

Univerzitet Metropolitan
Fakultet za primenjenu ekologiju Futura

Slobodan S. Stefanović

**Determinacija biorazgradivih sistema
autohtonih vrsta gljiva u cilju procene
mikoremedijacionih potencijala**

- doktorska disertacija -

Beograd, 2023.

Metropolitan University
Faculty of Applied Ecology Futura

Slobodan S. Stefanović

**Determination of biodegradable systems
of native fungi species with the aim of
evaluating mycoremediation potential**

- doctoral dissertation -

Belgrade, 2023.

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentor:

dr Žaklina Marjanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Članovi komisije:

dr Vitomir Ćupić, redovni profesor
Univerzitet Metropolitan, Fakultet za primenjenu ekologiju Futura

dr Mirjana Bartula, vanredni profesor
Univerzitet Metropolitan, Fakultet za primenjenu ekologiju Futura

Datum odbrane:

U Beogradu, _____ 2023.

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Žaklini Marjanović, naučnoj savetnici Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu koja me je uvela u naučnoistraživački rad i tokom čitavog procesa istraživanja podržavala i strpljivo usmeravala ka cilju. Zahvalan sam joj na poverenju i nemerljivom doprinosu proširivanju mojih saznanja i usavršavanju, ne samo kroz istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, već i kroz saradnju u okviru drugih istraživačkih projekata.

Sva eksperimentalna istraživanja ove doktorske disertacije obavljena su u laboratorijama Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu uz pomoć i podršku kolega kojima posebno želim da se zahvalim: dr Kseniji Radotić Hadži-Manić na podršci i korisnim savetima i sugestijama, dr Jeleni Dragišić Maksimović na pomoći pri merenju aktivnosti enzima, ukupnog sadržaja fenola i antioksidativnog kapaciteta, dr Vuku Maksimoviću na HPLC analizi, dr Dragani Bartolić na pomoći oko protokola za acetil bromidni test, dr Jasni Simonović Radosavljević na pomoći u pripremi izolovanih ćelijskih zidova, dr Danijeli Đikanović na sintezi DHP-a i dr Dragosavu Mutavdžiću na statističkoj obradi podataka i pomoći u tumačenju rezultata.

Zahvaljujem se članovima komisije prof. dr Vitomiru Ćupiću i prof. dr Mirjani Bartuli na konstruktivnim savetima i sugestijama koje su mi pomogle pri oblikovanju teksta doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svim svojim kolegama sa Fakulteta za primenjenu ekologiju Futura koji su mi pružali stručnu i moralnu podršku, posebno prof. dr Jordanu Aleksiću, koji nažalost više nije među nama, a koji me je inspirisao i presudno uticao na moju odluku u vezi izbora tematike istraživanja.

Izuzetnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima koji su verovali u mene čak i onda kada sam ja sumnjao, zahvalan sam im na strpljenju, razumevanju i što su bili moj osnovni oslonac podrške tokom čitavog procesa usavršavanja na doktorskim studijama.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima, koji su oduvek insistirali na mom obrazovanju i nesebično pružali podršku svim izborima koje sam pravio i ciljevima usavršavanja koje sam sebi postavljao.

Determinacija biorazgradivih sistema autohtonih vrsta gljiva u cilju procene mikoremedijacionih potencijala

Sažetak

Predmet istraživanja doktorske disertacije su autohtone drvorazgrađujuće vrste gljiva koje pripadaju ekofiziološkoj grupi izazivača bele truleži. Istraživanja su obavljena sa dve ekološki različite vrste gljiva, sa autohtonim sojevima jablanovače, *Cyclocybe aegerita* Ser1 i bukovače, *Pleurotus ostreatus* Ser1. U toku istraživanja je urađena analiza DNK ispitivanih sojeva koja je potvrdila njihov taksonomski status.

U istraživanju su poređena dva autohtona soja gljiva izazivača bele truleži, poreklom iz ravničarskih šuma Srbije, u cilju procene njihovih mikoremedijacionih potencijala. Praćena je produkcija i aktivnost ligninolitičkih enzima (lakaze, mangan peroksidaze i lignin peroksidaze), njihova sposobnost degradacije različitih fenolnih jedinjenja male molekulske mase i sposobnost brze razgradnje lignina *in vitro* u tečnim kulturama na različitim supstratima - komponentama biljne biomase od različitih drvenastih vrsta i sintetičkom dehidrogenovanom polimeru koniferil alkohola.

Dobijeni rezultati pokazuju da su obe istraživane vrste produkovale ligninolitičke enzime i efikasno razgrađivale fenolna jedinjenja male molekulske mase, ali registrovane su značajne kvalitativne i kvantitativne razlike među ispitivanim sojevima, kao i u zavisnosti od supstrata. Zabeležena je statistički značajno veća aktivnost svih ligninolitičkih enzima, kao i efikasnija degradacija fenolnih jedinjenja kod vrste *P. ostreatus*. Kod ove vrste je registrovana i sposobnost rapidne depolimerizacije lignina. *P. ostreatus* može efikasno da razgrađuje različita aromatična jedinjenja u kratkom vremenskom periodu, što jasno ukazuje da ova vrsta ima veoma visok mikoremedijacioni potencijal.

Ključne reči: *Gljive izazivači bele truleži, Cyclocybe aegerita, Pleurotus ostreatus, lignin, mikoremedijacija, lakaza, mangan peroksidaza, lignin peroksidaza.*

Naučna oblast: Nauke o zaštiti životne sredine

Uža naučna oblast: Primenjena ekologija

Determination of biodegradable systems of native fungi species with the aim of evaluating mycoremediation potential

Abstract

The research subject of the doctoral dissertation are autochthonous wood-decomposing fungi that belong to the ecophysiological group of white rot fungi. The research was conducted with two ecologically different types of fungi, with indigenous strains of poplar mushroom, *Cyclocybe aegerita* Ser1 and oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* Ser1. In the course of the research, a DNA analysis of the examined strains was performed, which confirmed their taxonomic status. In the research, two autochthonous strains of fungi causing white rot, originating from lowland forests of Serbia, were compared in order to evaluate their mycoremediation potential. The production and activity of ligninolytic enzymes (laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase) were monitored as well as their ability to degrade various phenolic compounds of low molecular weight and their ability to rapidly degrade lignin in vitro in liquid cultures on different substrates – components of plant biomass from different woody species and synthetic dehydrogenative polymer of coniferyl alcohol.

The obtained results have shown that both researched species produced ligninolytic enzymes and efficiently degraded phenolic compounds of low molecular weight, but significant qualitative and quantitative differences were recorded between the investigated strains, depending on the substrate. Statistically, a significantly higher activity of all ligninolytic enzymes was recorded, including a more efficient degradation of phenolic compounds in the *P. ostreatus* species. The ability of rapid depolymerization of lignin has also been recorded in this species. *P. ostreatus* can effectively degrade various aromatic compounds in a short period of time, which clearly indicates that this species has a very high mycoremediation potential.

Key words: *White rot fungi, Cyclocybe aegerita, Pleurotus ostreatus, lignin, mycoremediation, laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase.*

Scientific field: Environmental Sciences

Scientific subfield: Applied ecology

SADRŽAJ

1. UVODNA RAZMATRANJA.....	1
2. MIKOREMEDIJACIJA – PREGLED ISTRAŽIVANJA I PRIMENA U PRAKSI.....	10
2.1. Pregled dosadašnjih istraživanja.....	13
2.2. Praktična primena mikoremedijacije.....	18
3. GLJIVE IZAZIVAČI BELE TRULEŽI I RAZGRADIVANJE LIGNOCELULOZNE BIOMASE.....	23
3.1. <i>Cyclocybe aegerita</i> , jablanovača.....	29
3.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> , bukovača.....	31
4. LIGNINOLITIČKI ENZIMI GLJIVA IZAZIVAČA BELE TRULEŽI.....	34
4.1. Lakaza.....	35
4.2. Lignin peroksidaza.....	36
4.3. Mangan peroksidaza.....	38
4.4. Verzatilna peroksidaza.....	39
5. PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	40
5.1. Ciljevi istraživanja.....	41
5.2. Hipotetički okvir istraživanja.....	42
6. MATERIJAL I METODE.....	43
6.1. Umnožavanje i održavanje kultura micelija gljiva.....	43
6.2. Izolacija, umnožavanje i sekvenciranje DNK gljiva.....	45
6.3. Supstrati.....	46
6.3.1. Piljevina.....	46
6.3.2. Izolovani ćelijski zidovi.....	46
6.3.3. DHP – dehidrogenovani polimer koniferil alkohola.....	48
6.4. Tečni mineralni medijum.....	48
6.5. Postavka eksperimenta.....	49
6.6. Priprema uzoraka za analizu.....	55
6.7. Određivanje aktivnosti lakaze.....	56

6.8. Određivanje aktivnosti Mn-peroksidaze.....	56
6.9. Određivanje aktivnosti lignin peroksidaze.....	57
6.10. Acetil bromidni test.....	57
6.11. Ukupni sadržaj fenola.....	58
6.12. Ukupni antioksidativni kapacitet.....	59
6.13. HPLC analiza.....	59
6.14. PCA analiza.....	60
6.15. Statistička obrada podataka.....	61
7. REZULTATI I DISKUSIJA.....	62
7.1. Rast gljiva na hranljivim podlogama i medijumima.....	62
7.2. Analiza DNK gljiva.....	62
7.3. Analiza rezultata merenja aktivnosti lakaze.....	64
7.4. Analiza rezultata merenja aktivnosti mangan peroksidaze.....	65
7.5. Analiza rezultata merenja aktivnosti lignin peroksidaze.....	67
7.6. Analiza rezultata merenja sadržaja lignina acetil bromidnim testom.....	68
7.7. Analiza rezultata merenja ukupnog sadržaja fenola.....	70
7.8. Analiza rezultata merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta.....	71
7.9. Rezultati HPLC analize.....	73
7.10. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA).....	83
7.11. Analiza rezultata kontrola gljiva i medijuma.....	85
7.12. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa piljevinom hrasta.....	85
7.13. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa piljevinom topole.....	86
7.14. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa piljevinom smrče.....	87
7.15. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima hrasta	88
7.16. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima topole	89
7.17. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima smrče	90
7.18. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa DHP-om.....	91
8. ZAKLJUČAK.....	93
9. LITERATURA.....	96
10. PRILOZI.....	111
10.1. Popis slika.....	111

10.2. Popis grafikona.....	113
10.3. Popis tabela.....	114
BIOGRAFIJA.....	115
IZJAVA O AUTORSTVU.....	116
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA.....	117
IZJAVA O KORIŠĆENJU.....	118

1. UVODNA RAZMATRANJA

Industrijska revolucija je jedan od najznačajnijih događaja u istoriji ljudske vrste i prekretnica koja je promenila gotovo sve aspekte života ljudi. Industrijski i tehnološki razvoj, praćen agrarnom revolucijom i velikim napretkom nauke podstakli su snažan ekonomski razvoj koji je uslovio značajno povećanje brojnosti stanovništva i unapređenje sveukupnog životnog standarda ljudi. Međutim, ovaj razvoj ljudske civilizacije uslovio je i pojavu novih vrsta pritisaka na životnu sredinu. Zagađenje životne sredine, prekomerna eksploatacija resursa, klimatske promene i globalna ugroženost biodiverziteta samo su neke od najizrazitijih manifestacija ovih pritisaka na životnu sredinu.

Procenjuje se da se godišnje u svetu proizvede najmanje 30 miliona tona industrijskih hemikalija (Cribb, 2017), što je samo mali deo ukupne godišnje emisije svih hemikalija u životnu sredinu koja se procenjuje na oko 220 milijardi tona (Naidu i sar., 2021). Za mnoge od ovih hemikalija postoje jasni i nedvosmisleni dokazi da imaju štetan, toksičan, kancerogeni ili mutageni efekat. Za veliki broj hemikalija koje se akumuliraju u životnoj sredini nije poznato kakav efekat imaju na živi svet ili ljudsko zdravlje, dok se za neke otkrije da imaju negativne efekte, tek nakon više godina ili decenija akumuliranja u životnoj sredini.

Problem zagađivanja životne sredine uzrokovan antropogenim aktivnostima u prošlosti nije bio jasno prepoznat, verovalo se da priroda ima neograničenu sposobnost samoprečišćavanja i da su prirodni resursi neograničeni. Međutim, zagađivanje vode, vazduha i zemljišta se odvijaju i danas i treba ih shvatiti kao kontinuiran proces koji se donekle kvalitativno i kvantitativno menjao kroz istoriju. Netaknuta priroda više ne postoji jer u svakom ekosistemu na planeti se mogu detektovati polutanti emitovani iz različitih industrijskih aktivnosti i jasno je da destruktivni antropogeni uticaj ima globalni karakter. Danas je, više nego ikada, sasvim jasno da održavanje postojećeg i dalje unapređivanje životnog standarda ljudi nije moguće bez očuvanja životne sredine.

Industrija je svakako najvažniji zagađivač celokupne životne sredine. U vremenu sa početka industrijalizacije postojale su samo manje fabrike koje su zagađivale životnu sredinu jedino dimom koji se oslobađao u procesima sagorevanja. Međutim, kasnije, kako se razvijala industrija, tako je i pritisak na životnu sredinu bio sve veći.

Industrijsko zagađivanje zemljišta je višestruko. U toku industrijske proizvodnje obično nastaje velika količina intermedijernih jedinjenja i nusproizvoda i otpada, koji se deponuje u životnoj sredini. Smatra se da se samo u farmaceutskoj industriji svakodnevno sintetiše nekoliko stotina novih hemijskih jedinjenja, o čijim efektima na životnu sredinu i ljudsko zdravlje se ne zna gotovo ništa (Eckerman, 2001). Od oko 22.000 prepoznatih različitih organskih i neorganskih polutanata oko 6.000 je komercijalno dostupno, a manje od 200 ovih jedinjenja je obuhvaćeno nekim vidom regulative od strane Svetske zdravstvene organizacije ili Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (Daughton, 2004). Negativan uticaj industrije na životnu sredinu se ne može ukloniti, ali se može smanjiti uvođenjem zelenih tehnologija, smanjenjem upotrebe fosilnih goriva i prelaskom na alternativne izvore energije, kao što su energija vetra, sunčeva energija, geotermalna energija i uopšte, poštovanjem principa održivog razvoja. Zagađujuće materije su u odnosu na hemijsku strukturu izuzetno raznovrsne, pa i njihov štetni efekat u zemljištu i uopšte u životnoj sredini, može biti od manjeg ili većeg značaja. Dok su neke od ovih materija prisutne samo lokalno i kratkotrajno, druge predstavljaju globalni problem. Zagađujuće materije koje su prisutne u zemljištu širom sveta, pa predstavljaju globalni problem, odlikuju se velikim kapacitetom rasprostiranja, perzistentne su i toksične (Mingelgrin i Nasser, 2006).

Veliki kapacitet rasprostiranja je karakterističan za zagađujuće materije koje su rastvorljive u vodi, što omogućuje njihovu migraciju vodotokovima, kao i za one koje su čvrsto vezane za čestice zemljišta, koje lako može da raznosi vetar (Mingelgrin i Nasser, 2006). Perzistentnost zagađujućih materija pre svega zavisi od njihove hemijske prirode i sposobnosti zemljišnih mikroorganizama da ih razlože. Toksičnost podrazumeva sposobnost supstanci da indukuju različite poremećaje u normalnim životnim funkcijama, inhibiraju ili potpuno sprečavaju rast i reprodukciju ili funkciju pojedinih organa. Većina veštački sintetisanih supstanci se odlikuje znatno većom toksičnošću u odnosu na supstance koje postoje u prirodi. Izuzetak su jedino neki glikozidi, alkaloidi, fenolna i druga jedinjenja proizvedena od strane biljaka, gljiva ili mikroorganizama. Međutim, koncentracije ovih materija u prirodi su daleko manje od toksičnih materija antropogenog porekla (Kvesitadze i sar., 2006).

Najzastupljenije zagađujuće materije u zemljištu se grubo mogu podeliti na tri osnovne grupe. To su teški metali, aromatični ugljovodonici i organohlorna jedinjenja.

Aromatični ugljovodonici su vrlo raznovrsna grupa jedinjenja, koja obično imaju kancerogena svojstva, što dovoljno naglašava njihov značaj kao zagađujućih materija u životnoj sredini. Najznačajnija jedinjenja ove grupe su benzen i njegovi derivati i policiklični aromatični ugljovodonici. Benzen i njegovi derivati imaju široku primenu jer se koriste u proizvodnji boja, lepkova, gume, pesticida, lekova, deterdženata i slično. Glavni izvor benzena su fosilna goriva i u životnu sredinu dospeva iz petrohemijske industrije prilikom prerade nafte ili nepotpunim sagorevanjem fosilnih goriva. Benzen i njegovi derivati su izuzetno toksični i kancerogeni i izazivaju leukemiju i druge oblike kancera. Vezujući se za makromolekule, narušavaju njihovu strukturu i funkciju i negativno utiču na većinu organa. Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) nastaju najčešće usled nepotpunog sagorevanja različitih vrsta goriva. To su u vodi nerastvorljiva i izuzetno perzistentna jedinjenja sa velikim potencijalom akumulacije u životnoj sredini. Mnoga od ovih jedinjenja imaju kancerogena svojstva (Brandt i Einhenkel-Arle, 2016).

Organohlorna jedinjenja su vrlo raznovrsna organska jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže hlor, a najznačajniji su organohlorni pesticidi, hlorovani alifatični ugljovodonici, hlorovani aromatični ugljovodonici, među kojima su najznačajniji dioksini i hlorovana fenolna jedinjenja među kojima su najznačajniji polihlorovani bifenili (Mingelgrin i Nasser, 2006). Organohlorni pesticidi su vrlo intenzivno bili primenjivani u poljoprivredi i za kontrolu malarije, a danas je njihova upotreba u većem delu sveta zabranjena zbog izuzetne toksičnosti i perzistentnosti. Verovatno najpoznatiji pesticid iz ove grupe jedinjenja zbog svojih izuzetno štetnih efekata je dihlor-difenil-trihloretan (DDT). Hlorovani alifatični ugljovodonici se obično upotrebljavaju kao rastvarači ili kao reagensi za sintezu različitih organskih jedinjenja. Svakako najznačajnije jedinjenje ove grupe je trihloretilen. Smatra se da 90% od ukupne proizvedene količine ovog jedinjenja završi u prirodi, a radi se o relativno perzistentnom molekulu, koji ispoljava hepatotoksični efekat (Kvesitadze i sar., 2006). Dioksini su jedinjenja koja najčešće nastaju kao sporedni produkti prilikom proizvodnje organohlornih pesticida i drugih organohlornih jedinjenja, u industriji papira prilikom razgradnje lignina i prilikom sagorevanja goriva u motornim vozilima. To su izuzetno toksična i stabilna jedinjenja u prirodi. Dioksini su kancerogena jedinjenja koja indukuju pojavu kancera, narušavaju funkcije endokrinog sistema, izazivaju poremećaje

seksualnog razvića, izazivaju imunodeficijenciju i promene na koži (Kvesitadze i sar., 2006). Polihlorovani bifenili (PCB) su jedinjenja koja su našla široku primenu zbog otpornosti na visoke temperature. Koriste se za elektroizolaciju, kao ulja za podmazivanje motora, kao rashladne tečnosti i slično. Usled široke primene i velike perzistentnosti mogu biti prisutni u značajnim koncentracijama u zemljištu. Poznato je svega nekoliko mikroorganizama koji mogu u potpunosti da razgrade poliflorovane bifenile. Lako ulaze u lance ishrane i izuzetno su toksični. Po toksičnim efektima polihlorovani bifenili su slični dioksinima.

Kada je reč o zaštiti i očuvanju životne sredine, osnovni imperativ bio bi zaustavljanje dalje emisije zagađujućih materija iz svih antropogenih izvora, kao i sanacija postojećeg zagađenja. Pod remedijacijom zagađenog zemljišta se podrazumevaju sve one mere koje treba preduzeti sa ciljem da se spreči dalje širenje zagađenja, da se snize koncentracije prisutnih zagađujućih materija do nivoa koji su bezbedni za životnu sredinu i ljudsko zdravlje i podigne kvalitet zemljišta, kako bi se ono ponovo moglo bezbedno koristiti. U te svrhe razvijen je veliki broj metoda koje se grubo mogu podeliti u dve grupe u zavisnosti od mesta na kom se tretira zagađeno zemljište.

Remedijacija *ex situ* podrazumeva iskopavanje zemljišta koje se transportuje do mesta na kom će se zemljište na određeni način tretirati. U zavisnosti od vrste polutanata prisutnih u zemljištu, otpadne materije se dalje mogu tretirati na različite načine, pa se, na primer, može vršiti njihovo ispiranje, ukoliko su polutanti rastvorljivi u vodi, ili sagorevati na visokim temperaturama, podvrgavati UV oksidaciji, ili se tretira nekim drugim konvencionalnim metodama (Vidali, 2001). Bez obzira na dalji tretman zemljišta, remedijacija *ex situ* je uvek veoma skupa i komplikovana, samim tim što podrazumeva iskopavanje i transport velikih količina zemlje, što nosi dodatne rizike kontaminacije životne sredine. Za takav otpad neophodno je obezbediti i odgovarajući prostor za deponovanje, što nije uvek jednostavno, a čest problem pri pronalasku adekvatnog prostora je i otpor javnosti. Za tretman deponovanog otpada potreban je određeni vremenski period, a ponekad se i ne tretira odmah po deponovanju, što zahteva redovan monitoring i nosi dodatne rizike kontaminacije.

S obzirom i na površine koje danas zauzima zagađeno zemljište širom sveta, ovaj vid remedijacije je apsolutno nedovoljan. Remedijacija *ex situ* zato predstavlja

rešenje jedino u slučaju nekih izuzetno toksičnih supstanci prisutnih u visokim koncentracijama u zemljištu i obično se primenjuje onda kada je nemoguće primeniti neku od *in situ* metoda.

Remedijacija *in situ* podrazumeva sanaciju zemljišta na licu mesta, bez iskopavanja i prenošenja zagađenog zemljišta na drugu lokaciju i to je najveća prednost ovakvog pristupa jer se na taj način smanjuje rizik od širenja zagađenja u životnoj sredini i ugrožavanja zdravlja radnika uključenih u sanaciju i drugih ljudi. Iskopavanje i transport zagađenog zemljišta imaju značajan udeo u ukupnoj ceni procesa remedijacije, pa je *in situ* pristup ekonomski prihvatljivija opcija. *In situ* pristup je jedina opcija u slučajevima remedijacije velikih površina zemljišta i kada se zagađujuće materije nalaze na velikim dubinama, u ovim slučajevima iskopavanje zagađenog zemljišta nije moguće. Razvijene su brojne i veoma raznovrsne metode koje se primenjuju pri *in situ* remedijaciji. Neke od najčešće korišćenih su ventiliranje i ispiranje zemljišta, hemijska ekstrakcija, termalna desorpcija, hemijska oksidacija, elektroklimacija i druge (Kuppusamy i sar., 2016).

Idealan scenario remedijacije zagađenog zemljišta bi podrazumevao potpunu razgradnju i neutralizaciju zagađujućih materija na licu mesta, odnosno *in situ* i to je u nekim slučajevima, zavisno od prirode i koncentracije prisutnih polutanata, moguće ostvariti primenom različitih fizičkih ili hemijskih metoda remedijacije. Iako mogu biti visoko efikasne, primena ovih konvencionalnih metoda ima i negativne aspekte koji su prouzrokovani često njihovom tehnološkom kompleksnošću i relativno visokom ekonomskom cenom implementacije.

Prirodni ekosistemi imaju sposobnost samoprečišćavanja, koja počiva na sposobnosti živih organizama da svojim metaboličkim aktivnostima ekstrahuju, akumuliraju ili razgrađuju različite zagađujuće materije. Razumevanje ovih mehanizama u cilju unapređenja njihove efikasnosti predstavlja osnovu za primenu ekoremedijacije. Ekoremedijacija se može definisati kao proces biološke degradacije zagađujućih materija u životnoj sredini pod kontrolisanim uslovima do bezbednog nivoa, ili ispod graničnog nivoa njihovih vrednosti koncentracija koji je definisan odgovarajućom regulativom (Mueller i sar., 1996). Ekoremedijacija nije nova biotehnologija, istorija primene ekoremedijacionih metoda u zbrinjavanju različitog otpada je duža od jednog veka, ali se tek poslednjih nekoliko decenija vrše intenzivna

istraživanja koja za cilj imaju definisanje jasnih protokola za efikasnu primenu ekoremedijacionih tehnologija u praksi.

Ekoremedijacija je zelena, ekološki prihvatljiva biotehnologija koja koristi biljke, gljive, bakterije i druge mikroorganizme u sanaciji zagađenja. Za realizaciju ekoremedijacionih projekata najčešće nije neophodna komplikovana i skupa oprema, korišćenje agresivnih hemikalija ili obezbeđenje izvora energije. Energija potrebna za sve fiziološke procese, pa i za razgradnju polutanata od strane živih organizama potiče od Sunca i nutrijenata prisutnih na zagađenom staništu. Ekoremedijacija je tehnologija koju je relativno lako primeniti i njena primena ne dovodi do gomilanja dodatnog otpada u životnoj sredini. Primena ove tehnologije je vrlo široka i može se primeniti u slučaju prisustva veoma različitih organskih i neorganskih polutanata u zemljištu, kao što su različiti teški metali, pesticidi, naftni derivati, hlorovani rastvarači, fenolna jedinjenja, PAHovi, derivati benzena. Jednostavna primena i energetska nezavisnost uslovljavaju i nisku cenu implementacije ove tehnologije (Aleksić i sar., 2015).

Velika prednost ekoremedijacije je što se najčešće implementira in situ čime se eliminiše čitav niz potencijalnih negativnih uticaja na životnu sredinu povezanih sa iskopavanjem, transportom i odlaganjem zagađenog zemljišta, ali se može izvoditi i ex situ. Karakteristična je velika raznovrsnost metoda primene ekoremedijacionih tehnologija što obezbeđuje značajne mogućnosti njihovog prilagođavanja i definisanje pristupa koji je najadekvatniji za rešavanje svakog pojedinačnog slučaja zagađenja koje treba sanirati.

U literaturi se termin ekoremedijacija često izjednačava sa terminom bioremedijacija, a koji je, opet u drugim literaturnim izvorima, ograničen samo na upotrebu bakterija i drugih mikroorganizama u procesima remedijacije. Koncept ekoremedijacije podrazumeva ekosistemski pristup koji se bazira na zaštiti i restauraciji životne sredine i taj akcenat na nivou ekosistema je ono po čemu se ekoremedijacija razlikuje od bioremedijacije (Vovk Korže, 2014). Terminom fitoremedijacija je označena upotreba biljaka, a pod terminom mikoremedijacija se podrazumeva upotreba micelija gljiva u procesima remedijacije.

Bioremedijacija se može definisati kao proces u kom se pomoću mikroorganizama uklanjaju zagađujuće materije iz zemljišta (Leung, 2004). Osnivačem savremene bioremedijacije se smatra Džordž Robinson koji je 60-ih godina prošlog

veka eksperimentisao sa bakterijama koje mogu da razgrađuju ugljovodonike iz nafte. Tek 1972. godine su ovi mikroorganizmi prvi put primenjeni u praksi za remedijaciju zemljišta zagađenog izlivanjem naftovoda u Ambleru u Pensilvaniji, što predstavlja prvi zvanični komercijalni primer primene in situ bioremedijacije (Sonawdekar, 2012). Od tada do danas su širom sveta uspešno realizovani brojni bioremedijacioni projekti.

Za uspešnu realizaciju procesa bioremedijacije mogu biti dovoljni mikroorganizmi koji su već prisutni u zagađenom zemljištu. Opravdano je pretpostaviti da su ovi mikroorganizmi već adaptirani na prisustvo polutanata i da među njima ima i onih sa odgovarajućim metaboličkim kapacitetima koji ih mogu razgrađivati. Međutim, bioremedijacija može biti limitirana brojnim faktorima kao što su pH, temperatura, vlažnost, količina kiseonika i nutrijenata, i slično. Modifikacijom ovih faktora, odnosno biostimulacijom, obezbeđuje se značajno poboljšanje uslova za razvoj mikroorganizama i time povećava efikasnost bioremedijacije (Adams i sar., 2015). Ovakav vid bioremedijacije se oslanja na autohtone mikroorganizme i izvodi se in situ kada se radi o zemljištima koja su zagađena umerenim ili manjim koncentracijama zagađujućih materija.

Bioaugmentacija je tip bioremedijacije koji karakteriše unošenje specifičnih alohtonih mikroorganizama u sredinu zagađenu visokim koncentracijama zagađujućih materija (Cassidy, 2023). To su mikroorganizmi koji su posebno selektovani na osnovu dokazane sposobnosti razgradnje odgovarajućeg polutanta čije je prisustvo utvrđeno u zagađenom zemljištu. Ovaj vid bioremedijacije se može izvodi i in situ i ex situ.

Biotehnologija kojom se pomoću biljaka vrši remedijacija zemljišta kontaminiranog organskim ili neorganskim zagađujućim materijama označava se terminom fitoremedijacija, koji je Raskin skovao 1991. godine (Raskin i sar., 1994). Identifikovan je veliki broj vrsta biljaka koje su izuzetno tolerantne na prisustvo zagađujućih materija u zemljištu čije koncentracije značajno prevazilaze definisane granične vrednosti koje se smatraju bezbednim (Cunningham i Ow, 1996). U zavisnosti od fizioloških mehanizama biljaka na kojima je baziran proces remedijacije zagađenog zemljišta, može se izdvojiti nekoliko različitih fitotehnologija.

Fitodegradacija i fitotransformacija su fitotehnologije u kojima biljke putem korena usvajaju organske zagađujuće materije. U tkivima biljaka dolazi do potpune razgradnje ili transformacije zagađujućih materija do manje toksičnih jedinjenja. Ovi

krajnji produkti transformacije se potom akumuliraju u ćelijskim vakuolama ili se ugrađuju u ćelijske zidove (McCutcheon i Schnoor, 2003).

Rizosferna degradacija je fitotehnologija u kojoj dolazi do razgradnje organskih zagađujućih materija u zoni korena, odnosno rizosfere. Biljke ne akumuliraju polutante, već pospešuju razvoj mikroorganizama i gljiva u oblasti rizosfere izlučevinama korena koje sadrže različite organske biomolekule (Schnoor, 2000). Razgradnja polutanata u ovom slučaju se odvija zahvaljujući aktivnosti mikroorganizama i gljiva.

Fitovolatilizacija podrazumeva upotrebu biljaka pri remedijaciji zemljišta zagađenog isparljivim zagađujućim organskim materijama (Limmer i Burken, 2016). Gasoviti polutanti iz zemljišta se usvajaju putem korena, transportuju kroz biljku i transpiracijom oslobađaju u atmosferu u nepromenjenom ili izmenjenom obliku. Oslobodeni isparljivi kontaminanti bivaju razblaženi u atmosferi gde najčešće naknadno dolazi do njihove fotohemijske degradacije. Kao rezultat aktivnosti biljaka i mikroorganizama i neki neorganski polutanti koji sadrže živu, arsen ili selen se mogu prevesti u isparljiva jedinjenja koja se mogu ukloniti iz zemljišta fitovolatilizacijom (Limmer i Burken, 2016).

Uspešnost primene ekoremedijacije zavisi od velikog broja faktora. Pre svega neophodna je dobra proučenost bioloških odlika svake pojedinačne vrste koja će se koristiti u procesu, poznavanje klimatskih uslova koji vladaju na površini zagađenog zemljišta koje će se tretirati, a posebno poznavanje stepena zagađenja i vrsta polutanata prisutnih u tom zemljištu (Admassu i Korus, 1996). Ako se tome doda da i sami živi organizmi koji se koriste u ekoremedijaciji moraju imati neophodne preduslove za život, jasno je da njena primena ima brojna ograničenja. Primena ekoremedijacije je nemoguća u slučajevima kada je zemljište zagađeno visokim koncentracijama polutanata, posebno ako se radi o supstancama koje su izuzetno toksične. Takođe, u slučajevima kada su polutanti čvrsto vezani za glinu ili druge komponente zemljišta, efekat ekoremedijacije je veoma ograničen. Toksičnost i dostupnost različitih polutanata nisu uvek poznate, a to se posebno odnosi na njihove intermedijere koji nastaju pod uticajem aktivnosti organizama. Usled ekoremedijacije može doći do povećanja pokretljivosti nekih polutanata, pa usled toga može doći do zagađivanja podzemnih voda, ili emisije polutanata u atmosferu. U slučajevima kada se koriste biljke koje akumuliraju polutante u svojim tkivima postoji rizik ulaska tih polutanata u lance

ishrane ukoliko te biljke budu konzumirane od strane životinja ili čoveka. Poseban problem predstavljaju pokošeni ostaci biljaka koje se koriste u fitoekstrakciji, jer predstavljaju opasan otpad. Nedostatak fitoremedijacije je i to što je ograničena samo na relativno plitku zonu zemljišta koje je u zoni korenova (McCutcheon i Schnoor, 2003).

Efikasnost procesa ekoremedijacije zavisi i od klimatskih faktora. Tako u tropskim i suptropskim predelima biljke i mikroorganizmi su aktivni u toku cele godine. Međutim, sa porastom geografske širine njihova aktivnost varira u toku godine, što je uslovljeno pojavom hladnijeg zimskog perioda. Samim tim i efikasnost fitoremedijacije u ovim oblastima ima sezonski karakter.

Konačno, nedostatak ekoremedijacije je i neophodnost dugog vremenskog perioda. Za ekoremedijaciju zagađenog zemljišta je često potrebno nekoliko godina.

I pored svih svojih ograničenja, ekoremedijacija ima izuzetno široku primenu, pre svega zbog mogućnosti izbora velikog broja vrsta živih organizama koji mogu da detoksifikuju izuzetno široku lepezu polutanata. Ona se može primeniti i u kombinaciji sa drugim metodama za remedijaciju zemljišta, a mogućnosti primene ekoremedijacije se konstantno proširuju uporedo sa napredkom istraživanja novih vrsta, kao i istraživanja njihovih metaboličkih mehanizama manipulacije polutantima. Ova intenzivna istraživanja su podstaknuta i porastom društvene svesti o štetnim posledicama prisustva zagađujućih materija u životnoj sredini i činjenicom da se stalno donose sve striktniji propisi koji se odnose na očuvanje životne sredine. Posledično, javlja se pritisak neophodnosti da se problemi u vezi zagađenja životne sredine moraju rešavati, a oni su brojni i zahtevaju ulaganje značajnih finansijskih sredstava, koja su u slučaju primene ekoremedijacionih tehnologija ipak značajno manja u odnosu na druge konvencionalne metode. Ostvaren je značajan napredak u istraživanjima i definisanju protokola za praktičnu primenu u oblastima bioremedijacije i fitoremedijacije, dok je napredak u oblasti mikoremedijacije znatno skromniji, ali su poslednjih decenija primenjena mikološka istraživanja gljiva u fokusu naučnoistraživačkih organizacija širom sveta. Imajući u vidu ekološku ulogu gljiva kao razlagača organske materije u prirodnim ekosistemima i njihov raznovrstan enzimatski aparat, mikoremedijacija deluje kao obećavajuća biotehnologija, posebno kada je u pitanju rešavanje problema zagađenja polutantima koje drugi organizmi ne mogu da razgrade.

2. MIKOREMEDIJACIJA – PREGLED ISTRAŽIVANJA I PRIMENA U PRAKSI

Gljive su eukariotski jednoćelijski ili višećelijski heterotrofni organizmi koji imaju ćelijske zidove izgrađene od hitina i klasifikovani su u okviru posebnog carstva. To su najčešće organizmi mikroskopskih dimenzija, a i kada su većih dimenzija, njihovo telo – micelija, izgrađena je od filamentoznih i veoma tankih ćelija – hifa koje ili obrastaju ili prožimaju supstrat u kom se razvijaju. Često su sporokarpi, strukture koje se obrazuju u cilju reprodukcije, jedini delovi koji se mogu uočiti, dok je vegetativna micelija skrivena u supstratu (Marinović, 1973). Ovakav kriптиčan način života u značajnoj meri otežava proučavanje ovih organizama u prirodi. Identifikacija vrsta nije moguća na osnovu vegetativnih karakteristika tela, pa građa i karakteristike sporokarpa imaju najveći taksonomski značaj (Harley, 1971). Poslednjih decenija primena molekularnih metoda i sekvenciranje DNK predstavljaju moćne alate za identifikaciju vrsta i dali su izuzetan doprinos razrešenju taksonomskog statusa velikog broja vrsta i viših taksonomskih grupa i sveukupnom razumevanju biodiverziteta i evolucije gljiva (Hibbett i sar., 2007).

Gljive su izuzetno slabo proučena grupa organizama. Ukupan broj do danas opisanih vrsta gljiva se procenjuje na 80.000 do oko 120.000 (Webster i Weber, 2007). Species Fungorum trenutno prepoznaje preko 155.000 vrsta (Species Fungorum, 2023). Prema najkonzervativnijim procenama postoji najmanje 1,5 miliona vrsta, dok Hawksworth i Lücking (2017) procenjuju biodiverzitet gljiva na 2,2 do 3,8 miliona vrsta, iz čega sledi da broj do danas opisanih vrsta gljiva čini svega 3 do 8% od ukupnog broja vrsta prisutnih u ekosistemima na planeti.

Carstvo gljiva predstavlja jednu od najraznovrsnijih grupa organizama koji su široko rasprostranjeni u svim terestričnim ekosistemima u kojima imaju izuzetno veliki značaj. Postoji značajan broj parazitskih i patogenih vrsta koje se razvijaju na biljakama, životinjama ili drugim gljivama, od kojih neke pričinjavaju velike ekonomske štete na usevima gajenih biljaka i prouzrokujući bolesti gajenih životinja. Neke vrste su izazivači bolesti čoveka. Veliki ekonomski značaj imaju i jestive vrste gljiva, a posebno lekovite vrste koje proizvode antibiotike i druge biološki aktivne supstance.

Izuzetno veliki značaj za održavanje ekosistema imaju gljive koje stupaju u simbiotske odnose sa biljkama gradeći mikorize. Procenjuje se da oko 90% vrsta biljaka stupa u ovakve simbiotske odnose i da bez gljiva ne bi mogle da opstanu samostalno (Bonfante, 2003). U simbiozi sa algama i cijanobakterijama grade lišajeve koji imaju značajnu ulogu u kolonizaciji stena i drugih nenastanjenih staništa gde kao pionirske vrste obrazuju tanak sloj mineralnog supstrata kao osnovu za nastanak zemljišta.

Najznačajnija uloga slobodnoživećih vrsta gljiva u terestičnim, a u nešto manjoj meri i u akvatičnim ekosistemima, je uloga razlagača organske materije, što predstavlja ključnu kariku u procesima kruženja materije u biogeochemijskim ciklusima, pre svega ugljenika, azota, fosfora, sumpora i nekih metala. Pored bakterija, gljive su ključni razlagači biomase, ali imaju i izuzetno veliki značaj u prometu i transformaciji neorganskih jedinjenja. Imaju izuzetno veliki značaj u formiranju i održavanju strukture zemljišta, kao i u redistribuciji različitih elemenata i minerala putem micelijske mreže (Gadd, 2007). Kao razlagači organske materije, slobodnoživeće saprofitske i simbiotske gljive predstavljaju značajne karike u lancima ishrane.

Gljive su heterotrofni organizmi koji se hrane saprofitski. Razgradnja organske materije počiva na sintezi izuzetno raznovrsnih ekstracelularnih enzima koji predstavljaju osnovu biorazgradivih sistema gljiva. Ovi enzimi u spoljašnjoj sredini katalizuju reakcije razgradnje organskih molekula do prostih organskih molekula koje gljive apsorbuju kao nutrijente putem površine micelije u rastvorenom obliku. Kontrola enzimske aktivnosti je znatno manja u slučaju ekstracelularnih enzima u poređenju sa enzimima koji imaju intracelularnu aktivnost, pa se često dešava da produkcija nutrijenata bude znatno veća nego što su potrebe gljive (Harley, 1971). Ovaj višak nutrijenata često stimuliše razvoj drugih mikroorganizama, kao što su bakterije. Produkcijom ekstracelularnih enzima gljive aktivno menjaju uslove sredine.

Postoji izuzetno velika varijabilnost ekstracelularnih enzima koje proizvode gljive i u skladu sa tim mogućnosti razgradnje izuzetno raznovrsnih molekula. Osim u razgradnji polimera i organskih molekula prisutnih u prirodnim ekosistemima, ovi enzimi efikasno razgrađuju i brojne materijale i molekule antropogenog porekla. Dobro je poznato da materijali poput građevinskog materijala od drveta, papir, koža, tekstil, ali i plastika, beton, elektroinstalacioni materijali, vremenom propadaju usled prisustva gljiva i aktivnosti njihovih enzima u procesu koji se označava kao mikodegradacija

(Singh, 2006). Vrste roda *Fusarium*, *Aspergillus niger* i *Mycelia sterilia* razgrađuju beton izvlačenjem kalcijuma (Singh, 2006), dok vrste rodova *Phoma* i *Alternaria* oštećuju mermer (Diakumaku i sar., 1995). Mikodegradacija slika i drugih umetničkih dela i literature u bibliotekama predstavlja globalni problem.

U dosadašnjim mnogobrojnim istraživanjima je utvrđeno da ovi ekstracelularni enzimi gljiva mogu veoma efikasno da katalizuju reakcije razgradnje raznovrsnih organskih zagađujućih materija, uključujući i neke izuzetno toksične i perzistentne kao što su policiklični aromatični ugljovodonici, različiti derivati benzena, fenolna jedinjenja, organohlorna jedinjenja, pesticidi, industrijske boje i slično. Produkcija efikasnih enzima od strane gljiva je njihova najvažnija karakteristika koja predstavlja osnovu mikoremedijacije, biotehnologije koja ima za cilj uklanjanje zagađujućih materija iz medijuma životne sredine pomoću gljiva (Akhtar i Amin-ul Mannan, 2020; Kulshreshtha i sar., 2014). Termin mikoremedijacija je osmislio Paul Stamets sa ciljem da ukaže na upotrebu konkretno micelija gljiva u remedijaciji (Ramtek, 2010).

Osim produkcije efikasnih enzima, od značaja za mikoremedijaciju su i druge biološke karakteristike gljiva. Gljive se odlikuju brzim rastom i velikom i brzom produkcijom biomase micelija, koje mogu da rastu neograničeno, odnosno dokle god postoje optimalni uslovi za rast. Usled brzog rasta i načina na koji rastu prožimajući supstrat, relativno brzo mogu da kolonizuju zagađeni medijum. Micelije su veoma razgranate, izgrađene od velike mase filamentoznih hifa zbog čega se odlikuju izuzetno velikom površinom u odnosu na zapreminu. Velika površina tela sa kog se izlučuju efikasni enzimi omogućuje i kontakt sa većom površinom zagađenog medijuma. Sintezu enzima kod bakterija najčešće indukuje izlaganje bakterijskih ćelija odgovarajućoj koncentraciji zagađujućih materija, dok u slučaju gljiva to nije neophodno i produkcija njihovih enzima usled male specifičnosti prema supstratu ne zavisi od koncentracije polutanata. Zbog toga se zagađujuće materije pomoću bakterija mogu sniziti do veoma niskih koncentracija, ali ne i ukloniti u potpunosti, a što je često moguće ostvariti upotrebom gljiva, odnosno mikoremedijacijom (Adenipekun i Lawal, 2012). Važno je naglasiti i da gljive najčešće ne apsorbuju organske zagađujuće materije, već samo male netoksične krajnje produkte njihove razgradnje, jer se njihova razgradnja ostvaruje u spoljašnjoj sredini pomoću ekstracelularnih enzima. Na taj način sprečava se njihovo akumuliranje u živim sistemima jer se oni isključuju iz lanaca ishrane. Međutim, u

slučaju zagađenja uzrokovanog teškim metalima, moguć je njihov prenos kroz lance ishrane, jer mnoge vrste gljiva imaju sposobnost apsorpcije i akumulacije teških metala u svojim tkivima.

2.1. Pregled dosadašnjih istraživanja

Prva istraživanja u oblasti mikoremedijacije, kao i u slučaju bioremedijacije, vršena su sredinom XX veka. Međutim, za uspešnu praktičnu primenu i realizaciju konkretnih mikoremedijacionih projekata trebalo je da prođe još nekoliko decenija. Iako su u laboratorijskim uslovima dobijani značajni rezultati, nedovoljno poznavanje biologije gljiva i nerazumevanje uslova koje je trebalo ispuniti za njihov uspešan uzgoj i rast predstavljali su prepreku za uspešnu primenu ove biotehnologije u praksi. Fokus istraživanja i praktične primene je bio na bioremedijaciji i fitoremedijaciji, dok su malobrojni značajniji rezultati pri praktičnoj primeni mikoremedijacije ostvareni u toku poslednjih dvadeset do trideset godina.

Sposobnost gljiva da razlažu fenolna i druga aromatična jedinjenja poreklom iz drvene biomase je odavno poznata i opisana 60-ih godina prošlog veka od strane Horst Lira (Anderson i Juday, 2016). Ideju da enzimi uključeni u razgradnju drvene biomase mogu da razgrađuju i brojne organske zagađujuće materije koje su samo delimično strukturno slične ligninu dao je 80-ih godina Bumpus (1985) koji je vršio eksperimente sa vrstom *Phanerochaete chrysosporium*. U svojim eksperimentalnim istraživanjima otkrio je da ova vrsta može uspešno da razgrađuje organohlorni pesticid DDT i druga organohlorna jedinjenja. *Phanerochaete chrysosporium* je ubrzo postala model gljiva mikoremedijacije, najpoznatija i najistraživanija vrsta sa kojom je naknadno urađeno nebrojeno mnogo eksperimentalnih ispitivanja njene sposobnosti razlaganja najrazličitijih polutanata.

Phanerochaete chrysosporium je vrsta koja vodi saprofitski način života na različitom drveću i pripada grupi gljiva izazivača bele truleži. S obzirom na rezultate do kojih se došlo u istraživanjima sa ovom vrstom ubrzo su u fokusu daljih istraživanja bile i druge vrste ove grupe gljiva. Prema procenama na osnovu publikovane literature, istraživanja gljiva izazivača bele truleži čine oko 30% od ukupnih istraživanja obavljenih u oblasti mikoremedijacije (Singh, 2006).

U taksonomskom smislu ogromna većina vrsta gljiva koje su istraživane u oblasti mikoremedijacije pripada razdelu Basidiomycota, znatno je manji broj vrsta koje su istraživane i primenjivane u mikoremedijacionim projektima koje pripadaju razdelima Ascomycota, Deuteromycota, Zygomycota i drugim grupama.

Osim gljiva izazivača bele truleži i vrste koje pripadaju drugim ekološkim grupama imaju mikoremedijacioni potencijal. U eksperimentalnim istraživanjima u kojima su ispitivane vrste koje pripadaju grupi gljiva izazivača smeđe truleži *Gloeophyllum striatum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Fomitopsis pinicola* i *Daedalea dickinsii* dobijeni su rezultati koji pokazuju da ove vrste mogu da razgrađuju različita organohlorna jedinjenja (Purnomo i sar., 2008, Schlosser i sar., 2000). Biorazgrađivi sistemi ovih gljiva se bitno razlikuju od gljiva izazivača bele truleži jer proizvode drugačije enzime i njihova sposobnost degradacije zagađujućih materija je bazirana na aktivnosti enzima citohrom P450, a sličan mehanizam degradacije i nekih drugih zagađujućih materija koji uključuje aktivnost ovog enzima je zastupljen i kod mnogih zemljišnih mikrogljiva (Singh, 2006).

Pored gljiva koje razgrađuju drvo za mikoremedijaciju su značajne i zemljišne vrste gljiva. Vrste koje nastanjuju oblast rizosfere korenova biljaka, bilo da žive samostalno ili u simbiozi sa biljkama, imaju značajnu ulogu u razgradnji različitih zagađujućih materija u procesu koji se označava kao rizosferna degradacija. Zagađeno zemljište karakteriše drastična redukcija biodiverziteta gljiva, kao i drugih organizama. Međutim, retke vrste koje opstaju na takvom zemljištu su vrste koje su tolerantne na zagađenje i često imaju sposobnost korišćenja prisutnih zagađujućih materija za svoje metaboličke potrebe, pa upravo među njima treba tražiti kandidate za korišćenje u mikoremedijaciji. Vrste koje pripadaju rodovima *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mortierella*, *Beauveria*, *Engyodontium* su pronađene na zagađenim zemljištima koja su kontaminirana polihlorovanim bifenilima, hlorobenzoevim kiselinama i pesticidom endosulfanom i na čije prisustvo su tolerantne pa se smatra da imaju veliki mikoremedijacioni potencijal (Anastasi i sar., 2013).

Jedan od problema kom je posvećena posebno velika pažnja kada je reč o zaštiti životne sredine jeste problem izlivanja nafte i naftnih derivata, i to kako zbog obima ovog problema, tako i zbog uticaja koji ima na životnu sredinu, pa je rešavanje posledica ovog vida zagađenja bilo i u fokusu brojnih mikoremedijacionih istraživanja.

Izlivanja nafte i njenih derivata su najčešće slučajni akcidenti koji se dešavaju u toku proizvodnje, skladištenja, transporta ili korišćenja. Nafta predstavlja heterogenu smešu alifatičnih, aromatičnih i heterocikličnih ugljovodonika od koji je, u zavisnosti od sastava, od 60 do 90% komponenti biorazgradivo (dos Santos i sar., 2018). Prilikom izlivanja naftni ugljovodonici se vezuju za čestice zemljišta, vremenom se spiraju u dublje slojeve i pri toj vertikalnoj migraciji menjaju hemijska, fizička, biološka svojstva i sastav zemljišta (dos Santos i sar., 2018).

Identifikovan je značajan broj vrsta gljiva koje mogu da razgrađuju naftne ugljovodonike i da dobijene produkte koriste kao izvor ugljenika i energije. Neki od rodova kojima pripadaju te vrste su *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Sporobolomyces*, *Cephalosporium*, *Penicillium* i *Graphium* (Li i sar., 2020). U istraživanju koje je sproveo Hassan (2014) *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* i *Penicillium funiculosum* su se uspešno razvijale na zemljištu koje je sadržalo 2% naftnih ugljovodonika čijom razgradnjom su oslobađale nutrijente za rast. U većini sprovedenih studija koje se odnose na degradaciju naftnih ugljovodonika pomoću gljiva, istraživane su mikrogljive koje su u prirodi izolovane upravo iz zemljišta kontaminiranih naftom. Nešto manje su brojne studije u kojima su istraživane gljive izazivači bele truleži i druge bazidiomicete, ali su dobijeni izuzetno značajni rezultati.

U istraživanju koje su sproveli Yateem i sar., (1998) ispitivane su sposobnosti degradacije naftnih ugljovodonika tri vrste gljiva izazivača bele truleži – *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus ostreatus*. Nakon 12 meseci inkubacije na zemljištu koje je sadržalo 31g/kg naftnih ugljovodonika *Trametes versicolor* je vrsta koja je uspela da smanji koncentraciju ugljovodonika za 78,1%, *Phanerochaete chrysosporium* za 68,7%, a *Pleurotus ostreatus* za 53,1%. U istraživanju koje su sproveli Zitte i sar., (2012) gljiva *Pleurotus ostreatus* je uspela da razgradi 85-90% od ukupne količine naftnih ugljovodonika iz kontaminiranog supstrata za 4 nedelje inkubacije.

Policiklični aromatični ugljovodonici čine značajan udeo aromatične frakcije ugljovodonika nafte, ali u životnu sredinu dospevaju i iz drugih izvora. Mnoga od ovih jedinjenja su kancerogena i izuzetno toksična. Ove polutante lako razgrađuju mnoge vrste bakterija, ali samo one sa malom molekulskom masom koji imaju u svojoj

strukturi do 4 aromatična prstena, dok gljive mogu da razgrađuju i policiklične aromatične ugljovodonike veće molekulske mase sa do 7 spojenih prstenova (Lamar i sar., 2002). Postoje brojna istraživanja koja pokazuju da gljive izazivači bele truleži mogu svojom enzimatskom aktivnošću da otvaraju aromatične prstenove ovih polutanata i da ih u potpunosti mineralizuju.

Najstarija ispitivanja mogućnosti razgradnje ovih polutanata obavljena su krajem 80-ih godina sa vrstom *Phanerochaete chrysosporium*. U istraživanju koje je sproveo Bumpus (1989) ova vrsta je gajena u medijumu koji je sadržao 50mg/l antracenskog ulja. Dobijeni rezultati ukazuju da je ova vrsta u tom eksperimentu razgrađivala 22 različita policiklična aromatična ugljovodonika. Ovi nalazi su potvrđeni u brojnim istraživanjima koja su naknadno urađena. Veliki broj istraživanja je urađen i sa vrstom *Pleurotus ostreatus* (Márquez-Rocha i sar., 2000; Stamets, 2005). Sposobnosti razgradnje ove vrste su Novotný i sar. (1999) procenjivali u odnosu na *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor* koje su inkubirali na zemljištu kontaminiranom sa antracenom, fenantrenom i pirenom u koncentraciji od 50ppm. *P. ostreatus* se pokazala kao superiorna vrsta u odnosu na druge dve i nakon 2 meseca inkubacije razgradila 81-87% antracena, 41-46% fenantrena i 84-93% pirena.

Vrsta roda *Agrocybe* je u laboratorijskom eksperimentalnom ispitivanju razgradila preko 99% fluorena od polazne koncentracije od 100ppm nakon 6 dana inkubacije i preko 75% fluorantena za 30 dana inkubacije (Chupungars i sar., 2009). U prethodnim istraživanjima je otkriveno da vrste ovog roda mogu da razgrađuju i druge policiklične aromatične ugljovodonike, kao što su antracen, fenantren, piren i benzo(a)piren (Sack i sar., 1997; Steffen i sar., 2002). Ting i sar. (2011) su utvrdili da *Ganoderma lucidum* razgrađuje fenantren i piren. Prema istraživanjima Majcherczyk i sar. (1998) enzim lakaza vrste *Trametes versicolor* može da oksiduje većinu od 14 ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Sposobnost razgradnje ovih jedinjenja je potvrđena i u brojnim drugim istraživanjima ove vrste.

Dioksini spadaju među najtoksičnija jedinjenja poznata nauci i odlikuju se izuzetnom perzistentnošću u životnoj sredini. Mali je broj vrsta koje mogu da razgrađuju dioksine, a gljive su najefikasniji razlagači ovih polutanata. Pored nekoliko mikrogljiva, sposobnost razgradnje ovih toksičnih materija otkrivena je i kod nekoliko vrsta gljiva izazivača bele truleži. *Pleurotus pulmonarius* je u istraživanju koje su

sproveli Kaewlaoyoong i sar., (2021) uspela da razgradi 60% dibenzo-*p*-dioksina i dibenzofurana iz jako kontaminiranog zemljišta uzetog iz kruga fabrike za proizvodnju pentahlorfenola. Ista vrsta je u drugom istraživanju razgradila 96% ovih jedinjenja nakon 72 dana inkubacije (Kaewlaoyoong i sar., 2020). Sposobnost razgradnje različitih polihlorovanih dibenzo-*p*-dioksina utvrđena je kod vrste *Phlebia lindtneri* (Kamei i Kondo, 2005), kao i kod *Phanerochaete sordida* (Takada i sar., 1996) i *Coriolus hirsuta* (Orihara i sar., 2005).

Polihlorovani bifenili su toksična i izuzetno perzistentna i široko rasprostranjena jedinjenja u životnoj sredini, iako je njihova proizvodnja zabranjena pre 40 godina (Singer i sar., 2000). U laboratorijskim istraživanjima je potvrđeno da mnoge vrste gljiva mogu da ih razgrađuju. U istraživanju koje su sproveli Gayosso-Canales i sar., (2012) *Pleurotus ostreatus* je gajena u tečnoj kulturi i u tečni medijum je dodato ulje iz transformatora koje je sadržalo polihlorovane bifenile u koncentraciji od 7,1mg/l. Nakon 30 dana inkubacije gljiva je uspela da razgradi oko 64% polihlorovanih bifenila u medijumu. Istraživanje je utvrdilo i da prisustvo ovih toksičnih materija indukuje povećanje aktivnosti enzima lakaze, aktivnost je bila gotovo 7 puta veća u odnosu na kontrolu, kao i povećanje biomase gljiva koja je u odnosu na kontrolu bila gotovo dvostruko veća. Ovakvi rezultati ukazuju na ključnu ulogu lakaze u procesu razgradnje ovih polutanata. Sposobnost razgradnje polihlorovanih bifenila od strane ove vrste gljiva je dokumentovana i u brojnim drugim istraživanjima (Kubatova i sar., 2001; Siracusa i sar., 2017; Zeddel i sar., 1993). Sposobnost razgradnje ovih zagađujućih materija je potvrđena i kod drugih vrsta gljiva izazivača bele truleži, kao što su *Bjerkandera adusta* (Beaudette i sar., 1998), *Trametes versicolor* (Beaudette i sar., 1998; Ruiz-Aguilar i sar., 2002; Zeddel i sar., 1993), *Lentinula edodes* (Ruiz-Aguilar i sar., 2002).

Sintetičke boje imaju izuzetno široku primenu u tekstilnoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj industriji i industriji papira i procenjuje se da postoji preko 100.000 komercijalno dostupnih boja (Singh, 2006). To su u hemijskom pogledu izuzetno raznovrsna jedinjenja i to mogu biti neorganska jedinjenja, različiti polimeri i različita organska jedinjenja (Singh, 2006). Posebno je problematična upotreba boja u tekstilnoj industriji jer se u procesu bojenja gubi oko 15% boje koja završava u otpadnim vodama, preko kojih dospevaju u životnu sredinu (Prakash, 2017). Nakon

primene na tkaninama boje su postojane na svetlosti, nerastvorljive u vodi, otporne na oksidaciona sredstva, što ukazuje da se radi o izuzetno stabilnim jedinjenjima, od kojih neka imaju aromatična svojstva i toksične efekte, posebno u akvatičnim ekosistemima. Gljive izazivači bele truleži vrlo efikasno razgrađuju veliki broj sintetičkih boja zahvaljujući produkciji ligninolitičkih enzima. Robinson i sar. (2001), su ispitivali sposobnosti razgradnje 5 sintetičkih boja pomoću gljiva *Bjerkandera adusta*, *Phlebia tremellosa*, *Pleurotus ostreatus* i *Trametes versicolor* i dobili su rezultate koji ukazuju da enzimi ovih gljiva efikasno vrše dekolorizaciju sintetičkih boja.

Ligninolitički enzimi gljiva izazivača bele truleži našli su primenu u papirnoj industriji, koja je jedan od primarnih korisnika drvne biomase iz koje izvlači celulozu za potrebe proizvodnje papira. U procesu industrijske proizvodnje papira generiše se velika količina otpadnih voda koje su zagađene produktima hemijske degradacije lignina, a među zagađujućim materijama posebno su značajna organohlorna jedinjenja, koja nastaju u procesu izbeljivanja hlorom, i fenolni derivati lignina, među kojima ima izuzetno toksičnih i mutagenih jedinjenja (Singh, 2006). Gljive izazivači bele truleži, kao organizmi koji u potpunosti mogu da mineralizuju lignin i njegove derivate, veoma efikasno razgrađuju zagađujuće materije iz otpadnih voda industrije papira. Nagarathnamma i sar. (1999) testirali su sposobnost razgradnje zagađujućih materija iz otpadnih voda industrije papira 110 različitih vrsta gljiva, od kojih je 10 vrsta vršilo preko 70% dekolorizacije otpadne vode kao rezultat razgradnje zagađujućih materija. Vrsta koja se pokazala kao najuspešnija u ovom istraživanju je bila *Ceriporiopsis subvermispota* čijom primenom je ostvarena dekolorizacija otpadne vode od 84% u periodu od 48 sati.

2.2. Praktična primena mikoremedijacije

Izuzetno značajan doprinos popularizaciji mikoremedijacije kao zelene biotehnologije za saniranje zagađenja dali su Paul Stamets i Peter McCoy. Peter McCoy je putem internet sajta, brojnih video zapisa i publikacija među kojima je najznačajnija *Radical Mycology: A Treatise On Seeing And Working With Fungi* (McCoy, 2016), približio široj javnosti praktične aspekte uzgoja gljiva i mogućnosti njihove primene u mikoremedijaciji. Paul Stamets je popularizovao mikoremedijaciju kroz brojna

predavanja koja je održao, kao i putem brojnih publikacija koje je objavio, a posebno veliku pažnju naučne i šire javnosti je privukao eksperiment koji je sproveo 1998. godine (Stamets, 2005). Zemljište koje je bilo zagađeno aromatičnim ugljovodonicima u koncentraciji od oko 2% (20.000ppm) postavljeno je na polietilenske folije podeljeno u četiri gomile koje su u osnovi imale oko 6m puta 2,5m i visine oko 1m. U jednoj gomili zagađene zemlje je umešana piljevina koja je prethodno inokulisana micelijom vrste *Pleurotus ostreatus*, u količini od oko 30% od ukupne zapremine gomile zemljišta. Inokulisana piljevina je postavljena u slojevima, naizmenično sa slojevima zagađenog zemljišta. Preostale dve gomile su inokulisane bakterijama, a četvrta gomila je služila kao kontrola i nije imala nikakav tretman. Sve gomile su pokrivene folijom radi zaštite od kiše i zasenčivanja. Nakon 4 nedelje na gomili inokulisanoj micelijom gljive pojavili su se sporokarpi bukovače u ogromnom broju, zemljište je bilo svetlo smeđe boje, nije se osećao karakterističan miris nafte, a nakon 9 nedelja počele su da niču biljke, pojavile su se i druge vrste gljiva, insekti i drugi organizmi. Preostale 3 gomile su i dalje bile crne, mirisale na naftu i izgledale beživotno. Analize urađene nakon 8 nedelja od postavke eksperimenta su pokazale da se koncentracija ukupnih aromatičnih ugljovodonika od inicijalnih 20.000ppm snizila na 200ppm, što znači da je gljiva *Pleurotus ostreatus* uklonila 99% zagađujućih materija. Ovo neformalno istraživanje, koje predstavlja verovatno najpoznatiji eksperiment u oblasti mikoremedijacije, je jasno ukazalo na potencijale koje ima mikoremedijacija u saniranju zagađenja.

Lamar i sar., (2002) sprovedli su, nakon probnih laboratorijskih ispitivanja, pilot istraživanje mogućnosti mikoremedijacije zemljišta iz neposrednog okruženja fabrike za zaštitu drveta u zapadnoj Virdžiniji koje je zagađeno kreozolom. Kreozol je ulje koje se dobija destilacijom katrana i sadrži visoke koncentracije različitih policikličnih aromatičnih ugljovodonika i najčešće se koristi za zaštitu drveta. Konstruisane su dve bioćelije 8x8 stopa u osnovi i 4 stope dubine koje su obložene polietilenskim folijama. Ćelije su napunjene mešavinom zagađenog zemljišta i inokulisanih supstrata, gde je supstrat sa micelijom činio oko 20% mase mešavine. Ćelije su potom pokrivene plastičnim folijama. Za svaku ćeliju je upotrebljeno oko 4,5 tona zagađenog zemljišta. Supstrati su inokulisani micelijom bukovače, *Pleurotus ostreatus*. Supstrat koji je korišćen za inokulaciju u jednoj bioćeliji bile su drvene ljeske i opiljci, a u drugoj bioćeliji supstrat je bio mešavina ljeski i piljevine uz dodatak biljnog ulja. Uzorci

zemljišta su uzeti odmah nakon punjenja bioćelija, a kasnije su uzimani 62, 146, 175, 223 i 276-og dana, koliko je i trajao eksperiment. Nakon 276 dana kompostiranja zagađenog zemljišta došlo je do degradacije 93,2% od ukupne količine zagađujućih materija u prvoj ćeliji, dok je u drugoj razloženo 90,4%.

Prema uvidu u dostupnu literaturu može se zaključiti da je obavljen izuzetno veliki broj istraživanja mikoremedijacionih potencijala različitih vrsta gljiva u kojima su u strogo kontrolisanim laboratorijskim uslovima ostvareni izuzetni rezultati. Znatno je manji obim probnih istraživanja koja su sprovedena u realnim uslovima na terenu, a često se dešavalo da prilikom primene mikoremedijacije u realnim uslovima nisu dobijani podjednako impresivni rezultati kao u laboratorijskim uslovima. Lamar i White (2001) smatraju da razloge neuspeha u primeni ove tehnologije treba tražiti u činjenicama da je nedovoljno pažnje posvećeno razvoju i pripremi micelijalnih inokuluma, nedovoljno razumevanja svojstava polutanata u uslovima realne sredine koja se često bitno razlikuju od strogo kontrolisanih laboratorijskih uslova, pokušajima komercijalizacije biotehnologije koja još uvek nije u potpunosti razvijena i konačno u činjenici da su implementaciju biotehnologije često sprovodile osobe i timovi koji nedovoljno poznaju sve njene aspekte. Jasno je da u realnim uslovima na proces mikoremedijacije utiču i brojni promenljivi uslovi životne sredine. Neophodno je sprovesti istraživanja koja bi omogućila definisanje jasnih protokola koji bi omogućili potpunu komercijalizaciju ove biotehnologije.

Efikasnost mikoremedijacije zavisi od brojnih faktora kao što su temperatura, relativna vlažnost zemljišta, pH vrednost, količina dostupnog kiseonika i nutrijenata, posebno je značajan odnos ugljenika i azota. Optimalna temperatura za mikoremedijaciju je u intervalu od 25-30°C (Hoa i sar., 2015), dok optimalna vlažnost varira u opsegu od 60-80%. Interesantno je da je efikasnost mikoremedijacije veća u alkalnim uslovima sredine usled bolje rastvorljivosti polutanata (Hong i sar., 2007), iako je poznato da gljive bolje rastu u kiseloj sredini kada se uzgajaju u različitim hranljivim medijumima u laboratorijskim uslovima. Dobra aeracija se može ostvariti mešanjem zagađenog zemljišta sa različitim suspcratima na kojima su inokulisane micelije gljiva, a što je svakako neophodno u slučaju korišćenja gljiva izazivača bele truleži ili drugih drvorazgrađujućih vrsta gljiva. Na taj način se ujedno obezbeđuje i dovoljna količina nutrijenata. Za razliku od bakterija, gljivama je potrebno manje azotnih jedinjenja i

mogu se razvijati u sredini sa niskim sadržajem azota, optimalan odnos ugljenika i azota je 10:1 (Singh, 2006).

Prilikom planiranja jednog mikoremedijacionog projekta neophodno je prvo uraditi uzorkovanje zagađenog zemljišta i obaviti kvalitativne i kvantitativne analize prisutnih polutanata. U zavisnosti od konstatovanog zagađenja treba odabrati i odgovarajuće vrste gljiva za koje postoje dokumentovani dokazi da utvrđene zagađujuće materije mogu efikasno da razgrade. Lamar i White (2001) preporučuju realizaciju mikoremedijacije u 4 faze. Prvo treba uraditi malo probno istraživanje, a potom u drugoj fazi pilot istraživanje na terenu koji je planiran za sanaciju. Ukoliko su dobijeni zadovoljavajući rezultati u trećoj fazi treba pristupiti proizvodnji inokuluma i konačno u četvrtoj fazi obaviti planirani tretman zagađenog zemljišta.

Posebnu pažnju treba posvetiti pripremi inokuluma. Dobri rezultati su dobijeni upotrebom kapsuliranih micelija. U postupku kapsuliranja micelije se obavijaju slojem agara, agaroze, želatina, hitozana i slično, čime se obezbeđuje dodatni izvor nutrijenata i produžava životni vek (Singh, 2006). Veoma su raznovrsni supstrati koji se mogu inokulisati micelijama gljiva za potrebe mikoremedijacije. Osim piljevine, drvenih ljuski i opiljaka, za inokulaciju se mogu iskoristiti nusproizvodi i otpad iz poljoprivredne proizvodnje kao što su slama od različitih vrsta žitarica, suve stabljike kukuruza, grančice od orezivanja voća i vinove loze, seno različitih trava, seno lucerke, pulpa od šećerne repe, treset, kompost i slično. To su široko rasprostranjeni, lako dostupni i ekonomski pristupačni materijali. Redovna praksa, bar kada je reč o Republici Srbiji, je da se zbrinjavanje bar jednog dela ovog otpada svodi na spaljivanje. Mnoge vrste jestivih gljiva koje se komercijalno uzgajaju imaju sposobnost razgradnje različitih zagađujućih materija i veliki mikoremedijacioni potencijal, pa se za potrebe mikoremedijacije može koristiti supstrat koji se javlja kao otpad u njihovoj proizvodnji (Eggen i Šašek, 2002; Okparanma i sar., 2011).

Inokulisani supstrat se postavlja preko površine zagađenog zemljišta ili se meša sa zemljištem, najčešće se postavlja u slojevima naizmjenično sa slojevima zemljišta. Mešanjem supstrata sa zemljištem se obezbeđuje veća efikasnost i brzina procesa. Površina tretiranog zemljišta se prekriva folijama u cilju zaštite od padavina, zasenčivanja i sprečavanja isušivanja. Poželjno je ograditi prostor kako bi se sprečilo kopanje i druge aktivnosti divljih životinja, kao i eventualno prikupljanje sporokarpa

gljiva od strane posetilaca koji bi ih mogli koristiti u ishrani. U daljem toku treba sprovoditi redovan monitoring. Definisanje jasnih protokola za monitoring, prilagođavanje i održavanje sistema su od presudnog značaja za uspešnost procesa. Kompeticija micelija gljiva sa autohtonim populacijama mikroorganizama može značajno da utiče na konačan ishod procesa mikoremedijacije. Međutim, protokoli za eliminaciju ovih varijacija tek treba da se uspostave (Singh, 2006)

Dužina trajanja mikoremedijacije će zavisi pre svega od prirode i koncentracija zagađujućih materija, najčešće je to period od nekoliko meseci, ali može trajati i duže, a može biti neophodno i ponavljanje čitavog postupka. Po završetku procesa treba ukloniti folije i ograde. Uklanjanje inokulisanog supstrata će zavisi od buduće namene zemljišta. Supstrat se ne mora uklanjati ukoliko je zemljište bilo zagađeno organskim zagađujućim materijama koje gljive ne usvajaju. U tom slučaju dovoljno je da se zaore, čime će se povećati sadržaj organske materije u zemljištu i povećati njegova plodnost.

3. GLJIVE IZAZIVAČI BELE TRULEŽI I RAZGRADIVANJE LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Pre oko 470 do 450 miliona godina, u toku Ordovicijuma, biljke su započele kolonizaciju terestrične sredine (Becker i Marin, 2009). Kako bi preživjele nepovoljne uslove, pre svega nedostatak vode i velika temperaturna kolebanja, biljke su morale razviti čitav niz adaptacija neophodnih za opstanak u novoj životnoj sredini. Jedna od najznačajnijih adaptacija je razvoj složenog debelog ćelijskog zida koji biljnim ćelijama daje potporu, štiti od isušivanja i patogenih mikroorganizama. Primarni ćelijski zid je izgrađen najvećim delom od polisaharida celuloze, hemiceluloze i pektina, a razvoj sekundarnog ćelijskog zida karakteriše proces lignifikacije.

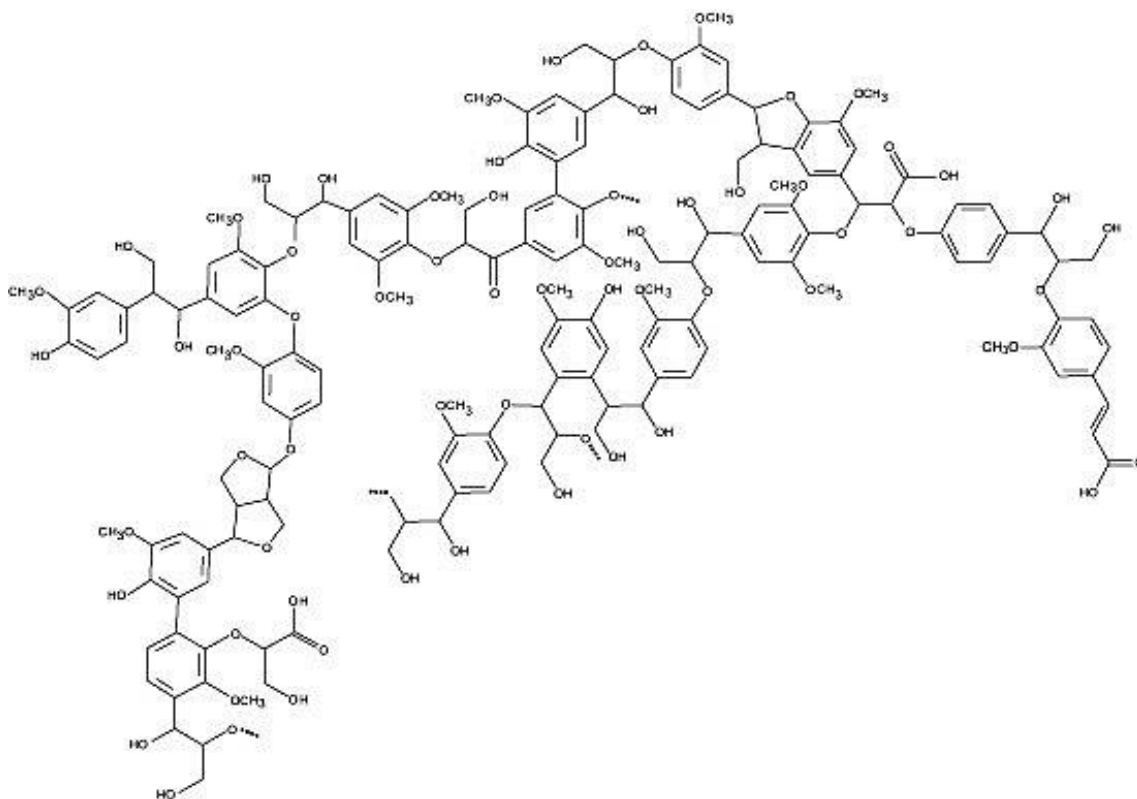
Celuloza je polisaharid kojeg čine linearni lanci nastali polimerizacijom molekula D-glukoze povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ vezama (Crawford, 1981). Lanci celuloze su grupisani u snopove i predstavljaju “armaturu” ćelijskog zida koja mu daje čvrstinu. Prosečan sadržaj celuloze u ćelijskim zidovima drvenastih biljaka je oko 50%. Celuloza se smatra najzastupljenijim organskim polimerom u prirodi sa procenjenom godišnjom produkcijom biomase od oko $1,5 \times 10^{12}$ tona (Klemm, 2005).

Hemiceluloze su polisaharidi varijabilnog sastava, izgrađene polimerizacijom različitih monosaharida. Sastoje se od ksilana koji je polimer molekula D-ksiloze povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ vezama, β glukana koji je polimer molekula D-glukoze povezanih $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ vezama, manana koji je polimer molekula D-manoze povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ vezama, a sadrže u svojoj strukturi i oligomere galaktoze, arabinoze, fukoze, glukuronske kiseline (Kameshwar i Qin, 2017). Hemiceluloze su blisko vezane za celulozu, čine deo matriksa oko snopova celuloze i imaju udeo od oko 20-30% u suvoj biljnoj biomasi (Kameshwar i Qin, 2017).

Pektini su polisaharidi varijabilnog sastava i strukture, njihova količina i sastav variraju kod različitih vrsta biljaka, kao i u zavisnosti od starosti i u različitim tkivima. Ključna komponenta od koje su izgrađeni je galakturonska kiselina.

Lignin je posle celuloze najzastupljeniji organski polimer na planeti (Lewis i Sarkanen, 1998). Oko 30% od ukupnog organskog ugljenika u biosferi nalazi se u polimerima lignina (Boerjan i sar., 2003). Lignin sačinjava oko 30% suve mase drveta, obavlja polisaharidne komponente ćelijskih zidova i štiti ih od mikrobijalne degradacije

(Anastasi i sar., 2013). Lignin predstavlja najveći izvor aromatičnih jedinjenja na planeti i smatra se da bi u budućnosti mogao postati primarni izvor za proizvodnju većine aromatičnih supstanci koje se danas industrijski dobijaju iz derivata nafte (Letourneau i Volmer, 2021).



Slika 3.1. – Hemijska struktura lignina¹

Lignin se može definisati kao razgranati kompleksni polimer velike molekulske mase izgrađen od fenilpropanskih jedinica povezanih alkil-aril etarskim vezama (Funaoka, 2013). Hemijska struktura lignina (Slika 3.1.) je izuzetno heterogena usled varijabilnosti u međusobnom povezivanju fenilpropanskih jedinica. Iako se odlikuje velikom heterogenošću sastava, lignin je u osnovi izgrađen od tri prekursora, a to su *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol (Carrier i sar., 2012) koji su derivati fenilpropana. Udeo ovih ligninskih monomera u sastavu lignina varira kod različitih

¹ Preuzeto iz Yost (2014).

biljaka. Biljke koje odlikuje “tvrdo drvo”, što je karakteristika većine drvenastih skrivenosemenica, u sastavu lignina imaju visok procenat koniferil i sinapil alkohola i vrlo malu količinu *p*-kumaril alkohola, dok biljke koje odlikuje “meko drvo”, kao što su četinari, u sastavu lignina imaju izuzetno visok udeo koniferil alkohola i mali procenat *p*-kumaril alkohola (Letourneau i Volmer, 2021).

Nema dovoljno podataka o strukturi i načinu povezivanja lignina sa polisaharidnim komponentama ćelijskih zidova u prirodnom stanju. Smatra se da je u nativnom stanju lignin daleko manje razgranat nego što se do sada mislilo i da se uglavnom sastoji od linearnih polimera (Yue i sar., 2016). U izolovanom stanju lignin je žuto-smeđe boje, vlaknaste strukture, nerastvorljiv u vodi ili alkoholu. To je izuzetno stabilan polimer i gljive izazivači bele truleži su jedini poznati organizmi u prirodi koji imaju sposobnost potpune mineralizacije lignina do ugljendioksida i vode (Blanchette, 1995, Dashtban i sar., 2010).

Sposobnost razgradnje lignocelulozne biomase ima veliki broj vrsta gljiva, kao i mnoge bakterije. Na osnovu preferencija prema supstratu na kom se razvijaju i karakterističnim tragovima koje ostavljaju na drvetu prilikom razgradnje, gljive drvorazgrađivači se mogu podeliti u tri grupe: gljive izazivači meke truleži, gljive izazivači smeđe truleži i gljive izazivači bele truleži (Kameshwar i Qin, 2016).

Gljive izazivači meke truleži obuhvataju vrste iz razdela Ascomycota, kao i brojne vrste koje su ranije klasifikovane u okviru razdela Deuteromycota. Razvijaju se najčešće na samoj površini drveta u uslovima visoke vlažnosti. Usled njihove aktivnosti na drvetu se pojavljuju smeđe fleke od nerazgrađenog lignina, pa na osnovu izgleda truleži nije ih lako razlikovati od gljiva izazivača smeđe truleži. Zahvaćena trula površina drveta je mekana, pa su po tome dobile ime, što možda nije najbolji izbor s obzirom na to da je trulež drveta mekana i kada je uzrokovana drvorazgrađujućim gljivama iz drugih grupa (Goodell i sar., 2008).

Gljive izazivači smeđe truleži čine svega oko 6% od svih poznatih drvorazgrađujućih vrsta gljiva i gotovo isključivo se razvijaju na četinarskom drveću (Hibbett i Donoghue, 2001). To su dominantne gljive drvorazgrađivači u ekosistemima borealnih četinarskih šuma (McFee i Stone 1966). Pripadaju razdelu Basidiomycota i oko 70% vrsta je iz reda Polyporales (Stamets, 2005). One su evolutivno mlađe od gljiva izazivača bele truleži i smatra se da su od njih i nastale tako što su u toku

evolucije izgubile gene za sintezu enzima koji su neophodni za razgradnju ligninskih komponenti drvene biomase (Arantes i Goodell, 2014).

Gljive izazivači smeđe truleži su jedini organizmi koji mogu gotovo u potpunosti da iz drveta uklone ugljene hidrate, odnosno celulozu, hemicelulozu i pektin, a bez značajnijih gubitaka lignina (Arantes i sar., 2012). Usled razgradnje polisaharidnih komponenti na drvetu se pojavljuju karakteristične smeđe mrlje i zone koje potiču od nerazgrađenog lignina, pa su po toj karakteristici i dobile ime.

Razgradnja drveta se odvija u dve faze. U prvoj fazi dolazi do ekstracelularne produkcije visoko reaktivnih hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) koji nasumično napadaju komponente lignoceluloznog ćelijskog zida izazivajući i modifikacije lignina i kidanje pojedinih lanaca celuloze. Usled toga se pojavljuju šupljine u strukturi ćelijskog zida i time se otvara pristup ekstracelularnim enzimima koji katalizuju razgradnju polisaharidnih komponenti u sledećoj fazi (Arantes i sar., 2012). Drvo zahvaćeno smeđom truleži (Slika 3.2.) već u inicijalnoj fazi gubi čvrstinu, a kasnije postaje smeđe, mekano, sa karakterističnim pukotinama i kubičnom strukturom i lako se drobi (Stamets, 2005).

Gljive izazivači bele truleži su ekofiziološka grupa koja obuhvata vrste iz razdela Basidiomycota i ovoj grupi pripada preko 90% drvorazgrađujućih gljiva ovog razdela (Tuomela i Hatakka, 2011). Manji broj vrsta razdela Ascomycota iz porodice Xylariaceae je često u literaturi grupisan među gljive izazivače bele truleži jer pokazuju izvesne sličnosti sa ovom grupom, pre svega u izgledu napadnutog drveta. Međutim, njihovi mehanizmi razgradnje lignocelulozne biomase su ipak sličniji gljivama izazivačima meke truleži (Daniel, 2016).

Gljive izazivači bele truleži su najveća i najznačajnija grupa drvorazgrađujućih gljiva. Odlikuju ih biorazgradivi sistemi koje čini set raznovrsnih enzima koji im omogućuju razgradnju svih komponenti lignocelulozne biomase, uključujući i lignin. Gljive izazivači bele truleži su posebno karakteristični kolonizatori “tvrđog drveta” skrivenosemenica, ali takođe mogu da razlažu i biomasu “mekog drveta” kojim se odlikuju četinarske vrste. Osim vrsta koje se tipično razvijaju na stablima drveća, gljivama izazivačima bele truleži pripada i većina bazidiomiceta koje se razvijaju u zemljištu i obavljaju razgradnju šumske stelje (Danijel, 2016).



Slika 3.2. – Smeđa trulež drveta²



Slika 3.3. – Bela trulež drveta³

Moguće je razlikovati dva obrazca razgradnje lignocelulozne biomase, pa se u skladu sa tim gljive izazivači bele truleži mogu grubo podeliti u dve grupe, jednu koja vrši selektivnu razgradnju i drugu koja obavlja simultanu razgradnju svih komponenti biomase (Goodell i sar, 2008). Vrste koje pripadaju grupi selektivnih razgrađivača prvo razgrađuju lignin i hemicelulozu, koja je u ovoj inicijalnoj fazi ključni izvor nutrijenata i energije potrebne za dalji proces razgradnje (Daniel, 2016). U ovoj fazi celuloza ostaje gotovo netaknuta. Na drvetu zahvaćenom ovim gljivama pojavljuju se tipične svetle zone, a u kasnijim fazama bele truleži zahvaćeni deo drveta je gotovo potpuno bele boje koja potiče od nerazgrađene celuloze, mekano je i ima vlaknastu strukturu (Slika 3.3.). Do razgradnje celuloze dolazi u završnoj fazi i time do potpune razgradnje biomase.

Kod vrsta koje obavljaju simultanu razgradnju istovremeno se razlažu sve komponente lignocelulozne biomase, pa iako se mogu pojavljivati svetlije zone na drvetu, ova dijagnostička karakteristika često izostaje i osim belih, mogu postojati i smeđe mrlje na zahvaćenom drvetu, u zavisnosti od procesa razgradnje koji dominira. Znatno je veći broj vrsta gljiva izazivača bele truleži koje obavljaju simultanu razgradnju lignocelulozne biomase.

Ovu podelu na dve grupe treba shvatiti uslovno, s obzirom na činjenicu da su gljive izazivači bele truleži izuzetno raznovrsne i da postoje raznovrsne strategije razgradnje drvene biomase u zavisnosti od lokalnih uslova sredine i genoma gljiva, pa tako neke vrste mogu na istom drvetu obavljati simultanu ili selektivnu razgradnju ili se one mogu naizmenično smenjivati (Daniel, 2016).

² Preuzeto sa <https://www.projectnoah.org/spotting/878936003> 09.05.2023.

³ Preuzeto sa <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/LECT10.HTM> 09.05.2023.

Kolonizacija drveta u početnoj fazi se ostvaruje u najvećoj meri razvojem i rastom hifa micelije gljiva kroz sržne zrake. Sržni zraci su većinom izgrađeni od parenhimskih ćelija, pružaju se od centra prema kori i imaju ulogu u transportu i razmeni vode i hranljivih materija između centralnog i perifernog dela stabla ka kori. Zato nije slučajno što su upravo ove strukture prve na udaru gljiva jer to omogućuje najlakši pristup vodi i u njoj rastvorenim nutrijentima. Usled ovakvog razvoja putem sržnih zraka gljive izazivači bele truleži veoma brzo kolonizuju dublje slojeve drveta. U nastavku kolonizacije hife micelija prodiru kroz jamice u ćelijskim zidovima i kroz prirodno prisutne šupljine u drvetu. Hife ispunjavaju lumen provodnih elemenata u drvetu i razgrađuju ćelijske zidove sa unutrašnje strane. Istovremeno se obrazuju i specijalizovane hife koje buše rupe u ćelijskim zidovima i omogućuju dalju kolonizaciju novih provodnih elemenata (Daniel, 2016).

Razgradnja lignocelulozne biomase se ostvaruje lučenjem brojnih i izuzetno raznovrsnih enzima. Gljive izazivači bele truleži, kao i sve druge vrste koje razgrađuju drvo, produkuju enzime za razgradnju celuloze. Celuloza je polisaharidna komponenta čija je razgradnja najjednostavnija i njena potpuna hidroliza ostvaruje se pomoću 3 enzima – endoglukanaze, egzoklukanaze i β -glukozidaze (Kameshwar i Qin, 2017). Endoglukanaze i egzoklukanaze hidrolizuju lance celuloze pri čemu nastaju oligosaharidi koje potom β -glukozidaze depolimerizuju do monomera glukoze.

Hemiceluloza i pektin odlikuju se heterogenim sastavom, pa je u skladu sa tim i potpuno očekivana produkcija raznovrsnijih enzima potrebnih za njihovu razgradnju. Za razgradnju hemiceluloze gljive produkuju enzime endoksilanaze, ksilobiohidrolaze, ksilozidaze, acetil ksilan esteraze, mananaze, manozidaze, glukuronidaze, arabinofuranozidaze, dok pektin razgrađuju enzimi endopoligalakturonaze, egzopoligalakturonaze, ksilogalakturonan hidrolaze, endoramnogalakturonaze, pektin lijaze i drugi (Goodell i sar, 2008; Kameshwar i Qin, 2017).

Ono po čemu se razlikuju gljive izazivači bele truleži od ostalih gljiva jeste sposobnost lučenja enzima koji mogu u potpunosti da razgrade lignin. Ti enzimi su lakaze i peroksidaze i sve gljive izazivači bele truleži luče jedan ili više enzima iz ove grupe (Goodell i sar, 2008).

Razvoj sposobnosti potpune mineralizacije lignocelulozne biomase predstavlja jednu od najvažnijih ekoloških inovacija u evoluciji gljiva. Ove gljive su se

najverovatnije pojavile pre oko 300 miliona godina (Floudas i sar., 2012). Lignin je glavni prekursor uglja i činjenica da pojava ovih gljiva koincidira sa krajem Karbona, perioda u kom su nastale najveće naslage uglja, upućuje na zaključak da su gljive izazivači bele truleži presudno uticale na globalni ciklus ugljenika (Nagy i sar., 2016). Malobrojne su naslage uglja iz perioda nakon Karbona, a potencijalni razlog može biti aktivnost gljiva izazivača bele truleži koje nisu dozvolile znatnije akumuliranje lignina.

Grupi gljiva izazivača bele truleži pripadaju mnoge dobro poznate jestive i lekovite vrste gljiva kao što su jablanovača (*Cyclocybe aegerita*), bukovača (*Pleurotus ostreatus*), šitake (*Lentinula edodes*), baršunasta panjevčica (*Flamulina velutipes*), hrastova sjajnica (*Ganoderma lucidum*), ćuranov rep (*Trametes versicolor*) i druge. Mnoge od ovih vrsta se komercijalno uzgajaju.

3.1. *Cyclocybe aegerita*, jablanovača

Cyclocybe aegerita (Slika 3.4.), jablanovača, je vrsta iz grupe gljiva izazivača bele truleži koja pripada porodici Strophariaceae iz reda Agaricales.



Slika 3.4. – *Cyclocybe aegerita*

Ova vrsta je prethodno bila poznata kao gotovo kosmopolitski rasprostranjena vrsta pod imenom *Agrocybe aegerita*, međutim novija genetička istraživanja dala su novi pogled na njen taksonomski status i areal rasprostranjenja. Nakon istraživanja koje su sprovedeli Vizzini i sar., (2014) utvrđeno je da *A. aegerita* nije u bliskom srodstvu sa tipskom vrstom tog roda *A. praecox* i zajedno sa još 4 vrste je prebačena u rod *Cyclocybe*. Istraživanjem genetičke varijabilnosti koje su sprovedeli Frings i sar. (2020) došlo se do saznanja da je *C. aegerita* u svom rasprostranjenju ograničena isključivo na evropski kontinent, dok populacije sa područja Azije i iz oblasti Pacifika pripadaju drugoj vrsti, a moguće je da je u pitanju i čitav kompleks još uvek neopisanih vrsta.

C. aegerita najčešće raste na živom ili mrtvom drveću iz rodova *Populus* sp. i *Salix* sp., odnosno na različitim vrstama topola i vrba, ali se može javiti i na drugim listopadnim vrstama drveća (Uhart i Albertó, 2007). Najčešće se javlja na panjevima ili korenovima, ređe na gornjim delovima stabla, obično na mestu grananja ili na mestu povrede. Sporokarpi se pojavljuju u busenovima od ranog proleća do jeseni.

Klobuk sporokarpa je od 3 do 10cm u prečniku, ponekad može biti i većih dimenzija, široko otvoren i gotovo ravan ili blago ispupčen u sredini, donekle valovitih ivica, sa glatkom površinom i često prisutnim udubljenjima oblika kapljica. U središnjem delu tamno smeđe boje, a ka ivicama svetliji, na samom obodu sasvim svetložute boje. Klobuk je dosta mesnat, na preseku beo i ne menja boju. Sa donje strane klobuka je lisnati himenofor sa mnogobrojnim, gustim, u početku belim do svetlosivim, a kasnije tamnosmeđim listićima. Stručak je od 3 do 15cm visine i oko 1 do 2cm debljine, cilindričan, ispunjen, vlaknast, bele boje ili ponekad sasvim svetlosmeđe boje od rasutih spora. U gornjem delu ima nepomični membranozni prsten.

Jablanovača je izuzetno cenjena jestiva gljiva vrhunskog kvaliteta i komercijalno se uzgaja u mnogim delovima sveta. U mediteranskom području se uzgajala još u doba starog Rima. Ima i lekovita svojstva i koristi se kao diuretik u tradicionalnoj kineskoj medicini. Komercijalna proizvodnja ove vrste u Republici Srbiji ne postoji.

Mikoremedijacioni potencijali ove vrste nisu tako ekstenzivno ispitivani kao u slučaju *P. chryso sporium*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*, ili nekih drugih vrsta, ali rezultati sprovedenih istraživanja pokazuju da može uspešno da razlaže neke policiklične aromatične ugljovodonike manje molekulske mase (Vipotnik i sar., 2021; Vipotnik i sar., 2022).

Analizom genoma vrste *C. aegerita* utvrđeno je prisustvo 14 gena za sintezu enzima lakaza (Gupta i sar., 2018). Osim lakaza, ova gljiva produkuje i 5 peroksidaza, od kojih su 4 mangan peroksidaze (Liang i sar., 2020). Pored klasičnih ligninolitičkih peroksidaza, kod *C. aegerita* je otkriven novi tip enzima peroksidaza – nespecifična peroksigenaza (Kinne i sar., 2010). Ovaj enzim vrši oksidaciju različitih aromatičnih, alifatičnih i heterocikličnih organskih jedinjenja prenosom jednog atoma kiseonika sa peroksida. Poznato je preko 350 različitih organskih jedinjenja koja mogu biti supstrat ovog enzima, uključujući i 35 od 40 prioriternih organskih zagađujućih materija sa liste Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (Hofrichter i sar., 2020). Utvrđeno je postojanje 6 formi ovog enzima kod *C. aegerita*, a naknadnim istraživanjima ovaj enzim je otkriven kod mnogih drugih vrsta širom carstva gljiva. Široka rasprostranjenost kod ekološki veoma različitih vrsta gljiva ukazuje na neku važnu ulogu ovih enzima. Međutim, o funkciji ovih enzima i njihovom značaju u prirodi se još uvek ne zna gotovo ništa (Hofrichter i sar., 2020).

3.2. *Pleurotus ostreatus*, bukovača

Pleurotus ostreatus (Slika 3.5.), bukovača, je vrsta iz grupe gljiva izazivača bele truleži koja pripada porodici Pleurotaceae iz reda Agaricales. To je gotovo kosmopolitski rasprostranjena vrsta, areal rasprostranjenja obuhvata pre svega umerene i subtropske oblasti. Razvija se na širokolisnim listopadnim vrstama koje se odlikuju tvrdim drvetom, pre svega na bukvi, ali i na velikom broju drugih vrsta kao što su divlji kesten, hrast, javor, grab, vrba, topola, itd. *P. ostreatus* se najčešće razvija na mrtvom ili umirućem drveću. To je primarno saprofitska vrsta, ali može biti fakultativni parazit živih, obično već oslabljenih stabala.

Interesantan je podatak da je *P. ostreatus* jedna od oko 700 vrsta nematofagnih vrsta gljiva, odnosno vrsta koje se hrane valjkastim crvima iz grupe nematoda (Marlin i sar., 2019). Micelija produkuje mehuriće sa nematoksinom – trans-2-decenoinskom kiselinom u uslovima smanjene dostupnosti azotnih jedinjenja. Nakon kontakta sa ovim strukturama, nematode ostaju paralisane za svega par minuta (Satou i sar., 2008). Micelija gljive potom kolonizuje i svojim enzimima razlaže telo nematode koje predstavlja važan dodatni izvor azotnih jedinjenja (Marlin i sar., 2019).



Slika 3.5. – *Pleurotus ostreatus*⁴

Sporokarpi bukovače se u nekim oblastima mogu pojavljivati u bilo kom periodu godine, ali najčešće od kraja jeseni do ranog proleća. Pojavljuju se u busenovima. Klobuk je u početku jezičastog, a kasnije polukružnog oblika, u prečniku od 5 do 25cm, sa gornje strane gladak i sjajan. Ivice klobuka su valovite, ponekad reznjevite, kod mladih primeraka blago uvijene, a sa rastom se postepeno otvaraju. Sa gornje strane klobuk je od svetlo sive do tamno sivosmeđe boje, koja varira u zavisnosti od temperature. Na nižim temperaturama obojenost klobuka je intenzivnija. Na donjoj strani klobuka nalaze se beli listići himenofora, gusto zbijeni, koji se granaju ka obodu klobuka i spuštaju niz stručak. Prah spora je bele boje. Stručak je često rudimentaran, postavljen ekscentrično, 1-4cm visine i 1-3cm širine.

Bukovača je cenjena jestiva gljiva, koja osim velikih nutritivnih vrednosti ima i lekovita svojstva, pozitivno utiče na nivo holesterola u krvi i produkuje bioaktivne molekule sa antitumorskim svojstvima (Fernández-Fueyo i sar., 2014). Bukovača je, posle šampinjona, gljiva sa najvećom proizvodnjom u svetu (Sánchez, 2010). Udeo bukovače u proizvodnji jestivih gljiva je oko 25% sa proizvodnjom od oko 3 miliona tona godišnje (Fernández-Fueyo i sar., 2014).

⁴ Preuzeto sa <https://www.hobbyfarms.com/grow-your-own-oyster-mushrooms-for-flavor-profit/> 09.05.2023.

P. ostreatus je jedna od najistraživanijih gljiva kada je reč o istraživanjima njenih mikoremedijacionih potencijala. Sprovedeno je nebrojeno mnogo studija u kojima je ova vrsta pokazala sposobnost razgradnje izuzetno raznovrsnih zagađujućih materija uključujući i neke koje su izuzetno toksične i perzistentne, kao što su dioksini, polihlorovani bifenili, policiklični aromatični ugljovodonici, industrijske boje, različiti pesticidi, itd.

Sposobnost razgradnje ovih zagađujućih materija počiva na produkciji ligninolitičkih enzima lakaza i peroksidaza. Analizom genoma utvrđeno je postojanje 12 gena koji kodiraju sintezu enzima lakaza (Janusz i sar., 2013; Jiao i sar., 2018), a 6 različitih izoenzima lakaza je izolovano i okarakterisano do danas (Pezzella i sar., 2013). Od enzima iz grupe peroksidaza *P. ostreatus* produkuje 6 mangan peroksidaza i 3 verzatilne peroksidaze (Fernández-Fueyo i sar., 2014).

4. LIGNINOLITIČKI ENZIMI GLJIVA IZAZIVAČA BELE TRULEŽI

Za razliku od polisaharidnih komponenti lignocelulozne biomase koje mogu da razgrade sve gljive drvorazgrađivači, lignin je znatno kompleksniji i stabilniji polimer koji mogu u potpunosti da razgrađuju samo gljive izazivači bele truleži (Daniel, 2016). Ta njihova sposobnost razgradnje ligninskih polimera počiva na sintezi ekstracelularnih ligninolitičkih enzima. Potpuna mineralizacija lignina do ugljen-dioksida i vode se ostvaruje brojnim oksidacionim reakcijama koje katalizuju dve grupe ligninolitičkih enzima – lakaze i peroksidaze. Lakaze su enzimi oksidoreduktaze koje vrše oksidaciju supstrata koristeći molekularni kiseonik O_2 kao akceptor elektrona, pri čemu se on redukuje do vode, H_2O (Cañas i Camarero, 2010). Peroksidaze su hemni proteini koji katalizuju oksidaciju različitih supstrata koristeći vodonik-peroksid, H_2O_2 , kao akceptor elektrona. Kod gljiva izazivača bele truleži postoje tri glavne grupe ovih enzima, a to su lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i verzatilne peroksidaze (Kellner i sar., 2014). Pored ovih enzima, u procesu razgradnje lignina gljive sintetišu i brojne druge enzime koji imaju ulogu u produkciji peroksida, različitih intermedijera i slobodnih readikala koji podržavaju funkciju ključnih ligninolitičkih enzima.

Sve gljive izazivači bele truleži produkuju jednu ili više vrsta ligninolitičkih enzima (Goodell i sar, 2008). Kod vrsta koje produkuju više vrsta enzima postoje varijacije u produkciji enzima usled lokalnih uslova sredine i sastava supstrata, a produkcija se može menjati sa protokom vremena degradacije. Tako, na primer, *Ganoderma lucidum* produkuje mangan peroksidaze kada se razvija na tvrdom drvetu topole, ali ih ne produkuje kada se razvija na mekom drvetu borova (D'Souza i sar., 1999). Ovo ukazuje na postojanje različitih strategija razgradnje ligninskih komponenti. Međutim, različite kombinacije produkcije ligninolitičkih enzima mogu podjednako efikasno da vrše razgradnju lignina, što ukazuje na nespecifičnu aktivnost ovih enzima. Zajednička karakteristika svih ligninolitičkih enzima je da mogu da produkuju slobodne radikale od različitih molekula male molekulske mase koji su ili produkti degradacije lignina ili produkti metabolizma samih gljiva. Ovi visoko reaktivni radikali potom prodiru kroz ćelijski zid i vrše nasumične oksidacije različitih ligninskih komponenti. Upravo ovaj mehanizam delovanja enzima preko stvaranja slobodnih radikala

predstavlja objašnjenje za izuzetnu nespecifičnost aktivnosti ligninolitičkih enzima. Usled nespecifične aktivnosti ovi enzimi mogu da katalizuju oksidacije izuzetno širokog spektra organskih jedinjenja, uključujući i ona čija je struktura samo delimično slična ligninskim komponentama (Anastasi i sar., 2013; Gao i sar., 2010). Toj grupi pripadaju i brojne zagađujuće organske materije kao što su policiklični aromatični ugljovodonici, dioksini, polihlorovani bifenili i slično.

Sposobnost razgradnje različitih toksičnih i perzistentnih organskih polutanata privukla je veliku pažnju naučne javnosti. Urađene su brojne studije koje su imale za cilj da okarakterišu ove enzime, ispituju njihovu aktivnost i utvrde optimalne uslove njihovog delovanja. Ligninolitički enzimi gljiva izazivača bele truleži i mehanizmi njihovog delovanja su daleko bolje proučeni u odnosu na druge enzime uključene u razgradnju lignocelulozne biomase i enzime koje proizvode druge grupe gljiva.

4.1. Lakaza

Lakaze su glikoproteini velike molekulske mase, u proseku od 60 do 80kDa i optimalna pH vrednost njihove aktivnosti varira u opsegu od 3 do 5,7 (Singh, 2006). Lakaze gljiva su metaloenzimi koji u svom katalitičkom centru imaju 4 atoma bakra (Lundell i sar., 2010). Ovi enzimi katalizuju reakcije oksidacije različitih fenolnih jedinjenja i drugih supstrata sa niskim redoks potencijalom, oduzimajući im jedan elektron koji prenose na molekularni kiseonik. Za redukciju jednog molekula kiseonika do vode potreban je prenos 4 elektrona sa enzima, odnosno oksidacija 4 molekula supstrata, nakon čega se enzim vraća u prvobitno stanje (Lundell i sar., 2010).

Usled relativno niskog redoks potencijala (Uzan i sar., 2010), lakaze mogu direktno da oksiduju samo fenolne komponente lignina, koje u strukturi lignina učestvuju sa 15 do 20% (Barreca i sar., 2003). Zbog toga se smatralo da imaju skromnu ulogu u razgradnji lignina i da potpuna depolimerizacija lignina pomoću ovih enzima nije moguća. Međutim, utvrđeno je da vrsta *Pycnoporus cinnabarinus* može efikasno i u potpunosti da depolimerizuje nefenolne komponente lignina, iako je poznato da od ligninolitičkih enzima proizvode samo lakaze i ne proizvode ni jedan enzim iz grupe peroksidaza (Eggert i sar., 1996). Razgradnja nefenolnih komponenti lignina pomoću lakaze je moguća preko redoks medijatora. To su uglavnom fenolna jedinjenja male

molekulske mase kao što su *p*-hidroksicinaminske kiseline koje su prirodno prisutne u biljnom materijalu ili fenolni aldehidi, ketoni i kiseline koje nastaju kao degradacioni produkti lignina oksidacijom fenilpropanskih monomera (Cañas i Camarero, 2010). Na taj način, produkti direktne katalitičke aktivnosti lakaze, postaju medijatori koji proširuju dejstvo ovog enzima na ligninske komponente koje ne može direktno da oksiduje. Osim izuzetne nespecificnosti prema supstratu, druga svojstva ovih enzima koja su od značaja za njihovu primenu u različitim biotehnologijama su njihova velika stabilnost, činjenica da su to ekstracelularni enzimi, što olakšava procedure njihovog prečišćavanja, a posebno činjenica da je za njihovu aktivnost potreban samo kiseonik koji je prisutan u životnoj sredini i da nije potrebno obezbeđivati kofaktore poput peroksida, čiji je konstantan priliv neophodan za aktivnost peroksidaza (Baldrian, 2006). Neki od primera uspešne primene ovih enzima su razgradnja fenolnih jedinjenja iz vina i alkoholnih pića, razgradnja industrijskih boja u otpadnim vodama tekstilne industrije, izbeljivanje i uklanjanje lignina iz drvenih vlakana (Lundell i sar., 2010).

Lakaze su enzimi koji su izuzetno široko zastupljeni u živom svetu. Produkuju ih gotovo sve vrste gljiva izazivača bele truleži, a produkuju ih i mnoge vrste gljiva iz grupe Ascomycota i Deuteromycota (Singh, 2006). Lakaze produkuju i više biljke kod kojih ovi enzimi imaju ulogu u sintezi lignina (Boudet, 2000). Produkcija lakaza je registrovana i kod nekih bakterija (Baldrian, 2006). Primarna uloga lakaza kod gljiva je razlaganje lignina, ali imaju ulogu i u regulaciji interakcija domaćin-patogen, sintezi pigmenata, odgovoru na stres, detoksifikaciji, regulaciji faza životnog ciklusa, produkciji sporokarpa i sporulaciji (Baldrian, 2006; Singh, 2006). Jedna od lakaza vrste *Pleurotus ostreatus* označena kao LACC10 izgleda da ima značajnu ulogu u vegetativnom rastu gljive, sintetiše se samo u vegetativnoj fazi, a sinteza se prekida kada gljiva počinje da obrazuje sporokarpe (Pezzella i sar., 2013).

4.2. Lignin peroksidaza

Lignin peroksidaze su prvobitno otkrivene kod vrste *Phanerochaete chrysosporium*. Naknadnim istraživanjima je otkriveno da ova vrsta može da produkuje i do 15 različitih formi ovog enzima u zavisnosti od soja, starosti kulture, sastava medijuma i uslova kultivacije (Singh, 2006).

Lignin peroksidaze su glikozilovani hem proteini znatno manjih molekulskih masa u odnosu na lakaze, u proseku oko 40kDa. Optimalna pH vrednost za njihovu aktivnost je od 2,5 do 3,0 (Singh, 2006). U svojoj strukturi imaju hem (protoporfirin IX) kao prostetičku grupu (Lundell i sar., 2010). Enzim u stanju mirovanja ima u prostetičkoj grupi Fe^{3+} katjon. Reakcija oksidacije supstrata koju katalizuje ovaj enzim se odvija u 3 koraka. Reakcija je inicirana peroksidom, H_2O_2 koji se vezuje za enzim. Nakon toga dolazi do raskidanja O-O veze u peroksidu, za šta je neophodan transfer dva elektrona sa prostetičke grupe enzima pri čemu dolazi do nastanka intermedijera - kompleks I (Fe^{4+} -okso-porfirin-radikal kompleks). U sledećem koraku dolazi do redukcije ovog kompleksa I prenosom jednog elektrona sa jednog molekula supstrata, pri čemu nastaje kompleks II, (Fe^{4+} -okso-porfirin kompleks) koji se u finalnom koraku redukuje prenosom još jednog elektrona sa istog ili novog molekula supstrata. Enzim se tako vraća u prvobitno stanje, uz produkciju dva oksidovana molekula supstrata i dva molekula vode (Hofrichter, 2002).

Prostetička grupa lignin peroksidaze se nalazi duboko u središtu enzima i komunicira sa spoljašnjom sredinom preko izuzetno uzanog kanala, pa je usled toga pristup supstrata hemu onemogućen. Detaljnim analizama strukture enzima je utvrđeno prisustvo hidroksilovanog triptofana na poziciji 171 koji ima ulogu u vezivanju supstrata i transferu elektrona preko druge aminokiseline do hema (Piontek i sar., 2001).

Tipičan supstrat lignin peroksidaze je veratril alkohol, koji se proizvodi kao derivat sekundarnog metabolizma gljiva (Faison i sar., 1986). Ovo jedinjenje, putem mehanizma produkcije slobodnih radikala, može služiti kao medijator oksidacije ligninskih komponenti koje inače nisu supstrat lignin peroksidaze. Uloga visoko reaktivnih slobodnih radikala u razgradnji lignina je od presudnog značaja, s obzirom na činjenicu da su svi ligninolitički enzimi, pa i lignin peroksidaza, krupni proteini koji ne mogu da prolaze kroz pore ćelijskih zidova usled čega im je jako limitiran direktan kontakt sa komponentama lignina koje im mogu biti odgovarajući supstrat (Anastasi i sar., 2013). Za kontinuiranu aktivnost lignin peroksidaze, kao i svih drugih peroksidaza, neophodno je kontinuirano snabdevanje peroksidom. Gljive sintetišu više vrsta enzima koji proizvode H_2O_2 , kao što su glukozna oksidaza, glioksal oksidaza i arilalkohol oksidaza i tako podržavaju aktivnost peroksidaza (ten Have i Teunissen, 2001).

Lignin peroksidaza je enzim koji ima visok redoks potencijal i može da oksiduje nefenolna i fenolna aromatična jedinjenja (Wong, 2009). Usled male specifičnosti prema supstratu, lignin peroksidaza može da razloži izuzetno raznovrsne komponente lignina, katalizuje raskidanje veza β -O-4, C_{α} - C_{β} , raskidanje veza bočnih lanaca, reakcije otvaranja prstenova, demetoksilacije i oksidativne dehlorinacije (Singh, 2006). Oko 50 do 60% hemijskih veza u ligninu je podložno razgradnji od strane lignin peroksidaze (ten Have i Teunissen, 2001). Uzevši ovo u obzir, kao i činjenicu da većina gljiva izazivača bele truleži produkuje lignin peroksidaze, jasno je da se ovaj enzim smatra ključnim za proces razgradnje lignina. Međutim, danas je poznato da sve ligninske komponente mogu efikasno da razgrade i gljive izazivači bele truleži koje ne produkuju ovaj enzim, poput vrste *Pleurotus ostreatus* ili *Pycnoporus cinnabarinus*.

4.3. Mangan peroksidaza

Otkriće lignin peroksidaze kod vrste *Phanerochaete chrysosporium* podstaklo je potragu za drugim sličnim ligninolitičkim enzimima gljiva. Ubrzo je kod iste vrste otkriven nov enzim – mangan peroksidaza (ten Have i Teunissen, 2001).

Mangan peroksidaze su glikoproteini koji, kao i lignin peroksidaza, imaju u svojoj strukturi hem kao prostetičku grupu. Dimenzije ovih enzima variraju u opsegu od 38 do 62,5kDa, a u proseku su oko 45kDa (Hatakka, 1994). Mehanizam katalitičke aktivnosti ovih enzima je veoma sličan mehanizmu lignin peroksidaze. Za inicijaciju reakcije je neophodno prisustvo H_2O_2 . Ključna razlika u odnosu na mehanizam katalitičke aktivnosti lignin peroksidaze je u redukciji kompleksa I i II. Za redukciju kompleksa I i II, da bi se enzim vratio u nativno stanje, apsolutno je neophodno prisustvo Mn^{2+} katjona. U finalnom koraku kompleks II se redukuje prenosom elektrona sa Mn^{2+} katjona koji prelazi u Mn^{3+} . Kompleks I, osim Mn^{2+} katjona, mogu da redukuju i neka fenolna jedinjenja, ali za redukciju kompleksa II i završetak katalitičkog ciklusa je neophodan Mn^{2+} katjon (Hofrichter, 2002). Aktivnost ovih peroksidaza je prema tome zavisna od prisustva Mn^{2+} katjona, pa su po tome i dobile ime. Nedostatak ovih jona mangana bi predstavljao limitirajući faktor aktivnosti ovih enzima, ali se to u prirodnim uslovima gotovo nikada ne događa, s obzirom da su ovi joni prisutni u značajnim koncentracijama u lignoceluloznoj biomasi i u zemljištu (Singh, 2006).

Mangan peroksidaze imaju niži redoks potencijal u odnosu na lignin peroksidaze i u skladu sa tim uži spektar jedinjenja čiju oksidaciju mogu da katalizuju. Mogu direktno da oksiduju fenolne (Anastasi i sar., 2013), ali ne mogu direktno da oksiduju nefenolne aromatične strukture lignina (Piontek i sar., 2001). Katjoni Mn^{3+} , koji nastaju kao proizvod katalitičke aktivnosti mangan peroksidaza, stabilizuju se građenjem helata sa različitim organskim kiselinama, poput oksalne kiseline, koje su derivati metabolizma gljiva. Ovi helati male molekulske mase difunduju kroz ćelijski zid i funkcionišu kao visoko reaktivni redoks medijatori koji nespecifično napadaju i oksiduju različite komponente lignina (Hofrichter, 2002).

Mesto vezivanja supstrata kod mangan peroksidaze se nalazi blizu prostetičke grupe, pa je moguć direktan transfer elektrona (Martínez i sar., 2005). Ovo mesto vezivanja supstrata čine 3 aminokiseline, dve glutaminske kiseline Glu35 i Glu39 i asparaginska kiselina Asp 179 (ten Have i Teunissen, 2001).

Produkcija mangan peroksidaza je poznata samo kod nekih grupa gljiva iz razdela Basidiomycota. Mangan peroksidaze proizvode gotovo sve gljiva izazivača bele truleži i mnoge vrste koje obavljaju razgradnju opalog lišća i šumske stelje (Hofrichter, 2002).

4.4. Verzatilna peroksidaza

Verzatilna peroksidaza je enzim koji je prvi put otkriven kod vrste *Pleurotus eryngii* (Martínez i sar., 1996). Kasnije je pronađen i kod nekih drugih vrsta gljiva izazivača bele truleži. Verzatilne peroksidaze su glikoproteini sa hemom kao prostetičkom grupom i za njihovu katalitičku aktivnost je kao i u slučaju drugih peroksidaza neophodno prisustvo H_2O_2 . Njihov mehanizam katalitičke aktivnosti je takođe sličan mehanizmu drugih peroksidaza. Suštinski, verzatilne peroksidaze se mogu opisati kao hibridni enzimi mangan peroksidaze i lignin peroksidaze. Njihova molekularna arhitektura kombinuje karakteristike ova druga dva enzima (Fisher i Fong, 2014; Pérez-Boada i sar., 2005) i one u svojoj strukturi poseduju oba mesta vezivanja supstrata, jedno u blizini prostetičke grupe kao kod mangan peroksidaze i drugo na površini enzima sa hidrosilovanim triptofanom preko kojeg se ostvaruje prenos elektrona od prostetičke grupe preko lanca aminokiselina (Martínez i sar., 2005).

5. PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije su autohtone vrste gljiva izazivača bele truleži. Za potrebe istraživanja nabavljene su micelije sedam vrsta gljiva poreklom iz ravničarskih šuma Republike Srbije - *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* i *Trametes versicolor*. Sa ovim vrstama su urađeni probni testovi u kojima je praćen rast i razvoj micelija i produkcija ligninolitičkih enzima na različitim hranljivim podlogama. Nakon ovih preliminarnih ispitivanja selektovane su dve ekološki različite vrste za potrebe istraživanja ove doktorske disertacije, a to su jablanovača, *Cyclocybe aegerita*, vrsta koja se najčešće javlja na determinisanim supstratima – na drveću iz rodova *Populus sp.* ili *Salix sp.* i ima ograničeno rasprostranjenje i bukovača, *Pleurotus ostreatus*, koja je kosmopolitski rasprostranjena i može biti nađena na različitim supstratima. Ove dve vrste u prirodi mogu deliti stanište, pa se postavlja pitanje delinacije njihovih ekoloških niša, naročito u pogledu sistema za razgradnju lignina.

U fokusu istraživanja ove doktorske disertacije bile su pre svega autohtone vrste gljiva izazivača bele truleži. Na osnovu pregleda dostupne literature može se izvući zaključak da su istraživanja u oblasti mikoremedijacije, a posebno mikoremedijacionih potencijala autohtonih vrsta gljiva u Republici Srbiji malobrojna, pa se ova istraživanja mogu smatrati pionirskim.

Eksperimentalnim ispitivanjima sprovedenim pri izradi doktorske disertacije dobijeni su rezultati koji verifikuju i proširuju dosadašnja saznanja o enzimatskim sistemima gljiva koji su uključeni u razgradnju lignocelulozne biomase, a posebno razumevanju enzimatskih sistema autohtonih vrsta gljiva uključenih u razgradnju lignina i razvoju mikoremedijacije kao inovativne biotehnologije. Rezultati do kojih se došlo u toku istraživanja predstavljaju osnovu za dalja istraživanja u ovoj oblasti i potencijalno za razvoj modela i protokola koji se mogu primeniti u praksi za rešavanje određenih problema u životnoj sredini.

5.1. Ciljevi istraživanja

Mikoremedijacija je biotehnologija koja ima za cilj saniranje zagađenja u medijumima životne sredine upotrebom gljiva i počiva na produkciji efikasnih enzima od strane tih gljiva. Prilikom definisanja bilo kog mikoremedijacionog projekta, pored karakterizacije zagađujućih materija i drugih parametara od značaja za uspešnost procesa, neophodno je napraviti i odgovarajuću selekciju gljiva koje će se koristiti u tom procesu, a koje imaju sposobnost produkcije efikasnih enzima. Cilj istraživanja ove doktorske disertacije nije bio realizacija nekog konkretnog mikoremedijacionog projekta, već ispitivanje da li odabrane autohtone vrste gljiva produkuju efikasne enzime i u skladu sa tim, da li imaju potencijal za korišćenje u procesima mikoremedijacije.

Prilikom formulisanja teme i predmeta istraživanja doktorske disertacije definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Molekularna determinacija autohtonih drvorazgrađujućih vrsta gljiva koje potiču iz ravničarskih šuma Srbije;
2. Determinacija uslova pod kojima izolovane micelije gljiva uspešno rastu na čvrstim i tečnim eksperimentalnim podlogama;
3. Determinacija uslova pod kojima micelije istraživanih vrsta gljiva izazivača bele truleži produkuju efikasne enzime koji su uključeni u razgradnju biljne biomase u prisustvu različitih komponenti biomase različitih vrsta drvenastih biljaka;
4. Ispitivanje mogućnosti da se ovi protokoli primene u praksi;
5. Konačni cilj je procena mikoremedijacionih potencijala odabranih autohtonih vrsta gljiva izazivača bele truleži.

5.2. Hipotetički okvir istraživanja

Generalna hipoteza:

Vrste gljiva izazivača bele truleži koje će biti predmet istraživanja doktorske disertacije će posedovati enzimske sisteme za razlaganje lignocelulozne biomase koji će moći da se primenjuju u mikoremedijacionim procesima.

Posebne hipoteze:

1. Enzimski sistemi različitih gljiva izazivača bele truleži će se razlikovati kvalitativno, kao i po svojoj efikasnosti.
2. Produkcija enzima će zavisiti od sastava eksperimentalnih medijuma na kojima gljive izazivači bele truleži budu rasle.
3. Ispitivane vrste gljiva će moći u praksi da se koriste za eliminaciju različitih organskih jedinjenja i polutanata.

6. MATERIJAL I METODE

6.1. Umnožavanje i održavanje kultura micelija gljiva

Za potrebe istraživanja i eksperimentalnih ispitivanja u cilju izrade ove doktorske disertacije nabavljene su micelije sedam vrsta gljiva izazivača bele truleži. Sve micelije su izolovane iz sporokarpa sakupljenih u lokalnim šumama iz okoline Bele Crkve. To su micelije sledećih vrsta gljiva:

1. *Cyclocybe (Agrocybe) aegerita* (V. Brig.) Vizzini (2014)
2. *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (1951)
3. *Ganoderma lucidum* Karst (1881)
4. *Ganoderma resinaceum* Boud., (1889)
5. *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. (1825)
6. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P.Kumm. (1871)
7. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920)

Kulture izolovanih micelija gljiva su umnožavane i održavane u petri kutijama na čvrstom medijumu od sladnog agara koji je pripreman prema sledećem protokolu:

- 30g ekstrakta slada (malt extract);
- 5g mikološkog peptona;
- 15g agara;
- 1000ml destilovane vode.

Ekstrakt slada, pepton i agar su rastvoreni u destilovanoj vodi, dobijeni rastvor je mešan na magnetnoj mešalici do potpunog rastvaranja svih sastojaka, a potom je pripremljenom medijumu podešena pH vrednost na 5,5. Nakon toga medijum je sterilisan u autoklavu na 114°C u trajanju od 30min. Vreli medijum je razlivan u plastične petri kutije prečnika 10cm u količini od 15ml medijuma po petri kutiji u sterilnim uslovima u laminarnoj komori. Ohlađeni čvrsti medijum je u laminarnoj komori inokulisan micelijama gljiva sa po 3 plaga micelije prečnika 1cm. Kulture micelija su inkubirane na sobnoj temperaturi (Slika 6.1.). U cilju održavanja kultura micelija vršeno je njihovo redovno prenošenje na nove sterilne podloge svakih 30 dana.

a)



b)



Slika 6.1. – Micelije gljiva u petrijevim kutijama na čvrstoj podlozi od sladnog agara stare 15 dana – a) *Pleurotus ostreatus*, b) *Cyclocybe aegerita*.

Deo kultura micelija je održavan i na kosom sladnom agaru koji je pripremljen prema istom protokolu i izliven u staklene vijale zapremine 20ml. Ovaj medijum je inokulisan sa po jednim plagom micelije. Nakon inicijalne inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana, ove kulture micelija su prebačene u frižider gde su čuvane na temperaturi od +4°C. Prednost ovakvog čuvanja kultura micelija na niskoj temperaturi je u tome što se ove kulture bez prenošenja na svežu podlogu mogu održavati i duže od šest meseci.

U toku istraživanja isprobane su i druge vrste medijuma za uzgoj micelija, kao što su tečni medijum od ekstrakta slada i čvrsta PDA podloga (Potato Dextrose Agar). Tečni medijum od ekstrakta slada sadržao je 15g/l ekstrakta slada i 5g/l peptona. Tečni medijum je izliven u erlenmajere zapremine 100ml u količini od 50ml. Nakon sterilizacije u autoklavu na 114°C u trajanju od 30min i hlađenja, vršena je inokulacija medijuma sa po 3 plaga micelije prečnika 1cm u laminarnoj komori. Gotova PDA podloga proizvođača Biolife Italiana je pripremana u skladu sa uputstvom. Nakon sterilizacije u autoklavu, izlivana je u petri kutije Ø10cm u laminarnoj komori i inokulisana sa po 3 plaga micelije.

Kulture micelija gljiva koje su nabavljene za potrebe istraživanja ove doktorske disertacije se čuvaju na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu i koriste se u drugim istraživanjima i koristiće se u istraživanjima budućih naučno-istraživačkih projekata.

6.2. Izolacija, umnožavanje i sekvenciranje DNK gljiva

U cilju potvrde taksonomskog statusa gljiva urađena je izolacija DNK iz micelija. Za izolovanje DNK iz micelija gljiva korišćen je DNeasy Kit (Qiagen), a izolacija je izvršena prema protokolu koji je sastavni deo ovog kita. Izolovana DNK je umnožavana PCR metodom korišćenjem standardnih prajmera za gljive – ITS1F i ITS4, primenom standardnog protokola (Gardes and Bruns, 1993). Produkti PCR umnožavanja DNK poslani su u Beč (Microsyth) na sekvenciranje. Dobijene sekvence su upoređene sa postojećim sekvencama u bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije, NCBI (engl. National Center for Biotechnology Information).

6.3. Supstrati

6.3.1. Piljevina

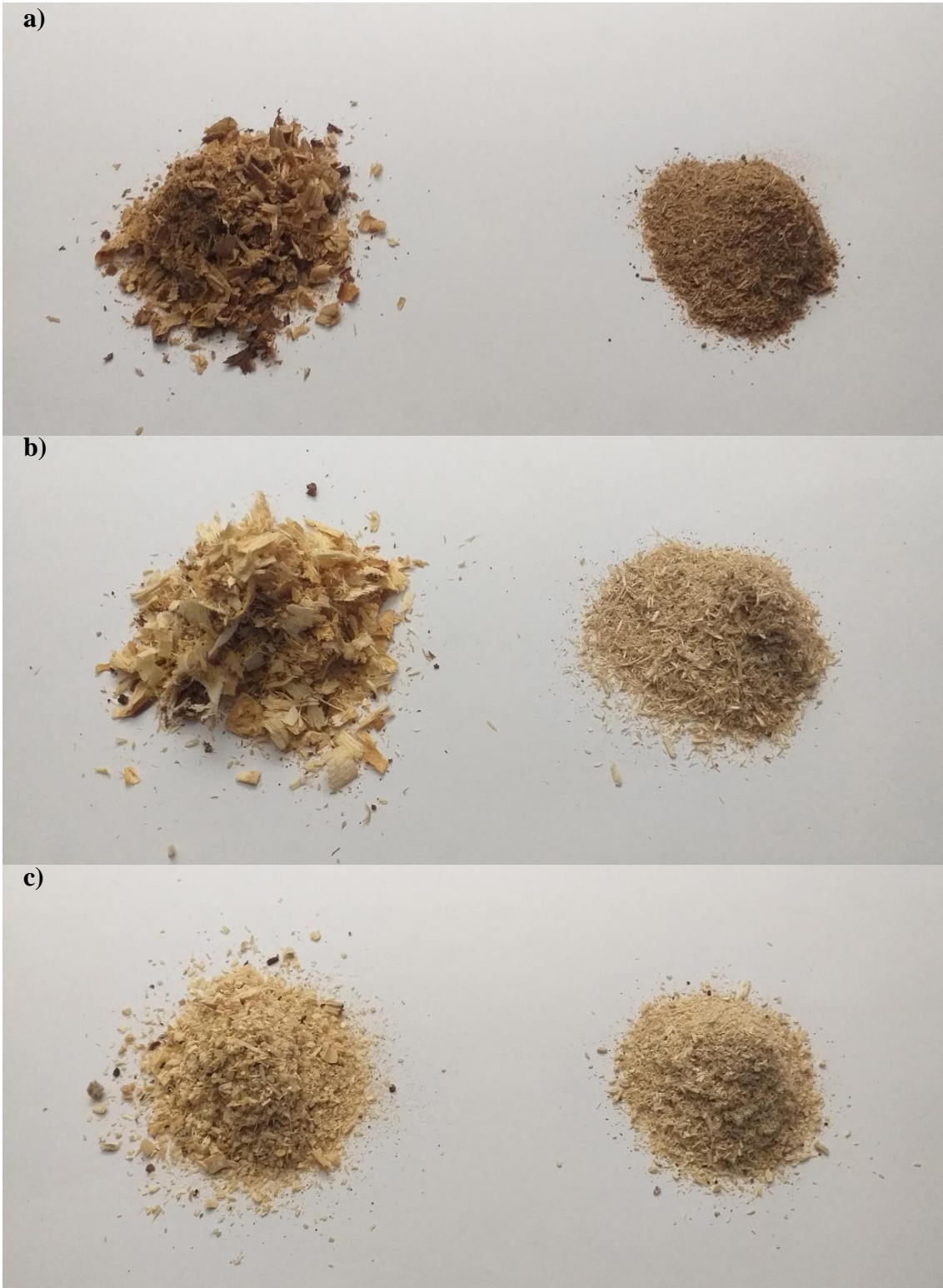
U eksperimentalnim ispitivanjima korišćena je piljevina od tri vrste drveta:

- Cer, *Quercus cerris* L.
- Bela topola, *Populus alba* L.
- Smrča, *Picea sp.*

Piljevina je sakupljena nakon sečenja grana živog drveća motornom testerom. Grane cera i bele topole prikupljene su iz lokalnih šuma u okolini Obrenovca, a smrče iz okoline Valjeva. Sakupljena piljevina sastojala se od drvenih ljuski i opiljaka veličine do 0,5cm. Piljevina je sušena 48 sati na 60°C, nakon toga je korišćena kao supstrat u eksperimentalnoj postavci ili za dobijanje druge vrste supstrata - izolovanih ćelijskih zidova.

6.3.2. Izolovani ćelijski zidovi

Izolovani ćelijski zidovi su korišćeni kao supstrat u eksperimentalnim ispitivanjima, a dobijeni su od piljevine koja je prethodno sušena 48 sati na 60°C. Osušeni materijal je potom samleven u prah. 400mg suvog praha je homogenizovano sa 10ml 80% metanola 10 minuta na vorteksu. Homogenat je potom mešan na šejkeru u trajanju od 60min pri brzini od 220rpm na sobnoj temperaturi, a potom centrifugiran 5min na 1500g. Ovaj postupak sa homogenatom je ponovljen još dva puta sa pauzama od po 15min. U cilju uklanjanja ekstrakta izvršeno je ispiranje homogenata u 7 koraka (Chen i sar., 2000, Strack i sar. 1988) sa po 20ml određenog rastvora: u prvom koraku sa 1M NaCl i 0,5% Triton X-100, zatim u dva koraka sa destilovanom vodom, pa dva koraka sa 100% metanolom i konačno u dva koraka sa 100% acetonom. U svakom koraku urađena je homogenizacija uzorka na vorteksu u trajanju od 10min, potom mešanje na šejkeru u trajanju od 10min pri brzini od 220rpm na sobnoj temperaturi i centrifugiranje na 1500g u trajanju od 10min. Nakon svakog koraka odlivan je supernatant i sačuvan pelet. Dobijeni izolovani ćelijski zidovi su na kraju sušeni 48 sati na 60°C (Slika 6.2.).



Slika 6.2. Piljevina (levo) i izolovani ćelijski zidovi (desno) – a) cera, b) bele topole i c) smrče.

6.3.3. DHP – dehidrogenovani polimer koniferil alkohola

Model jedinjenje lignina, dehidrogenovani polimer koniferil alkohola (u daljem tekstu DHP), sintetisan je prema ranije opisanim protokolima (Freudenberg i Neish, 1968, Wayman i Obiaga 1974, Radotic i sar. 1994, 1998). DHP je sintetisan od koniferil alkohola pomoću peroksidaze rena kao katalizatora uz istovremeno dodavanje koniferil alkohola i vodonik-peroksida rastvoru peroksidaze rena. Reakciona smeša se sastojala od 5mM koniferil alkohola, 5mM H₂O₂ i 2.5x10⁻⁸M peroksidaze rena u 50mM fosfatnom puferu na 25°C. Rastvor je mešan 48 sati do završetka reakcije. Dobijeni talog je ispiran dva puta dejonizovanom vodom, a potom uparavan u vakuumu na 5°C.

6.4. Tečni mineralni medijum

U eksperimentalnim ispitivanjima korišćen je tečni mineralni medijum pripremljen prema ranije publikovanoj recepturi (Jović i sar., 2018). Jedan litar tečnog mineralnog medijuma je sadržao:

- 0.5g NH₄NO₃,
- 1g KH₂PO₄,
- 0.5g MgSO₄·7H₂O,
- 0.01g CaCl₂·2H₂O,
- 0.05g CuSO₄·5H₂O,
- 0.03g MnSO₄·H₂O,
- 0.05g FeSO₄·7H₂O,
- 0.035g ZnSO₄·7H₂O,
- 0.02g CoSO₄·7H₂O,
- 1g ekstrakta kvasca.

Nakon rastvaranja svih komponenti, pH vrednost tečnog mineralnog medijuma je podešena na 5,5.

6.5. Postavka eksperimenta

Eksperimentalni medijumi su postavljeni u erlenmajerima od 100ml i 300ml. Eksperimentalni medijumi su se sastojali od različitih supstrata, različitih komponenti biomase (piljevina, izolovani ćelijski zidovi, DHP) kojima je dodata odgovarajuća količina tečnog mineralnog medijuma.

Tečni eksperimentalni medijumi sa piljevinom - U erlenmajerima od 300ml dodato je po 3g piljevine od 3 različite vrste drveta (svaka vrsta piljevine posebno) i 50ml tečnog mineralnog medijuma.

Tečni eksperimentalni medijumi sa izolovanim ćelijskim zidovima - U erlenmajerima od 300ml dodato je po 3g izolovanih ćelijskih zidova od 3 različite vrste drveta (svaka vrsta posebno) i 50ml tečnog mineralnog medijuma.

Eksperimentalni medijum sa DHP – U erlenmajerima od 100ml dodato je 50mg DHP i 25ml tečnog mineralnog medijuma.

Tabela 6.1. – Šematski prikaz eksperimentalne postavke

<i>Cyclocybe aegerita</i>			<i>Pleurotus ostreatus</i>		
CQP1	CQP2	CQP3	PQP1	PQP2	PQP3
CPP1	CPP2	CPP3	PPP1	PPP2	PPP3
CSP1	CSP2	CSP3	PSP1	PSP2	PSP3
CQW1	CQW2	CQW3	PQW1	PQW2	PQW3
CPW1	CPW2	CPW3	PPW1	PPW2	PPW3
CSW1	CSW2	CSW3	PSW1	PSW2	PSW3
CDHP1	CDHP 2	CDHP 3	PDHP1	PDHP2	PDHP3
<i>Legenda:</i>					
Prva slovena oznaka: P - <i>P. ostreatus</i> C - <i>C. aegerita</i>					
Druga oznaka: Q - hrast P - topola S - smrča DHP - DHP					
Treća oznaka: P - piljevina W - ćelijski zid					
Peta oznaka: 1,2,3 - broj ponavljanja					

Pripremljeni eksperimentalni medijumi su sterilisani u autoklavu na 114°C u trajanju od 30min. Nakon hlađenja, medijumi su inokulisani u laminarnoj komori sa svežim, sedam dana starim micelijama vrsta *Pleurotus ostreatus* i *Cyclocybe aegerita*, posebno sa jednom i drugom vrstom gljive. Eksperimentalni medijumi sa piljevinom i izolovanim ćelijskim zidovima inokulisani su sa po 6 plagova micelija prečnika oko 1cm, a medijum sa DHP-om sa po 2 plaga micelija (Tabela 6.1.). Inokulisani eksperimentalni medijumi su inkubirani 14 dana u mraku na 30°C (Slike 6.3. – 6.9.).

Tabela 6.2. – Šematski prikaz kontrola u eksperimentalnoj postavci

<i>Kontrole supstrata</i>			<i>Legenda</i>
KQP1	KQP2	KQP3	Prva slovna oznaka: K – kontrola Druga slovna oznaka: Q – hrast P – topola S – smrča DHP – DHP Treća slovna oznaka: P – piljevina W – ćelijski zid 1,2,3 – broj ponavljanja
KPP1	KPP2	KPP3	
KSP1	KSP2	KSP3	
KQW1	KQW2	KQW3	
KPW1	KPW2	KPW3	
KSW1	KSW2	KSW3	
KDHP1	KDHP2	KDHP3	
<i>Kontrole gljiva</i>			
KC1	KC2	KC3	C – <i>Cyclocybe aegerita</i>
KP1	KP2	KP3	P – <i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Kontrole medijuma</i>			
M1	M2	M3	M – medijum

Eksperimentalna postavka je podrazumevala i pripremu odgovarajućih kontrola medijuma, supstrata i gljiva (Tabela 6.2.). Kontrola medijuma je sadržala 50ml tečnog mineralnog medijuma, bez dodataka supstrata i micelija. Kontrole supstrata su pripremljene na isti način kao i napred opisani eksperimentalni medijumi, ali nakon sterilizacije u autoklavu nisu inokulisane micelijama gljiva. Kontrole gljiva su

pripremljene u erlenmajerima od 300ml i sadržale su 50ml tečnog mineralnog medijuma koji je nakon sterilizacije u autoklavu i hlađenja inokulisan sa po 6 plagova micelija od obe vrste gljiva posebno. Pripremljene kontrole su takođe inkubirane 14 dana u mraku na 30°C. Sve kontrole, kao i svi eksperimentalni tretmani su urađeni u tri ponavljanja.



Slika 6.3. – Micelija bukovače (*Pleurotus ostreatus*) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa piljevinom hrasta (levo) i piljevinom topole (desno).



Slika 6.4. – Micelija jablanovače (*Cyclocybe aegerita*) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa piljevinom topole



Slika 6.5. – Micelija jablanovače (*Cyclocybe aegerita*) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa piljevinom hrasta



Slika 6.6. – Micelija jablanovače (*Cyclocybe aegerita*) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa ćelijskim zidovima smrče



Slika 6.7. – Micelija jablanovače (*Cyclocybe aegerita*) u eksperimentalnom medijumu sa ćelijskim zidovima topole



Slika 6.8. – Micelija jablanovače (*Cyclocybe aegerita*) u eksperimentalnom medijumu sa DHP-om



Slika 6.9. – Micelija bukovače (*Pleurotus ostreatus*) u eksperimentalnom medijumu sa DHP-om

6.6. Priprema uzoraka za analizu

Nakon 14 dana inkubacije, erlenmajeri sa eksperimentalnim tretmanima su mućkani na šejkeru pri brzini od 220rpm na 30°C u trajanju od 30min. Potom je izvršeno razdvajanje tečne i čvrste faze filtracijom sa filter papirom na vakuum pumpi. Čvrsta faza na filter papiru je spakovana i čuvana do dalje analize na –20°C u zamrzivaču. Tečna faza je centrifugirana na 4185g u trajanju od 30min. Nakon centrifugiranja je odliceno po 2ml supernatanta koji je spakovan u ependorfice i zamrznut do dalje analize aktivnosti ligninolitičkih enzima na –80°C. Ostatak tečne faze, supernatanta, je prebačen u bočice za urin zapremine 50ml i liofilizovan. Po završetku liofilizacije, bočice su zatvorene i liofilizovani uzorci su čuvani u zamrzivaču na –20°C. Deo liofilizovanih uzoraka je prebačen iz bočica za urin u ependorfice u kojima je čuvan u zamrzivaču do dalje analize (Slika 6.10.).



Slika 6.10. – Deo liofilizovanih uzoraka eksperimentalnih medijuma u ependorficama

6.7. Određivanje aktivnosti lakaze

Određivanje aktivnosti enzima lakaze u uzorcima je urađeno prema prethodno publikovanom protokolu (Kalra i sar., 2013) baziranom na oksidaciji gvajakola. Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 1ml je sadržala:

- 600 μ l 10mM/l acetatnog pufera, pH 5.0
- 200 μ l 2mM/l gvajakola
- 200 μ l uzorka

Reakciona smeša je inkubirana na 30°C, a potom je očitavana apsorbancu na 470nm na spektrofotometru (2501 PC Shimadzu, Japan). Kao blank je pravljen reakciona smeša koja je umesto uzorka sadržala 200 μ l destilovane vode. Aktivnost enzima je izražena u međunarodnim jedinicama (U), gde je jedna jedinica (1U) jednaka količini enzima koja je potrebna za oksidaciju 1 μ mol gvajakola po minuti. Aktivnost enzima je računata prema formuli:

$$E.A = A \cdot V / t \cdot v \cdot \epsilon$$

E.A – aktivnost enzima (U/ml)

A – apsorbancu

V – ukupna zapremina reakcione smeše

t – vreme inkubacije

v – zapremina uzorka sa enzimom

ϵ – ekstinkcioni koeficijent

Računato je da je ekstinkcioni koeficijent gvajakola $\epsilon = 6.74 \text{ L/mmol}\cdot\text{cm}$, prema prethodno publikovanom izveštaju (Hosoya, 1960).

6.8. Određivanje aktivnosti Mn-peroksidaze

Određivanje aktivnosti enzima mangan peroksidaze u uzorcima je urađeno prema prethodno publikovanom protokolu (Casciello i sar., 2013) baziranom na

oksidaciji 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), ili skraćeno ABTS ($\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 1ml je sadržala:

- 975 μl 40mM/l Na-citratnog pufera, pH 4.5
- 5 μl 100mM/l ABTS
- 5 μl MnCl_2
- 5 μl H_2O_2
- 10 μl uzorka

Reakcija je započeta dodavanjem peroksida, nakon što su prethodno promešane sve ostale komponente. Na spektrofotometru (2501 PC Shimadzu, Japan) praćen je porast apsorbanca na 420nm u trajanju od 3min na 25°C, prema destilovanoj vodi kao referentnom rastvoru. Jedna jedinica (1U) aktivnosti enzima jednaka je količini enzima koja je potrebna za oksidaciju 1 μmol ABTS po minuti na 25°C.

6.9. Određivanje aktivnosti lignin peroksidaze

Određivanje aktivnosti enzima lignin peroksidaze vršeno je prema ranije opisanoj proceduri (Archibald, 1992), a koja se bazira na oksidaciji boje azur B ($\epsilon = 48.8 \text{ L/mmol}\cdot\text{cm}$). Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 1ml je sadržala:

- 400 μl 125mM/l Na-tartaratnog pufera, pH 3.0
- 200 μl 0,16mM/l azur B
- 200 μl uzorka
- 200 μl H_2O_2

Reakcija je započeta dodavanjem peroksida, nakon što su prethodno promešane sve ostale komponente. Na spektrofotometru (2501 PC Shimadzu, Japan) praćeno je opadanje apsorbanca na 651nm u trajanju od 3min u odnosu na destilovanu vodu kao referentni rastvor. Jedna jedinica (1U) aktivnosti enzima definisana je kao promena apsorbanca za 0,1 jedinicu po minuti po mililitru uzorka.

6.10. Acetil bromidni test

U cilju kvantifikacije lignina u uzorcima eksperimentalnih medijuma sa piljevinom i izolovanim ćelijskim zidovima urađen je acetil bromidni test. Piljevina i

izolovani ćelijski zidovi su prethodno u fazi pripreme uzoraka filtracijom razdvojeni od tečne faze i zamrznuti na -20°C u zamrzivaču. Nakon odmrzavanja, sušeni su na 60°C u trajanju od 48 sati. Iz uzoraka piljevine su nakon sušenja izolovani ćelijski zidovi, a prema ranije opisanoj proceduri.

Osušeni izolovani ćelijski zidovi iz eksperimentalnog medijuma, kao i ćelijski zidovi izolovani iz eksperimentalnih medijuma sa piljevinom su nakon sušenja podvrgnuti alkalnoj hidrolizi. Suvi ćelijski zidovi u količini od 400mg su suspendovani u 8ml vodenog 1M NaOH temperature 80°C i inkubirani na sobnoj temperaturi 17 časova. Hidrolizat je potom dva puta ispiran destilovanom vodom uz mešanje na šejkeru pri brzini od 220rpm u trajanju od 10min i nakon toga sušen 24 časa na 80°C .

Uzorci hidrolizovanih ćelijskih zidova u količini od 2,5mg su prelivevi sa 250 μl 25% acetil bromidom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini i potom inkubirani 30min na temperaturi od 70°C . Nakon inkubacije uzorci su brzo ohlađeni na ledu, a potom im je dodato 250 μl 2M NaOH. Pripremljena smeša je centrifugirana 5min na 15000g.

Iz ove smeše uzeto je 250 μl supernatanta kom je dodato 5 μl 15M hidrosilamina i 2495 μl glacijalne sirćetne kiseline. Apsorbancija ovako pripremljene reakcione smeše je određivana na 280nm na spektrofotometru (2501 PC Shimadzu, Japan).

Kvantifikacija ligninskih monomera je izvršena pomoću standardne krive sa koniferil alkoholom kao standardom. Rezultati su izraženi kao ekvivalentna količina koniferil alkohola u miligramima po gramu suve mase.

6.11. Ukupni sadržaj fenola

Ukupni sadržaj fenola je određivan prema Folin-Ciocalteu protokolu (Singleton i Rossi, 1965) koji je modifikovan od strane Dragišić Maksimović i Živanović (2012). Modifikovani metod se bazira na redukciji Folinovog reagensa, koji se redukuje pri oksidaciji fenolnih jedinjenja i daje rastvoru intenzivno plavu boju, čiji je intenzitet proporcionalan količini fenolnih jedinjenja u rastvoru. Galna kiselina je korišćena kao standard za kalibraciju standardne krive, a dobijeni rezultati su izraženi kao ekvivalentna količina galne kiseline u miligramima po gramu sveže mase (mg GA eq. g^{-1} FW).

Ukupni sadržaj fenola je određivan iz liofilizovanih uzoraka eksperimentalnih medijuma, 10mg liofilizata je rastvoreno u 1ml 100% metanola. Standardni rastvori napravljeni su rastvaranjem galne kiseline u metanolu u koncentraciji od 0,1 do 2mM.

Standardi i uzorci su u količini od 50 μ l pomešani sa 0,475ml 0,25N Folinovog reagensa u mikrotiter ploči i ostavljeni da se inkubiraju 3min na sobnoj temperaturi. Potom je dodato 0,475ml vodenog rastvora 0,2M Na₂CO₃. Pripremljena reakciona smeša je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi, a potom je merena apsorbancija na 724nm na spektrofotometru Multiscan® Spectrum (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

6.12. Ukupni antioksidativni kapacitet

Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta je urađeno prema protokolu sa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), ili skraćeno ABTS-om (Arnao i sar., 1999). Reakciona smeša se sastojala od 2mM ABTS, 15 μ M H₂O₂ i 0.25 μ M peroksidaze rena u 50mM fosfatnom puferu pH 7.5. Reakcija se bazira na aktivnosti peroksidaze rena koja u prisustvu vodonik peroksida prevodi ABTS u reaktivni monokatjonski radikal koji daje zelenu boju rastvoru. U prisustvu antioksidanasa dolazi do redukcije ABTS radikala usled čega se smanjuje intenzitet zelene boje i dolazi do obezbojavanja rastvora i posledično do opadanja apsorbancije. Ta promena apsorbancije je praćena na 730nm na spektrofotometru Multiscan® Spectrum (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

Askorbinska kiselina je korišćena kao standard za kalibraciju standardne krive u koncentraciji od 0,1 do 0,8mM, a dobijeni rezultati su izraženi kao ekvivalentna količina askorbinske kiseline u miligramima po gramu sveže mase (mg AA eq· g⁻¹ FW).

6.13. HPLC analiza

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja je urađena metodom hromatografije obrnutih faza tečnom hromatografijom visokih performansi (eng. High performance liquid chromatography - HPLC). Korišćeni su liofilizovani uzorci za HPLC analizu koji su rastvoreni u 100% metanolu u koncentraciji od 10mg/ml. HPLC

analiza je urađena na Waters HPLC sistemu sa binarnom pumpom, termostatom, autosemplerom i EMD 1000 detektorom sa jednim analizatorom i ESI izvorom (Waters, Milford, USA). Razdvajanje je urađeno pomoću Symmetry C-18 RP kolone veličine 125x4,6mm, veličine čestica 5 μ m (Waters, Milford, USA). Mobilnu fazu je činio sistem rastvarača – 0,1% mravlja kiselina (A) i acetonitril (B). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom gradijenta: prvih 20min od 10% do 20% B, sledećih 10min linearno povećanje do 40% B, zatim 15min linearnog smanjenja do 10% B uz dodatnih 5min za ekvibraciju. Protok mobilne faze je iznosio 1ml/min. Postkolonski delilac protoka (ASI, Richmond, CA, USA) sa odnosom razdvajanja 5:1 korišćen je za dobijanje optimalnog protoka mobilne faze za ESI probu. Parametri jonskog izvora su bili sledeći: napon kapilare 3,0 kV, napon na konusu -35 V, napon ekstraktora 3,0V i radiofrekventni napon 0,2V. DAD detektor je korišćen za detekciju različitih fenolnih jedinjenja. Temperatura izvora je bila 140°C, a temperatura desolvacije 400°C, uz protok N₂ od 500l/h. Za obradu podataka korišćen je softver Empower 2 (Waters, Milford, USA).

6.14. PCA analiza

Analiza glavnih komponenti (eng. Principal component analysis - PCA) je multivarijantna analiza koja predstavlja statistički postupak koji omogućuje da se varijabilnost prikupljenih podataka može opisati sa svega nekoliko glavnih komponenti, uz odbacivanje suvišnih informacija. Analizom se kombinuju međusobno korelisane varijable u nove setove linearno nekorelisanih varijabli, odnosno glavnih komponenti, koje imaju maksimalnu varijansu uz minimalan gubitak informacija originalnih podataka. Proučavanje sličnosti uzoraka moguće je smanjenjem dimenzionalnosti prostora, odnosno ortogonalnom projekcijom uzoraka na podprostor definisan manjim brojem glavnih komponenti, najčešće dve, što omogućuje grafičku vizuelizaciju i grupisanje uzoraka prema sličnosti. PCA analiza je primenjena u cilju uočavanja sličnosti u hemijskom sastavu među uzorcima koji su analizirani HPLC metodom. Ova metoda je primenjena na hromatograme fenolnih profila uzoraka eksperimentalnih tretmana koji su dobijeni kao rezultat HPLC analize, gde su u analizi korišćena

retenciona vremena od 3 do 40 min. Multivarijantna analiza je sprovedena analizom glavnih komponenti u programu Unscrambler x10.4 (Camo AS, Trondheim, Norway).

6.15. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je urađena dvofaktorskom analizom varijanse ANOVA u cilju procene uticaja vrste gljive i tipa supstrata na aktivnosti ligninolitičkih enzima, sadržaja lignina, ukupnog sadržaja fenola i ukupnog antioksidativnog kapaciteta. U testovima je korišćen nivo značajnosti od 5%. Dvofaktorska analiza varijanse je urađena u programu SPSS 25 (IBM corp.).

7. REZULTATI I DISKUSIJA

7.1. Rast gljiva na hranljivim podlogama i medijumima

Kulture izolovanih micelija gljiva su umnožavane i održavane u petri kutijama na čvrstom medijumu od sladnog agara ili PDA podlogama. Nisu uočene razlike u rastu gljiva na različitim podlogama, rast svih vrsta je bio obilan i micelije gljiva bi najčešće u potpunosti prekrile površinu čvrste podloge za oko 7 dana. Kulture micelija na kosom agaru koje su čuvane na +4°C su se uspešno razvijale prenošenjem na svežu podlogu čak i nakon godinu dana čuvanja u frižideru.

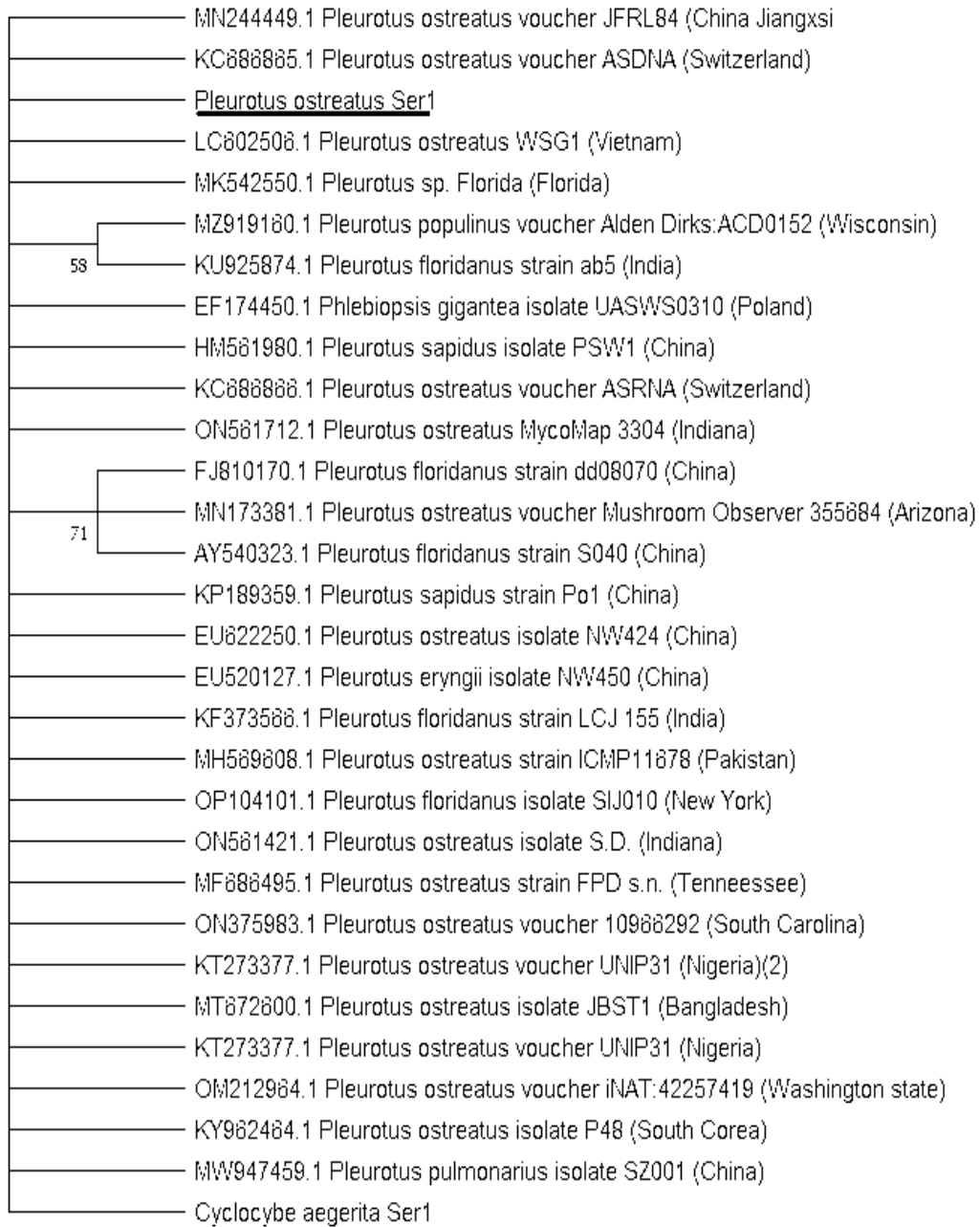
U postavci eksperimenta je korišćen tečni mineralni medijum, kom su dodati različiti supstrati (piljevina, izolovani ćelijski zidovi ili DHP), osim u kontrolama gljiva. U svim eksperimentalnim tretmanima rast gljiva je bio obilan i ujednačen, čak i u kontrolama gljiva, koje su se sastojale samo od tečnog mineralnog medijuma inokulisanog micelijama. Ovo ukazuje da je sadržaj nutrijenata u medijumima eksperimentalnih tretmana bio dovoljan za optimalan rast micelija gljiva za vreme trajanja eksperimenta od 14 dana.

7.2. Analiza DNK gljiva

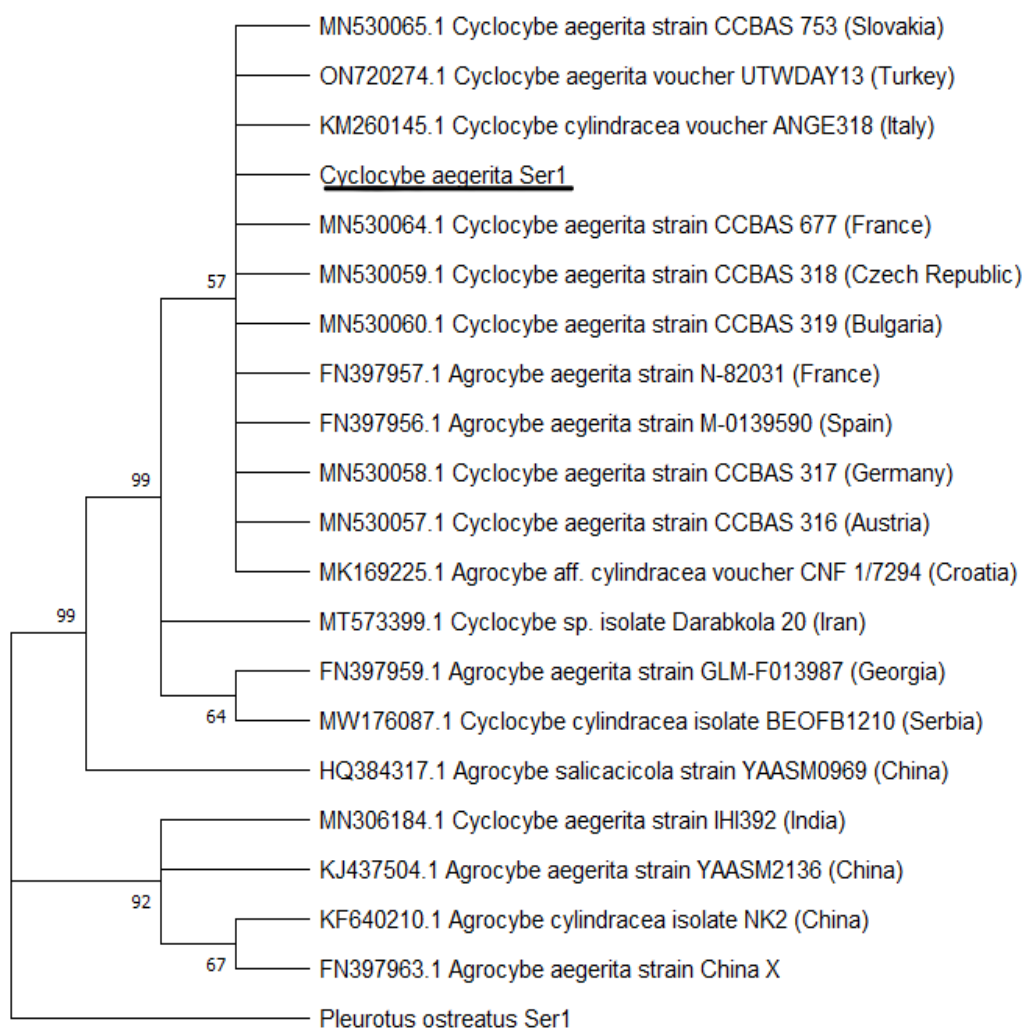
U cilju potvrde taksonomskog statusa gljiva koje su korišćene u eksperimentu urađena je izolacija njihove DNK. Izolovana DNK je umnožavana PCR metodom korišćenjem standardnih prajmera za gljive – ITS1F i ITS4. U istraživanju su korišćeni sojevi gljiva označeni kao *Cyclocybe aegerita* Ser 1 i *Pleurotus ostreatus* Ser 1. Analiza ITS sekvenci rDNK je potvrdila taksonomski status istraživanih vrsta. Pozicija istraživanih sojeva gljiva je prikazana na filogenetskim stablima na slikama 7.1. i 7.2. Dobijene sekvence DNK sojeva se nalaze u Banci gena i zavedene su pod brojevima OP936994 i OP936995.

Obe istraživane vrste gljiva su široko rasprostranjene u prirodi. Na osnovu pozicije sojeva u dobijenim filogenetskim stablima, može se zaključiti da je soj *Pleurotus ostreatus* Ser 1 sličan sojevima iz različitih geografskih oblasti. Soj *Cyclocybe aegerita* Ser 1 je sličan sojevima detektovanim u Hrvatskoj i drugim

zemljama Evrope, ali različit od soja koji je prethodno detektovan u oblasti južne Srbije, a koji je sličniji nekim sojevima sa područja Azije (Stefanović i sar., 2023).



Slika 7.1. – Filogenetsko stablo sa maksimalnom verovatnoćom na osnovu analize ITS sekvenci *Pleurotus ostreatus* Ser 1

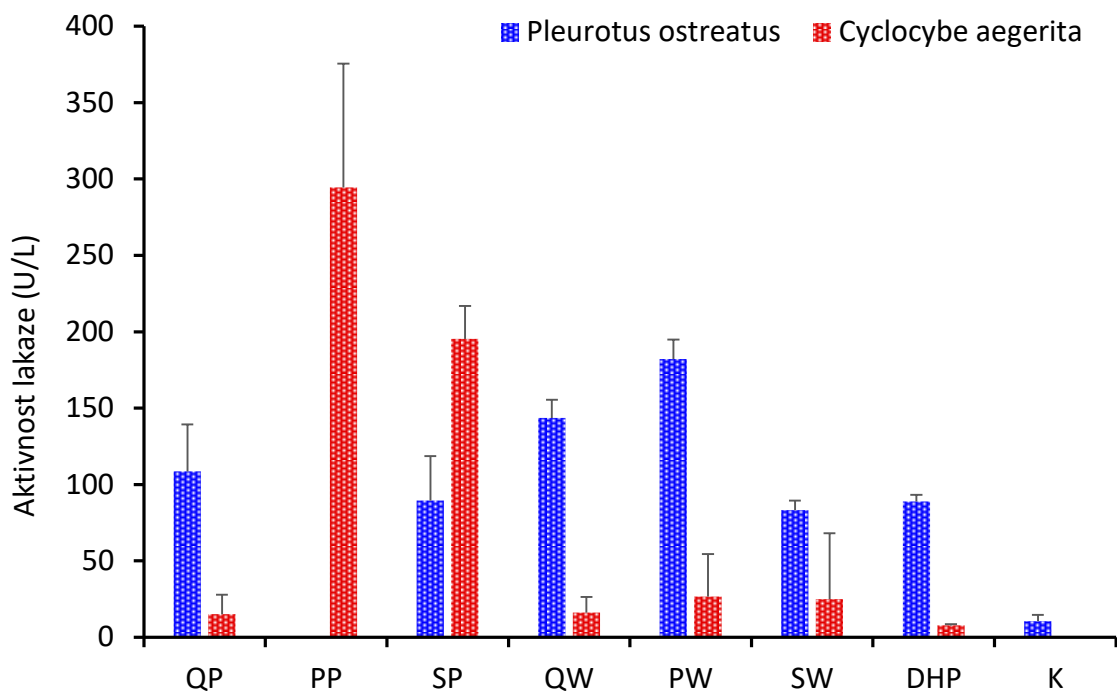


Slika 7.2. – Filogenetsko stablo sa maksimalnom verovatnoćom na osnovu analize ITS sekvenci *Cyclocybe aegerita* Ser 1

7.3. Analiza rezultata merenja aktivnosti lakaze

Određivanje aktivnosti enzima lakaze u eksperimentalnim tretmanima je urađeno prema protokolu baziranom na oksidaciji gvajakola (Kalra i sar., 2013). Rezultati merenja aktivnosti lakaze su prikazani na grafiku 7.1.

Na osnovu prikazanih rezultata jasno je da postoji izuzetno velika razlika u izmerenoj aktivnosti lakaza dve vrste gljiva, kao i da postoje velike razlike u aktivnosti enzima u zavisnosti od supstrata u eksperimentalnim tretmanima.



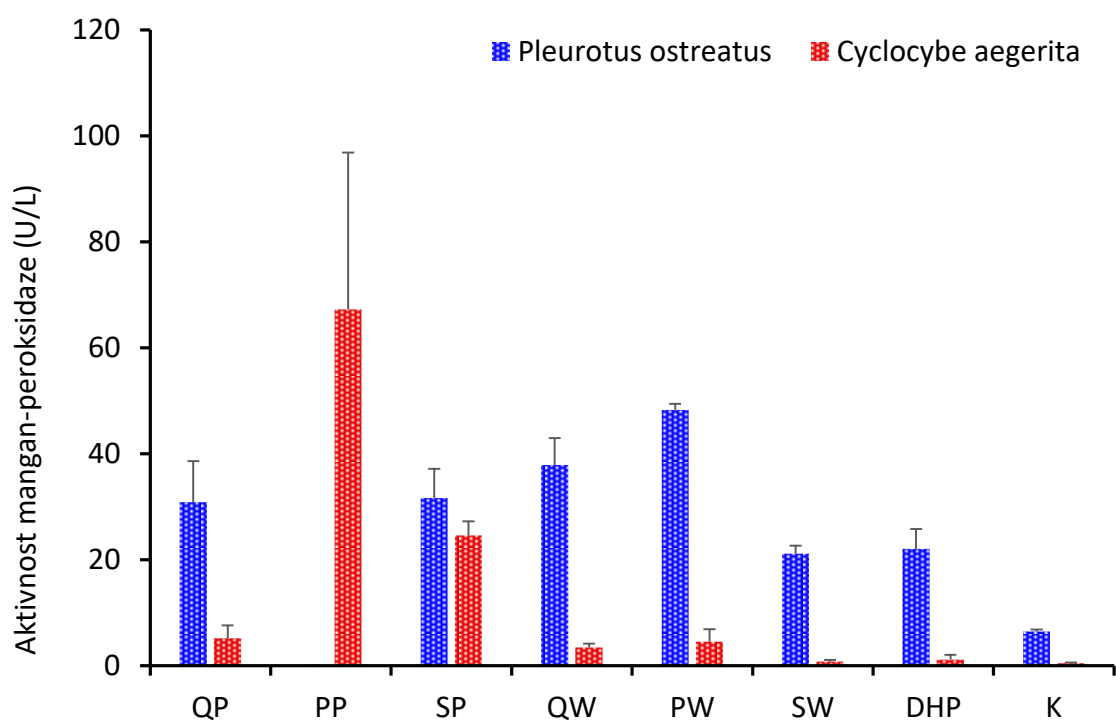
Grafik 7.1. – Rezultati merenja aktivnosti enzima lakaze (piljevina hrasta – QP, topole – PP i smrče – SP u mineralnom medijumu, izolovani ćelijski zidovi hrasta – QW, topole – PW i smrče – SW u mineralnom medijumu, DHP u mineralnom medijumu – DHP i kontrola gljiva – K, mineralni medijum)

Kod vrste *P. ostreatus* je detektovana aktivnost lakaze u kontroli, za razliku od *C. aegerita* koja u kontroli nije proizvela ovaj enzim. Izmerene vrednosti aktivnosti lakaze su značajno veće u svim eksperimentalnim tretmanima u slučaju vrste *P. ostreatus*, osim u eksperimentalnom tretmanu sa piljevinom smrče (SP) i u tretmanu sa piljevinom topole (PP) u kom nije ni detektovana aktivnost lakaze. U kontrolama supstrata nisu registrovane aktivnosti lakaze, što ukazuje da izmerene aktivnosti potiču od enzima koje su proizvele gljive.

7.4. Analiza rezultata merenja aktivnosti mangan peroksidaze

Određivanje aktivnosti enzima mangan peroksidaze u eksperimentalnim tretmanima je urađeno prema protokolu baziranom na oksidaciji ABTS (Casciello i sar., 2013). Rezultati merenja aktivnosti mangan peroksidaze su prikazani na grafiku 7.2.

Prikazani rezultati ukazuju na postojanje velikih razlika u aktivnosti enzima među gljivama, kao i u zavisnosti od supstrata. Enzimatska aktivnost je zabeležena kod obe vrste u kontroli, s tim da je aktivnost mangan peroksidaze vrste *C. aegerita* jedva merljiva. Aktivnost mangan peroksidaze pokazuje veliku sličnost sa rezultatima merenja aktivnosti lakaze, postoji sličan trend koji se ogleda u činjenici da *P. ostreatus* u svim eksperimentalnim tretmanima pokazuje značajno veću aktivnost osim u slučaju piljevine smrče (SP) i piljevine topole (PP). U eksperimentalnom tretmanu sa piljevinom topole nije detektovana aktivnost mangan peroksidaze, kao i u slučaju merenja aktivnosti lakaze. Aktivnost enzima nije registrovana u kontrolama supstrata, izmerene aktivnosti potiču od enzima gljiva.

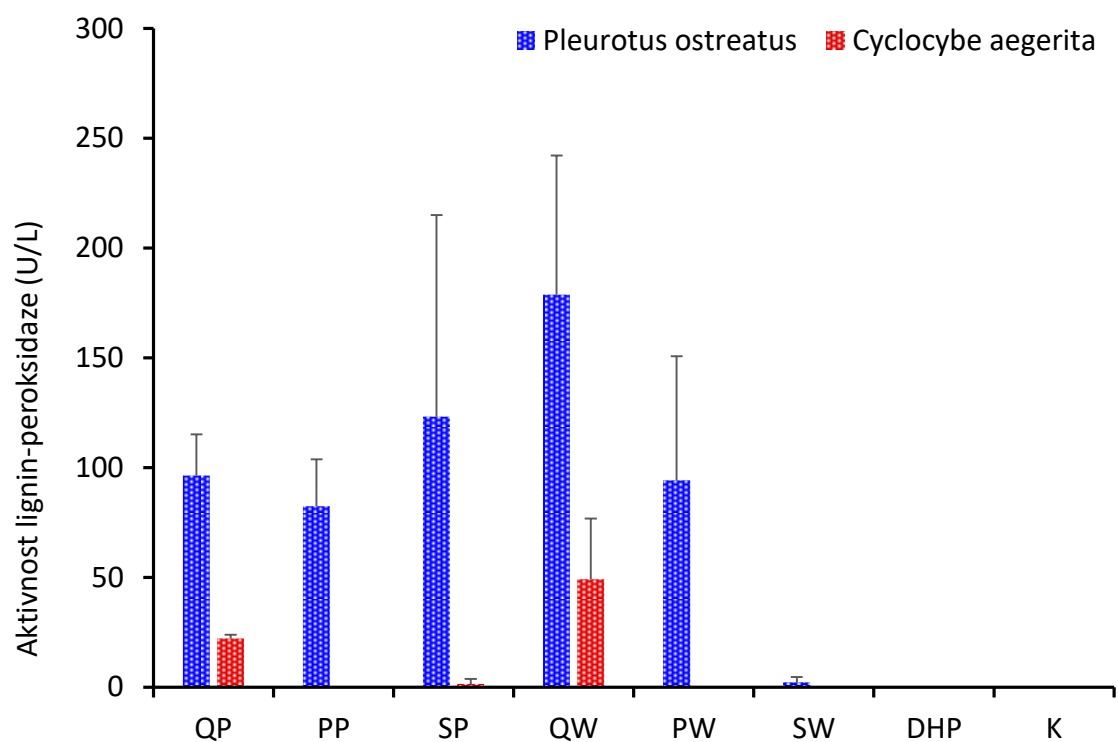


Grafik 7.2. – Rezultati merenja aktivnosti enzima mangan peroksidaze (piljevina hrasta – QP, topole – PP i smrče – SP u mineralnom medijumu, izolovani ćelijski zidovi hrasta – QW, topole – PW i smrče – SW u mineralnom medijumu, DHP u mineralnom medijumu – DHP i kontrola gljiva – K, mineralni medijum)

7.5. Analiza rezultata merenja aktivnosti lignin peroksidaze

Određivanje aktivnosti enzima lignin peroksidaze u eksperimentalnim tretmanima je urađeno prema protokolu koji se bazira na oksidaciji boje azur B (Archibald, 1992). Rezultati merenja aktivnosti lignin peroksidaze su prikazani na grafiku 7.3.

Kao i u slučaju merenja aktivnosti druga dva ligninolitička enzima, postoje izuzetno velike razlike u izmerenim aktivnostima lignin peroksidaze kod dve istraživane vrste gljiva, kao i velike razlike uslovljene različitim supstratima.



Grafik 7.3. – Rezultati merenja aktivnosti enzima lignin peroksidaze (piljevina hrasta – QP, topole – PP i smrče – SP u mineralnom medijumu, izolovani ćelijski zidovi hrasta – QW, topole – PW i smrče – SW u mineralnom medijumu, DHP u mineralnom medijumu – DHP i kontrola gljiva – K, mineralni medijum)

Ni jedna ni druga gljiva nisu proizvele enzime u kontroli. Aktivnost lignin peroksidaze vrste *C. aegerita* je detektovana samo u eksperimentalnim tretmanima sa piljevinom i ćelijskim zidovima hrasta (QP i QW). Jedva merljiva aktivnost, koja nije

statistički značajna je detektovana u tretmanu sa piljevinom smrče (SP). Izmerene aktivnosti lignin peroksidaze su značajno veće u slučaju vrste *P. ostreatus* i detektovane su u svim eksperimentalnim tretmanima, s tim što je u tretmanu sa ćelijskim zidovima smrče (SW) ta aktivnost jako mala i nije statistički značajna. Aktivnost enzima lignin peroksidaze nije registrovana u kontrolama supstrata, pa je jasno da izmerene aktivnosti potiču od enzima koje su proizvele gljive.

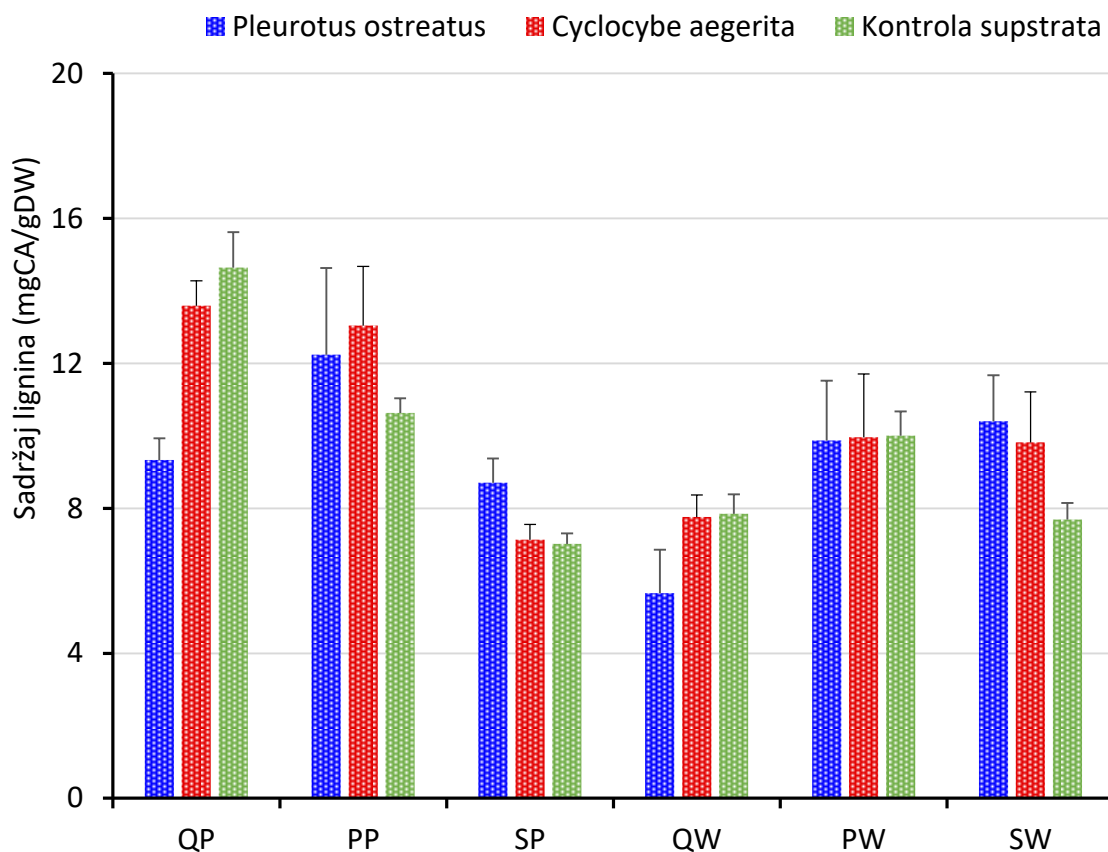
Analizom genoma vrste *P. ostreatus* nije utvrđeno prisustvo gena za lignin peroksidazu, što znači da ona ne može proizvoditi ovaj enzim. Međutim, utvrđeno je prisustvo gena za sintezu verzatilnih peroksidaza i poznato je da ova gljiva proizvodi 3 različite forme ovog enzima (Fernández-Fueyo i sar., 2014). Verzatilna peroksidaza je enzim hibridnih svojstava koji kombinuje karakteristike mangan peroksidaze i lignin peroksidaze (Mester i Field, 1998; Ruiz-Duenas i Martínez, 2010). Protokol koji se bazira na oksidaciji boje azur B je jedan od najšire korišćenih za utvrđivanje aktivnosti lignin peroksidaze (Arora i Gill, 2001; Pointing i sar., 2005; Vares i sar., 1995). Sudeći prema dobijenim rezultatima, ovaj protokol očigledno nije dovoljno diskriminativan i ne može da razlikuje aktivnost lignin peroksidaze od verzatilne peroksidaze, koja takođe može da oksiduje azur B (Hibi i sar., 2012), a Kinnunen i sar. (2017) su utvrdili da je optimalna pH vrednost za aktivnost verzatilne peroksidaze pH 3.0, što je upravo pH vrednost esej sa azur B bojom. U funkcionalnom smislu nema bitne razlike između ova dva enzima, jer verzatilna peroksidaza može da katalizuje reakcije istih supstrata kao i lignin peroksidaza (Garcia-Ruiz i sar., 2014; Hofrichter i sar., 2010).

7.6. Analiza rezultata merenja sadržaja lignina acetil bromidnim testom

U cilju utvrđivanja sadržaja lignina u eksperimentalnim tretmanima urađen je acetil bromidni test. Rezultati su izraženi kao ekvivalentna količina koniferil alkohola u miligramima po gramu suve mase (mgCA/gDW) i prikazani na grafiku 7.4.

U eksperimentalnim tretmanima sa vrstom *C. aegerita* nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrole supstrata u pogledu ukupnog sadržaja lignina. Ovaj rezultat nije iznenađujući s obzirom na činjenicu da ova vrsta pripada grupi gljiva izazivača bele truleži koje vrše simultanu razgradnju lignocelulozne biomase. U početnim fazama kolonizacije biomase, ova vrsta prvo razgrađuje polisaharidne

komponente, pre svega celulozu (Wang i sar., 2013), tek u kasnijim fazama počinje da razgrađuje lignin. U eksperimentu koji su sproveli Liers i sar. (2011), *C. aegerita* je započela značajniju razgradnju lignina tek nakon 24 dana inkubacije.



Grafik 7.4. – Prikaz rezultata merenja sadržaja lignina acetil bromidnim testom (piljevina hrasta – QP, topole – PP i smrče – SP u mineralnom medijumu i izolovani ćelijski zidovi hrasta – QW, topole – PW i smrče – SW u mineralnom medijumu)

U eksperimentalnim tretmanima sa *P. ostreatus* na supstratima piljevine i ćelijskih zidova topole i smrče takođe nisu registrovane statistički značajne razlike u sadržaju lignina u odnosu na kontrole supstrata. S obzirom na to da je eksperiment trajao 14 dana, zabeležena je inicijalna faza napada gljiva na biomasu. Acetil bromidni test prikazuje rezultate koji su presek stanja u trenutku okončanja eksperimenta i presek stanja u ovoj inicijalnoj fazi je omogućio detekciju rapidne razgradnje biomase. Takva brza degradacija biomase je utvrđena samo u eksperimentalnim tretmanima sa *P. ostreatus* gde su supstrati bili piljevina i ćelijski zidovi hrasta (QP i QW), gde je

zabeleženo statistički značajno smanjenje sadržaja lignina u odnosu na kontrole supstrata. Registrovana brza degradacija lignina u ovim eksperimentalnim tretmanima korelira i sa veoma visokom aktivnošću svih ligninolitičkih enzima.

7.7. Analiza rezultata merenja ukupnog sadržaja fenola

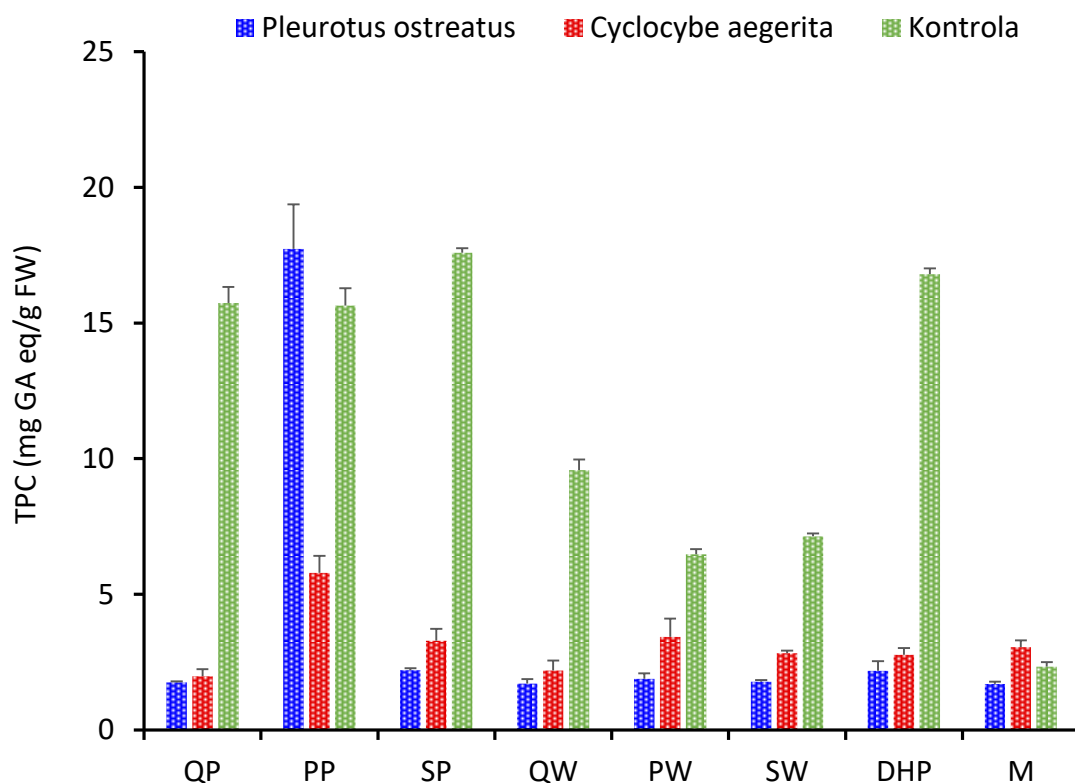
Ukupni sadržaj fenola je određivan prema Folin-Ciocalteu protokolu (Singleton i Rossi, 1965), a dobijeni rezultati su izraženi kao ekvivalentna količina galne kiseline u miligramima po gramu sveže mase ($\text{mg GA eq} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$). Rezultati merenja ukupnog sadržaja fenola su prikazani na grafiku 7.5.

Ukupni sadržaj fenola u eksperimentalnim tretmanima potiče iz višestrukih izvora. Izvesna količina fenolnih jedinjenja potiče od tečnog mineralnog medijuma (Kontrola M), koji je osim smeše neorganskih soli, sadržao i ekstrakt kvasca. Ekstrakt kvasca je izvor fenolnih jedinjenja u ovom medijumu.

Deo fenolnih jedinjenja poreklom je od metaboličkih aktivnosti micelija gljiva. Poznato je da gljive produkuju fenolna jedinjenja male molekulske mase poput *p*-hidroksicinaminske kiseline koja funkcionišu kao redoks medijatori aktivnosti ligninolitičkih enzima (Cañas i Camarero, 2010). Postoji statistički značajno veća količina ovih fenolnih jedinjenja u kontroli sa vrstom *C. aegerita*.

Najveći deo fenolnih jedinjenja potiče od supstrata korišćenih u eksperimentalnim tretmanima. Na osnovu dobijenih rezultata jasno se može uočiti da je ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja znato veći u eksperimentalnim tretmanima u kojima je kao supstrat korišćena piljevina u odnosu na tretmane sa ćelijskim zidovima. Takav rezultat je očekivan, s obzirom na proceduru izolacije ćelijskih zidova koja podrazumeva višestruka ispiranja od ekstrakta.

Ukupni sadržaj fenola u svim eksperimentalnim tretmanima je modifikovan aktivnošću ligninolitičkih enzima gljiva. Prema dobijenim rezultatima jasno se može uočiti da su količine fenolnih jedinjenja u eksperimentalnim tretmanima značajno niže u odnosu na kontrole supstrata, što jasno ukazuje na visok stepen degradacije i da su obe gljive efikasno razgrađivale ova jedinjenja. Male količine fenolnih jedinjenja u svim eksperimentalnim tretmanima sa gljivama potiču ili od samih gljiva ili su rezultat degradacije supstrata ligninolitičkim enzimima.



Grafik 7.5. – Prikaz rezultata merenja ukupnog sadržaja fenola (piljevina hrasta – QP, topole – PP i smrče – SP u mineralnom medijumu, izolovani ćelijski zidovi hrasta – QW, topole – PW i smrče – SW u mineralnom medijumu, DHP u mineralnom medijumu – DHP i mineralnim medijum – M)

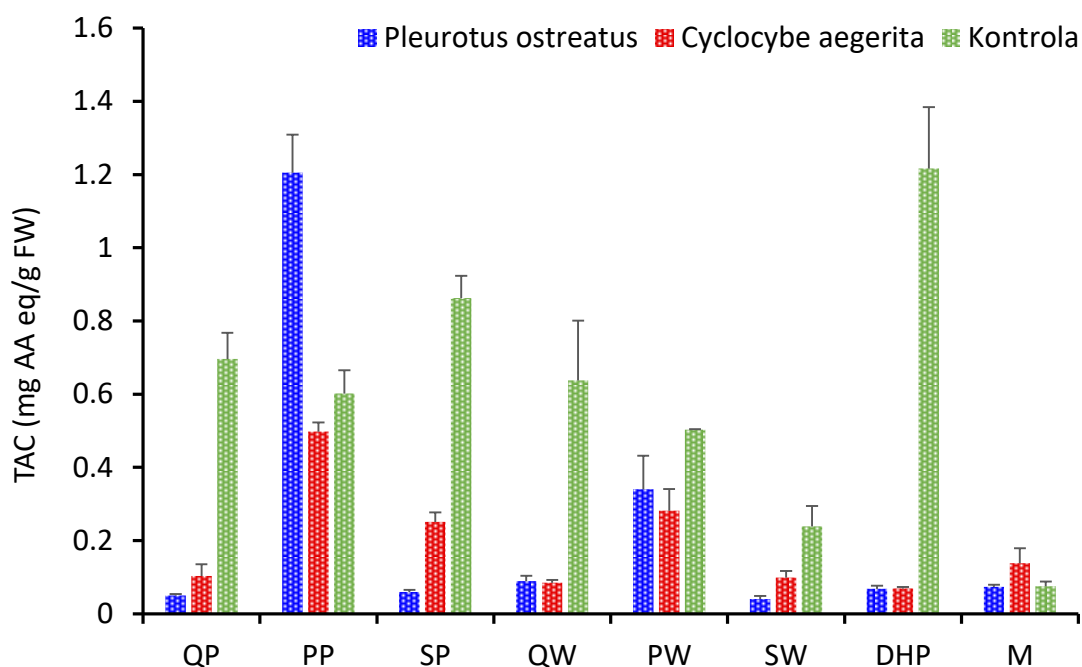
Ukupni sadržaj fenola je statistički značajno niži u svim eksperimentalnim tretmanima sa vrstom *P. ostreatus*, što upućuje na zaključak da je ova vrsta efikasnije razgrađivala ova jedinjenja. Izuzetak je jedino eksperimentalni tretman sa piljevinom topole (PP) koji karakteriše visok ukupni sadržaj fenola. Izgleda da u ovom eksperimentalnom tretmanu sa *P. ostreatus* nije bilo razgradnje fenolnih jedinjenja.

7.8. Analiza rezultata merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta

Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta je urađeno prema protokolu sa ABTS-om (Arnao i sar., 1999). Rezultati su su izraženi kao ekvivalentna količina

askorbinske kiseline u miligramima po gramu sveže mase ($\text{mg AA eq} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$). Rezultati merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta su prikazani na grafiku 7.6.

Antioksidans se može definisati kao bilo koja supstanca koja, kada je prisutna u znatno nižoj koncentraciji od supstrata koji može biti oksidovan, umanjuje ili sprečava oksidaciju tog supstrata (Bartosz, 2003). To su hemijski izuzetno raznovrsna jedinjenja, poput različitih vitamina, nekih aminokiselina, bilirubina, koenzima Q, a najčešće su to različita polifenolna jedinjenja male molekulske mase, koja neutrališu visoko reaktivne slobodne radikale i druga oksidujuća sredstva. Fenolna jedinjenja su glavni nosioci antioksidativne aktivnosti gljiva (Guo i sar., 2012).



Grafik 7.6. – Prikaz rezultata merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta (piljevina hrasta – QP, topole – PP i smrče – SP u mineralnom medijumu, izolovani ćelijski zidovi hrasta – QW, topole – PW i smrče – SW u mineralnom medijumu, DHP u mineralnom medijumu – DHP i mineralnim medijum – M)

Postoji visok stepen korelacije između dobijenih rezultata merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola (koeficijent korelacije iznosi 0,97). Najviše izmerene vrednosti ukupnog antioksidativnog kapaciteta su u kontrolama

supstrata u kojima su detektovane i najveće količine fenolnih jedinjenja. Eksperimentalni tretmani sa vrstom *P. ostreatus* odlikuju se nešto nižim vrednostima u odnosu na tretmane sa *C. aegerita* ili među njima nema statistički značajnih razlika. Izuzetak je jedino tretman sa vrstom *P. ostreatus* sa piljevinom topole (PP) koji karakteriše visoka vrednost ukupnog antioksidativnog kapaciteta, što je takođe u korelaciji sa visokom vrednošću ukupnog sadržaja fenola tog eksperimentalnog tretmana.

7.9. Rezultati HPLC analize

HPLC analizom su detektovana različita fenolna jedinjenja u eksperimentalnim tretmanima i kao rezultat analize dobijeni su hromatogrami u kojima pojedinačni pikovi reprezentuju različita pojedinačna fenolna jedinjenja, a površina ispod pikova ukazuje na njihovu koncentraciju u ispitivanim uzorcima. HPLC analiza nije imala za cilj identifikaciju svakog pojedinačnog degradacionog produkta lignina, već samo da pruži uvid u razlike u raznovrsnosti i količini fenolnih jedinjenja među eksperimentalnim tretmanima sa različitim gljivama i kontrolama supstrata. Rezultati HPLC analize prikazani su na graficima 7.7. do 7.14.

Rezultati HPLC analize ukazuju na prisustvo malih količina fenolnih jedinjenja u mineralnom medijumu (grafik 7.14.), koji potiču iz ekstrakta kvasca, a koji je sastavni deo ovog medijuma (M). U poređenju sa medijumom, u kontrolama gljiva (KC i KP) pojavljuju se brojni pikovi koji se ne poklapaju sa pikovima medijuma što ukazuje na prisustvo fenolnih jedinjenja koja su rezultat metabolizma istraživanih gljiva.

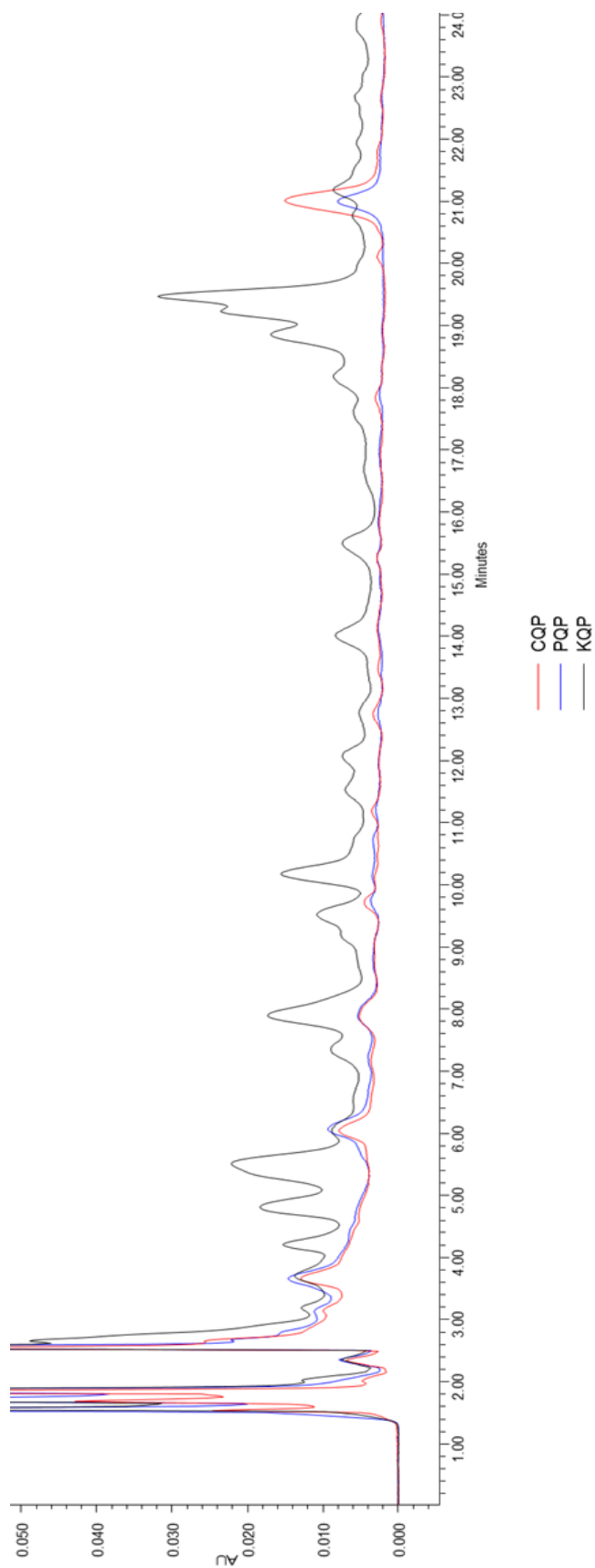
Najveća količina i najveća raznovrsnost fenolnih jedinjenja je prema očekivanjima detektovana u kontrolama piljevine (KQP, KPP i KSP, grafik 7.7., 7.8. i 7.9.). Uočljivo je da je raznovrsnost i količina ovih jedinjenja značajno manja u eksperimentalnim tretmanima sa gljivama, posebno u slučaju vrste *P. ostreatus*, što jasno ukazuje da su svojim enzimima gljive vršile razgradnju fenolnih jedinjenja. Izuzetak je jedino tretman sa piljevinom hrasta (PPP) koji se u značajnoj meri poklapa sa kontrolom supstrata (KPP). Prilikom enzimatske oksidacije lignina dolazi do njegove depolimerizacije i oslobađanja različitih aromatičnih jedinjenja (Christopher i sar., 2014; Gall i sar., 2018). Svojim enzimima gljive u daljem procesu razgrađuju i te

degradacione produkte. Izvesna količina ovih jedinjenja koja je prisutna u tretmanima sa gljivama potiče jednim delom od degradacije lignina i ukazuje na kontinuitet tog procesa. Drugi deo ovih jedinjenja, koji se može uočiti u vidu pikova koji se ne poklapaju sa pikovima kontrola supstrata, potiče od metabolizma samih gljiva, bilo da je reč o produktima koje gljive luče najčešće kao redoks medijatore enzimske aktivnosti ili je reč o transformaciji degradacionih produkata ligninskih komponenti enzimskom aktivnošću.

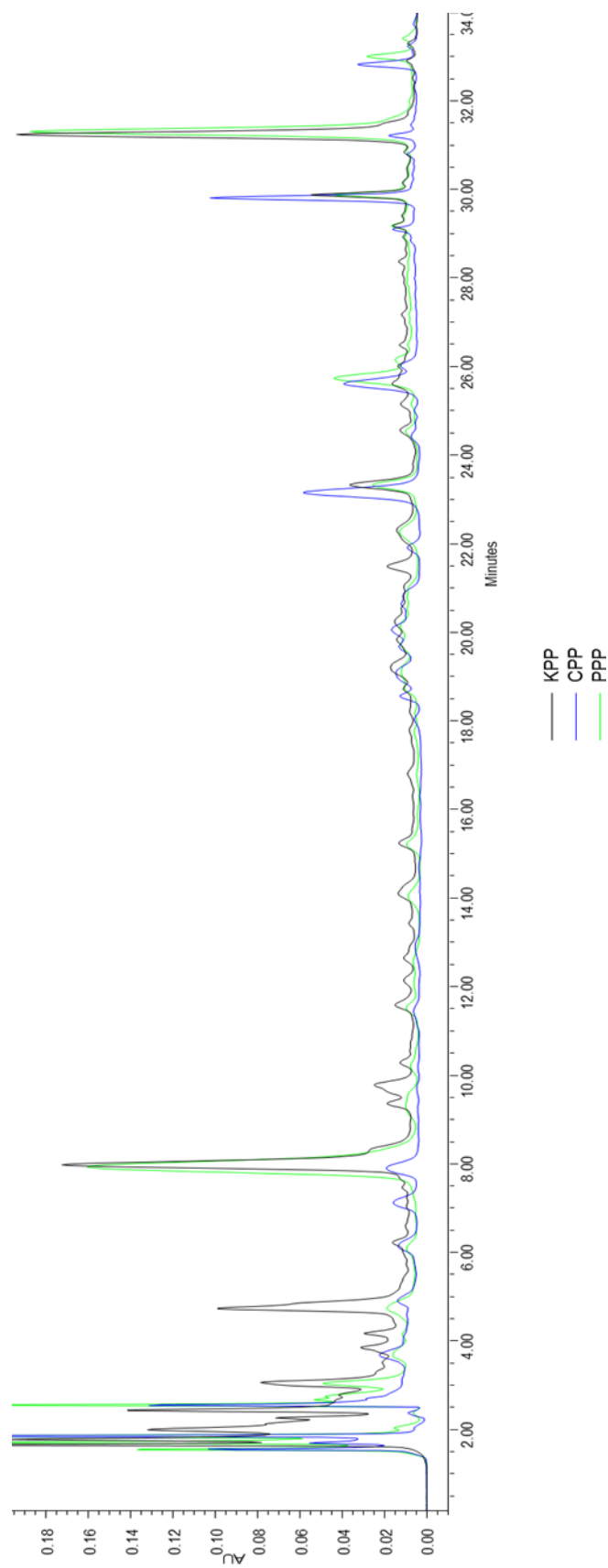
Kada su u pitanju eksperimentalni tretmani sa ćelijskim zidovima (grafik 7.10., 7.11. i 7.12.) može se uočiti veoma sličan trend kao i kod tretmana sa piljevinom. Najveće količine i najveća raznovrsnost fenolnih jedinjenja se mogu uočiti u kontrolama supstrata (KQW, KPW i KSW), ali je njihova raznovrsnost i količina ipak manja u poređenju sa kontrolama piljevine, što je u skladu sa očekivanjima, s obzirom na proceduru izolacije ćelijskih zidova u toku koje se vrše višestruka ispiranja svih rastvorljivih komponenti lignocelulozne biomase. U tretmanima sa gljivama je uočljivo da su raznovrsnost i količine fenolnih jedinjenja značajno manje što ukazuje na njihovu razgradnju.

Rezultati HPLC analize jasno pokazuju da se značajna količina fenolnih jedinjenja oslobodila iz DHP-a (KDHP, grafik 7.13.). U eksperimentalnim tretmanima sa gljivama (CDHP i PDHP) raznovrsnost i količine ovih jedinjenja su značajno manje, što jasno ukazuje da su gljive skoro u potpunosti razgradile ova jedinjenja.

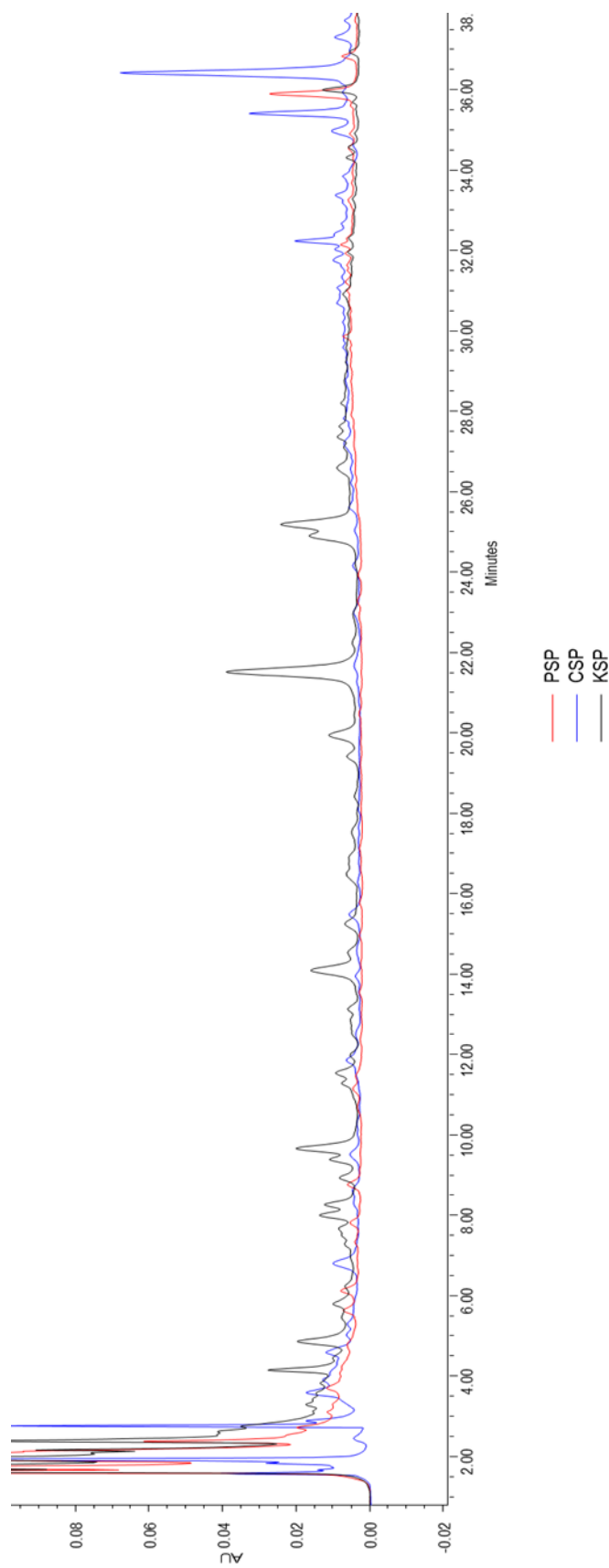
Rezultati dobijeni HPLC analizom su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim merenjem ukupnog sadržaja fenola.



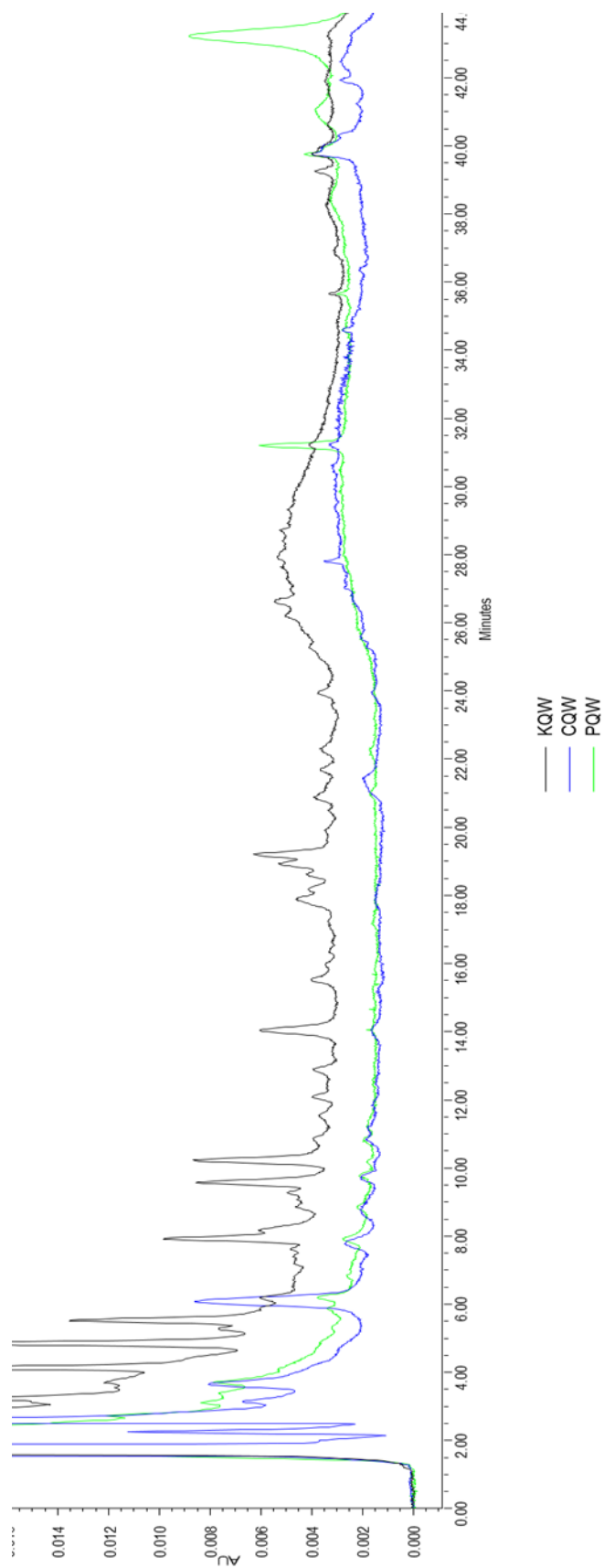
Grafik 7.7. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa piljevinom hrasta (KQP – kontrola piljevine hrasta u mineralnom medijumu, CQP – *C. aegerita* u medijumu sa piljevinom hrasta i PQP – *P. ostreatus* u medijumu sa piljevinom hrasta)



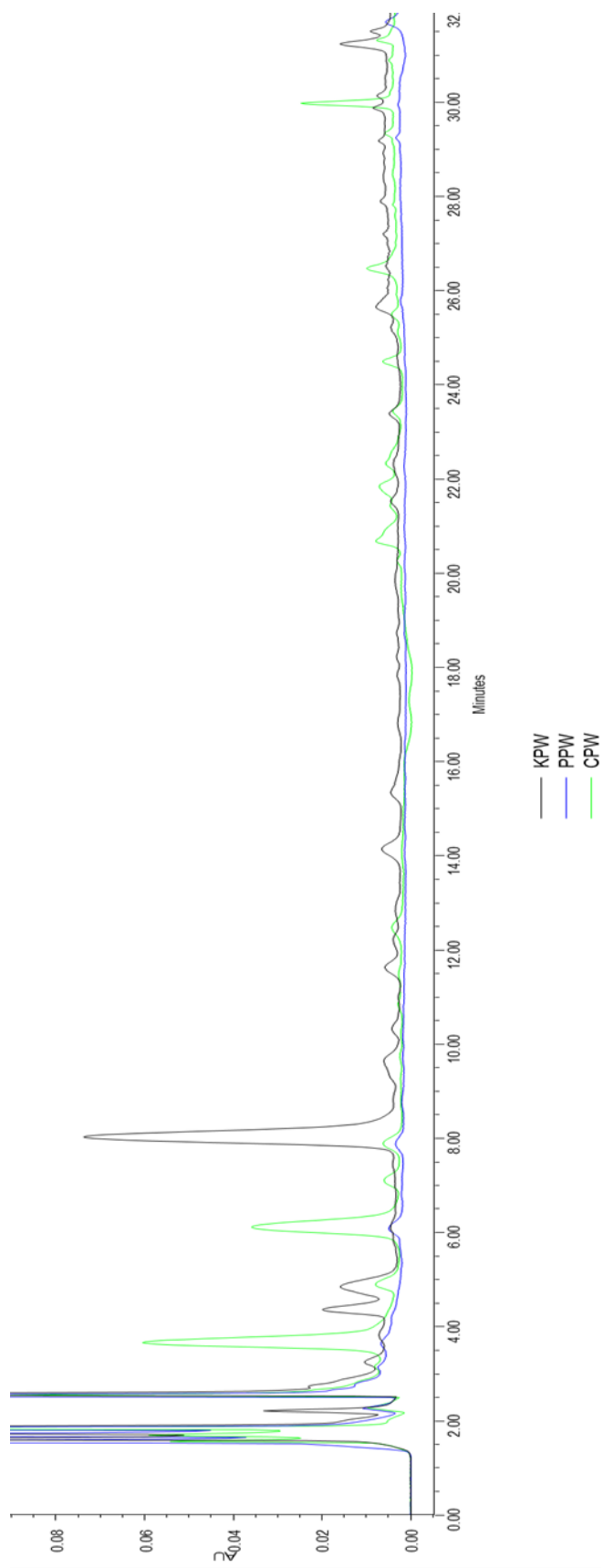
Grafik 7.8. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa piljevinom topole (KPP – kontrola piljevine topole u mineralnom medijumu, CPP – *C. aegerita* u medijumu sa piljevinom topole i PPP – *P. ostreatus* u medijumu sa piljevinom topole)



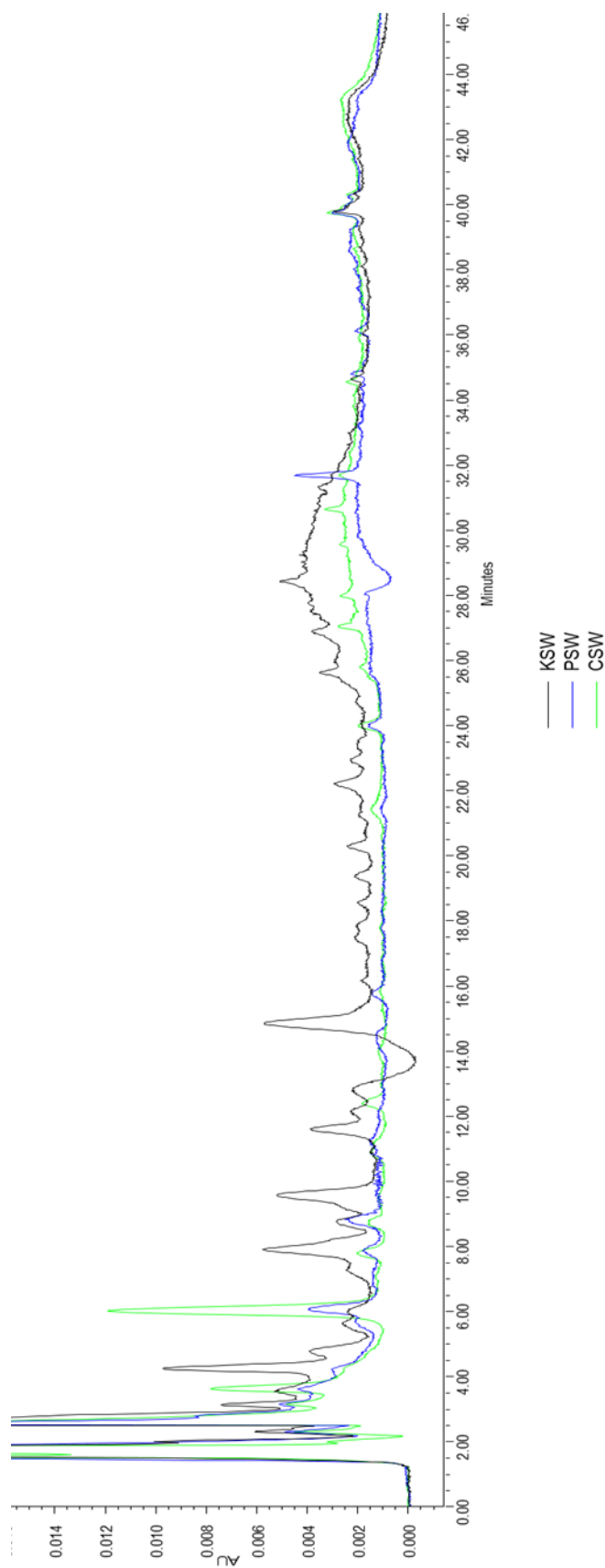
Grafik 7.9. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa piljevinom smrče (KSP – kontrola piljevine smrče u mineralnom medijumu, CSP – *C. aegerita* u medijumu sa piljevinom smrče i PSP – *P. ostreatus* u medijumu sa piljevinom smrče)



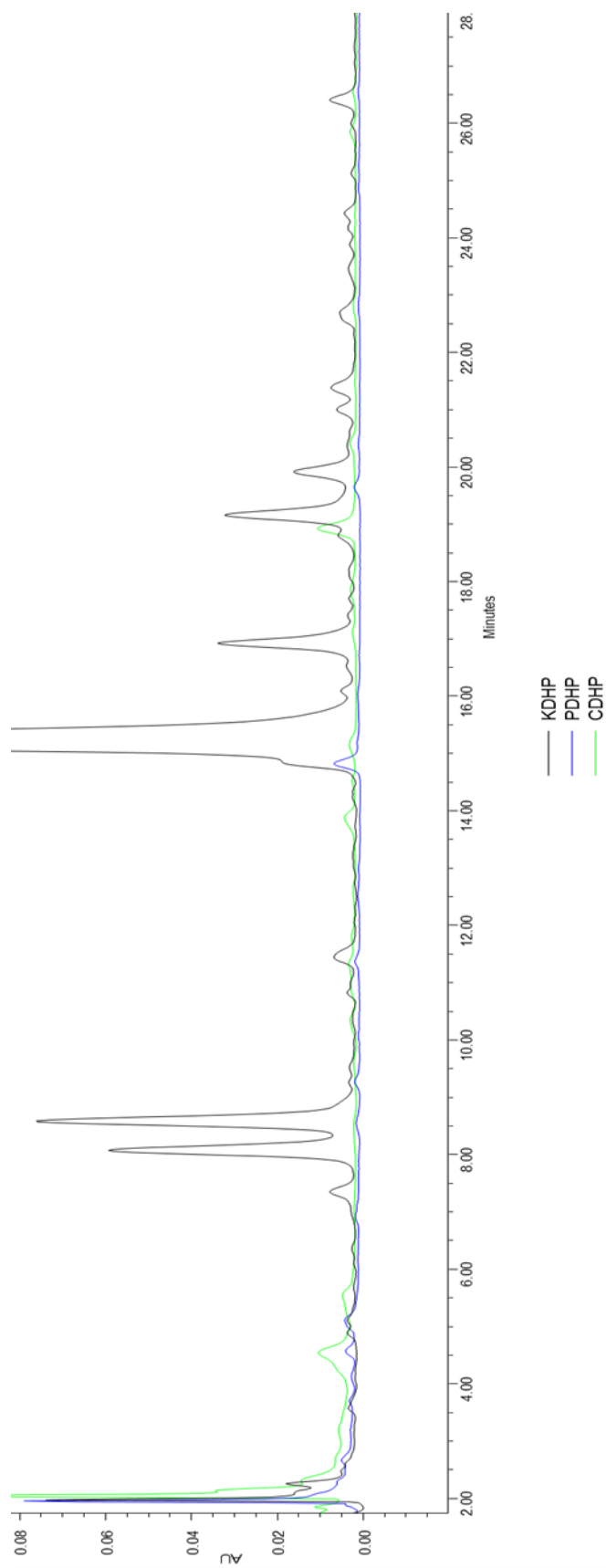
Grafik 7.10. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima hrasta (KQW – kontrola izolovanih ćelijskih zidova hrasta u mineralnom medijumu, CQW – *C. aegerita* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima hrasta i PQW – *P. ostreatus* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima hrasta)



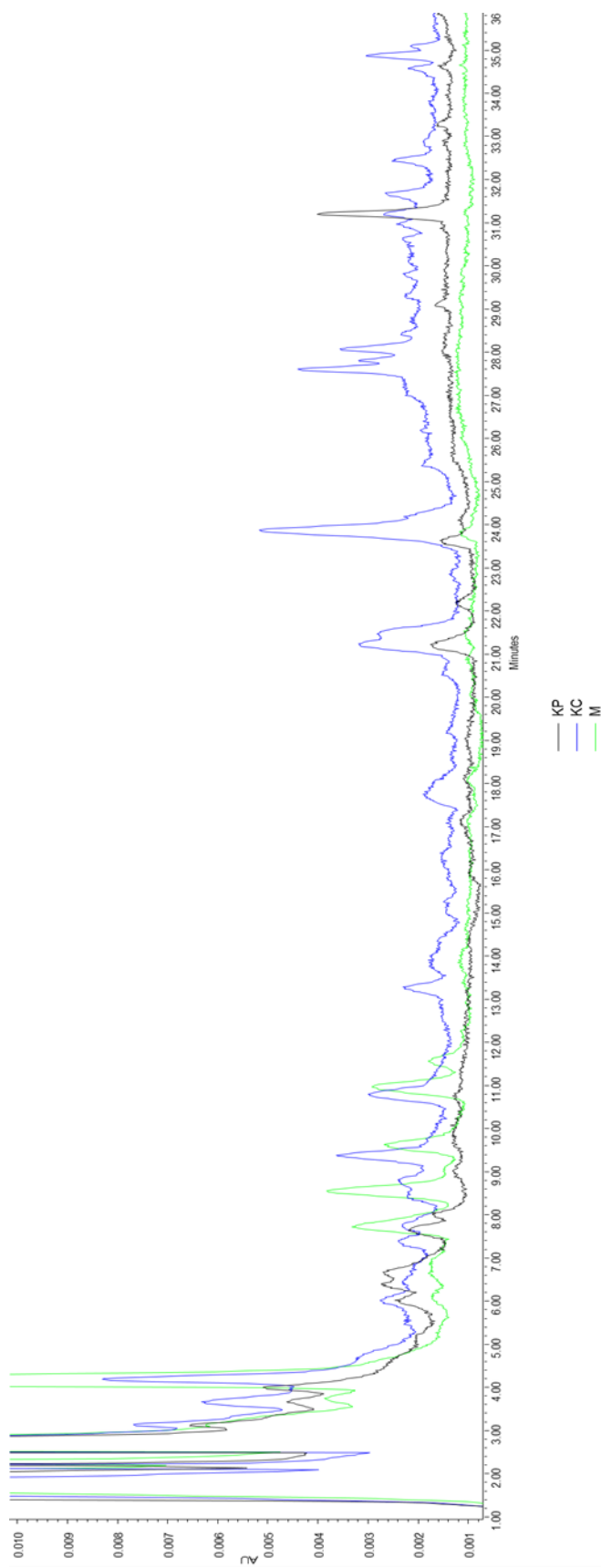
Grafik 7.11. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima topole (KPW – kontrola izolovanih ćelijskih zidova topole u mineralnom medijumu, CPW – *C. aegerita* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima topole i PPW – *P. ostreatus* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima topole)



Grafik 7.12. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima smrče (KSW – kontrola izolovanih ćelijskih zidova smrče u mineralnom medijumu, CSW – *C. aegerita* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima smrče i PSW – *P. ostreatus* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima smrče)



Grafik 7.13. – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa DHP-om (KDHP – kontrola DHP u mineralnom medijumu, CDHP – *C. aegerita* u medijumu sa DHP-om i PDHP – *P. ostreatus* u medijumu sa DHP-om)



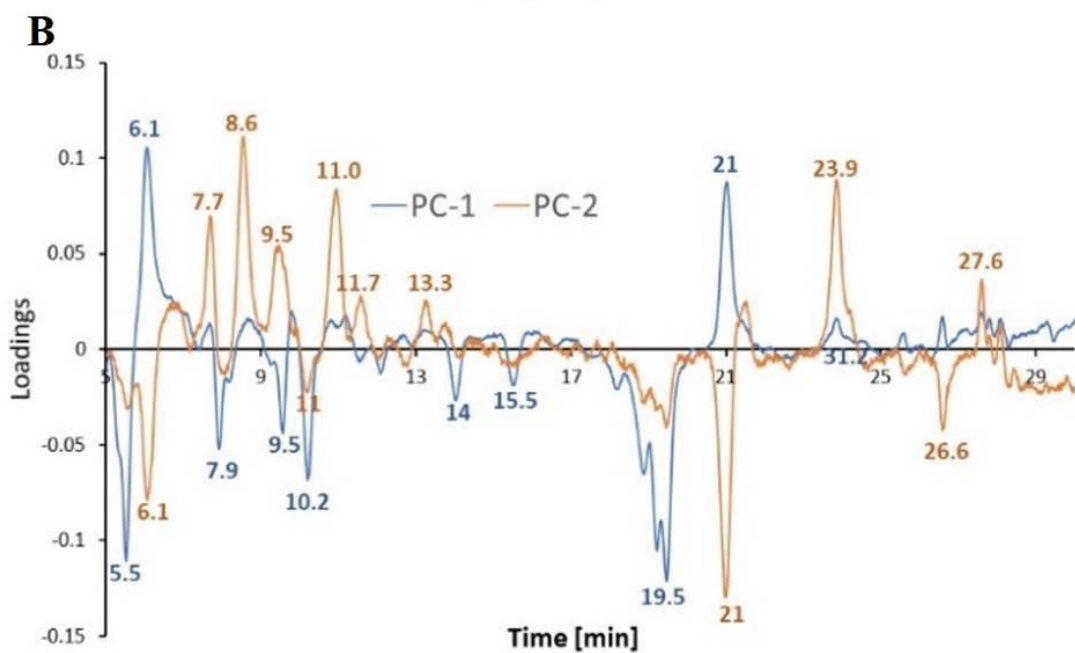
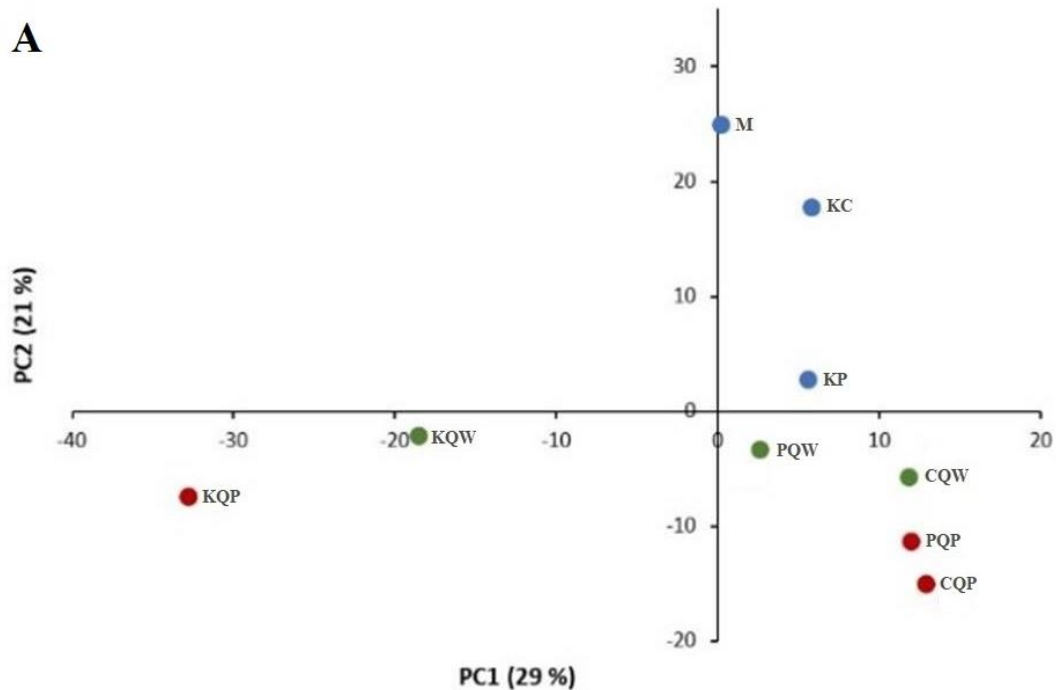
Grafik 7.14. – Hromatogram fenolnih profila kontrola gljiva i medijuma (M – kontrola mineralnog medijuma, KC – *C. aegerita* u mineralnom medijumu i KP – *P. ostreatus* u mineralnom medijumu)

7.10. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA)

PCA analiza je primenjena u cilju uočavanja sličnosti u hemijskom sastavu među uzorcima koji su analizirani HPLC metodom, pre svega u cilju diferencijacije fenolnih jedinjenja male molekulske mase u različitim eksperimentalnim tretmanima. Metoda je primenjena na hromatograme fenolnih profila uzoraka eksperimentalnih tretmana sa hrastom koji su dobijeni kao rezultat HPLC analize, gde su u analizi korišćena retencionna vremena od 3 do 40 min. Rezultati PCA analize su prikazani na grafiku 7.15. Glavne komponente PC1 i PC2 opisuju 50% ukupnih varijacija, pri čemu se 29% odnosi na PC1, a 21% se odnosi na PC2.

PC2 jasno razlikuje uzorke eksperimentalnih tretmana u kojima se nalaze fenolna jedinjenja poreklom samo od gljiva (kontrolne gljiva KC i KP i mineralni medijum M koji sadrži ekstrakt kvasca) od svih ostalih eksperimentalnih tretmana koji sadrže biljni materijal. Najmanja količina i raznovrsnost ovih jedinjenja je u kontroli sa vrstom *P. ostreatus* (KP).

PC1 jasno razlikuje eksperimentalne tretmane u kojima se u mineralnom medijumu nalazi samo biljni materijal (kontrolne supstrata piljevine hrasta KQP i izolovanih ćelijskih zidova hrasta KQW) od svih ostalih eksperimentalnih tretmana. Postoji sličnost u sastavu fenolnih jedinjenja oslobođenih u medijumu iz piljevine hrasta i izolovanih ćelijskih zidova hrasta, ali je količina i raznovrsnost ovih jedinjenja značajno veća u kontroli piljevine hrasta (KQP). Na osnovu rezultata PCA analize jasno se može zaključiti da u kontrolama navedenih supstrata nema fenolnih jedinjenja koja su poreklom od gljiva. Na osnovu prikaza rezultata PCA analize može se uočiti grupisanost uzoraka eksperimentalnih tretmana sa gljivama na biljnom materijalu, što ukazuje na produkciju veoma sličnih degradacionih produkata lignina. Može se uočiti da je količina i raznovrsnost fenolnih jedinjenja značajno veća u tretmanima sa piljevinom hrasta (CQP i PQP) u odnosu na tretmane sa izolovanim ćelijskim zidovima hrasta (CQW i PQW). Iako postoji sličnost u sastavu fenolnih jedinjenja, značajno veća raznovrsnost se može uočiti u tretmanima sa vrstom *C. aegerita*. Najmanja količina i raznovrsnost fenolnih jedinjenja je zabeležena u eksperimentalnom tretmanu sa *P. ostreatus* u medijumu sa izolovanim ćelijskim zidovima hrasta (PQW), što jasno ukazuje da ova vrsta veoma efikasno i neselektivno razgrađuje fenolna jedinjenja.



Grafik 7.15. – Prikaz rezultata analize glavnih komponenti (PCA) hromatograma različitih eksperimentalnih tretmana sa piljevinom i ćelijskim zidovima hrasta – A i prikaz opterećenja koji pokazuje koje varijable uglavnom definišu prve dve glavne komponente – B (M – mineralni medijum, KC – kontrola *C. aegerita*, KP – kontrola *P. ostreatus*, kontrole supstrata piljevine hrasta – KQP i ćelijskih zidova hrasta – KQW, *C. aegerita* na piljevini hrasta – CQP i ćelijskim zidovima hrasta – CQW i *P. ostreatus* na piljevini hrasta – PQP i ćelijskim zidovima hrasta – PQW).

7.11. Analiza rezultata kontrola gljiva i medijuma

Na osnovu merenja ukupnog sadržaja fenola (grafik 7.5.), PCA i HPLC analize (grafik 7.14. i 7.15.) jasno je utvrđeno prisustvo fenolnih jedinjenja u mineralnom medijumu (M). S obzirom na sastav medijuma, fenolna jedinjenja mogu poticati jedino od ekstrakta kvasca. Obe vrste istraživanih gljiva su razgrađivale neka od ovih jedinjenja, ali značajno veći stepen razgradnje se može uočiti kod vrste *P. ostreatus* (KP). Ovaj rezultat je u skladu i sa izmerenim aktivnostima enzima. Za razliku od *C. aegerita* koja u kontroli (KC) nije produkovala ligninolitičke enzime (detektovana je samo izuzetno mala aktivnost mangan peroksidaze koja nije statistički značajna), *P. ostreatus* je produkovala manje količine lakaze i mangan peroksidaze (grafik 7.1. i 7.2.).

Na grafiku 7.14. se jasno mogu uočiti brojni pikovi u kontrolama gljiva koji ne postoje u kontroli medijuma što jasno ukazuje na produkciju fenolnih jedinjenja od strane istraživanih vrsta gljiva, pri čemu su količine i raznovrsnost ovih jedinjenja značajno veće u slučaju vrste *C. aegerita* (grafik 7.15.), a što potvrđuju i rezultati merenja ukupnog sadržaja fenola.

7.12. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa piljevinom hrasta

Za vreme sterilizacije i inkubacije u trajanju od 14 dana, došlo je do oslobađanja značajnih količina raznovrsnih fenolnih jedinjenja iz piljevine hrasta u medijum, što je utvrđeno merenjem ukupnog sadržaja fenola (grafik 7.5) i potvrđeno HPLC analizom (grafik 7.7.). Količine ovih jedinjenja su značajno niže u eksperimentalnim tretmanima sa obe vrste gljive, pri čemu su nešto niže kod vrste *P. ostreatus*. Obe vrste su produkovale sve tri vrste ligninolitičkih enzima (grafik 7.1., 7.2. i 7.3.) koje su praćene u ovom istraživanju, ali je zabeležena izuzetno velika razlika u enzimatskoj aktivnosti.

Kod vrste *C. aegerita* (CQP) zabeležena je mala aktivnost svih enzima, što očigledno nije bilo dovoljno za depolimerizaciju značajnije količine lignina. Ovo potvrđuju i dobijeni rezultati merenja sadržaja lignina acetil bromidnim testom (grafik 7.4.) koji ukazuju da nema statistički značajne razlike u sadržaju lignina piljevine hrasta u odnosu na kontrolu. S druge strane, *P. ostreatus* je produkovala velike količine enzima i zabeležene su veoma visoke aktivnosti sva tri enzima (PQP). Rezultati merenja

sadržaja lignina acetil bromidnim testom jasno pokazuju statistički značajno smanjenje sadržaja lignina u piljevini hrasta. S obzirom da su merenja vršena nakon samo 14 dana inkubacije, nameće se zaključak da je vrsta *P. ostreatus* sposobna za veoma brzu i efikasnu razgradnju ponuđenog supstrata.

7.13. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa piljevinom topole

Velika količina raznovrsnih fenolnih jedinjenja je utvrđena u kontroli supstrata piljevine topole (KPP) na osnovu rezultata merenja ukupnog sadržaja fenola (grafik 7.5.) i HPLC analize (grafik 7.8.).

Utvrđena je značajno manja raznovrsnost i količina ovih jedinjenja u eksperimentalnom tretmanu sa vrstom *C. aegerita* (CPP). U ovom tretmanu su registrovane izuzetno visoke aktivnosti enzima lakaze i mangan peroksidaze (grafik 7.1. i 7.2.), dok aktivnost lignin peroksidaze nije zabeležena (grafik 7.3.). Međutim, i pored jako visoke aktivnosti dva ligninolitička enzima, acetil bromidnim testom nije utvrđena statistički značajna promena u količini lignina u piljevini topole u odnosu na kontrolu supstrata. Drvo topole je prirodni supstrat za vrstu *C. aegerita*, ona se u prirodi najčešće javlja upravo na korenovima i panjevima različitih vrsta topola i vrba (Uhart i Albertó, 2007), pa bi se mogla očekivati upravo najveća efikasnost razgradnje ovog supstrata produkcijom visokih aktivnosti svih ligninolitičkih enzima. Produkcija lignin peroksidaze od strane ove vrste je zabeležena u prethodnim istraživanjima (Shantaveera Swamy i Ramalingappa, 2015; Vipotnik i sar., 2021), aktivnost ovog enzima je konstatovana i u ovom istraživanju, ali na drugim supstratima. U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da *C. aegerita* u inicijalnoj fazi razvoja razgrađuje polisaharidne komponente biomase, kao i manje količine oslobođenih aromatičnih jedinjenja, a da do značajnije razgradnje lignina dolazi tek u kasnijim fazama razvoja (Liers i sar., 2011). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da enzimatski sistem vrste *C. aegerita* nije dovoljno efikasan za brzu depolimerizaciju lignina.

Vrlo su interesantni rezultati dobijeni za eksperimentalni tretman sa vrstom *P. ostreatus* na piljevini topole (PPP), koji ukazuju na potpuno drugačiju strategiju razgradnje ovog supstrata. U ovom tretmanu merenjem ukupnog sadržaja fenola (grafik 7.5.) registrovana je velika količina fenolnih jedinjenja uporediva sa količinom ovih

jedinjenja u kontroli supstrata. Hromatogram ovog tretmana dobijen HPLC analizom pokazuje značajno poklapanje sa hromatogramom kontrole supstrata (grafik 7.8.). Dobijeni rezultati ukazuju da *P. ostreatus* uopšte nije razgrađivala fenolna jedinjenja u ovom eksperimentalnom tretmanu. Dodatni dokaz za ovakvo tumačenje dobijenih rezultata predstavlja i činjenica da ova gljiva u ovom tretmanu nije proizvela ni lakazu ni mangan peroksidazu, enzime koji su odgovorni za razgradnju pre svega fenolnih komponenti lignina. Međutim, registrovana je visoka aktivnost enzima lignin peroksidaze, odnosno, u slučaju *P. ostreatus* verzatilne peroksidaze (Grafik 7.3.). Prethodna istraživanja ukazuju na izvesnu selektivnost vrste *P. ostreatus* u izboru supstrata, koja radije izvlači nutrijente razlaganjem aromatičnih komponenti lignina, nego iz polisaharidnih komponenti (Bezalel i sar., 1996; Hadar i sar., 1993). Čini se da je ta selektivnost registrovana i u ovom slučaju i da je možda otišla i korak dalje, jer je usled visoke aktivnosti ovog enzima razgrađivala uglavnom samo nefenolne komponente lignina, dok su fenolne komponente ostale gotovo netaknute. Međutim, i pored visoke aktivnosti ovog enzima, acetil bromidnim testom nije registrovana statistički značajna promena sadržaja lignina u piljevini topole. Izgleda da visoka aktivnost samo ovog jednog enzima ipak nije dovoljna za rapidnu depolimerizaciju lignina.

7.14. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa piljevinom smrče

Kao i u prethodnim slučajevima sa piljevinom hrasta i topole, i u slučaju eksperimentalnih tretmana sa piljevinom smrče u kontroli supstrata (KSP) su registrovane visoke koncentracije raznovrsnih fenolnih jedinjenja merenjem ukupnog sadržaja fenola (grafik 7.5.) i HPLC analizom (grafik 7.9.). Značajno je manja količina i raznovrsnost ovih jedinjenja u tretmanima sa gljivama, pri čemu je u slučaju vrste *P. ostreatus* statistički značajno manja količina ovih jedinjenja u odnosu na tretman sa *C. aegerita*.

U tretmanu sa vrstom *C. aegerita* (CSP) je registrovana izuzetno visoka aktivnost enzima lakaze, znatno veća nego kod *P. ostreatus*, nešto manja aktivnost mangan peroksidaze, dok je samo u tragovima registrovana aktivnost lignin

peroksidaze, koja nije statistički značajna. Nije registrovano statistički značajno smanjenje sadržaja lignina u piljevini smrče acetyl bromidnim testom.

Produkcija enzima u tretmanu sa vrstom *P. ostreatus* (PSP) je bila izuzetno visoka i zabeležena je aktivnost sva tri enzima koja su praćena u ovom istraživanju. Izmerene vrednosti aktivnosti enzima su uporedive sa produkcijom enzima u eksperimentalnom tretmanu sa piljevinom hrasta. Međutim, i pored visoke aktivnosti sva tri enzima, acetyl bromidnim testom nije registrovana statistički značajna promena sadržaja lignina u piljevini smrče u odnosu na kontrolu supstrata. Većina vrsta gljiva izazivača bele truleži se u prirodi razvija na tvrdom drvetu skrivenosemenica, veoma retko se javljaju i izuzetno su retke vrste koje se isključivo razvijaju na mekom drvetu četinara, kakvo karakteriše i smrču. Lignin mekog drveta četinara je izgrađen u najvećem procentu od monomera koniferil alkohola, koji omogućuje stvaranje znatno razgranatijih polimera lignina u odnosu na lignin tvrdog drveta i ima znatno veći udeo C-C veza (Liao i sar., 2020). Meko drvo četinara ima veći procenat lignina koji je kompaktniji i ima znatno manje pore (MacDonald i sar., 2011), što utiče na njegovu veću stabilnost i težu i sporiju razgradnju. Zato i pored visoke produkcije ligninolitičkih enzima nije detektovana brza razgradnja lignina u piljevini smrče.

7.15. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima hrasta

Iako je tokom procedure izolacije ćelijskih zidova biljni materijal višestruko ispiran, tokom sterilizacije i inkubacije u trajanju od 14 dana došlo je do oslobađanja značajnih količina fenolnih jedinjenja iz izolovanih ćelijskih zidova hrasta u medijumu (KQW), ali koje su ipak značajno niže u poređenju sa tretmanom sa piljevinom hrasta (grafik 7.5.). Obe vrste gljiva su produkovale sve tri vrste ligninolitičkih enzima i uspešno razgrađivale ova jedinjenja (grafik 7.1., 7.2., 7.3. i 7.10.).

U eksperimentalnom tretmanu sa vrstom *C. aegerita* (CQW) izmerene su relativno niske aktivnosti lakaze i mangan peroksidaze, ali i nešto veća aktivnost enzima lignin peroksidaze. Nije registrovana statistički značajna promena sadržaja lignina u izolovanim ćelijskim zidovima hrasta u odnosu na kontrolu supstrata acetyl bromidnim testom. *C. aegerita* je uspešno razgrađivala u medijumu rastvorena fenolna jedinjenja,

ali nije uspela da u kratkom vremenskom periodu degradira lignin u količini koja bi se mogla detektovati acetil bromidnim testom.

Izuzetno visoka aktivnost svih enzima je konstatovana u eksperimentalnom tretmanu sa vrstom *P. ostreatus* (PQW). Produkcija svih enzima u ovom tretmanu sa izolovanim ćelijskim zidovima hrasta je statistički značajno veća u odnosu na tretman sa piljevinom hrasta. Moguće objašnjenje ovako visoke aktivnosti enzima mogla bi biti veća izloženost lignocelulozne biomase koja je u procesu višestrukog ispiranja oslobođena od različitih ekstrakta i usled toga je podložnija lakšem napadu enzima (Stefanović i sar., 2023). Acetil bromidnim testom je registrovano statistički značajno smanjenje sadržaja lignina u izolovanim ćelijskim zidovima hrasta. Kao i u slučaju sa piljevinom hrasta i u ovom eksperimentalnom tretmanu je detektovana sposobnost rapidne depolimerizacije lignina od strane vrste *P. ostreatus*.

7.16. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima topole

U kontroli supstrata sa izolovanim ćelijskim zidovima topole (KPW) je konstatovano prisustvo različitih fenolnih jedinjenja (grafik 7.5. i 7.11.), ali je njihova raznovrsnost i količina značajno niža u poređenju sa tretmanom sa piljevinom topole. U tretmanima sa gljivama količina i raznovrsnost ovih jedinjenja je značajno manja, posebno u slučaju vrste *P. ostreatus*.

U eksperimentalnom tretmanu sa vrstom *C. aegerita* (CPW) izmerene su iznenađujuće niske aktivnosti enzima lakaze i mangan peroksidaze, višestruko manje u odnosu na rekordne aktivnosti ovih enzima u tretmanu sa piljevinom topole. Aktivnost lignin peroksidaze nije registrovana, kao i u slučaju tretmana sa piljevinom topole. Ključna razlika između medijuma sa piljevinom topole i izolovanim ćelijskim zidovima topole je u značajno manjoj raznovrsnosti fenolnih i drugih u medijumu rastvorenih jedinjenja koja su uklonjena u procesu izolacije ćelijskih zidova. Moguće je da neka od tih jedinjenja deluju stimulatивно na produkciju ligninolitičkih enzima ili funkcionišu kao redoks medijatori njihove aktivnosti, pa bi odsustvo tih jedinjenja u tretmanu sa izolovanim ćelijskim zidovima topole moglo biti objašnjenje male enzimatske aktivnosti u ovom tretmanu. Na hromatograma ovog tretmana (CPW, grafik 7.11.) jasno se može uočiti produkcija nekoliko fenolnih jedinjenja od strane vrste *C. aegerita* koja

nisu bila prisutna u kontroli supstrata, a od kojih bi neka možda imala ulogu redoks medijatora u kasnijoj fazi depolimerizacije ligninskih komponenti. Usled male aktivnosti enzima potpuno je očekivan rezultat acetil bromidnog testa koji nije registrovao promene u sadržaju lignina u izolovanim ćelijskim zidovima topole. Rezultati ovog tretmana sa izolovanim ćelijskim zidovima potvrđuju tezu da je *C. aegerita* u inicijalnoj fazi napada na biomasu fokusirana pre svega na razgradnju polisaharidnih komponenti biomase.

Rezultati koji su dobijeni za tretman sa vrstom *P. ostreatus* (PPW) na prvi pogled se značajno razlikuju od rezultata tretmana sa piljevinom topole. U tretmanu sa piljevinom topole *P. ostreatus* je proizvela samo enzim lignin peroksidazu (odnosno verzatilnu peroksidazu), registrovana je jako visoka aktivnost ovog enzima i uočena je potpuno drugačija strategija razgradnje biomase, jer nije bilo razgradnje fenolnih komponenti. I u ovom tretmanu je registrovana visoka produkcija istog enzima, ali su registrovane i veoma visoke aktivnosti enzima lakaze i mangan peroksidaze. I pored izmerenih visokih aktivnosti sva tri enzima, acetil bromidnim testom nije registrovana rapidna depolimerizacija lignina, s obzirom da nema statistički značajnog smanjenja sadržaja lignina u izolovanim ćelijskim zidovima topole u odnosu na kontrolu supstrata. Moguće je da je i u slučaju ovog supstrata, kao i u slučaju gde je supstrat bila piljevina topole, vršena samo razgradnja nefenolnih komponenti lignina, dok su lakaza i mangan peroksidaza obavljale razgradnju pre svega fenolnih komponenti rastvorenih u medijumu. Ovome u prilog ide činjenica da hromatogram ovog tretmana (PPW, grafik 7.11.) izgleda gotovo kao potpuno ravna linija što ukazuje da su gotovo sva fenolna jedinjenja skoro u potpunosti razgrađena.

7.17. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima smrče

Kao i u slučaju sa drugim tretmanima sa ćelijskim zidovima, i u kontroli sa izolovanim ćelijskim zidovima smrče (KSW) registrovane su značajne količine fenolnih jedinjenja, ali koje su ipak značajno manje u odnosu na tretmane sa piljevinom (grafik 7.5. i 7.12.) . Sadržaj ovih jedinjenja je značajno manji u tretmanima sa gljivama, a posebno u slučaju vrste *P. ostreatus*.

Obe gljive su produkovale enzime lakazu i mangan peroksidazu, pri čemu su izmerene aktivnosti ovih enzima značajno veće u eksperimentalnom tretmanu sa vrstom *P. ostreatus*, kod koje je u tragovima zabeležena i aktivnost lignin peroksidaze, odnosno verzatilne peroksidaze. Raznovrsnost i količina fenolnih jedinjenja su u skladu sa očekivanjima prema produkciji enzima, pa su vrednosti merenja ukupnog sadržaja fenola značajno niže u slučaju vrste *P. ostreatus*. Acetil bromidnim testom nije registrovano statistički značajno smanjenje sadržaja lignina u izolovanim ćelijskim zidovima smrče, ni u tretmanu sa vrstom *C. aegerita*, ni u tretmanu sa *P. ostreatus*. Kod obe vrste gljiva u ovim tretmanima su registrovane značajno manje aktivnosti svih enzima u poređenju sa tretmanima sa piljevinom smrče. Razgradnja mekog drveta četinara gljivama izazivačima bele truleži je zbog prirode lignina nešto sporija (Liao i sar., 2020; MacDonald i sar., 2011), a čini se da je razgradnja izolovanih ćelijskih zidova dodatno otežana usled odsustva različitih jedinjenja, među kojima ima potencijalnih redoks medijatora, a koja su eliminisana u procesu ispiranja u proceduri izolacije ćelijskih zidova.

7.18. Analiza rezultata eksperimentalnih tretmana sa DHP-om

U kontroli supstrata sa sintetičkim polimerom DHP-om (KDHP) nakon sterilizacije i inkubacije od 14 dana u medijumu je konstatovano prisustvo značajnih količina fenolnih jedinjenja merenjem ukupnog sadržaja fenola (grafik 7.5.) i HPLC analizom (grafik 7.13.). Obe vrste gljiva su efiksno razgrađivale ova jedinjenja, pri čemu rezultat merenja ukupnog sadržaja fenola pokazuje da je u tretmanu sa vrstom *P. ostreatus* (PDHP) značajno manji sadržaj ovih jedinjenja. Ni jedna ni druga gljiva nisu produkovale lignin peroksidazu, što ukazuje da ovaj enzim nije neophodan za razgradnju DHP-a. U eksperimentalnom tretmanu sa vrstom *P. ostreatus* su registrovane značajno veće aktivnosti enzima lakaze i mangan peroksidaze (grafik 7.1. i 7.2.) u odnosu na tretman sa vrstom *C. aegerita*. Izmerena aktivnost mangan peroksidaze u tretmanu sa vrstom *C. aegerita* se ne razlikuje statistički značajno u odnosu na aktivnost ovog enzima izmerenu u kontroli gljive, pa se može zaključiti da ni ovaj enzim nije neophodan za razgradnju DHP-a (Stefanović i sar., 2023). Na osnovu dobijenih rezultata nameće se zaključak da je za potpunu razgradnju ovog sintetičkog polimera

dovoljna aktivnost enzima lakaze. Prethodna istraživanja ukazuju da je za efikasnu razgradnju DHP-a neophodna aktivnost enzima lignin peroksidaze i mangan peroksidaze (Hatakka, 1994). Međutim, Eggert i sar. (1996) su u sprovedenom istraživanju sa vrstom *Pycnoporus cinnabarinus* pokazali da enzim lakaza ove vrste može efikasno da razgrađuje ove sintetičke polimere koniferil alkohola i da za njihovu potpunu razgradnju nije neophodna aktivnost drugih ligninolitičkih enzima, koje ova vrsta ne produkuje.

8. ZAKLJUČAK

Mikoremedijacija je biotehnologija koja ima za cilj da pomoću gljiva ukloni zagađenje i otpad iz životne sredine i bazira se na produkciji efikasnih enzima od strane gljiva koji mogu da razgrade raznovrsne zagađujuće materije. Posebno visok mikoremedijacioni potencijal imaju gljive izazivači bele truleži koje proizvode ligninolitičke enzime. Ovi enzimi se odlikuju malom specifičnošću prema supstratu, pa mogu da razgrade i veoma raznovrsne organske zagađujuće materije. Međutim, različite vrste ovih gljiva se međusobno razlikuju i po svojim biorazgradivim sistemima, dok neke proizvode samo jedan, druge proizvode više različitih ligninolitičkih enzima, a njihova aktivnost varira i u zavisnosti od uslova životne sredine, što uslovljava postojanje značajnih razlika u mikoremedijacionim potencijalima različitih vrsta gljiva.

U ovom istraživanju su poređena dva autohtona soja gljiva izazivača bele truleži, *Cyclocybe aegerita* Ser 1 i *Pleurotus ostreatus* Ser 1, poreklom iz ravničarskih šuma Srbije, u cilju procene njihovih mikoremedijacionih potencijala. U toku istraživanja urađena je analiza DNK istraživanih sojeva u cilju potvrde njihovog taksonomskog statusa i dobijeni rezultati su potvrdili da su obe vrste korektno identifikovane. Kulture micelija istraživanih vrsta gljiva su uspešno umnožavane i održavane na različitim čvrstim podlogama u petri kutijama. U eksperimentu su kulture micelija inkubirane 14 dana na 30°C u tečnom mineralnom medijumu sa dodatkom različitih supstrata, komponentama biljne biomase od različitih drvenastih vrsta i registrovan je optimalan i ujednačen porast micelija u svim eksperimentalnim tretmanima. U istraživanju je praćena produkcija i aktivnost ligninolitičkih enzima, njihova sposobnost degradacije različitih fenolnih jedinjenja male molekulske mase i sposobnost brze razgradnje lignina *in vitro* u tečnim kulturama na različitim supstratima.

Prema rezultatima koji su dobijeni u ovom istraživanju može se konstatovati da su obe vrste istraživanih gljiva u eksperimentalnim uslovima proizvodile efikasne enzime koji imaju ulogu u razgradnji lignocelulozne biomase. Mogu se zapaziti izuzetno velike kvalitativne i kvantitativne razlike u aktivnosti proizvedenih ligninolitičkih enzima kod ove dve vrste gljiva. Kod vrste *C. aegerita* je uočljiva izuzetno velika varijabilnost u produkciji sva tri ligninolitička enzima koja su praćena u ovom istraživanju u zavisnosti od supstrata. Postoje značajno manje oscilacije u

aktivnosti ovih enzima kod vrste *P. ostreatus*, njihova produkcija je značajno stabilnija, a zabeležena je značajna produkcija enzima čak i u odsustvu supstrata, za razliku od vrste *C. aegerita*. *P. ostreatus* je proizvela lignin peroksidazu, odnosno verzatilnu peroksidazu u svim eksperimentalnim tretmanima sa lignoceluloznom biomasom, dok je produkcija lignin peroksidaze kod vrste *C. aegerita* registrovana samo u tretmanima sa supstratima poreklom od hrasta. Kod obe vrste može se uočiti da postoji značajna korelacija u produkciji enzima lakaza i mangan peroksidaza. U gotovo svim eksperimentalnim tretmanima je zabeležena statistički značajno veća aktivnost svih ligninolitičkih enzima vrste *P. ostreatus* u odnosu na vrstu *C. aegerita*.

Obe vrste su veoma efikasno razgrađivale različita fenolna jedinjenja male molekulske mase koja su se oslobodila iz supstrata i medijuma u toku sterilizacije i inkubacije u trajanju od 14 dana, što se može zaključiti na osnovu merenja ukupnog sadržaja fenola. Međutim, može se jasno uočiti da je količina i raznovrsnost ovih jedinjenja u eksperimentalnim tretmanima sa vrstom *P. ostreatus* značajno manja u odnosu na tretmane sa vrstom *C. aegerita*, što upućuje na zaključak da je ova vrsta efikasnije razgrađivala ova jedinjenja. Registrovana je veća raznovrsnost i količina fenolnih jedinjenja koja su produkti micelija gljiva u tretmanima sa vrstom *C. aegerita*. Ostaje pitanje da li je micelija *C. aegerita* zaista proizvela veće količine ovih jedinjenja od *P. ostreatus*, ili je njihovo povećano prisustvo registrovano usled sporije degradacije ovih jedinjenja usled slabije aktivnosti ligninolitičkih enzima.

U prethodnim istraživanjima je dokumentovano da *C. aegerita* može efikasno da razgrađuje sve komponente lignocelulozne biomase, uključujući i lignin, kao i različite zagađujuće materije. U ovom istraživanju nisu dobijeni rezultati koji ukazuju na sposobnost razgradnje lignina. Kako je napred već rečeno, ova gljiva u inicijalnoj fazi kolonizacije biomase pre svega razgrađuje polisaharidne komponente, dok se depolimerizacija lignina događa u kasnijim fazama, što potvrđuje i ovo istraživanje. Očigledno je da *C. aegerita* u kratkom vremenskom periodu može efikasno da razgrađuje fenolna jedinjenja i druge produkte oslobođene u medijumu iz supstrata, ali ne i da depolimerizuje lignin u značajnijim količinama.

U eksperimentalnim tretmanima sa vrstom *P. ostreatus*, ne samo da je zabeležena veća degradacija fenolnih jedinjenja, već je registrovana i veoma brza depolimerizacija lignina, a što je posledica značajno veće aktivnosti ligninolitičkih

enzima. Na osnovu svih dobijenih rezultata može se zaključiti da vrsta *P. ostreatus* može efikasno da razgrađuje različita aromatična jedinjenja u kratkom vremenskom periodu, što jasno ukazuje da ova vrsta, za razliku od vrste *C. aegerita*, ima veoma visok mikoremedijacioni potencijal.

U cilju valorizacije registrovanog visokog mikoremedijacionog potencijala soja *P. ostreatus* Ser1 neophodno je u narednoj fazi sprovesti dodatna laboratorijska istraživanja. U tim istraživanjima potrebno je testirati sposobnost degradacije različitih organskih zagađujućih materija uz variranje njihovih koncentracija i uslova sredine. Nakon utvrđivanja koje zagađujuće materije i pod kojim uslovima mogu biti razgrađene primenom ove vrste gljive, može se razmišljati o njenoj praktičnoj primeni u remedijaciji zagađenog zemljišta. Tada je neophodno uraditi probna laboratorijska ispitivanja sa realnim uzorcima zagađenog medijuma, potom, ako se dobiju zadovoljavajući rezultati, može se pristupiti probnom pilot istraživanju na terenu. Ukoliko se dobiju pozitivni rezultati u svim navedenim fazama istraživanja, može se pristupiti mikoremedijacionom tretmanu zagađenog zemljišta i komercijalizaciji biotehnologije.

9. LITERATURA

1. Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I. 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1): 28–39.
2. Adenipekun CO, Lawal R. 2012. Uses of mushrooms in bioremediation: A review, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 7(3): 62–68.
3. Admassu W, Korus RA. 1996. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. In Crawford RL, Crawford DL (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 13–34.
4. Akhtar N, Amin-ul Mannan M. 2020. Mycoremediation: expunging environmental pollutants. *Biotechnology Reports*, 26: e00452.
5. Aleksić J, Dražić G, Vovk Korže A, Milovanović J, Antonijević D, Jovičić D, Dragosavljević Z, Bartula M, Vakanjac B, Adžemović M, Radojević U, Đorđević S, Cvetković D, Mitrović S, Aleksić S, Ninković M, Aleksić D. 2015. *Primenjena ekologija: vodič*, Fakultet za primenjenu ekologiju Futura, Green Limes, Beograd.
6. Anastasi A, Tigini V, Varese GC. 2013. The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi. (In) Goltapeh E, Danesh Y, Varma A. (eds.). *Fungi as Bioremediators. Soil Biology*, vol 32. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 29–49.
7. Anderson C, Juday G. 2016. Mycoremediation of Petroleum: A Literature Review. *Journal of Environmental Science and Engineering A* 5, 397–405.
8. Arantes V, Goodell B. 2014. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. (In) Schultz TP, Goodell B, Nicholas DD. (eds.). *Deterioration and protection of sustainable biomaterials*. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington. pp. 3–21.
9. Arantes V, Jellison J, Goodell B. 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94(2): 323–338.
10. Archibald FS. 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Applied and environmental microbiology*. 58(9): 3110–3116.
11. Arnao, MB, Cano A, Acosta M. 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radic. Res.* 31 (sup1), 89–96.

12. Arora DS, Gill PK. 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7-8): 602–605.
13. Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2): 215–242.
14. Barreca AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P, Ljunggren S. 2003. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2): 105–110.
15. Bartosz G. 2003. Total antioxidant capacity. *Advances in Clinical Chemistry*, 37: 219–292.
16. Beaudette LA, Davies S, Fedorak PM, Ward OP, Pickard MA. 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2020–2025.
17. Becker B, Marin B. 2009. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany*, 103(7): 999–1004.
18. Bezalel LEA, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. 1996. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, 62(7): 2547–2553.
19. Blanchette RA. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*. 73(1): 999–1010.
20. Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1): 519–546.
21. Bonfante P. 2003. Plants, Mycorrhizal Fungi and Endobacteria: a Dialog Among Cells and Genomes. *The Biological Bulletin*. 204(2): 215–220.
22. Boudet AM. 2000. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2): 81–96.
23. Brandt M, Einhenkel-Arle D. 2016. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Harmful to the Environment! Toxic! Inevitable?. *German Environment Agency*, 1-24.
24. Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*. 224(4706): 1434–1436.
25. Bumpus JA. 1989. Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(1): 154–158.

26. Cañas AI, Camarero S. 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28(6): 694–705.
27. Carrier M, Serani AL, Absalon C, Aymonier C, Mench M. 2012. Degradation pathways of holocellulose, lignin and α -cellulose from *Pteris vittata* fronds in sub- and super critical conditions. *Biomass Bioenergy*. 43:65–71.
28. Casciello C, Tonin F, Berini F, Fasoli E, Marinelli F, Pollegioni L, Rosini E. 2017. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin. *Biotechnology Reports*. 13, pp.49-57.
29. Cassidy J. 2023. Bioremediation: An Eco-Friendly Solution for Environmental Pollution. *J Ecosys Ecograph*. 13: 388.
30. Chen M, Sommer A, McClure JW. 2000. Fourier transform-IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings and improved methods for extractive-free cell wall preparation. *Phytochem Anal*. 11: 153–159.
31. Christopher LP, Yao B, Ji Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research*, 2, p.12.
32. Chupungars K, Rerngsamran P, Thaniyavarn S. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp. CU-43 and its fluorene transformation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1): 93–99.
33. Crawford RL. 1981. *Lignin biodegradation and transformation*. John Wiley and Sons, New York.
34. Cribb J. 2017. *Surviving the 21st Century. Humanity's Ten Great Challenges and How We Can Overcome Them*. Springer International Publishing Switzerland.
35. Cunningham SD, Ow DW. 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol*. 110:715–719.
36. Daniel G. 2016. Fungal Degradation of Wood Cell Walls. (In) Kim YS, Funada R, Singh AP. (eds.). *Secondary Xylem Biology - Origins, Functions, and Applications*. Academic Press, Elsevier, pp. 131–167.
37. Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology*. 1(1), p.36.
38. Daughton CG. 2004. PPCPs in the Environment: Future Research - Beginning with the End Always in Mind. In Kuemmerer K (ed.), *Pharmaceuticals in the*

Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Springer Publishers, New York, NY, 33:463–495.

39. Diakumaku E, Gorbushina AA, Krumbein WE, Panina L, Soukharjevski S. 1995. Black fungi in marble and limestones: an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *Science of The Total Environment*. 167(1–3): 295–304.
40. dos Santos JJ, Maranhão LT. 2018. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of Environmental Management*, 210: 104–113.
41. Dragišić Maksimović J, Živanović BD. 2012. Quantification of the Antioxidant Activity in Salt-Stressed Tissues. In Shabala S, Cui T (eds.), *Plant Salt Tolerance. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp 237–250.
42. D'Souza TM, Merritt CS, Reddy CA. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5307–5313.
43. Eckerman I. 2001. *Chemical Industry and Public Health. Bhopal as an Example*. Master of Public Health, Nordic School of Public Health, Göteborg, Sweden.
44. Eggen T, Šašek V. 2002. Use of Edible and Medicinal Oyster Mushroom [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.] Spent Compost in Remediation of Chemically Polluted Soils. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 4(3): 255–261.
45. Eggert C, Temp U, Dean JFD, Eriksson KEL. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*, 391(1-2): 144–148.
46. Faison BD, Kirk TK, Farrell RL. 1986. Role of Veratryl Alcohol in Regulating Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2): 251–254.
47. Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Romero A, Hammel KE, Medrano FJ, Martínez AT. 2014. Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnology for biofuels*. 7(1): 1–23.
48. Fisher AB, Fong SS. 2014. Lignin biodegradation and industrial implications. *AIMS Bioengineering*, 1(2): 92–112.
49. Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martinez AT, Otiillar R, Spatafora JW, Yadav JS, et al. . 2012. The Paleozoic origin of

- enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*. 336: 1715–1719.
50. Freudenberg K, Neish AC. 1968. *Constitution and Biosynthesis of Lignin*. Springer-Verlag Inc., 129. New York.
 51. Frings RA, Maciá-Vicente JG, Buße S, Čmoková A, Kellner H, Hofrichter M, Hennicke F. 2020. Multilocus phylogeny- and fruiting feature-assisted delimitation of European *Cyclocybe aegerita* from a new Asian species complex and related species. *Mycological Progress*, 19: 1001–1016.
 52. Funaoka M. 2013. Sequential transformation and utilization of natural network polymer “Lignin”. *Reactive and Functional Polymers*. 73: 396–404.
 53. Gadd GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*. 111(1): 3–49.
 54. Gall DL, Kontur WS, Lan W, Kim H, Li Y, Ralph J, Donohue TJ, Noguera DR. 2018. In vitro enzymatic depolymerization of lignin with release of syringyl, guaiacyl, and triclin units. *Applied and environmental microbiology*, 84(3), pp.e02076-17.
 55. Gao D, Du L, Yang J, Wu WM, Liang H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1): 70–77.
 56. Garcia-Ruiz E, Mate DM, Gonzalez-Perez D, Molina-Espeja P, Camarero S, Martínez AT, Ballesteros AO, Alcalde M. 2014. Directed Evolution of Ligninolytic Oxidoreductases: from Functional Expression to Stabilization and Beyond. (In) Riva S, Fessner WD. (eds). *Cascade Biocatalysis: Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany, pp. 1–22.
 57. Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 2(2), pp.113-118.
 58. Gayosso-Canales M, Rodríguez-Vázquez R, Esparza-García FJ, Bermúdez-Cruz RM. 2012. PCBs stimulate laccase production and activity in *Pleurotus ostreatus* thus promoting their removal. *Folia Microbiologica*, 57(2): 149–158.
 59. Goodell B, Qian Y, Jellison J. 2008. Fungal Decay of Wood: Soft Rot-Brown Rot-White Rot. (In) Schultz TP, Militz H, Freeman MH, Goodell B, Nicholas DD. (eds.). *Development of Commercial Wood Preservatives*, Vol. 982, ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington. pp. 9–31.

60. Guo YJ, Deng GF, Xu XR, Wu S, Li S, Xia EQ, Li F, Chen F, Ling WH, Li HB. 2012. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food & Function*, 3(11): 1195.
61. Gupta DK, Rühl M, Mishra B, Kleofas V, Hofrichter M, Herzog R, Pecyna MJ, Sharma R, Kellner H, Hennicke F, Thines M. 2018. The genome sequence of the commercially cultivated mushroom *Agrocybe aegerita* reveals a conserved repertoire of fruiting-related genes and a versatile suite of biopolymer-degrading enzymes. *BMC Genomics*, 19(1): 48.
62. Hadar Y, Kerem Z, Gorodecki B. 1993. Biodegradation of lignocellulosic agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology*, 30(1): 133–139.
63. Harley JL. 1971. Fungi in Ecosystems. *The Journal of Ecology*, 59(3), 653–668.
64. Hassan IF. 2014. Ability of Some Soil Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(2): 46–52.
65. Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3): 125–135.
66. Hawksworth DL, Lücking R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*. 5(4): 5.4.10.
67. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509–547.
68. Hibbett DS, Donoghue MJ. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Systematic Biology*. 50(2): 215–242.
69. Hibi M, Hatahira S, Nakatani M, Yokozeki K, Shimizu S, Ogawa J. 2012. Extracellular oxidases of *Cerrena* sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(3): 220–225.
70. Hoa HT, Wang CL, Wang CH. 2015. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*. 43(4): 423–434.
71. Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4): 454–466.
72. Hofrichter M, Kellner H, Herzog R, Karich A, Liers C, Scheibner K, Kimani VW, Ullrich R. 2020. Fungal Peroxygenases: A Phylogenetically Old

- Superfamily of Heme Enzymes with Promiscuity for Oxygen Transfer Reactions. (In) Nevalainen, H. (ed.). *Grand Challenges in Fungal Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Springer Nature Switzerland AG, pp. 369–403.
73. Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3): 871–897.
 74. Hong Q, Zhang Z, Hong Y, Li S. 2007. A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using Burkholderia sp. FDS-1. *International biodeterioration & biodegradation*. 59(1): 55–61.
 75. Hosoya T. 1960. Turnip peroxidase IV. The effect of pH and temperature upon the rate of reaction. *Biochem*. 48, 178–189.
 76. Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski AJ. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial technology*, 52(1): 1–12.
 77. Jiao X, Li G, Wang Y, Nie F, Cheng X, Abdullah M, Lin Y, Cai Y. 2018. Systematic Analysis of the Pleurotus ostreatus Laccase Gene (PoLac) Family and Functional Characterization of PoLac2 Involved in the Degradation of Cotton-Straw Lignin. *Molecules*, 23(4): 880.
 78. Jović J, Buntić A, Radovanović N, Petrović B, Mojović L. 2018. Lignin-Degrading Abilities of Novel Autochthonous Fungal Isolates Trametes hirsuta F13 and Stereum gausapatum F28. *Food technology and biotechnology*. 56(3): 354–365.
 79. Kaewlaoyoong A, Cheng CY, Lin C, Chen JR, Huang WY, Sriprom P. 2020. White rot fungus Pleurotus pulmonarius enhanced bioremediation of highly PCDD/F-contaminated field soil via solid state fermentation. *Sci. Total Environ*. 738: 139670.
 80. Kaewlaoyoong A, Chen JR, Cheng CY, Lin C, Cheruiyot NK, Sriprom P. 2021. Innovative mycoremediation technique for treating unsterilized PCDD/F-contaminated field soil and the exploration of chlorinated metabolites. *Environmental Pollution*, 289: 117869.
 81. Kalra K, Chauhan R, Shavez M, Sachdeva S. 2013. Isolation of laccase producing Trichoderma spp. and effect of pH and temperature on its activity. *Int. J. Chem. Environ. Technol*. 5(5): 2229–2235.
 82. Kamei I, Kondo R. 2005. Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-p-dioxin by the white-rot fungus Phlebia lindtneri. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 68: 560–566.

83. Kameshwar AKS, Qin W. 2016. Lignin degrading fungal enzymes. (In) Fang Z, Smith JrR. (eds.). *Production of Biofuels and Chemicals from Lignin. Biofuels and Biorefineries*. Springer, Singapore. pp. 81–130.
84. Kameshwar AKS, Qin W. 2017. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology*, 9(2): 93–105.
85. Kellner H, Luis P, Pecyna MJ, Barbi F, Kapturska D, Krüger D, Zak DR, Marmeisse R, Vandenbol M, Hofrichter M. 2014. Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils. *PLoS One*, 9(4), p.e95557.
86. Kinne M, Zeisig C, Ullrich R, Kayser G, Hammel KE, Hofrichter M. 2010. Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(1): 18–21.
87. Kinnunen A, Maijala P, Jarvinen P, Hatakka A. 2017. Improved Efficiency in Screening for Lignin-Modifying Peroxidases and Laccases of Basidiomycetes. *Current Biotechnology*, 6(2): 105–115.
88. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22): 3358–3393.
89. Kubatova A, Erbanová P, Eichlerová I, Homolka L, Nerud F, Sasek V. 2001. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere*, 43(2): 207–215.
90. Kulshreshtha S, Mathur N, Bhatnagar P. 2014. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*, 4: 29.
91. Kuppusamy S, Palanisami T, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R. 2016. In-Situ Remediation Approaches for the Management of Contaminated Sites: A Comprehensive Overview. (In) de Voogt P. (ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236*, 1–115.
92. Kvesitadze G, Khatisashvili G, Sadunishvili T, Ramsden JJ. 2006. *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. Basis of Phytoremediation*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
93. Lamar RT, White RB. 2001. Mycoremediation: commercial status and recent developments. (In) Magar VS, von Fahnestock MF, Leeson A, (eds.). *Proceedings of the Sixth International Symposium on In Situ and On-Site Bioremediation*, San Diego, USA, Vol. 6, pp. 263–278.
94. Lamar RT, White RB, Ashley KC. 2002. Evaluation of white-rot fungi for the remediation of creosote-contaminated soil. *Remediation Journal*, 12(4): 97–106.

95. Letourneau DR, Volmer DA. 2021. Mass spectrometry-based methods for the advanced characterization and structural analysis of lignin: A review. *Mass Spectrometry Reviews*. 42: 144–188.
96. Leung M. 2004. Bioremediation: techniques for cleaning up a mess. *Journal of Biotechnology*, vol. 2, pp. 18–22.
97. Lewis NG, Sarkanen S. 1998. *Lignin and lignan biosynthesis*. American Chemical Society.
98. Li Q, Liu J, Gadd GM. 2020. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 8999–9008.
99. Liang Y, Lu D, Wang S, Zhao Y, Gao S, Han R, Yu J, Zheng W, Geng J, Hu S. 2020. Genome assembly and pathway analysis of edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 18(3): 341–351.
100. Liao JJ, Latif NHA, Trache D, Brosse N, Hussin MH. 2020. Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162: 985–1024.
101. Liers C, Arnstadt T, Ullrich R, Hofrichter M. 2011. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood-and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS microbiology ecology*, 78(1): 91-102.
102. Limmer M, Burken J. 2016. Phytovolatilization of Organic Contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 50(13): 6632–6643.
103. Lundell TK, Mäkelä MR, Hildén K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50(1): 5–20.
104. MacDonald J, Doering M, Canam T, Gong Y, Guttman DS, Campbell MM, Master ER. 2011. Transcriptomic Responses of the Softwood-Degrading White-Rot Fungus *Phanerochaete carnosae* during Growth on Coniferous and Deciduous Wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10): 3211–3218.
105. Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A. 1998. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Laccase of *Trametes Versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5): 335–341.
106. Marinović RŽ. 1973. *Osnovi mikologije i lihenologije*, Beogradski izdavačko-grafički zavod, Beograd.

107. Marlin M, Wolf A, Alomran M, Carta L, Newcombe G. 2019. Nematophagous Pleurotus Species Consume Some Nematode Species but Are Themselves Consumed by Others. *Forests*, 10(5): 404.
108. Márquez-Rocha FJ, Hernández-Rodríguez VZ, Vázquez-Duhalt R. 2000. Biodegradation of Soil-Adsorbed Polycyclic aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus Pleurotus ostreatus. *Biotechnology Letters*. 22: 469–472.
109. Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Guillén F, Martínez AT. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from Pleurotus eryngii. *Journal of Biochemistry*, 237(2): 424–432.
110. Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195–204.
111. McCoy, P. 2016. *Radical Mycology: A Treatise On Seeing And Working With Fungi*. Chthaeus Press, Portland, Oregon, USA.
112. McCutcheon SC, Schnoor JL. 2003. Overview of Phytotransformation and Control of Wastes. (In) McCutcheon SC, Schnoor JL. (eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. A Wiley-Interscience Series of Texts and Monographs, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp. 1–58.
113. McFee WW, Stone EL. 1966. The persistence of decaying wood in the humus layers of northern forests. *Soil Science Society of America Journal*. 29: 432–436.
114. Mester T, Field JA. 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(25): 15412–15417.
115. Mingelgrin U, Nasser A. 2006. Diagnosis and prognosis of the distribution of contaminants in the geosphere. (In) Twardowska I, Allen HE, Häggblom MM. (eds.). *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation, NATO Science Series IV: Earth and Environmental Sciences – Vol. 69*, Springer in cooperation with NATO Public Diplomacy Division, The Netherlands.
116. Mueller JG, Cerniglia CE, Pritchard PH. 1996. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In Crawford RL, Crawford DL (eds.). *Bioremediation: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 125–194.
117. Nagarathnamma R, Bajpai P, Bajpai PK. 1999. Studies on decolourization, degradation and detoxification of chlorinated lignin compounds in kraft

- bleaching effluents by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Process Biochemistry*, 34(9): 939–948.
118. Nagy LG, Riley R, Tritt A, Adam C, Daum C, Floudas D, Sun H, Yadav JS, Pangilinan J, Larsson KH, Matsuura K, Barry K, LaButti K, Kuo R, Ohm RA, Bhattacharya SS, Shirouzu T, Yoshinaga Y, Martin FM, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2016. Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. *Molecular Biology and Evolution*, 33(4): 959–970.
 119. Naidu R, Biswas B, Willett IR, Cribb J, Singh BK, Nathanail CP, Coulon F, Semple KT, Jones KC, Barclay A, Aitken, RJ. 2021. Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environment International*, 156: 106616.
 120. Novotný Č, Erbanová P, Šašek V, Kubátová A, Cajthaml T, Lang E, Krahl J, Zadražil F. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*. 10: 159–168.
 121. Okparanma RN, Ayotamuno JM, Davis DD, Allagoa M. 2011. Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated oil-based drill-cuttings. *African Journal of Biotechnology*. 10(26): 5149–5156.
 122. Orihara K, Yamazaki T, Shinkyō T, Sakaki T, Inouye K, Tsukamoto A, Sugiura J, Shishido K. 2005. Rat cytochrome P450-mediated transformation of dichlorodibenzo-p-dioxins by recombinant white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 22–28.
 123. Perez-Boada M, Ruiz-Duenas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez AT. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of molecular biology*, 354(2): 385–402.
 124. Pezzella C, Lettera V, Piscitelli A, Giardina P, Sannia G. 2013. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 705–717.
 125. Piontek K, Smith AT, Blodig W. 2001. Lignin peroxidase structure and function. *Biochemical Society Transactions*, 29(2): 111–116.
 126. Pointing SB, Pelling AL, Smith GJD, Hyde KD, Reddy CA. 2005. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycological Research*, 109(1), 115–124.
 127. Prakash V. 2017. Mycoremediation of Environmental Pollutants. *International Journal of ChemTech Research*, 10(3): 149–155.

128. Purnomo AF, Kamei I, Kondo R. 2008. Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. *J. Biosci. Bioeng.*, 105:614–621.
129. Radotic K, Simic-Krstic J, Jeremic M, Trifunovic M. 1994. A study of lignin formation at the molecular level by scanning tunneling microscopy. *Biophys. J.* 66: 1763–1767.
130. Radotic K, Todorovic S, Zakrzewska J, Jeremic M. 1998. Study of photochemical reactions of coniferyl alcohol. II. Comparative structural study of a photochemical and enzymatic polymer of coniferyl alcohol. *Photochem. Photobiol.* 68: 703–709.
131. Ramtek DS. 2010. Reclamation and Remediation of Solid Waste through Biochemical Process. (In) Fulekar MH. (eds.). *Bioremediation Technology: Recent Advances*. Springer, Dordrecht. pp. 285–314.
132. Raskin I, Kumar PN, Dushenkov S, Salt DE. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(3), 285–290.
133. Robinson T, Chandran B, Nigam P. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8-9): 575–579.
134. Ruiz-Aguilar GML, Fernandez-Sanchez JM, Rodriguez-Vazquez R, Poggi-Veraldo H. 2002. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research*, 6(4): 559–568.
135. Ruiz-Duenas FJ, Martínez AT. 2010. Structural and functional features of peroxidases with a potential as industrial biocatalysts. (In) Torres E, Ayala M. (eds.). *Biocatalysis based on heme peroxidases*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 37–59.
136. Sack U, Heinze TM, Deck J, Cerniglia CE, Martens R, Zadrazil F, Fritsche W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3919–3925.
137. Sánchez C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5): 1321–1337.
138. Satou T, Kaneko K, Li W, Koike K. 2008. The Toxin Produced by *Pleurotus ostreatus* Reduces the Head Size of Nematodes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(4): 574–576.

139. Schlosser D, Fahr K, Karl W, Wetzstein HG. 2000. Hydroxylated metabolites of 2,4-dichlorophenol imply a Fenton-type reaction in *Gloeophyllum striatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2479–2483
140. Schnoor J. 2000. Phytostabilization of Metals Using Hybrid Poplar Trees. (In) Raskin I, Ensley BD. (eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 133–150.
141. Shantaveera Swamy HM, Ramalingappa. 2015. Lignolytic Enzymes Production from Selected Mushrooms. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 3(2): 308–313.
142. Singer AC, Gilbert ES, Luepromchai E, Crowley DE. 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6): 838–843.
143. Singh H. 2006. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
144. Singleton, VL, Rossi, JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16, 144–158.
145. Siracusa G, Becarelli S, Lorenzi R, Gentini A, Di Gregorio S. 2017. PCB in the environment: bio-based processes for soil decontamination and management of waste from the industrial production of *Pleurotus ostreatus*. *New Biotechnology*, 39: 232–239.
146. Sonawdekar S. 2012. Bioremediation: A boon to hydrocarbon degradation. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(4): 2408–2424.
147. Species Fungorum. 2023. <http://www.speciesfungorum.org> (pristupljeno 30.04.2023.)
148. Stamets P. 2005. *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*, Ten Speed Press, Berkeley.
149. Stefanović S, Dragišić Maksimović J, Maksimović V, Bartolić D, Djikanović D, Simonović Radosavljević J, Mutavdžić D, Radotić K, Marjanović Ž. 2023. Functional differentiation of two autochthonous cohabiting strains of *Pleurotus ostreatus* and *Cyclocybe aegerita* from Serbia in lignin compound degradation. *Botanica Serbica*, 47(1): 135–143.
150. Steffen K, Hatakka A, Hofrichter M. 2002. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 212–217.

151. Strack D, Heilemann J, Mömken M, Wray V. 1988. Cell wall conjugated phenolics from coniferous leaves. *Phytochemistry*. 27:3517–3521.
152. Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K. 1996. Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4323–4328.
153. ten Have R, Teunissen JM. 2001. Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. *Chemical Reviews*, 101(11): 3397–3414.
154. Ting WTE, Yuan SY, Wu SD, Chang BV. 2011. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1): 238–242.
155. Tuomela M, Hatakka A. 2011. Oxidative Fungal Enzymes for Bioremediation. (In) Moo-Young M. (ed.). *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition), Vol. 6, Elsevier B.V., pp. 183–196.
156. Uhart M, Albertó E. 2007. Morphologic characterization of *Agrocybe cylindracea* (Basidiomycetes, Agaricales) from America, Europe and Asia. *Revista Mexicana de Micología*, 24: 9–18.
157. Uzan E, Nousiainen P, Balland V, Sipila J, Piumi F, Navarro D, Asther M, Record E, Lomascolo A. 2010. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6): 2199–2213.
158. Vares T, Kalsi M, Hatakka A. 1995. Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3515–3520.
159. Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 73, no. 7, pp. 1163–1172.
160. Vipotnik Z, Michelin M, Tavares T. 2021. Ligninolytic enzymes production during polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: effect of soil pH, soil amendments and fungal co-cultivation. *Biodegradation*, 32: 193–215.
161. Vipotnik Z, Michelin M, Tavares T. 2022. Rehabilitation of a historically contaminated soil by different laccases and laccase-mediator system. *J Soils Sediments*, 22: 1546–1554.
162. Vizzini AL, Angelini CL, Ercole E. 2014. Le sezioni *Velatae* e *Aporus* di *Agrocybe* sottogenere *Aporus*: rivalutazione del genere *Cyclocybe* Velen. ed un nuova specie. *Rivista micologica romana*, 92(2): 21–38.

163. Vovk Korže A. 2014. Ecoremediation for Soil Protection in Slovenia. *E.S.S.C. Newsletter 2*, National Agriculture and Food Centre – The Soil Science and Conservation Research Institute NPPC, Slovakia, pp. 12–17.
164. Wang M, Gu B, Huang J, Jiang S, Chen Y, Yin Y, Pan Y, Yu G, Li Y, Wong BHC, Liang Y. 2013. Transcriptome and proteome exploration to provide a resource for the study of *Agrocybe aegerita*. *PloS one*, 8(2), p.e56686.
165. Wayman M, Obiaga TI. 1974. The modular structure of lignin. *Can. J. Chem.* 2102–2110.
166. Webster J, Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, New York.
167. Wong DWS. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 157: 174–209.
168. Yateem A, Balba MT, Al-Awadhi N, El-Nawawy AS. 1998. White rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. *Environment International*, 24(1-2): 181–187.
169. Yost JL. 2014. *The Contribution of Soil Aggregates to Carbon Sequestration in Restored Urban Grasslands*. Senior Thesis, Lake Forest College.
170. Yue F, Lu F, Ralph S, Ralph J. 2016. Identification of 4–O–5-units in softwood lignins via definitive lignin models and NMR. *Biomacromolecules*. 17(6):1909–1920.
171. Zeddel A, Majcherczyk A, Hüttermann A. 1993. Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 40(1-4): 255–266.
172. Zitte LF, Awi-Waadu GDB, John AU. 2012. Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Mycelia on Petroleum Hydrocarbon Contaminated Substrate. *Journal of Agriculture and Social Research*. 12(2): 115–121.

10. PRILOZI

Prilog 10.1. – Popis slika

1.	<i>Slika 3.1.</i> – Hemijska struktura lignina (Preuzeto iz Yost, 2014).....	24
2.	<i>Slika 3.2.</i> – Smeđa trulež drveta (Preuzeto 09.05.2023. sa https://www.projectnoah.org/spotting/878936003).....	27
3.	<i>Slika 3.3.</i> – Bela trulež drveta (Preuzeto 09.05.2023. sa http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/LECT10.HTM).....	27
4.	<i>Slika 3.4.</i> – <i>Cyclocybe aegerita</i>	29
5.	<i>Slika 3.5.</i> – <i>Pleurotus ostreatus</i> (Preuzeto 09.05.2023. sa https://www.hobbyfarms.com/grow-your-own-oyster-mushrooms-for-flavor-profit/).....	32
6.	<i>Slika 6.1.</i> – Micelije gljiva u petrijevim kutijama na čvrstoj podlozi od sladnog agara stare 15 dana – a) <i>Pleurotus ostreatus</i> , b) <i>Cyclocybe aegerita</i> ...	44
7.	<i>Slika 6.2.</i> – Piljevina (levo) i izolovani ćelijski zidovi (desno) – a) cera, b) bele topole i c) smrče.....	47
8.	<i>Slika 6.3.</i> – Micelija bukovače (<i>Pleurotus ostreatus</i>) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa piljevinom hrasta (levo) i piljevinom topole (desno).....	51
9.	<i>Slika 6.4.</i> – Micelija jablanovače (<i>Cyclocybe aegerita</i>) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa piljevinom topole.....	52
10.	<i>Slika 6.5.</i> – Micelija jablanovače (<i>Cyclocybe aegerita</i>) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa piljevinom hrasta.....	52
11.	<i>Slika 6.6.</i> – Micelija jablanovače (<i>Cyclocybe aegerita</i>) u tečnom eksperimentalnom medijumu sa ćelijskim zidovima smrče.....	53
12.	<i>Slika 6.7.</i> – Micelija jablanovače (<i>Cyclocybe aegerita</i>) u eksperimentalnom medijumu sa ćelijskim zidovima topole.....	53

13.	<i>Slika 6.8.</i> – Micelija jablanovače (<i>Cyclocybe aegerita</i>) u eksperimentalnom medijumu sa DHP-om.....	54
14.	<i>Slika 6.9.</i> – Micelija bukovače (<i>Pleurotus ostreatus</i>) u eksperimentalnom medijumu sa DHP-om.....	54
15.	<i>Slika 6.10.</i> – Deo liofilizovanih uzoraka eksperimentalnih medijuma u ependorficama.....	55
16.	<i>Slika 7.1.</i> – Filogenetsko stablo sa maksimalnom verovatnoćom na osnovu analize ITS sekvenci <i>Pleurotus ostreatus</i> Ser 1.....	63
17.	<i>Slika 7.2.</i> – Filogenetsko stablo sa maksimalnom verovatnoćom na osnovu analize ITS sekvenci <i>Cyclocybe aegerita</i> Ser 1.....	64

Prilog 10.2. – Popis grafikona

1.	<i>Grafik 7.1.</i> – Rezultati merenja aktivnosti lakaze.....	65
2.	<i>Grafik 7.2.</i> – Rezultati merenja aktivnosti mangan peroksidaze.....	66
3.	<i>Grafik 7.3.</i> – Rezultati merenja aktivnosti lignin peroksidaze.....	67
4.	<i>Grafik 7.4.</i> – Prikaz rezultata merenja sadržaja lignina acetil bromidnim testom.....	69
5.	<i>Grafik 7.5.</i> – Prikaz rezultata merenja ukupnog sadržaja fenola.....	71
6.	<i>Grafik 7.6.</i> – Prikaz rezultata merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta....	72
7.	<i>Grafik 7.7.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa piljevinom hrasta.....	75
8.	<i>Grafik 7.8.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa piljevinom topole.....	76
9.	<i>Grafik 7.9.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa piljevinom smrče.....	77
10.	<i>Grafik 7.10.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima hrasta.....	78
11.	<i>Grafik 7.11.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima topole.....	79
12.	<i>Grafik 7.12.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa ćelijskim zidovima smrče.....	80
13.	<i>Grafik 7.13.</i> – Hromatogram fenolnih profila eksperimentalnih tretmana sa DHP-om.....	81
14.	<i>Grafik 7.14.</i> – Hromatogram fenolnih profila kontrola gljiva i medijuma.....	82
15.	<i>Grafik 7.15.</i> – Prikaz rezultata analize glavnih komponenti (PCA) hromatograma različitih eksperimentalnih tretmana sa piljevinom i ćelijskim zidovima hrasta – A i prikaz opterećenja koji pokazuje koje varijable uglavnom definišu prve dve glavne komponente – B.....	84

Prilog 10.3. – Popis tabela

1.	<i>Tabela 6.1.</i> – Šematski prikaz eksperimentalne postavke.....	49
2.	<i>Tabela 6.2.</i> – Šematski prikaz kontrola u eksperimentalnoj postavci.....	50

BIOGRAFIJA

Slobodan Stefanović je rođen 14.02.1980. godine u Beogradu. Završio je osnovnu školu „14. oktobar“ u Bariču, a potom „Gimnaziju u Obrenovcu“, prirodno-matematičkog smera. Diplomirao je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,26 i stekao zvanje diplomirani biolog. Doktorske akademske studije upisao je 2013. godine na studijskom programu Održivi razvoj i životna sredina na Fakultetu za primenjenu ekologiju Futura.

Po završetku studija na Biološkom fakultetu radio je kao nastavnik biologije na zameni u većem broju osnovnih i srednjih škola. Od marta 2016. godine zaposlen je na Fakultetu za primenjenu ekologiju Futura u zvanju asistent. U toku 2017. godine obavljao je funkciju koordinatora master akademskih studija FPE Futura. Izabran je u zvanje istraživač-saradnik 10.02.2022. godine na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Učestvovao je u realizaciji više projekata među kojima su najznačajniji „Ekoremedijacija degradiranih prostora produkcijom agroenergetskih useva“, TR 31078, naučnoistraživački projekat finansiran od strane Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja (istraživač u periodu od novembra 2016. do decembra 2019.) i „Evaluation of the Microplastic in the Soils of Serbia - EMIPLAST-SoS“ 7742318, finansiran od strane Fonda za nauku Republike Srbije, u okviru programa IDEJE, a čija realizacija je započela u januaru 2022. godine.

Slobodan Stefanović je objavio 16 naučno-stručnih radova, koji su publikovani u međunarodnim i nacionalnim naučnim časopisima i na naučnim skupovima od čega su 2 rada objavljena u međunarodnim časopisima sa SCI liste.

Изјава о ауторству

Потписани: Слободан Стефановић

број уписа: D07/2013

Изјављујем

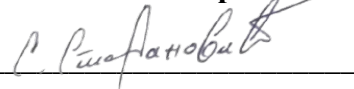
да је докторска дисертација под насловом

"Детерминација биоразградивих система аутохтоних врста гљива у циљу процене микоремедијационих потенцијала"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 07.09.2023.

Потпис докторанда



**Изјава о истоветности
штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Слободан Стефановић

Број уписа: D07/2013

Студијски програм: Одрживи развој и животна средина

Наслов рада: Детерминација биоразградивих система аутохтоних врста гљива у циљу процене микоремедијационих потенцијала

Ментор: др Жаклина Марјановић, научни саветник, Универзитета у Београду - Институт за мултидисциплинарна истраживања.

Потписани Слободан Стефановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета МЕТРОПОЛИТАН у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета Метрополитан у Београду.

У Београду, 07.09.2023.

Потпис докторанда



Изјава о коришћењу

Овлашћујем библиотеку Универзитета Метрополитан да у Дигитални репозиторијум Универзитета Метрополитан у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Детерминација биоразградивих система аутохтоних врста гљива у циљу процене микоремедијационих потенцијала"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета Метрополитан у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима


5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 07.09.2023.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.