privatne zbirke (Institute for Applied Mycology and Biotechnology, Celje, Slovenija) i izolirani na području Celja i Laškog (Slovenija): *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst,, *Ganoderma resinaceum* Boud, *Trametes versicolor* (L.) i *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr.
Gljive su uzgajane na krumpirovom agaru tijekom 7 dana pri 27 °C te čuvane u hladnjaku na 4 °C.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema i karakterizacija adsorbensa

Priprema pivskog tropa. Nekoliko sati nakon uzimanja iz pivovare određena je pH vrijednost pivskog tropa pH metrom s ubodnom elektrodom te je kiseli pivski trop ispran vrućom destiliranom vodom do neutralnog pH i osušen u sušioniku na 60 °C kroz 48 h, kako bi se spriječilo mikrobiološko kvarenje. Osušeni pivski trop (6,8 % vlage) usitnjen je na standardnom laboratorijskom mlinu korištenjem sita promjera 1 mm. Tako pripremljeni pivski trop čuvan je na suhom, tamnom i hladnom mjestu. Nikakvi drugi kemijski ili fizikalni postupci obrade pivskog tropa nisu primijenjeni prije korištenja u adsorpcijskim eksperimentima.

Određivanje udjela suhe tvari pivskog tropa. Udjel suhe tvari određen je standardnom gravimetrijskom metodom sušenjem uzoraka pri 105 °C u sušioniku do konstantne mase (HRN ISO 6496:2004). Za određivanje udjela suhe tvari tijekom bioloških eksperimenata korištena je brza metoda upotrebom halogenog analizatora vlage.

Analiza veličine čestica pivskog tropa. Analiza sijanjem provedena je upotrebom analitičkog vibrirajućeg uređaja za prosijavanje i serije standardnih sita čiji je otvor očica bio u području od 0,053 mm do 2 mm. Amplituda trešnje sita iznosila je 50, dok je vrijeme potrebno za potpuno prosijavanje analiziranog uzorka mase 100 g iznosilo 10 min. Izmjerena je masa pivskog tropa zadržanog na svakom situ i izračunat je udjel mase uzorka na svakom situ u ukupnoj masi analiziranog uzorka pivskog tropa.

Određivanje elementnog sastava. Elementni sastav pivskog tropa određen je pomoću CHNS/O analizatora. Uzorci su izvagani u kositarske posudice (masa uzorka korištena za analizu iznosila je od 1,5 mg do 3 mg), koje su nakon toga smotane u kuglice te stavljene u CHNS/O analizator. Kao standard za kalibraciju uređaja korišten je acetanilid.

Određivanje metala u pivskom tropu. Osušeni i samljeveni pivski trop razoren je u mikrovalnoj pećnici prema metodi 3051A. Metali bakar,krom, nikal olovo, kadmij i arsen su zatim određeni korištenjem tehnika atomsko-apsorpcijske spektrofotometrije (metoda HRN ISO 15586:2003), a živa (etoda HRN EN ISO 12846:2012). Željezo,cink i mangan određeni su induktivno spregnuto plazmom - optičke emisijske spektrometrije ICP-OES (metodom HRN EN ISO 11885:2010).

Određivanje udjela pepela. Pepeo je određen metodom HRN ISO 5984:2004. Usitnjeni uzorak najprije je karboniziran korištenjem plamenika, a zatim mineraliziran u mufolnoj peći do postizanja jednolično svijetlo sivog pepela ili do konstantne mase pepela.

Određivanje udjela ekstraktivnih tvari. Za analizu je korišteno 3 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka. Uzorak je odvagan u ekstrakcijske tuljke i stavljen u ekstrakcijsku jedinicu. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa otapala etanol:benzen = 1:1. Ekstrakcijsko otapalo volumena 50 cm^3 dodano je u prethodno osušene i odvagane ekstrakcijske posude koje su zatim stavljene u ekstrakcijsku jedinicu na ploču za zagrijavanje. Ekstrakcija je provedena u dvije faze: kuhanje (*boiling*) i ispiranje (*rinsing*) u ukupnom trajanju od 90 minuta (faza 1 –u trajanju od 30 minuta i faza 2 u trajanju od 60 minuta). Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakcijske posude s ekstrahiranim tvarima osušene su pri 80 °C do konstantne mase te su zatim ohlađene u eksikatoru, izvagane i izračunat je udjel ekstraktivnih tvari.

Određivanje udjela celuloze. Udjel celuloze određen je prema modificiranom postupku Rivers i suradnika (1983). U epruvete je odvagano 0,8 g ekstrahiranog uzorka (uzorak nakon određivanja ekstraktivnih tvari). Uzorku je dodano 30 cm^3 reagensa po Updergraffu (1969) koji je pripremljen na način da je u 150 cm^3 80 % CH_3COOH dodano 15 cm^3 konc. HNO_3. Epruvete su zatim stavljene u vodenu kupelj na 100 °C kroz jedan sat. Nakon jednog sata uzorak je filtriran preko filter papira na Büchnerovom lijevku. Nakon filtracije uzorak je ispran dva puta s 95 % etanolom. Uzorak s filter papirom prebačen je u aluminijskim posudicama u sušionik, gdje je osušen do konstantne mase pri 105 °C (masa 1). Uzorci s filter papira prebačeni su kvantitativno u porculanske lončiće uz pomoć 95 % etanola. Etanol je otparen na vodenoj kupelji, dok uzorak nije postao potpuno suh. Uzorak je zatim kvantitativno prebačen u epruvete, te mu je dodano 30 cm^3 72 % H_2SO_4. Epruvete s uzorkom stavljene su u vodenu kupelj na 30 °C kroz jedan sat. Kada je uzorak u potpunosti otopljen, provedena je filtracija preko sinter lončića koji su zatim sušeni u sušioniku do konstantne mase na 105 °C (masa 2). Udjel celuloze određen je prema izrazima:

$$m_{\text{celuloze}} = m_1 - m_2$$

$$\%\ \text{celuloze} = \frac{m_{\text{celuloze}}}{m_{\text{apsolutno suhog uzorka}}} \cdot 100$$

Određivanje udjela lignina. Ukupni lignin zbroj je Klasonovog lignina (netopljivog u kiselini) koji predstavlja lignin zaostao nakon razgradnje sa 72 % H_2SO_4 (Kirk i Obst, 1988) te lignina topljivog u kiselini, koji se mjeri spektrofotometrijski koristeći ekstinkcijski koeficijent za lignin (Dence i Lin, 1992). Za određivanje Klasonovog lignina izvagano je 100 mg ekstrahiranog uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu (150 cm^3) te je dodano 1,5 cm^3 72 % H_2SO_4. Uzorak je zatim inkubiran 1 sat na 30 °C u vodenoj kupelji uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije, 72 % H_2SO_4 razrijeđena je destiliranom vodom do 4 % te je uzorak autoklaviran 1 sat na 121 °C. Uzorak je filtriran na prethodno izvagan filter papir, a filtrat je odvojen za određivanje lignina topljivog u kiselini. Talog zaostao na filter papiru ispran je vrućom destiliranom vodom do neutralne reakcije. Filter papir s talogom je osušen u sušioniku na 70 °C do konstantne mase te je zatim izvagan ($m_{\text{ostatka nakon sušenja}}$). Klasonov lignin izračunat je prema izrazu:

$$\%\ \text{Klasonov lignin} = \frac{m_{\text{ostatka nakon sušenja}}}{m_{\text{apsolutno suhog uzorka}}} \cdot 100$$

Lignin topljiv u kiselini određen je spektrofotometrijski, mjereći apsorbanciju pri 205 nm prema TAPPI UM-250 protokolu (TAPPI, 1985) u kvarcnoj kiveti dodatkom 0,2 cm^3 uzorka te 1,8 cm^3 destilirane vode. Kao slijepa proba također je korištena destilirana voda. Lignin topljiv u kiselini izračunat je prema izrazu:

$$\%\ \text{Lignin topljiv u kiselini} = \frac{A_{205} \cdot R \cdot V}{e \cdot l \cdot m_{\text{suhog uzorka prije hidrolize}}} \cdot 100$$

gdje je A_{205} apsorbancija pri 205 nm, R razrijeđenje, V je volumen filtrata (dm^3), e je ekstincijski koeficijent lignina (110 L g^{-1} cm^{-1}), a l je širina kivete (1 cm).

Određivanje udjela proteina. Udjel proteina u uzorcima pivskog tropa prije i nakon fermentacije određen je metodom po Kjeldahlu (ASN 3401). Udjel proteina određen je indirektno preko udjela dušika.

Određivanje morfoloških i strukturnih značajki pretražnim elektronskim mikroskopom. Površinska morfologija i strukturne značajke ispitivanog adsorbensa analizirani su primjenom pretražne elektronske mikroskopije (engl. scanning electron microscopy - SEM) visokorezolucijskim pretražnim elektronskim mikroskopom s emisijom polja elektrona (FE SEM) bez prethodnog naparavanja uzoraka vodljivim slojem zlata ili ugljika. Površina uzoraka adsorbensa skenirana je fokusiranim snopom elektrona koji pobuđuje elektrone u sustavu atoma uzorka, uz napon ubrzanja od U = 10 kV.

Određivanje specifičnih funkcijskih skupina primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom. Površinske funkcijske skupine pivskog tropa određene su

Fourierovom transformacijskom infracrvenom spektroskopijom. Prilikom snimanja IR spektara korištena je ATR (eng. Attenuated total reflection) tehnika te je korištena vrlo mala količina (20 mg) fino usitnjenog uzorka nanešena direktno na mjerni uređaj. Prilikom mjerenja uzorak je u bliskom kontaktu s prizmom materijala (dijamant) s relativno visokim indeksom loma, a infracrveno zračenje se reflektira od međupovršine prizma/uzorak pri čemu se mjeri transmisija u spektru od 4000 cm^{-1} do 600 cm^{-1}. Za detekciju je korišten DTGS (eng. Deuterated triglycine sulfate) detektor, a za korekciju spektra korištena je Happ Genzelova apodizacija.

Određivanje točke nul naboja. Nul točka naboja određena je prema Fiol i Villaescusa (2009) te prema Mushtaq i suradnici (2014). U prvom slučaju inertni elektrolit bila je otopina KNO_3 koncentracije 0,03 mol dm^{-3}. U Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 1,25 g uzorka i 50 cm^3 otopine KNO_3 koncentracije 0,03 mol dm^{-3} te su pH vrijednosti podešene pomoću NaOH (0,1 mol dm^{-3}) i HCl (0,1 mol dm^{-3}) u rasponu od 2 do 12 i zabilježene (početna pH vrijednost). U drugom slučaju inertni elektrolit je bila otopina NaCl koncentracije 0,01 mol dm^{-3}. Postupak je isti kao i prethodni, osim što je masa uzorka pivskog tropa iznosila 0,2 g, a volumen otopine NaCl 40 cm^3. Tikvice su zatim stavljene u termostatiranu tresilicu na 25 °C kroz 24 h (brzina miješanja iznosila je 250 okr min^{-1}). Nakon 24 sata uzorak je profiltriran, određena je konačna pH vrijednost te je izračunata promjena pH (ΔpH) za svaku pH vrijednost. Točka nul naboja pH_{pzc} određena je grafički kao početna pH vrijednost pri kojoj je promjena pH (ΔpH) jednaka 0.

3.2.2. Adsorpcijski eksperimenti

3.2.2.1. Priprava modelnih otopina bojila te sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila

Modelne otopine bojila. Standardne otopine metilenskog modrila i kongo crvenila masene koncentracije 1000 mg dm^{-3} pripravljene su otapanjem 1 g bojila u 1 dm^3 demineralizirane vode. Razrjeđivanjem standardne otopine pripravljene su modelne otopine masenih koncentracija 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 i 200 mg dm^{-3} s ciljem ispitivanja adsorpcijskih svojstava adsorbensa pri različitim početnim masenim koncentracijama bojila.

Sintetska otpadna voda s dodatkom bojila. Sintetska (komunalna) otpadna voda pripremljena je otapanjem hranjivih i mineralnih sastojaka u demineraliziranoj vodi prema smjernicama OECD 302B. Sastav sintetske otpadne vode bio je kako slijedi: pepton (160 mg dm^{-3}), mesni ekstrakt (110 mg dm^{-3}), urea (30 mg dm^{-3}), dikalijev hidrogenfosfat (28 mg dm^{-3}), natrijev klorid (7 mg dm^{-3}), kalcijev klorid dihidrat (4 mg dm^{-3}), magnezijev sulfat heptahidrat (2 mg dm^{-3}). Za pripravu sintetske otpadne vode s dodatkom bojila, u pripravljenu sintetsku otpadnu vodu dodana je potrebna količina standardne otopine bojila do konačne masene koncentracije bojila od γ = 10, 50 i 200 mg dm^{-3}.

Realna (komunalna) otpadna voda s dodatkom bojila. Za pripravu realne otpadne vode s dodatkom bojila, u prikupljene uzorke realne komunalne otpadne vode dodana je potrebna

količina standardne otopine bojila do konačne koncentracije bojila od γ = 10, 50 i 200 mg dm^{-3}. Sastav uzoraka realne (komunalne) otpadne vode prikazan je u **tablici 3.1.1.3.**

Tablica 3.1.1.3. Pokazatelji kakvoće uzoraka realne (komunalne) otpadne vode korištenih u istraživanju (*SM - standardna APHA metoda)

		MDK za ispuštanje u sustav javne odvodnje	METODE	Vrijednost
1.	Temperatura zraka °C		SM*	4,00-6,00
2.	Temperatura vode °C		SM*	15,00-17,00
3.	pH	6,5-9,5	HRN ISO 10523:2012	8,10-8,40
	Temperatura ºC			15,20-20,40
4.	Taloženje po IMHOFF-u			
	-10' (cm^3 dm^{-3})			8,00-13,00
	-30' (cm^3 dm^{-3})			10,00-13,00
	-60' (cm^3 dm^{-3})	10,0	SM*	10,00-13,00
	-120' (cm^3 dm^{-3})			10,00-13,00
5.	Ukupna suspendirana tvar (mg dm^{-3})		HRN ISO 872:2008	232,00-325
6.	Ukupna tvar sušena pri 105 °C (mg dm^{-3})			1092,00-1238
7.	Ukupna tvar žarena pri 600 °C (mg dm^{-3})			576,00-612,00
8.	Gubitak žarenjem			497,00-636,00
9.	KPK (mgO_2 dm^{-3})	700	HRN ISO 15705:2002	487,00-573,00
10.	BPK_5 (mgO_2 dm^{-3})	250	HRN EN 1899-1:2004	255,00-295,00
11.	Teškohlapljive lipofilne tvari (mg dm^{-3})	100	SM*	19,48-69,84
12.	Otopljeni O_2 (mg dm^{-3})		HRN EN ISO 5814:2012	2,60-4,72
13.	Detregenti (mg dm^{-3})	10	HRN EN 903:2002	3,81-9,22
14.	Amonijak kao N (mg dm^{-3})		HRN ISO 5664:1998	58,62-58,74
15.	Nitrati kao N (mg dm^{-3})		HRN ISO 7890-1:1998	0,55-0,83
16.	Nitriti kao N (mg dm^{-3})	10	HRN EN 26777:1998	0,013-0,0184
17.	Orto-fosfati (mg dm^{-3})		HRN ISO 6878:2008	6,21-6,97
18.	Ukupni P (mg dm^{-3})		HRN ISO 6878:2008	6,53-7,27
19.	Ukupni N (mg dm^{-3})		HRN ISO 5663:2001+NO_2-N+NO_3-N	60,51-76,87
20.	Kjeldahl N (mg dm^{-3})		HRN EN 25663:1993	60,51-64,99
21.	Sulfati (mg dm^{-3})		SM*	69,91-80,24
22.	Kloridi (mg dm^{-3})		HRN ISO 9297:19998	74,87-82,31

3.2.2.2. Provedba šaržnih adsorpcijskih eksperimenata i određivanje koncentracije bojila

Istraživanje adsorpcijskih svojstava pivskog tropa provedeno je postupkom šaržne adsorpcije. U seriju Erlenmeyerovih tikvica od 250 cm^3 dodana je definirana masa pivskog tropa te 100 cm^3 otopine bojila poznatih početnih koncentracija i željene pH vrijednosti. Tikvice su zatim stavljene u termostatiranu tresilicu na odabranu temperaturu pri brzini miješanja od 150 okr min^{-1} i vremenu od 240 min (uklanjanje metilenskog modrila), odnosno 300 min (uklanjanje kongo crvenila), kako bi se osiguralo postizanje ravnotežnog stanja (osim za istraživanje kinetike adsorpcije, kada je vrijeme kontakta adsorbensa i adsorbata varirano). Nakon provedene adsorpcije, tikvice su izvađene iz termostatirane tresilice te je sadržaj tikvica profiltriran kroz filtar papir (Whatman br. 42) kako bi se odvojio adsorbens. Filtrat je zatim centrifugiran na 3500 okr min^{-1} tijekom 5 minuta. Koncentracije bojila u bistrim supernatantima su određene odmah po centrifugiranju pomoću spektrofotometra na odgovarajućim valnim duljinama (metilensko modrilo 664 nm i kongo crvenilo 498 nm).
Postotak uklanjanja bojila izračunat je korištenjem sljedećeg izraza:

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

gdje su γ_0 i γ početna i konačna masena koncentracija bojila (mg dm^{-3}).

Količina bojila koja je adsorbirana po jedinici mase adsorbensa u stanju ravnoteže (adsorpcijski kapacitet) izračunata je kako slijedi:

$$q_e = \frac{(\gamma_0 - \gamma_e)}{m} \cdot V$$

gdje je q_e ravnotežni adsorpcijski kapacitet (mg g^{-1}), γ_0 i γ_e početna i ravnotežna masena koncentracija bojila (mg dm^{-3}), m je masa adsorbensa (g), a V volumen otopine bojila (dm^3).
Svi šaržni adsorpcijski eksperimenti provedeni su u najmanje dva ponavljanja (rezultati su izraženi kao srednja vrijednost).

Utjecaj veličine čestica adsorbensa i koncentracije adsorbensa. Za istraživanje utjecaja veličine čestica pivskog tropa na adsorpciju bojila prvo su provedeni eksperimenti kojima je za cilj bilo usporediti postotak uklanjanja bojila koristeći nesamljeveni pivski trop (veličine čestica < 2 mm) te samljeveni neklasirani pivski trop (veličina čestica < 0,6 mm). Nakon toga provedeni su eksperimenti s klasiranim samljevenim pivskim tropom, pri čemu su ispitane četiri klase čestica (0,053 mm – 0,100 mm; 0,100 mm - 0,200 mm; 0,100 mm - 0,400 mm i 0,400 mm - 0,600 mm), pri čemu ostali parametari nisu mijenjani (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3}, $m_{adsorbensa}$ = 0,1 g (metilensko modrilo) i 1 g (kongo crvenilo), $V_{otopine\ bojila}$ = 100 cm^3, pH = 6,8, t = 240 min, θ = 25 °C , $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1}). Utjecaj koncentracije adsorbensa na količinu adsorbiranog bojila ispitan je dodavanjem različitih masa adsorbensa (0,05 g - 1 g za metilensko modrilo, te

0,5 g - 1,25 g za kongo crvenilo) određenom volumenu otopine bojila ($V_{\text{otopine bojila}}$ = 100 cm^3) i stalnim ostalim eksperimentalnim parametrima (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3}, pH = 6,8, t = 240 min, θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}).

Utjecaj vremena adsorpcije (kontakta između adsorbensa i adsorbata) i početne koncentracije bojila. Utjecaj vremena adsorpcije i početne konentracije bojila na proces adsorpcije ispitan je pri početnim masenim koncentracijama bojila od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3}, pri čemu ostali parametari nisu mijenjani (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3}, θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}). Masena koncentracija adsorbensa iznosila je 1 g dm^{-3} za uklanjanje metilenskog plavila i 10 g dm^{-3} za uklanjanje kongo crvenila. Ispitivanje je provedeno u vremenskim intervalima od t = 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 240 i 300 minuta.

Utjecaj pH. Utjecaj pH vrijednosti modelne otopine bojila na adsorpciju bojila na pivski trop ispitan je u rasponu vrijednosti pH od 4 do 10. Svi ostali parametri procesa nisu mijenjani (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3}, $\gamma_{\text{adsorbensa}}$ = 1 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3}, t = 240 (300) min, θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}). pH vrijednost modelnih otopina bojila podešavana je pomoću 0,1 mol dm^{-3} otopine NaOH i 0,1 mol dm^{-3} otopine HCl.

Utjecaj temperature. Ispitivanje utjecaja temperature na adsorpciju bojila na pivski trop provedeno je pri temperaturama θ = 15, 25, 35 i 45 °C. Svi ostali parametri procesa nisu mijenjani (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3}, $\gamma_{\text{adsorbensa}}$ = 1 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3}, pH=6,8; t = 240 (300) min, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}).

Utjecaj ionske jakosti. Utjecaj ionske jakosti na vezanje bojila na pivski trop provedeno je pri različitim koncentracijama NaCl u rasponu od 0,001 mol dm^{-3} do 0,5 mol dm^{-3}. Svi ostali parametri procesa nisu mijenjani (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3}, $\gamma_{\text{adsorbensa}}$ = 1 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3}, pH= 6,8; t = 240 (300) min, θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}).

Usporedba procesa adsorpcije bojila iz modelnih otopina te sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila. Ispitivanja su provedena pri sljedećim eksperimentalnim uvjetima: γ_{bojila} = 10, 50 i 200 mg dm^{-3}, $\gamma_{\text{adsorbensa}}$ = 1 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3}, t = 240 (300) min, θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}. pH otopina nije podešavan. Nakon odvajanja pivskog tropa filtracijom, u filtratima je određen ukupni sadržaj prisutne organske tvari izražen kao KPK (kemijska potrošnja kisika, mg dm^{-3}) prema metodi HRN ISO 15705:2002.

Ispitivanje izluživanja organskih tvari iz pivskog tropa tijekom adsorpcije. Ispitivanja su provedena na način da je po 1 g neispranog samljevenog pivskog tropa i samljevenog pivskog tropa ispranog do neutralne reakcije destiliranom vrućom vodom dovedeno u kontakt sa 100 cm^3 demineralizirane vode na način na koji su provedeni šaržni adsorpcijski eksperimenti (t = 300 min, θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}). Nakon odvajanja pivskog tropa filtracijom, u filtratu je određen ukupni sadržaj prisutne organske tvari izražen kao KPK te je izmjeren pH filtrata.

3.2.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom

3.2.3.1.Priprava hranjivih podloga za uzgoj odabranih vrsta gljiva na čvrstim hranjivim podlogama (agarnim pločama)

U 1 dm^3 destilirane vode dodano je 42 g krumpirovog agara, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta. Ohlađena hranjiva podloga (na 45 °C) razlivena je u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Tako pripremljene čvrste hranjive podloge (agarne ploče) nacijepljene su micelijskim diskovima (promjera 5 mm) radnih mikroorganizama čija inkubacija je trajala 7 dana pri 27 °C. Micelijski diskovi kultura starih 7 dana korišteni su kao inokulum u kvalitativnim testovima za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti te testovima obezbojenja sintetskih bojila na agarnim pločama. Svi kvalitativni testovi enzimske aktivnosti i testovi obezbojenja provedeni su u pet ponavljanja. Svaki test uključivao je i odgovarajuću biotičku (nacijepljena agarna ploča bez dodatka bojila) te abiotičku kontrolu (nenacijepljena agarna ploča s dodatkom indikatorskih spojeva za kvalitativne testove enzimske aktivnosti, odnosno bojila za testove obezbojenja).

3.2.3.2. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja

Celulolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom karboksimetil-celuloze. Test je proveden prema postupku koji je opisao Pointing (1999), na podlogama za uzgoj s dodatkom karboksimetil-celuloze (CMC). Osnovna podloga za provođenje testa bila je sljedećeg sastava: 5 g dm^{-3} amonijevog tartarata; 1 g dm^{-3} KH_2PO_4; 0,5 g dm^{-3} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001 g dm^{-3} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ i 0,1 g dm^{-3} kvaščevog ekstrakta. U 0,5 dm^3 pripremljene osnovne podloge dodano je 10 g CMC i 8 g tehničkog agara. Podloga je zatim sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C kroz 15 min te nakon hlađenja na 45 °C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, agarne ploče su nacijepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te inkubirane u termostatu pri 27 °C od 2 do 5 dana, odnosno do porasta gljive od oko 30 mm promjera. Agarne ploče su zatim natopljene 1 % vodenom otopinom kongo crvenila te je nakon 15 min višak bojila ispran destiliranom vodom. Nakon toga, natopljene su otopinom NaCl koncentracije 1 mol dm^{-3} i ostavljene 15 min, nakon čega je izliven višak otopine. Žuto-narančasto obojenje oko micelija potvrda je razgradnje CMC i aktivnosti endoglukanaza, dok je nerazgrađena CMC ostala crvene boje.

Lignolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS). Bezbojni agar s dodatkom ABTS-a oboji se zeleno do ljubičasto uslijed oksidacije ABTS-a u prisutnosti lignolitičkog enzima lakaze (Pointing, 1999.). Test je proveden prema modificiranom postupku koji su opisali Levasseur i sur. (2010.). Pripremljeno je 0,5 dm^3 osnovne podloge za uzgoj slijedećeg sastava: 21 g krumpirovog agara i dodano 0,5 dm^3 destilirane vode. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min. Nakon sterilizacije, podloga je ohlađena te je u nju sterilno dodano 5 cm^3 otopine ABTS-a koncentracije 0,2 mmol dm^{-3} i 0,5 cm^3 otopine $CuSO_4$ koncentracije 100 mmol dm^{-3}. Podloga s dodatkom ABTS-a je zatim razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja agarne ploče su nacijepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te su potom inkubirane od 24 h do 48 h u termostatu pri temperaturi od 27 °C. Pojava zelenog do ljubičastog obojenja oko zone rasta micelija potvrda je aktivnosti lakaze.

Lignolitička aktivnost: obojenje agarnih ploča s dodatkom gvajakola. Test je proveden prema modificiranom postupku Kiiskinena i sur (2004.) Gvajakol kao sintetski fenolni spoj može poslužiti kao pokazatelj aktivnosti lakaze. Pripremljeno je 500 cm^3 podloge za uzgoj slijedećeg sastava: 21 g krumpirovog agara, dodano 500 cm^3 destilirane vode te gvajakol u koncentraciji 0,01 %. Podloga je potom sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 15 min te nakon hlađenja na (45 °C) razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, agarne ploče su nacijepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te inkubirane u termostatu pri temperaturi od 27 °C, do pojave narančasto-smeđeg obojenja oko zone rasta micelija, kao potvrda aktivnosti lakaze.

Lignolitička aktivnost: obezbojenje agarnih ploča s dodatkom bromfenol modrila. Test je proveden prema modificiranom postupku koji su opisali Tekere i sur. (2004). Pripremljeno je 0,5 dm^3 podloge za uzgoj slijedećeg sastava: 21 g krumpirovog agara, dodano 0,5 dm^3 destilirane vode te bromfenol modrilo u koncentraciji 0,2 g dm^{-3}. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121°C tijekom 15 min te nakon hlađenja na 45 °C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, agarne ploče su nacijepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te inkubirane u termostatu pri temperaturi od 27 °C, do pojave obezbojenja plavog obojenja agarne ploče, kao potvrda aktivnosti lakaze.

Lignolitička aktivnost: kvalitativni test sposobnosti razgradnje lignina. Test je proveden prema jednostavnoj metodi za utvrđivanje lignolitičke aktivnosti koju su razvili Sundman i Nase (1971). Pripremljeno je 500 cm^3 hranjive podloge slijedećeg sastava: 20 g dm^{-3} agara; 5 g dm^{-3} glukoze; 5 g dm^{-3} amonijevog tartarata; 1 g dm^{-3} kvaščevog ekstrakta; 0,5 g dm^{-3} $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,1 g dm^{-3} NaCl; 0,01 g dm^{-3} $CaCl_2$; 0,01 g dm^{-3} $FeCl_3$; 0,01 g dm^{-3} lignina (Kraft) te 1 mg dm^{-3} tiamina. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 15 min te nakon hlađenja na 45- 50 °C razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja, agarne ploče su nacijepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te inkubirane u termostatu pri temperaturi od 27 °C, do porasta gljive od oko 30 mm promjera. Pripravljene su otopine $FeCl_3$ i $K_3[Fe(CN)_6]$, koncentracije 10 g dm^{-3}, koje su zatim izmiješane u omjeru 1:1. Ovako pripremljenim reagensom, koji reagira s ligninom dajući zeleno obojenje, prelivene su agarne ploče s gljivama. Na mjestima gdje je lignin ostao nerazgrađen vidljivo je tamnozeleno obojenje, dok je na mjestima gdje je došlo do razgradnje lignina to obojenje vrlo slabo ili ga nema.

3.2.3.3. Testovi obezbojenja metilenskog modrila i kongo crvenila na agarnim pločama pomoću odabranih vrsta gljiva

U bočice od 250 cm^3 izvagano je 8,4 g krumpirova agara i dodano 200 cm^3 destilirane vode. Tako pripremljene podloge su sterilizirane u autoklavu na temperaturi od 121°C kroz 15 min te potom ohlađene na temperaturu od 45 °C do 50 °C i do dodatka bojila, držane u termostatiranoj vodenoj kupelji. Osnovne otopine bojila pripremljene su tako što je u sterilne bočice od 5 cm^3 odvagano 0,1 g bojila te dodano 3 cm^3 sterilne destilirane vode. Otopine su homogenizirane na vibrirajućoj mješalici te je u tikvice s termostatiranim sterilnim krumpirovim agarom dodan odgovarajući volumen bojila do postizanja konačne koncentracije bojila u podlozi od 10 mg dm^{-3} do 1500 mg dm^{-3}. Po 20 cm^3 podloge s dodatkom različitih koncentracija bojila razlivene su u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Nakon hlađenja, agarne ploče s dodatkom bojila su nacijepljene micelijskim diskovima (promjera 5 mm) 7 dana starih kultura gljiva te su inkubirane u termostatu pri temperaturi od 27 °C kroz 14 dana. Rast gljiva i promjena boje agarnih ploča praćeni su svaka dva dana, mjerenjem promjera kolonije gljive i promjera zone obezbojenja (promjene intenziteta boje) agarne ploče pomoću digitalnog pomičnog mjerača. Nakon što je micelij gljive prorastao cijelu površinu Petrijeve zdjelice, vizualno je praćeno obezbojenje agarnih ploča koje su čuvane na sobnoj temperaturi do potpunog obezbojenja

3.2.3.4. Biološka obrada obojenog pivskog tropa pomoću T. versicolor u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima

Priprema inokuluma (cjepiva) za fermentaciju na čvrstim nosačima. U 500 cm^3 destilirane vode dodano je 42 g krumpirovog agara, 2 g samljevenog pivskog tropa te 25 mg bojila (metilensko modrilo ili kongo crvenilo, γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}). Podloga je sterilizirana u autoklavu

pri 121 °C kroz 15 min te nakon hlađenja razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon hlađenja, agarne ploče nacijepljene su micelijskim diskovima (5 mm) 7 dana starih kultura gljiva (pripremljenih kako je opisano u poglavlju 3.2.3.1.) te inkubirane u termostatu pri temperaturi od 27 °C tijekom 7 dana. Postupak je ponovljen još dva puta, pri čemu je povećavana koncentracija bojila u hranjivoj podlozi (γ_{bojilo} = 100 mg dm^{-3} i 200 mg dm^{-3}), kako bi se gljiva adaptirala na okruženje s bojilom i pivskim tropom, odnosno kako bi se potakla proizvodnja enzima odgovornih za razgradnju lignoceluloznih materijala i bojila. Agarne ploče s dodatkom bojila u koncentraciji od 200 mg dm^{-3} korištene su za izrezivanje micelijskih diskova koji su zatim korišteni kao inokulum za fermentacije na čvrstim supstratima.

Uzgoj gljive T. versicolor u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Uzgoj gljive *T. versicolor* na obojenom pivskom tropu kao neinertnom nosaču proveden je u staklenkama volumena 750 cm^3. Staklenke s pripadajućim metalnim poklopcima s rupom promjera 3 cm u sredini i zatvorenima čepom od akvarijske vate (kako bi se osigurala aeracija i izmjena plinova tijekom uzgoja), prethodno su izvagane. Uzorci obojenog pivskog tropa pripremljeni su na način da simuliraju uzorak zaostao nakon uklanjanja bojila iz (sintetske) otpadne vode, pri čemu je količina bojila adsorbirana na trop (adsorpcijski kapacitet) iznosila 10 mg g^{-1}. U svaku staklenku odvagano je 20 g pivskog tropa (samljevni klasirani , veličine čestica > 0,1 mm) te je dodano 200 mg bojila otopljeno u odgovarajućem volumenu prethodno pripremljene sintetske otpadne vode (kako je opisano u poglavlju 3.2.2.1.) u omjerima pivski trop: sintetska otpadna voda od 1:1,5 do 1:3,5 kako bi se osigurao udjel vode u supstratu od 55 % do 75 %. Sadržaj staklenki dobro je izmiješan staklenim štapićem te su zatim staklenke zatvorene pripadajućim poklopcima sterilizirane u autoklavu pri 121 °C u trajanju od 15 minuta. Biotičke kontrole pripremljene su na isti način, samo bez dodatka bojila. Nakon sterilizacije staklenke su ohlađene na sobnu temperaturu te je sterilnim načinom rada iz svake staklenke izuzet uzorak za određivanje udjela vlage. Staklenke su zatim inokulirane s po 5 micelijskih diskova (promjera 5 mm) 7 dana stare kulture kako je prethodno opisano u ovom poglavlju, zatvorene pripadajućim poklopcima te izvagane. Na isti način inokulirane su i biotičke kontrole, koje su sadržavale neobojeni pivski trop. Osim biotičkih kontrola, pripremljene su i abiotičke kontrole koje su sadržavale obojeni trop, ali nisu bile inokulirane micelijskim diskovima.
Provedene su dvije serije eksperimenata, pri čemu je vrijeme inkubacije (uzgoja gljive na ovako pripremljenim uzorcima) u termostatu iznosilo 28 dana. Prva serija eksperimenata uključivala je ispitivanje utjecaja udjela vode u uzorcima na gubitak na masi supstrata (izražen na suhu tvar uzorka) i promjenu boje uzoraka. Uzgoj je proveden u termostatu pri 21 °C, pri čemu je sadržaj staklenki dnevno ručno izmiješan (bez otvaranja staklenki). Druga serija eksperimenta uključivala je ispitivanje utjecaja temperature uzgoja te načina uzgoja – sa ili bez miješanja sadržaja staklenki na promjene u masi supstrata i promjenu boje uzoraka. Udjel vode u uzorcima u drugoj seriji eksperimenata iznosio je 75 %, dok su temperature koje su ispitane bile 21 °C i 27 °C. Nakon završenog uzgoja, staklenke su izvagane te je uzet uzorak za određivanje udjela vlage na kraju uzgoja, kako bi se mogao izračunati gubitak na masi supstrata. Sadržaj staklenki je zatim steriliziran kako bi se zaustavio daljnji rast gljive te je osušen na 50 °C kroz 24 sata. U ovako pripremljenim uzorcima određena je promjena udjela pepela te promjena boje uzoraka. Opisani eksperimenti provedeni su u tri ponavljanja te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost.

3.2.3.5. Određivanje promjene boje uzoraka

Mjerenje boje uzoraka provedeno je kromametrijski. Tip kromametra koji je korišten mjeri reflektiranu svjetlost s površine uzorka. Uzorak je postavljen na otvor mjerne glave promjera 8 mm. U otvoru se nalazi ksenonska lučna svjetiljka, koja okomito na površinu uzorka baca pulsirajuću svjetlost. Svjetlost reflektiranu od uzorka mjeri šest osjetljivih silikonskih fotoćelija. Uređaj prikuplja podatke te ih izražava u CIE *L*a*b** sustavu, koji daje vrijednosti slične onima koje pokazuje ljudsko oko. U radu su praćene *L*, *a** i *b** vrijednosti uzoraka prije i nakon 28 dana fermentacije te pripadajućih biotičkih i abiotičkih kontrola.
Na osnovu dobivenih mjerenja pomoću odgovarajućih jednadžbi izračunavaju se ukupna promjena boje (ΔE) i promjena kromatičnosti boje (C^*_{ab}) (suhih) uzoraka nakon fermentacije u odnosu na njihove pripadajuće abiotičke kontrole:

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

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

*L** - vrijednosti koja daju ocjenu je li nešto tamno ili svijetlo; predmet je crn ukoliko je *L**=0, a bijel ukoliko je *L**=100

*a** - vrijednost koja može biti pozitivna ili negativna; ako je pozitivna radi se o crvenoj boji, ako je negativna o zelenoj boji

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

3.2.3.6. Određivanje akutne toksičnosti uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa – određivanje imobilizacije slatkovodnog račića Daphnia magna

Provedeno je ekotoksikološko testiranje odabranih uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa te pripadajućih abiotičkih kontrola s ciljem određivanja akutne toksičnosti na modelni organizam slatkovodni račić *Daphnia magna*. Test uključuje određivanje imobilizacije račića nakon izlaganja uzorku u trajanju od 24 ili 48 sati pri uvjetima preciziranim standardnom metodom HRN EN ISO 6341:2013. Po 2 g uzorka biološki obrađenog pivskog tropa, biotičke i abiotičke kontrole dodano je u Erlenmeyerove tikvice te je izmiješano sa 100 cm^3 destilirane vode. Tikvice su zatim postavljene na tresilicu ($v_{\text{miješenja}}$ = 150 okr min^{-1}) te su miješane kroz 24 h. Nakon toga uzorak je profiltriran i centrifugiran kroz 10 min na 3500 okr min^{-1} (Ruiz-Hidalgo i sur., 2014). Tako dobiveni filtrat dalje je korišten za određivanje akutne toksičnosti na slatkovodni račić *Daphnia magna*. Razrijeđenja za 1 % i 0,5 % otopine su priređene s vodom

za razrijeđenje. Potreban pH za preživljavanje organizama je u rasponu od 6 do 9 , te je stoga bilo potrebno podesiti pH vrijednost 2 %-tne otopine (uzoraka) za testiranje s 1 mol dm^{-3} NaOH.

3.2.4. Obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata korišteni su programi Microsoft Excel 2013 (Microsoft Excel 2013, Redmond, Washington, SAD) te GraphPad Prism ver. 6 za računalni sustav Windows (GraphPad Software, La Jolla, SAD). Korišten je statistički test analize varijance ANOVA ($p < 0,05$) te post-hock Bonferronijev test utvrđivanja razlike između podataka.

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija adsorbensa

Kako bi se dobio uvid u fizikalno-kemijske i morfološke karakteristike pivskog tropa koje utječu na njegovu učinkovitost kao adsorbensa, provedena je karakterizacija primjenom različitih analiza i tehnika: provedene su elementna analiza (CHN analiza) i analiza metala, određeni su udjeli suhe tvari, pepela, ekstraktivnih tvari, lignina, celuloze i proteina, provedena je granulometrijska analiza veličine čestica te su analizirane površinska morfologija i specifične funkcijske skupine pivskog tropa primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM) i infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FT-IR).

Kemijski sastav i karakteristike pivskog tropa prikazane su u **tablici 4.1.1.** Iz tablice je vidljivo kako udjel suhe tvari u tropu pristiglom iz pivovare odmah nakon cijeđenja iznosi 21,9 %. Kako se radi o materijalu podložnom mikrobiološkom kvarenju, a visok udjel vode pogoduje proliferaciji mikroorganizama, za potrebe daljnjih eksperimenata pivski trop je bilo potrebno osušiti do udjela suhe tvari koja ne pogoduje rastu mikroorganizama od 6,8 %. Sušenju pivskog tropa prethodilo je ispiranje vrućom destiliranom vodom do neutralne reakcije (pH = 7). Osim visokog udjela vode, proliferaciji mikroorganizma (poglavito gljiva) pogoduje i blago kiseli pH pivskog tropa pristiglog iz pivovare. Tijekom ukomljavanja slada, pH se obično održava između 5,2 i 5,6 te se korekcije pH provode dodavanjem, primjerice, 80 % otopine mliječne kiseline. Posljedično, pH tropa pristiglog iz pivovare iznosio je 5,9. Prethodna istraživanja pivskog tropa kao adsorbensa za uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila (Kezerle i sur., 2018) pokazala su kako dodatak osušenog neispranog pivskog tropa u vodenu otopinu bojila dovodi do značajnog smanjenja pH vrijednosti otopine, zbog čega je za potrebe daljnjih istraživanja provedeno ispiranje pivskog tropa. Osim korekcije pH vrijednosti tropa, ispiranjem je uklonjen i velik dio zaostalih šećera i drugih spojeva koji se ekstrahiraju tijekom procesa ukomljavanja te različitih nečistoća.

Nakon ispiranja i sušenja pivskog tropa, provedena je kemijska analiza njegova sastava.

Elementna analiza pivskog tropa pokazala je kako udjeli elemenata rastu u nizu C (48,5 %) > H (7,3 %) > N (5,7 %). Nadalje, analiza metala pokazala je kako su dominantni metali prisutnu u pivskom tropu željezo, cink, mangan i bakar (od 25,4 mg kg^{-1} do 188,5 mg kg^{-1}), pri čemu njihove koncentracije rastu u nizu Fe > Zn > Mn > Cu. Koncentracije ostalih metala su značajno manje (od 0,03 mg kg^{-1} do 3,6 mg kg^{-1}) te rastu u nizu kako slijedi: Cr > Ni > Hg > Pb > Cd > As. Podrijetlo tih metala u pivskom tropu može biti iz zemljišta, ali i opreme i kemikalija koje su korištene tijekom procesa proizvodnje slada i sladovine.

Pepeo je anorganski ostatak koji zaostaje nakon uklanjanja organske tvari i vode te predstavlja mjerilo ukupnog udjela mineralnih tvari u uzorku. Udjel pepela u pivskom tropu iznosi 3,1 %. Udjel ekstraktivnih tvari, koje uključuju različite lipofilne i hidrofilne spojeve, iznosi 10,27 %.

Ukupni udjel lignoceluloznih polimera lignina i celuloze, bogatih funkcijskih skupinama poput –OH i –COOH koje sudjeluju u procesu adsorpcije, iznosi 41,35 % suhe tvari pivskog tropa. Pri tome udjel ukupnog lignina iznosi 21,02 %, od čega Klason-ov lignin iznosi 11,3 %, a lignin topljiv u kiselini 9,7%. Udjel celuloze iznosi 20,33 %. Osim lignina i celuloze, velik dio suhe tvari tropa čine i proteini s udjelom 19,8 %.

Tablica 4.1.1. Kemijski sastav i karakteristike pivskog tropa

Pivski trop prije pripreme (ispiranje i sušenje)	**Vrijednost ± SD**
Suha tvar / %	21,9 ± 0,22
pH	5,9 ± 0,02
Pivski trop nakon pripreme	
Suha tvar / %	93,2 ± 0,24
Elementna analiza / % s.t.	
C	48,5 ± 0,51
H	7,3 ± 0,18
N	5,7 ± 0,14
Metali / mg kg^{-1}	
Fe	188,5 ± 2,67
Zn	70,8 ± 0,88
Mn	42,0 ± 0,25
Cu	25,4 ± 0,22
Cr	3,6 ± 0,03
Ni	2,69 ± 0,04
Hg	2,0 ± 0,01
Pb	1,38 ± 0,03
Cd	0,03 ± 0,001
As	< 1
Pepeo / % s.t.	3,1 ± 0,11
Ekstraktivne tvari* / % s.t.	10,27 ± 0,13
Celuloza / % s.t.	20,33 ± 0,58
Ukupni lignin / % s.t.	21,02
Klason lignin	11,3 ± 2,1
Lignin topljiv u kiselini	9,7 ± 1,54
Proteini / % s.t.	19,8 ± 0,9

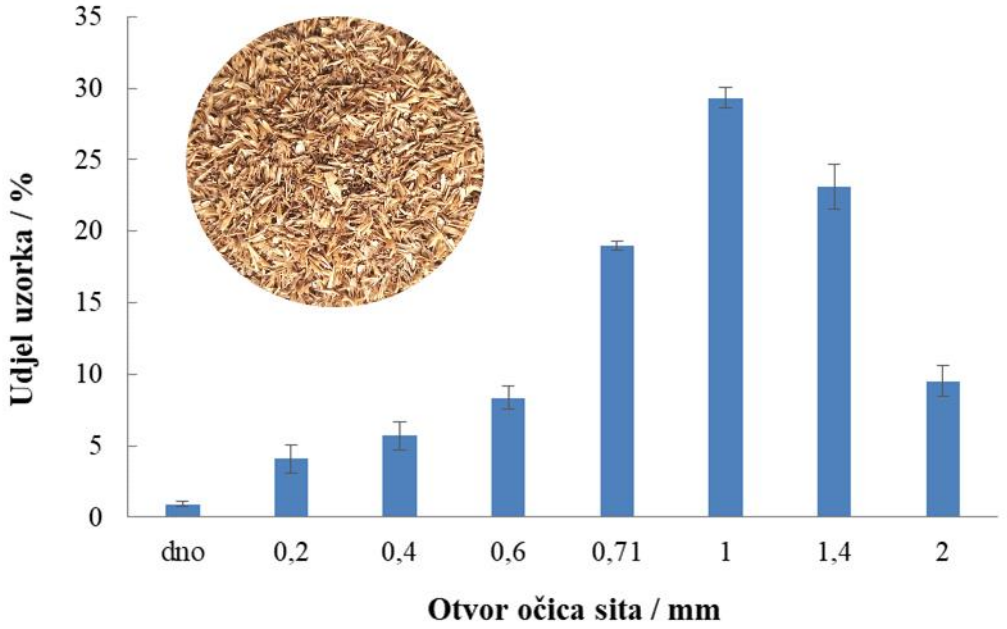
*etanol:benzen = 1:1

Nakon pripreme pivskog tropa ispiranjem i sušenjem, provedena je analiza veličine čestica. Granulometrijska (sitena) analiza je najbrža i najpogodnija metoda za odjeljivanje čestica (veličine do 10 mm) unutar uskih granica. Pivski trop je zatim usitnjen mljevenjem pomoću laboratorijskog mlina korištenjem sita promjera 1 mm te je ponovo provedena analiza veličine čestica. Rezultati analize veličine čestica i izgled ispranog i osušenog nesamljevenog pivskog tropa, kao i usitnjenog pivskog tropa prikazani su na **slici 4.1.2.** Iz rezultata prikazanih na **slici 4.1.2. A** vidljivo je kako se veličina čestica nesamljevenog pivskog tropa kreće u rasponu od 0,2 mm do 2 mm, dok je udjel čestica manjih od 0,2 mm zanemariv (0,91 %). Suma udjela svih čestica manjih od 1 mm iznosi 38,05 %, dok suma udjela čestica većih od 1 mm iznosi 61,94 %. Analiza čestica samljevenog pivskog tropa (**slika 4.1.2. B**) pokazala je kako se veličina čestica kreće u rasponu od < 0,053 mm do 0,6 mm. 68,10 % čestica kreće se u rasponu od 0,1 mm do

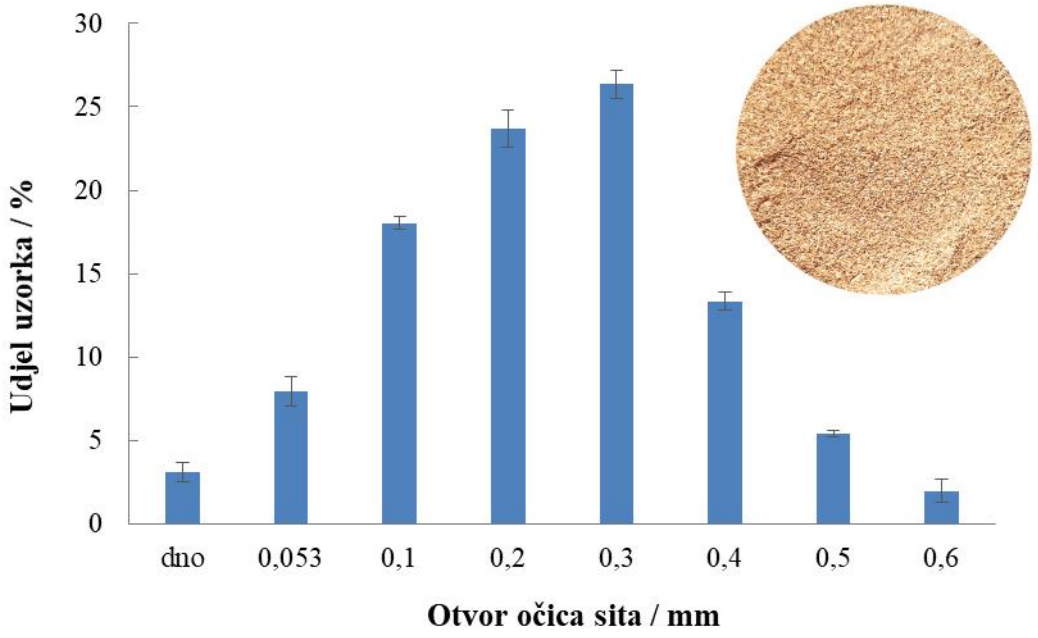
0,4 mm. Udjel čestica manjih od 0,1 mm iznosi 11,03 %, dok udjel čestica raspona od 0,4 mm do 0,6 mm iznosi 20,74 %.

Daljnja karakterizacija pivskog tropa provedena je promatranjem samljevenog pivskog tropa pod svjetlosnim mikroskopom te je izgled pivskog tropa pri povećanju 5× prikazan na **slici 4.1.1.** Iz slike **4.1.1.** je vidljivo kako se radi o relativno heterogenom materijalu, različitih oblika i veličina čestica, čime su dodatno potvrđeni rezultati dobiveni granulometrijskom analizom.

Slika 4.1.1. Izgled samljevenog pivskog tropa pri povećanju 5×, snimljeno svjetlosnim mikroskopom.



A

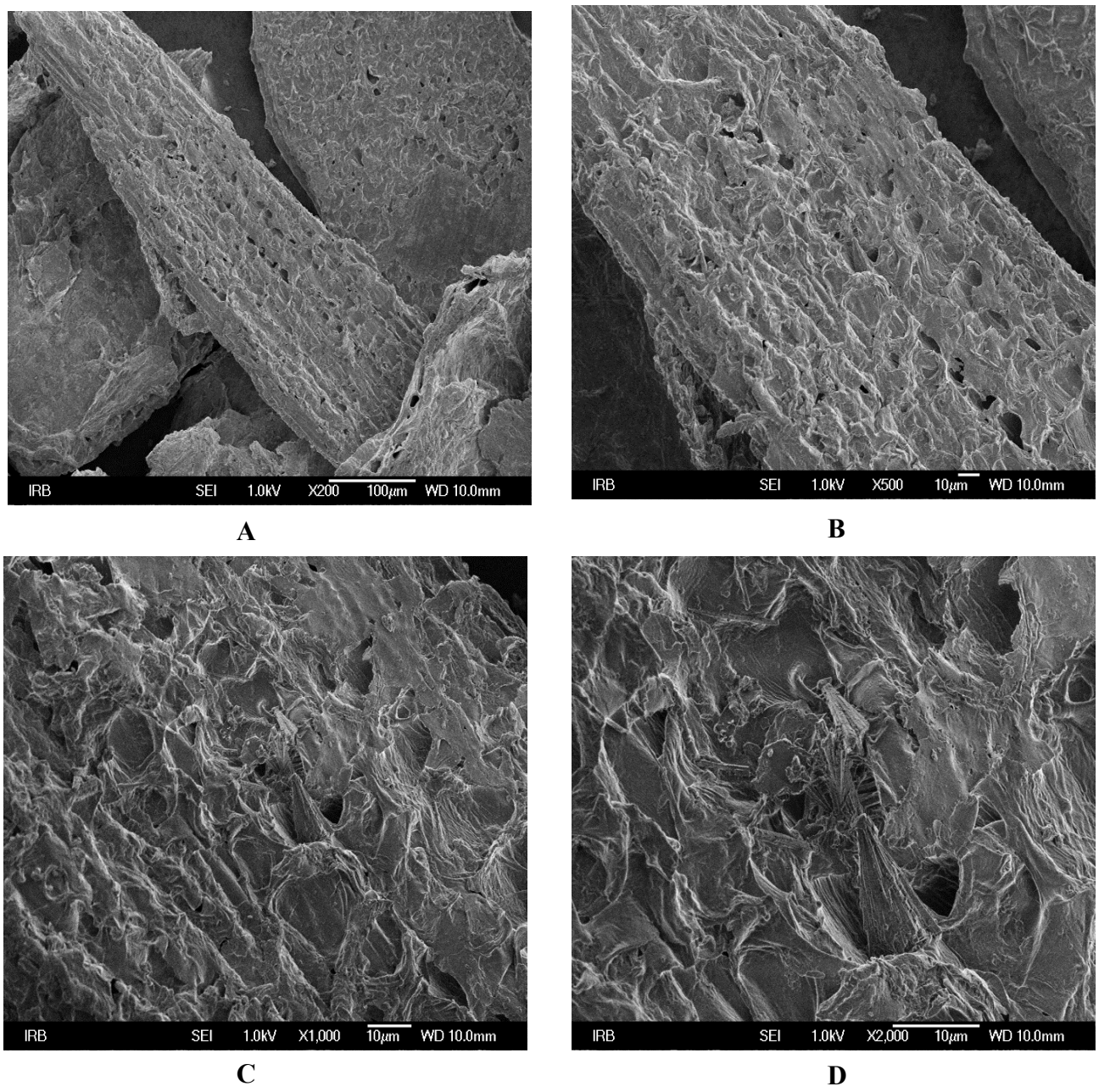


B

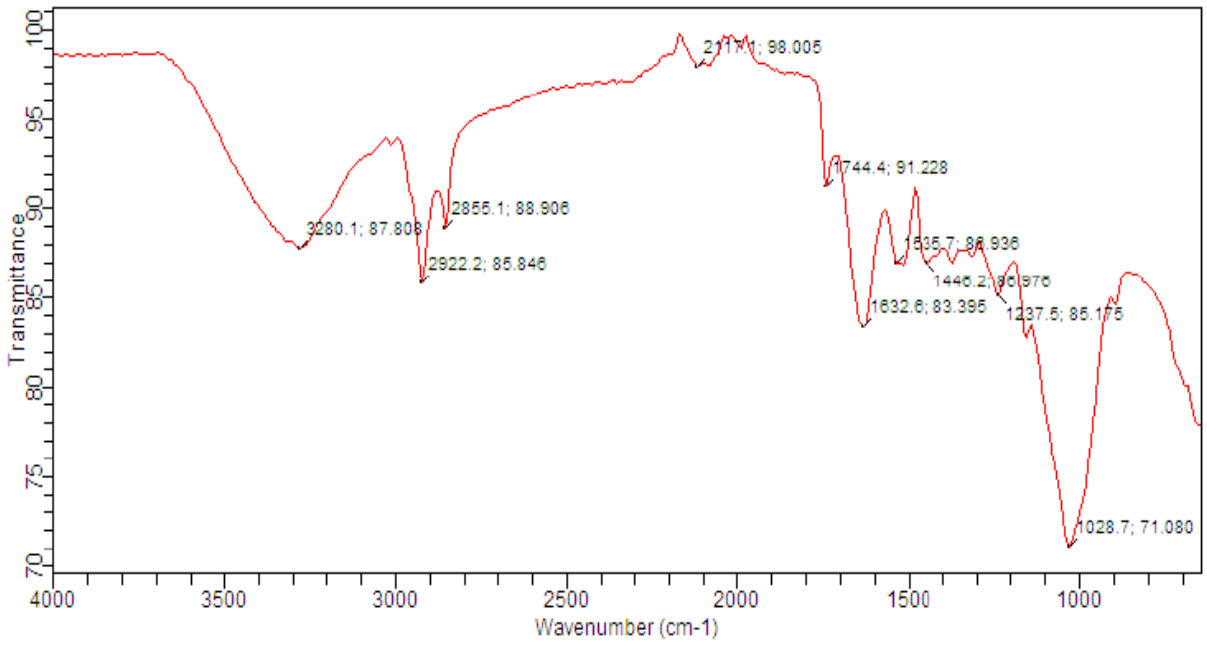
Slika 4.1.2. Analiza veličine čestica (granulometrijska analiza) te makroskopski izgled nesamljevenog (A) i samljevenog (B) pivskog tropa – grafički prikaz raspodjele veličina čestica.

Površinska morfologija i strukturne značajke samljevenog pivskog tropa analizirani su i primjenom pretražne elektronske mikroskopije. SEM mikrografije pivskog tropa snimljene pri različitim povećanjima prikazane su na **slici 4.1.3.** Iz slike je vidljivo kako se radi o materijalu čija je površina gruba, neravna i nabrana te su vidljive pore različitih veličina.

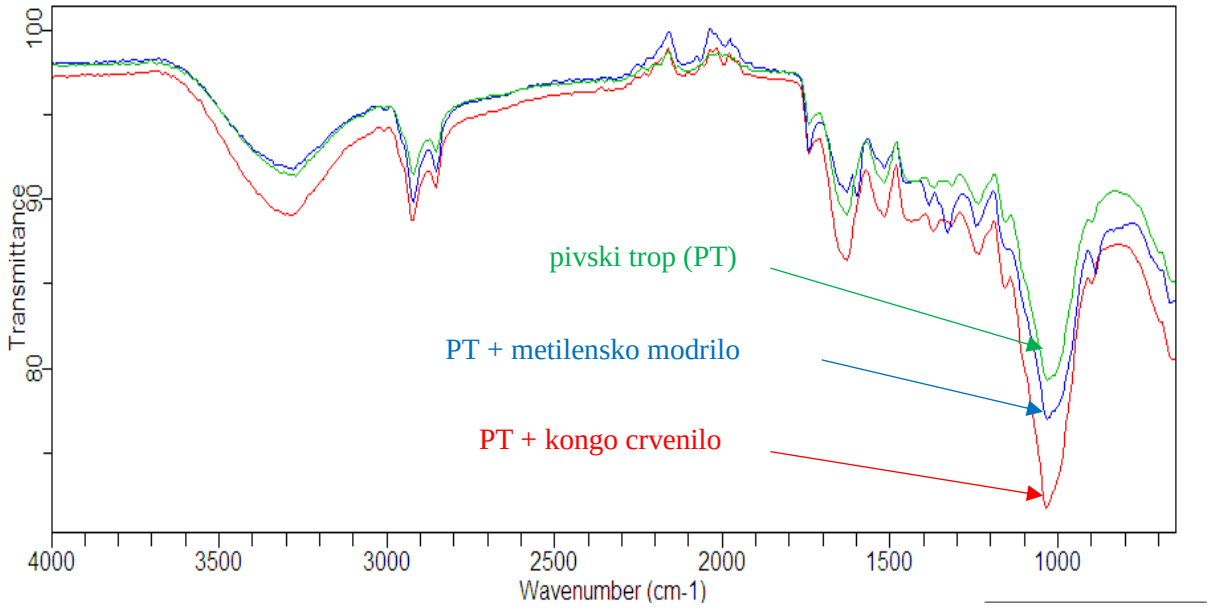
Specifične funkcijske skupine na površini pivskog tropa određene su primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom. FT-IR spektri pivskog tropa prije i nakon adsorpcije bojila prikazani su na **slici 4.1.4.** Na svim spektrima (**4.1.4. A** i **B**) uočljiva je dominantna i vrlo široka vrpca pri 3280 cm^{-1} koja se pripisuje hidroksilnim skupinama (-OH), odnosno vibracijama istezanja O-H veze uslijed inter- i intramolekularnog stvaranja vodikovih veza unutar polimernih molekula, kao što su celuloza i lignin. Te vibracije ukazuju na prisustvo hidroksilnih skupina na površini adsorbensa. Široka vrpca s dva maksimuma na 2922 cm^{-1} i 2855 cm^{-1} može se pripisati vibracijama istezanja alifatskih (-CH) skupina ugljikovodičnih lanaca. Vrpca s maksimumom na 1744 cm^{-1} pripisuje se karbonilnim skupinama karboksilnih kiselina i/ili estera u strukturi hemiceluloze. U području od 1000 cm^{-1} do 1500 cm^{-1} dominantna je vrpca pri 1028 cm^{-1} koja se vjerojatno može pripisati polisaharidima, odnosno javlja se kao posljedica C–O, C=C i C–C–O istezanja u celulozi, ligninu i hemicelulozi. Nadalje, vrpca pri 1632 cm^{-1} pripisuje se karbonilnim vibracijama istezanja (C=O) u karboksilnim skupinama pektina i hemiceluloze, dok se vrpca pri 1535 cm^{-1} pripisuje vibracijama istezanja aromatskog ligninskog prstena. Vrpca koja se javlja pri 1237 cm^{-1} predstavlja istezanje C–O veza u ligninu. Na osnovu preklopljenih FT-IR spektara pivskog tropa i obojenog pivskog tropa zaostalog nakon adsorpcije bojila (**sl. 4.1.4. B**), vidljivo je kako je došlo do blagog pomicanja vrpci te povećanja (ili smanjenja) intenziteta vrpci spektara obojenog pivskog tropa u odnosu na neobojeni pivski trop, vjerojatno kao posljedica adsorpcije bojila.



Slika 4.1.3. SEM mikrografije samljevenog pivskog tropa snimljene pri različitim povećanjima: (A) 200 ×, (B) 500 ×, (C) 1000 × i (D) 2000 ×



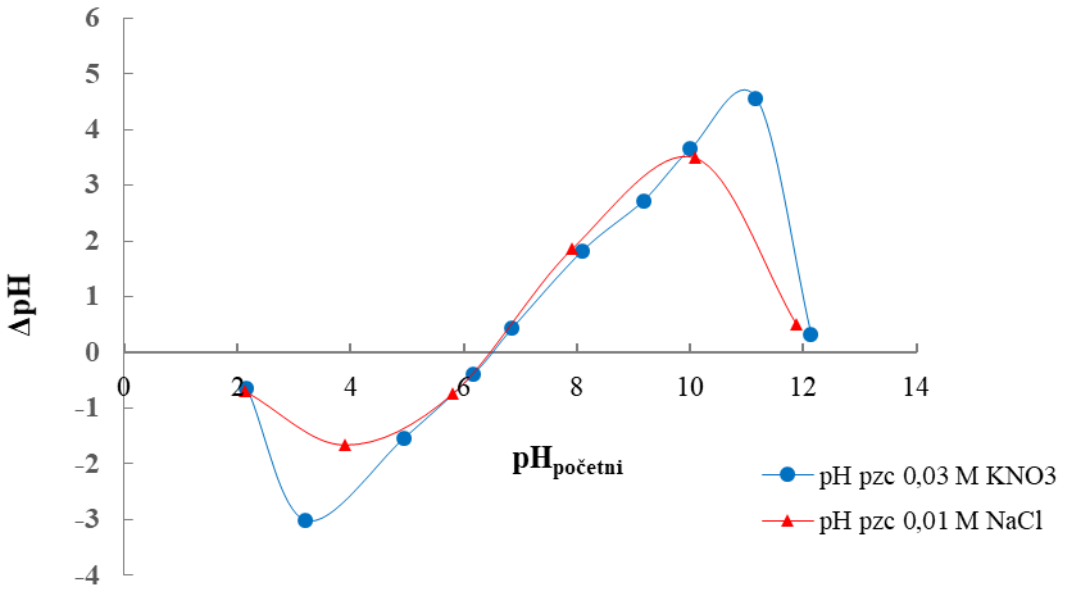
A



B

Slika 4.1.4. FT-IR spektar pivskog tropa s istaknutim vrijednostima za karakteristične funkcijske skupine (A) te preklopljeni FT-IR spektri pivskog tropa i obojenog pivskog tropa zaostalog nakon adsorpcije bojila (B) (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} (MM) i 10 g dm^{-3} (KC), t = 240 min (MM) i 300 min (KC); θ = 25 °C; pH = 6,8; v = 150 okr/min)

Točka nul naboja adsorbensa (pH_{pzc}) odgovara pH pri kojem je površinska gustoća naboja jednaka nuli. Rezultati određivanja točke nul naboja pivskog tropa prikazani su na **slici 4.1.5.**, pri čemu točka nul naboja pivskog tropa odgovara pH vrijednosti od 6,5.



Slika 4.1.5. Točka nul naboja pivskog tropa.

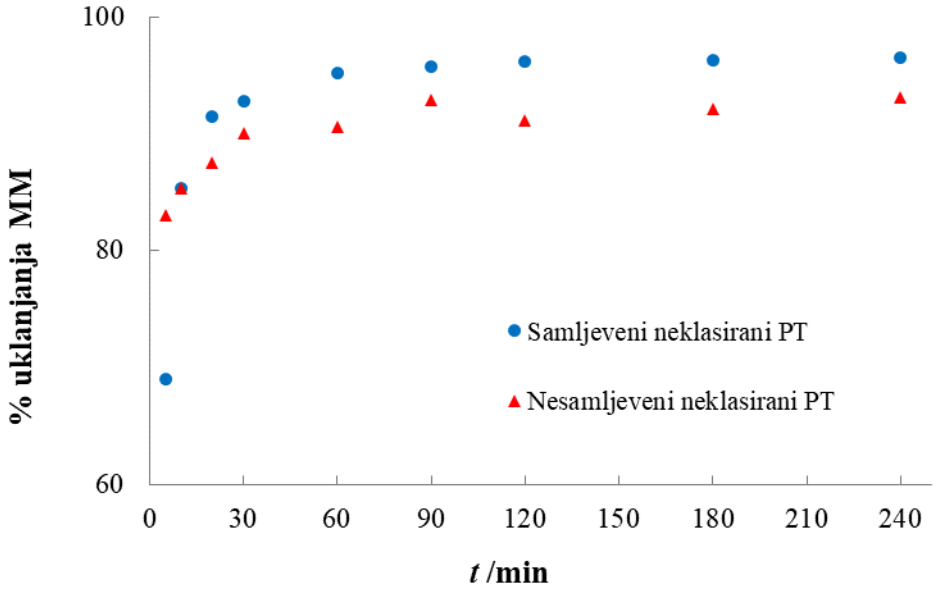
4.2. Adsorpcija metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina na pivski trop

4.2.1. Utjecaj veličine čestica adsorbensa na proces adsorpcije

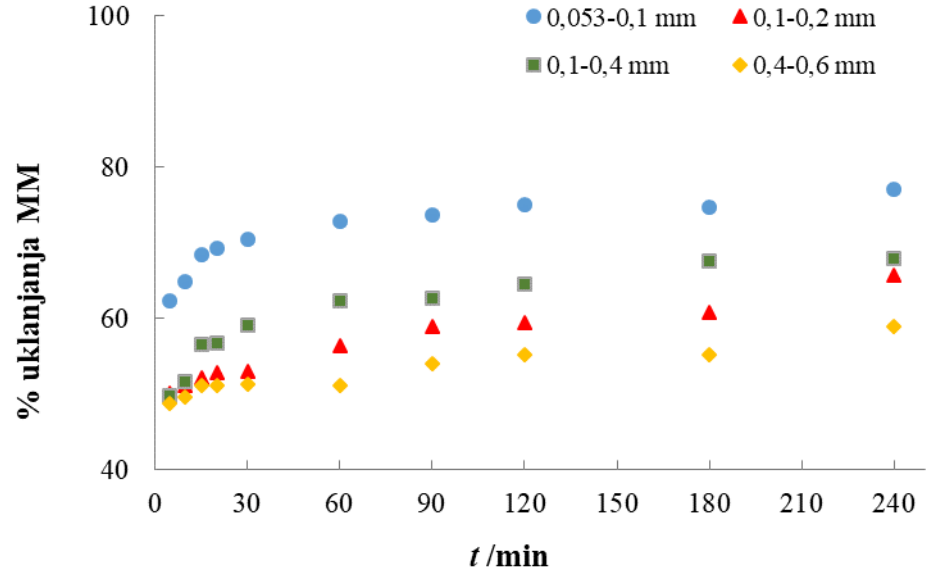
Kako bi se ispitao utjecaj veličine čestica adsorbensa na adsorpciju metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop, kao i primjenjivost nesamljevenog pivskog tropa u obliku u kojem on dolazi iz proizvodnog procesa, provedeni su šaržni adsorpcijski eksperimenti korištenjem neklasiranog nesamljevenog i samljevenog tropa (**slike 4.2.1.1.A** i **4.2.1.2.A**) te četiri klase čestica samljevenog te klasiranog pivskog tropa: 0,053 mm - 0,1 mm; 0,1mm - 0,2 mm; 0,100 mm - 0,4 mm i 0,4mm - 0,6 mm (**slike 4.2.1.1.B** i **4.2.1.2.B**).

Iz rezultata prikazanih na **slici 4.2.1.1.A** vidljivo je kako je, neovisno o tome je li korišten nesamljeveni ili samljeveni pivski trop, postignut velik postotak uklanjanja metilenskog modrila od preko 90 %. Ipak, koncentracija adsorbensa od 10 g dm^{-3} odabrana na osnovu preliminarnih istraživanja (Kezerle i sur., 2018) rezultirala je malim adsorpcijskim kapacitetom. Stoga je za ispitivanja u kojima su korištene različite klase čestica samljevenog klasiranog tropa primijenjena koncentracija adsorbensa od 1 g dm^{-3}. Iz rezultata je vidljivo (**slika 4.2.1.1.B**) kako postotak uklanjanja metilenskog modrila u ovisnosti o veličini čestica adsorbensa raste u nizu 0,053 mm - 0,1 mm > 0,1 mm - 0,4 mm > 0,1 mm - 0,2 mm > 0,4 mm - 0,6 mm. Kako je iz analize čestica samljevenog tropa (**slika 4.1.2.**) vidljivo da se više od 60 % čestica kreće u rasponu od 0,1 mm do 0,4 mm (udjel čestica veličine 0,053 mm < 10 %), korištenje ove klase čestica u daljnjim eksperimentima opravdano je kako zbog velikog postotka uklanjanja metilenskog modrila, tako i radi ekonomičnosti.

Za razliku od uklanjanja metilenskog modrila, uklanjanje kongo crvenila primjenom samljevenog neklasiranog pivskog tropa rezultiralo je značajno većim postotkom uklanjanja (65 %) u odnosu na onaj postignut primjenom nesamljevenog tropa (45,9 %) (**slika 4.2.1.2.A**). Primjenom različitih klasa čestica samljevenog klasiranog tropa (**slika 4.2.1.2.B**) postotak uklanjanja kongo crvenila raste u nizu 0,053 mm - 0,1 mm > 0,1 mm - 0,2 mm > 0,1 mm - 0,4 mm > 0,4 mm - 0,6 mm, pri čemu je razlika između klasa čestica 0,1mm - 0,2 mm i 0,1 mm - 0,4 mm vrlo mala te je i u tom slučaju opravdano korištenje te klase čestica u daljnjim eksperimentima.

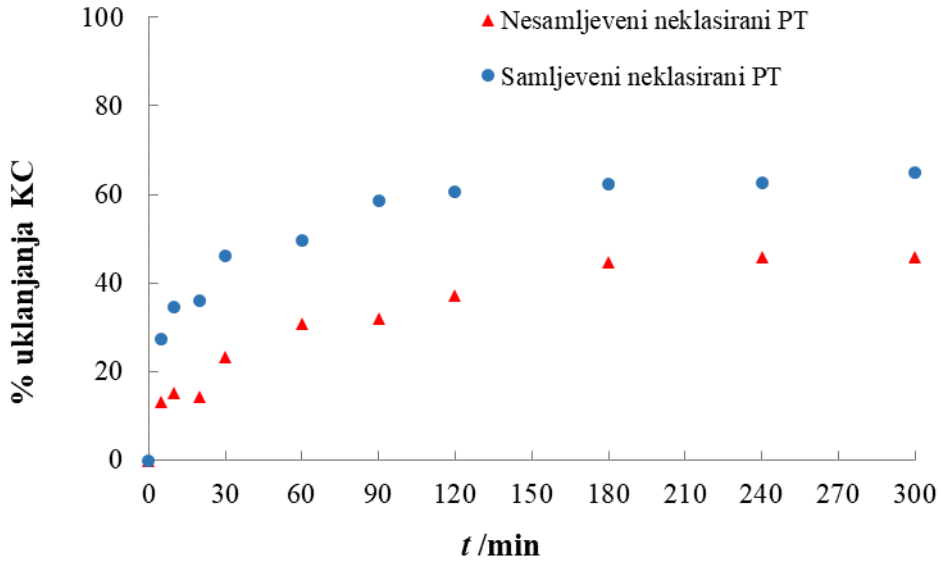


A

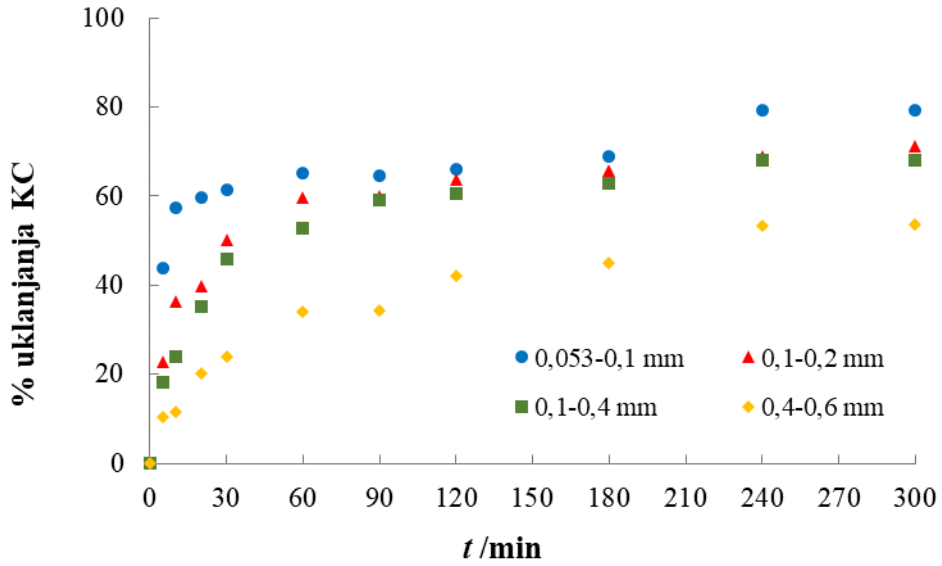


B

Slika 4.2.1.1. Utjecaj veličine čestica adsorbensa na adsorpciju metilenskog modrila (MM) na pivski trop: A) neklasirani pivski trop – nesamljeveni i samljeveni; B) različite klase čestica samljevenog pivskog tropa (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3} (A), 1 g dm^{-3} (B); t = 240 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})



A



B

Slika 4.2.1.2. Utjecaj veličine čestica adsorbensa na adsorpciju kongo crvenila (KC) na pivski trop: A) neklasirani pivski trop – nesamljeveni i samljeveni; B) različite klase čestica samljevenog pivskog tropa (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3}; t = 300 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

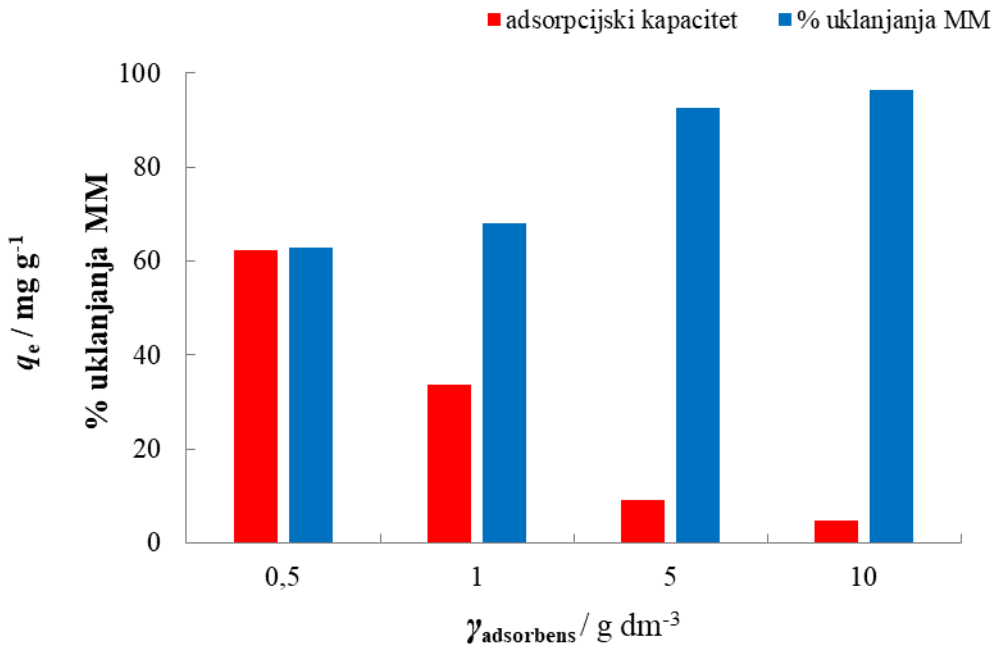
4.2.2. Utjecaj koncentracije adsorbensa na proces adsorpcije

Koncentracija adsorbensa važan je parametar koji utječe na proces adsorpcije i koji definira adsorpcijski kapacitet adsorbensa pri odabranoj početnoj koncentraciji adsorbata (Bulut i Aydun, 2006). Kako bi se odredila optimalna koncentracija adsorbensa koja će se koristiti u daljnjim eksperimentima (i sa stajališta adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja bojila), provedeni su šaržni adsorpcijski eksperimenti na način da su dodavane različite mase adsorbensa (0,05 g - 1 g za metilensko modrilo, te 0,5 g - 1,25 g za kongo crvenilo) određenom volumenu otopine bojila ($V_{\text{otopine bojila}}$ = 100 cm^3) koncentracije 50 mg dm^{-3}, pri čemu su ostali parametri bili: pH = 6,8; t = 240 min; θ = 25 °C; $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}. Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 4.2.2.1.**

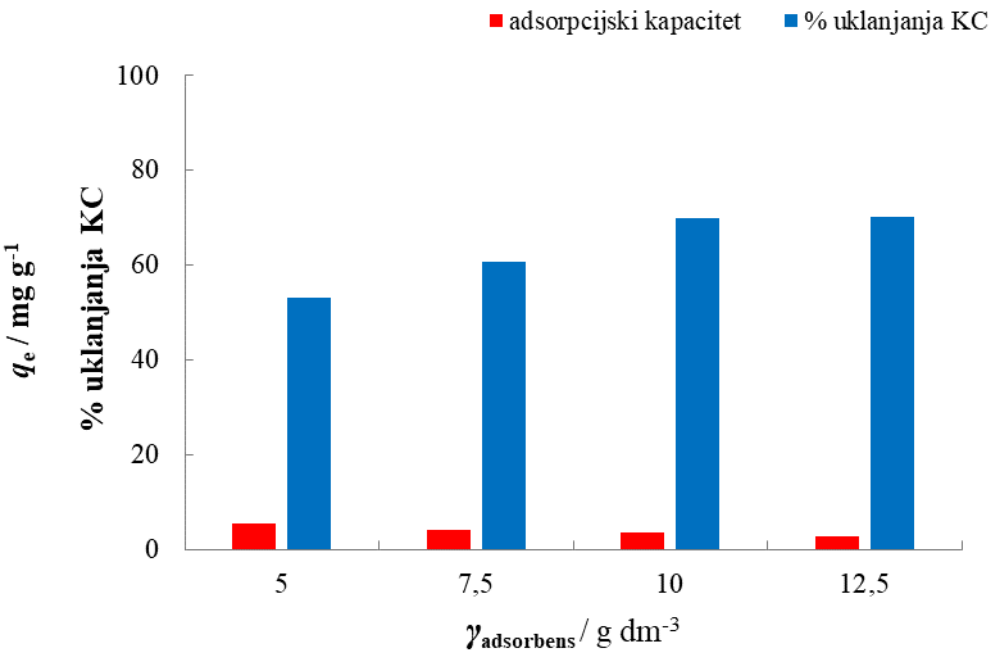
Iz slike je vidljivo kako je i u slučaju metilenskog modrila (**4.2.2.1.A**) i u slučaju kongo crvenila (**4.2.2.1.B**) povećanje koncentracije adsorbensa rezultiralo smanjenjem adsorpcijskog kapaciteta, ali i istovremenim povećanjem postotka uklanjanja bojila. Najveći adsorpcijski kapacitet za metilensko modrilo iznosio je 62,42 mg g^{-1} za najmanju primijenjenu koncentraciju adsorbensa od 0,5 g dm^{-3}, dok je najmanji iznosio 4,81 mg g^{-1} za najveću koncentraciju adsorbensa od 10 g dm^{-3}. Najveći i najmanji adsorpcijski kapacitet za kongo crvenilo iznosili su 5,32 mg g^{-1} i 2,78 mg g^{-1}, pri čemu su koncentracije adsorbensa iznosile 5 g dm^{-3} i 12,5 g dm^{-3}.

Usporedbom postotka uklanjanja bojila vidljivo je kako je za postizanje postotka uklanjanja od 60 % za metilensko modrilo bilo potrebno primijeniti najmanju ispitanu koncentraciju adsorbensa, dok je za postizanje jednakog postotka uklanjanja kongo crvenila bilo potrebno primijeniti 15 puta veću koncentraciju adsorbensa, odnosno 7,5 g dm^{-3}. Nadalje, usporedbom adsorpcijskih kapaciteta i postotka uklanjanja metilenskog modrila i kongo crvenila za iste primijenjene koncentracije adsorbensa od 5 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3} može se vidjeti kako su postotci uklanjanja i adsorpcijski kapaciteti za metilensko modrilo veći u odnosu na kongo crvenilo.

Prilikom odabira optimalne koncentracije adsorbensa za nastavak istraživanja razmatrani su i adsorpcijski kapaciteti i postotak uklanjanja bojila koji su postignuti primjenom određene koncentracije adsorbensa. Tako je za nastavak istraživanja adsorpcije metilenskog modrila za pivski trop odabrana koncentracija adsorbensa od 1 g dm^{-3}, dok je za istraživanja adsorpcije kongo crvenila odabrana koncentracija adsorbensa od 10 g dm^{-3}.



A



B

Slika 4.2.2.1. Utjecaj koncentracije adsorbensa na adsorpciju metilenskog modrila (A) i kongo crvenila (B) na pivski trop (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; t = 240 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.2.3. Utjecaj vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila na proces adsorpcije

Vrijeme adsorpcije i početna koncentracija bojila važni su čimbenici koji utječu na adsorpcijski kapacitet nekog adsorbensa. Ispitivanje utjecaja vremena adsorpcije bojila na proces adsorpcije provedeno je za masenu koncentraciju bojila od 50 mg dm^{-3} u vremenskim intervalima od t = 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 240, 300 i 1440 minuta. Ispitivanje utjecaja početne koncentracije bojila provedeno je pri početnim masenim koncentracijama bojila od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} te gore navedenim vremenskim intervalima od 5 do 240, odnosno 300 min. Ostali eksperimentalni uvjeti bili su kako slijedi: θ = 25 °C, $\nu_{\text{mijeđanja}}$ = 150 okr min^{-1}, $\gamma_{\text{adsorbens}}$= 1 g dm^{-3} za uklanjanje metilenskog modrila te $\gamma_{\text{adsorbens}}$= 10 g dm^{-3} za uklanjanje kongo crvenila. Rezultati ispitivanja prikazani su na **slikama 4.2.3.1.** i **4.2.3.2.**

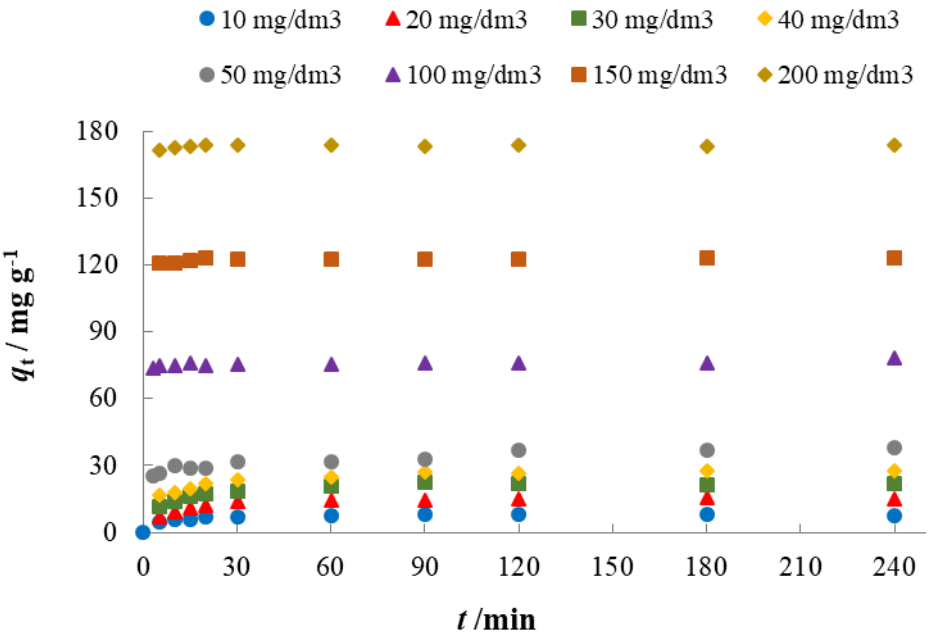
Iz **slike 4.2.3.1.A** vidljivo je kako je do postizanja ravnotežnog stanja prilikom uklanjanja metilenskog modrila iz vodene otopine masene koncentracije 50 mg dm^{-3} došlo nakon 120 min. Daljnjim provođenjem adsorpcije do vremena od 1440 min (odnosno 24 h) nije došlo do značajne promjene u postotku uklanjanja metilenskog modrila te je on iznosio 74 %. Na osnovu dobivenih rezultata za nastavak istraživanja odabrano je vrijeme adsorpcije od 240 min.

Za postizanje ravnotežnog stanja prilikom uklanjanja kongo crvenila iz vodene otopine masene koncentracije 50 mg dm^{-3} (**slika 4.2.3.2.A**) bilo je potrebno 240 min. Kao i u slučaju metilenskog modrila, nakon 1440 min provođenja eksperimenta nije došlo do značajnog povećanja niti smanjenja postotka uklanjanja kongo crvenila te je on iznosio 69,33 %. Za nastavak istraživanja odabrano je vrijeme adsorpcije od 300 min.

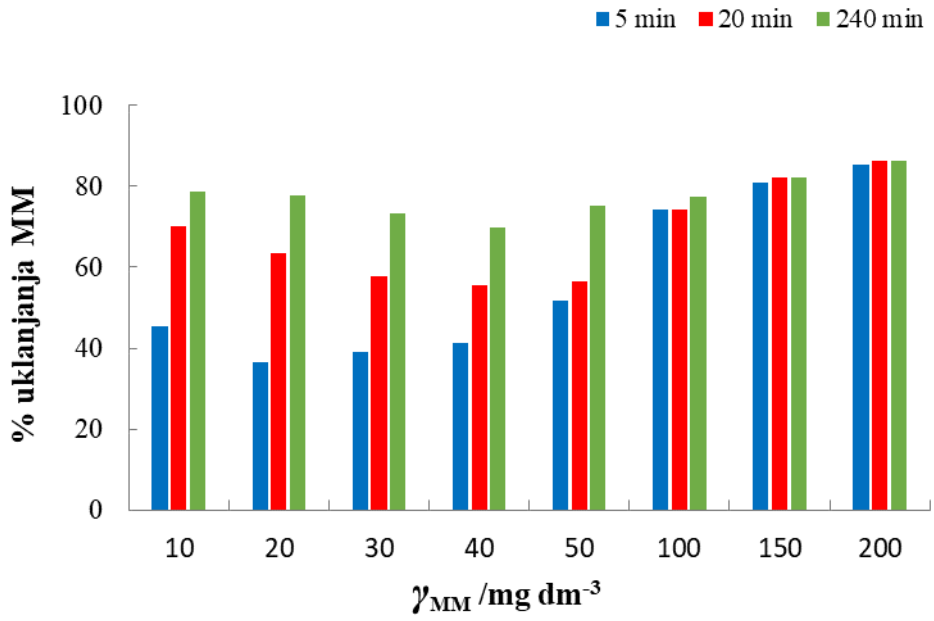
Utjecaj početne koncentracije metilenskog modrila na adsorpcijski kapacitet vidljiv je iz **slike 4.2.3.1.A.** Povećanjem početne koncentracije bojila od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3}, adsorpcijski kapacitet povećava se od 7,79 mg g^{-1} do 173,45 mg g^{-1}. Za razliku od adsorpcijskog kapaciteta koji kontinuirano raste s povećanjem koncentracije bojila, postotak uklanjanja bojila pokazuje drugačiji trend (**slika 4.2.3.1.B**). U koncentracijskom području od 10 mg dm^{-3} do 40 mg dm^{-3}, postotak uklanjanja bojila se smanjuje od 78,55 % do 69,69 % s povećanjem koncentracije bojila. U koncentracijskom području od 50 mg dm^{-3} do 200 mg dm^3 dolazi do povećanja postotka uklanjanja bojila od 75,25 % do 86,38 % s povećanjem koncentracije bojila. Uklanjanje metilenskog modrila karakterizirano je brzim uklanjanjem bojila tijekom prvih 20 min adsorpcije, što je vidljivo iz velikog postotka uklanjanja (od 70,10 % do 86,38 %) pri 20 min za sve ispitane koncentracije bojila (**slika 4.2.3.1.B**). Nakon intenzivnog uklanjanja bojila u početnoj fazi eksperimenta, postotak uklanjanja i dalje raste do uspostavljanja ravnoteže, ali značajno sporije. Pri velikim koncentracijama metilenskog modrila od 150 mg dm^{-3} i 200 mg dm^{-3} ravnotežno stanje postignuto je već nakon 20 min eksperimenta što je vidljivo iz ovisnosti količine uklonjenog metilenskog modrila (q_t) o vremenu prikazane na **slici 4.2.3.1.A**, kao i iz velikog postotka uklanjanja bojila postignutog nakon 20 min koji je gotovo identičan onome postignutom nakon 240 min adsorpcije (**slika 4.2.3.1.B**).

Slika **4.2.3.2.A.** prikazuje utjecaj početne koncentracije kongo crvenila na adsorpcijski kapacitet. Kao i u slučaju metilenskog modrila, povećanje početne koncentracije bojila od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} rezultiralo je povećanjem adsorpcijskog kapaciteta od 0,34 mg g^{-1}

do 11,10 mg g^{-1}, pri čemu postotak uklanjanja bojila pokazuje drugačiji trend (**slika 4.2.3.1.B**). U koncentracijskom području od 10 mg dm^{-3} do 40 mg dm^{-3}, postotak uklanjanja bojila nakon 300 min povećava se s povećanjem koncentracije bojila od 34,95 % do 73,30 %, dok u koncentracijskom području od 50 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} dolazi do smanjenja postotka uklanjanja bojila (od 68,20 % do 54,13 %) s povećanjem koncentracije bojila. Uklanjanje kongo crvenila također je karakterizirano brzim uklanjanjem bojila tijekom prvih 20 min adsorpcije, što je vidljivo iz postotka uklanjanja (od 22,45 % do 43,5 %) pri 20 min za sve ispitane koncentracije bojila (**slika 4.2.3.1.B**). U prvih 5 min eksperimenta postotak uklanjanja bojila raste s povećanjem koncentracije bojila, dok se u nastavku eksperimenta taj trend mijenja kako je već navedeno. Nakon intenzivnog uklanjanja bojila u početnoj fazi eksperimenta, postotak uklanjanja dalje raste do uspostavljanja ravnoteže, ali sporije nego u prvih 20 min eksperimenta.

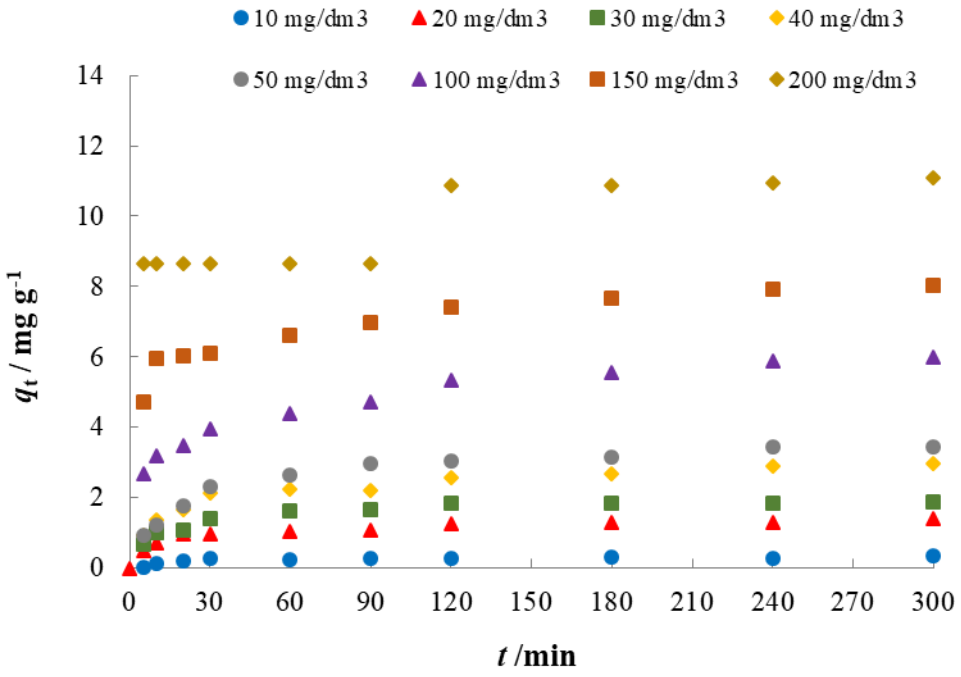


A

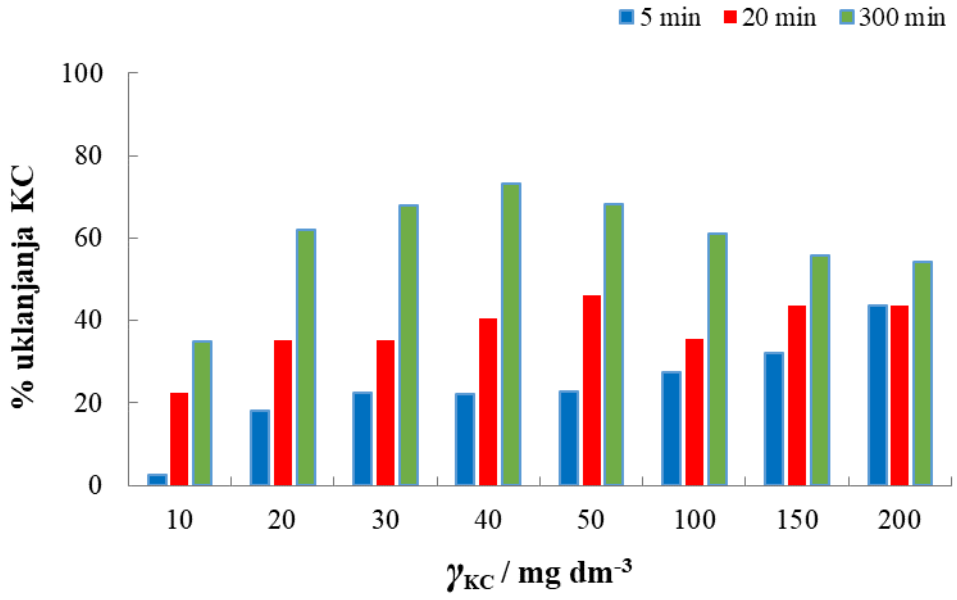


B

Slika 4.2.3.1. Utjecaj vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila na adsorpciju metilenskog modrila (MM) na pivski trop: (A) utjecaj na količinu adsorbiranog bojila (q_t) (B) utjecaj na postotak uklanjanja bojila ($\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3}; t = 240 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})



A



B

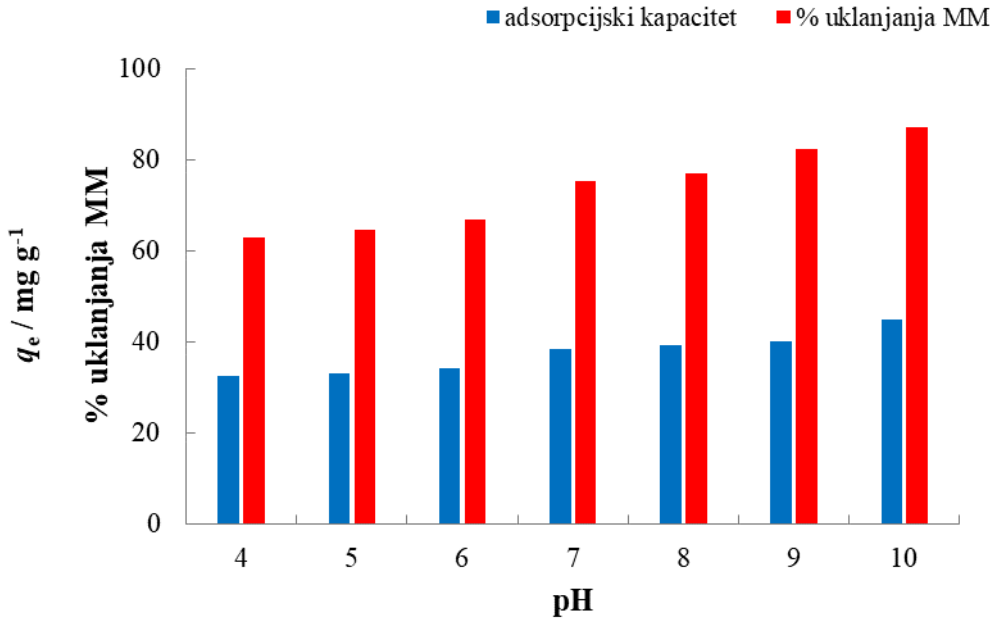
Slika 4.2.3.2. Utjecaj vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila na adsorpciju kongo crvenila (KC) na pivski trop: (A) utjecaj na količinu adsorbiranog bojila (q_t) (B) utjecaj na postotak uklanjanja bojila ($\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3}; t = 300 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.2.4. Utjecaj pH na proces adsorpcije

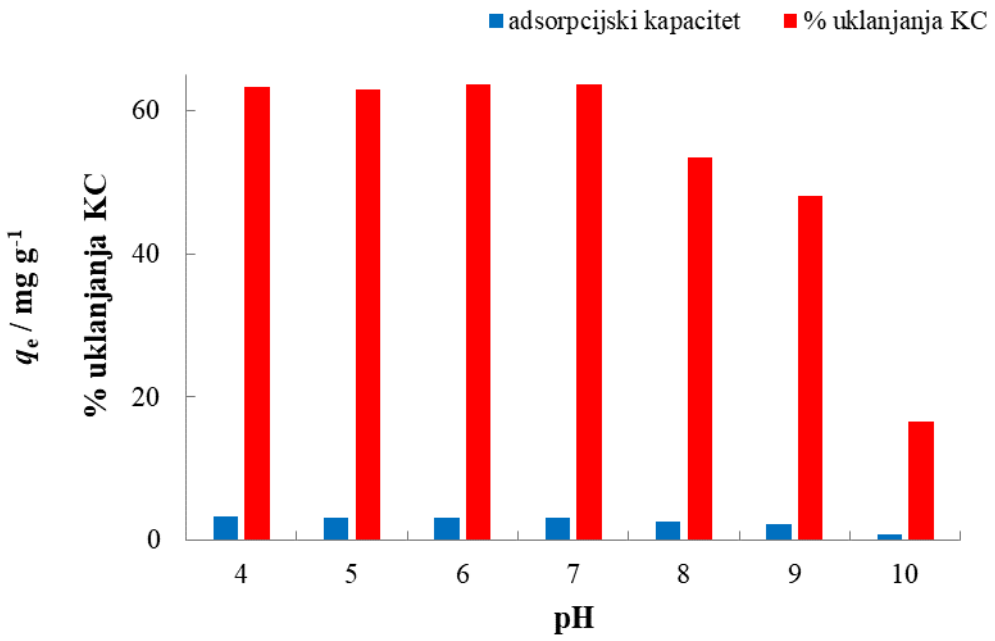
pH je važan čimbenik koji utječe na uklanjanje različitih onečišćujućih tvari iz otpadnih voda (Baek i sur., 2010). Utjecaj pH otopine bojila na količinu bojila adsorbiranog na pivski trop u ravnotežnom stanju (adsorpcijski kapacitet) te na postotak uklanjanja bojila prikazan je na **slici 4.2.4.1.** Utjecaj pH ispitan je za pH područja od 4 do 10. Ostali eksperimentalni uvjeti bili su kako slijedi: θ = 25 °C, $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}, $\gamma_{\text{adsorbens}}$= 1 g dm^{-3} i t = 240 min za uklanjanje metilenskog modrila te $\gamma_{\text{adsorbens}}$ = 10 g dm^{-3} i t = 300 min za uklanjanje kongo crvenila.

Iz **slike 4.2.4.1.A** vidljivo je kako je za metilensko modrilo s povećanjem pH vrijednosti otopine bojila došlo do kontinuiranog povećanja adsorpcijskog kapaciteta te povećanja postotka uklanjanja bojila. Pri tome je najmanji adsorpcijski kapacitet postignut pri pH = 4 iznosio 32,6 mg g^{-1}, dok je najveći adsorpcijski kapacitet postignut pri pH = 10 i iznosi 45 mg g^{-1}. Pri istim pH vrijednostima postignuti su i najmanji i najveći postotak uklanjanja metilenskog modrila, koji su iznosili 62,8 % i 87,2 %.

Za razliku od metilenskog modrila, povećanjem pH vrijednosti otopine kongo crvenila dolazi do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja kongo crvenila (**slika 4.2.4.1.B**), što je posebno izraženo u pH području od 8 do 10. U pH području od 4 do 7, promjena pH vrijednosti otopine nije imala značajan utjecaj na vrijednosti adsorpcijskih kapaciteta (od 3,2 mg g^{-1} do 3,10 mg g^{-1}) i postotke uklanjanja kongo crvenila (od 63,3 % do 63,7 %) te su oni u ovom području gotovo konstantni. U pH području od 8 do 10 dolazi do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta te smanjenja postotka uklanjanja kongo crvenila, pri čemu su njihove najmanje vrijednosti zabilježene pri pH vrijednosti 10 i iznosile su 0,83 mg g^{-1} te 16 %.



A



B

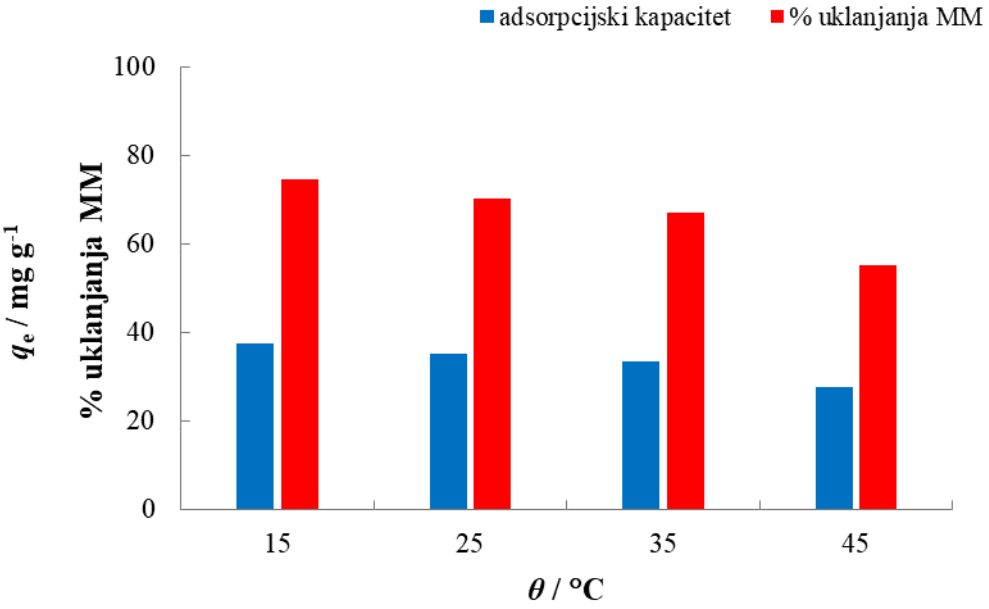
Slika 4.2.4.1. Utjecaj pH na adsorpciju metilenskog modrila (MM) (A) i kongo crvenila (KC) (B) na pivski trop (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} (A), 10 g dm^{-3} (B); t = 240 min (A), 300 min (B); θ = 25 °C; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.2.5. Utjecaj temperature na proces adsorpcije

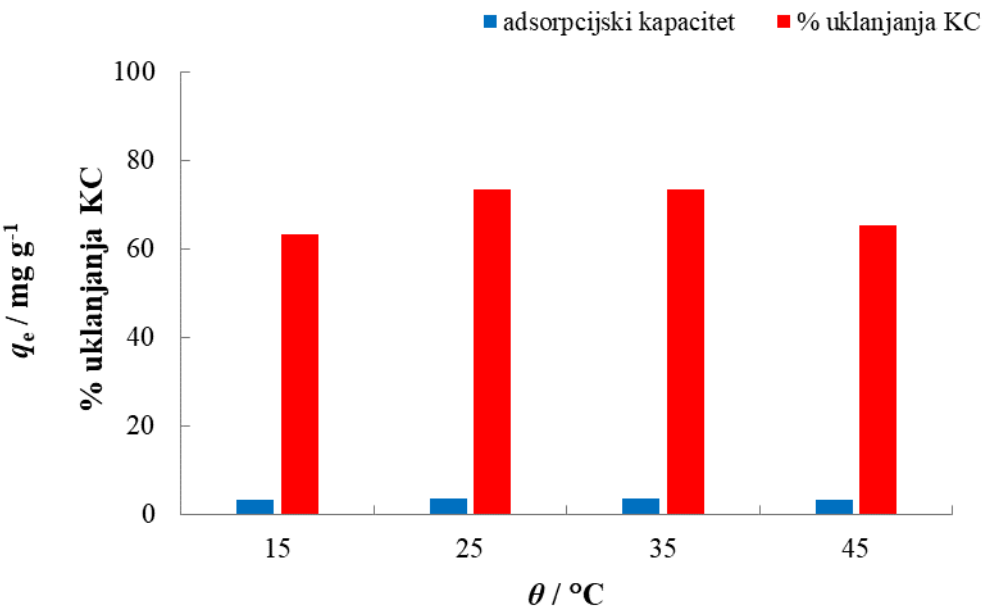
Temperatura vodene otopine bojila, odnosno otpadnih voda sa sadržajem bojila, također može biti važan čimbenik uklanjanja bojila adsorpcijom. Utjecaj temperature na adsorpciju bojila na pivski trop ispitan je pri različitim temperaturama: θ = 15 °C, 25 °C, 35 °C i 45 °C.Ostali eksperimentalni uvjeti bili su kako slijedi: pH = 6,8; $\nu_{\text{miješanja}}$ = 150 okr min^{-1}; $\gamma_{\text{adsorbens}}$= 1 g dm^{-3} i t = 240 min za uklanjanje metilenskog plavila te $\gamma_{\text{adsorbens}}$ = 10 g dm^{-3} i t = 300 min za uklanjanje kongo crvenila. Rezultati ispitivanja prikazani su na **slici 4.2.5.1.**

Povećanjem temperature vodene otopine metilenskog modrila dolazi do kontinuiranog smanjenja adsorpcijskog kapaciteta te smanjenja postotka uklanjanja metilenskog modrila (**slika 4.2.5.1.A**). Najveća vrijednost adsorpcijskog kapaciteta iznosila je 37,4 mg g^{-1} (pri 25 °C), dok je najmanja vrijednost iznosila 27,63 mg g^{-1} (pri 45 °C). Postotak uklanjanja bojila s povećanjem temperature smanjio se sa 74,80 % na 55,25 %.

Za razliku od metilenskog modrila, utjecaj povećanja temperature na proces adsorpcije kongo crvenila na pivski trop nije jednoznačan (**slika 4.2.5.1.B**). Naime, povećanjem temperature od 15 °C do 25 °C dolazi do povećanja adsorpcijskog kapaciteta od 3,16 mg g^{-1} do 3,67 mg g^{-1}. Istovremeno dolazi i do povećanja postotka uklanjanja bojila od 63,25 % do 73,41 %. Daljnjim povećanjem temperature za 10 °C, ne dolazi do daljnjeg povećanja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja, već obje veličine ostaju jednake kao i pri 25 °C. Povećanjem temperature na 45 °C, adsorpcijski kapacitet i postotak uklanjanja se ponovo smanjuju i iznose 3,27 mg g^{-1} i 65,44 %.



A



B

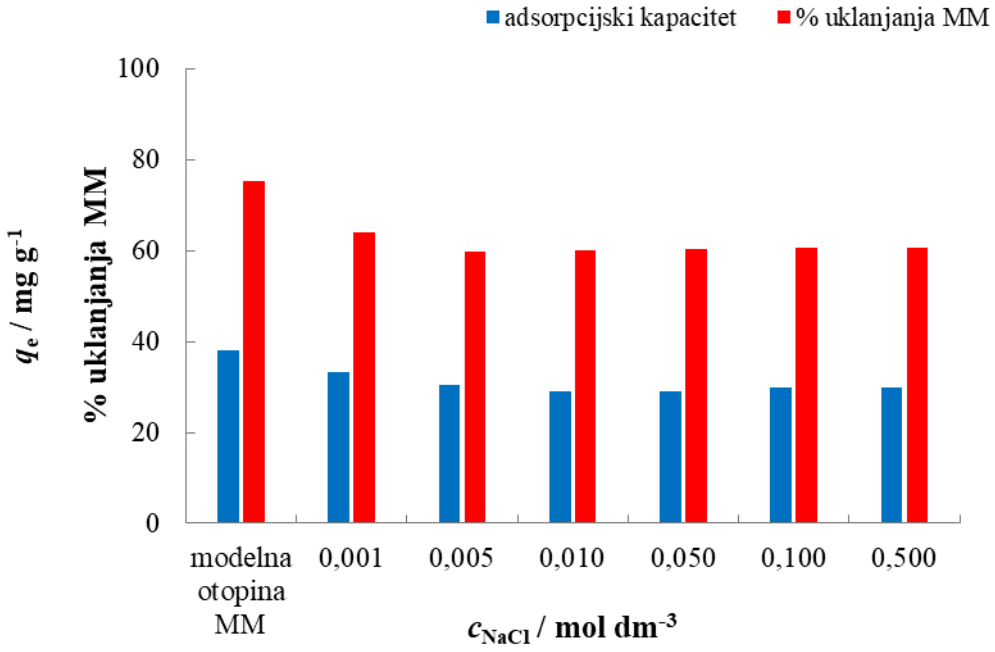
Slika 4.2.5.1. Utjecaj temperature na adsorpciju metilenskog modrila (MM) (A) i kongo crvenila (KC) (B) na pivski trop (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} (A), 10 g dm^{-3} (B); t = 240 min (A), 300 min (B); pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.2.6. Utjecaj ionske jakosti otopine na proces adsorpcije

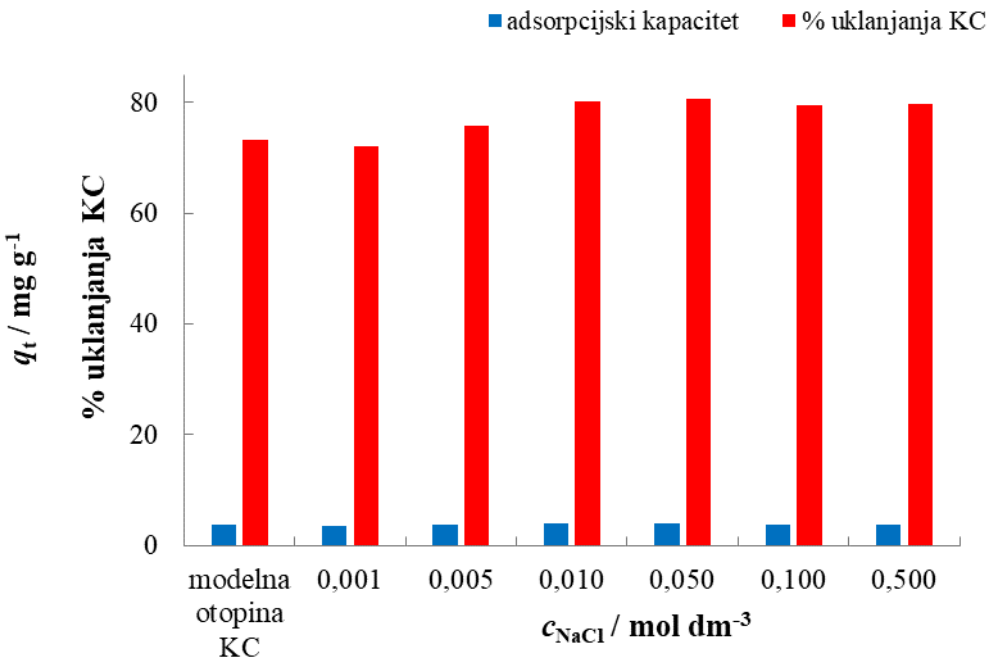
Ispitivanje utjecaja ionske jakosti na proces adsorpcije najčešće se provodi dodatkom različitih anorganskih soli u vodene otopine bojila. Tako je u ovom doktorskom radu ispitan utjecaj ionske jakosti na adsorpciju bojila na pivski trop na način da je u otopinu bojila koncentracije 50 mg dm^{-3} dodan NaCl do postizanja konačnih koncentracija u rasponu od 0,001 mol dm^{-3} do 0,5 mol dm^{-3}. Ostali eksperimentalni uvjeti bili su kako slijedi: pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1}; $\gamma_{adsorbens}$= 1 g dm^{-3} i t = 240 min za uklanjanje metilenskog modrila te $\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3} i t = 300 min za uklanjanje kongo crvenila. Rezultati ispitivanja prikazani su na **slici 4.2.6.1.**

Slika 4.2.6.1.A prikazuje utjecaj ionske jakosti otopine metilenskog modrila na adsorpcijski kapacitet i postotak uklanjanja bojila pomoću pivskog tropa. U svim otopinama s dodatkom NaCl može se primijetiti smanjenje adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja metilenskog modrila, u usporedbi s modelnom otopinom metilenskog modrila (γ_{bojilo}= 50 mg dm^{-3}) bez dodatka NaCl (kontrola) čiji su adsorpcijski kapacitet i postotak uklanjanja metilenskog modrila iznosili 38,02 mg g^{-1} i 75,25 %. Očekivano, pri najmanjoj koncentraciji NaCl od 0,001 mol dm^{-3} (odnosno otopini najmanje ionske jakosti u odnosu na kontrolu) zabilježen je najveći adsorpcijski kapacitet i najveći postotak uklanjanja bojila, koji su iznosili 33,30 mg g^{-1} i 75,25 %. U koncentracijskom rasponu od 0,005 mol dm^{-3} do 0,5 mol dm^{-3} adsorpcijski kapaciteti se vrlo malo razlikuju i njihove vrijednosti se kreću između 29 mg g^{-1} i 30 mg g^{-1}, dok se postotci uklanjanja metilenskog modrila kreću oko 60 %.

Utjecaj ionske jakosti otopine kongo crvenila na proces adsorpcije prikazan je na **slici 4.2.6.1.B.** Izuzimajući najmanju koncentraciju NaCl od 0,001 mol dm^{-3}, dodatak NaCl u otopinu bojila doveo je do povećanja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja kongo crvenila u odnosu na modelnu otopinu kongo crvenila bez dodatka NaCl, čiji su adsorpcijski kapacitet i postotak uklanjanja iznosili 3,69 mg g^{-1} i 73,3 %. Adsorpcijski kapaciteti za sve ispitane koncentracije NaCl kretali su se u rasponu od 3,61 mg g^{-1} do 4,05 mg g^{-1}, dok su se postotci uklanjanja kongo crvenila kretali u rasponu od 72,10 % do 80,60 %. Iako je povećanje ionske jakosti dovelo do povećanja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja u odnosu na modelnu otopinu bez dodatka NaCl, pri koncentracijama NaCl većima od 0,05 mol dm^{-3} može se uočiti blago smanjenje u odnosu na manje primijenjene koncentracije.



A



B

Slika 4.2.6.1. Utjecaj ionske jakosti na adsorpciju metilenskog modrila (MM) (A) i kongo crvenila (KC) (B) na pivski trop (γ_{bojilo} = 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} (A), 10 g dm^{-3} (B); t = 240 min (A), 300 min (B); θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.2.7. Adsorpcijske izoterme i kinetika adsorpcije

Adsorpcijski ravnotežni modeli. U ovom radu su za modeliranje eksperimentalnih rezultata korištene Langmuirova i Freundlichova adsorpcijska izoterma te su vrijednosti parametara, izračunate korištenjem lineariziranih oblika odgovarajućih jednadžbi, prikazane u **tablicama 4.2.7.1.** i **4.2.7.2.** Nadalje, **slike 4.2.7.1.** i **4.2.7.2.** prikazuju eksperimentalne podatke i računski dobivene krivulje adsorpcijskih izotermi pri različitim temperaturama.

Parametri adsorpcijskih izotermi prikazani u **tablicama 4.2.7.1.** i **4.2.7.2.** razmatrani su kako bi se utvrdilo kako primijenjeni modeli opisuju proces adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop.

Kada su eksperimentalni podatci dobiveni za uklanjanje metilenskog modrila adsorpcijom na pivski trop u cijelom ispitanom području početnih koncentracija bojila od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} obrađeni Langmuirovim modelom, dobivene su negativne vrijednosti parametara te su linearni koeficijenti korelacije iznosili od 0,004 do 0,007 što upućuje na izuzetno loše slaganje eksperimentalno dobivenih vrijednosti s računskim vrijednostima dobivenim primjenom modela. Obradom istih eksperimentalnih podataka Freundlichovim modelom dobivene su vrijednosti parametara prikazane u **tablici 4.2.7.1.** U usporedbi s Langmuirovim modelom, Freundlichov model za navedeno koncentracijsko područje dobro opisuje proces adsorpcije metilenskog modrila na pivski trop, što se očituje u vrijednostima koeficijenata korelacije koji iznose od 0,720 do 0,925 te vrijednostima konstanti K_f i n, koje opisuju kapacitet vezanja adsorbata i afinitet adsorbensa prema adsorbatu. Vrijednosti koeficijenta n veće od 1 ukazuju kako se radi o povoljnom procesu te o fizikalnom procesu (Sadaf i sur., 2014.).

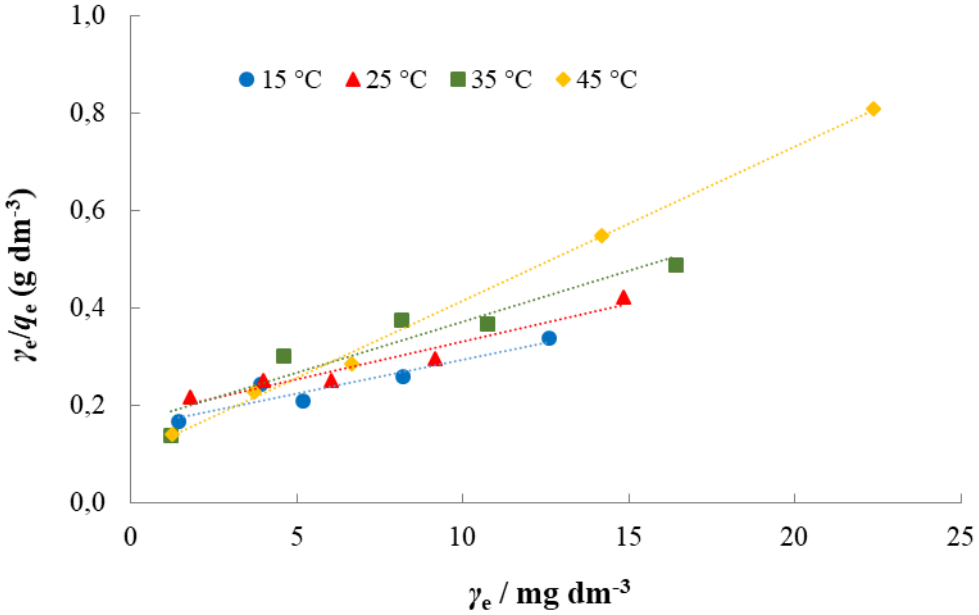
Eksperimentalni podatci zatim su suženi na koncentracijsko područje od 10 mg dm^{-3} do 50 mg dm^{-3} i ponovo obrađeni s oba modela te su rezultati također prikazani u **tablici 4.2.7.1.**, kao i na **slici 4.2.7.1.** Vrijednosti dobivenih koeficijenata korelacije velike su za oba modela te bi se moglo zaključiti kako oba modela dobro opisuju proces adsorpcije metilenskog modrila na pivski trop pri primijenjenim eksperimentalnim uvjetima. Bezdimenzionalni separacijski faktor R_L karakterističan za Langmuirov model iznosio je od 0,058 do 0,186 što ukazuje na povoljnost adsorpcije. Ipak, usporedbom eksperimentalno dobivenih i izračunatih maksimalnih adsorpcijskih kapaciteta, vidljivo je kako je najbolje slaganje ovih vrijednosti postignuto za proces adsorpcije proveden pri 45 °C. Usporedbom vrijednosti parametra Freundlichova modela dobivenih obradom eksperimentalnih podataka za cijelo i suženo koncentracijsko područje, vidljivo je kako su vrijednosti koeficijenta korelacije za suženo koncentracijsko područje veće pri svim ispitanim temperaturama. Nadalje, vrijednosti konstanti K_f i n također su veće, što ukazuje na veći kapacitet vezanja i veći afinitet adsorbensa prema adsorbatu.

Tablica 4.2.7.1. Parametri adsorpcijskih izotermi za adsorpciju metilenskog modrila na pivski trop (γ_{bojilo} = 10 - 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} ; t = 240 min; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

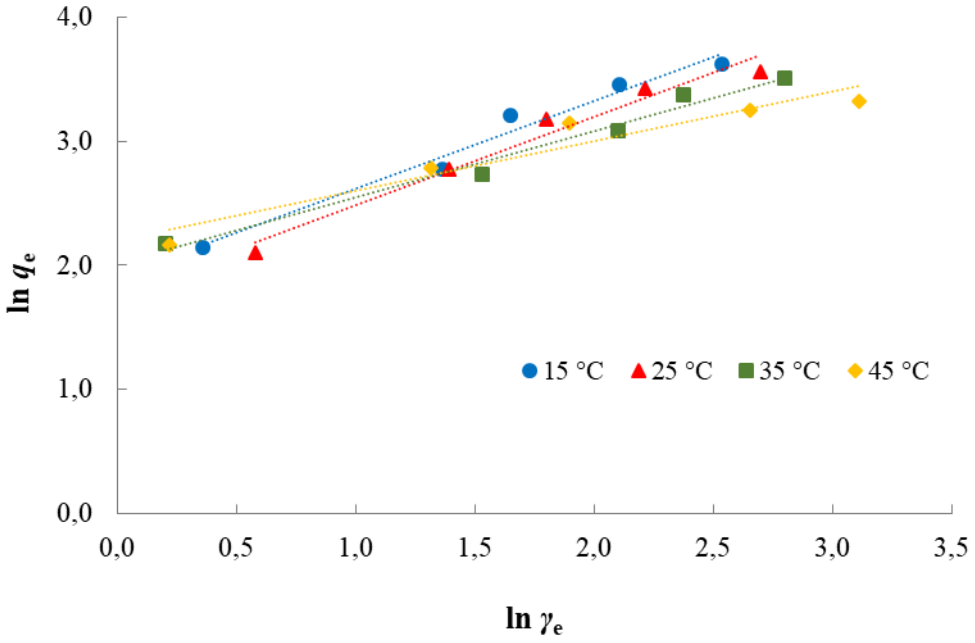
Model	**Metilensko modrilo**			
θ / °C	15	25	35	45
Langmuir				
$q_{m\ exp.}$ / mg g^{-1}	37,400	35,150	33,580	27,630
$q_{m\ cal.}$ / mg g^{-1}	71,942	64,516	47,847	31,546
K_L / dm^3 mg^{-1}	0,089	0,088	0,129	0,326
R_L	0,183	0,186	0,134	0,058
R^2	0,898	0,948	0,902	0,997
Freundlich				
K_F / (mg/g (dm^3/mg)$^{1/n}$)	6,751	5,890	7,540	9,042
n	1,412	1,404	1,884	2,501
R^2	0,974	0,967	0,979	0,922
γ_{bojilo} = 10 mg dm^{-3} - 200 mg dm^{-3}				
K_F / (mg/g (dm^3/mg)$^{1/n}$)	5,065	4,012	4,886	5,949
n	1,073	1,013	1,144	1,290
R^2	0,925	0,909	0,832	0,720

Tablica 4.2.7.2. Parametri adsorpcijskih izotermi za adsorpciju kongo crvenila na pivski trop (γ_{bojilo} = 20 - 200 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3} ; t = 300 min; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

Model	**Kongo crvenilo**			
θ / °C	15	25	35	45
Langmuir				
$q_{m\ exp.}$ / mg g^{-1}	6,95	10,25	10,55	8,54
$q_{m\ cal.}$ / mg g^{-1}	8,613	18,692	17,094	9,690
K_L / dm^3 mg^{-1}	0,025	0,014	0,014	0,025
R_L	0,165	0,265	0,261	0,166
R^2	0,965	0,790	0,760	0,888
Freundlich				
K_f / (mg/g (dm^3/mg)$^{1/n}$)	0,501	0,413	0,409	0,593
n	1,802	1,350	1,388	1,856
R^2	0,928	0,920	0,910	0,965

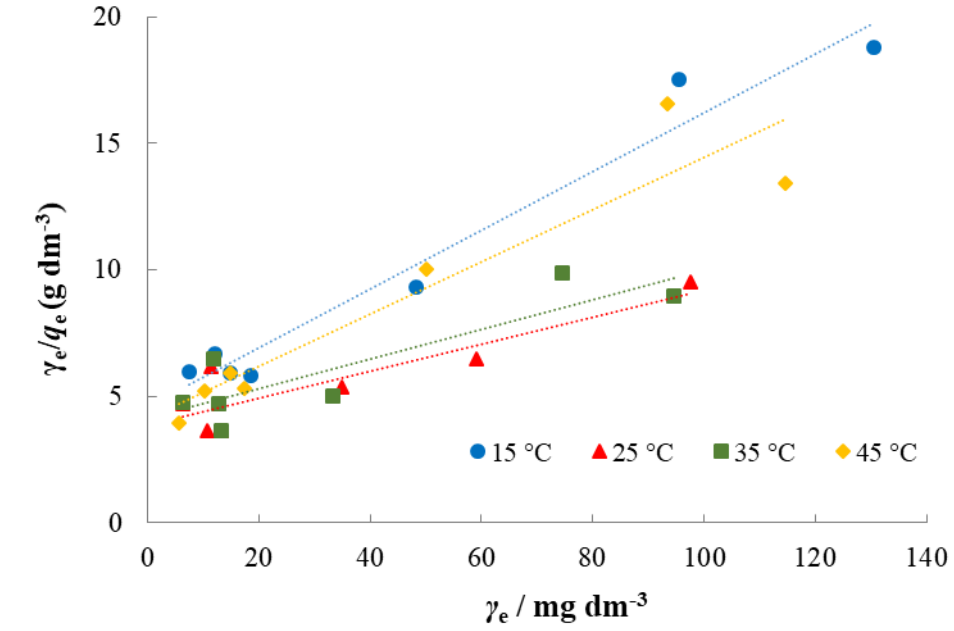


A

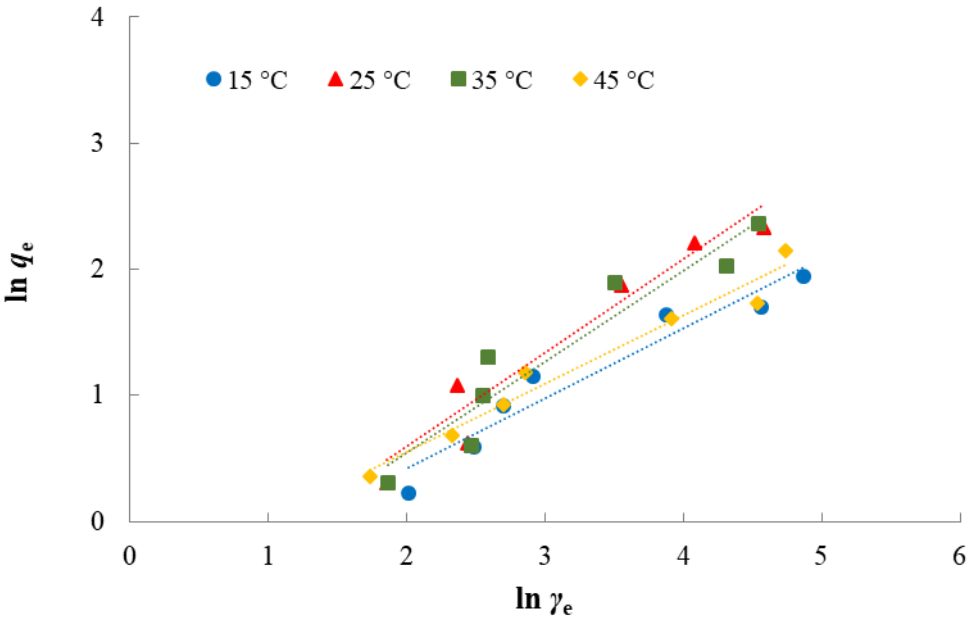


B

Slika 4.2.7.1. Langmuirove (A) i Freundlichove (B) adsorpcijske izoterme za adsorpciju metilenskog modrila na pivski trop (γ_{bojilo} = 10 - 50 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} ; t = 240 min; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})



A



B

Slika 4.2.7.2. Langmuirove (A) i Freundlichove (B) adsorpcijske izoterme za adsorpciju kongo crvenila na pivski trop (γ_{bojilo} = 20 - 200 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3} ; t = 300 min; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

Kao i u slučaju metilenskog modrila, eksperimentalni podatci dobiveni za uklanjanje kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop te obrađeni Langmuirovim i Freundlichovim modelom zbog lošeg slaganja s primijenjenim modelima suženi su na područje početnih koncentracija bojila od 20 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3}. Dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 4.2.7.2.** i na **slici 4.2.7.2.** Razmatranjem i usporedbom vrijednosti koeficijenata korelacije vidljivo je kako bolje slaganje s eksperimentalnim podatcima pokazuje Freundlichov model (vrijednosti koeficijenta korelacije od 0,910 do 0,965), za razliku od Langmuirovog modela (vrijednosti koeficijenata korelacije od 0,760 do 0,965). Usporedbom eksperimentalno određenih maksimalnih adsorpcijskih kapaciteta te onih dobivenih Langmuirovim modelom vidljiva su odstupanja, ali nešto manja u odnosu na metilensko modrilo. Bezdimenzionalni separacijski faktor pri svim primijenjenim eksperimentalnim uvjetima ima vrijednost manju od 1, odnosno radi se o procesu adsorpcije koji je povoljan. Kako je već napomenuto, čini se kako Freundlichov model pokazuje nešto bolje slaganje s eksperimentalnim podatcima u odnosu na Langmuirov model. Vrijednosti parametra *n* veće su od 1, ali manje od 2, što ukazuje na umjereno uspješan proces adsorpcije te na fizikalni proces.

Kinetika adsorpcije. Eksperimentalni podatci dobiveni su dovođenjem pivskog tropa u kontakt s otopinom različitih koncentracija tijekom unaprijed definiranih vremenskih intervala te su na njih primijenjena dva odabrana kinetička modela - modeli pseudo-prvog i pseudo-drugog reda te difuzijski model unutarčestične difuzije. Ispitane su tri koncentracije bojila:10 mg dm^{-3}, 50 mg dm^{-3} i 200 mg dm^{-3}. S obzirom da je za oba bojila pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od 200 mg dm^{-3} do uspostavljanja ravnotežnog stanja došlo odmah na početku eksperimenta, navedeni eksperimentalni podatci nisu se mogli koristiti za analizu odabranim modelima. Ostali eksperimentalni podatci analizirani su primjenom linearizirranih oblika kinetičkih modela pseudo-prvog i pseudo drugog reda te modelom unutarčestične difuzije te su vrijednosti parametra modela prikazani u **tablicama 4.2.7.3.** i **4.2.7.4.** te na **slikama 4.2.7.1. – 4.2.7.5.**

Iz **tablice 4.2.7.3.** vidljivo je kako su za oba bojila i obje koncentracije bojila koeficijenti korelacije za model pseudo-drugog reda veći. Vrijednosti koeficijenta brzine adsorpcije *k*, ovise o uvjetima provođenja procesa, kao što su početna koncentracija adsorbata, koncentracija adsorbensa, veličina čestica adsorbensa, temperatura, pH i drugo. Iz tablice je vidljivo kako se vrijednosti koeficijenta brzine adsorpcije za oba primijenjena modela smanjuju povećanjem početne koncentracije bojila. Što je brzina kojom se bojilo adsorbira manja, veća je količina bojila koja će se adsorbirati po jedinici mase adsorbensa, odnosno bit će veći adsorpcijski kapacitet. Razmatranjem vrijednosti adsorpcijskih kapaciteta dobivenih modelima ($q_{e\ cal.}$) i eksperimentalno dobivenih vrijednostima ($q_{e\ exp.}$), vidljivo je kako se vrijednosti $q_{e\ cal.}$ dobivene modelom pseudo-drugog reda značajno bolje slažu s eksperimentalnim vrijednostima u usporedbi s vrijednostima dobivenim modelom pseudo-prvog reda, što je vidljivo i na **slikama 4.2.7.3.** i **4.2.7.4.** Sve navedeno upućuje na zaključak kako model pseudo-drugog reda bolje opisuje kinetiku adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop.

Kako se kinetičkim modelima pseudo-prvog reda i pseudo-drugog reda ne može pojasniti mehanizam difuzije i odrediti ograničavajući korak adsorpcije, u tu svrhu primijenjen je model unutarčestične difuzije koji su predložili Weber i Morris (1962). Grafička ovisnost q o $t^{1/2}$ za različite početne koncentracije metilenskog modrila i kongo crvenila prikazana je na **slici 4.2.7.5.**, dok su parametri modela dani u **tablici 4.2.7.4.** Ukoliko grafička ovisnost daje pravac

koja prolazi kroz ishodište, difuzija unutar pora čestica adsorbensa je jedini korak koji ograničava brzinu adsorpcije. Međutim, ako je $C \neq 0$, pravac neće prolaziti kroz ishodište i ta će ovisnost dati krivulju izlomljenu na dva ili više linearnih dijelova (**slika 4.2.7.5.**). Brzinu adsorpcije u tom slučaju, u određenoj mjeri, kontrolira još neki korak procesa adsorpcije, kao primjerice difuzija kroz granični sloj tekućine do površine adsorbensa. Iz grafičkog prikaza na **slici 4.2.7.5.** vidljive su dvije (metilensko modrilo), odnosno tri (kongo crvenilo) linearne regije za svaku početnu koncentraciju bojila i za svako bojilo, što upućuje na zaključak kako unutračestična difuzija nije jedini korak koji ograničava brzinu adsorpcije. Iz **tablice 4.2.7.4.** vidljivo je kako su vrijednosti parametra *C* za adsorpciju metilenskog modrila na pivski trop puno veće od vrijednosti za kongo crvenilo. Vrijednosti *C* daju informaciju o debljini graničnog sloja - što je vrijednost *C* veća, granični sloj je deblji. Nadalje, veće vrijednosti parametra C ukazuju i na veći adsorpcijski kapacitet adsorbensa (Ojedokun i Bello, 2017).

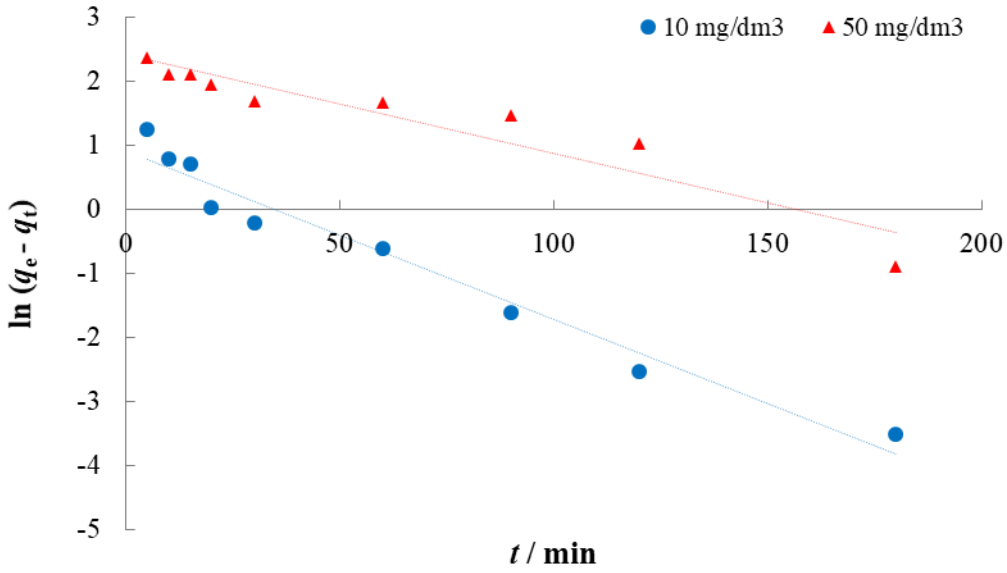
Tablica 4.2.7.3. Parametri kinetičkih modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda za adsorpciju metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop ($\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3}; t = 5 - 300 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

Model	**Pseudo-prvi red**					**Pseudo-drugi red**		
	Parametar							
Bojilo	γ_0 / mg dm^{-3}	$q_{e\ exp}$ / mg g^{-1}	k_1 / min^{-1}	$q_{e\ cal}$ / mg g^{-1}	R^2	k_2 / g mg^{-1} min^{-1}	$q_{e\ cal.}$ / mg g^{-1}	R^2
MM	10	7,99	0,026	2,518	0,965	0,028	8,14	1
	50	37,02	0,025	11,196	0,890	0,004	37,31	0,998
KC	10	0,34	1,873	0,154	0, 559	0,051	0,492	0,8515
	50	3,69	0,785	2,192	0,927	0,011	3,804	0,9948

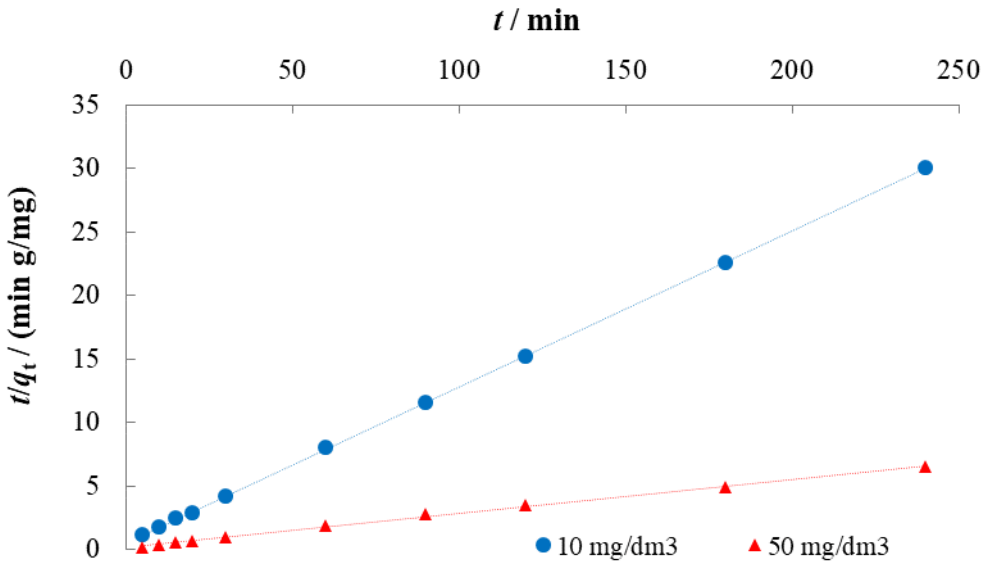
Tablica 4.2.7.4. Parametri modela unutarčestične difuzije za adsorpciju metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop ($\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3}; t = 5 - 300 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

	Parametar									
Bojilo	γ_0/ mg dm^{-3}	$k_{i\ 1}$*	C_1	R_1^2	$k_{i\ 2}$*	C_2	R_2^2	$k_{i\ 3}$*	C_3	R_3^2
MM	10	0,839	2,846	0,923	0,063	7,102	0,741			
	50	1,530	23,151	0,953	0,749	25,883	0,964			
KC	10	0,063	0,330	0,755	0,012	0,624	0,988	0,003	0,744	0,942
	50	0,385	0,040	0,994	0,165	1,394	0,997	0,101	1,885	0,948

*mg g^{-1} min$^{-0.5}$

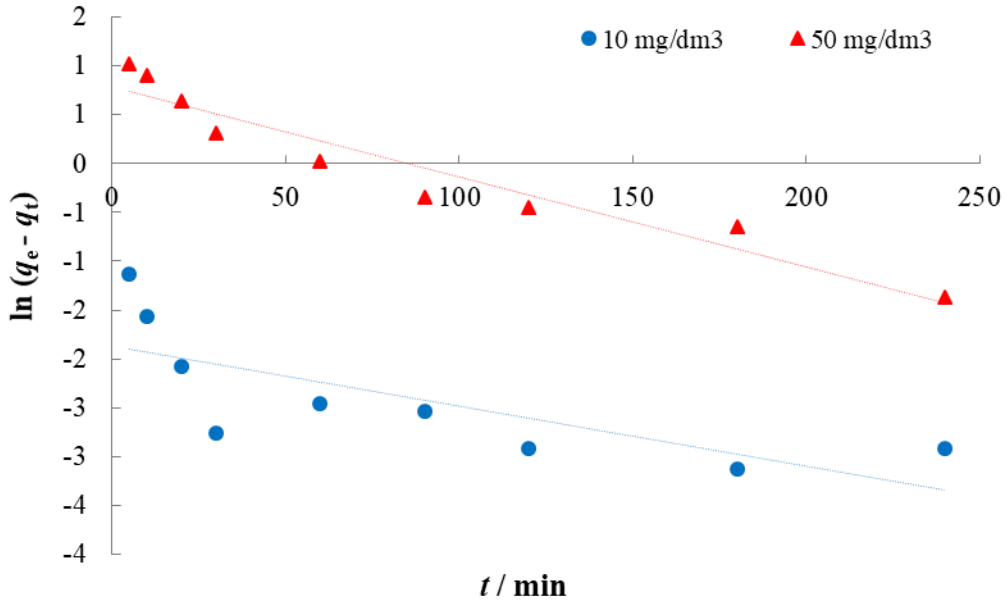


A

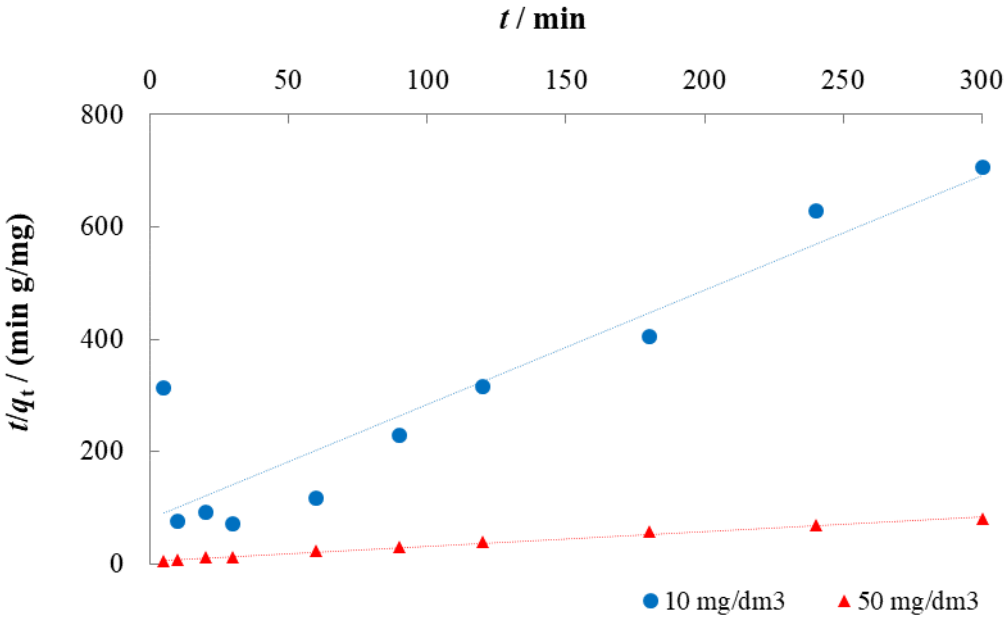


B

Slika 4.2.7.3. Eksperimentalni podatci i modeli pseudo-prvog (A) i pseudo-drugog reda (B) za adosrpciju metilenskog modrila na pivski trop ($\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3}; t = 5 - 240 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

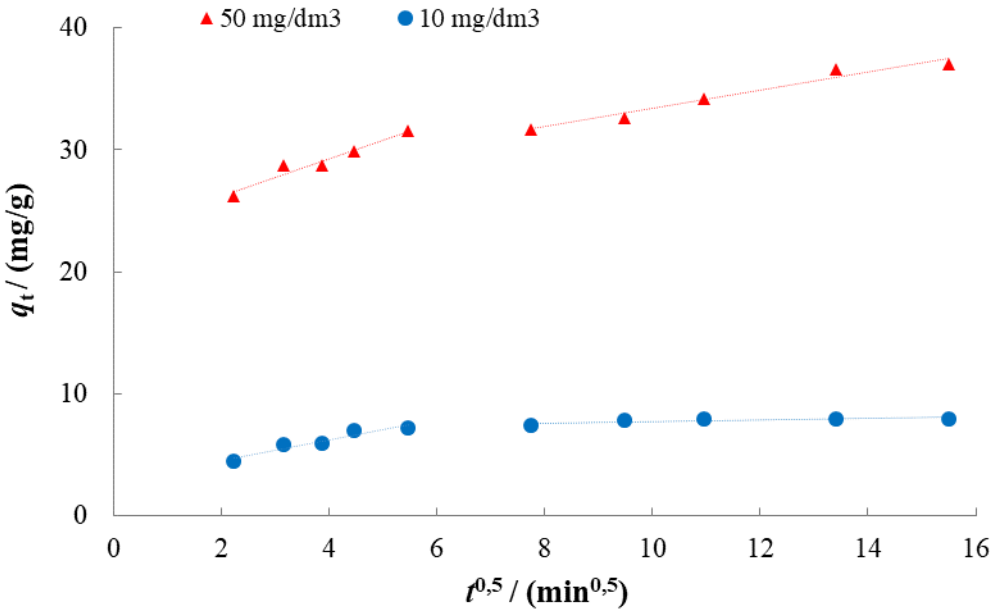


A

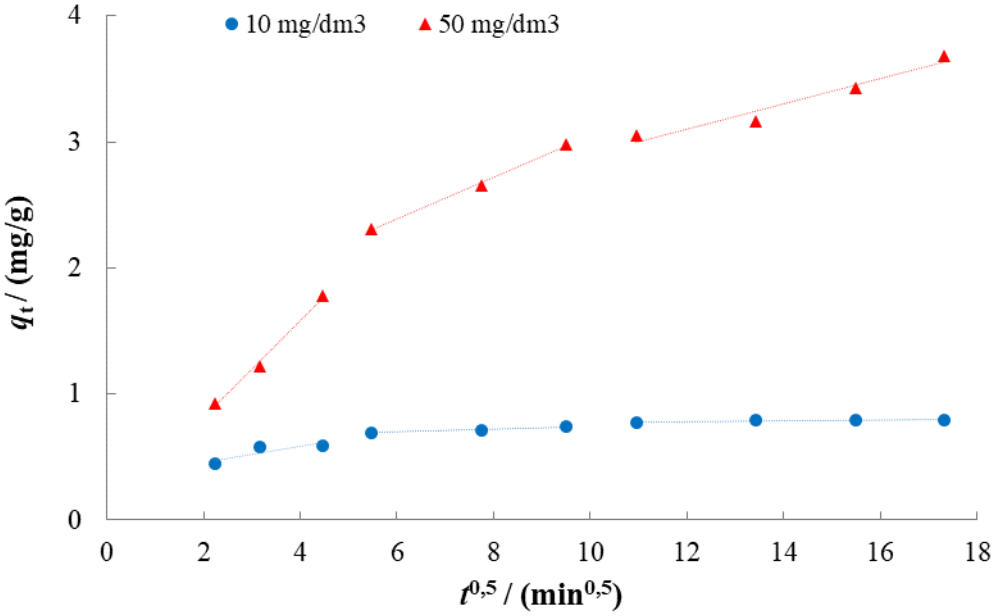


B

Slika 4.2.7.4. Eksperimentalni podatci i modeli pseudo-prvog (A) i pseudo-drugog reda (B) za adosrpciju kongo crvenila na pivski trop ($\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3} ; t = 5 - 300 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})



A



B

Slika 4.2.7.5. Eksperimentalni podatci i model unutarčestične difuzije za adosrpciju metilenskog modrila (A) i kongo crvenila (B) na pivski trop ($\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} i 10 g dm^{-3} ; t = 5 - 300 min; θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.2.8. Uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila iz sintetskih i realnih otpadnih voda dodatkom pivskog tropa

Kako bi se istražila mogućnost primjene pivskog tropa kao adsorbensa i u realnim uvjetima, provedeni su šaržni adsorpcijski eksperimenti u sintetskoj otpadnoj vodi koja simulira sastav komunalne otpadne vode te u realnoj komunalnoj otpadnoj vodi. U obje vrste uzoraka dodan je potreban volumen standardne otopine bojila do konačne koncentracije bojila od 10 mg dm^{-3}, 50 mg dm^{-3} i 200 mg dm^{-3}. Nadalje, u uzorcima prije i nakon uklanjanja bojila određena je kemijska potrošnja kisika (KPK), kao pokazatelj ukupne kakvoće otpadne vode. Kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri se topljiva organska tvar prisutna u pivskom tropu izlužuje u vodu tijekom adsorpcije (uzrokujući sekundarno onečišćenje otpadne vode), određena je KPK i u vodi dobivenoj nakon izluživanja pivskog tropa ($\gamma_{\text{pivski trop}}$ = 10 g dm^{-3}) u trajanju od 300 min. Rezultati su prikazani na **slikama** od **4.2.8.1.** do **4.2.8.3.** te u **tablici 4.2.8.1.**

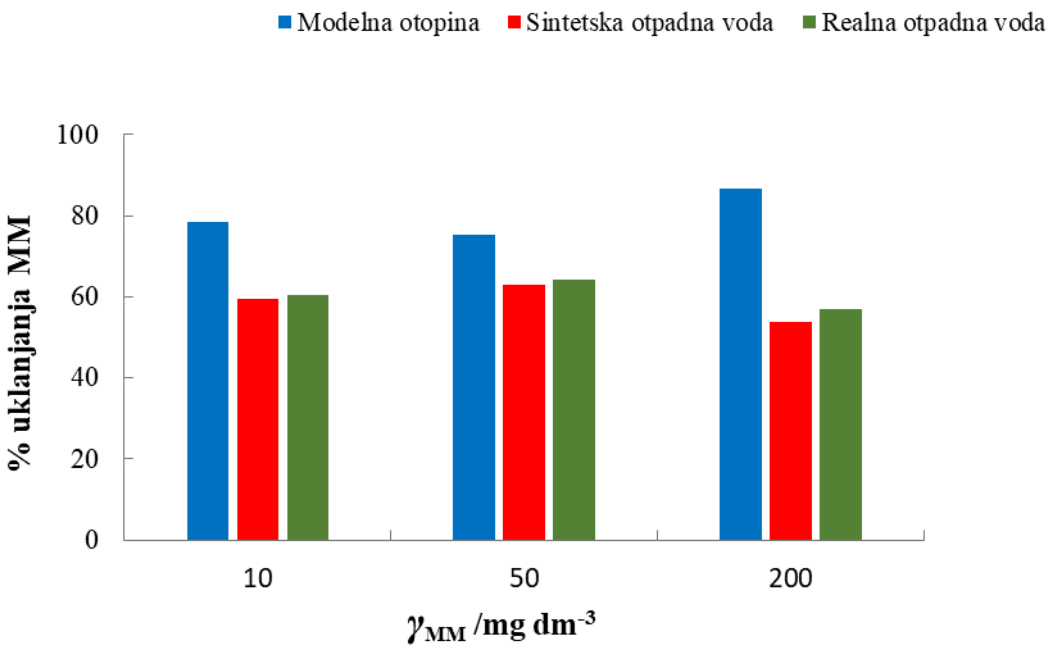
Iz **slike 4.2.8.1.** vidljivo je kako je postotak uklanjanja metilenskog modrila, ovisno o početnoj koncentraciji bojila, za 23 % do 37 % manji u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi u odnosu na postotak uklanjanja u modelnoj otopini bojila. Pri tome je postotak uklanjanja nešto veći u realnoj otpadnoj vodi u odnosu na sintetsku otpadnu vodu. Iz **slike 4.2.8.2.** vidljivo je kako su i količine adsorbiranog metilenskog modrila po jedinici mase adsorbensa u ovisnosti o vremenu za sve ispitane koncentracije rasle u nizu modelna otopina bojila > realna otpadna voda > sintetska otpadna voda. Postotak uklanjanja kongo crvenila iz sintetske i realne otpadne vode manji je od postotka uklanjanja iz modelne otopine bojila samo pri najmanjoj početnoj koncentraciji bojila od 10 mg dm^{-3}. Pri ostale dvije ispitane koncentracije, postotak uklanjanja iz sintetske i realne otpadne vode je veći od 5 % do 40 % od postotka uklanjanja iz modelne otopine bojila, pri čemu je postotak uklanjanja iz sintetske otpadne vode veći od postotka uklanjanja iz realne otpadne vode. **Slika 4.2.8.3.** prikazuje ovisnost količine adsorbiranog kongo crvenila po jedinici mase adsorbensa o vremenu. Pri početnoj koncentraciji bojila od 10 mg dm^{-3} količina adsorbiranog bojila do 240 min raste u nizu sintetska otpadna voda > modelna otopina bojila > realna otpadna voda. Nakon 300 min vjerojatno dolazi do desorpcije bojila s adsorbensa u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi, pa je stoga najveća količina adsorbiranog bojila po jedinici mase adsorbensa zabilježena u modelnoj otpadnoj vodi. Pri ostale dvije ispitane koncentracije, količina adsorbiranog bojila s vremenom raste u nizu: sintetska otpadna voda > realna otpadna voda > modelna otopina bojila.

Tablica 4.2.8.1. prikazuje promjene KPK vrijednosti destilirane vode nakon provedenog izluživanja pivskog tropa neispranog vrućom destiliranom vodom nakon primitka iz pivovare te pivskog tropa ispranog destiliranom vrućom vodom do neutralnog pH s ciljem uklanjanja prisutnih nečistoća. Iz tablice je vidljivo kako se iz obje vrste uzoraka pivskog tropa u vodu izlužuje određena količina organskih spojeva koja se očituje kao povećanje KPK vrijednosti destilirane vode, što ukazuje na problem mogućeg sekundarnog onečišćenja otpadne vode iz koje se adsorpcijom na pivski trop uklanjanja određena vrsta onečišćujućih tvari. Ispiranjem pivskog tropa količina izluženih organskih spojeva (izraženo kao KPK vrijednost) smanjena je za 70 % u odnosu na neisprani pivski trop. Kao usporedba, u tablici su prikazane i KPK vrijednosti sintetske otpadne vode, realne otpadne vode te modelnih otopina metilenskog modrila i kongo crvenila koncentracije 50 mg dm^{-3}. **Tablica 4.2.8.1.** prikazuje i promjene KPK

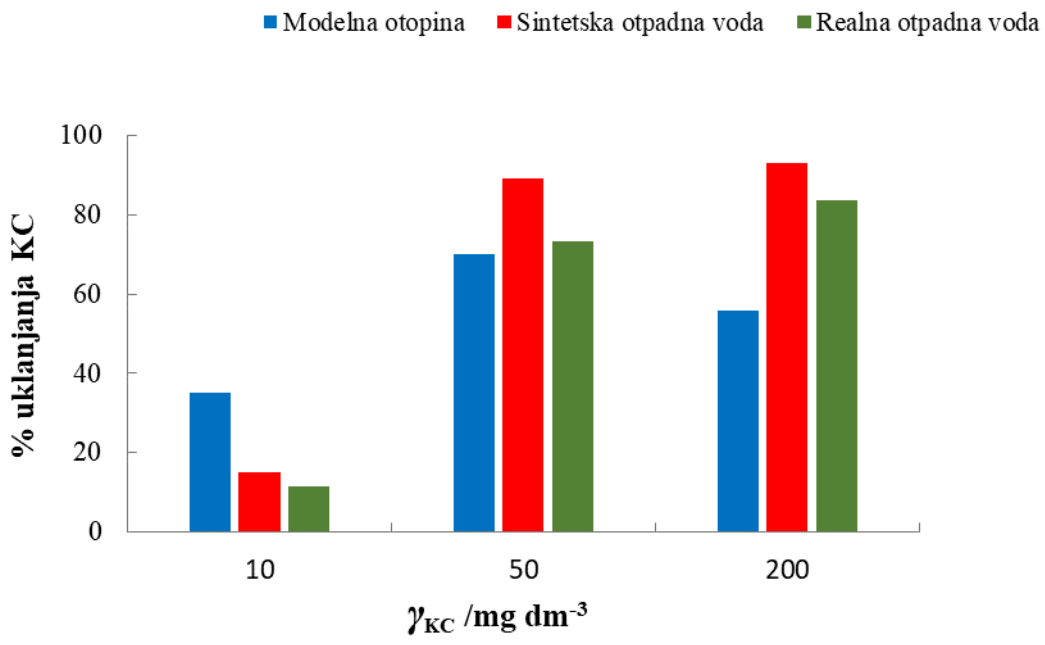
vrijednosti sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila na početku i na kraju procesa adsorpcije bojila na pivski trop. U sintetskoj otpadnoj vodi s dodatkom bojila dolazi do porasta KPK vrijednosti nakon adsorpcije za oba bojila i pri svim koncentracijama bojila, vjerojatno uslijed prethodno razmatranog izluživanja organske tvari iz pivskog tropa. U slučaju uklanjanja metilenskog modrila iz realne otpadne vode s dodatkom bojila dolazi do smanjenja KPK pri svim koncentracijama bojila, pri čemu je to smanjenje najizraženije pri koncentraciji bojila od 10 mg dm^{-3}. S druge strane, u slučaju uklanjanja kongo crvenila iz realne otpadne vode i dalje dolazi do povećanja KPK.

Tablica 4.2.8.1. Promjene KPK vrijednosti i pH sintetske i realne otpadne vode te izluživanje organske tvari iz pivskog tropa u vodu tijekom adsorpcije.

Uzorak	$KPK_{početni}$ / mg O_2 dm^{-3}	$KPK_{konačni}$ / mg O_2 dm^{-3}	$pH_{početni}$	$pH_{konačni}$
Voda od izluživanja neispranog (neobrađenog) pivskog tropa	-	450	-	5,0
Voda od izluživanja ispranog pivskog tropa	-	135	-	6,8
Modelna otopina metilenskog modrila (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3})	115	-	-	-
Modelna otopina kongo crvenila (γ_{bojila} = 50 mg dm^{-3})	80	-	-	-
Sintetska otpadna voda s dodatkom bojila				
γ_{bojila} / mg dm^{-3}				
Metilensko modrilo ($\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3}; t = 240 min; θ = 25 °C; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})				
10	563	589	7,49	8,84
50	547	583	7,65	9,07
200	520	619	7,60	8,90
Kongo crvenilo ($\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3}; t = 300 min; θ = 25 °C; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})				
10	530	578	7,38	8,40
50	533	580	7,56	8,76
200	595	653	7,49	8,40
Realna otpadna voda s dodatkom bojila				
Metilensko modrilo ($\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3}; t = 240 min; θ = 25 °C; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})				
10	529	393	8,61	9,01
50	483	444	8,55	9,12
200	665	529	8,57	9,15
Kongo crvenilo ($\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3}; t = 300 min; θ = 25 °C; $v_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})				
10	431	540	8,37	8,69
50	527	571	8,23	8,73
200	699	759	8,19	8,73

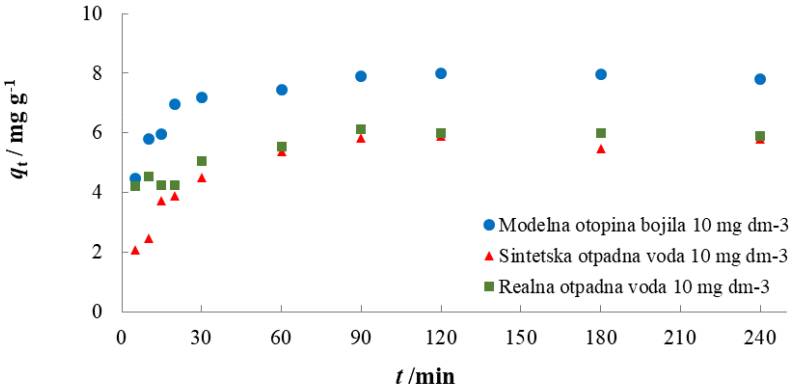


A

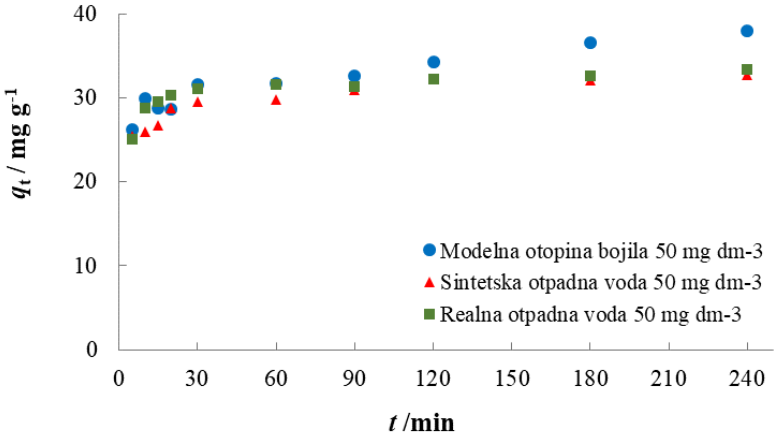


B

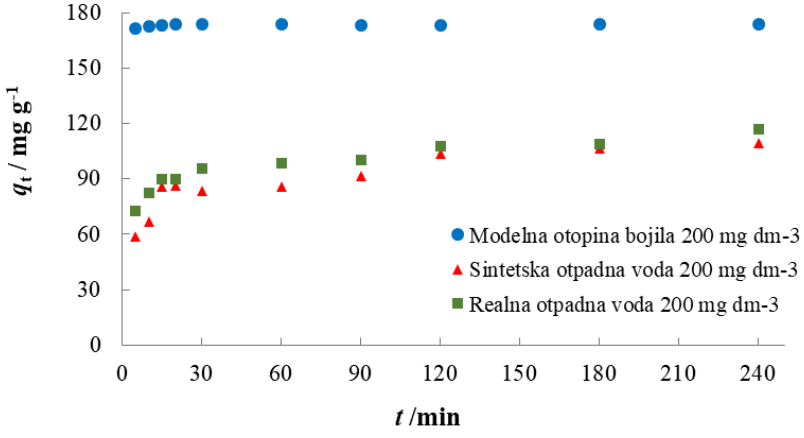
Slika 4.2.8.1. Postotak uklanjanja metilenskog modrila (MM) (A) i kongo crvenila (KC) (B) iz modelnih otopina bojila te sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila (γ_{bojilo} = 10, 50 i 200 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3} (A), 10 g dm^{-3} (B); t = 240 min (A), 300 min (B); θ = 25 °C; pH = 6,8; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})



A

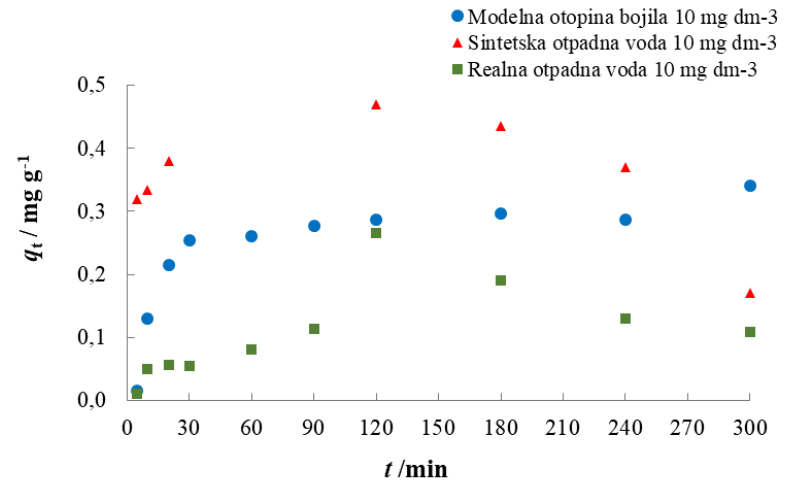


B

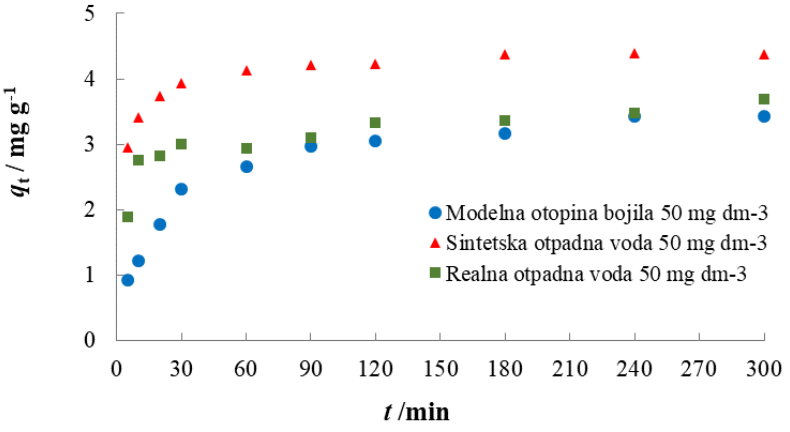


C

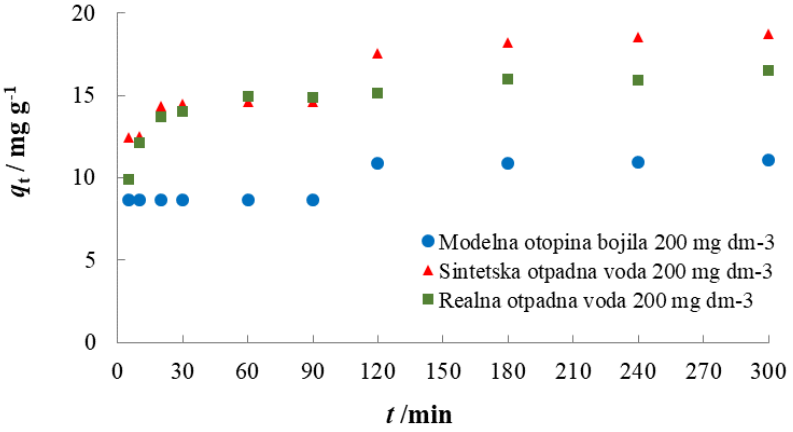
Slika 4.2.8.2. Adsorpcija metilenskog modrila na pivski trop iz modelne otopine bojila te sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila (γ_{bojilo} = 10, 50 i 200 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 1 g dm^{-3}; t = 240 min; θ = 25 °C; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})



A



B



C

Slika 4.2.8.3. Adsorpcija kongo crvenila na pivski trop iz modelne otopine bojila te sintetske i realne otpadne vode s dodatkom bojila (γ_{bojilo} = 10, 50 i 200 mg dm^{-3}; $\gamma_{adsorbens}$ = 10 g dm^{-3}; t = 300 min; θ = 25 °C; $\nu_{miješanja}$ = 150 okr min^{-1})

4.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom

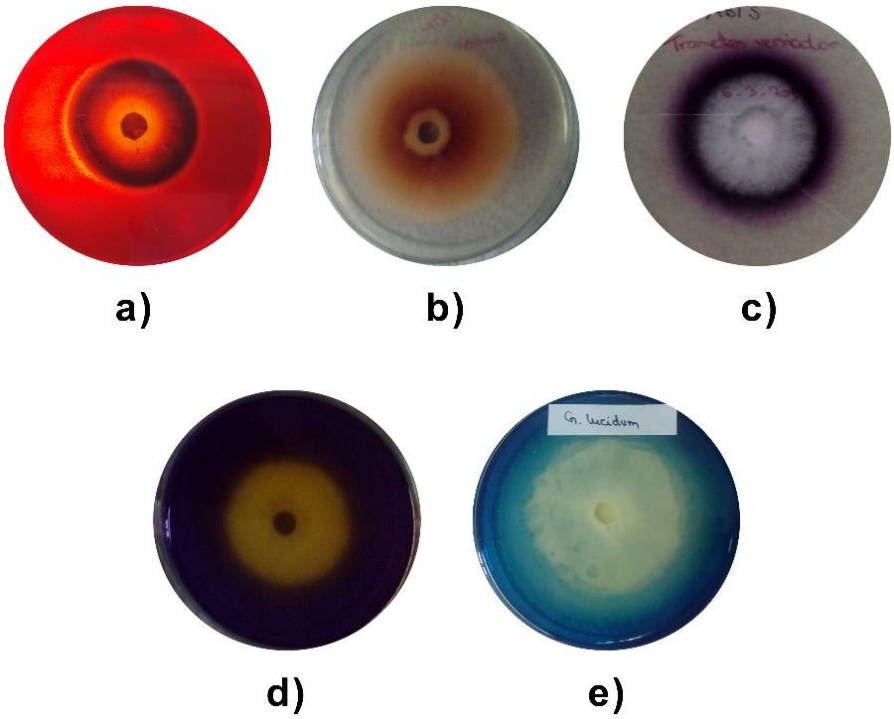
4.3.1. Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja

Rezultati provođenja kvalitativnih enzimskih testova za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti odabranih novoizoliranih vrsta gljiva korištenih u ovom istraživanju prikazani su u **tablici 4.3.1.1.** te na **slici 4.3.1.1.**

Iz rezultata prikazanih u **tablici 4.3.1.1.** vidljivo je kako su svi provedeni kvalitativni enzimski testovi za sve četiri vrste istraživanih gljiva bili potvrdni, čime je potvrđena njihova celulolitička i lignolitička aktivnost. Potvrdan rezultat ukazuje i na mogućnost obrade otpadnog lignoceluloznog adsorbensa tim gljivama, kao i mogućnost istovremene biorazgradnje adsorbiranog bojila, budući da u oba procesa sudjeluju lignolitički enzimi.

Tablica 4.3.1.1. Rezultati kvalitativnih enzimskih testova za potvrdu celulolitičke i lignolitičke aktivnosti odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja. CMC – karboksimetil-celuloza, ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonske kiseline

Radni mikroorganizam	**Celulolitička aktivnost**	**Lignolitička aktivnost**			
Indikator	**CMC**	**ABTS**	**Gvajakol**	**Bromfenol modrilo**	**Lignin**
T. versicolor	+	+	+	+	+
T. gibbosa	+	+	+	+	+
G. lucidum	+	+	+	+	+
G. resinaceum	+	+	+	+	+



Slika 4.3.1.1. Izgled potvrdnih kvalitativnih testova za određivanje enzimske aktivnosti gljiva bijelog truljenja: **a)** celulolitička aktivnost: svjetliji prsten (žuto-narančasti) oko zone rasta gljive na agarnoj ploči s dodatkom karboksimetil-celuloze, **b)** lignolitička aktivnost: smeđi prsten oko zone rasta gljive na agarnoj ploči s dodatkom gvajakola, **c)** lignolitička aktivnost: ljubičasti prsten oko zone rasta gljive na agarnoj ploči s dodatkom ABTS-a, **d)** lignolitička aktivnost: obezbojenje agarne ploče s dodatkom bromfenol modrila (žuto), **e)** test sposobnosti razgradnje lignina: djelomično razgrađeno plavo obojenje agarne ploče oko zone rasta gljive

4.3.2. Testovi obezbojenja metilenskog modrila i kongo crvenila na agarnim pločama pomoću odabranih vrsta gljiva

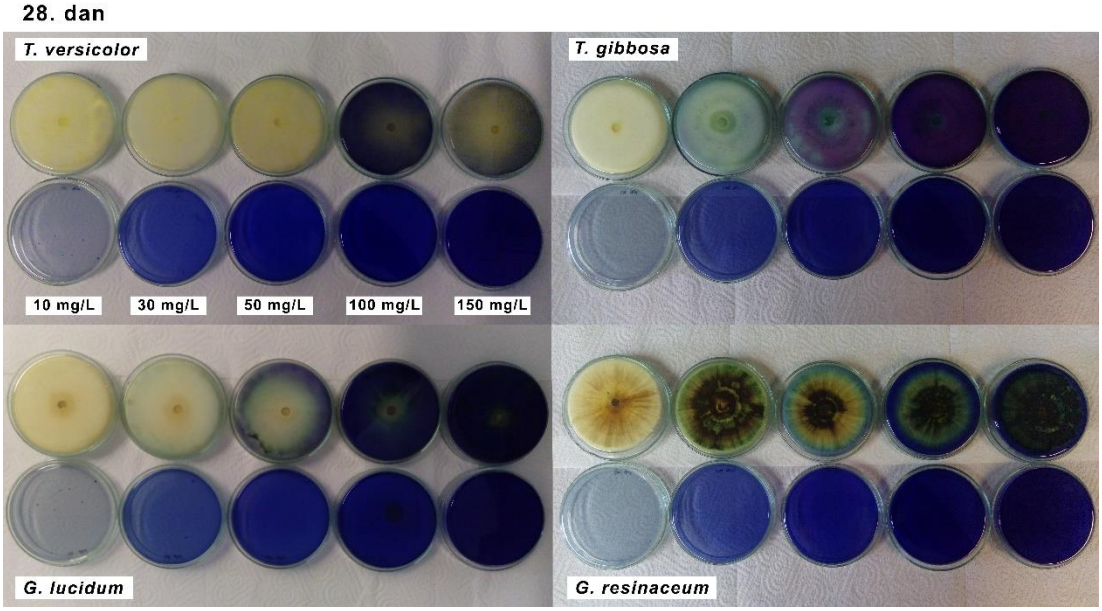
Tijekom istraživanja ispitana je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila metilenskog modrila i kongo crvenila pomoću četiri odabrane gljive bijelog truljenja *T. versicolor*, *T. gibbosa*, *G. lucidum* i *G. resinaceum* na agarnim pločama s dodatkom bojila u koncentracijama od 10 mg dm^{-3} do 150 mg dm^{-3} tijekom 14 (odnosno 28) dana uzgoja. **Tablice 4.3.2.1.** i **4.3.2.2.** pokazuju indeks obezbojenja korištenih bojila pomoću odabranih gljiva u periodu od 4. do 14. dana uzgoja, dok **slike 4.3.2.1.** i **4.3.2.2.** prikazuju izgled agarnih ploča (obezbojenje) s dodatkom bojila 28. dana uzgoja. Indeks obezbojenja izražen je kao omjer promjera zone obezbojenja (mm) i promjera zone rasta (mm) te stoga veća vrijednost indeksa obezbojenja (≥1) ukazuje na bolju sposobnost razgradnje bojila (Jayasinghe i sur., 2008). Razmatranje indeksa obezbojenja nekog bojila izračunatog na osnovu praćenja rasta i razgradnje bojila pomoću većeg broja različitih mikrobnih vrsta omogućuje probir onih vrsta koje će brže i učinkovitije provesti razgradnju bojila. Ipak, pri njegovom razmatranju treba uzeti u obzir moguću inhibiciju

rasta mikroorganizma zbog dodatka bojila u podloge te tako velika vrijednost indeksa obezbojenja, uz istovremenu snažnu inhibiciju rasta, može rezultirati obezbojenjem tek dijela ukupne površine obojene agarne ploče.

Dodatak metilenskog modrila u podlogu za rast gljiva nije rezultirao značajnijom inhibicijom rasta gljiva te je 10. dana uzgoja primijećeno potpuno prorastanje agarnih ploča micelijem. Iz **tablice 4.3.2.1**. te je iz velike vrijednosti indeksa obezbojenja (1) vidljivo kako su sve korištene gljive, osim vrste *T. gibbosa*, nakon 14. dana uzgoja potpuno obezbojile cijelu površinu agarne ploče s dodatkom najmanje koncentracije (10 mg dm^{-3}) metilenskog modrila. Sposobnost potpunog obezbojenja metilenskog modrila pri ostalim ispitivanim koncentracijama nakon 14. dana uzgoja pokazala su vrste *G. lucidum* i *T. versicolor*, pri čemu su izračunati indeksi obezbojenja bili manji od 1. Budući je površina svih agarnih ploča bila u potpunosti prekrivena micelijem, vrijednosti indeksa obezbojenja manji od 1 ukazuju na činjenicu kako je samo dio ukupne površine agarne ploče bio potpuno obezbojen. Vrijednosti indeksa obezbojenja za vrstu *T. versicolor* bile su veće od onih za vrstu *G. lucidum*, što upućuje na bolju sposobnost razgradnje metilenskog modrila tom gljivom. Za vrste *T. gibbosa* i *G. resinaceum* vrijednosti indeksa obezbojenja su velike (veliki dio površine agarne ploče je obuhvaćen), ali se radi samo o djelomično obezbojenju. Nakon 14. dana uzgoja nastavljeno je vizualno praćenje zone obezbojenja do 28. dana uzgoja te je uočeno kako je nakon isteka tog vremena gljiva *T. versicolor* pokazala najbolju sposobnost obezbojenja agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila (**slika 4.3.2.1.**).

Tablica 4.3.2.1. Indeks obezbojenja metilenskog modrila pomoću odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja (* djelomično obezbojenje, indeks obezbojenja = zona obezbojenja (mm) / zona rasta (mm))

Metilensko modrilo						
γ_{bojila}/mg dm^{-3}	**Indeks obezbojenja**					
Dan	**6.**	**10.**	**14.**	**6.**	**10.**	**14.**
	T. versicolor			***T. gibbosa***		
10	0,29	0,60	1,00	0,37	0,66	0,71
30	0,45*	0,83	0,96	0,47*	0,52*	0,89*
50	0,35*	0,77*	0,51	0,42*	0,46*	0,91*
100	0,41*	0,53*	0,30	0,36*	0,31*	0,51*
150	0,34*	0,41*	0,30	0,00*	0,14*	0,32*
	G. lucidum			***G. resinaceum***		
10	0,77	1,00	1,00	0,68	1,00	1,00
30	0,68	0,87	0,89	0,31	0,43	0,50
50	0,34	0,36	0,46	0,53*	0,89*	0,93*
100	0,00	0,25	0,17	0,53*	0,87*	0,97*
150	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	0,52*

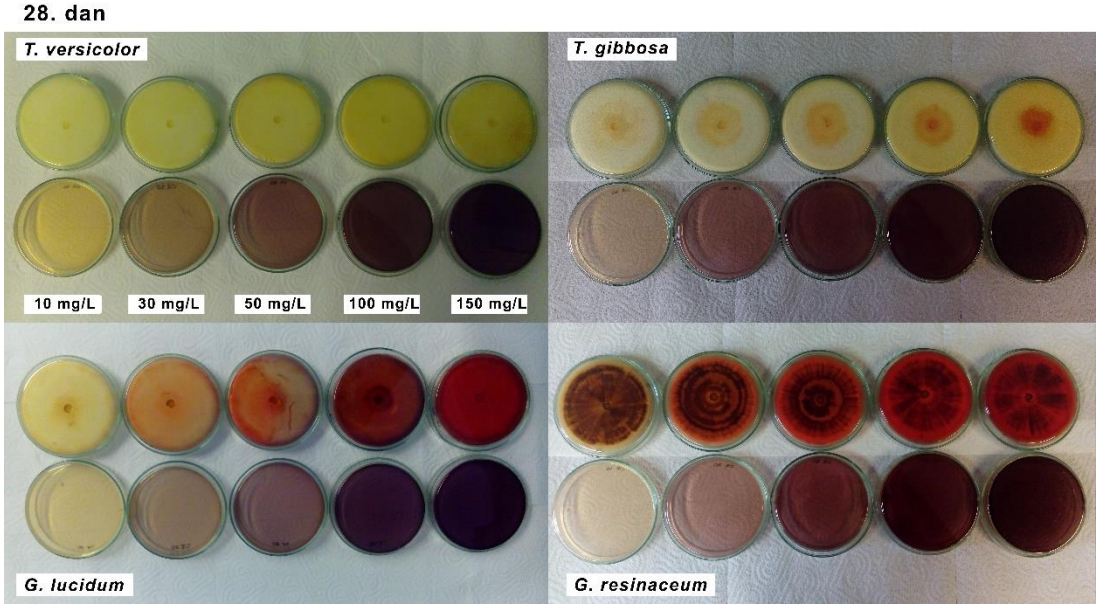


Slika 4.3.2.1. Agarne ploče s dodatkom metilenskog modrila (u koncentracijama od 10 mg dm^{-3} do 150 mg dm^{-3}) na kojima su uzgajane odabrane vrste gljiva bijelog truljenja tijekom 28 dana.

Kao i u slučaju dodatka metilenskog modrila, dodatak kongo crvenila u podlogu nije rezultirao značajnijom inhibicijom rasta gljiva te je potpuno prorastanje agarnih ploča micelijem također primijećeno 10. dana uzgoja. Iz **tablice 4.3.2.2.** je vidljivo kako su vrijednosti indeksa obezbojenja velike za sve korištene gljive, neovisno radi li se o potpunom ili djelomičnom obezbojenju. Sve gljive su nakon 14. dana uzgoja potpuno obezbojile cijelu površinu agarne ploče s dodatkom kongo crvenila u najmanjoj ispitanoj koncentraciji od 10 mg dm^{-3}. Sposobnost djelomičnog obezbojenja kongo crvenila pri ostalim ispitivanim koncentracijama nakon 14. dana uzgoja pokazala su sve vrste gljiva, pri čemu su i vrijednosti indeksa obezbojenja bile velike, odnosno promjenom boje bila je zahvaćena cijela ili gotovo cijela površina agarne ploče. Ipak, jedino je vrsta *T. versicolor* 14. dan uzgoja potpuno obezbojila cijelu površinu agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila u koncentracijama od 30 mg dm^{-3} i 50 mg dm^{-3}. Vrijednosti indeksa potpunog i djelomičnog obezbojenja kongo crvenila bile su za sve vrste i sve ispitane koncentracije veće od vrijednosti obezbojenja za metilensko modrilo, što upućuje na zaključak kako je metilensko modrilo teže biološki razgradljivo bojilo. **Slika 4.3.2.2.** prikazuje izgled agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila 28. dan uzgoja, do kada je nastavljeno vizualno praćenje zone obezbojenja. Iz slike je vidljivo kako je jedino u slučaju vrste *T. versicolor* došlo do potpunog obezbojenja cijele površine agarnih ploča za sve ispitivane koncentracije bojila.

Tablica 4.3.2.2. Indeks obezbojenja kongo crvenila pomoću odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja (* djelomično obezbojenje, indeks obezbojenja = zona obezbojenja (mm) / zona rasta (mm))

Kongo crvenilo						
γ_{bojila}/mg dm^{-3}	**Indeks obezbojenja**					
Dan	**6.**	**10.**	**14.**	**6.**	**10.**	**14.**
	T. versicolor			***T. gibbosa***		
10	0,47	0,85	1,00	0,44	0,89	1,00
30	0,42	0,81	1,00	0,51*	0,96*	1,00*
50	0,42	0,70	1,00	0,52*	0,94*	1,00*
100	0,46*	0,71*	1,00*	0,52*	0,91*	1,00*
150	0,44*	0,57*	1,00*	0,38*	0,87*	1,00*
	G. lucidum			***G. resinaceum***		
10	0,70	0,92	1,00	1,02*	1,01*	1,00
30	0,72*	0,90*	0,91*	1,03*	1,02*	1,00*
50	0,72*	0,86*	0,90*	1,02*	1,02*	1,00*
100	0,73*	0,86*	0,90*	1,03*	1,01*	1,00*
150	0,66*	0,81*	0,88*	1,04*	1,02*	1,00*



Slika 4.3.2.2. Agarne ploče s dodatkom kongo crvenila (u koncentracijama od 10 mg dm^{-3} do 150 mg dm^{-3}) na kojima su uzgajane odabrane vrste gljiva bijelog truljenja tijekom 28 dana.

Na osnovu dobivenih rezultata, za daljnja istraživanja biološke obrade obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom odabrana je gljiva *T. versicolor*.

Kako bi se istražilo u kojoj mjeri koncentracija bojila dodana u podlogu inhibira rast gljive *T. versicolor* tijekom 28 dana uzgoja, gljiva je uzgajana na agarnim pločama s dodatkom metilenskog modrila i kongo crvenila u koncentracijama od 10 mg dm^{-3} do 1500 mg dm^{-3}. Kao i u prethodnim eksperimentima, zona rasta gljive te zona obezbojenja bojila mjerena je svaka 2 dana tijekom 14 dana uzgoja, dok je nakon 14. dana samo vizualno praćena sposobnost obezbojenja bojila. **Tablice 4.3.2.3**. i **4.3.2.4.** prikazuju rast gljive i sposobnost obezbojenja bojila na agarnim pločama s dodatkom bojila tijekom 14 dana uzgoja, dok **slike 4.3.2.2.** i **4.3.2.4.** prikazuju izgled agarnih ploča (obezbojenje) 14., 21. i 28. dana uzgoja.

Rezultati su obrađeni statističkim testom analize varijance ANOVA uz post-hock Bonferronijev test utvrđivanja razlike između podataka. Iz **tablice 4.3.2.3.** vidljivo je kako dodatak metilenskog modrila u podlogu inhibira rast gljive od 4. do 6. dana uzgoja, dok već od 10. dana uzgoja više nema značajnije inhibicije rasta bojilom, kada je ono dodano u koncentracijama do 500 mg dm^{-3}. Početak razgradnje bojila, koja se očituje u potpunom ili djelomičnom obezbojenju obojene agarne ploče, vidljiv je tek od 6. dana uzgoja. Metilensko modrilo dodano u hranjivu podlogu za uzgoj u koncentracijama većim od 500 mg dm^{-3} snažno inhibira rast gljive te negativno utječe na sposobnost razgradnje bojila (**slika 4.3.2.3.**).

Dodatak kongo crvenila u hranjivu podlogu za uzgoj gljive inhibira rast gljive od početka uzgoja, neovisno o koncentraciji (**tablica 4.3.2.4.**). Kao i u slučaju metilenskog modrila, nakon nekoliko dana prilagodbe gljive na uvjete uzgoja, inhibitorni učinak je prevladan. Tako je za koncentracije bojila manje od 100 mg dm^{-3} inhibitorni učinak bojila na rast prevladan već od 8. dana, dok je nakon 14. dana inhibitorni učinak na rast prevladan na svim podlogama s dodatkom bojila manjim od 200 mg dm^{-3}. Za koncentracijsko područje od 500 mg dm^{-3} do 1500 mg dm^{-3} ne dolazi do prorastanja podloge micelijem gljive, odnosno inhibitorni učinak na rast bio je prisutan do 28. dana uzgoja. Početak razgradnje bojila za sve uzorke primijećen je od 6. dana uzgoja. Ipak, za razliku od metilenskog modrila, u slučaju kongo crvenila pri svim ispitanim koncentracijama bojila dolazi do razgradnje, odnosno došlo je ili do potpunog ili do djelomičnog obezbojenja agarnih ploča s dodatkom bojila (**slika 4.3.2.4.**).

Tablica 4.3.2.3. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila pomoću *T. versicolor*

T. versicolor	**Metilensko modrilo**														
Dan	**0.**	**2.**		**4.**		**6.**		**8.**		**10.**		**12.**		**14.**	
γ_{bojila} / mg dm^{-3}	**ZR**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**
kontrola	5,00	30,54^{a}	-	65,07^{a}	-	81,58^{a}	-	90,00^{a}	-	90,00^{a}	-	90,00^{a}	-	90,00^{a}	-
10	5,00	27,37^{a}	0,00	58,91^{b}	0,00	80,94^{a}	23,86	90,00^{a}	46,52	90,00^{a}	53,95	90,00^{a}	60,00	90,00^{a}	90,00
30	5,00	26,04^{a}	0,00	56,71^{bc}	0,00	77,99^{ab}	35,18*	90,00^{a}	58,20	90,00^{a}	74,73	90,00^{a}	85,81	90,00^{a}	90,00
50	5,00	27,4^{a}	0,00	57,14^{b}	0,00	79,79^{a}	28,12*	90,00^{a}	55,76*	90,00^{a}	69,25*	90,00^{a}	45,79	90,00^{a}	47,61
100	5,00	28,49^{a}	0,00	54,60^{bc}	0,00	78,80^{ab}	32,64*	90,00^{a}	40,17*	90,00^{a}	67,80*	90,00^{a}	25,08	90,00^{a}	26,80
150	5,00	27^{a}	0,00	51,96^{c}	0,00	74,31^{b}	25,56*	90,00^{a}	26,50*	90,00^{a}	36,98*	90,00^{a}	37,21*	90,00^{a}	37,21*
200	5,00	19,28^{bc}	0,00	37,41^{d}	39,23*	57,30^{c}	57,30*	74,20^{b}	74,20*	83,76^{b}	83,76*	90,00^{a}	87,00*	90,00^{a}	87,00*
500	5,00	20,86^{b}	0,00	42,04^{d}	0,00	59,13^{c}	15,17*	75,3^{b}	18,23*	90,00^{a}	22,31*	90,00^{a}	24,12*	90,00^{a}	25,21*
800	5,00	14,7^{cd}	0,00	26,43^{e}	0,00	32,09^{d}	0,00	50,22^{c}	0,00	60,56^{c}	0,00	66,44^{b}	0,00	76,77^{b}	0,00
1000	5,00	13,16^{d}	0,00	19,62^{f}	0,00	27,75^{d}	0,00	31,21^{d}	0,00	38,3^{d}	0,00	43,59^{c}	0,00	47,78^{c}	0,00
1500	5,00	11,81^{d}	0,00	17,08^{f}	0,00	17,59^{e}	0,00	22,85^{e}	0,00	27,85^{e}	0,00	29,63^{d}	0,00	32,35^{d}	0,00

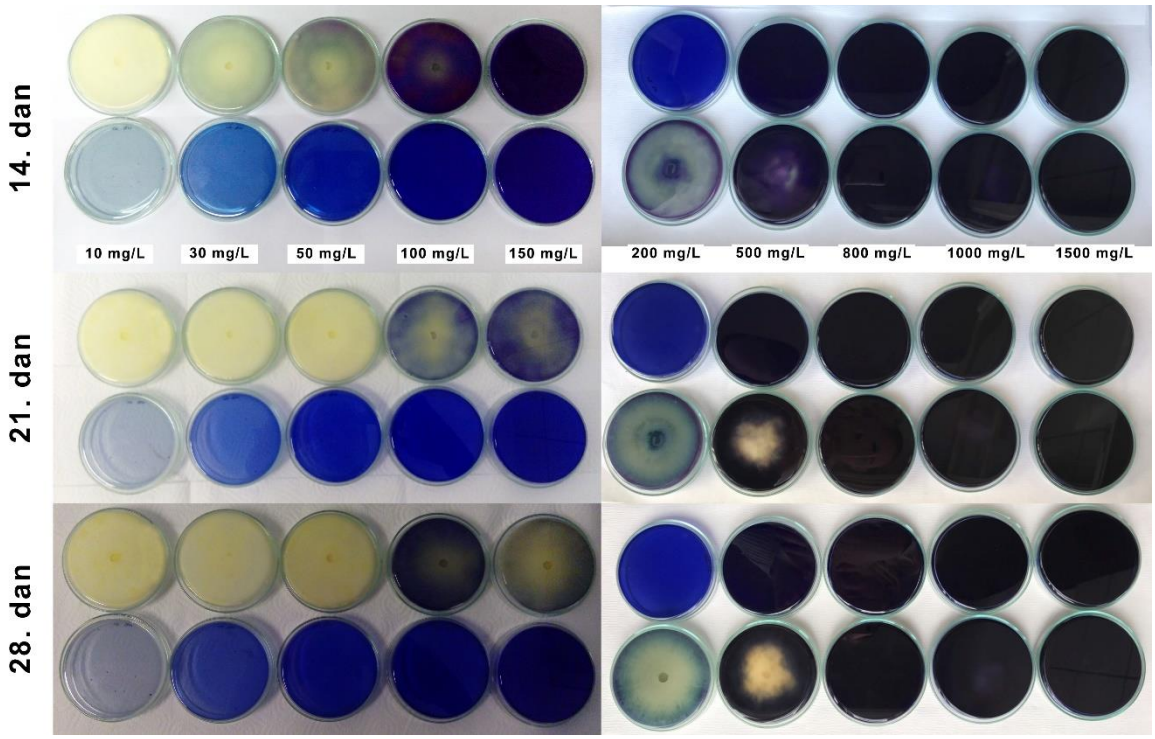
ZR- zona rasta, ZO- zona obezbojenja, * djelomično obezbojenje

prosječne vrijednosti u stupcima označene istim slovima nisu statistički značajne

Tablica 4.3.2.4. Rast i obezbojenje agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila pomoću *T. versicolor*

T. versicolor	**Kongo crvenilo**														
Dan	**0.**	**2.**		**4.**		**6.**		**8.**		**10.**		**12.**		**14.**	
γ_{bojila} / mg dm^{-3}	**ZR**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**	**ZR**	**ZO**
kontrola	5,00	30,54^{a}	-	65,07^{a}	-	81,58^{ab}	-	90,00^{a}	-	90,00^{a}	-	90,00^{a}	-	90,00^{a}	-
10	5,00	26,58^{ab}	0,00	59,12^{b}	0,00	82,37^{a}	38,89	90,00^{a}	72,78	90,00^{a}	76,53	90,00^{a}	90,00	90,00^{a}	90,00
30	5,00	24,63^{bc}	0,00	57,08^{b}	0,00	80,66^{ab}	33,90	90,00^{a}	68,60	90,00^{a}	72,83	90,00^{a}	90,00	90,00^{a}	90,00
50	5,00	24,57^{bc}	0,00	56,16^{b}	0,00	81,01^{ab}	34,42	90,00^{a}	60,42	90,00^{a}	63,11	90,00^{a}	90,00	90,00^{a}	90,00
100	5,00	25,65^{abc}	0,00	55,13^{b}	0,00	76,10^{b}	34,83*	90,00^{a}	57,37*	90,00^{a}	63,96*	90,00^{a}	90,00*	90,00^{a}	90,00*
150	5,00	23,08^{c}	0,00	43,54^{c}	0,00	65,10^{c}	28,42*	80,95^{b}	51,12*	90,00^{a}	51,68*	90,00^{a}	90,00*	90,00^{a}	90,00*
200	5,00	19,01^{d}	21,00*	36,10^{d}	37,07*	51,08^{d}	52,61*	65,73^{c}	69,77*	78,48^{b}	78,48*	83,16^{b}	82,66*	90,00^{a}	90,00*
500	5,00	17,61^{d}	19,93*	31,90^{de}	31,90*	46,66^{d}	43,64*	60,12^{d}	64,50*	67,99^{c}	72,68*	72,67^{c}	79,13*	76,15^{b}	82,74*
800	5,00	12,65^{e}	0,00	24,72^{f}	0,00	36,26^{e}	38,58*	42,7^{e}	50,98*	54,96^{d}	62,59*	62,15^{d}	69,63*	69,26^{c}	75,70*
1000	5,00	16,03^{d}	0,00	31,16^{e}	0,00	34,8^{e}	41,04*	42,09^{e}	53,15*	56,00^{e}	52,92*	59,20^{d}	59,20*	63,20^{d}	69,73*
1500	5,00	12,65e	0,00	18,59^{g}	0,00	24,69^{f}	0,00	31,64^{f}	38,12*	40,41^{f}	45,02*	46,98^{e}	53,21*	53,77^{e}	57,11*

ZR- zona rasta, ZO- zona obezbojenja, * djelomično obezbojenje,
prosječne vrijednosti u stupcima označene istim slovima nisu statistički značajne



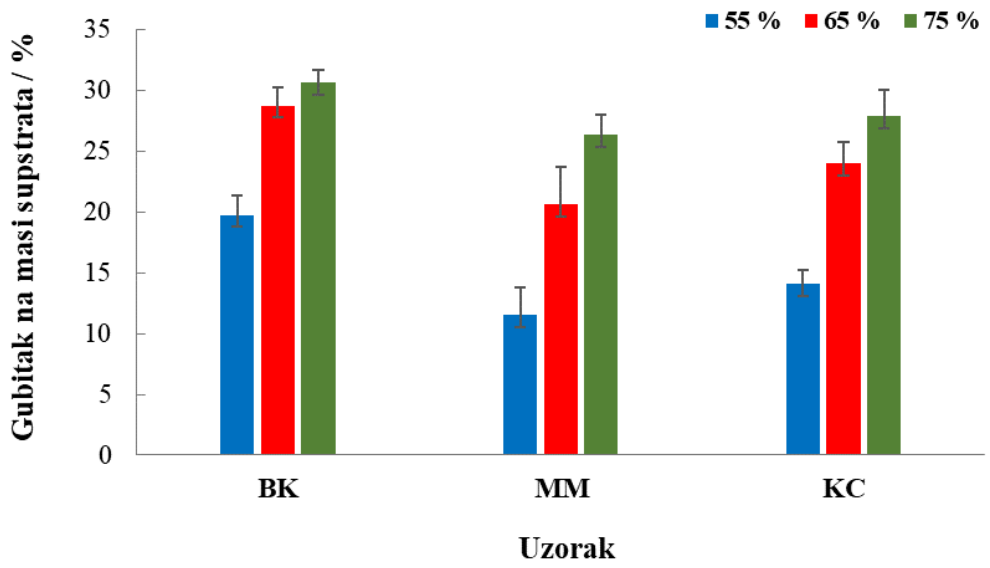
Slika 4.3.2.3. Izgled agarnih ploča s dodatkom metilenskog modrila (u koncentracijama od 10 do 1500 mg dm^{-3}) na kojima je uzgajana gljiva *T. versicolor* nakon 14, 21 i 28 dana uzgoja

Slika 4.3.2.4. Izgled agarnih ploča s dodatkom kongo crvenila (u koncentracijama od 10 do 1500 mg dm^{-3}) na kojima je uzgajana gljiva *T. versicolor* nakon 14, 21 i 28 dana uzgoja

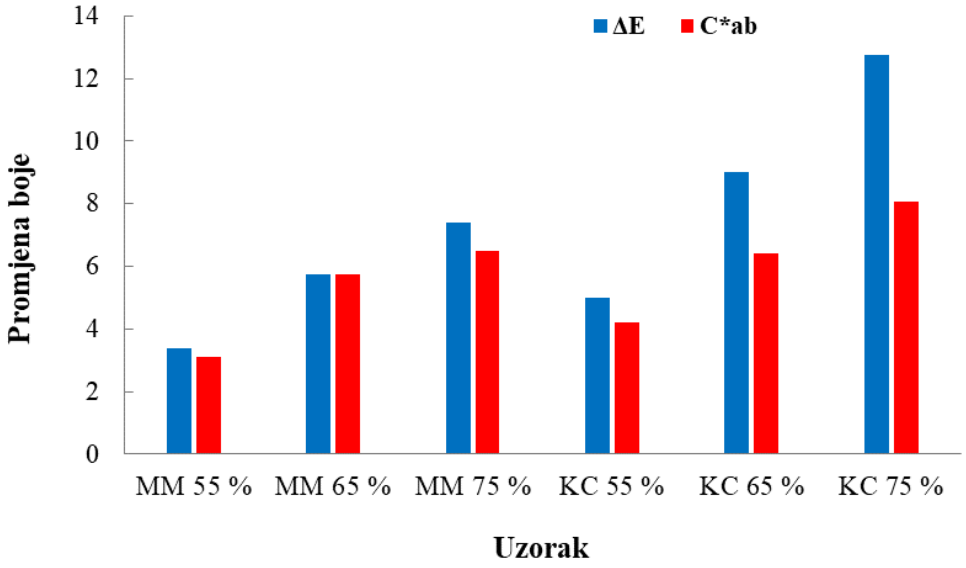
4.3.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa pomoću T. versicolor u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima

Uzorci obojenog pivskog tropa pripravljeni su na način da simuliraju uzorak zaostao nakon uklanjanja bojila iz (sintetske) otpadne vode, pri čemu je količina bojila adosrbirana na trop iznosila 10 mg_{bojila} / $g_{pivskog\ tropa}$. Provedena je biološka obrada u trajanju od 28 dana te je ispitan utjecaj početnog udjela vode u supstratu, temperature i miješanja na rast gljive. U uzorcima prije i nakon fermentacije praćeni su gubitak na masi supstrata i promjena boje. Rezultati su prikazani na **slikama 4.3.3.1. - 4.3.3.5.**

Na **slici 4.3.3.1.** prikazan je gubitak na masi supstrata biološki obrađenih uzoraka neobojenog pivskog tropa koji je služio kao biotička kontrola (BK), pivskog tropa obojanog metilenskim modrilom (MM) i pivskog tropa obojanog kongo crvenilom (KC) pri različitim početnim udjelima vode (55 %, 65 % i 75 %) i temperaturi 21 °C. Iz rezultata je vidljivo kako je za sve uzorke najveći gubitak na masi supstrata, odnosno najintenzivniji rast i razgradnja lignoceluloznih sastavnica, postignut kada je gljiva uzgajana na pivskom tropu s udjelom vode od 75 %. Općenito, povećanjem udjela vode u supstratu u svim uzorcima se povećao gubitak na masi supstrata. Očekivano, najveći gubitak na masi supstrata primijećen je u uzorcima biotičke kontrole za sve ispitane početne udjele vode. U obojenim uzorcima pivskog tropa, gubitak na masi supstrata bio je manji u odnosu na biotičku kontrolu, vjerojatno kao posljedica inhibicije rasta gljive metilenskim modrilom i kongo crvenilom. Rast gljive na uzorcima obojanim kongo crvenilom bio je nešto intenzivniji (što se očituje u većem gubitku na masi supstrata) u odnosu na uzorke obojane metilenskim modrilom. Dobivene rezultate dodatno potvrđuju rezultati prikazani na **slici 4.3.3.2.** koji prikazuju promjene parametara boje uzoraka (ΔE = ukupna promjena boje, C^*ab = promjena intenziteta boje) obojenog pivskog tropa (MM i KC) nakon biološke obrade u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Promjena parametra boje uzoraka izražena je u odnosu na pripadajuću abiotičku kontrolu, koju je činio obojeni pivski trop različitih udjela vode. Kao rezultat celulolitičke i lignolitičke aktivnosti gljive tijekom rasta na pivskom tropu (što se ogleda u gubitku na masi uzorka), može doći i do istovremene razgradnje bojila koja je katalizirana lignolitičkim enzimima. Kao i u slučaju gubitka na masi, najveće promjene parametara boje primijećene su za uzorke obojenog pivskog tropa s udjelom vode od 75 %, odnosno povećanje udjela vode u uzorcima rezultiralo je većom promjenom parametara boje uzoraka. Biološka obrada uzoraka pivskog tropa obojenog kongo crvenilom rezultirala je većom promjenom parametara boje u odnosu na uzorke obojane metilenskim modrilom, odnosno većom razgradnjom bojila. Na osnovu ovih rezultata, za provođenje druge serije eksperimenata, tijekom kojih je ispitan utjecaj temperature uzgoja i miješanja na rast gljive, odabran je udjel vode u pivskom tropu od 75 %.

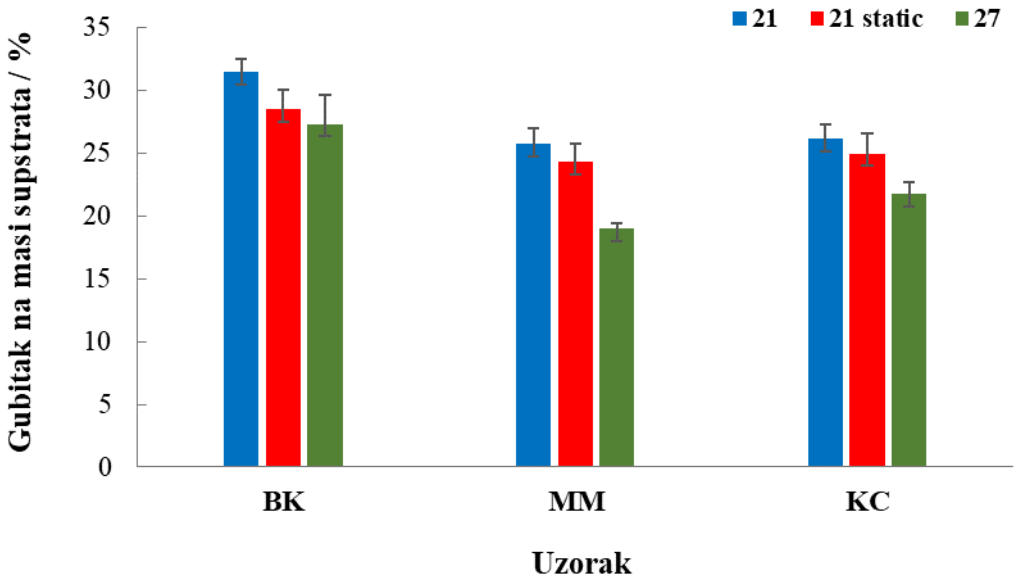


Slika 4.3.3.1. Gubitak na masi supstrata biološki obrađenih uzoraka pivskog tropa (BK), pivskog tropa obojanog metilenskim modrilom (MM) i pivskog tropa obojanog kongo crvenilom (KC) pomoću gljive *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima (nakon 28 dana uzgoja) pri različitim početnim udjelima vode (55 %, 65 % i 75 %) i temperaturi 21 °C.



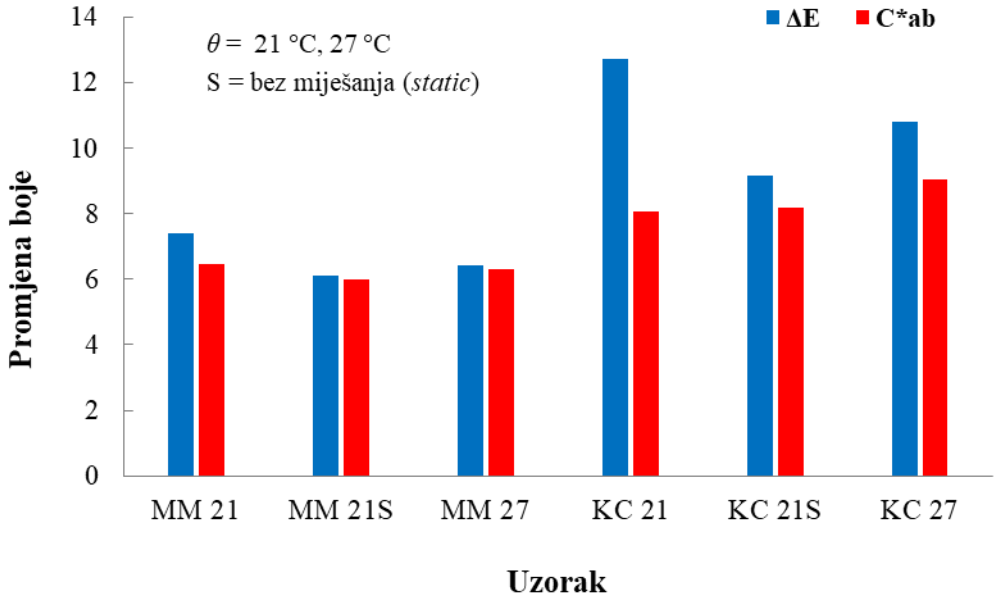
Slika 4.3.3.2. Promjene parametara boje uzoraka (ΔE = ukupna promjena boje, C^*_{ab} = promjena intenziteta boje) obojenog pivskog tropa (MM i KC) nakon biološke obrade pomoću gljive *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima (nakon 28 dana uzgoja, pri temperaturi 25 °C) u odnosu na pripadajuće abiotičke kontrole pri različitim početnim udjelima vode od 55 %, 65 % i 75 % (SD < 0,91, n = 3).

Slika 4.3.3.3. prikazuje gubitak na masi supstrata biološki obrađenih uzoraka neobojenog biotička kontrola (BK) te pivskog tropa obojanog metilenskim modrilom (MM) i pivskog tropa obojanog kongo crvenilom (KC) pri različitim temperaturama (21 °C i 27 °C) i različitim režimima uzgoja (s miješanjem i bez miješanja-"static ili statično"). Pri svim uvjetima uzgoja najintenzivniji rast gljive i posljedično najveći gubitak na masi supstrata primijećen je za biotičku kontrolu. Pri tome je najveći gubitak (31,45 %) ostvaren kada je gljiva uzgajana pri temperaturi od 21 °C uz povremeno miješanje sadržaja staklenki. Uzgoj na istoj temperaturi bez miješanja (21 static) rezultirao je nešto manjim gubitkom na masi supstrata (28,45 %), dok je najmanji gubitak na masi supstrata postignut uzgojem na temperaturi od 27 °C (24,4 %). Najveći gubitak na masi postignut za gljivu uzgajanu na obojenom pivskom tropu također je postignut kada je gljiva uzgajana pri temperaturi od 21 °C uz povremeno miješanje sadržaja staklenki i iznosio je 25,70 % za metilensko modrilo i 26,10 % za kongo crvenilo. Pri temperaturi od 27 °C došlo je do značajnijeg isušivanja supstrata, što je posljedično dovelo do smanjenja udjela vode u supstratu i manje intenzivnog rasta gljive. Isto je primijećeno i za uzorke obojenog pivskog tropa. Najveći gubitak na masi supstrata postignut je uzgojem gljive pri 21 °C uz povremeno miješanje sadržaja staklenki. Ipak, razlika između uzoraka koji su miješani i onih koji nisu miješani je vrlo mala. I za obojene uzorke primijećeno je isušivanje supstrata i manje intenzivan rast gljive prilikom uzgoja pri 27 °C.



Slika 4.3.3.3. Gubitak na masi supstrata biološki obrađenih uzoraka pivskog tropa (BK), pivskog tropa obojanog metilenskim modrilom (MM) i pivskog tropa obojanog kongo crvenilom (KC) pomoću gljive *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima (nakon 28 dana uzgoja) pri različitim temperaturama (21 °C i 27 °C) te s miješanjem i bez miješanja sadržaja staklenki (static).

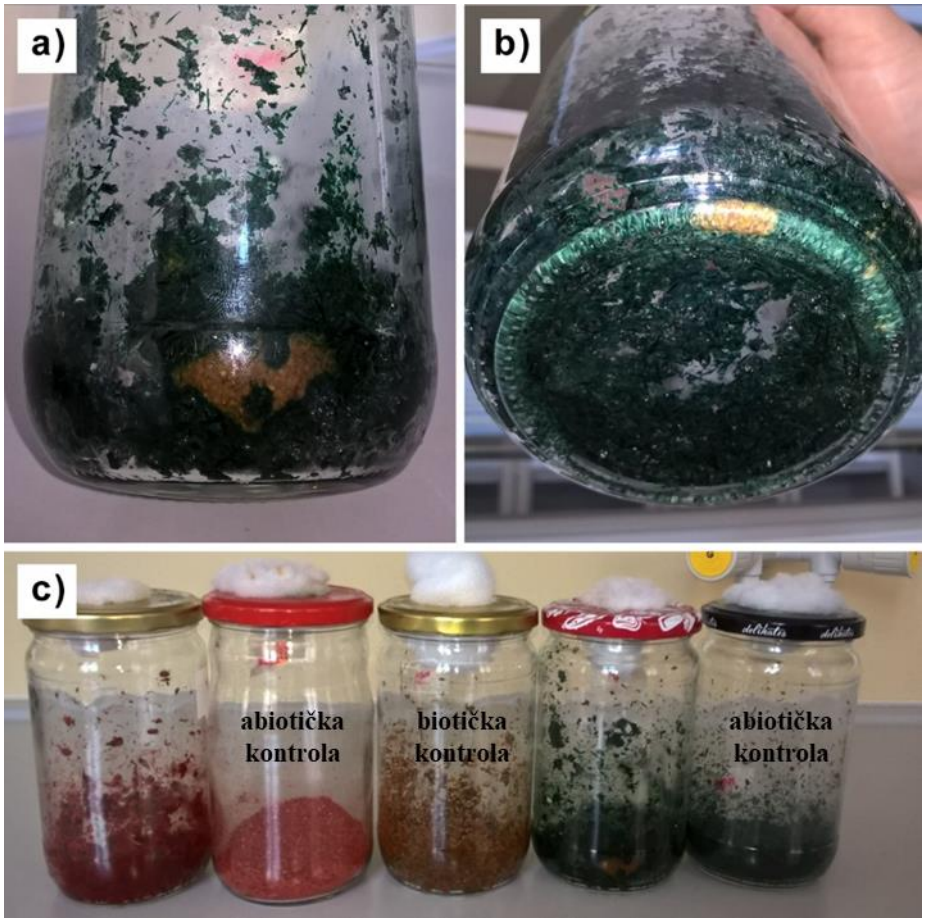
Na **slici 4.3.3.4.** prikazane su promjene parametara boje uzoraka obojenog pivskog tropa (MM i KC) u odnosu na pripadajuće abiotičke kontrole nakon biološke obrade u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima na 21 °C i 27 °C te s miješanjem i bez miješanja sadržaja staklenki (21 static). Najveće promjene parametara boje primijećene su u uzorcima obojenog pivskog tropa nakon uzgoja gljive na 21 °C uz miješanje. U slučaju pivskog tropa obojenog metilenskim modrilom promjena režima uzgoja (bez miješanja) i promjena temperature uzgoja (27 °C) rezultirale su nešto manjom promjenom parametara boje u odnosu na uzorak dobiven nakon uzgoja gljive na 21 °C i uz miješanje, ali je to smanjenje u odnosu na uzorak MM 21 podjednako za oba uzorka. Promjene parametara boje u uzorcima pivskog tropa obojanog kongo crvenilom rastu u nizu: KC 21 > KC 27 > KC 21S. I u drugoj seriji eksperimenata biološke obrade obojenih uzoraka pivskog tropa veća promjena parametra boje primijećena je u uzorcima pivskog tropa obojenog kongo crvenilom, u odnosu na uzorke obojene metilenskim modrilom.



Slika 4.3.3.4. Promjene parametara boje uzoraka (Δ*E* = ukupna promjena boje, C^*_{ab} = promjena intenziteta boje) obojenog pivskog tropa (MM i KC) nakon biološke obrade pomoću gljive *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima (nakon 28 dana uzgoja) u odnosu na pripadajuće abiotičke kontrole pri različitim temperaturama (21 °C i 27 °C) te s miješanjem i bez miješanja sadržaja staklenki (static). (SD < 0,85, *n* =3)

Slika 4.3.3.5. prikazuje izgled obojenog tropa nakon biološke obrade pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* nakon 28 dana uzgoja. U uzorcima biološki obrađenog pivskog tropa obojenog metilenskim modrilom vidljivi su u potpunosti obezbojeni dijelovi supstrata, što nije

slučaj s uzorcima obojenim kongo crvenilom, iako je promjena parametara boje u obje serije eksperimenata za uzorke obojene kongo crvenilom bila veća. Nadalje, na slici su vidljivi biološki obrađeni uzorci s pripadajućim abiotičkim kontrolama te biotičkom kontrolom. U usporedbi sa (svjetlijim) abiotičkim kontrolama u kojima je s vremenom došlo do smanjenja udjela vode zbog isušivanja, biološki obrađeni obojeni uzorci imaju veći udjel vode (zbog nastajanja metaboličke vode ne dolazi do isušivanja) pa su vizualno tamniji.



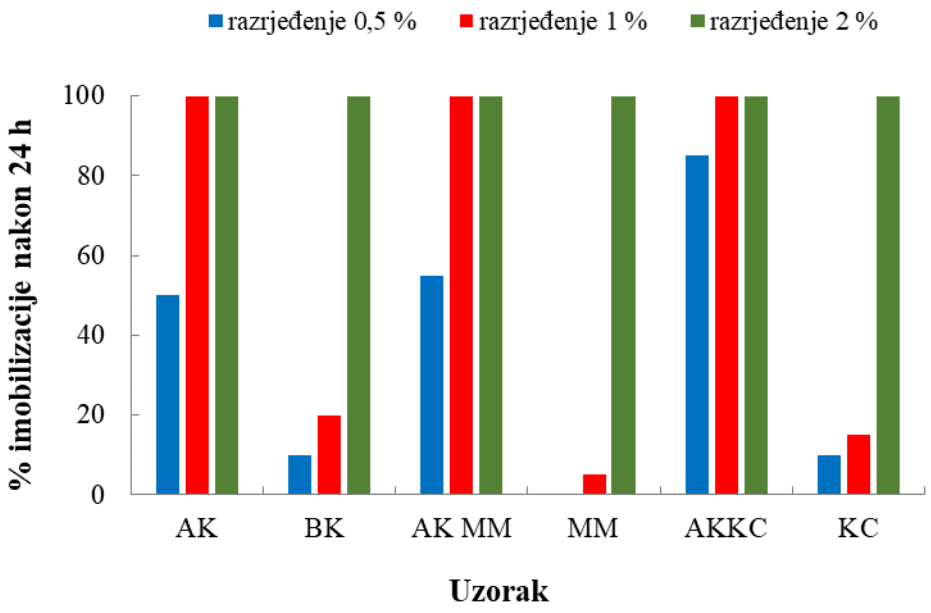
Slika 4.3.3.5. Izgled obojenog tropa nakon biološke obrade pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* nakon 28 dana uzgoja: a) i b) trop obojen s metilenskim modrilom s vidljivim u potpunosti obezbojenim dijelovima supstrata; c) usporedba obojenih biološki obrađenih uzoraka (tamniji, vlažniji) s pripadajućim abiotičkim kontrolama (svjetliji, suhi uzorak) te biotičkom kontrolom (u sredini)

4.3.4. Određivanje akutne toksičnosti uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa – određivanje imobilizacije slatkovodnog račića Daphnia magna

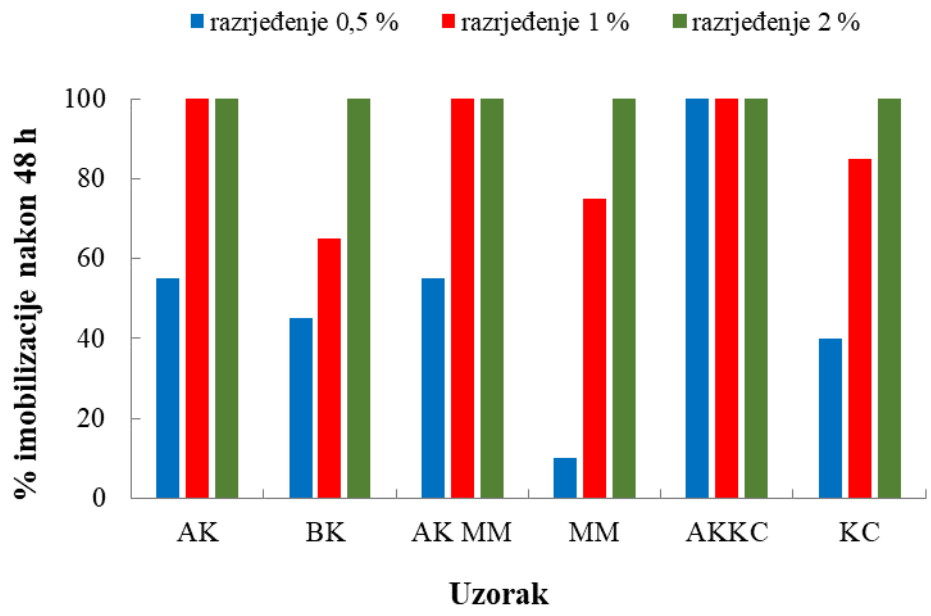
Nakon provedene biološke obrade obojanih uzoraka pivskog tropa pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor*, odabrani su uzorci za provođenje ekotoksikološkog testiranja biološki obrađenih uzoraka te njihovih pripadajućih abiotičkih kontrola s ciljem određivanja akutne toksičnosti na modelni organizam slatkovodni račić *Daphnia magna.* Test uključuje određivanje imobilizacije račića nakon izlaganja uzorku u trajanju od 24 ili 48 sati pri uvjetima preciziranim standardnom metodom HRN EN ISO 6341:2013. Pod imobilizacijom se smatra nemogućnost pokretanja (plivanja) račića i nakon laganog miješanja testnih otopina (čak i u slučaju mogućnosti pomicanja ticala).

Rezultati provedenih ekotoksikoloških testiranja prikazani su na **slici 4.3.4.1.A** Rezultati koji prikazuju postotak imobilizacije račića nakon 24 h izlaganja uzorku za razrjeđenje 2 % potvrđuju kako su svi uzorci, uključujući i neobojenu abiotičku kontrolu toksični. Takvi rezultati su očekivani, budući su uzorci za biološku obradu pripremljeni na način da simuliraju uklanjanje bojila iz otpadnih voda i priređeni su sa sintetskom otpadnom vodom, koja je i bez dodatka bojila pri navedenom razrjeđenju toksična za modelni organizam. Pri razrjeđenju od 1 % svi biološki obrađeni uzorci (BK, MM i KC) pokazuju značajno smanjenje postotka imobilizacije modelnog organizma, odnosno smanjenje toksičnosti nakon biološke obrade gljivom *T. versicolor*. Uslijed daljnjeg razrjeđenja uzoraka (0,5 %) dolazi do smanjenja toksičnosti i svih abiotičkih kontrola, pri čemu je to smanjenje najmanje za abiotičku kontrolu kongo crvenila. Smanjenje postotka imobilizacije račića za sve biološke uzorke pri ovom razrjeđenju je $\leq$ 10 %.

Slika 4.3.4.1.B prikazuje postotak imobilizacije račića nakon 48 h izlaganja istim uzorcima. I nakon 48 sati primijećeno je smanjenje postotka imobilizacije u svim biološki obrađenim uzorcima i razrjeđenjima 1 % i 0,5 %. Postotak imobilizacije je očekivano veći nego nakon 24 h izlaganja, ali i dalje je vidljivo kako se nakon biološke obrade uzoraka smanjuje postotak imobilizacije modelnog organizma, odnosno biološkom obradom uzoraka postiže se smanjenje polazne toksičnosti.



A



B

Slika 4.3.4.1. Akutna toksičnost uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa (pivski trop obojan metilenskim modrilom MM i kongo crvenilom KC) i pripadajućih biotičkih (biološki obrađen pivski trop, BK) i abiotičkih kontrola (pivski trop AK, pivski trop obijan metilenskim modrilom AK MM i kongo crvenilom AK KC) na slatkovodni račić *D. magna*: A) nakon izlaganja uzorku u trajanju od 24 h, B) nakon izlaganja uzorku u trajanju od 48 h

5. RASPRAVA

5.1. Karakterizacija adsorbensa

Često se kao prvi korak u istraživanju novih materijala kao potencijalnih adsorbensa provodi njihova fizikalno-kemijska i morfološka karakterizacija. Tako je i u ovom radu provedena karakterizacija pivskog tropa kao potencijalnog adsorbensa za uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina.

Kemijski sastav i karakteristike pivskog tropa prikazane u **tablici 4.1.1.** u skladu su s rezultatima drugih istraživanja kojima je cilj bio provesti sveobuhvatnu analizu pivskog tropa od mjesta nastajanja do potencijalne primjene (Ikram i sur., 2017; Pejin i sur., 2013; Santos i sur., 2009; Jay i sur., 2008; Mussato i sur., 2006), kao i istražiti mogućnost primjene pivskog tropa kao adsorbensa za uklanjanje različitih bojila (de Araújo i sur., 2020; da Silva i sur., 2019; Fontana i sur., 2016). Santos i sur. (2009) navode kako je postotak suhe tvari pivskog tropa pristiglog iz pivovare manji od 30 % , pri čemu kemijski sastav pivskog tropa može varirati ovisno o korištenim sirovinama te primijenjenoj tehnologiji. Rezultati elementne analize u skladu su s rezultatima de Araújo i suradnika (2020), kao i s pregledom rezultata drugih autora prikazanih u navedenom radu (de Araújo i sur., 2020). Autori navode kako su udjeli C od 46,64 % do 49,70 %, dok su udjeli vodika od 6,54 % do 8,18 % te udjeli N od 3,60 % do 3,86 %. Nešto veći udjel N dobiven ovim istraživanjem vjerojatno je rezultat većeg udjela N u osnovnim sirovinama koje se koriste za proizvodnju piva, posebno pivarskog ječma. Nadalje, udjeli pepela koje navode isti autori iznose od 2,20 % do 3,80 %, što je također u skladu s rezultatima dobivenim u okviru ovog doktorskog rada. Udjel ekstraktivnih tvari (koje u najvećoj mjeri uključuju lipide) određene u pivskom tropu odgovara udjelu lipida od 10,6 % koju su u pivskom tropu odredili Mussato i suradnici (2006). Rezultati dobiveni određivanjem proteina u ovom radu također su u skladu s udjelima proteina koje navode gore navedeni autori od 15,2 % do 24 %. Pivski trop, kao proizvodni ostatak iz prehrambene industrije, ubraja se u skupinu materijala koji sadrže značajne udjele celuloze, hemiceluloze i lignina. Glavna karakteristika navedenih lignocelulozних polimera je, kako je već navedeno, velik broj raspoloživih funkcijskih skupina poput –OH i –COOH koje sudjeluju u procesu adsorpcije. U ovom radu određeni su udjeli celuloze i lignina, čije su vrijednosti usporedive s onima koje navode Mussato i suradnici (2006), a koji se kreću u rasponu od 16,8 % do 25,4 % za celulozu i od 11,9 % do 27,8 % za lignin. Menses i suradnici (2013) navode kako su najvažniji minerali prisutni u pivskom tropu Ca (3600 mg kg^{-1}), Mg (1900 mg kg^{-1}) i Na (600 mg kg^{-1}) dok u manjoj koncentraciji od navedenih prisutni Fe, Na, Mn, Zn, Al, Co, Cu, Sr, Ba, Mo, Pb, Se, Cr, Ni, Cd. U sklopu ovog rada u pivskom tropu su određene koncentracije teških metala koji se uobičajeno prate u otpadnim vodama, a koji bi mogli uzrokovati sekundarno onečišćenje otpadnih voda zbog mogućeg izluživanja iz pivskog tropa tijekom adsorpcije. Koncentracije tih metala prikazane u **tablici 4.1.1.** u skladu su s koncentracijama koje su u pivskom tropu naveli Menses i suradnici (2013), osim koncentracija Cu, Cr i Ni koje su u ovom radu nešto veće, što može biti posljedica uzgoja sirovine ili kontaminacije sirovine tijekom proizvodnog procesa putem opreme.

Osim fizikalno-kemijske analize pivskog tropa, provedena je i analiza veličine čestica pivskog tropa pristiglog iz pivovare (nakon sušenja) te pivskog tropa nakon usitnjavanja mljevenjem. Veličina čestica materijala utječu na mnoge njegove karakteristike poput izgleda, teksture, okusa, reaktivnosti, viskoznosti, specifične površine, nasipne gustoće, poroznosti, brzine tečenja i sl. (Ikenyiri i Ukpaka, 2016). Veličina čestica adsorbensa utječe na proces

adsorpcije, odnosno na učinkovitost uklanjanja onečišćujućih tvari iz vode primjenom adsorbensa, jer smanjenje veličine čestica adsorbensa kao posljedicu ima veću specifičnu površinu dostupnu za vezanje adsorbata (De Gisi i sur., 2016). Usitnjavanjem materijala smanjuje se veličina čestica te dolazi do povećanja specifične površine, što, posljedično, može utjecati na povećanje učinkovitosti procesa adsorpcije. Zbog toga se često kao dio pripreme lignoceluloznih materijala za korištenje kao adsorbensa provodi prethodno usitnjavanje materijala (Moosavi i sur.; 2020), što je provedeno i u ovom istraživanju. Za analizu veličine čestica koriste se različite metode, od kojih je za odjeljivanje čestica unutar uskih granica najbrža i najpogodnija analiza pomoću standardnih laboratorijskih sita. Rezultati granulometrijske analize pokazali su kako je 61,94 % svih čestica nesamljevenog pivskog tropa veće od 1 mm, dok je nakon usitnjavanja 68,1 % svih čestica bio u rasponu od 0,1 mm do 0,4 mm. S obzirom na moguću primjenu pivskog tropa kao adsorbensa u realnim sustavima, odnosno u industrijskom mjerilu, važno je znati kakva je raspodjela veličine čestica, kako bi se u konačnici za provođenje adsorpcije odabrao onaj raspon veličina čestica koji će osigurati velik postotak uklanjanja onečišćujućih tvari, uz istovremenu malu količinu neiskorištenog adsorpcijskog materijala (zbog neodgovarajuće veličine čestica).

Osim veličine čestica adsorbensa, važni čimbenici koji utječu na adsorpciju su i površina i struktura pora adsorbensa, kao i kemijski sastav adsorbensa, odnosno prisutnost različitih funkcijskih skupina. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) je metoda koja se često koristi kako bi se odredile morfološke i strukturne karakteristike površine adsorbensa. SEM mikrografije prikazane su na **slici 4.1.3.** i u skladu su s rezultatima drugih autora koji također navode kako je površina pivskog tropa heterogena, gruba i neravna te su vidljive pore različitih veličina (de Araújo i sur., 2020; da Silva i sur., 2019; Contreras i sur., 2012). Prisutnost pora može pozitivno utjecati na proces adsorpcije, zbog veće površine dostupne za adsorpciju bojila na pivski trop, kao i zbog olakšavanja kretanja vodene faze kroz strukturu adsorbensa, odnosno olakšavanja unutarnje difuzije adsorbata (Kukić, 2016.). Općenito, opisana morfologija utječe povoljno na vezanje molekula adsorbata (da Silva i sur., 2019).

Kvalitativna analiza specifičnih funkcijskih skupina na površini adsorbensa, koje utječu na učinkovitost procesa adsorpcije, najčešće se provodi primjenom FT-IR metode. FT-IR spektri pivskog tropa prije i nakon adsorpcije bojila prikazane su na **slici 4.1.4.** Specifične vrpce koje su uočljive na sva tri spektra odgovaraju vrpcama koje kao najvažnije, odnosno dominantne, za pivski trop navode i drugi autori. Široka vrpca u području od 3460 cm^{-1} do 3388 cm^{-1} (istezanja O-H veze), vrpca s dva maksimuma od 2925 cm^{-1} do 2916 cm^{-1} i 2861 cm^{-1} do 2855 cm^{-1} (istezanja –CH skupina), 1666 cm^{-1} do 1632 cm^{-1} (istezanja C=O) te 1027 cm^{-1} (C–O, C=C i C–C–O istezanja) (de Araújo i sur., 2020; da Silva i sur., 2019; Juchen i sur., 2018).

Poznavanje točke nul naboja adsorbensa (pH_{pzc}) važno je kako bi se bolje razumjela elektrostatska međudjelovanja između površine adsorbensa i adsorbata pri određenoj pH vrijednosti okoline. Pri pH vrijednostima manjima od pH_{pzc} površina adsorbensa pozitivno je nabijena, što su uvjeti koji pogoduju adsorpciji anionskih bojila, poput kongo crvenila (Fiol i Villaescusa, 2009). S druge strane, kada je pH veći od pH_{pzc} površina adsorbensa nabijena je negativno, što pogoduje adsorpciji kationskih bojila, kao što je metilensko modrilo. Točka nul naboja pivskog tropa pH_{pzc} = 6,5, približna je točki nul naboja koju za pivski trop navode de Araújo i suradnici (2020) i da Silva i suradnici (2019) i koja je iznosila 6,75.

5.2. Adsorpcija metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina na pivski trop

Utjecaj veličine čestica adsorbensa na proces adsorpcije. Primjenjivost neusitnjenog pivskog tropa u obliku u kojem on pristiže iz pivovare, kao i utjecaj veličine čestica usitnjenog i klasiranog pivskog tropa na adosrpciju metilenskog modrila i kongo crvenila istraženi su u sklopu ovog rada te su rezultati prikazani na **slikama 4.2.1.1.** i **4.2.1.2.** pokazali kako se postotak uklanjanja oba bojila povećava sa smanjenjem veličine čestica adsorbensa. Slične rezultate dobili su Chanzu i suradnici (2019) za uklanjanje kongo crvenila i malahitnog zelenila iz vodenih otopina adsorpcijom na pivski trop. Proveli su ispitivanja koristeći tri klase čestica: < 0,3 mm, od 0,3 mm do 0,425 mm i > 0,425 mm. Postotak uklanjanja kongo crvenila iznosio je 10 % za klasu čestica > 0,425 mm, dok je za najmanju klasu čestica postotak uklanjanja iznosio 49 %. Drugi autori koji su koristili pivski trop kao adsorbens za uklanjanje metilenskog modrila (de Araújo i sur., 2020), reaktivne žute (da Silva i sur., 2019), reaktivne plave BF-5G (Juchen i sur., 2018), narančaste solimax TGL 182 % (OS-TGL) (Fontana, 2016) navode kako veličina čestica adsorbensa nije imala značajan utjecaj na postotak uklanjanja bojila. Ipak, primjenom drugih lignoceluloznih materijala različitih veličina čestica za uklanjanje metilenskog modrila, poput kore limete (Shakoor i Nasar, 2016) ili biomase oleandra (Abu-El-Halawa i sur., 2016) također je potvrđeno kako smanjenjem veličine čestica adsorbensa dolazi do povećanja postotka uklanjanja bojila. Al-Ghouti i sur., (2010) navode kako usitnjavanjem čestica adsorbensa vjerojatno dolazi do otvaranja zatvorenih pora u njegovoj unutrašnjosti, koje zatim postaju dostupne za vezivanje adsorbata. Kukić (2016) navodi kako manje čestice imaju veću specifičnu površinu, što posljedično znači veći broj adsorpcijskih mjesta dostupnih za vezanje adsorbata te učinkovitiju adsorpciju. Smanjenjem veličine čestica u sustavu čvrsto-tekuće intenzivira se proces prijenosa mase zbog manjih difuzijskih otpora. Ipak, u slučaju kada su čestice premalene, teže se izdvajaju iz vode nakon završene adsorpcije, što može dovesti do povećavanja troškova separacije adsorbensa (Kukić, 2016).

Utjecaj koncentracije adsorbensa na proces adsorpcije. Koncentracija adsorbensa ima značajan utjecaj na proces adsorpcije, zbog površine adsorbensa dostupne za vezivanje adsorbata, odnosno broja adsorpcijskih mjesta. Pravilan odabir koncentracije adsorbensa važan je kako s tehnološkog, tako i s ekonomskog stajališta provođenja adsorpcije (Kukić, 2016). Iz rezultata prikazanih na **slici 4.2.2.1.** vidljivo je kako povećanjem koncentracije adsorbensa dolazi do povećanja postotka uklanjanja oba bojila, ali i istovremenog smanjenja adosrpcijskog kapaciteta. Do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta s povećanjem koncentracije adsorbensa dolazi zbog povećanja površine dostupne za vezivanje iste količine adsorbata, pri čemu se adsorbira manja količina adsorbata po jedinici mase adsorbensa (Kukić, 2016). Povećanje postotka uklanjanja bojila s povećanjem koncentracije adsorbensa u skladu je s rezultatima drugih autora, poput adsorpcije metilenskog modrila na koru limete (Shakoor i Nasar, 2016), biomasu oleandra (Abu-El-Halawa i sur., 2016), koru krumpira (Gupta i sur., 2016), koru kruhovca (Hameed, 2008) te adsorpcije kongo crvenila na pivski trop (Chanzu, i sur., 2019), korijen biljke *E. crassipes* (Wanyonyi i sur., 2014), aktiviranu oduljenu gorušicu (Jain i Sikarwar, 2014) i korijen rogoza (Hu i sur., 2010).

Utjecaj vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila na proces adsorpcije. Adsorpcija je proces ovisan o vremenu kontakta između adsorbensa i adsorbata te je važno poznavati optimalno vrijeme trajanja adsorpcije, kako za optimizaciju procesa tako i za primjenu nekog adsorbensa u realnim uvjetima za obradu voda (Kukić, 2016). Jedna od karakteristika idealnog adsorbensa je da brzo adsorbira adsorbat iz tekuće faze te da dolazi do brzog uspostavljanja ravnotežnog stanja. Iz rezultata prikazanih na **slikama 4.2.3.1.** i **4.2.3.2.** vidljivo je kako je uklanjanje oba bojila karakterizirano brzim uklanjanjem tijekom prvih 20 min adsorpcije. Nakon početnog brzog uklanjanja bojila, u kasnijim fazama eksperimenta uklanjanje postaje sporije do trenutka kada se postiže ravnoteža. Veći postotak uklanjanja bojila u početnim fazama adsorpcije može se pripisati većoj (slobodnoj) površini koja je dostupna za adsorpciju bojila, dok je u kasnijim fazama eksperimenta manje preostalih slobodnih adsorpcijskih mjesta te brzina uklanjanja bojila postaje sporija (Wanyonyi i sur., 2014).

Nadalje, rezultati su pokazali kako povećanjem početne koncentracije bojila dolazi do povećanja količine adsorbiranog bojila po masi adsorbensa (q_t), odnosno u slučaju uspostavljanja ravnotežnog stanja dolazi do povećanja adsorpcijskog kapaciteta (q_e) s povećanjem početne koncentracije bojila. Ti rezultati ukazuju kako je uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop proces ovisan o koncentraciji bojila, što je u skladu s rezultatima drugih autora koji su koristili lignocelulozne adsorbense za uklanjanje tih bojila, poput otpada iz proizvodnje pamuka (Haque i sur., 2020), korijena biljke *E. crassipes* (Wanyonyi i sur., 2014), ljuske bijelog luka (Hameed i Ahmad, 2009) i kore kruhovca (Hameed, 2008). Veća početna koncentracija bojila rezultira većim koncentracijskim gradijentom, odnosno većom pokretačkom silom za prevladavanje otpora za prijenos molekula bojila između dvije faze - tekuće i čvrste. Slijedom toga, povećava se količina bojila koja se adsorbira po jedinici mase adsorbensa u stanju ravnoteže (Abu-El-Halawa i sur., 2016). Dakle, pri većim koncentracijama adsorbata veći je broj zauzetih adsorpcijskih mjesta, pa se adsorpcijski kapacitet povećava. Pri tome se često smanjuje učinkovitost procesa uklanjanja adsorbata, odnosno postotak uklanjanja adorbata (Kukić, 2016), što je za slučaj uklanjanja malahitnog zelenila adsorpcijom na pivski trop potvrdilo istraživanje koje su proveli Reis i suradnici (2018). Za metilensko modrilo ovaj je trend uočen za početne koncentracije bojila u području od 10 mg dm^{-3} do 40 mg dm^{-3}. U koncentracijskom području od 50 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} dolazi do povećanja postotka uklanjanja bojila. U slučaju uklanjanja kongo crvenila ovaj trend je suprotan: porast postotka uklanjanja s povećanjem početne koncentracije bojila u području od 10 mg dm^{-3} do 40 mg dm^{-3}, nakon kojeg slijedi smanjenje postotka uklanjanja u koncentracijskom području od 50 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3}.

Utjecaj pH na proces adsorpcije. Promjena pH sustava u kojem se odvija proces adsorpcije može dovesti do promjene aktivnog mjesta adsorbensa, kao i do promjene naboja samog bojila (Crini i sur., 2007), što značajno utječe na sam proces adsorpcije. Utjecaj pH otopine metilenskog modrila i kongo crvenila na adsorpcijski kapacitet pivskog tropa te na postotak uklanjanja ovih bojila prikazan je na **slici 4.2.4.1.** Veći adsorpcijski kapacitet i veći postotak uklanjanja metilenskog modrila adosrpcijom na pivski trop postignuti su pri pH vrijednostima od 7 do 10, odnosno u pH području većem od pH_{pzc}. Rezultati istraživanja koje su proveli de Araújo i suradnici (2020) također koristeći pivski trop za uklanjanje metilenskog modrila

potvrđuju rezultat dobiven ovim istraživanjem te navode kako je najveći adsorpcijski kapacitet koji je iznosio 95,2 mg g^{-1} postignut pri pH = 11. Nepovoljan utjecaj kiselog medija na uklanjanje metilenskog modrila iz vodenih otopina adsorpcijom potvrđuju i rezultati istraživanja u kojima su primijenjeni drugi lignocelulozni adsorbensi poput iscrpljenog lignoceluloznog supstrata zaostalog nakon uzgoja gljiva (Yan i Wang, 2013), celolignina – proizvodnog ostatka drvne industrije (Suteu i Malutan, 2013), kore kruhovca (Hameed, 2008) i piljevine cedrovine (Hamdaoui, 2006). Veći postotak uklanjanja kongo crvenila na pivski trop i veći adsorpcijski kapacitet postignuti su pri pH vrijednostima od 4 do 7, odnosno u pH području manjem od pH_{pzc} (uz izuzetak pH = 7). Iako su u pH području od 5 do 7 vrijednosti postotka uklanjanja kongo crvenila i adsorpcijski kapacitet gotovo konstantni, najveći postotak uklanjanja postignut je pri pH = 4. Kako je već navedeno pri razmatranju važnosti poznavanja točke nul naboja adsorbensa, pri pH vrijednostima manjima od pH_{pzc} površina adsorbensa pozitivno je nabijena, dok je pri pH vrijednostima većima od pH_{pzc} površina adsorbensa nabijena negativno (Fiol i Villaescusa, 2009). Metilensko modrilo je kationsko bojilo, zbog čega je učinkovitost njegove adsorpcije na pivski trop veća pri većim pH vrijednostima. S druge strane, adsorpcija kongo crvenila učinkovitija je pri manjim pH vrijednostima, jer se radi o anionskom bojilu. Da manje pH vrijednosti imaju pozitivan utjecaj na učinkovitost adsorpcije kongo crvenila na pivski trop potvrdilo je i istraživanje koje su proveli Chanzu i suradnici (2019). Oni navode kako se kationska bojila pri manjim pH vrijednostima natječu za adsorpcijska mjesta s H^+ ionima, dok se anionska bojila natječu s OH^- ionima pri većim pH vrijednostima, što u oba slučaja negativno utječe na učinkovitost adsorpcije. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ponešto se razlikuju od rezultata istraživanja Hu i suradnika (2010) koji navode kako je najveća učinkovitost adsorpcije kongo crvenila na korijen rogoza postignuta pri pH = 5, ali je u pH području od 5,5 do 10 bila konstantna. Li i suradnici (2014) koji su koristili otpad od kasave kao adsorbens za uklanjanje kongo crvenila navode kako pH nije značajno utjecao na adsorpcijski kapacitet primijenjenog lignoceluloznog materijala.

Utjecaj temperature na proces adsorpcije. Osim onečišćujućim tvarima poput bojila i drugih otopljenih i neotopljenih tvari, obojene otpadne vode različitih industrija mogu biti onečišćene i otpadnom toplinom. To je često slučaj s otpadnim vodama iz tekstilne industrije, zbog proizvodnog procesa koji tijekom bojenja materijala zahtijeva povećanje temperature i dodatak elektrolita kako bi se olakšala migracija bojila do površine vlakna koja se bojaju.

Rezultati prikazani na **slici 4.2.5.1.** pokazuju kako s povećanjem temperature vodene otopine metilenskog modrila dolazi do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta te smanjenja postotka uklanjanja metilenskog modrila. Asgher i Bhatti (2012) navode kako je smanjenje učinkovitosti adsorpcije pri većim temperaturama rezultat slabljenja privlačnih sila odgovornih za adsorpciju molekule bojila na površinu adsorbensa. Abu-El-Halawa i suradnici (2016) navode kako je uklanjanje metilenskog modrila biomasom oleandra kao adsorbensom endoterman proces, budući da dolazi do povećanja postotka uklanjanja metilenskog modrila s povećanjem temperature, što se razlikuje od rezultata dobivenih ovim istraživanjem. Povećanjem temperature od 15 °C do 35 °C došlo je do povećanja postotka uklanjanja kongo crvenila i povećanja adsorpcijskog kapaciteta. Daljnjim povećanjem temperature do 45 °C, međutim, došlo je do smanjenja postotka uklanjanja kongo crvenila. Dobiveni rezultati djelomično su u skladu s istraživanjem koje su proveli Chanzu i suradnici (2019) koji navode

kako ovisnost učinkovitosti adsorpcije kongo crvenila i malahitnog zelenila na pivski trop o temperaturi ukazuje na egzoterman proces, jer dolazi do smanjenja učinkovitosti uklanjanja bojila i smanjenja adsorpcijskog kapaciteta povećanjem temperature. Za razliku od navedenog istraživanja, Jain i Sikarwar (2013) navode kako je adsorpcija kongo crvenila na aktiviranu oduljenu gorušicu endoterman proces, jer dolazi do povećanja postotka uklanjanja bojila povećanjem temperature.

Utjecaj ionske jakosti otopine na proces adsorpcije. U radu je ispitan utjecaj ionske jakosti otopine na proces adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop te su rezultati prikazani na **slici 4.2.6.1.** Povećanjem ionske jakosti otopine dolazi do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja metilenskog modrila u odnosu na modelnu otopinu metilenskog modrila bez dodatka NaCl. Ovo je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Gupta i suradnici (2016) istražujući adsorpciju metilenskog modrila na otpadu krumpira. Autori navode kako je s povećanjem ionske jakosti otopine od 0 do 0,1 mol dm^{-3} došlo do značajnog smanjenja adsorpcijskog kapaciteta te kao moguće objašnjenje navode natjecanje molekula bojila s Na^+ ionima iz soli za slobodna adsorpcijska mjesta dostupna na površini adsorbensa (Hamdaouia i sur., 2008). Abu-El-Halawa i suradnici (2016) također navode kako je povećanjem ionske jakosti, zbog dodatka soli, došlo do smanjenja postotka uklanjanja metilenskog modrila adsorpcijom na biomasu oleandra u odnosu na modelnu otopinu bojila pripravljenu u destiliranoj vodi. Izuzimajući najmanju koncentraciju NaCl od 0,001 mol dm^{-3}, povećanje ionske jakosti otopine dovelo je do povećanja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja kongo crvenila u odnosu na modelnu otopinu kongo crvenila u ovom istraživanju. Chanzu i suradnici (2019) navode kako je povećanjem ionske jakosti prvo došlo do povećanja postotka uklanjanja kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop, da bi zatim došlo do postepenog smanjenja ovog postotka. Početni pozitivni učinak ionske jakosti na proces adsorpcije objašnjavaju pozitivno nabijenom površinom adsorbensa koja povoljno utječe na adsorpciju anionskog bojila, da bi zatim povećanje koncentracije soli (odnosno povećanje koncentracije iona) dovelo do stvaranja barijere između adsorbensa i molekula bojila, što posljedično rezultira nepovoljnim utjecajem na adsorpciju (Krishnan i Anirudhan, 2003). Općenito, ako između površine adsorbensa i adsorbata postoji elektrostatsko privlačenje, povećanje ionske jakosti dovest će do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta. S druge strane, ako se radi o elektrostatskom odbijanju, povećanje ionske jakosti dovest će do povećanja adsorpcijskog kapaciteta (Alberghina i sur., 2000).

Adsorpcijske izoterme i kinetika adsorpcije. Adsorpcijske izoterme opisuju kako su molekule adsorbata raspodijeljene između tekuće i krute faze pri adsorpcijskoj ravnoteži te pružaju uvid u maksimalni adsorpcijski kapacitet adsorbensa za neki adsorbat. Najčešći matematički modeli koji se u tu svrhu koriste su Langmuirova i Freundlichova adsorpcijska izoterma, koje su korištene i u ovom radu. Dobivene vrijednosti parametara navedenih modela prikazane su u **tablicama 4.2.7.1.** i **4.2.7.2.**, dok su eksperimentalni podatci i računski dobivene krivulje adsorpcijskih izotermi prikazani na **slikama 4.2.7.1.** i **4.2.7.2.**

Proces adsorpcije metilenskog modrila na pivski trop za ispitano koncentracijsko područje od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} i za primijenjene temeperature bolje je opisan Freundlichovim modelom, što pokazuje bolje slaganje eksperimentalno dobivenih vrijednosti s računskim

vrijednostima dobivenim modelom, za razliku od Langmuirovog modela koji je pokazao izrazito loše slaganje s eksperimentalnim vrijednostima. Za suženo koncentracijsko područje od 10 mg dm^{-3} do 50 mg dm^{-3} proces adsorpcije također bolje opisuje Freundlichov model. Proces adsorpcije kongo crvenila na pivski trop za koncentracijsko područje od 20 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} i za primijenjene temperature bolje je opisan Freundlichovim modelom u usporedbi s Langmuirovim modelom. Ti rezultati razlikuju se od rezultata koje navodi većina drugih autora. de Araújo i suradnici (2020) navode kako Langmuirov model najbolje opisuje adsorpciju metilenskog modrila i tartrazin žute na pivski trop, što su za adsorpciju kongo crvenila i malahitnog zelenila na pivski trop potvrdili Chanzu i suradnici (2019). Langmuirov ravnotežni model pokazao se boljim i za opisivanje adsorpcije reaktivne žute (da Silva i sur., 2019), reaktivne plave BF-5G (Juchen i sur., 2018) te narančaste solimax TGL 182% (Fontana i sur., 2016) na pivski trop. S druge strane, Freundlichov ravnotežni model dobro je opisivao adsorpciju malahitnog zelenila (Chanzu i sur., 2012) na modificirani pivski trop, kao i kisele žute AY17 i kisele plave AB25 (Jaikumar i sur., 2009) te kisele narančaste 7 (Silva i sur., 2004), na pivski trop.

Istraživanje kinetike procesa adsorpcije važno je, jer daje informacije o mogućim mehanizmima adsorpcije te osigurava teorijsku podlogu za razvoj i primjenu adsorbensa u industrijskom mjerilu (Gupta i Bhattacharya, 2011). Rezultati modeliranja eksperimentalnih podataka primjenom dva odabrana kinetička modela - modelom pseudo-prvog i modelom pseudo-drugog reda te difuzijskim modelom unutarčestične difuzije prikazani su u **tablicama 4.2.7.3.** i **4.2.7.4.** te na **slikama 4.2.7.1. – 4.2.7.5.** Iz rezultata se može zaključiti kako model pseudo-drugog reda bolje opisuje kinetku adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop pri primijenjenim eksperimentalnim uvjetima. Model pseudo-drugog reda pretpostavlja kako se na površini adsorbensa odvijaju i adorpcija i ionska izmjena, pri čemu je ograničavajući čimbenik brzine adsorpcije kemijsko vezanje za aktivna mjesta na površini adsorbensa (Kukić, 2016). I drugi autori također navode kako model pseudo-drugog reda dobro opisuje kinetiku adsorpcije metilenskog modrila (de Araújo i sur., 2020) i kongo crvenila (Chanzu i sur., 2019) na pivski trop, ali i drugih bojila poput tartrazin žute (de Araújo i sur., 2020), malahitnog zelenila (Chanzu i sur., 2019), reaktivne žute (da Silva i sur., 2019), reaktivne plave BF-5G (Juchen i sur., 2018), narančaste solimax TGL 182% (Fontana i sur., 2016) te kisele žute AY17 i kisele plave AB25 (Jaikumar i sur., 2009).

Adsorpcija je višestupanjski proces, pri kojem dolazi do prijenosa adsorbata iz otopine na čvrstu fazu u unutrašnjost adsorbensa gdje biva zadržan (Olgun i sur., 2013.). Kako bi se pojasnio mehanizam difuzije, eksperimentalni podatci analizirani su modelom unutarčestične difuzije te je grafička ovisnost q o $t^{1/2}$ za različite početne koncentracije metilenskog modrila i kongo crvenila prikazana na **slici 4.2.7.5**., dok su parametri modela dani u **tablici 4.2.7.4.** Iz grafičkog prikaza na **slici 4.2.7.5.** vidljive su dvije (metilensko modrilo), odnosno tri (kongo crvenilo) linearne regije za svaku početnu koncentraciju bojila i za svako bojilo. Ta multilinearnost upućuje na zaključak kako unutračestična difuzija nije jedini korak koji ograničava brzinu adsorpcije. Prva linearna regija koja je najstrmija, vjerojatno se može pripisati adsorpciji na vanjskoj površini adsorbensa (odnosno difuziji u filmu). Druga (odnosno druge dvije) linearne regije su manje strme i pripisuju se fazi u kojoj je adosrpcija sporija te ravnotežnoj fazi kada je utjecaj unutarčestične difuzije puno manji ili je u potpunosti prestao, zbog male koncentracije adsorbata u otopini. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima drugih

autora za adsorpciju metilenskog modrila na ljusku bijelog luka (Hameed i Ahmad, 2009) i koru kruhovca (Hameed, 2008), kao i za adsorpciju kongo crvenila na korijen rogoza (Hu i sur., 2010).

Uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila iz sintetskih i realnih otpadnih voda dodatkom pivskog tropa. Prilikom istraživanja primjenjivosti adsorbensa za uklanjanje bojila, posebno kada se radi o nekonvencionalnim adsorbensima poput različitih lignoceluloznih materijala, obično se koriste modelne otopine bojila. Ipak, sastav realnih otpadnih voda puno je složeniji i prisutno je više otopljenih (i neotopljenih) onečišćujućih i drugih tvari koje mogu utjecati na uspješnost procesa adsorpcije. Rezultati istraživanja mogućnost primjene pivskog tropa kao adsorbensa za uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi s dodatkom bojila prikazani su na **slikama** od **4.2.8.1.** do **4.2.8.3.** te u **tablici 4.2.8.1.** Iz rezultata je vidljivo kako je postotak uklanjanja metilenskog modrila u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi manji nego u modelnoj otopini bojila. S obzirom na izrazito složen kemijski sastav sintetske i realne otpadne vode, može se zaključiti kako se radi o otopinama veće ionske jakosti od modelne otopine bojila. Stoga je smanjenje postotka uklanjanja metilenskog modrila u skladu s rezultatima dobivenima tijekom ispitivanja utjecaja ionske jakosti na adsorpciju metilenskog modrila na pivski trop. Iz rezultata dobivenih za uklanjanje kongo crvenila iz sintetske i realne otpadne vode adsorpcijom na pivski trop vidljivo je djelomično slaganje s rezultatima dobivenim tijekom istraživanja utjecaja ionske jakosti na proces adsorpcije. Postotak uklanjanja kongo crvenila iz sintetske i realne otpadne vode manji je od postotka uklanjanja iz modelne otopine bojila samo pri najmanjoj početnoj koncentraciji bojila od 10 mg dm^{-3}. Pri ostale dvije ispitane koncentracije, postotak uklanjanja iz sintetske i realne otpadne vode, kao otopine veće ionske jakosti od modelne otopine, je veći od postotka uklanjanja iz modelne otopine bojila.

Tijekom uklanjanja metilenskog modrila i kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi nije došlo do smanjenja KPK vrijednosti otopine, unatoč velikom postotku uklanjanja bojila, već je došlo do porasta KPK vjerojatno zbog izluživanja organske tvari iz pivskog tropa. Slično se događa i tijekom uklanjanja kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop u realnoj otpadnoj vodi. Do smanjenja KPK vrijednosti dolazi jedino u slučaju uklanjanja metilenskog modrila iz realne otpadne vode. Iako neki autori navode kako tijekom uklanjanja bojila adsorpcijom dolazi do smanjenja KPK vrijednosti, poput istraživanja Low i suradnika (2012) koji su istraživali adsorpciju metilenskog modrila na bagasu šećerne trske modificiranu vinskom kiselinom ili Yadav i suradnika (2013) koji su proveli uklanjanje bojila iz sintetske otpadne vode kombinacijom koagulacije, oksidacije Fentonovim reagensom i adsorpcije na kitozan, istraživanja koja su se detaljno bavila ovim problemom, kao i problemom sekundarnog onečišćenja otpadne vode uslijed izluživanja nemodificiranih lignoceluloznih adsorbensa su rijetka.

5.3. Biološka obrada obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom

Kvalitativni testovi za određivanje celulolitičke i lignolitičke aktivnosti odabranih vrsta gljiva bijelog truljenja. Zbog svoje iznimne sposobnosti razgradnje teško biorazgradljivih spojeva, gljive bijelog truljenja često se koriste u istraživanjima s ciljem razgradnje različitih sintetskih bojila. Razgradnja sintetskih bojila pomoću tih gljiva temelji se na sličnosti u kemijskoj strukturi (aromatski spojevi) lignina i bojila, jer su mnoga istraživanja pokazala kako su enzimi odgovorni za razgradnju sintetskih bojila, upravo enzimi uključeni u razgradnju lignina: lakaza, lignin peroksidaza i mangan peroksidaza (Santos i Corso, 2014; Eshghia i sur., 2011; Jayasinghe i sur., 2008; Eichlerová i sur., 2007).

Kako bi se iz velikog broja novih izolata mikroorganizama izvršio probir samo onih izolata koji imaju sposobnost produkcije enzima od interesa, primjerice enzima uključenih u razgradnju lignoceluloznih materijala, često se provode kvalitativni testovi za određivanje enzimske aktivnosti. Pri tome postupak provedbe kvalitativnih enzimskih testova treba biti jednostavan, a reagensi koji se koriste pri provedbi testa lako dostupni i jeftini. Izražavanje rezultata uključuje samo potvrdu je li test pokazao pozitivan ili negativan rezultat (Pointing, 1999.). Za potrebe istraživanja biološke obrade obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom korištene su četiri novo izolirane vrste gljiva bijelog truljenja. Kako bi se potvrdila njihova sposobnost razgradnje lignoceluloznih sastavnica, odnosno njihova celulolitička i lignolitička aktivnost, provedeni su kvalitativni enzimski testovi te su rezultati prikazani u **tablici 4.3.1.1.** te na **slici 4.3.1.1.**

Kako mnoge gljive sintetiziraju endoglukanaze u velikim količinama, test s dodatkom karboksi-metil celuloze (CMC) koja je supstrat za endoglukanazu, može poslužiti kao dobar pokazatelj njihove celulolitičke sposobnosti. Celulolitička sposobnost gljiva potvrđena je pojavom svjetlijeg prstena oko zone rasta na agarnim pločama s dodatkom CMC nakon bojenja s kongo crvenilom (Pointing, 1999). Otkrivanje novih lakaza s različitom supstratnom specifičnošću i poboljšanom stabilnošću važno je za industrijsku primjenu navedenih enzima. Probir mikroorganizama koji proizvode lakazu provodi se ili njihovim uzgojem na agarnim podlogama s dodatkom indikatorskih spojeva koji omogućuju vizualnu potvrdu prisutnosti lakaze ili uzgojem u tekućim hranjivim podlogama uz provođenje testova za mjerenje enzimske aktivnosti (Kiiskinen i sur., 2004). Kao što je već navedeno, upotreba indikatorskih spojeva općenito je puno jednostavnija. Neki od indikatorskih spojeva koji su korišteni kao potvrda sposobnosti gljive za proizvodnju lakaze u ovom radu su gvajakol, ABTS i bromfenol modrilo. Potvrdna reakcija u slučaju gvajakola uključuje pojavu smeđeg obojenja oko zone rasta micelija gljive (Nishida i sur., 1988.), u slučaju ABTS-a pojave zelenog do ljubičastog obojenja oko zone rasta micelija (Levasseur i sur., 2010; Pointing, 1999), dok u slučaju bromfenol modrila dolazi do obezbojenja bojila oko zone rasta micelija (Pointing, 1999). Svi provedeni kvalitativni enzimski testovi za sve četiri vrste istraživanih gljiva bili su potvrdni, čime je potvrđena njihova celulolitička i lignolitička aktivnost te mogućnost primjene u daljnjim istraživanjima.

Testovi obezbojenja metilenskog modrila i kongo crvenila na agarnim pločama pomoću odabranih vrsta gljiva. Nakon što je potvrđeno kako sve istraživane gljive imaju celulolitičku i lignolitičku aktivnost, idući korak u istraživanju njihove sposobnosti razgradnje različitih bojila obično se provodi pomoću testa obezbojenja na agarnim pločama (Eichlerová i sur., 2007), pri čemu se bojila mogu dodati u podlogu u različitim koncentracijama. Rezultati istraživanja sposobnost obezbojenja sintetskih bojila metilenskog modrila i kongo crvenila pomoću četiri odabrane gljive bijelog truljenja *T. versicolor*, *T. gibbosa*, *G. lucidum* i *G. resinaceum* na agarnim pločama s dodatkom bojila u koncentracijama od 10 mg dm^{-3} do 150 mg dm^{-3} tijekom 14 (odnosno 28) dana uzgoja prikazani su u **tablicama 4.3.2.1.** i **4.3.2.2.** i na **slikama 4.3.2.1.** i **4.3.2.2.**

Dodatak metilenskog modrila u podlogu za rast gljiva nije rezultirao značajnijom inhibicijom rasta gljiva, ali nije došlo niti do potpunog obezbojenja tog bojila na agarnim pločama, osim u slučaju najmanje primijenjene koncentracije. Nakon 14 i 28 dana uzgoja najbolju je sposobnost potpune razgradnje metilenskog modrila, pri svim ispitanim koncentracijama bojila pokazala gljiva *T. versicolor*. Ti rezultati ukazuju kako je metilensko modrilo teško biorazgradljivo bojilo, što je potvrdilo i istraživanje koje su proveli Jayasinghe i suradnici (2008.). Od deset različitih vrsta gljiva bijelog truljenja koje su istraživali, samo su dvije vrste pokazale dobru sposobnost razgradnje metilenskog modrila dodanog u koncentraciji od 100 mg dm^{-3} i indeks obezbojenja veći od 1. Za razliku od rezultata dobivenih u sklopu ovog doktorskog rada, dodatak metilenskog modrila u podlogu za rast imao je umjeren do jak inhibitorni učinak na rast deset odabranih vrsta gljiva.

Dodatak kongo crvenila u podlogu za rast također nije rezultirao značajnijom inhibicijom rasta gljiva. Iako su sve istraživane gljive pokazale sposobnost djelomičnog obezbojenja kongo crvenila pri svim ispitanim koncentracijama, jedino je vrsta *T. versicolor* potpuno obezbojila cijele površine agarnih ploča za sve ispitivane koncentracije bojila nakon 28 dana uzgoja. To je u skladu s rezultatima Yuan i suradnika (2011) koji su istražili sposobnost razgradnje šest sintetskih bojila, uključujući i kongo crvenilo i metilensko modrilo, za 60 sojeva gljiva truležnica. Koncentracija bojila dodana u podloge za rast iznosila je 50 mg dm^{-3}. Od 60 sojeva samo je 10 pokazalo izvrsnu sposobnost razgradnje svih ispitanih bojila, od čega 3 soja vrste *T. versicolor*. Autori dalje navode kako su se metilensko modrilo i kongo crvenilo pokazali kao najteže biorazgradljivi od svih ispitanih bojila.

Kako je već navedeno, za daljnja istraživanja biološke obrade obojenog pivskog tropa zaostalog nakon uklanjanja bojila adsorpcijom odabrana je gljiva *T. versicolor*. Raspon koncentracija bojila prisutnih u obojenim otpadnim vodama različitih industrija koje se mogu pronaći u literaturi je vrlo širok (od nekoliko mg dm^{-3} do nekoliko stotina mg dm^{-3}). Nigam i suradnici (2000) navode kako je uobičajena koncentracija bojila u realnim otpadnim vodama tekstilne industrije puno manja od 500 mg dm^{-3}, odnosno navodi literaturni podatak kako ta koncentracija iznosi od 10 mg dm^{-3} do 50 mg dm^{-3}. Količine bojila adsorbiranih na lignoceluloznim adsorbensima zaostalim nakon obrade obojenih otpadnih voda posljedično će također obuhvaćati široki raspon. To može predstavljati problem prilikom biološke obrade obojenih lignoceluloznih adsorbensa zaostalih nakon adsorpcije, jer sintetska bojila prisutna u većim koncentracijama mogu inhibirati rast mikroorganizama i time smanjiti učinkovitost razgradnje bojila (Cheng i sur., 2012). Rezultati istraživanja utjecaja koncentracije bojila dodanog u podlogu za rast u koncentracijama od 10 mg dm^{-3} do 1500 mg dm^{-3} na rast gljive *T.*

versicolor prikazani su u **tablicama 4.3.2.3.** i **4.3.2.4.** te na **slikama 4.3.2.2.** i **4.3.2.4.** Iz prikazanih rezultata može se zaključiti kako metilensko modrilo i kongo crvenilo dodani u hranjivu podlogu za uzgoj u koncentracijama većim od 500 mg dm^{-3} inhibiraju rast gljive *T. versicolor*. Inhibitorni učinak metilenskog modrila, kao i kongo crvenila, u koncentracijama manjim od 500 mg dm^{-3} prevladan je već nakon nekoliko dana prilagodbe gljive na uvjete uzgoja. Za razliku od metilenskog modrila gdje dolazi do razgradnje bojila samo pri koncentracijama manjim od 500 mg dm^{-3}, u slučaju kongo crvenila do razgradnje dolazi pri svim ispitanim koncentracijama bojila, što se očituje u potpunom ili djelomičnom obezbojenju agarnih ploča s dodatkom bojila.

Biološka obrada obojenog pivskog tropa pomoću T. versicolor u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Nakon uklanjanja sintetskih bojila iz vodenih otopina adsorpcijom na pivski trop zaostaje obojeni adsorbens (pivski trop) koji je potrebno na odgovarajući način zbrinuti. Nigam i suradnici (2000) predložili su metodu za uklanjanje bojila iz otpadnih voda koja se sastoji od dva koraka. U prvom koraku provodi se fizičko uklanjanje bojila iz vodenog medija adsorpcijom na različite lignocelulozne adsorbense, da bi se u drugom koraku zaostali obojeni adsorbensi iskoristili kao neinertni nosači za uzgoj gljiva bijelog truljenja u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima. Autori su proveli uklanjanje 2 bojila kao pojedinačnih bojila te smjese 8 različitih bojila adsorpcijom na slamu pšenice, kukuruzne oklaske i piljevinu drveta. Ispitane koncentracije bojila iznosile su od 200 mg dm^{-3} do 500 mg dm^{-3}. Dobivene obojene lignocelulozne materijale (adsorbense) uspješno su iskoristili kao supstrat za uzgoj gljiva bijelog truljenja *Phanerochaetae chrysosporium* i *Coriolus versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima, što je potvrđeno povećanjem udjela proteina u biološki obrađenim adsorbensima, kao i njihovim djelomičnim obezbojenjem. Autori navode kako bi se ovako obrađeni obojeni lignocelulozni materijali mogli koristiti kao biološko gnojivo zbog povećanog udjela proteina. Ovakav pristup primijenili su zatim i drugi istraživači. Carletto i suradnici (2008) istražili su mogućnost korištenja ljuske lješnjaka kao jeftinog prirodnog adsorbensa za uklanjanje kongo crvenila iz modelnih otopina bojila koncentrcije od 50 mg dm^{-3} do 500 mg dm^{-3}. Obojene ljuske lješnjaka nakon adsorpcije iskorištene su kao neinertni nosač za uzgoj gljive bijelog truljenja *P. chrysosporium* u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima, s ciljem proizvodnje lignolitičkog enzima mangan peroksidaze. Autori navode kako je došlo do biološke razgradnje bojila od oko 43 %, kao i do proizvodnje mangan peroksidaze. Ozmen i Yesilada (2012) istražili su sposobnost proizvodnje lakaze i obezbojenja bojila Astrazon crnog i Astrazon plavog adsorbiranih na pšenične mekinje pomoću gljiva *T. versicolor* ATCC 200801 i *T. trogii* ATCC 200800 korištenjem metode u dva koraka. Postotak obezbojenja Astrazon crnog iznosio je 86 %, a Astrazon plavog 84 % kada je na obojenim pšeničnim mekinjama uzgajana gljiva *T. versicolor*, odnosno 80 % (Astrazon crno) i 69 % (Astrazon plavo) kada je korištena gljiva *T. trogii*. Li i suradnici (2014) su otpad dobiven proizvodnjom etanola iz manioke koristili kao adsorbens za uklanjanje kongo crvenila iz vodene otopine. Nakon provedenih adsorpcijskih eksperimenata obojena manioka korištena je kao supstrat za rast gljive bijelog truljenja *Trametes* sp. SYBC-L4 u uvjetima uzgoja na čvrstim supstratima. Tijekom uzgoja došlo je do *in vivo* obezbojenja obojene manioke, odnosno do razgradnje bojila djelovanjem lakaze. Praćenjem enzimske aktivnosti tijekom uzgoja, potvrđeno je kako je lakaza bila jedini enzim

uključen u razgradnju bojila tijekom ovog istraživanja, dok aktivnost drugih lignolitičkih enzima nije detektirana.

U ovom radu istražena je mogućnost biološke obrade obojenog pivskog tropa pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima s ciljem smanjenja mase obojenog pivskog tropa uslijed razgradnje polimernih lignoceluloznih sastavnica (gubitak na masi) te moguće razgradnje bojila. Obojeni pivski trop pri tome je služio kao neinertni nosač, odnosno i kao nosač biomase i kao supstrat za rast gljive. Rezultati istraživanja biološke obrade obojenog pivskog tropa pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima prikazani su na **slikama 4.3.3.1. - 4.3.3.5.** Iz rezultata je vidljivo kako je gljiva *T. versicolor* dobro rasla na obojenom pivskom tropu, što je osim vizualne potvrde u vidu pojave bijelog micelija gljive, potvrđeno i gubitkom na masi obojenog lignoceluloznog supstrata te promjenom boje uzoraka, odnosno djelomičnom razgradnjom bojila. Gubitak na masi supstrata ukazuje na metaboličku aktivnost gljive, jer dolazi do razgradnje lignoceluloznih sastavnica pivskog tropa djelovanjem fungalnih enzima (Valášková i Baldrian, 2006). Uvjeti koji su najbolje pogodovali rastu gljive na obojenom pivskom tropu bili su udjel vode u supstratu od 75 %, temperatura 21 °C i povremeno miješanje sadržaja staklenki u kojima je proveden uzgoj na čvrstim nosačima, pri čemu je postignut gubitak na masi supstrata od 31,45 % za biotičku kontrolu te 25,70 % za metilensko modrilo i 26,10 % za kongo crvenilo. Li i suradnici (2014) u prethodno opisanom istraživanju navode slične vrijednosti gubitka na masi supstrata. Veća promjena parametara boje, odnosno bolja razgradnja bojila u svim eksperimentima primijećena je u uzorcima pivskog tropa obojenog kongo crvenilom, u odnosu na uzorke obojene metilenskim modrilom. U slučaju oba bojila došlo je samo do djelomične razgradnje bojila, ali ne i do potpunog obezbojenja pivskog tropa.

Određivanje akutne toksičnosti uzoraka biološki obrađenog obojanog pivskog tropa – određivanje imobilizacije slatkovodnog račića Daphnia magna. Obojene otpadne vode iz različitih industrija složenog su kemijskog sastava te ih osim prisutnosti sintetskih bojila često karakteriziraju i velike vrijednosti pokazatelja kakvoće poput ukupnih suspendiranih tvari, KPK i BPK. Zbog svega navedenoga, ukoliko se neobrađene obojene otpadne vode ispuštaju u prirodni recipijent, mogu biti visoko toksične za prisutnu floru i faunu. Biorazgradnja i/ili biotransormacija bojila biološkom obradom gljivama može dovesti do potpune mineralizacije (razgradnje) ili do nastajanja razgradnih produkata i produkata transformacije koji su manje toksični od polaznog spoja. Ipak, kako bi se potvrdila primjenjivost procesa biološke obrade gljivama s ciljem razgradnje bojila ili njegove transformacije, potrebno je nedvojbeno utvrditi kako dolazi do smanjenja toksičnosti polaznog spoja, što uključuje provedbu ekotoksikoloških testova (Przystas i sur., 2015). Nakon provedene biološke obrade obojanih uzoraka pivskog tropa pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor*, proveden je test akutne toksičnosti na modelni organizam *Daphnia magna* odabranih biološki obrađenih uzoraka te njihovih pripadajućih abiotičkih kontrola te su rezultati prikazani na **slici 4.3.4.1.** Pri razrjeđenju od 0,5 % i 1 % biološki obrađeni uzorci (BK, MM i KC) pokazuju značajno smanjenje postotka imobilizacije modelnog organizma nakon 24 h u odnosu na pripadajuće abiotičke kontrole. Takav trend je primijećen i nakon izlaganja uzorku u trajanju od 48 h, ali je postotak imobilizacije ipak veći u odnosu na 24 h izlaganja. Navedeno upućuje kako se biološkom obradom obojenog pivskog tropa postiže smanjenje polazne toksičnosti. Przystas i suradnici

(2015) istraživali su razgradnju (obezbojenje) smjese dva bojila koja pripadaju različitim klasama bojila (trifenilmetansko bojilo brilliant zeleno i azo bojilo Evans plavo) pomoću različitih sojeva gljiva *Pleurotus ostreatus*, *Gloeophyllum odoratum* i *Fusarium oxysporum*. Zootoksičnost (*D. magna*) i fitotoksičnost (*Lemna minor*) ocijenjene su na kraju eksperimenta. Neovisno o postotku uklanjanja bojila, toksičnost je u svim uzorcima smanjena nakon obrade gljivama. Si i suradnici (2013) također navode kako je nakon razgradnje sintetskih bojila kromazurina, kongo crvenila, kristal violeta i metilenskog modrila pomoću gljive bijelog truljenja *T. pubescens* uzgajane dubinski (submerzno) u tekućim hranjivim podlogama s dodatkom bojila (50 mg dm^{-3}) došlo do smanjenja toksičnosti u odnosu na polaznu toksičnost bojila, što je zaključeno na osnovu testa fitotoksičnosti korištenjem sjemena biljaka *Phaseolus mungo*, *Sorghum vulgare* i *Triticum aestivum.*

6. ZAKLJUČCI

6. *ZAKLJUČCI*

Na osnovu rezultata dobivenih nakon provedenih istraživanja uklanjanja sintetskih bojila metilenskog modrila i kongo crvenila iz vodenih otopina adsorpcijom na pivski trop te provedene biološke obrade obojenog lignoceluloznog adsorbensa zaostalog nakon adsorpcije, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Karakterizacija pivskog tropa kao mogućeg adsorbensa za uklanjanje sintetskih bojila, koja je uključivala fizikalno –kemijsku analizu, analizu veličine čestica, morfološku karakterizaciju te kvalitativnu analizu specifičnih funkcijskih skupina na površini pivskog tropa pokazala je kako se radi o materijalu koji ima potencijal za primjenu kao adsorbens.

2. Ispitivanje utjecaja veličine čestica adsorbensa na adsorpciju metilenskog modrila i kongo crvenila primjenom neusitnjenog te usitnjenog i klasiranog pivskog tropa (tri klase čestica) pokazalo je kako se postotak uklanjanja oba bojila povećava sa smanjenjem veličine čestica adsorbensa. Postotak uklanjanja metilenskog modrila u ovisnosti o veličini čestica adsorbensa raste u nizu 0,053-0,1 mm > 0,1-0,4 mm > 0,1-0,2 mm > 0,4-0,6 mm. Postotak uklanjanja kongo crvenila raste u nizu 0,053-0,1 mm > 0,1-0,2 mm > 0,1-0,4 mm > 0,4-0,6 mm.

3. Povećanjem koncentracije adsorbensa došlo je do povećanja postotka uklanjanja oba bojila, ali i istovremenog smanjenja adsorpcijskog kapaciteta.

4. Ispitivanje utjecaja vremena adsorpcije i početne koncentracije bojila na proces adsorpcije pokazalo je kako je uklanjanje oba bojila karakterizirano brzim uklanjanjem tijekom prvih 20 min. Ravnotežno stanje postignuto je nakon 120 min za adsorpciju metilenskog modrila, odnosno 240 min za adsorpciju kongo crvenila na pivski trop. Uklanjanje metilenskog modrila i kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop proces je ovisan o koncentraciji bojila, pri čemu povećanjem početne koncentracije bojila od 10 mg dm^{-3} do 200 mg dm^{-3} dolazi do povećanja adsorpcijskog kapaciteta od 7,79 mg g^{-1} do 173,45 mg g^{-1} (metilensko modrilo) , odnosno od 0,34 mg g^{-1} do 11,10 mg g^{-1} (kongo crvenilo).

5. Veći adsorpcijski kapacitet i veći postotak uklanjanja metilenskog modrila (kationskog bojila) adosrpcijom na pivski trop postignuti su pri pH vrijednostima od 7 do 10, odnosno u pH području većem od pH_{pzc} (6,5). Veći postotak uklanjanja kongo crvenila (anionskog bojila) na pivski trop i veći adsorpcijski kapacitet postignuti su pri pH vrijednostima od 4 do 7, odnosno u pH području manjem od pH_{pzc} (uz izuzetak pH = 7).

6. Povećanjem temperature vodene otopine metilenskog modrila od 15 °C do 45 °C dolazi do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta te smanjenja postotka uklanjanja metilenskog modrila. Povećanjem temperature od 15 °C do 35 °C došlo je do povećanja postotka uklanjanja kongo crvenila i povećanja adsorpcijskog kapaciteta. Daljnjim povećanjem

temperature do 45 °C, međutim, došlo je do smanjenja postotka uklanjanja kongo crvenila.

7. Povećanjem ionske jakosti otopine dolazi do smanjenja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja metilenskog modrila u odnosu na modelnu otopinu metilenskog modrila bez dodatka NaCl. Izuzimajući najmanju dodanu koncentraciju NaCl od 0,001 mol dm^{-3}, povećanje ionske jakosti otopine dovelo je do povećanja adsorpcijskog kapaciteta i postotka uklanjanja kongo crvenila u odnosu na modelnu otopinu kongo crvenila bez dodatka NaCl u ovom istraživanju.

8. Procesi adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop bolje su opisani Freundlichovim ravnotežnim adsorpcijskim modelom, u odnosu na Langmuirov model. Kinetički model pseudo-drugog reda bolje opisuje kinetiku adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop pri primijenjenim eksperimentalnim uvjetima. Nakon analize eksperimentalnih podataka modelom unutarčestične difuzije može se zaključiti kako unutračestična difuzija nije jedini korak koji ograničava brzinu adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila na pivski trop.

9. Postotak uklanjanja bojila u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi s dodatkom bojila za metilensko modrilo manji je nego u modelnoj otopini bojila, dok je za kongo crvenilo postotak uklanjanja veći nego u modelnoj otopini bojila. Osim u slučaju uklanjanja metilenskog modrila iz realne otpadne vode, tijekom uklanjanja metilenskog modrila i kongo crvenila adsorpcijom na pivski trop u sintetskoj i realnoj otpadnoj vodi s dodatkom bojila nije došlo do smanjenja KPK vrijednosti otpadne vode, unatoč velikom postotku uklanjanja bojila. Do porasta KPK vrijednosti vjerojatno je došlo zbog izluživanja organske tvari iz pivskog tropa.

10. Biološkom obradom obojenog pivskog tropa zaostalog nakon adsorpcije metilenskog modrila i kongo crvenila pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima došlo je do razgradnje lignoceluloznih sastavnica i razgradnje bojila, što je potvrđeno gubitkom na masi pivskog tropa te promjenom parametra bojila biološki obrađenih uzoraka u odnosu na abiotičke kontrole. Polazna toksičnost uzoraka obojenog pivskog tropa smanjena je nakon biološke obrade, što je potvrđeno testom akutne toksičnosti na modelni organizam *Daphnia magna*.

7. LITERATURA

7. Literatura

Abdolali A, Guo WS, Ngo HH, Chen SS, Nguyen NC, Tung KL. 2014. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. *Bioresource Technology* 160:57.

Abu-El-Halawa R., Zabin S. A., Abu-Sittah HH. 2016. Investigation of Methylene Blue Dye Adsorption from Polluted Water Using *Oleander* Plant (*Al Defla*) Tissues as Sorbent. *American Journal of Environmental Sciences* 12:213.

Adamović D, Turk Sekulić M, Pap S, Bežanović V, Živančev N, Radonić J. 2017. Evaluation of the adsorption of heavy metal ions from wastewater using an alternative adsorbent in a continuous fixed-bed column. 7th International Scientific and Proffesional Conference Water for all – Proceedings, Osijek : Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, pp 1.

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

Adegoke KA, Bello OS. 2015. Dye sequestration using agricultural wastes as adsorbents. *Water Resources and Industry* 12:8.

Akhtar M, Iqbal S, Bhanger MI, Moazzam M. 2009. Utilization of organic by-products for the removal of organophosphorous pesticide from aqueous media. *Journal of Hazardous Materials* 162:703.

Alberghina G, Bianchini R, Fichera M, Fisichella S. 2000. Dimerization of Cibacron Blue F3GA and other dyes: Influence of salts and temperature. *Dyes and Pigments* 46:129.

Al-Degs YS, Khraisheh MAM, Allen SJ. 2001. Sorption behavior of cationic and anionic dyes from aqueous solution on different types of activated carbons. *Separation Science and Technology* 36:91.

Alonso D, Martins B, Ferreira H, Simoes R, Leite R, Ferreira H, Souza MM. 2005. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. U: Integrated Waste Management – Volume II. Mr. Sunil Kumar (Ed.), InTech.

Anijiofor SC, Norsyahariati ND, Syazwani I, Hasfalina CM. 2018. Recycling of fishpond wastewater by adsorption of pollutants using aged refuse as an alternative low-cost adsorbent. *Sustainable Environment Research* 28:315.

Alam MS, Khanom R, Rahman MA. 2015. Removal of Congo Red Dye from Industrial Wastewater by Untreated Sawdust. *American Journal of Environmental Protection* 4:207.

Al-Ghouti, Khraisheh MAM, Allen SJ, Ahmad MN, 2010. The removal of dyes from textile wastewater: a study of physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth. *Journal of Environmental Economics and Management* 69:229.

Anjaneyulu Y, Chary NS, Raj SSD. 2005. Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies - a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4:245.

Aljamali NM. 2015. Review in Azo Compounds and its Biological Activity. *Biochemistry &Analytical Biochemistry* 4.2.

Annadurai G, Juang RS, Lee DJ. 2002. Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 92:263.

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

Asgher M, Bhatti HN. 2012. Evaluation of thermodynamics and effect of chemical treatments on sorption potential of Citrus waste biomass for removal of anionic dyesfrom aqueous solutions. *Ecological Engineering* 38:79.

ASN 3401 - The determination of nitrogen according to Kjeldahl in animal feed.

Baek MH, Olakitan Ijagbemi C, O SJ, SuKim D. 2010. Removal of Malachite Green from aqueous solution using degreased coffee bean. *Journal of Hazardous Materials* 76:820.

Bamforth SM, Singleton I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 72:156.

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

Bharathi KS, Ramesh ST. 2013. Removal of dyes using agricultural waste as low-cost adsorbents: a review. *Applied Water Science* 3:773.

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

Brdička R.1969. Osnove fizikalne kemije, Školska knjiga, Zagreb.

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

Carletto RA, Chimirri F, Bosco F, Ferrero F. 2008. Adsorption of congo red dye on hazelnut shells and degradation with *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology* 3:1146

Carrott PJM, Carrott MMLR, Nabais JMV. 1998. Influence of surface ionization on the adsorption of aqueous mercury chlorocomplexes by activated carbons. *Carbon* 36:11.

Carrott PJM, Mourao PAM, Ribeiro Carrott MML, Goncalves EM. 2005. Separating surface and solvent effects and the notion of critical adsorption energy in the adsorption of phenolic compounds by activated carbons. *Langmuir* 21:11863.

Chand P, Bafana A, Pakade YB. 2015. Xanthate modified apple pomace as an adsorbent for removal of Cd (II), Ni (II) and Pb (II), and its application to real industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 97:60.

Chahm T,Martins BA, Rodrigue CA. 2018. Adsorption of methylene blue and crystal violet on low-cost adsorbent: waste fruits of *Rapanea ferruginea* (ethanol-treated and H_2SO_4-treated). *Enviromental Earth Sciences* 78:508.

Chanzu HA, Onyari JM, Shiundu PM. 2012. Biosorption of malachite green from aqueous solutions onto polylactide/spent brewery grains films: kinetic and equilibrium studies. *Journal of Polymers and the Enviroment* 20:665.

Chanzu HA, Onyari JM, Shiundu PM. 2019. Brewers' spent grain in adsorption of aqueous Congo Red and Malachite Green dyes: Batch and continuous flow systems. *Journal of hazardous materials* 380:120897.

Chatterjee S, Lee MW, Lee DS, Woo SH. 2009. Congo Red Adsorption from Aqueous Solutions by Using Chitosan Hydrogel Beads Impregnated with Nonionic or Anionic Surfactant. *Bioresource Technology* 100:3862.

Chen X. 2015. Modeling of Experimental Adsorption Isotherm Data. *Information* 6:14.

Cheng ZZ; Yang ZP; Hu R; Jing DJ; Chen HP. 2012. Decolorization of 12 kinds of dyes by the mycelium pellets of *Trametes gallica* under non-sterile condition. *Mycosystema* 31:878.

Clifton JII ,Leikin JB. 2003. Methylene Blue. *American Journal of Therapeutic,* 10:289.

Contreras E, Sepúlveda L, Palma C. 2012 Valorization of agroindustrial wastes as biosorbent for the removal of textile dyes from aqueous solutions. *International Journal of Chemical Engineering*. article ID 679352.

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

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

Crini G, Peindy HN, Gimbert F, Robert C. 2007. Removal of CI Basic Green (Malachite Green) from aqueous solutions by adsorption using cyclodextrin-based adsorbent: kinetic and equilibrium studies. *Separation and Purification Technology* 53:97.

Dabrowski A. 2001. Adsorption – from theory to practice. *Advances in Colloid and Interface Science* 93.135.

da Silva, Bruna C, Zanutto A, Mta Pietrobelli J. 2019. Biosorption of reactive yellow dye by malt bagasse. *Adsorption Science & Technology* 37:236.

de Araújo TP, Tavares FO, Vareschini DT, Barros MASD. 2020. Biosorption mechanisms of cationic and anionic dyes in a low-cost residue from brewer's spent grain. *Environmental Technology* 1:16.

De Grisi S, Lofrano G, Grassi M, Notarmicola M. 2016. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. *Sustainable Materials and Technologies* 9:10.

Deliyanni, EA , Kyzas GZ, Triantafyllidis KS, Matis KA. 2015. Activated carbons for the removal of heavy metal ions: A systematic review of recent literature focused on lead and arsenic ions. *Open Chemistry* 1

Dence, CW, Lin SY. 1992 The Determination of Lignin, Methods in lignin chemistry. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Derylo-Marczewska A, Blachnio M, Wojciech Marczewski A, Seczkowska M, Tarasiuk B. 2019. Phenoxyacid pesticide adsorption on activated carbon – Equilibrium and kinetics. *Chemosphere* 214:349.

DIREKTIVA 2000/60/EZ EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 23. listopada 2000. o uspostavi okvira za djelovanje Zajednice u području vodne politike

DIREKTIVA VIJEĆA od 21. svibnja 1991. o pročišćavanju komunalnih otpadnih voda (91/271/EEZ).

Dwivedi AD, Dubey SP, Gopal K, Tandon VK. 2010. A comparative investigation for strengthening the adsorptive phenomenon by activated natural minerals and plant waste-carbon for defluoridation in water milieu. *Desalination* 263:189.

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

European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs

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

Ejder-Korucu M, Gürses A, Doğar Ç, Sharma SK, Açıkyıldız M. 2015. Removal of Organic Dyes from Industrial Effluents: An Overview of Physical and Biotechnological Applications. U: Green Chemistry for Dyes Removal from Wastewater, Scrivener Publishing, Beverly, MA, USA.

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

Eshghia H, Alishahib Z, Zokaeib M, Daroodia A, Tabasib E. 2011. 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.

Etim UJ, Umoren SA, Eduok UM. 2016. Coconut coir dust as a low cost adsorbent for the removal of cationic dye from aqueous solution. *Journal of Saudi Chemical Society* 20:67.

Fahlman BD. 2011. Materials Chemistry. Central Michigan University, Mount Pleasant, MI, USA.

Ferrero F. 2007. Dye removal by low cost adsorbents: Hazelnut shells in comparison with wood sawdust. *Journal of Hazardous Materials*. 142:144.

Fiol N, Villaescusa I. 2009. Determination of sorbent point zero charge:usefulness in sorption studies. *Environmental Chemistry letters* 7:79.

Freundlich HMF. 1906. Over the Adsorption in Solution *The Journal of Physical Chemistry* 57: 385.

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

Fontana KB, Chaves ES, sanchez JDS, Watanabe ERLR, Pietrobelli GGL. 2016. Textile dye removal from aqueous solutions by malt bagasse: Isotherm, kinetic and thermodynamic studies. *Ecotoxicology and Enviromental safety*, 124:329.

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

Gabald´on C, Marzal P, Seco A, Gonzalez JA. 2000. Cadmium and copper removal by a granular activated carbon in laboratory column systems. *Separation Science and Technology* 35:1039.

Gold MH, Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology and Molecular biology reviews* 57:605.

Gorgano ML, Isikhuenhan OS, Van Griensen LJLD, Lundequist U. 2017. Medical Mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystem* 151:548.

Grelska A, Noszczyńska M. 2020. White rot fungi can be a promising tool for removal of bisphenol A, bisphenol S, and nonylphenol from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research* 27:39958.

Gudelj I, Hrenović J, Landeka Dragičević T, Delaš F, Šoljan V, Gudelj H. 2011. Azo boje,njiov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnološke strategije za njihovu biorazgradnju i detoksikaciju. *Arhiv za Higijenu Rada Toksikologiju* 62:91.

Guimarães Gusmão KA, Alves Gurgel LV, Sacramento Melo TM, Gil LF. 2012. Application of succinylated sugarcane bagasse as adsorbent to remove methylene blue and gentian violet from aqueous solutions - Kinetic and equilibrium studies. *Dyes and Pigments* 92:967.

Guler U, Sarioglu M. 2014. Removal of tetracycline from wastewater using pumice stone: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 12:1.

Gupta VK, Carrott PJM, Ribeiro Carrott MML, Suhas. 2009. Low-Cost Adsorbents: Growing Approach to Wastewater Treatment—a Review. *Enviromental Science and Techology* 39: 783.

Gupta SS, Bhattacharyya KG. 2011. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 162:39.

Gupta VK, Ali I, Saleh TA, Nayak A, Agarwal S. 2016. Chemical treatment technologies for waste-water recycling – an overview. *RSC Advances* 2:6380.

Gupta VK, Mohan D, Sharma S, Sharma M. 2000. Removal of basic dyes (rhodamine B andmethylene blue) from aqueous solutions using bagasse fly ash. *Separation Science and Technology* 35:2097.

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

Habuda-Stanić M, Nujić M, Mikić G, Romić Ž, Ivić M. 2013. Utjecaj miješanja na učinkovitost procesa koagulacije i flokulacije pri kondicioniranju vode crpilišta „Jarčavac". *e-gfos* 7:1.

Hameed H. 2008. Removal of Cationic Dye from Aqueous Solution Using Jackfruit Peel as Non-Conventional Low-Cost Adsorbent. *Journal of hazardous materials*. 162. 344.

Hameed BH, Ahmad AA. 2009. Batch adsorption of methylene blue from aqueos solution by garlic peel, an agricultural waste biomass. *Journal of Hazardous Material* 115:234.

Hamdaoui O. 2006. Batch study of liquid-phase adsorption of methylene blue using cedar sawdust and crushed brick. *Journal of Hazardous Material* 135:264.

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

Hameed BH, Krishni RR, Sata SA. 2009. A novel agricultural waste adsorbent for the removal of cationic dye from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 162:305.

Hamdaoui O, Saoudi F, Chiha M, Naffrechoux E. 2008. Sorption of malachite green by a novel sorbent, dead leaves of plane tree: Equilibrium and kinetic modeling. *Chemical Engineering Journal* 143:73.

Han R, Ding D, Xu Y, Zou L, Wang Y, Li Y, Zou W. 2008. Use of Rice Husk for the Adsorption of Congo Red from Aqueous Solution in Column Mode. *Bioresource Technology* 99:2938.

Hassaan MA, Nemr AE. 2017. Health and Environmental Imacts of Dyes: Mini Review. *American Journal of Environmental Science and Engineering* 1: 64.

Haque ANA, Remadevi R, Rojas OJ, Wang X, Naebe M. 2020. Kinetics and equilibrium adsorption of methylene blue onto cotton gin trash bioadsorbents. *Cellulose* 27:6485.

Herrera-González, Villalobos AM, Villalobos C, Alicia M, Alicia P. 2019. Adsorption of textile dyes using an activated carbon and crosslinked polyvinyl phosphonic acid composite. *Journal of Environmental Management* 234:237.

Ho YS, McKay G. 1999. Pseudo-second order model for adsorption processes. *Process Biochemistry* 34:451.

HRN ISO 6496:2001 – Stočna hrana – Određivanje vode i drugih hlapljivih tvari

HRN ISO 15586 : 2003 – Water quality – Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace.

HRN ISO 11885 : 2010 – Water quality – Determination of selected slemsnts by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP – OES).

HRN EN ISO 12846:2012 - Kvaliteta vode – Određivanje žive – Meoda atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS) sa i bez obogaćenja

HRN ISO 5984 : 2004 – Stočna hrana – Određivanje pepela.

HRN ISO 15705 : 2002 – kakvoća vode – Određivanje indeksa kemijske potrošnje kisika (KPK) – Metoda s malim zatvorenim epruvetama

HRN ISO 6341 : 2013 – Kvaliteta vode – Određivanje inhibicije pokretljivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustarea) – test akutne toksičnosti.

https://colour-index.com/ pristupljeno 23.1. 2020.

http://www.wfd-croatia.eu/templates/radnaHrv.asp?sifraStranica=591 pristupljeno 23.1.2020.

Hu J, Aizawa T, Ookubo Y, Morita T, Magara Y. 1998. Adsorptive characteristics of ionogenic aromatic pesticides in water on powdered activated carbon. *Water Research* 32:2593.

Hu ZC, Hui J, Feng Y, Shoujun. 2010. Removal of Congo Red from Aqueous Solution by Cattail Root. *Journal of hazardous materials*. 173:292.

Humbert H, Gallard H, Suty H, Croué JP. 2008. Natural organic matter (NOM) and pesticides removal using a combination of ion exchange resin and powdered activated carbon (PAC). *Water Research* 42:1635.

Ikenyiri PN, Ukpaka CP. 2016. Overview on the effect of particle size on the performance of wood based adsorbent. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*. 7:5.

Ikram S, Huang L, Zhang H, Wang J, Yin M. 2017. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science* 82:2232.

Iqbal HMN, Kyazze, G, Keshavarz T. 2013. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. *Bioresource Technology* 8:3157.

Jaikumar V, Kumar SK, Prakash G. 2009. Biosorption of acid dyes using spent brewery grains: Characterization and modeling. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2:115.

Jain R, Sikawar S. 2013. Adsorption and desorption studies of Congo red using low-cost adsorbent: activated de-oiled mustard. *Desalination and Water Treatment* 52:37.

Janušić V, Ćurić D, Krička T, Voća N, Matin A. 2008. Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Stručni članak. Poljoprivreda* 14:53.

Jay A, Parker M, Faulks R, Husband F, Wilde P, Smith A, Faulds C, Waldron K. 2008. A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science* 47:357.

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

Jayasinghe C, Imitaj A, Woo Lee G, Hoan Im K. 2008. Degradation of Three Aromatic Dyes by White Rot Fungi and the Production of Ligninolytic Enzymes. *Mycobiology* 36:114.

Jirekar DB, Ubale M, Farooqui M. 2016. Evaluation of adsorption capacity of low cost adsorbent for the removal of congo red dye from aqueous solution. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* 8:5.

Juchen PT, Piffer HH, Veit MT, da Cunha Gonçalves G, Palácio SM, Zanette JC. 2018. Biosorption of reactive blue BF-5G dye by malt bagasse: kinetic and equilibrium studies. *Journal of environmental chemical engineering* 6:7111.

Kammerer J, Carle R, Kammerer DR. 2011. Adsorption and Ion Exchange: Basic Principles and Their Application in Food Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:22.

Kandelbauer A, Guebitz GM. 2005. Bioremediation for the decolorization of textile dyes—a review *Environmental Chemistry*. 269:19.

Kezerle A, Jurić T, Velić N, Hasenay D, Marček T, Velić D. 2016. Adsorptive removal of methylene blue from aqueous solutions using lignocellulosic waste materials and biological treatment of dye-absorbed biosorbent. *Proceedings & abstracts of 9th International scientific/professional conference Agriculture in nature and environment protection,* Glas Slavonije d.d., Osijek, str. 204.

Khan RJ, Saqib ANS, Farooq R, Khan R, Siddique M. 2018. Removal of Congo Red from Aqueous Solutions by Spent Black Tea as Adsorben. *Journal of Water Chemistry and Technology* 40:206.

Khaniabadi YO, Mohammadi MJ, Sheger M, Sadeghi S, Saeedi S, Basiri, H. 2017. Removal of congo red dye from aueous solutions by low-cost adsorbent. Activated carbon prepared from aloe vera leaves shell. *Enviromental Health Engineering and Management Journal* 4:29.

Kiernan JA. 2006. Dyes and other colorants in microtechnique and biomedical research. *Coloration Technology* 122:1.

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

Kirk TK, Obst JR. 1988. Lignin determination, Methods in enzymology-Biomass, part b, Lignin, pectin, and chitin. Academic Press. Inc., San Diego, USA, 161:3..

Krishnan KA, Anirudhan T. 2003. Removal of cadmium (II) from aqueous solutions bysteam-activated sulphurised carbon prepared from sugar-cane bagasse pith: kineticsand equilibrium studies. *Water SA* 29:147.

Kyzas GZ, Kostoglou M, Lazaridis NK and Bikiaris DN. 2013. Decolorization of Dyeing Wastewater Using Polymeric Absorbents. U: Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing. Intech Open.

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

Lagergren S. 1898. About the theory of so-called adsorption of soluble substances, Zur theorie der sogenannten adsorption gel?ster stoffe. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens, Handlingar* 24:1.

Langmuir I. 1918. The Adsorption of Gases on Plane Surface of Glass, Mica and Platinum. *Journal of the American Chemical Society* 40:1361.

Lankinen P. 2004. Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. eThesis, Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki.

Levasseur A, Saloheimo M, Navarro D, Andberg M, Pontarotti P, Kruus K, Record E. 2010. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. *BMC Biochemistry* 11:32.

Li HX, Zhang RJ, Tang L, Zhang JH, Mao ZG. 2014. Use of cassava residue for the removal of congo red from aqueous solution by novel process incorporating adsorption and *in vivo* decolorization. *Bioresources* 9:6682.

Linke B. 2006. Kinetic study of thermophilic anaerobic digestion of solid wastes from potato processing. *Biomass and Bioenergy* 30:892.

Linsen BG. 1970. Physical and chemical aspects of adsorbents and catalysts. *Physics Bulletin*. 12:12.

Low LW, Teng TT, Ahmad A, Morad N, Wong YS. 2011. A novel pretreatment method of lignocellulosic material as adsorbent and kinetic study of dye waste adsorption. *Water, Air, and Soil Pollution* 218:293.

Low LW, Teng TT, Morad N, Azahari B. 2012. Studies on the Adsorption of Methylene Blue Dye from Aqueous Solution onto Low-Cost Tartaric Acid Treated Bagasse. *APCBEE Procedia.* 1:103.

Loganathan P, Vigneswaran S, Kandasamy J, Naidu R. 2013. Defluoridation of drinking water using adsorption processes. *Journal of Hazardous Materials* 248.1.

Malhas AN, Abuknesha RA, Price RG. 2002. Removal of detergents from protein extracts using activated charcoal prior to immunological analysis. *Journal of Immunological Methods* 264:37.

Marsh H, Rodriguez – Reinoso F. 2006. Activated carbon, Elsevier Science, Oxford.

Mathur N, Bhatnagar P. 2007. Mutagenicity assessment of textile dyes from Sanganer (Rajasthan). *Journal of Environmental Biology* 28:123.

Masschelein WJ. 1992. Unit process in drinking water treatment, Marcel Dekker Inc., New York.

Meili L, Lins PVS, Costa MT, Almeida RL, Abud AKS, Soletti JI, Dotto GL, Tanabe EH, Sellaoui L, Carvalho SHV, Erto A. 2018. Adsorption of methylene blue on agroindustrial wastes: Experimental investigation and phenomenological modelling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 141:60.

Medvedev ZA, Crowne HM, Medvedeva MN. 1988. Age related variations of hepato carcinogeniceffect of azo dye (30- MDAB) as linked to the level of hepatocyte polyploidization. *Mechanisms of Ageing and Development* 46:159.

Meneses NGT, Martins S, Teixeira JA, Mussatto SI. 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology* 108:152.

Method 3051A – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils.

Mitchell DA, Berovič M, Krieger N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8:183.

Mondal NK, Kar S. 2018. Potentiality of banana peel for removal of Congo red dye from aqueous solution: isotherm, kinetics and thermodynamics studies. *Applied Water Science* 8:157.

Moosavi S, Wei lai C, gan S, Zamiri G, Pirehzhani OA, Johan MR. 2020. Application of Efficient amgnetic Particles and Activated Carbon for Dye Removal from Wastewater. *ACS Omega* 5:33.

Mourao PAM, Carrott PJM, Ribeiro Carrott MML. 2006. Application of different equations to adsorption isotherms of phenolic compounds onactivated carbons prepared from cork. *Carbon* 44:2422

Munagapati VS,Yarramuthi V, Kim Y, Lee KM, Kim DS. 2018. Removal of anionic dyes (Reactive Black 5 and Congo Red) from aqueous solutions using Banana Peel Powder as an adsorbent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148:601.

Mussato SI, Dragone G, Roberto IC. 2006. Brewers` spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* 43:1.

Mustaq M, Tan IM, Ismail L, Nadeem M, Sagir M, Azam R, Hashmet R. 2014. Influence of PZC (Point of Zero Charge) on the Static Adsorption of Anionic Surfactants on a Malaysian Sandstone. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35:343.

Ngah WSW, Hanafiah MAKM. 2008. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. *Bioresource Technology* 99:3935.

Nguyen TAH, Ngo HH, Guo WS, Zhang J, Liang S, Yue QY, Li Q, Nguyen TV. 2013. Applicability of agricultural waste and by-products for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 148:574.

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

Nishida T, Yoshinori K, Mimura A,Takahara Y. 1988 Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. Screening of lignindegrading fungi. *Mokuzai Gakkaishi* 34:530.

Nohyneka GJ, Fautz R, Kieffer FB, Toutain H. 2004. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology* 42:517.

Noroozi B, Sorial GA, Bahrami H, Arami M. 2007. Equilibrium and kinetic adsorption study of a cationic dye by a natural adsorbent—Silkworm pupa. *Journal of Hazardous Materials* 139:167.

Novotný Č, Svobodová K, Kasinath A, Erbanová P. 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54:215.

Novotny C, Dias N, Kapanen A, Malachova K, Vandrovcova M, Itavarra M, Lima N. 2006. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo and anthraquinonedyes. *Chemosphere* 63:1436.

O'Connell DW, Birkinshaw C, O'Dwyer TF. 2008. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology* 99:6709.

OECD 302 B Guideline for testing of chemicals. 1992

Ojedokun AT, Bello OS. 2017. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of Congo red dye using guava leaf-based activated carbon. *Applied Water Science* 7:1965.

Olgun A, Atar N, Wang S. 2013. Batch and column studies of phosphate and nitrate removal adsorption on waste solids containing boron impurity. *Chemical Engineering Journal* 222:108.

Ozmen N, Yesilada O. 2012. Valorization and biodecolorization of dye adsorbed on lignocellulosics using white rot fungi. Bioresources 7:1656.

Pandey A. 2003. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:81.

Papegowda PK, Syed AA. 2017. Isotherm, Kinetic and Thermodynamic Studies on the Removal of Methylene Blue Dye from Aqueous Solution Using Saw Palmetto Spent. *International Journal of Environmental Research* 11:91.

Paprowicz JT. 1990. Activated carbons for phenols removal from wastewaters. *Environmental Technology* 11:71.

Parac-Osterman Đ, Karaman B. 2013. Osnove teorije bojenja tekstila. Sveučilište u Zagrebu Tekstilno – tehnološki fakultet.

Patil YB, Kumari S. 2017. A sustainable agro based industrial ecology model/strategy for efficient waste resource and energy management. *Menagement of Enviromental Quality* 30:61.

Pejin JD, Radosavljević MS, Grujić OS, Mojović LJV, Kocić-Tanackov SD, Nikolić SB, Djukić-Vuković AP. 2013. Mogućnosti primene pivskog tropa u biotehnologiji. *Hemijska Industrija* 67:277.

Pelekani C, Snoeyink VL. 2000. Competitive adsorption between atrazine and methylene blue on activated carbon: The importance of pore size distribution. *Carbon* 38:1423.

Philippoussis A. 2009. Production of Mushrooms Using Agro-Industrial Residues as Substrates. *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues* (pp.163-196).

Pirbazari M, Weber WJ, Jr. 1984. Removal of dieldrin from water by activated carbon. *Journal of Environmental Engineering* 110:656.

Percy AJ, Moore N, Chipman JK. 1989. Formation of nuclear anomalies in rat intestine bybenzidine and its biliary metabolites. *Toxicology* 57:217.

Periasamy D, Mani S, Ambikapathi R. 2019. White Rot Fungi and Their Enzymes for the Treatment of Industrial Dye Effluents. In: Yadav A., Singh S., Mishra S., Gupta A. (eds) Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Fungal Biology. Springer, Cham

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

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. NN 26/20.

Przystas W, Zablocka-Godlewska E, Grabinska-Sota E. 2015. Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. *Brazilian Journal of Microbiology* 46:415.

Qiu H, Lv L, Pan B, Zhang Q, Zhang W, Zhang Q. 2009. Critical review in adsorption kinetic models. *Journal of Zhejiang University Science A* 10:716.

Quaratino D, Federici F, Petruccioli P, Fenice M, D'Annib A. 2007. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. *Journal of Microbiology* 91:57.

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

Ralph JP, Catcheside DEA. 2002. Biodegradation by White-Rot Fungi. In book: *Industrial Application* DOI:10.1007/978-3-662-10378-4_15.

Rani KC, Naik A, Chaurasiya RS, Raghavarao KSMS. 2017. Removal of toxic Congo red dye from water employing low-cost coconut residual fiber. *Water Science and Technology* 75:22205.

Reddy DD, Rakesh KG, Bindu JP, Mahadevaswamy M, Murthy TGK. 2017. Removal of Methylene Blue from Aqueous System Using Tobacco Stems Biomass: Kinetics, Mechanism and Single-Stage Adsorber Design. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 36:4.

Reis HCO, Cossolin AS, Santos AP, Castro KC, Pereira GM, Silva VC, Sousa Jr PT, Dall`Oglio EL, Vasconcelos LG, Morais EB. 2018. Malt bagasse waste as biosorbent for malachite green: An ecofriendly approach for dye removal from aqueous solution. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering* 12:4.

Ribeiro AVFN,da Silva AR, Pereira MG, Licinio MVVJ, Ribeiro JN. 2018. Wood sawdust powder from *Corimbya Citriodora* to congo red toxic dye adsorption. *Enviromental science* 8:7.

Rivers DB, Zoldak BR, Evans RS, Emert GH. 1983. Determination of cellulose in municipal solid wastes contaminated with synthetic materials. *Biotechnology Letters* 5:777.

Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77:247.

Rodriguez-Couto SR, Sanroman MA. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering* 76:291.

Roy A, Chakraborty S, Kundu SP, Adhikari B, Majumder SB. 2013. Lignocellulosic jute fiber as a bioadsorbent for theremoval of azo dye from its aqueous solution: batch and column studies. *Journal of Applied Polymer Science* 129:15.

Roy U. Manna S, Senputa S, Bhowal A, Das P, Datta S, Mukopadhyay A. 2018. Dye Removal Using Microbial Biosorbents. U: Green Adsorbents for Pollutant Removal. Springer, pp 253–280.

Ruiz-Hidalgo K, Chin-Pampillo JS, Masis-Mora M, Carazo RE, Rodríguez- Rodríguez CE 2014. Degradation of carbofuran by *Trametes versicolor* in rice husk as a potential lignocellulosic substrate for biomixtures: From mineralization to toxicity reduction. *Process Biochemistry* 49:2266.

Sadaf S, Bhatti HN, Nausheen S, Amin M. 2015. Application of a novel lignocellulosic biomaterial for the removal of Direct Yellow 50 dye from aqueous solution: Batch and column study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 47:160.

Salazar-Rábago JJ, Ramos RL, Rivera-Utrilla J, Cerino-Cordova FJ. 2017. Biosorption mechanism of Methylene Blue from aqueous solution onto White Pine (*Pinus durangensis*) sawdust: Effect of operating conditions. *Sustainable Environment Research* 27:1.

Sánchez Orozco R, Balderas Hernández P, Roa Morales G, Ureña Núñez F, Orozco Villafuerte J, Lugo Lugo V, Flores Ramírez N, Barrera Díaz CD, Cajero Vázquez P. 2014. Characterization of Lignocellulosic Fruit Waste as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production. *BioResources* 9:2.

Santos GC, Pedro RJ, Rodrigues HDP, Mitter EK, Corso CR. 2009. Análise de biodegradabilidade dos corantes têxteis procion blue MX-G e crystal scarlet em solução ácida por phanerochaete *Chrysosporium* e *Aspergillus oryzae*. *O Biologico* 71:192.

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

Shakoor S, Nasar A. 2016. Removal of methylene blue dye from artificially contaminated water using citrus limetta peel waste as a very low cost adsorbent. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 66:154.

Shakoor S, Nasar A. 2017. Adsorptive treatment of hazardous methylene blue dye from artificially contaminated water using *cucumis sativus* peel waste as a low-cost adsorbent. *Groundwater for Sustainable Development.* 5:152.

Sharma J, Janveja B. 2008. A study on removal of congo red dye from the effluents of textile industry using rice husk carbon activated by steam. *Rasayan Journal of Chemistry* 1:936.

Si J, Cui B, Dai Y. 2013 Decolorization of chemically different dyes by white-rot fungi in submerged cultures. *Annals of Microbiology* 63:1099.

Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E. 2012. Fungal Strategies for Lignin Degradation. *Advances in Bothanical Research* 61:263.

Silva JP, Sousa S, Rodrigues J, Antunes H, Porter JJ, Gonçalves I, Ferreira-Dias S. 2004. Adsorption of acid orange 7 in aqueous solutions by spent brewery grains. *Separation andPurification Technology* 40:309.

Singh RK, Murty HR, Gupta SK, Dikshit AK. 2008. Integrated environment management in steel industries. *International Journal of Management and Decision Making* 9:103.

Sjostrom E. 1993. Wood Chemistry. Fundamentals and Applications, 2nd ed., Academic Press, San Diego, USA, str. 292

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

Slokar YM, Le Marechal M. 1997. Decoloration of chlorotriazine reactive azo dyes with H_2O_2/UV. *Dyes and Pigments* 33:281.

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

Sun G, Xu X. 1997. Sunflower stalks as adsorbents for color removal from textile wastewater. *Industrial & engineering chemistry research* 36:80.

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

Suteu D, Măluțan T. 2013. Industrial Cellolignin Wastes as Adsorbent for Removal of Methylene Blue Dye from Aqueous Solutions. *Bioresource Technology* 8:427.

Šikić Z, 2016, Sustavi gospodarenja vodom, Sveučilište u Zadru, Zadar

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

Tang R, Chong Dai C, Li C, Liu W, Gao S, Wang C. 2017. Removal of Methylene Blue from Aqueous Solution Using Agricultural Residue Walnut Shell: Equilibrium, Kinetic, and Thermodynamic Studies. *Journal of Chemistry* 2017:10.

TAPPI, 1985. Acid-soluble lignin in wood and pulp. Useful method 246 TAPPI. Atlanta

Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 28:420.

Tran HN, You SJ, Cha HP. 2017. Fast and efficient adsorption of methylene green 5 on activated carbon prepared from new chemical activation method. *Journal of Environmental Management* 188:322.

Uredba (EZ) br. 1331/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o uspostavi zajedničkog postupka odobravanja prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i prehrambenih aroma

Valášková V, Baldrian P. 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* - production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152:3613.

Vanreppelen K, Vanderheyden S, Kuppens T, Schreurs S, Yperman J, Carleer R. 2014. Activated carbon from pyrolysis of brewer's spent grain: Production and adsorption properties *Waste Management & Research* 32: 634.

Varghese AG, Paul SA. 2018. Cellulose Based Green Adsorbents for Pollutant Removal from Wastewater: Innovative materials. U: Green Adsorbents for Pollutant Removal. Springer Nature Switzerland AG, Cham, Švicarska.

Vasdev K. 2011. Decolorization of triphenylmethane dyes by six white-rot fungi isolated from nature. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 2:128.

Velić N, Marček T, Jurić T, Petrinović K, Hasenay D, Begović L, Slačanac V. 2015. A survey of different bioadsorbents for removal of malachite green and methylene blue dyes from aqueous solutions. *15th Ružička days "Today science - tomorrow industry" – Proceedings* 424-432.

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

Venkatamohan S, Rao N, Karthikeyan J. 2002. Adsorptive removal of direct azo dye from aqueous phase onto coal based sorbents: a kinetic and mechanistic study. *Journal of Hazardous Materials* B90:189.

Vijayaraghavan K, Yun YS. 2008. Biosorption of C.I. Reactive Black 5 from aqueous solution using acid-treated biomass of brown seaweed *Laminaria* sp. *Dyes and Pigments* 76:726.

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

Xie B, Qin J, Wang S, Li X, Sun H, Chen W. 2020. Adsorption of Phenol on Commercial Activated Carbons: Modelling and Interpretation. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17:789.

Yakout SM, Daifullah AAM. 2013. Removal of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution onto various adsorbent materials. *Desalination and Water Treatment* 51:6711.

Yadav A, Mukherji S, Garg A. 2013. Removal of Chemical Oxygen Demand and Color from Simulated Textile Wastewater Using a Combination of Chemical/Physicochemical Processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 52:10063.

Yan T, Wang L. 2013. Adsorptive Removal of Methylene Blue from Aqueous Solution by Spent Mushroom Substrate: Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamics. *Bioresource Technology*, 8:4722.

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

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

Yuan HS, Dai YC, Steffen K. 2011. Screening and evaluation of white rot fungito decolourise synthetic dyes, with particularreference to *Antrodiella albocinnamomea. Mycology* 3:100.

Zakon o vodama NN66/19.

Zorc B, Pavić K. 2017. Metilensko modrilo – lijek, bojilo, indikator. *Farmaceutski glasnik: glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva* 73:99.

Zweistra-Hoogschagen MJ. 2007. Macroscopic modelling of solid-state fermentation, doktorska disertacija, Wageningen University, Wageningen, Nizozemska.

Wanyonyi W, Onyari J, Shiundu P. 2014. Adsorption of Congo Red Dye from Aqueous Solutions Using Roots of Eichhornia Crassipes: Kinetic and Equilibrium Studies. *Energy Procedia*. 50:862.

Walker GM, Weatherley LR. 1999 Kinetics of acid dye adsorption on GAC. *Water Research* 33:1895.

Weber Jr WR, Morris JC, Stumm W. 1962. Determination of Alkylbenzenesulfonates by Ultraviolet Spectrophotometry. *Analytical Chemistry* 34:1844.

8. ŽIVOTOPIS

8. Životopis

Antonija Kezerle rođena je u Osijeku 18. siječnja 1977. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala je dodiplomski studij Prehrambene tehnologije, smjer Prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomirala je 2001. godine pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Spomenke Kovač, obranivši diplomski rad naslova „*Priprava intermedijera za sintezu serina*".
Od veljače 2005. zaposlena je kao inženjer analitičar u RJ Ekolaboratorij, PJ Odvodnja, Vodovod-Osijek d.o.o. Od 2015. godine radi kao voditelj kemijskog odjela RJ Ekolaboratorija, a od 2016. godine kao rukovoditeljica RJ Ekolaboratorija.
2012. godine upisala je poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Zaštita prirode i okoliša.
Članica je Hrvatskog društva za zaštitu voda, Hrvatskog društva kemijskih inženjera, Hrvatskog zavoda za normizaciju – članica tehničkih odbora HZN/TO 522 *Karakterizacija i zbrinjavanje otpada* i HZN/TO 554 *Obrada otpadnih voda* te članica Komisije za otpadnu vodu pri Hrvatskoj grupaciji vodovoda i kanalizacije.

Popis objavljenih radova

Radovi a1 skupine (WoS, CC):

1. Kezerle A, Velić N, Hasenay D, Kovačević D. 2018. Lignocellulosic materials as dye adsorbents: Adsorption of methylene blue and congo red on brewer`s spent grain. *Croatia Chemica Acta*, 91, 1; 1-12

Radovi a3 skupine (zbornici skupova s međunarodnom recenzijom):

1. Velić N, Pavlović H, Pavičić M, Kezerle A. 2017. Obezbojenje sintetskih bojila na agrarnim pločama odabranim gljivama. *Proceeding of 16th Ružička Days „ Today science tomorrow industry"*. 295-301
2. Bušić V, Velić N, Bunjik I, Martinović M, Kezerle A, Pavlović H, Gašo-Sokač D. 2018. Desorption of synthetic dye methylene blue from dye-adsorbed lignocellulosic biosorbent using organic solvents. *Natural resources green technology & sustainable development – PROCEEDINGS*, Zagreb : Hendrih Feldbauer d.o.o., str. 111-115
3. Kezerle A, Pavlović H, Silađi T, Antunović K, Martinović M, Velić D, Velić N. 2018. Biološka obrada pivskog tropa obojenog metilenskim modrilom i kongo crvenilom pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*. *11th International scientific/professional conference Agriculture in nature and environment protection*. Osijek : Glas Slavonije d.d., 2018. 184-188
4. Velić N, Antunović K, Pavlović H, Kezerle A, Mastanjević K, Velić D. 2018 Uklanjanje sintetskog bojila malahitnog zelenila pomoću micelijskih peleta *Trametes versicolor*. *7. međunarodni znanstveno-stručni skup Voda za sve* – Proceedings, Osijek : Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, str. 323-330
5. Kezerle A, Jurić T, Velić N, Hasenay D, Marček T, Velić D. 2016. Adsorptive removal of methylene blue from aqueous solutions using lignocellulosic waste materials and biological treatment of dye-adsorbed biosorbent. *Proceedings&abstracts of*

9th International scientific/professional conference Agriculture in nature and environment protection Osijek : Glas Slavonije d.d. 204-208

6. Kezerle A, Kolak K, Marček T, Hasenay D,Velić D, Velić N. 2016. Adsorptive removal of malachite green from aqueous solution using lignocellulosic waste material, *Proceedings of 2nd International and 6th Croatian Scientific and Professional Conference "Water for all"*. Osijek : Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. 98-103
7. Kezerle A, Velić N, Pavlović H, Velić D, Hasenay D, Kovačević D. 2016. Removal of Congo red from aqueous solution using lignocellulosic biosorbent and solid state fermentation of dye-adsorbed biosorbent. *Proceedings Natural resources, green technology&sustainable development 2*, Zagreb : Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb. 95-99

Kongresno priopćenje u CC časopisu:

1. Velić N, Pavlović H, Gorenšek J, Kezerle A, Mastanjević K, Velić D. 2017. Screening of New Fungal Isolates for Synthetic Dyes Decolourisation Ability. *Journal of Biotechnology, Volume 256, Supplement*. Elsevier, 2017. 59-59.

Kongresno priopćenje:

1. Amić A, Kezerle A. 2018. Spojevi dušika u vodi – izvori, procesi, utjecaj na zdravlje i okoliš // *Book of Abstracts of the 7th Symposium with International Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2018* / Kopačevo : Public Institution "Kopački Rit Nature Park", 10-11
2. Amić A, Kezerle A, Rožac V. 2018. Suvremene metode remedijacije onečišćenog tla i vode // *Book of Abstracts of the 7th Symposium with International Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2018* / Kopačevo : Public Institution "Kopački Rit Nature Park", 12-13
3. Amić A, Kezerle A, Rožac V. 2018. Tradescantia test za procjenu genotoksičnosti atmosferskih polutanata // *Book of Abstracts of the 7th Symposium with International Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2018* / Kopačevo : Public Institution "Kopački Rit Nature Park", 14-15
4. Bek N, Žuna Pfeiffer T, Špoljarić Maronić D, Stević F, Kezerle A. 2018. Raznolikost mikrofitskih zajednica u sedimentu Dunava i Sakadaškog jezera // *Book of abstracts of the 7th Symposium with international participation Kopački rit : past, present, future 2018* / Kopačevo, Bilje : Javna ustanova "Park prirode Kopački rit", 18-19
5. Kezerle A, Amić A. 2018. Analiza sadržaja nutrijenata u površinskim vodama rijeke Mure // *Book of Abstracts of the 7th Symposium with International Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2018* / Kopačevo : Public Institution "Kopački Rit Nature Park", 56-57
6. Amić A, Kezerle A, Kundakčić B. 2017. Determination of Polyphenol and Antioxidant Content in Selected Foods // *Book of abstracts of the 10th International Scientific and Professional Conference With Food to Health* / Osijek i Tuzla, 100-100
7. Amić A, Kezerle A, Rožac V. 2017. Concentration of Nutrients in the Karašica River Surface Waters // *Book of Abstracts of the 6th Symposium with International*

Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2017 / Kopačevo : Public Institution "Kopački Rit Nature Park. 15-16

8. Amić A, Kezerle A, Rožac V. 2017. Heavy Metals Concentrations in the Surface Waters of Karašica-Vučica Catchment Area // *Book of Abstracts of the 6th Symposium with International Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2017* / Kopačevo : Public Institution, 2017. 13-14
9. Amić A, Kezerle A, Rožac V. 2017. Concentration of Nutrients in Gaboška Vučica Surface Waters // *Book of Abstracts of the 6th Symposium with International Participation Kopački Rit: Past, Present, Future 2017* / Kopačevo : Public Institution "Kopački Rit Nature Park", 11-12
10. Amić A, Marković Z, Kezerle A, Kundakčić B. 2017. The antioxidant potential of polyphenols present in culinary herbs // *Book of abstracts of the 10th International Scientific and Professional Conference With Food to Health* / Osijek i Tuzla, 125-125
11. Bušić V, Bunjik I, Martinović M, Kezerle A, Velić N, Pavlović H, Gašo-Sokač D. 2018. Desorpcija sintetskog bojila kongo crvenila s obojenog biosorbensa pomoću organskih otapala *Book of Abstracts 17th Ružička Days*. Osijek/Zagreb : Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakulet Osijek, HDKI, 54-54
12. Galir Balkić A, Špoljarić Maronić D, Žuna Pfeiffer T, Stević F, Kezerle A. 2018. Spatial and seasonal oscillation in zooplankton taxonomical and functional groups under distinct environmental scenarios // *Book of abstracts. 3rd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (CESAMIR)* / Łódź : Drukarnia cyfrowa i wydawnictwo "Piktor" S.C.106-106
13. Bek N, Špoljarić Maronić D, Žuna Pfeiffer T,Štolfa Čamagajevac I, Lončarić, Z, Maksimović I, Stević F, Kezerle A, Pilipović A. 2017. Distribucija selena u vodenim biotopima poplavnog područja Kopačkog rita *2. simpozij o biologiji slatkih voda : knjiga sažetaka = 2nd Symposium on Freshwater Biology : abstracts* / Zagreb : Hrvatsko udruženje slatkovodnih ekologa. 4-4
14. Peršić V, Horvatić J, Kezerle A, Horvatić D. 2017. Water quality and pollution by hazardous substances of a small lowland stream under different hydrological conditions *10th Symposium for European Freshwater Sciences - Abstract Book* / Olomouc : The Czech Limnogical Society. 491-491
15. Velić N, Antunović K, Pavlović H, Kezerle A, Mastanjević K, Velić D. 2017. Obezbojenje sintetskog bojila malahitnog zelenila pomoću micelijskih peleta *Trametes versicolor*. *7th international Scientific and Profesional Conference Water for All - Book of abstracts* Osijek : Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. 34-35
16. Žuna Pfeiffer T, Špoljarić Maronić D, Bek N, Stević F, Kezerle A. 2017. Cyanobacteria as ubiquitous colonizers: a case study from floodplain lake *15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology - Book of Abstract* Zagreb: Ruđer Bošković Institute