

MIKOREMEDIACJA LINDANA V TEKOČIH KULTURAH GLIV *PLEUROTUS OSTREATUS* *HYPOXYLON FRAGIFORME*

Mycoremediation of lindane in liquid cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Hypoxylon fragiforme*

*Izvleček: Mehanizem, s katerim glive bele trohnobe razgrajujejo lignin, omogoča tudi razgradnjo izjemno širokega spektra okoljskih onesnaževal. V raziskavi smo proučevali razgradnjo kloriranega organskega insekticida lindana z dvema vrstama gliv bele trohnobe, bukovim ostrigarjem (*Pleurotus ostreatus*) in ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*). Kulture gliv so različno dolgo rasle v tekočem gojišču z dodanim lindanom. Lindan smo iz tekočih kultur gliv ekstrahirali z dvema različnima metodama ter ga določali s plinsko kromatografijo. Koncentracija lindana je s časom izpostavitve kulturam gliv padala. Največjo razgradnjo lindana (več kot 90 %) smo pri obeh vrstah ugotovili po 21 dneh izpostavitve lindana kulturi gliv. Odstranitev lindana iz tekočih kultur gliv se je najverjetneje zgodila zaradi razgradnje lindana z glivnimi encimi, do adsorpcije lindana na biomaso pa pri teh vrstah gliv verjetno ni prišlo.*

*Ključne besede: mikoremediacija, lindan, lesne glive, glive bele trohnobe, *P. ostreatus*, *H. fragiforme*, adsorpcija, plinska kromatografija*

*Abstract: White rot fungi have the ability to completely degrade lignin. The same mechanism enables them to biodegrade a wide variety of environmental pollutants. The ability of two white-rot fungi (*Pleurotus ostreatus* and *Hypoxylon fragiforme*) to degrade an organochlorine insecticide, lindane, in liquid cultures was studied. Lindane was exposed to fungal liquid cultures for various time intervals and its extraction was done by using two different methods. The residual content determination of lindane was done by gas chromatography. The rate of degradation increased with the incubation period of lindane in fungal liquid cultures. The highest rate of degradation with both fungi was measured after 21 days of incubation. Lindane removal from the culture media presumably occurred due to degradation and not via adsorption onto the fungal mycelium.*

*Keywords: mycoremediation, lindane, white rot fungi, *P. ostreatus*, *H. fragiforme*, adsorption, gas chromatography*

UVOD

Zaradi človekove dejavnosti ter pretirane in nepravilne uporabe je v okolju prisotnih več deset tisoč različnih sintetičnih kemikalij. Snovi, ki so v okolju prisotne v mnogo

višjih koncentracijah od običajnih ali pa so tuje celotnemu biološkemu sistemu in v naravi niso obstajale, preden jih je sintetiziral človek, imenujemo ksenobiotiki. Od teh so mnogi toksični, nekateri pa lahko takšni postanejo kot posledica biotransformacije. Za mnoge ksenobiotike učinki na zdravje ljudi še niso raziskani.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: ajda.ulcnik@bf.uni-lj.si

[§] Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Aškerčeva cesta 5, 1000 Ljubljana

^{**} Inštitut za lesarstvo in trajnostni razvoj, raziskovanje, razvoj, svetovanje in izobraževanje d.o.o, Celovška cesta 268, 1000 Ljubljana

V okolju so organske kemikalije izpostavljene encimatskim in neencimatskim reakcijam. Abiotski dejavniki zelo redko povzročijo spremembe v kemijski strukturi onesnaževala. Nasprotno pa se lahko mnogi ksenobiotiki v naravi razgra-

dijo s pomočjo mikroorganizmov in gliv. Uporabo bioloških sistemov ali organizmov za razgradnjo ali odstranitev onesnaževal iz okolja imenujemo bioremediacija. Pri tem biotehnološkem procesu organizem (mikroorganizem, gliva, rastlina ali njihovi encimi) onesnaževalo porablja kot vir hrane, ga kometabolizira ali pa kopiči (Alexander, 1981).

Z bioremediacijo količino onesnaževal znižamo na nezaznavno, netoksično ali sprejemljivo vrednost. Namen bioremediacije je popolna razgradnja (mineralizacija) organskih onesnaževal do CO_2 ter v primeru kovin transformacija v manj toksične oblike ali njihova odstranitev s sorpcijo (Pointing, 2001). Pri razgradnji onesnaževal navadno pride do razstrupljanja, lahko pa nastanejo tudi strupeni razgradni produkti.

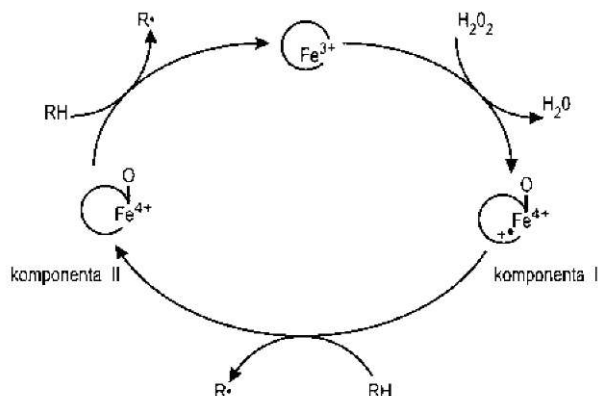
Bioremediacijo lahko izvajamo z različnimi organizmi (Hamby, 1996; Pointing, 2001). Poleg bakterij in rastlin (fitoremediacija) lahko pri čiščenju okolja zelo uspešno uporabljamo tudi glive (mikoremediacija). Lesne glive imajo namreč veliko sposobnost razgradnje izjemno širokega nabora ksenobiotikov.

Glede na poškodbe lesa delimo lesne glive na glive bele in rjave trohnobe. Glive rjave trohnobe so sposobne razgrajevati le polisaharide v olesneli celični steni, pri čemer se lignin le delno modificira. Glive bele trohnobe pa lahko razgradijo vse glavne komponente lesa - celulozo, hemicelulozo ter tudi lignin, ki je sicer izjemno odporen na biološko in kemično razgradnjo. Glive bele trohnobe razgrajujejo lignin selektivno ali pa simultano. Selektivne delignifikatorke naprej razgrajujejo lignin in hemicelulozo ter šele nato tudi celulozo, simultane delignifikatorke pa hkrati razgrajujejo vse tri glavne komponente rastlinske celične stene (Zabel in Morell, 1992; Martfnez in sod., 2005). Poleg razgradnje lignina so glive bele trohnobe sposobne razgradnje organskih ksenobiotikov, ki so strukturno podobni ligninu (Bumpus in sod., 1985; Hammel, 1995; Reddy, 1995).

RAZGRADNJA LIGNINA

Lignin je kompleksen heteropolimer, sestavljen iz treh osnovnih fenilpropanskih podenot, kumaril, koniferil in sinapil alkohola. Raznolikost ligninskih podenot in vezi med njimi zahteva dokaj nespecifičen sistem razgradnje, ki ga povzročajo glive bele trohnobe. Razgradnja lignina z glivami bele trohnobe je oksidativen aeroben proces. Ker je polimer lignina prevelik za endocitozo, je njegova razgradnja zunajcelična (Aust, 1995; Hammel, 1995).

Glive bele trohnobe razgrajujejo lignin z zunajceličnimi encimi, od katerih so najpomembnejši lignin peroksidaze (LiP), od mangana odvisne peroksidaze (MnP) in lakaze (Lac). Razgradnja lignina poteka z oksidacijo, ki jo katalizirajo omenjeni encimi, pri čemer nastajajo kationski prosti ra-



Slika 1. Katalični cikel LiP (Aust, 1995).

dikali ligninskih podenot (Kirk in Farrel, 1987; Hammel, 1995; Reddy, 1995). Ti so nestabilni in reaktivni ter povzročijo številne spontane cepitve ligninske makromolekule v manjše enote. Mehanizem oksidacije z lignin peroksidazami je prikazan na sliki 1. Podoben mehanizem, ki vključuje dve enoelektronski oksidaciji substrata, ustreza tudi delovanju MnP, lakaze pa katalizirajo enoelektronsko oksidacijo substrata.

Ligninolitični encimi gliv bele trohnobe nastajajo v sekundarnem metabolizmu ob pomanjkanju hranil, predvsem dušika in ogljika (Bumpus in sod., 1985). Novejše raziskave kažejo, da lahko pride do izražanja ligninolitičnih encimov tudi v začetni fazi glivne okužbe lesa, ko ima gliva na voljo še dovolj hranil (Janse in sod., 1998; Messner in sod., 1998; Pointing, 2001).

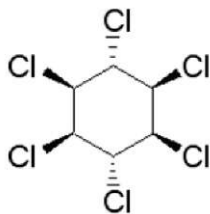
Oksidaze, ki katalizirajo razgradnjo lignina, so prevelike za prehajanje v olesnelo celično steno, zaradi česar delujejo predvsem na njeni površini. Ker pa naj bi razgradnja lignina v notranjosti celične stene potekala tudi v primerih, ko celična stena še ni razgrajena do te mere, da bi vanjo lahko vstopali encimi, je Hammel (1997) predlagal posredno delovanje peroksidaz preko oksidacij substratov z majhno relativno molekulsko maso. Ti substrati naj bi delovali kot mediatorji med encimi in njihovimi substrati (Candeias in Harvey, 1995). Eden izmed možnih kandidatov za takšne substrate je veratril alkohol (3,4-dimetoksibenzil alkohol), ki je sekundarni metabolit glive in ga glive proizvajajo ob pomanjkanju hranil.

Z glivami bele trohnobe so v številnih raziskavah uspešno razgradili različna sintetična barvila, klorirane fenole, klorirane pesticide, policiklične aromatske ogljikovodike, poliklorirane bifenile ter druge kemijsko podobne snovi (Reddy, 1995; Gadd, 2001; Singh, 2006; Quintero in sod., 2008).

LINDAN

Lindan (1a,2a,3β,4a,5a,6β-heksaklorocikloheksan, γ-HCH) (slika 2) je kloriran organski insekticid, ki se je v preteklosti

uporabljal za zatiranje škodljivcev v kmetijstvu ter konzervatorstvu, kot zaščitno sredstvo za les ter za odpravljanje parazitov pri ljudeh in živalih. Uvrščamo ga med obstojna organska onesnaževala, za katera so značilni zelo dolgo zadrževanje v okolju, prenašanje na velike razdalje, bioakumulacija v živih organizmih ter škodljivi učinki za ljudi in živali (UNEP, 2010). Lindan se v organizmih zaradi nepolarnosti akumulira predvsem v maščobnem tkivu (UNEP, 2007; Zucchini in sod., 2009), deluje pa kot živčni strup. Pri ljudeh povzroča nevrološke bolezni, pri laboratorijskih živalih pa povzroča napake v razvoju ter raka na jetrih (Siddique in sod., 2002). Uporaba lindana je danes v mnogih državah prepovedana, maja 2009 pa je bil lindan dodan na seznam prepovedanih kemikalij, ki so zajete v Stockholmski konvenciji o obstojnih organskih onesnaževalih. Stockholmsko konvencijo, katere cilj je prepovedati ali omejiti proizvodnjo ali uporabo obstojnih organskih onesnaževal, je leta 2004 podpisala tudi Republika Slovenija (Urad RS za kemikalije, 2010).



Slika 2. Lindan (γ -heksaklorocikloheksan, Y-HCH).

Glive bele trohnobe so v mnogih raziskavah uspešno razgradile različna obstojna organska onesnaževala, vključno z lindanom. Razgradnja ksenobiotikov z glivami bele trohnobe je bila najbolj preučevana z glivo *Phanerochaete chrysosporium*, za katero so Bumpus in sodelavci (1985) poročali o več kot 90 % razgradnji lindana v tekočih kulturah. Pri mikoremediaciji organskih pesticidov se sicer pojavlja vprašanje, ali med postopkom resnično pride do razgradnje pesticida ali je njegova zmanjšana koncentracija v mediju le posledica adsorpcije na različne površine, predvsem na micelij oziroma biomaso.

V pričujoči raziskavi smo proučevali sposobnost dveh vrst gliv bele trohnobe za mikoremediacijo lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv. Na podlagi primerjav izmerjenih deležev razgrajenega lindana, pridobljenih z dvema metodama ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur, smo ugotavljali, ali je odstranitev lindana posledica adsorpcije ali razgradnje z ligninolitičnimi encimi.

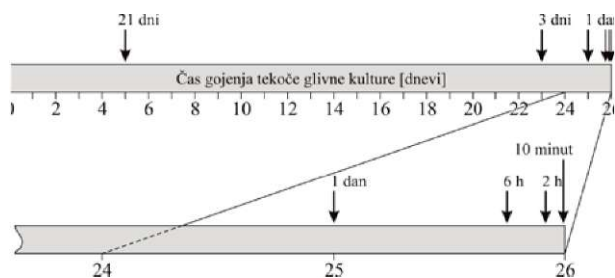
MATERIALI IN METODE

Lindan smo za različno dolga časovna obdobja izpostavili bukovemu ostrigarju (*Pleurotus ostreatus*, Plo5, se

izoliran iz hloda smreke 1998, Ljubljana) in ogljeni kroglici (*Hypoxylon fragiforme*, ZIM L108). Glivo bele trohnobe *H. fragiforme* uvrščamo v skupino zaprtotrošnic (*Ascomycotina*), gliva *P. ostreatus* pa spada v skupino prostotrošnic (*Basidiomycotina*). Kulture micelija smo vzeli iz Zbirke industrijskih organizmov (ZIM), ki jo hranimo na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v Delovni skupini za patologijo in zaščito lesa (Raspor in sod., 1995). Kulture gliv smo gojili v tristomililitrskih erlenmajericah, napolnjenih s 50 ml tekočega gojišča po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986), ki smo mu dodali $MnSO_4 \cdot H_2O$ (2 mM), pH gojišča pa smo umerili na 4,5 (Vidic in sod., 2008). Štiri dni pred dodatkom lindana smo v gojišče dodali veratril alkohol (koncentracija v gojišču 2 mM), s čimer smo vzpodbudili izražanje ligninolitičnih encimov (Faison in Kirk, 1985; Faison in sod., 1986; Jaouani in sod., 2006).

Inokulat za tekoča gojišča smo vzgojili na krompirjevem dekstroznem agarju (PDA) (DIFCO Laboratories, ZDA), iz katerega smo s plutovrtom (premer 9 mm) izrezali vcepke iz sedem dni starega micelija. Tekoča gojišča smo inokulirali s po tremi vcepki micelija iz gojišča PDA. Tekoče kulture gliv smo gojili 26 dni v temi na horizontalnem stresalniku (100 min^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 % RH).

Raztopino lindana (97 % γ-HCH, Merck) smo pripravili v acetonu. Tekočim kulturam gliv smo 100 μl raztopine lindana dodali za 21 dni, tri dni, en dan, šest ur, dve uri ali deset minut (lindan smo tekočim kulturam gliv dodali pet dni, 23 dni, 25 dni ali 26 dni po inokulaciji). Časovni potek poskusa je prikazan na sliki 3. Po dodatku raztopine lindana tekočim kulturam gliv je bila koncentracija lindana v gojišču 30 μM. Pri negativnih kontrolah smo namesto lindana tekočim kulturam gliv dodali 100 μl acetona. Za pozitivne kontrole smo uporabili tekoče gojišče, ki ga nismo inokulirali z micelijem in v katerega smo za deset minut oziroma 21 dni dodali 100 μl raztopine lindana. Tekočim kulturam gliv, ki jim je bil lindan izpostavljen 21 dni, ter vsem kontrolam, smo veratril alkohol dodali ob inokulaciji



Slika 3. dodajanje lindana tekočim glivnim kulturam. Puščice označujejo dodatek lindana, čas izpostavitve lindana tekočim glivnim kulturam je zapisan nad puščicami.

oziroma ob dodatku lindana ali acetona. Vse poskuse smo izvajali v šestih ponovitvah.

Iz tekočih glivnih kultur in kontrol smo lindan ekstrahirali s heksanom na dva načina. Iz polovice paralelnih ponovitev, kjer je bil lindan kulturi glive izpostavljen za enako obdobje, smo lindan ekstrahirali iz filtratov, iz druge polovice pa iz homogenatov tekočih glivnih kultur.

EKSTRAKCIJA LINDANA IZ FILTRATOV TEKOČIH KULTUR GLIV

Po koncu izpostavitve lindana kulturam gliv smo v erlenmajerice z gojiščem in glivno biomaso dodali 50 ml heksana ter vsebino dobro premešali. Biomaso gliv smo od mešanice heksana in gojišča ločili s filtracijo skozi grobi filtrirni papir (Sartorius Stedim Biotech, 84 g m⁻², grade 388) z uporabo vodne črpalke. Po filtraciji smo zgornjo nepolarno fazo filtrata previdno odpipetirali v stekleno epruveto. Za popolno odstranitev vode smo ekstraktom dodali Na₂SO₄ ter jih shranili v zamrzovalni skrinji (-20 °C).

EKSTRAKCIJA LINDANA IZ HOMOGENATOV TEKOČIH KULTUR GLIV

Vsebinsko erlenmajeric smo po koncu izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv prelili v centrifugirke. Prazne erlenmajerice smo dobro sprali s 50 ml heksana, ki smo ga nato dodali v centrifugirke. Vsebinsko centrifugirke smo homogenizirali z napravo Ika T25 Digital Ultra-Turrax (11000 obratov min⁻¹, 30 s). Po homogenizaciji smo nepolarno fazo z ekstrahiranim lindanom ločili od polarne faze s centrifugiranjem (centrifuga Tehtnica LC 321, Tehtnica Železniki, Slovenija) (4000 obratov min⁻¹, 5 min). Zgornjo nepolarno fazo smo ločili od spodnje polarne faze in ekstraktom pred shranjevanjem v zamrzovalni skrinji dodali Na₂SO₄.

Lindan smo v ekstraktih določali z uporabo plinske kromatografije (GC; angl. gas chromatography). Pri tej analizi lindan vnesemo v sistem v organskem topilu (heksan). Uporabili smo plinski kromatograf (Hewlett Packard 6890 Series, ZDA) z detektorjem za zajetje elektronov (ECD) in kolono RTX-5MS (dolžina 60 m, premer 250 μm, debelina stacionarne faze 0,50 μm). Analizni pogoji: temperatura injektorja 250 °C, temperatura detektorja 320 °C, nosilni plin dušik (pretok 2 ml min⁻¹), temperaturni program: 70 °C do 300 °C, 30 °C min⁻¹, zadrževalni čas 1 minuta pri 70 °C in 5 minut pri 300 °C. Na kolono smo nanašali desetkratne razredčine ekstraktov (redčenje s heksanom). Volumen vbrizganega vzorca je bil 1 μl.

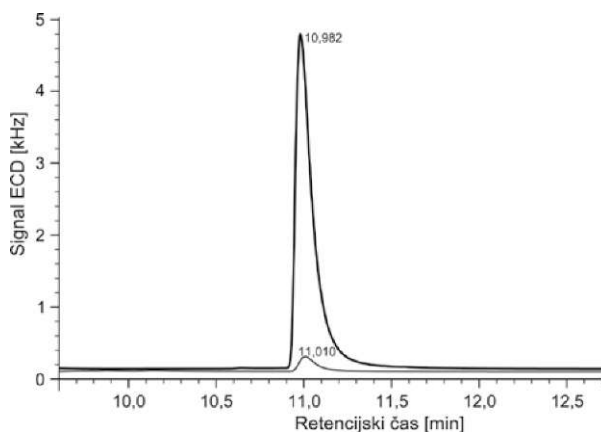
REZULTATI IN RAZPRAVA

Razgradnja lindana s testiranima vrstama gliv je bila določena s plinsko kromatografijo in izračunana s pri-

merjanjem ploščin kromatografskih vrhov lindana v eksperimentalnih vzorcih in pozitivni kontroli, ki ni bila inokulirana z micelijem. Rezultati so povprečje meritev treh paralelnih vzorcev z navedenimi pripadajočimi standardnimi odkloni. Na sliki 4 je prikazana primerjava kromatografskih vrhov ekstrakta iz kulture glive *P. ostreatus*, v katerem je bil lindan prisoten 21 dni, in kontrole, v kateri je bil lindan v tekočem gojišču prisoten 21 dni. Velika razlika ploščin obeh kromatografskih vrhov nakazuje visoko stopnjo razgradnje lindana.

Stopnja razgradnje lindana z obema glivama bele trohno-be je s časom naraščala (slika 5). Količine lindana, ki smo jih določili po desetih minutah in dveh urah delovanja kultur glive na lindan, imajo prevelike pripadajoče standardne odklone, da bi lahko sklepali na znatno razgradnjo lindana. Pri glivi *P. ostreatus* smo v teh vzorcih določili celo nekoliko večjo količino lindana kot v pozitivnih kontrolah, kar pripisujemo merskim napakam.

V tekočih kulturah glive *P. ostreatus* smo po 21 dneh izpostavitve lindana v vseh vzorcih, ne glede na vrsto uporabljene ekstrakcije, določili več kot 90 % razgradnjo. Zaradi velikih standardnih odklonov pri vzorcih z manj kot enodnevno izpostavitvijo lindana kulturi glive ne moremo govoriti o razgradnji. Intenzivno razgradnjo lindana smo nedvoumno določili po enem dnevu izpostavitve lindana kulturam glive. Po 21 dneh prisotnosti lindana v tekočih kulturah je gliva *P. ostreatus* razgradila skoraj vso količino dodanega lindana. Razen pri vzorcih, kjer smo razgradnjo lindana določali po 21 dneh izpostavitve lindana kulturam glive, so vidne razlike med načinoma ekstrakcije lindana iz tekočih kultur. Večjo razgradnjo smo določili z ekstrakcijo



Slika 4. Določitev lindana z GC: primerjava kromatografskih vrhov lindana, prisotnega 21 dni v tekočem gojišču (debela črta) in v tekoči kulturi glive *p. ostreatus* (tanka črta). oba vzorca sta bila pripravljena z ekstrakcijo iz homogenata tekoče kulture.

lindana iz filtratov tekočih kultur glive, vendar pa so bile razlike zaradi velikih standardnih odklonov neznačilne.

Pri vzorcih, kjer smo razgradnjo lindana določevali po krajšem času inkubacije lindana v tekočih kulturah glive *H. fragiforme*, je izmerjeni delež razgradnje glede na kontrolo v vseh primerih večji pri ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur. Precej veliko razgradnjo smo s tem načinom ekstrakcije določili po desetih minutah izpostavitve onesnaževala kulturam glive, pa tudi po dveh urah in enem dnevu delovanja kulture *H. fragiforme* na lindan. Ti rezultati nakazujejo, da je izračunana razgradnja lindana odvisna od načina ekstrakcije lindana iz tekočih kultur, vendar pa rezultati ostalih vzorcev, predvsem po 3 dneh in 21 dneh izpostavitve lindana glivam, tega ne podpirajo. Razgradnja lindana je s časom inkubacije naraščala, glede na rezultate pa sklepamo, da se je intenzivna razgradnja lindana z glivo *H. fragiforme* v tekoči kulturi pričela med šestimi urami in enim dnevom izpostavitve lindana tekoči kulturi glive.

Ker se lindan lahko adsorbira na površino glivnega micelija in tudi na steklo (Young in Banks, 1998; Ghosh in sod., 2009), je lahko zaradi tega količina preostalega (ekstrahiranega) lindana v glivnih kulturah manjša, rezultat pa napačno interpretiramo ter sklepamo na razgradnjo lindana. Zaradi tega smo pri poskusu uporabili dva različna načina ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur. Iz vzorcev, ki smo jih pripravili s homogenizacijo tekočih kultur gliv, naj bi ekstrahirali tudi lindan, ki bi se lahko adsorbiral na površino micelija ali steno erlenmajerice. Pri vzorcih, pripravljenih z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih glivnih

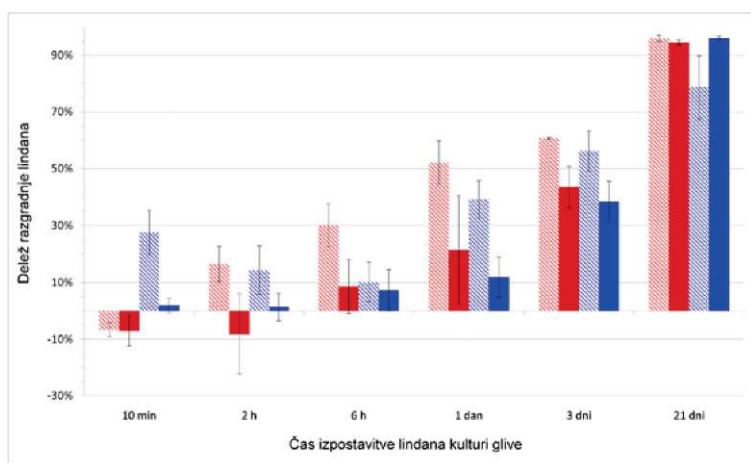
kultur, pa naj bi določili le preostanek lindana v tekočih kulturah, ki se ni vezal na prej omenjene površine. Izrazitih razlik v količini razgrajenega lindana glede na uporabljeno ekstrakcijo nismo opazili pri nobeni vrsti gliv. Sklepamo, da sta obe metodi, ki smo ju uporabili za ekstrakcijo lindana iz tekočih kultur teh dveh gliv, primerni za določanje količine lindana in da sta ga glivi s svojimi encimi najverjetneje razgradili, saj adsorpcije z uporabljenimi metodami nismo dokazali. Čeprav eno od gliv uvrščamo med zaprtotrosonice, drugo pa med prostotrosonice, je bila razgradnja lindana z obema glivama podobna, saj bistvenih razlik v količini razgrajenega lindana ni bilo.

SKLEP

Razgradnja lindana v tekočih glivnih kulturah je odvisna od časa izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv ter vrste glive. V tekočih kulturah gliv obeh vrst smo z obema načinoma ekstrakcije lindana določili primerljive razgradnje lindana. Po 21 dneh smo z glivama *P. ostreatus* in *H. fragiforme* razgradili več kot 90 % lindana. Domnevamo, da se je odstranitev lindana iz tekočih glivnih kultur zgodila zaradi razgradnje z glivnimi encimi in ni bila posledica adsorpcije lindana na hife micelija.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo v okviru programa P4-0015-0481 ter dr. Ireni Kralj Cigić za pomoč pri delu s plinskim kromatografom.



Slika 5. Povprečni deleži razgrajenega lindana s pripadajočimi standardnimi odkloni v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturam gliv *P. ostreatus* (rdeča barva) in *H. fragiforme* (modra barva). Delež razgradnje lindana smo določali v ekstraktih, pripravljenih iz filtratov (šrafirani stolpci) in homogenatov (polni stolpci) tekočih glivnih kultur.

LITERATURA

1. **Alexander M. (1981)** Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211, 4478: 132-138
2. **Aust S.D. (1995)** Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl 5): 59-61
3. **Bumpus J.A., tien M., Wright D., Aust S.D. (1985)** Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228: 1434-1436
4. **Candeias L.P., Harvey P.J. (1995)** Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 16745-16748
5. **Faison B.D., Kirk T.K. (1985)** Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 2: 299-304
6. **Faison B.D., Kirk K., Farrel R.A. (1986)** Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 2: 251-254
7. **Gadd G.M. (2001)** Fungi in bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, 481
8. **Ghosh S., Das S. K., Guha A.K., Sanyal A.K. (2009)** Adsorption behavior of lindane on *Rhizopus oryzae* biomass: physico-chemical studies. *Journal of Hazardous Materials* 172, 485-490
9. **Hadar Y., Cohen-Arazi E. (1986)** Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 6: 1352-1354
10. **Hamby D.M. (1996)** Site remediation techniques supporting environmental restoration activities- a review. *The Science of the Total Environment*, 191, 201-224
11. **Hammel K.E. (1995)** Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. V: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Young LY (Ur.), Cerniglia CE (Ur.), Wiley-Liss, New York, 331-346
12. **Hammel K.E. (1997)** Fungal degradation of lignin. V: Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Cadisch G (Ur.), Giller KE (Ur.), CAB International, Madison (MI), 33-45
13. **Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M., Cullen D. (1998)** Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and glyoxal oxidase in wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3536-3538
14. **Jaouani A., Tabka M.G., Penninckx M.J. (2006)** Lignin modifying enzymes of *Corioliopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere*, 62: 1421-1430
15. **Kirk KT, Farrell R.L. (1987)** Enzymatic »combustion«: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465-505
16. **Martfnez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martfnez M.J., Gutiérrez A., del Rfo J.C. (2005)** Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204
17. **Messner K., Koller K., Wall M.B., Akhtar M., Scott G.M. (1998)** Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young RA (Ur.), Akhtar MJ (Ur.), Wiley & Sons Inc, New York, 385-419
18. **Pointing S.B. (2001)** Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 1-2: 20-33
19. **Raspor P., Smole-Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F.V., Rogelj I., Hacin J. (1995)** ZIM: zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokultur. Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo, Ljubljana, 98
20. **Quintero J.C., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2008)** Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH). *Ciencia e Investigación Agraria*, 35, 2: 123-132
21. **Reddy A.C. (1995)** The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 320-328
22. **Siddique T., Okeke B.C., Arshad M., Frankenberger W.T. (2002)** Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and a soil slurry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5070-5076
23. **Singh H. (2006)** Mycoremediation: fungal bioremediation. John Wiley and Sons, New Jersey, 592
24. **UNEP (2007)** Lindane: Risk Management Evaluation. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third meeting. Geneva, 18
25. **UNEP (2010)** Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants (POPs). <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/language/en-US/Default.aspx> (marec 2010)
26. **Urad Republike Slovenije za kemikalije. (2010)** Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih. http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/obstojna_organska_onesnazevala/stockholmska_konvencija_o_obstojnih_organskih_onesnazevalih/ (marec, 2010)
27. **Vidic I., Zupančič-Kralj L., Sepčič K., Pohleven F. (2008)** Degradation of polychlorinated organic biocides by the wood decaying fungi. V: International Research Group on Wood Preservation. IRG Documents IRG 39, Istanbul, maj 25-29: str. 1-13
28. **Young E., Banks C.J. (1998)** The removal of lindane from aqueous solution using a fungal biosorbent: the influence of pH, temperature, biomass concentration and culture age. *Environmental Technology* 19, 619-625
29. **Zabel R.A., Morrell J.J. (1992)** Wood Microbiology: Decay and Its Prevention. Academic Press, New York, 476
30. **Zucchini-Pascal N., de Sousa G., Rahmani R. (2009)** Lindane and cell death: At the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicology*, 256, 1-2: 32-41