



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kaja BELKO PARKEL

**UPORABA GLIVNIH ENCIMOV ZA ČIŠČENJE
OKOLJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kaja BELKO PARKEL

UPORABA GLIVNIH ENCIMOV ZA ČIŠČENJE OKOLJA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**APPLICATIONS OF FUNGAL ENZYMES TO CLEAN THE
ENVIRONMENT**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Miha Humarja.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Miha Humar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 13. 9. 2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 602.3:582.28:504.5:628.3:661.16:665.6/.7(043.2)
KG	biotehnologija/glive/lignolitični encimi/okolje/remediacija/glive bele trohnobe
AV	BELKO PARKEL, Kaja
SA	HUMAR, Miha (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2017
IN	UPORABA GLIVNIH ENCIMOV ZA ČIŠČENJE OKOLJA
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij – 1. stopnja)
OP	VI, 20 str., 135 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Eden večjih okoljskih problemov danes je onesnaženje s strupenimi kemikalijami, ki predstavljajo resno tveganje za okolje in ljudi. To je vidno tudi iz zadnjih okoljskih nesreč v Sloveniji. Določene vrste gliv, predvsem glive bele trohnobe, so zaradi nespecifičnosti zunajceličnih encimov (lakaze, lignin peroksidaze, od mangana odvisne peroksidaze) privlačne za uporabo pri razgradnji onesnažil, prisotnih v okolju. Čiščenje oz. vračanje okolja v prvotno stanje z uporabo gliv oz. njihovih encimov imenujemo mikoremediacija. Glive so sposobne razgradnje onesnažil, kot so policiklični aromatski ogljikovodiki, polietilen, nafta in naftni proizvodi, različni insekticidi, poliklorirani bifenili in drugi. Razgradnjo omogoča podobnost med strukturo lignina in strukturo teh onesnažil. Glivne encime lahko uporabimo v bioreaktorju ali pa v procesu bioaugmentacije ali biostimulacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 602.3:582.28:504.5:628.3:661.16:665.6/.7(043.2)

CX biotechnology/fungi/lignin-modifying enzymes/environment/remediation/white rot fungi

AU BELKO PARKEL, Kaja

AA HUMAR, Miha (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2017

TI APPLICATIONS OF FUNGAL ENZYMES TO CLEAN THE ENVIRONMENT

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VI, 20 p., 135 ref.

LA sl

AL sl/en

AB One of the main environmental problems today is the pollution of the environment caused by toxic chemicals, which pose a serious risk for the ecosystem and the people involved. This is evident from the latest environmental accidents in Slovenia. Certain species of fungi, mainly white rot fungi, are able to degrade many pollutants present in the environment, due to the non-specificity of their extracellular enzymes (laccases, lignin peroxidases, manganese peroxidases), thus making them an attractive alternative for cleaning the environment. Cleaning or returning the environment to its original state with the use of fungi or its enzymes is called mycoremediation. Similarity between the chemical structure of lignin and the structures of many pollutants enables fungi to degrade a wide range of pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons, polyethylene, oil, insecticides, polychlorinated biphenyls and others. Fungal enzymes can be used in a bioreactor, in addition to approaches of bioaugmentation or biostimulation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1 UVOD	1
2 GLIVNI ENCIMI	2
2.1 LAKAZE	2
2.2 PEROKSIDAZE	4
2.2.1 Od mangana odvisne peroksidaze	4
2.2.2 Lignin peroksidaze	5
3 MIKOREMEDIACIJA	6
3.1 POLICIKLIČNI AROMATSKI OGLJIKOVODIKI (PAH)	8
3.2 POLIETILEN	9
3.3 SUROVA NAFTA	9
3.4 DDT	10
3.5 POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)	10
4 PREDNOSTI IN SLABOSTI	11
5 ZAKLJUČKI	12
6 VIRI	13

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons – policiklični aromatski ogljikovodiki
POPs	Persistent organic pollutants – obstojna organska onesnažila
PCP	Pentachlorophenol – pentaklorofenol
PCB	Polychlorinated biphenyls – poliklorirani bifenili
DDT	1,1,1-trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etan
DDD	1,1-dikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etan
DDA	2,2-bis(4-klorofenil) očetna kislina
DBP	4,4-diklorobenzofenon
DBP	4,4-diklorobenzohidrol
TNT	Trinitrotoluen
LDPE	Low density polyethylene
US-EPA	United States Environmental Protection Agency – agencija za varstvo okolja
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje

1 UVOD

Kontaminacija zemlje je definirana kot prisotnost ksenobiotičnih spojin v okolju v količinah, ki zmotijo njegovo normalno delovanje ali pa povzročajo nesprejemljivo tveganje za ljudi ali druge organizme, ki so v to okolje vpleteni. Zemlja velja za onesnaženo šele, ko so koncentracije kontaminantov nad vrednostmi, ki so jih postavili regulatorni organi (Scullion, 2006). Te vrednosti se v posameznih državah lahko močno razlikujejo.

Kontaminacija se pojavi zaradi nepravilne uporabe kmetijskih kemikalij, kot so fitofarmacevtska sredstva in gnojila, razlitja tekočin (npr. nafta), izcedne vode iz odlagališč in naprav za obdelavo odpadkov v okolici (Rao in sod., 2010; Stolte in sod., 2015). Kontaminanti v zemlji lahko predstavljajo zdravstveno tveganje ljudem, živalim ali rastlinam na več načinov. Lahko se akumulirajo v telesu v določenem časovnem obdobju ter motijo marsikateri proces življenjskega pomena. Visoke koncentracije onesnažil lahko povzročijo raka ali prirojene napake pri potomcih. Pri rastlinah se običajno zmanjša tako količina kot kvaliteta pridelka, če so te posajene v kontaminirani zemlji (Rao in sod., 2010).

O škodljivem vplivu onesnažil na okolje in ljudi pričajo tudi številne okoljske nesreče v Sloveniji in svetu. V Sloveniji je med razvpitimi predvsem onesnaženje reke Krke v Beli Krajini s PCB iz semiške tovarne kondenzatorjev Iskra. Prav tako onesnaženje okolja povzroča kurjenje odsluženih železniških pragov, ki so bili impregnirani s kreozotnim oljem. Med zadnjimi pa je treba omeniti tudi letošnjo nesrečo podjetja Kemis na Vrhniki, kjer je zgorela večja količina tako nevarnih kot nenevarnih odpadkov, posledice pa še niso povsem znane (NIJZ je objavil rezultate analiz, v katerih so ugotovili preseganje mejnih vrednosti za kadmij, nikelj, arzen, DDT/DDD/DDE in PAH) (Priporočila ..., 2017). Med večje svetovne katastrofe pa spadajo nesreča tankerja Exxon Valdez blizu Aljaske, izlitje nafte v Mehiški zaliv, izpust metil izocianata v Bhopalu, Indija, onesnaženje Love Canala v ZDA in razlitje surove nafte Amoco Cadiz blizu Bretanje v Franciji (Beck, 1979; Black, 2010; Žist, 2011).

Mikoremediacija je uporaba gliv pri razgradnji oziroma odstranitvi toksinov iz okolja, ki izkorišča sposobnost gliv, da razgradijo dolge verige različnih toksinov v krajše, bolj enostavne in manj toksične komponente. Ta tehnika vključuje vmešanje micelija v onesnaženo zemljo, postavitev plasti micelija preko toksičnih mest ali kombinacijo teh tehnik (Stamets, 2005).

Sama razgradnja je možna, saj nekatere glive izločajo encime, ki razgrajujejo primarne strukturne komponente lesa, kot sta lignin in celuloza. Ta strukturna elementa lesa sta podobna celi vrsti ksenobiotikov, ki so zašli v okolje. Na podlagi sposobnosti za razkroj strukturnih elementov lesa, glive delimo v dve skupini: glive rjave trohnobe in glive bele trohnobe. Slednje so med njimi pomembnejše, saj so zmožne razgraditi lignin. Nadalje jih delimo še v dve podskupini: simultane delignifikatorke, ki razgrajujejo tako lignin kot celulozo, ter selektivne delignifikatorke, ki razgrajujejo skoraj samo lignin. Encimi, ki jih omenjene glive izločajo, so zaradi edinstvenih lastnosti vsake molekule lignina zelo nespecifični, kar pomeni, da lahko poleg lignina razgradijo tudi široko paleto različnih onesnažil in toksinov, ki imajo takšne kemijske vezi, kot so tiste v ligninu oziroma lesu (Dashtban in sod., 2010).

Prve raziskave o razgradnji onesnažil z glivami bele trohnobe, ki so biotehnološko pomembnejše od gliv rjave trohnobe, so opravili na glivi *Phanerochaete chrysosporium*, ki je postala tudi modelni organizem za študije o razgradnji lignina (Bumpus in sod., 1985). Od takrat so se kot uporabne v namenih mikoremediacije pokazale med drugimi tudi glive iz rodov: *Pleurotus*, *Bjerkandera*, *Coriolopsis*, *Phlebia*, *Trametes*, *Ganoderma* in *Grifola*. (Baldrian, 2008; Kües, 2015; Rodríguez in sod., 2004).

2 GLIVNI ENCIMI

2.1 LAKAZE

Lakaze so zunajcelični glikoproteini, ki jih uvrščamo med polifenolne oksidazne encime. Katalizirajo oksidacijo (običajno fenolnega) substrata ob hkratni redukciji molekularnega kisika v vodo. Vsebujejo 4 bakrove ione, vezane na tri redoks mesta – T1, T2 in T3. Mesto T1, kjer je vezan en bakrov ion, je odgovorno za oksidacijo substrata, ostali trije bakrovi ioni na mestu T2 in T3 pa tvorijo trinuklearno skupino, kamor se veže molekularni kisik. Na tem mestu poteka redukcija molekularnega kisika v vodo, ki se nato sprosti z aktivnega mesta (Thurston, 1994).

Oksidacija substrata z lakazo poteka kot enoelektronska oksidacija, pri kateri se substrat pretvori v kationski prosti radikal. Ob tem se bakrovi ioni reducirajo, z redukcijo kisika v vodo pa se encim vrne v izhodiščno stanje. Odvzeti elektron se prenese s substrata na baker in z bakra na kisik. Oksidirati se morajo štiri molekule substrata, iz ene molekule kisika pa tako nastaneta dve molekuli vode. Redukcija kisika se dogaja na mestu T2/T3 (vezavno mesto za kisik), odvzeti elektron substrata pa tja pride preko ohranjenega zaporedja (His-Cys-His), ki povezuje baker na mestu T1 z bakri skupine (Alcalde, 2007; Baldrian, 2006; Riva, 2006; Thurston, 1994; Vaukner in sod., 2011). Kationski prosti radikal nato z lahkoto polimerizira in tvori dimere, oligomere ali polimere ali pa cepi vezi v organskih substratih (Alcalde, 2007; Giardina in sod., 2010; Vaukner in sod., 2011).

Glavna funkcija bazidiomicetnih lakaz je depolimerizacija lignina, za samo razgradnjo pa je potrebno sinergistično delovanje različnih glivnih encimov, kot sta še npr. lignin peroksidaza in mangan peroksidaza (Alcalde, 2007). Ker pa je njihovo delovanje relativno nespecifično, jih lahko uporabimo tudi za oksidacijo substratov, ki so splošno podobni (tipični substrati so sicer fenoli) (Rhodes, 2014). Pogosto pa substrata ni mogoče direktno oksidirati z lakazo, ker je prevelika, da bi lahko dostopala do substrata (Alcalde, 2007; Thurston, 1994). V takih primerih uporabljamo mediatorje (npr. ABTS oz. 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6 sulfonska kislina), ki služijo kot vmesni substrat za lakaze. Lakaza reagira z mediatorjem, oksidirani radikali mediatorja pa s substratom. Molekule mediatorja delujejo neodvisno od encima (Vaukner in sod., 2011).

Pogoji, pod katerimi raste kultura, ter sestava gojišča igrajo pomembno vlogo pri ekspresiji. Na produkcijo lakaz vplivajo parametri, kot so čas kultivacije, ali gre za emerzno ali submerzno kulturo, koncentracija organskih in anorganskih spojin, koncentracija induktorja (Palmieri in sod., 2000), aeracija (Dekker in Barbosa, 2001) in razgradnja oz. aktivacija proteaz (Palmieri in sod., 2001). Sinteza lakaz poteka večinoma v sekundarnem metabolizmu gliv belih trohnob, ki lahko rastejo tako na »naravnih« substratih kot v submerzni kulturi

(Shraddha in sod., 2011). Vpliv mešanja, pH, temperature, vira ogljika in dušika ter mikroelementov pa se med različnimi vrstami gliv bele trohnobe lahko precej razlikuje (Viswanath in sod., 2014).

Produkcija lakaz je tako tesno povezana s pogoji kulture (Heinzkill in sod., 1998; Praveen in sod., 2011). Gojišče, ki omogoča produkcijo velike količine biomase pa ne pomeni nujno tudi visokih donosov lakaz (Xavier in sod., 2001). Pomemben vpliv ima predvsem koncentracija oz. vir dušika in ogljika. Gliva *Phanerochaete chrysosporium* ne proizvaja lakaz ne v mediju z visoko niti v mediju z nizko koncentracijo dušika, če je vir ogljika glukoza. Če je vir ogljika celuloza pa produkcija lakaz poteka v obeh medijih (Srinivasan in sod., 1995). Gliva *Ganoderma lucidum* višje količine lakaz proizvede v mediju z visoko koncentracijo dušika in glukozo kot virom ogljika (D'souza in sod., 1999). Ligninolitični encimski sistem gliv bele trohnobe se večinoma aktivira v sekundarnem metabolizmu, pogosto pa ga sproži koncentracija dušika ali pa pomanjkanje ogljika ali žvepla (Buswell in sod., 1995; Heinzkill in sod., 1998). Prav tako povečanje oz. indukcijo aktivnosti lakaz sproži dodatek različnih ksenobiotikov, kot so npr. ksilidin, lignin ali veratril alkohol (Xavier in sod., 2001).

O vplivu pH na produkcijo lakaz ni znano veliko, a je produkcija lakaz večja, če je vrednost pH nekoliko nižja. Optimum pH za produkcijo lakaz se tako pri veliko vrstah nahaja med 5,0 in 6,0 (Minussi in sod., 2007; Papinutti in sod., 2003; Thiruchelvam in Ramsay, 2007; Thurston, 1994).

Optimalna temperatura za produkcijo lakaz je med 25 °C in 30 °C, vrednost pa je odvisna od prisotnosti svetlobe. Ob prisotnosti svetlobe je proizvodnja lakaz najvišja pri 25 °C, če pa kultura poteka v temi, optimalna produkcija lakaz teče pri 30 °C (Minussi in sod., 2007; Thurston, 1994). Pri temperaturah višjih od 30 °C se zmanjša aktivnost lakaz (Zadrazil in sod., 1999), sam temperaturni razpon pa se lahko od vrste do vrste precej razlikuje – našli so tudi izolat *Steccherinum ochraceum* 1833, ki proizvaja tri termostabilne izooblike lakaz, ki imajo temperaturni optimum med 75 in 80 °C (Chernykh in sod., 2008; Hildén in sod., 2009). Vir ogljika lahko predstavljajo glukoza, fruktoza, galaktoza, ksiloza, laktoza, saharoza, manitol, pektin itd. (D'Souza-Ticlo in sod., 2006). *Trametes versicolor* trikrat poveča produkcijo lakaz, če je v gojišču namesto fruktoze prisotna glukoza, nadaljnje pa produkcijo za 12 % poveča še dodatek škroba (Revankar in Lele, 2006). Pri rekombinantni lakazi iz *Ganoderme lucidum*, izraženi v kvasovki *Pichia pastoris*, pa encimatsko aktivnost za približno 15 % poveča vir ogljika v obliki manitola (Sun in sod., 2012).

Pogosto je sprožilec sinteze lakaz pomanjkanje dušika (Leatham in Kirk, 1983), pri nekaterih vrstah pa koncentracija dušika nima vpliva na aktivnost lakaz (Janusz in sod., 2006) – npr. *Lentinula edodes* proizvaja lakaze tudi pri visokih koncentracijah dušika (Buswell in sod., 1995), čeprav je splošno sprejeto, da je za produkcijo potrebno visoko razmerje med ogljikom in dušikom (Leatham in Kirk, 1983; Lo in sod., 2001). Najvišji donosi so pri uporabi peptona, kvasnega ekstrakta ali glutaminske kisline v nizkih koncentracijah (Leatham in Kirk, 1983; Revankar in Lele, 2006; Strong, 2011).

Aromatske spojine, ki so strukturno sorodne ligninu, kot so ksilidin, ferulinska kislina in 3,4-dimetoksibenzojska kislina, se pogosto dodajajo v glivne kulture za povečanje produkcije

lakaz (Yaver in sod., 1996). Nekatere spojine vplivajo na metabolizem ali stopnjo rasti, druge (npr. etanol) pa produkcijo lakaz sprožijo posredno (Dhawan in Kuhad, 2002). Veratril (3,4-dimetoksibenzil) alkohol igra pomembno vlogo v sintezi in razgradnji lignina. Dodatek tega v gojišče se namreč kaže v zvečanju produkcije lakaz (Froehner in Eriksson, 1974). Transkripcija lakaz se poveča tudi v vrstah *Trametes villosa* in *Trametes versicolor* ob dodatku ksilidina (Collins in Dobson, 1997; Saraiva in sod., 2012; Yaver in sod., 1996).

Baker ima stimulativen efekt na sintezo lakaz za veliko gliv, med njimi *Neurospora crassa*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes trogii*, *Lentinula edodes* in *Grifola frondosa*, zato je dodatek bakrovih ionov enostavna metoda za izboljšanje produkcije tega encima (Arora in Rampal, 2002; Cavallazzi in sod., 2005; Dittmer in sod., 1997; Huber in Lerch, 1987; Levin in sod., 2002; Palmieri in sod., 2000). Z western prenosom sta Huber in Lerch (1987) dokazala, da je sinteza lakaz povezana s prisotnostjo bakrovih ionov v mediju (*Trametes pubescens*, 2 0 mM CuSO₄), poleg tega pa so za visok donos pomembni tudi parametri dovajanja bakrovih ionov in koncentracija bakrovih ionov. Visoke koncentracije bakra (500 mM) so sicer inhibirale rast in znižale aktivnost mangan peroksidaz, na izločanje lakaz pa niso imele bistvenega vpliva (Levin in sod., 2002).

2.2 PEROKSIDAZE

Peroksidaze so skupina oksidoreduktaz, ki v svoji strukturi vsebujejo hem. Katalizirajo redukcijo peroksida (npr. vodikovega peroksida, H₂O₂) in oksidacijo različnih organskih in anorganskih substratov. Najpomembnejši v skupini peroksidaz razreda II sta lignin peroksidaza in od mangana odvisna peroksidaza oz. mangan peroksidaza, ki se v glivah z ligninolitično aktivnostjo pogosto sintetizirata simultano (Ikehata in sod., 2004). Značilne reakcije vključujejo ne-stereospecifične cepitve vezi med C_α in C_β atomi ter β-O-4 reze v dimernih modelih lignina, odprtje aromatskega obroča, oksidacijo benzil alkoholov (lignin peroksidaze lahko v nasprotju z mangan peroksidazami oksidirajo veratril alkohol, ki je sekundarni metabolit gliv) v ustrezne aldehide oz. ketone in hidroksilacijo benzilnih metilenskih skupin (Ikehata in sod., 2004; Tien in Kirk, 1984; Umezawa in Higuchi, 1989).

2.2.1 Od mangana odvisne peroksidaze

Mangan peroksidaza za svojo aktivnost potrebuje vodikov peroksid (H₂O₂) in divalentne manganove katione (Mn²⁺). Encim katalizira oksidacijo Mn²⁺ v Mn³⁺, hkrati pa se spojina I reducira v spojino II, kar pravzaprav omogoča nastanek Mn³⁺, posledično pa se oksidira še organski substrat, ki je lahko lignin ali ligninu podobna organska spojina (Cohen in sod., 2002).

H₂O₂ se veže na železo oksidazo (ang. ferric enzyme), to pa vodi v tvorbo železo-peroksid kompleksa, ki po cepitvi tvori spojino I. Spojina I se nato reducira v spojino II ob hkratni oksidaciji Mn²⁺ (donor elektrona) v Mn³⁺ (Hofrichter, 2002). H₂O₂ služi kot primarni oksidant, ki substratu odvzame dva elektrona in ob redukciji sprosti dve molekuli vode (Lundell in sod., 2010). Mn³⁺ se stabilizira z organskimi kislinami, kot sta oksalna in malonska kislina, ta keliran Mn³⁺ pa nespecifično napade mnoge organske spojine z odstranitvijo elektronov (Hofrichter, 2002). Aktivnost lahko povečamo z dodatkom mediatorskih spojin, kot so glutation ali nenasičene maščobne kisline, ki pomagajo pri tvorbi

prostih radikalov, ki nato napadejo druge spojine, ki jih sam encim ne bi mogel (Hofrichter, 2002; Tuomela in Hatakka, 2011).

V nekaterih kulturah gliv bele trohnobe, kot so *Pleurotus ostreatus* (Sarkar in sod., 1997), *Bjerkandera* sp. (Mester in Field, 1998) in *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Dueñas in sod., 1999) pa so odkrili tudi od mangana neodvisne peroksidaze – ti encimi oksidirajo različne fenolne spojine in aromatske amine, med njimi tudi ABTS, v odsotnosti manganovih kationov. Wang in sodelavci (2002) so tako predlagali, da imajo ti encimi veliko potencialnih aplikacij pri razgradnji ksenobiotikov, kot so poliaromatski ogljikovodiki oz. PAH.

S testi, ki temeljijo na sproščanju označenega $^{14}\text{CO}_2$, so Keyser in sod. dokazali, da se ligninolitični encimski sistem *P. chrysosporium* aktivira ob pomanjkanju dušika. Prav tako ima isti učinek pomanjkanje vira ogljika in žvepla, sintezo lignin peroksidaze pa inducira tudi dodatek veratril alkohola (Jeffries in sod., 1981; Keyser in sod., 1978; Leisola in Fiechter, 1985).

Pomembno vlogo v regulaciji aktivnosti lignin peroksidaze in mangan peroksidaze igrajo tudi Mn^{2+} ioni. Z raziskavo z uporabo glive *P. chrysosporium* so dokazali, da se lignin peroksidaza tvori v tekoči kulturi, ko je koncentracija Mn^{2+} nizka (pod 8 ppm), glede na to pa sklepajo, da bi višja koncentracija Mn^{2+} lahko vplivala na represijo lignin peroksidaze (koncentracija Mn^{2+} se med različnimi vrstami lesa razlikuje, večinoma pa se giblje med 20 in 200 ppm). Pri teh koncentracijah se sintetizira mangan peroksidaza, ki oksidira Mn^{2+} v Mn^{3+} , po določenem času pa se Mn izčrpa in takrat se lahko aktivira sinteza lignin peroksidaze, ki deluje neposredno na podstrukture lignina, ki so najverjetneje po delovanju mangan peroksidaze bolj dovzetne na delovanje lignin peroksidaze (Bonnarme in Jeffries, 1990).

2.2.2 Lignin peroksidaze

Lignin peroksidaza oksidira nefenolne ligninske podstrukture z odstranitvijo enega elektrona, običajno z aromatskega obročja lignina (Hatakka, 1994). S tem se ustvari kationski prosti radikal (Bonnarme in Jeffries, 1990), temu pa sledijo reakcije cepitve (Bonnarme in Jeffries, 1990; Hammel in sod., 1985). Mehanizem je podoben mehanizmu mangan peroksidaz. Vodikov peroksid služi kot akceptor elektronov. Lignin peroksidaza oksidira substrat, ob tem pa se tvorijo radikali, ki so zmožni oksidacije mnogih organskih spojin (Hofrichter in sod., 2010). Zaradi visokega redoks potenciala lahko lignin peroksidaze oksidirajo tudi nefenolne strukture z odstranitvijo elektrona tako, da nastane aril kationski radikal (Pointing, 2001).

Za močno oksidacijsko sposobnost lignin peroksidaz je odgovorno železo v porfirinskem obroču, ki ima večje oksidacijsko stanje kot klasične peroksidaze (Millis in sod., 1989). Prav tako je na izpostavljeni regiji na površini encima prisoten triptofanski ostanek (trp171), ki sodeluje pri prenosu elektronov iz aromatskega substrata, ki ne morejo priti v neposreden stik z oksidiranim hemom (Doyle in sod., 1998). Zaradi tega lahko lignin peroksidaza neposredno oksidira ligninu podobne substrate – če z mestno specifično mutagenezo zamenjajo triptofanski ostanek za serinskega, lignin peroksidaza izgubi svojo aktivnost (Doyle in sod., 1998; Millis in sod., 1989). Vendar pa se s povečevanjem velikosti substrata manjša učinkovitost oksidacije – ta še zmeraj poteka, a je nujna prisotnost veratril alkohola (Hammel in sod., 1993), morda zato ker kationski radikal veratril alkohola lahko deluje kot mediator

(Gilardi in sod., 1990). Druga razlaga za nujno prisotnost veratril alkohola pa se osredotoča na to, da veratril alkohol preprečuje encimu, da bi ostal oksidiran za daljši čas, medtem ko katalizira relativno počasno cepitev obsežnih struktur lignina (Cai in Tien, 1992; Hammel in Cullen, 2008).

3 MIKOREMEDIACIJA

Eden večjih okoljskih problemov, s katerim se soočamo danes, je onesnaženje zemlje, vode in zraka s toksičnimi kemikalijami. V zemlji so problematični predvsem obstojni organski polutanti (ang. persistent organic pollutants oz. POPs). Med njimi so policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH, ang. polycyclic aromatic hydrocarbons), pentaklorofenoli (PCP), poliklorirani bifenili (PCB), dikloro-difenil-trikloroetan (DDT), benzen, toluen, etilbenzen, ksilen, naftni proizvodi, polietilen in trinitrotoluen (TNT), ki so v okolju zelo obstojni in imajo karcinogene in/ali mutagene učinke (Viswanath in sod., 2014). Sposobnost gliv za pretvorbo nevarnih kemikalij pa je sprožila veliko zanimanja in raziskav za uporabo gliv v bioremediaciji (Bollag in sod., 2003).

Mikoremediacija je uporaba gliv pri razgradnji oziroma odstranitvi toksinov iz okolja, ki izkorišča sposobnost gliv, da razgradijo dolge verige različnih toksinov v krajše, bolj enostavne in manj toksične komponente, npr. v ogljikov dioksid, vodo, metan, anorganske snovi, biomaso ali ostale produkte, ki so manj kompleksni in škodljivi (Alperin in sod. 1997; Stametes, 2005). Kot že opisano zgoraj, ta sposobnost temelji na nespecifičnosti in velikem oksidativnem potencialu glivnih encimov, ki olajšajo razgradnjo organskega materiala, ki je v naravi najbolj odporen na razgradnjo – lignin, celuloza in hemiceluloza. Odpornost na razgradnjo izhaja iz same biosinteze: lignin namreč nastaja z naključnim premreženjem in ustvarja hidrofobno okolje, saj tako ščiti celično steno pred vodo in razgradnjo. (Kües, 2015). Glivne encime lahko uporabimo v bioreaktorju (mikoremediacija *ex situ*), kar zajema izkop onesnažene zemlje in transport do bioreaktorskega sistema, ali pa pri bioaugmentaciji oz. biostimulaciji (mikoremediacija *in situ*), torej čiščenju onesnažene zemlje, ne da bi jo prej odstranili (Sims in sod., 1990). Bioaugmentacija pomeni dodatek kulture v onesnaženo zemljo za pospeševanje razgradnje kontaminanta, biostimulacija pa modifikacijo okolja za stimulacijo organizmov, ki so sposobni bioremediacije, torej dodatek nutrientov za izboljšanje aktivnosti avtohtonih organizmov (Scullion, 2006). Prav tako lahko encime uporabimo za zmanjšanje onesnaženja odpadnih vod ali trdnih materialov, preden so sproščeni v okolje ali pa zgolj kot biosenzorje oz. bioindikatorje za spremljanje onesnaženja v okolju (Kües, 2015; Scullion, 2006).

Najbolj privlačna metoda za remediacijo zemlje, kjer so prisotni POPs, je razgradnja na mestu (mikoremediacija *in situ*). Takšna metoda je predvsem bolj ugodna, saj ni dodatnih stroškov z odstranitvijo, transportom in skladiščenjem onesnažene zemlje. Sama metoda je preprosta: zemljo se prekrije s plastjo slame ali lesnih sekancev, kjer se je predhodno razrastle micelij. Tako se ustvari membrana encimov, ki nato pronicajo skozi zemljo na toksine v zgornjem sloju tal. Običajno je treba večkrat dodati mešanico substrata in micelija, da se nivo toksinov zniža na sprejemljivo raven (Stametes, 2005).

Za izbiro organizma, ki ga uporabimo pri mikoremediaciji, je najprej treba pregledati teren, ki ga želimo očistiti, kjer poiščemo vrste, ki so tam že naravno prisotne. Če je habitat mikološko

nevtralen (torej ni prisotne nobene vrste gliv), potem kriterij izbire temelji na primernosti razgradnje prisotnega onesnažila (pregled vrst gliv proti določenim kemijskim onesnažilom je predstavljen na sliki 2), pri tem pa upoštevamo tudi pogoje v okolju (npr. vzorec padavin, prisotnost okoliških kmetij, struktura zemlje, prisotnost hranil, vlaga, aeracija, klimatski pogoji, pH in prisotnost mikroorganizmov) (Baldrian, 2008; Baldrian, 2014; Kües, 2015). Prav tako je pomembno, da je izbrana gliva enostavna za delo in da ji v okolju lahko zagotovimo primerne pogoje rasti. Pomembno je tudi, da je gliva na onesnažilo odporna – če izberemo glivo, ki je v tem okolju že prisotna, potem je na prisoten toksin že tolerantna. Če avtohtone glive v tem okolju ni, potem v okolje uvedemo novo, primerno vrsto, ki jo izberemo na podlagi presejalnih testov (Kües, 2015; Stamets, 2005).

Izbran organizem mora biti sposoben onesnažilo razgraditi (Baldrian, 2008), prav tako mora biti v okolju kompetitiven (tako za prostor kot za vire) ter aktiven v proizvodnji zelenih encimov (Borràs in sod., 2011; Winqvist in sod., 2014). Glive bele trohnobe, ki so pri razgradnji onesnažil najbolj uspešne, so tako v okolju lahko nekoliko manj uspešne, če so prisotne tudi druge vrste, saj so prilagojene na posebne pogoje in hranila, ki jim jih nudi les. Tako so lahko odporne na manjše število mikrobnih združb, običajno le na tiste, s katerimi naseljujejo les. Iz tega razloga je potreben dodatek že prej namnožene biomase in hranil. Treba pa je paziti, da kakšno izmed dodanih hranil (ki sicer spodbujajo rast) ne bi zaviralo produkcije encimov (Covino in sod., 2015; Kamolmanit in sod., 2013; Steffen in sod., 2007). Z biostimulacijo oz. dodatkom primernih hranil pospešimo oz. spodbudimo rast in produkcijo encimov avtohtonih organizmov (Teng in sod., 2010). Prednost biostimulacije je, da so v zemlji morda že prisotni neznani ali nepričakovani organizmi, ki bi lahko s sinergističnim delovanjem prisotna onesnažila razgradili, saj razgradnja onesnažil ni omejena zgolj na glive, ki naseljujejo les. Med drugim so odkrili ko-metabolizem razgradnje mono-fluorofenolov ob prisotnosti glukoze z ektomikorizno glivo *Pisolithus tinctorius* (Franco in sod., 2014).

O tem, kaj se zgodi s posameznim encimom, ko se izloči v zemljo, ni znano veliko. Prosta difuzija je manj verjetna. Bolj verjetno se vežejo na organski material oz. delce zemlje (Burns in sod., 2013; Valášková in Baldrian, 2006). Posledično lahko na encimsko aktivnost vpliva tako tip kot druge lastnosti zemlje, npr. prisotnost mineralov, vrednost pH, vsebnost vlage (Štursová in Baldrian, 2011).

Ex situ remediacija vključuje izkop onesnažene zemlje. Ločimo več tehnik, med njimi npr. landfarming tehniko (ustreznega slovenskega termina za to še nimamo), kompostiranje, biokupe in uporabo encimov v bioreaktorjih. Landfarming tehnika je v principu preprosta – po izkopu zemlje jo razporedijo na pripravljeno podlago, kjer jo periodično obdelujejo, dokler se onesnažila ne razgradijo. Cilj je olajšati organizmom aerobno razgradnjo onesnažil. Tehnika je omejena na 10–35 cm debelo plast. Cenovno je ugodna, saj ni veliko stroškov z monitoringom in vzdrževanjem, problem pa so njene prostorske zahteve. Kompostiranje vključuje dodatek gnoj ali kmetijskih ostankov. To namreč spodbuja razvoj mikrobne populacije, ki skupaj z glivami ob povišani temperaturi razgrajujejo onesnažila, ki so prisotna v zemlji (Vidali, 2001). Biokupi so kombinacija teh dveh tehnik in se običajno uporabljajo pri tretiranju površinskih kontaminacij z naftnimi ogljikovodiki (Vidali, 2001; von Fahnstock in Wickramanayake, 1998). Bioreaktorji se uporabljajo za tretma tako onesnažene zemlje kot vode. Sicer sta v bioreaktorjih stopnja in obseg razgradnje večja kot v prej opisanih sistemih ali v sistemih *in situ*, saj lahko okolje oz. pogoje v tem primeru napovemo in kontroliramo,

zahtevajo pa največ predobdelave (izkop, transport, učinkovita je tudi imobilizacija encimov ali mediatorjev) in povzročajo veliko stroškov (Asgher in sod., 2014; Ba in sod., 2013; Gasser in sod., 2014; Jahangiri in sod., 2014; Vidali, 2001).

Izbira primerne tehnike je odvisna od samega kraja onesnaženja in ciljev, ki jih želimo z bioremediacijo doseči. Pomembni kriteriji pri izbiri so tip in koncentracija onesnažila, količina onesnažene zemlje, velikost tretirane površine ter geološki in biološki pogoji. Vse to vpliva na uspešnost in stroškovno učinkovitost bioremediacije ter posledično na izbiro primernega postopka (Highley in Dashek, 2002). (Bruce in Palfreyman, 2002).

3.1 POLICIKLIČNI AROMATSKI OGLJIKOVODIKI (PAH)

PAH so običajno zelo odporni na mikrobiološko in glivno razgradnjo zaradi njihove slabe topnosti in kompleksne strukture, ki je večinoma sestavljena iz dveh ali več združenih benzenovih obročev (Antizar-Ladislao in sod., 2004). Obstaja več kot 100 znanih policikličnih aromatskih ogljikovodikovih spojin, ki se razlikujejo po fizikalno-kemijskih lastnostih. Poudarek je na glavnih šestnajstih, ki jih je ameriška agencija za varstvo okolja (US-EPA) na podlagi njihovega znanega škodljivega vpliva na človeka in okolje označila kot pomembnejše onesnaževalce. Med PAH med drugim uvrščamo antracen, fluoren, fenantren, tetacen, krizen, piren, pentacen in benzo [a] piren (Sack in Günther, 1993). Encimi vpleteni v razgradnjo PAH vključujejo lignin peroksidazo, od mangana odvisno peroksidazo, lakaze in citokrom P450. Peroksidaze in lakaze oksidirajo PAH tako, da nastanejo kinoni, ki se nato metabolizirajo naprej (Cerniglia in Sutherland, 2010).

Razgradnja je odvisna od molekulske mase PAH. Bolj problematični so predvsem PAH z visoko molekulsko maso, saj se lahko upirajo tako biološki kot kemijski razgradnji (Cerniglia in Sutherland, 2001). Zaradi njihove hidrofobne narave je njihova biološka dostopnost precej slaba, ker se velikokrat vežejo na različne delce v zemlji (Peng in sod., 2008).

Primer substrata s PAH je kreozotno olje, ki se uporablja za impregnacijo železniških pragov. Kreozot vsebuje približno 85 % PAH, 10 % fenolnih komponent in 5 % N-, S- in O-heterociklov (Mueller in sod., 1989). Pri mikoremediaciji zemlje onesnažene s kreozotom je uspešen predvsem *Pleurotus ostreatus*, uspešnost pa je odvisna od kompleksnosti strukture oz. molekulske mase. Po 7-tedenski inkubaciji *P. ostreatus* s kreozotom onesnažene zemlje (vsebuje 16 različnih PAH) se je odstotek skupnih PAH znižal za 86 %, odstotek PAH s tremi obročji za 89 %, odstotek PAH s štirimi obročji za 87 % in odstotek PAH s petimi obročji za 48 % (Eggen, 1999).

Bhat in sod. (2002) so raziskovali sposobnost razgradnje sedmih različnih policikličnih aromatskih ogljikovodikov (antracen, benzo[a]antracen, krizen, fluoren, fluoroaten, fenantren in piren) z uporabo dveh gliv bele trohnobe, *Irpex lacteus* in *Pleurotus ostreatus*. Rezultati so pokazali, da je *I. lacteus* po štirinajstih dneh inkubacije razgradil visok odstotek (med 13 % in 67 %) vseh PAH, razen krizena, *P. ostreatus* pa je bil pri tem nekoliko manj uspešen z odstotkom razgradnje med 0 in 26 %.

Glive so zelo uspešne pri razgradnji PAH v tekoči kulturi (Cripps in sod., 1990; Morgan in sod., 1991), rezultati z dejansko onesnaženo zemljo pa so običajno nekoliko slabši, saj je treba upoštevati še dejavnike, kot so biološka dostopnost (Weissenfels in sod., 1992), kompeticija z

naravno mikrofloro in dejstvo, da je delež spojin že razgrajen. Kljub temu so zaradi zunajceličnega delovanja uporabne predvsem v sodelovanju z bakterijskimi vrstami, saj lahko napadejo tudi PAH z visoko molekulske maso (Bhatt in sod., 2002).

3.2 POLIETILEN

V tem stoletju je kemijska sinteza polimerov, kot je polietilen, močno narastla, predvsem zaradi stabilnosti in uporabnosti produktov (Yamada-Onodera in sod., 2001). Polietilen se uporablja v mnogih aplikacijah zaradi njegovih uporabnih fizikalno-kemijskih lastnosti – je trajen, lahek, enostaven za obdelavo in inerten, zato je nepogrešljiv v marsikaterem industrijskem obratu (Prasad in sod., 1999). Težave se pojavijo po tem, ko je material odslužen, saj je težko razgradljiv in onesnažuje okolje ter moti ekosistem. Prav tako je zelo hidrofoben ter ima visoko molekulske maso, kar otežuje biološko razgradnjo (Zahra in sod., 2010). Pogosto je za biološko razgradnjo potrebna predobdelava, npr. z UV-svetlobo. S predobdelavo z UV-svetlobo nastanejo karbonilne skupine, ki jih organizem potrebuje za začetek razgradnje (Albertsson in sod., 1987; Hueck, 1974; Yamada-Onodera in sod., 2001).

Yamada-Onodera in sod. (2001) so izolirali organizem, *Penicillium simplicissimum*, ki je sposoben rasti na polietilenu in ga uporablja kot vir ogljika za rast. Razgradnja je bila boljša, ko so namesto spor uporabili micelij s hifami, saj te prodrejo v matriks polietilena. Natančen mehanizem razgradnje še ni preučen, hipotetičen mehanizem pa se nanaša na ligninolitične encime, ki jih gliva izloči v matriks. Ti razgradijo polietilen na manjše molekule, ki jih gliva nato posrka in uporabi v celičnem metabolizmu.

Zahra in sod. (2010) so prav tako dokazali, da lahko glive uporabijo polietilen kot vir ogljika. Rezultati so pokazali, da *A. terreus* in *A. fumigatus* lahko uporabita LDPE (ang. low density polyethylene) kot vir ogljika, kljub prisotnosti drugih virov.

3.3 SUROVA NAFTA

Veliko vezi, ki držijo rastlinski material skupaj, je podobnih vezem, ki jih najdemo tudi pri naftnih proizvodih (dizelsko gorivo, nafta ter tudi določeni herbicidi in pesticidi). Zato so encimi, ki se izločijo iz micelija, sposobni razgraditi širok spekter sicer trpežnih in toksičnih kemikalij. Zaradi cepitve vezi med ogljikom in vodikom sta primarna produkta cepitve voda in ogljikov dioksid. Približno 50 % organske mase se sprosti kot CO₂, 10–20 % pa kot voda (Stametes, 2005).

P. Stametes in sod. (2005) so po katastrofi Exxon Valdez preizkusili uspešnost rasti *P. ostreatus* na zemlji, onesnaženi s surovo nafto. Na štiri kupe onesnažene zemlje so po plasteh dodali micelij substratom, vmes pa onesnaženo zemljo. V dva kupa so dodali bakterijske kulture, eden pa je služil kot negativna kontrola. Po štirih tednih je bil kup z micelijem drugačne barve (svetlo rjav, prej črn), ni imel več vonja po dizelskem gorivu in po njem so se razrastli trosnjaki *P. ostreatus*. Pri ostalih treh kupih po štirih tednih ni bilo bistvene razlike. V gobah, ki so zrastle na prvem kupu, ni bilo zaznavnih ostankov nafte, vendar pa niso izmerili vsebnosti težkih kovin. Primarni stranski produkti so bili voda, ogljikov dioksid in biomasa. Zmanjšala se je tudi fizična masa kupa v primerjavi z ostalimi tremi. Kasneje so analize pokazale, da so se skupni naftni ogljikovodiki znižali iz vrednosti 20000 ppm na 200

ppm v 8 tednih (Stametes, 2005). Razgradni produkti so tako nestrupeni, ker gre pravzaprav le za pospešitev naravnih procesov, sam postopek pa je preprost in ugoden.

3.4 DDT

DDT (1,1,1-trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etan) se je v preteklosti uporabljal kot insekticid. Zaradi toksičnosti, hidrofobnosti in bioakumulacije so njegovo uporabo leta 1970 v razvitih državah prepovedali (Kannan in sod., 1994; Kelce in sod., 1995), v manj razvitih državah pa ga uporabljajo še danes. Nekatere vrste gliv bele trohnobe so uspešne tudi pri razgradnji organskih biocidov, kot je DDT. *Phlebia lindtneri* in *Phlebia brevispora* sta v gojišču z malo dušika v 21 dneh razgradili 70 in 30 % DDT-ja. Metabolite so analizirali s plinsko kromatografijo v kombinaciji z masno spektrometrijo (GC/MS). Obe glivi sta metabolizirali DDT v DDD (1,1-dikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etan), DDA (2,2-bis(4-klorofenil), očetno kislino) in DBP (4,4-diklorobenzofenon). Poleg tega so pretvorile DDD (ki je prav tako zelo toksičen) v DDA in DBP ter DDA v DBP in DBH (4,4-diklorobenzohidrol). Ko so za substrat uporabili DBP, so glivne kulture tvorile DBH in še tri hidroksilirane metabolite, ki so jih nato inhibirali z dodatkom citokrom P-450 inhibitorja. Ti dve kulturi sta tako razgradili tudi DBP/DBH preko hidroksilacije aromatskega obroča (Xiao in sod., 2011).

3.5 POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)

Poliklorirani bifenili (ang. polychlorinated biphenyls, PCB) se uporabljajo v raznih industrijskih aplikacijah npr. kot hidravlične in dielektrične tekočine ali kot hladilno sredstvo. Njihovo neprimerno odstranjevanje povzroča veliko okoljsko onesnaženost in tveganje za ljudi, saj so zaradi hidrofobne narave topni v maščobah (Parkinson in Safe, 1987). Prisotni so v zemlji, problematično pa je dejstvo, da lahko vstopijo v prehranjevalno verigo (Grittini in sod., 1995).

Razgradnja PCB-jev splošno poteka v dveh stopnjah: aerobni in anaerobni. Prvi korak je dehalogenizacija oz. odstranitev klora, ki jo lahko vršijo nekatere glive. Razgradljivost PCB se znižuje s stopnjo kloriranosti bifenilnih obročev, poročali pa so tudi, da lahko pri visoko kloriranih PCB-jih pod anaerobnimi pogoji prav tako pride do dehalogenizacije, zato potem tvorijo manj klorirane spojine, ki so bolj dovzetne za aerobno razgradnjo (Abramowicz, 1995; Furukawa in Fujihara, 2008; Gomes in sod., 2013). Oksidativna razgradnja PCB-jev v aerobni stopnji zavzema razgradnjo do klorobenzojske kisline in njeno nadaljnjo razgradnjo (Borja in sod., 2005).

Za odstranjevanje PCB-jev je privlačna predvsem tehnika *in situ* remediacije. Glive bele trohnobe lahko dokaj hitro oksidirajo in mineralizirajo tudi PCB-je, ta transformacija pa je omejena z biološko dostopnostjo teh spojin v zemlji (Bumpus in sod., 1985). Razgradnjo PCB so poročali pri glivah *P. chrysosporium*, *Pleurotus florida* (Arisoy, 1998), *T. versicolor* (Johansson in Nyman, 1993), *L. tigrinus* (Homolka in sod., 1995) in *Grifola frondosa* (Seto in sod., 1999).

Ruiz-Aguilar in sod. (2002) so dokazali, da je razgradnja PCB odvisna od same vrste glive ter tudi koncentracije PCB (uporabili so koncentracije 300, 600 in 1800 mg/L). Najbolj uspešna pri razgradnji je bila *T. versicolor*, ki je razgradila 29–70 %, kar 70 % pri začetni

koncentraciji 1800 mg/L, medtem ko je *P. chrysosporium* pri koncentraciji 600 mg/L razgradila 73 %, njena uspešnost pa je bila sicer med 34 in 73 %. Tretja testirana gliva je bila *Lentinula edodes*, ki je dosegla 0–33 % razgradnjo v 10 dneh inkubacije. Uporabili so tekočo kulturo, kjer je tudi učinkovitost razgradnje večja kot pri trdnih kulturah (Fernandez-Sanchez in sod., 2002; Ruiz-Aguilar in sod., 2002).

4 PREDNOSTI IN SLABOSTI

Eden večjih okoljskih problemov danes je onesnaženje zemlje, vode in zraka s toksičnimi kemikalijami, ki predstavljajo resno tveganje za okolje in ljudi. Tehnike, ki so trenutno v uporabi, so drage, zahtevajo veliko časa, velikokrat pa so tudi neefektivne in lahko generirajo toksične razgradne produkte (Grassi in sod., 2011). Uporaba gliv bele trohnobe se je tako pokazala kot učinkovita in uporabna alternativna metoda za odstranitev tovrstnih spojin iz okolja.

Podobnost med strukturo lignina in strukturo mnogih onesnažil je glavna lastnost gliv bele trohnobe, zaradi katere so privlačne za uporabo pri razgradnji onesnažil, prisotnih v okolju (Paszczynski in Crawford, 1995). Prav tako lahko vzdržijo v širokem območju okoljskih pogojev in imajo lahko pozitiven efekt na rast avtohtonih mikroorganizmov, s katerimi s sinergističnim delovanjem še olajšajo razgradnjo onesnažil (Rodríguez-Couto, 2017). Kljub številnim prednostim gliv bele trohnobe pri bioremediaciji pred bakterijami pa se danes še vedno dokaj redko uporabljajo na industrijskem nivoju.

Tovrstna tehnologija ima sicer tudi nekaj slabosti, med njimi dolg cikel rasti, zahtevajo pogoje z limitirajočim dušikom, nižji pH za optimum delovanja encimov zaradi česar je vzdrževanje gliv bele trohnobe v bioreaktorjih nekoliko problematično. Prav tako se pojavljajo določene operativne težave, kot je tvorba agregatov micelija in obraščanje oz. zamašitev elektrod, to pa zahteva odstranitev glivne biomase že po kratkem obratovalnem času (Sahu, 2014). To so razlogi, da aplikacija gliv bele trohnobe na industrijski ravni ostaja tehničen izziv.

Stroški uporabe prostih encimov so še vedno visoki, omejena pa je tudi obnovev in ponovna uporaba encimov po uporabi. Snovi, kot so kovinski ioni, kelatorji, detergenti ali druge snovi, prisotne v onesnaženi zemlji ali vodi, lahko vplivajo na katalitične lastnosti encimov, inaktivira pa jih lahko tudi vezava na delce zemlje oz. organske snovi (Ba in sod., 2013; Gasser in sod., 2014). To je razlog za omejenost uporabe prostih encimov v raztopini na industrijskem nivoju. Te slabosti pa lahko odpravijo različne tehnike imobilizacije encimov (Asgher in sod., 2014; Ba in sod., 2013; Gasser in sod., 2014).

Prednosti uporabe gliv bele trohnobe pred bakterijami za namene bioremediacije so naslednje (Maloney, 2001):

- kot vir hranil uporabljajo ugodne in lahko dostopne ligninocelulozne materiale,
- Tolerirajo relativno visoke koncentracije onesnažil zaradi zunajceličnega sistema razgradnje,
- zmožne so preživetja ob prisotnosti mnogih ksenobiotikov, ki so toksični za marsikatero organizme,
- zmožne so razgradnje mešanice kemikalij zaradi nespecifičnega mehanizma razgradnje,

- tolerirajo širok spekter okoljskih pogojev,
- stopnja razgradnje oz. biotransformacije je proporcionalna koncentraciji onesnažil.

5 ZAKLJUČKI

Glive bele trohnobe so sposobne učinkovite razgradnje mnogih toksičnih onesnažil, kot so poliaromatski ogljikovodiki, polietilen, nafta in naftni proizvodi, različni insekticidi, PCB, PCP in drugi. Razgradnjo omogočajo encimi (lakaze, od mangana odvisne peroksidaze, lignin peroksidaze), ki razgrajujejo primarne strukturne komponentne lesa. Lastnost razgradnje izvira v nespecifičnosti encimov zaradi podobnosti med strukturo lignina in mnogih onesnažil.

Čiščenje oz. vračanje okolja v prvotno stanje (torej razgradnjo polutantov) z uporabo gliv oz. njihovih encimov imenujemo mikoremediacija. Encime lahko uporabimo v bioreaktorju ali pa v procesu bioaugmentacije (dodatek kulture v onesnaženo zemljo za pospešitev razgradnje) oz. biostimulacije (dodatek hranil za izboljšanje aktivnosti avtohtonih organizmov).

6 VIRI

- Abramowicz D. A. 1995. Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment. *Environmental Health Perspectives, Suppl. 5*: 97-99
- Albertsson A.-C., Andersson S. O., Karlsson S. 1987. The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability, 18*: 73-87
- Alcalde M. 2007. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. *Industrial enzymes*: 461-476
- Alperin E. S., Hutton J. H., Lighty, J. S., Palmer C. R., Percin P. R., Troxler W. 1997. Innovative site remediation technology: design and application. Volume 5: Thermal Desorption. US Environmental Protection Agency, Solid Waste and Emergency Response: 844 str.
- Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J., Beck A. 2004. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34*: 249-289
- Arisoy M. 1998. Biodegradation of chlorinated organic compounds by white-rot fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 60*: 872-876
- Arora D. S., Rampal P. 2002. Laccase production by some *Phlebia* species. *Journal of basic Microbiology, 42*: 295-301
- Asgher M., Shahid M., Kamal S., Iqbal H. M. N. 2014. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 101*: 56-66
- Ba S., Arsenault A., Hassani T., Jones J. P., Cabana H. 2013. Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology, 33*: 404-418
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews, 30*: 215-242
- Baldrian P. 2008. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology, 1*: 4-12
- Baldrian P. 2014. Distribution of extracellular enzymes in soils: spatial heterogeneity and determining factors at various scales. *Soil Science Society of America Journal, 78*: 11-18
- Beck C. E. 1979. The love canal tragedy. *US Environmental Protection Agency Journal*.
<https://archive.epa.gov/epa/aboutepa/love-canal-tragedy.html> (21.8.2017)
- Bhatt M., Cajthaml T., Šašek V. 2002. Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiologica, 47*: 255-258
- Black R. 2010. Gulf oil leak: Biggest ever, but how bad? *BBC News*.
<https://archive.epa.gov/epa/aboutepa/love-canal-tragedy.html> (21.8.2017)
- Bollag J.-M., Chu H.-L., Rao M., Gianfreda L. 2003. Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *Journal of Environmental Quality, 32*: 63-69
- Bonnarme P., Jeffries T. W. 1990. Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology, 56*: 210-217
- Borja J., Taleon D. M., Auresenia J., Gallardo S. 2005. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry, 40*: 1999-2013
- Borràs E., Llorens-Blanch G., Rodríguez-Rodríguez C. E., Sarrà M., Caminal G. 2011. Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: substrate selection and naproxen degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation, 65*: 846-852

- Bumpus J. A., Tien M., Wright D., Aust S. D. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228: 1434-1437
- Burns R. G., Deforest J. L., Marxsen J., Sinsabaugh R. L., Stromberger M. E., Wallenstein M. D., Weintraub M. N., Zoppini A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58: 216-234
- Buswell J. A., Cai Y., Chang S.-T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 81-87
- Cai D., Tien M. 1992. Kinetic studies on the formation and decomposition of compounds II and III. Reactions of lignin peroxidase with H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 11149-11155
- Cavallazzi J. R. P., Kasuya C. M., Soares M. A. 2005. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 383-387
- Cerniglia C. E., Sutherland J. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. V: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Timmis, K. N. (ed.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 2079-2110.
- Cerniglia C. E., Sutherland J. B. 2001. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. V: *Fungi in bioremediation*. Gadd G. M. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 136-187.
- Chernykh A., Myasoedova N., Kolomytseva M., Ferraroni M., Briganti F., Scozzafava A., Golovleva L. 2008. Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 2065-2075
- Cohen R., Persky L., Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 582-594
- Collins P. J., Dobson A. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3444-3450
- Covino S., D'annibale A., Stazi S. R., Cajthaml T., Čvančarová M., Stella T., Petruccioli M. 2015. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. *Science of the Total Environment*, 505: 545-554
- Cripps C., Bumpus J. A., Aust S. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1114-1118
- D'souza-Ticlo D., Verma A. K., Mathew M., Raghukumar C. 2006. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC# 2a, isolated from mangrove wood. *Indian Journal of Marine Sciences*, 35: 364-372.
- D'souza T. M., Merritt C. S., Reddy C. A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5307-5313
- Dashek W. V., Higley, T. L. 2002. *Biotechnology in the study of brown- and white-rot decay*. V: *Forest products biotechnology*. Bruce A., Palfreyman J. (eds.) CRC Press: 326 str.
- Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 1: 36-50.
- Dekker R. F., Barbosa A. M. 2001. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 81-88

- Dhawan S., Kuhad R. C. 2002. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Bioresource Technology*, 84: 35-38
- Dittmer J. K., Patel N. J., Dhawale S. W., Dhawale S. S. 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*, 149: 65-70
- Doyle W. A., Blodig W., Veitch N. C., Piontek K., Smith A. T. 1998. Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 37: 15097-15105
- Eggen T. 1999. Application of fungal substrate from commercial mushroom production—*Pleurotus ostreatus*—for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44: 117-126
- Fernandez-Sanchez J., Ruiz-Aguilar G., Rodriguez-Vazquez R., Poggi-Varaldo H. M., Esparza-Garcia F., Vazquez-Duhalt R. 2002. PCB's biotransformation by a white-rot fungus under composting and liquid culture conditions. V: *Microbiology of composting*. Insam H., Riddech N., Klammer S. (eds.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 287-297
- Franco A. R., Ferreira A. C., Castro P. M. 2014. Co-metabolic degradation of mono-fluorophenols by the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius*. *Chemosphere*, 111: 260-265
- Froehner S. C., Eriksson K.-E. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *Journal of Bacteriology*, 120: 458-465
- Furukawa K., Fujihara H. 2008. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105: 433-449
- Gasser C. A., Ammann E. M., Shahgaldian P., Corvini P. F.-X. 2014. Laccases to take on the challenge of emerging organic contaminants in wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 9931-9952
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 369-385
- Gilardi G., Harvey P. J., Cass A. E., Palmer J. M. 1990. Radical intermediates in veratryl alcohol oxidation by ligninase. NMR evidence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1041: 129-132
- Gomes H. I., Dias-Ferreira C., Ribeiro A. B. 2013. Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. *Science of the Total Environment*, 445: 237-260
- Grassi E., Scodeller P., Filiel N., Carballo R., Levin L. 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 635-643
- Grittini C., Malcomson M., Fernando Q., Korte N. 1995. Rapid dechlorination of polychlorinated biphenyls on the surface of a Pd/Fe bimetallic system. *Environmental Science & Technology*, 29: 2898-2900
- Hammel K. E., Cullen D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 349-355
- Hammel K. E., Jensen K., Mozuch M. D., Landucci L. L., Tien M., Pease E. A. 1993. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 12274-12281

- Hammel K. E., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. 1985. Mechanism of oxidative C alpha-C beta cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. Stoichiometry and involvement of free radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 8348-8353
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 125-135
- Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P., Anke T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1601-1606
- Hildén K., Hakala T. K., Lundell T. 2009. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters*, 31: 1117-1128
- Hofrichter M. 2002. lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454-466
- Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M. J., Liers C., Lundell T. 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 871-897
- Homolka L., Voláková I., Nerud F. 1995. Variability of enzymatic activities in ligninolytic fungi *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus tigrinus* after protoplasting and UV-mutagenization. *Biotechnology Techniques*, 9: 157-162
- Huber M., Lerch K. 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters*, 219: 335-338
- Hueck H. 1974. Criteria for the assessment of the biodegradability of polymers. *International Biodeterioration Bulletin*, 10: 87-90.
- Ikehata K., Buchanan I. D., Smith D. W. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3: 1-19
- Jahangiri E., Reichelt S., Thomas I., Hausmann K., Schlosser D., Schulze A. 2014. Electron beam-induced immobilization of laccase on porous supports for waste water treatment applications. *Molecules*, 19: 11860-11882
- Janusz G., Rogalski J., Barwinska M., Szczodrak J. 2006. Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctonia praticola*. *Polish Journal of Microbiology*, 55: 309-319
- Jeffries T. W., Choi S., Kirk T. K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 290-296
- Johansson T., Nyman P. O. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300: 49-56
- Kamolmanit B., Vityakon P., Kaewpradit W., Cadisch G., Rasche F. 2013. Soil fungal communities and enzyme activities in a sandy, highly weathered tropical soil treated with biochemically contrasting organic inputs. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 905-917
- Kannan K., Tanabe S., Williams R. J., Tatsukawa R. 1994. Persistent organochlorine residues in foodstuffs from Australia, Papua New Guinea and the Solomon Islands: contamination levels and human dietary exposure. *Science of the Total Environment*, 153: 29-49
- Kelce W. R., Stone C. R., Laws S. C., Gray L. E. 1995. Persistent DDT metabolite p, p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375: 581-585

- Keyser P., Kirk T., Zeikus J. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology*, 135: 790-797
- Kües U. 2015. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 268-278
- Leatham G. F., Kirk T. K. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 16: 65-67
- Leisola M. S., Fiechter A. 1985. Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 29: 33-36
- Levin L., Forchiassin F., Ramos A. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, 94: 377-383
- Lo S. C., Ho Y. S., Buswell J. A. 2001. Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. *Mycologia*: 413-421
- Lundell T. K., Mäkelä M. R., Hildén K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes—ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50: 5-20
- Maloney S. E. Pesticide degradation. 2001. V: *Fungi in Bioremediation*. Gadd G.M. (ed.). New York, Cambridge University Press: 188-233
- Mester T., Field J. A. 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 15412-15417
- Millis C. D., Cai D., Stankovich M. T., Tien M. 1989. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, 28: 8484-8489
- Minussi R. C., Miranda M. A., Silva J. A., Ferreira C. V., Aoyama H., Marangoni S., Rotilio D., Pastore G. M., Durán N. 2007. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1248-1254
- Morgan P., Lewis S. T., Watkinson R. J. 1991. Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 693-696
- Mueller J. G., Chapman P. J., Pritchard P. H. 1989. Creosote-contaminated sites. Their potential for bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 23: 1197-1201
- Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sannia G. 2001. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2754-2759
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 920-924
- Papinutti V., Diorio L., Forchiassin F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 157-160
- Parkinson A., Safe S. 1987. Mammalian biologic and toxic effects of PCBs. V: Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. Safe S. (ed.). Berlin, Springer-Verlag: 49-75

- Paszczyński A., Crawford R. L. 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress*, 11: 368-379
- Peng R.-H., Xiong A.-S., Xue Y., Fu X.-Y., Gao F., Zhao W., Tian Y.-S., Yao Q.-H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 927-955
- Pointing S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33
- Prasad A. 1999. Polyethylene. V: *Polymer data handbook*. Mark J. (ed.). New York, Press New York: 508-539
- Praveen K., Viswanath B., Usha K., Pallavi H., Venkata Subba Reddy G., Naveen M., Rajasekhar Reddy B. 2011. Lignolytic enzymes of a mushroom *Stereum ostrea* isolated from wood logs. *Enzyme research*, 2011: 749518, doi 10.4061/2011/749518: 6 str.
- Priporočila okoliškimi prebivalcem po požaru na Vrhniki. 2017. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Ljubljana.
<http://www.nijz.si/sl/priporocila-okoliskim-prebivalcem-po-pozaru-pri-vrhniki> (21.8.2017)
- Rao M., Scelza R., Scotti R., Gianfreda L. 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10: 333-353
- Revankar M. S., Lele S. 2006. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 921-926
- Rhodes C. J. 2014. Mycoremediation (bioremediation with fungi)–growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26: 196-198
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24: 219-226
- Rodríguez-Couto S. 2017. Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere Journal of Fungal Biology*, 8: 456-466
- Rodríguez E., Nuero O., Guillén F., Martínez A., Martínez M. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 909-916
- Ruiz-Aguilar G. M., Fernández-Sánchez J. M., Rodríguez-Vázquez R., Poggi-Varaldo H. 2002. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research*, 6: 559-568
- Ruiz-Dueñas F. J., Martínez M. J., Martínez A. T. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology*, 31: 223-235
- Sack U., Günther T. 1993. Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *Journal of Basic Microbiology*, 33: 269-277
- Sahu O. 2014. Treatment of dye waste water by bioreactor. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2: 25-29
- Saraiva J. A., Tavares A. P., Xavier A. M. 2012. Effect of the inducers veratryl alcohol, xyldine, and ligninosulphonates on activity and thermal stability and inactivation kinetics of laccase from *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167: 685-693
- Sarkar S., Martínez A. T., Martínez M. A. J. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339: 23-30
- Scullion J. 2006. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften*, 93: 51-65

- Seto M., Nishibori K., Masai E., Fukuda M., Ohdaira Y. 1999. Degradation of polychlorinated biphenyls by a 'Maitake' mushroom, *Grifola frondosa*. *Biotechnology Letters*, 21: 27-31
- Shraddha R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. 2011. Laccase: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 2011: 217861, doi 10.4061/2011/217861: 11 str.
- Sims J. L., Sims R. C., Matthews J. E. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*, 7: 117-149
- Soil threats in Europe. 2015. Technical report. Stolte J., Tesfai M., Øygarden L., Kværnø S., Keizer J., Verheijen F., Panagos P., Ballabio C., Hessel R. (eds.). European commission Publications Office: 207 str.
https://esdac.jrc.ec.europa.eu/public_path/shared_folder/doc_pub/EUR27607.pdf
- Srinivasan C., Dsouza T., Boominathan K., Reddy C. 1995. Demonstration of Laccase in the White rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4274-4277
- Stamets P. 2005. Mycelium running: how mushrooms can help save the world. New York, Teen Speed Press: 356 str.
- Steffen K. T., Schubert S., Tuomela M., Hatakka A., Hofrichter M. 2007. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation*, 18: 359-369
- Strong P. 2011. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Enzyme research*, 2011: 379176, doi 10.4061/2011/379176: 8 str.
- Sun J., Peng R.-H., Xiong A.-S., Tian Y., Zhao W., Xu H., Liu D.-T., Chen J.-M., Yao Q.-H. 2012. Secretory expression and characterization of a soluble laccase from the *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 39: 3807-3814
- Štursová M., Baldrian P. 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil*, 338: 99-110
- Teng Y., Luo Y., Ping L., Zou D., Li Z., Christie P. 2010. Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Biodegradation*, 21: 167-178
- Thiruchelvam A., Ramsay J. A. 2007. Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 547-554
- Thurston C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26
- Tien M., Kirk T. K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 2280-2284
- Tuomela M., Hatakka A. 2011. Oxidative fungal enzymes for bioremediation. V: *Comprehensive biotechnology*. Moo-Young (ed.). Burlington, Academic Press: 183-196
- Umezawa T., Higuchi T. 1989. Cleavages of aromatic ring and β -O-4 bond of synthetic lignin (DHP) by lignin peroxidase. *FEBS Letters*, 242: 325-329
- Valášková V., Baldrian P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 157: 119-124
- Vaukner M., Tavzes Č., Ulčnik A., Pohleven F. 2011. Glivne lakaze: encimi neverjetnih sposobnosti. *Les*, 3: 49-54
- Vidali M. 2001. Bioremediation - an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 1163-1172

- Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A. P., Narasimha G. 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research*, 2014: 163242, doi 10.1155/2014/163242: 21 str
- Von Fahnstock F. M., Wickramanayake G. 1998. Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. Columbus (Ohio), Battelle Press: 174 str.
- Weissenfels W. D., Klewer H.-J., Langhoff J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 689-696
- Winquist E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen K. T., Jørgensen K. S., Tuomela M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi—From laboratory to field scale. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86: 238-247
- Xavier A., Evtuguin D., Ferreira R., Amado F. 2001. Laccase production for lignin oxidative activity. V: *Proceedings of the 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. 4-8
- Xiao P., Mori T., Kamei I., Kondo R. 2011. A novel metabolic pathway for biodegradation of DDT by the white rot fungi, *Phlebia lindtneri* and *Phlebia brevispora*. *Biodegradation*, 22: 859-867
- Yamada-Onodera K., Mukumoto H., Katsuyaya Y., Saiganji A., Tani Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability*, 72: 323-327
- Yaver D. S., Xu F., Golightly E. J., Brown K. M., Brown S. H., Rey M. W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalboge H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 834-841
- Zadrazil F., Gonser A., Lang E. 2000. Influence of incubation temperature on the secretion of extracellular ligninolytic enzymes of *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* into soil. *Journal of Basic Microbiology*, 40: 33-39
- Zahra S., Abbas S. S., Mahsa M.-T., Mohsen N. 2010. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Management*, 30: 396-401
- Žist V. 2011. Belokranjci so še vedno zastrupljeni s PCB. *Dnevnik*.
<https://www.dnevnik.si/1042486604> (21.8.2017)