



**Akademie věd
České republiky**

Teze disertace

k získání vědeckého titulu "doktor věd"

ve skupině věd MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH

**Mechanismy biodegradace perzistentních organických polutantů a nově
se objevujících mikropolutantů ligninolytickými houbami**

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru: MIKROBIOLOGIE, VIROLOGIE A
MYKOLOGIE

Tomáš Cajthaml

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

Praha 5.12.2018

Obsah

Souhrn	3
Summary	4
1. Úvod	5
1.1. Ligninolytické houby a jejich enzymy	6
1.2. Mykoremediace: původ a principy	7
2. Fungální biodegradace organických polutantů	10
2.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky	10
2.2. Polychlorované bifenyly	14
2.3. Chlorbenzoové kyseliny	19
2.4. Chlorované dioxiny a furany	21
2.5. Nově se objevující polutanty	22
2.6. Biodegradace endokrinních disruptorů houbami	24
2.7. Biodegradace farmak	28
2.8. Biodegradace mikropolutantů pomocí imobilizovaných enzymů	31
3. Pilotní a terénní mykoremediace	33
4. Závěr	36
Literatura	39
Seznam zkratk	55
Seznam obrázků	55
Seznam přiložených vědeckých prací	56

Souhrn

Kontaminace prostředí zejména antropogenními organickými polutanty představuje závažný problém z hlediska zdraví ekosystémů i lidské populace. Vedle dobře prozkoumaných kontaminujících látek obvykle patřících do skupiny perzistentních organických polutantů je v poslední době věnována pozornost i tzv. nově se objevujícím polutantům, často také označovaným jako mikropolutanty. Do první skupiny patří zejména řada kondenzovaných aromatických látek a jejich chlorovaných derivátů, jejichž používání a výroba je obvykle zakázána. Jejich toxické působení vůči organismům je dostatečně prozkoumáno a typickou vlastností je jejich schopnost kumulovat se v biotě nebo ve složkách životního prostředí. Druhá skupina je značně heterogenní a je obvykle reprezentována látkami, jejichž používání je naopak povoleno v rozličných aplikacích a na jejichž případné negativní účinky upozorňuje prozatím spíše jen vědecká komunita. Pravděpodobně nejzásadnějším je jejich schopnost narušovat přirozené hormonální signály vyšších živočichů i při velmi malých koncentracích a tím způsobovat tzv. endokrinní disruptci. Tyto látky jsou obvykle mnohem lépe rozpustné ve vodě než klasické perzistentní polutanty a způsobují tzv. difúzní znečištění.

Odstranění organických polutantů z prostředí je obtížné a ne vždy proveditelné. Fyzikální a chemické metody jsou velmi nákladné a z principu použitelné spíše pro klasické perzistentní polutanty. Oproti tomu v podstatě neexistují prakticky použitelné metody pro eliminaci mikropolutantů. Za tímto účelem se již delší dobu studují mikrobiální mechanismy, které by se mohly podílet na přirozeném odbourávání organických polutantů v prostředí a které by byly využitelné pro cílené dekontaminace prostředí. Řada těchto bioremediačních metod našla již uplatnění v praxi, nicméně jejich použití je omezeno pouze na úzké spektrum snáze rozložitelných kontaminantů (např. metody na principu stimulace nespecifické půdní mikroflóry pro rozklad ropných uhlovodíků).

Slibnou metodou se v oblasti bioremediací jeví použití dřevokazných ligninolytických hub. Tyto houby mají oproti bakteriím několik výhod, mezi které lze počítat zejména následující vlastnosti. Biodegradace je uskutečněna pomocí extracelulárních enzymů, což usnadňuje dostupnost polutantů. Přežití hub v půdě lze teoreticky dobře kontrolovat množstvím přidaného externího zdroje uhlíku (dřevní štěpka apod.). Na biodegradaci organických polutantů se obvykle dominantně podílí ligninolytický enzymový aparát s nízkou substrátovou specificitou a většinou se jedná o kometabolický proces, který není podmíněn přítomností určité koncentrace polutantu.

Nicméně, důležitým aspektem biodegradačních studií v souvislosti s případnými aplikacemi je objasnění rozkladných mechanismů a vznikajících produktů degradace, které nebyly v řadě případů charakterizovány. V rámci této disertace je uveden soubor prací zabývajících se biodegradačními mechanismy ligninolytických hub a jejich schopnostmi transformovat jak klasické perzistentní

organické polutanty, tak nově se objevující mikropolutanty. Výsledky jsou uvedeny v souvislosti s možnými dopady na případné praktické aplikace.

Summary

Anthropogenic organic pollutants represent a serious problem for the environment. Besides classical contaminants belonging typically to the persistent organic pollutants, an attention is also paid to a so called new-emerging pollutants often called micropollutants. The first group is represented by condensed aromatic compounds and their chlorinated derivatives, that are already prohibited. Their toxic effects are well documented and typically, they can accumulate in biota or in various environmental matrices. The second group is rather heterogenic and consists of compounds that are used in various formulations nowadays and their negative effects are documented in the scientific literature. Probably the most problematic mode of action is their abilities to interfere with natural hormonal signals of animals and in this way to cause so called endocrine disruption. These compounds are typically more soluble in water that results in diffusive pollution of the environment.

Removal of organic pollutants is not always feasible. Physico-chemical methods are very expensive and mostly practicable only for classical persistent organic pollutants. The number of methods for removal of micropollutants is limited. For these reasons, microbial mechanisms that can contribute to natural degradation of the organic pollutants in the environment and that can be employed for targeted decontamination of polluted localities. As well as these methods have been introduced into the practice; however, their use is limited to a narrow group of easily degradable pollutants e.g. petroleum hydrocarbons.

A promising method seems to be application of wood decaying ligninolytic fungi. These organisms have several advantages against bacteria including following ones. Biodegradation of the pollutants is performed via extracellular enzymes that increase availability of the compounds to the participating enzymes. Activity of the fungi in soil can be theoretically controlled by the amount and type of the used lignocellulosic material (wood shavings etc.). The biodegradation is often a cometabolic process that is not limited by a concentration of the respective pollutants.

Nevertheless, an important aspect of biodegradation studies and possible applications is elucidation of the degradation mechanisms and degradation products of the pollutants. Scientific studies used within this dissertation thesis describe aspects of biodegradation mechanisms of ligninolytic fungi and their abilities to transform classical persistent organic pollutants and new emerging micropollutants. The results are put into the context with possible practical applications.

5. Úvod

Antropogenní znečišťující látky se staly vážným celosvětovým problémem z důvodu jejich nepříznivých účinků na přírodní ekosystémy a lidské zdraví. Mohou ovlivnit jakoukoliv složku životního prostředí (vzduch, vodu i půdu), kde mohou být pevně vázány na půdní organickou hmotu a jílové částice, uvolňovány do ovzduší vypařováním nebo pronikat do vody. Ačkoliv se v prostředí vyskytuje značné množství mikroorganismů, které řadu těchto látek rozkládají – degradují, zvláště nově vytvářené antropogenní látky mohou představovat z hlediska rozložitelnosti problém. V důsledku toho se mohou šířit potravními řetězci, kumulovat v organismech a v životním prostředí, což má významný dopad i na metabolismus organismů. Jedná se o různé organické a anorganické znečišťující látky (Walker a kol., 2006): ropné uhlovodíky, halogenovaná rozpouštědla, chlorované aromatické uhlovodíky, výbušniny, dioxiny, sloučeniny narušující endokrinní systém, herbicidy, pesticidy, těžké kovy a radionuklidy. Tyto znečišťující látky se často vyskytují v životním prostředí jako komplexní směsi, což značně znesnadňuje případné sanační zásahy.

V současnosti jsou běžně používané konvenční technologie sanace nejčastěji založené na fyzikálních a chemických přístupech využívaných pro likvidaci nebezpečných chemikálií. Jelikož jsou tyto techniky ekonomicky náročné, ne vždy účinné, někdy dokonce nebezpečné a představující i další rizika, stále častěji se za rozumnou a udržitelnou alternativu k tradičním sanačním strategiím považují biologické postupy pro odstranění polutantů. Tyto postupy se souhrnně označují jako bioremediace. V posledních letech vzrůstá zájem o zvláštní odvětví bioremediace nazývané mykoremediace. Jeho název je odvozen od použití hub pro sanaci znečištěných půd nebo jiných pevných a kapalných prostředí.

Houby jsou různorodou skupinou mikroorganismů, které se v přírodních ekosystémech běžně vyskytují a mohou prosperovat v celé řadě prostředí od vod až po suchozemská prostředí, včetně extrémních zón biosféry, jako jsou pouště nebo polární oblasti. Jsou považovány za jedny z hlavních rozkladačů složitých biomateriálů, zejména pak saprotrofní houby, které se starají o rozklad odumřelé biomasy. Ze skupiny saprotrofních organismů si především dřevokazné houby vyvinuly velmi účinný nespecifický extracelulární enzymatický systém pro

rozklad komplexních heterogenních polymerů, jako je lignin a chitin. Díky produkci zejména lignocelulotických enzymů transformují širokou škálu organických substrátů, které jsou pro většinu prokaryotních organismů nerozložitelné. Také se ukázalo, že mohou rozkládat i řadu organických znečišťujících látek.

Vzhledem k těmto jedinečným schopnostem se uvažuje, že zejména tzv. ligninolytické houby, které jsou dominantními organismy rozkládajícími v přírodě lignin, mohou hrát zajímavou roli v biodegradčních procesech těžko rozložitelných znečišťujících látek v řadě kontaminovaných prostředí. Ačkoliv se nejedná o taxonomicky ucelenou skupinu, všichni zástupci této skupiny produkují některé ligninolytické enzymy, které jsou určeny k rozkladu ligninu. Vzhledem k tomu, že lignin obsahuje značné množství aromatických struktur atakovaných preferenčně těmito enzymy, jsou ligninolytické houby schopny účinně rozkládat také problematické aromatické polutanty (Cajthaml a Svobodová, 2011-publikace 8).

5.1. Ligninolytické houby a jejich enzymy

Houby jsou různorodou skupinou mikroorganismů, které se v přírodních ekosystémech vyskytují všude a jsou považovány za hlavní rozkladače komplexních biomateriálů. Habitaty hub představují řadu různorodých prostředí, od povrchových vod až po suchozemské prostředí, včetně extrémních zón biosféry jako jsou pouště nebo polární oblasti, ve kterých pro rozmnožování využívají často vzduch k rozptýlení svých spor. Bez ohledu na jejich taxonomickou klasifikaci jsou všechny houby v podstatě heterotrofní mikroorganismy, tj. asimilují živiny absorpcí z extracelulárního prostředí. Obecně lze podle jejich ekofyziologie rozdělit na biotrofní a saprotrofní organismy. První skupina zahrnuje symbionty a patogeny jiných druhů, zatímco druhá skupina představuje druhy rozkládající odumřelou biomasu. Ačkoliv několik studií zdůraznilo ekologickou úlohu některých biotrofních hub (např. mykorrhizních) při biodegradaci antropogenních polutantů, pro praktické využití při dekontaminaci znečištěného prostředí jsou významnější saprotrofické houby.

Lignocelulóza je nejhojněji se vyskytující obnovitelná biomasa na Zemi. Všechny dřeviny jsou složeny převážně z komplexních sacharidů (celulózy a hemicelulózy) a ligninu, který je dodnes známý jako nejsložitější heterogenní biopolymer. Díky produkci lignocelulolytických enzymů mohou různé saprotrofické houby rozkládat a využívat rostlinné polymery. Obecně lze extracelulární lignocelulolytické enzymy hub rozdělit do dvou hlavních skupin. První obsahuje

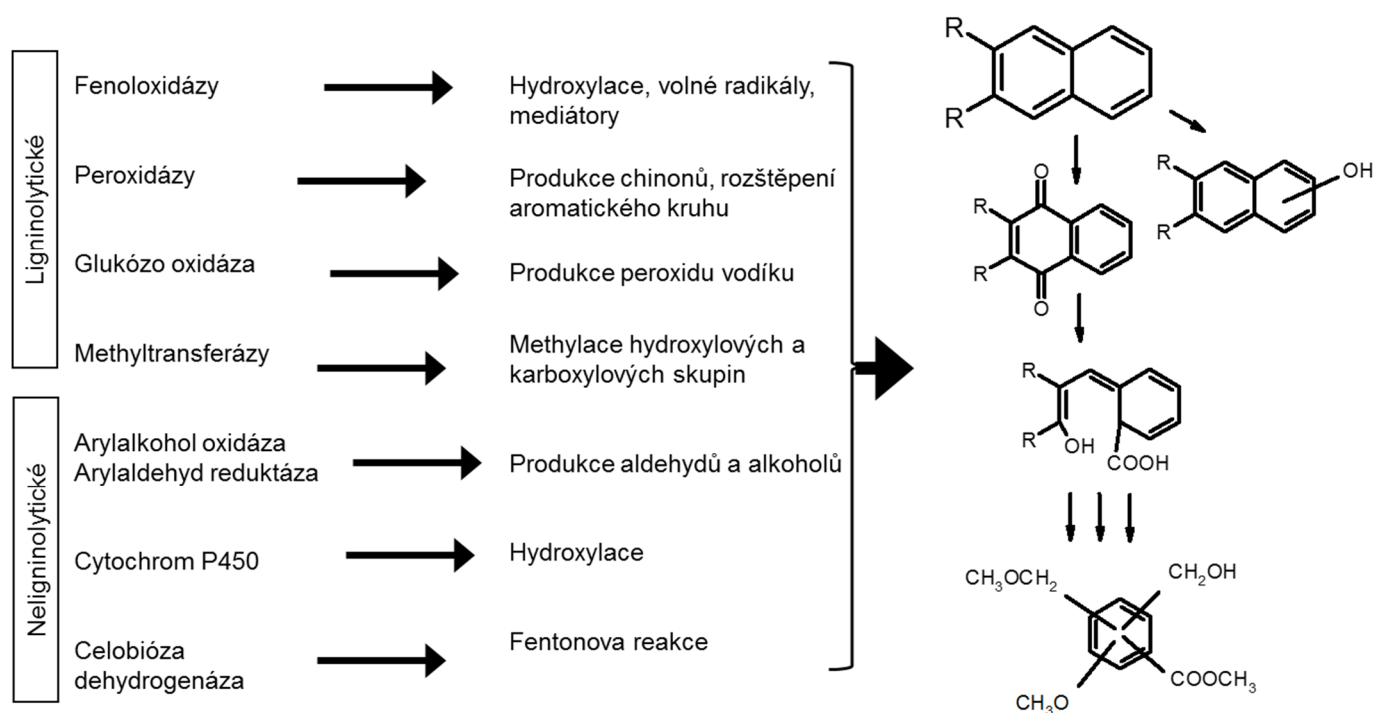
řadu hydrolytických enzymů schopných rozložit polysacharidové složky rostlinné buněčné stěny, konkrétně celulózy (např. glukonázy, glukosidázy, cellobiohydrolázy) a hemicelulózy (xylanázy, mannanázy, xylosidázy). Druhá skupina, označovaná jako ligninolytický systém, způsobuje kromě radikálově zprostředkovaného nespecifického rozkladu ligninu také štěpení aromatických skupin. Zahrnuje hemové peroxidázy (lignin peroxidáza, LiP, E.C. 1.11.1.14; mangan-dependentní peroxidáza, MnP, E.C.1.11.1.13; versatilní peroxidáza, VP, E.C. 1.11.1.16; peroxidáza rozkládající barvy, EC 1.11.1.19), fenol oxidázy (lakáza, Lac, E.C. 1.10.3.2; tyrosináza, EC 1.14. 18.1) a řadu pomocných enzymů pro produkci H₂O₂ (např. glyoxal oxidázu, glukózo oxidázu a arylalkoxidázy). V posledním desetiletí byl poprvé popsán nový typ H₂O₂ dependentního enzymu v bazidiomycetě *Agrocybe aegerita* (Ullrich a kol., 2004) a také i v dalších houbách (Hofrichter a kol., 2014). Tyto enzymy jsou hemothiolátové haloperoxidázy, které jsou dnes klasifikovány jako houbové nespecifické peroxidázy (EC 1.11.2.1). Jejich katalytický cyklus kombinuje typické dráhy extracelulárních hemových peroxidáz a intracelulárních monooxygenáz (systém cytochromu P450, CYP450, EC 1.14.14.1), což jim umožňuje katalyzovat obrovské množství reakcí (Hofrichter a kol., 2014).

Z důvodu odlišné strategie pro rozložení polymerů dřevní biomasy a podle vzhledu dřeva po rozpadu je možné dřevokazné houby rozlišit na tzv. houby měkké hniloby, hnědé hniloby a bílé hniloby (z ang. tzv. white-rot fungi). Další skupina ekofyziologicky blízká houbám bílé hniloby je tvořena houbami rozkládajícími opad (z ang. litter-decomposing fungi), které obývají organický prostor lesů a luk. Tyto bazidiomycety produkují ligninolytické oxidázy a peroxidázy stejně jako houby bílé hniloby, ale jejich typickým místem výskytu je svrchní vrstva půdy, kde způsobují rozpad zbytků listů a jiných kusů rostlin. Mezi ligninolytické houby se obvykle v literatuře zahrnují právě houby bílé hniloby a opad rozkládající houby. Z hlediska biodegradací organopolutantů jsou nejlépe prozkoumané a vzhledem k dosavadním znalostem i pravděpodobně nejperspektivnější zástupci hub bílé hniloby, které jsou dominantními rozkladači ligninu.

5.2. Mykoremediace: původ a principy

Jak bylo zmíněno, úvaha o využití ligninolytických hub pro bioremediační účely souvisí se schopností ligninolytických enzymů rozkládat preferenčně aromatické složky ligninu a se skutečností, že většina perzistentních organických polutantů jsou látky s aromatickými

strukturami. Bylo potvrzeno, že katabolické enzymy, které houby vyvinuly pro přístup k celulóзовým a hemicelulóзовým vláknům obsaženým v dřevěné struktuře, jsou schopny rozkládat širokém spektrum aromatických znečišťujících látek. V této souvislosti je na obrázku 1 uveden přehled mechanismů, které používají ligninolytické a neligninolytické houby k napadení jak lignocelulózy, tak i organických kontaminantů.



Obrázek 1. Obecné schéma mechanismů hub podílejících se na rozkladu organických polutantů (upraveno dle Covino a kol., 2016)

První poznatky o degradaci aromatických polutantů houbami byly získány před 50 lety (Anastasi a kol., 2013), kdy byl sledován potenciál odstranění chlorofenolu houbou rostoucí na impregnovaném dřevu (Duncan a Deverall, 1964). Ve stejném období byla poprvé popsána i tzv. "kerosenová houba" *Cladosporium resinae* izolovaná z palivových nádrží (Hendey 1964). Avšak skutečným impulzem, který vedl ke vzniku nového oboru bioremediace, byly studie modelové houby bílé hniloby *Phanerochaete chrysosporium*. Ve skutečnosti se ligninolytický

druh *P. chrysosporium* stal předmětem zájmu několika vědců v časných osmdesátých letech a LiP ze stejné houby byla poprvé charakterizována v roce 1984 (Tien a Kirk, 1984). Na základě schopnosti *P. chrysosporium* degradovat chlorované vedlejší produkty procesu kraftového rozvláknování ligninu Bumpus a kolegové (1985) prokázali o rok později schopnost stejné houby rozkládat (a částečně mineralizovat) skupinu perzistentních organických polutantů, konkrétně polychlorované bifenyly (PCB), polychlorované dibenzodioxiny (PCDD), lindan, 1,1-bis (4-chlorfenyl)-2,2,2-trichlorethan (DDT) a benzo[a]pyren. Od té doby začalo intenzivní období výzkumu bioremediačního potenciálu *P. chrysosporium* a dalších dřevokazných hub (Hammel, 1995, Rabinovich a kol. 2004, Harms a kol., 2011). V souvislosti s touto problematikou byl poprvé použit termín "mykoremediace" významným mykologem Paulem Stametsem, který takto konkrétně pojmenoval použití houbového mycelia a fungálních enzymů v bioremediaci. Většina studií týkajících se remediací houbami brala v úvahu hlavně lignin degradující houby, přičemž typickými cílovými matricemi byly půdy a sedimenty kontaminované perzistentními aromatickými polutanty jako jsou konzervační prostředky na dřevo, produkty získané z ropy, výbušniny, dielektrické kapaliny, pesticidy a další člověkem vytvořené chemické produkty (Mougin, 2002; Baldrian, 2008; Cerniglia and Sutherland, 2006; Cajthaml and Svobodová, 2012).

Některé fyziologické a biochemické vlastnosti ligninolytických hub z nich činí potenciálně vhodné kandidáty pro bioremediaci půdy. Jak již bylo uvedeno, produkují velké množství oxidativních enzymů, zejména Lac, LiP a MnP, které vykazují velmi nízkou substrátovou specifitu a díky své aktivitě v extracelulárním prostředí jsou schopny atakovat těžko biologicky dostupné kontaminanty za pomoci nespecifických radikálových reakcí. Kromě extracelulárního systému mají stejně jako ostatní eukaryota intracelulární enzymatický systém zahrnující CYP450 monooxygenázy (Črešnar & Petrič, 2011). Tento systém se vyskytuje u všech eukaryotických organismů a reguluje převážně biokonverzi hormonů, detoxikaci léků a xenobiotik (Bernhardt, 2006). U dřevokazných hub bylo prokázáno, že CYP450 se rovněž stejně jako ligninolytický aparát podílí na transformaci xenobiotik (van den Brink a kol., 1998). Ligninolytické houby produkují prostorově rozmanitý myceliární systém, který také zvyšuje pravděpodobnost kontaktu s polutanty (Novotný a kol., 1999). Zajímavým jevem je rovněž možnost přenosu degradačních bakterií na houbových hyfách, tzv. „fungal highways“ (Kohlmeier a kol., 2005). Ligninolytické houby jsou také často schopny tolerovat vysoké

koncentrace organických kontaminantů a těžkých kovů s malým účinkem na vlastní enzymatické aktivity (Baldrian a kol., 2000; Baldrian, 2003, Tuomela a kol., 2005). Navzdory svým mimořádným degradačním schopnostem drtivá většina hub nevyužívá znečišťující látky jako zdroj uhlíku a energie podobně jako bakterie, s výjimkou některých neligninolytických hub. Z tohoto důvodu se lignocelulózové materiály používají jako substrát umožňující růst hub.

V následujících kapitolách jsou uvedeny principy a mechanismy rozkladu perzistentních organických polutantů a dalších nově se objevujících organických mikropolutantů ligninolytickými houbami a rovněž některé aplikace směřující k praktickému využití.

6. Fungální biodegradace organických polutantů

6.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky

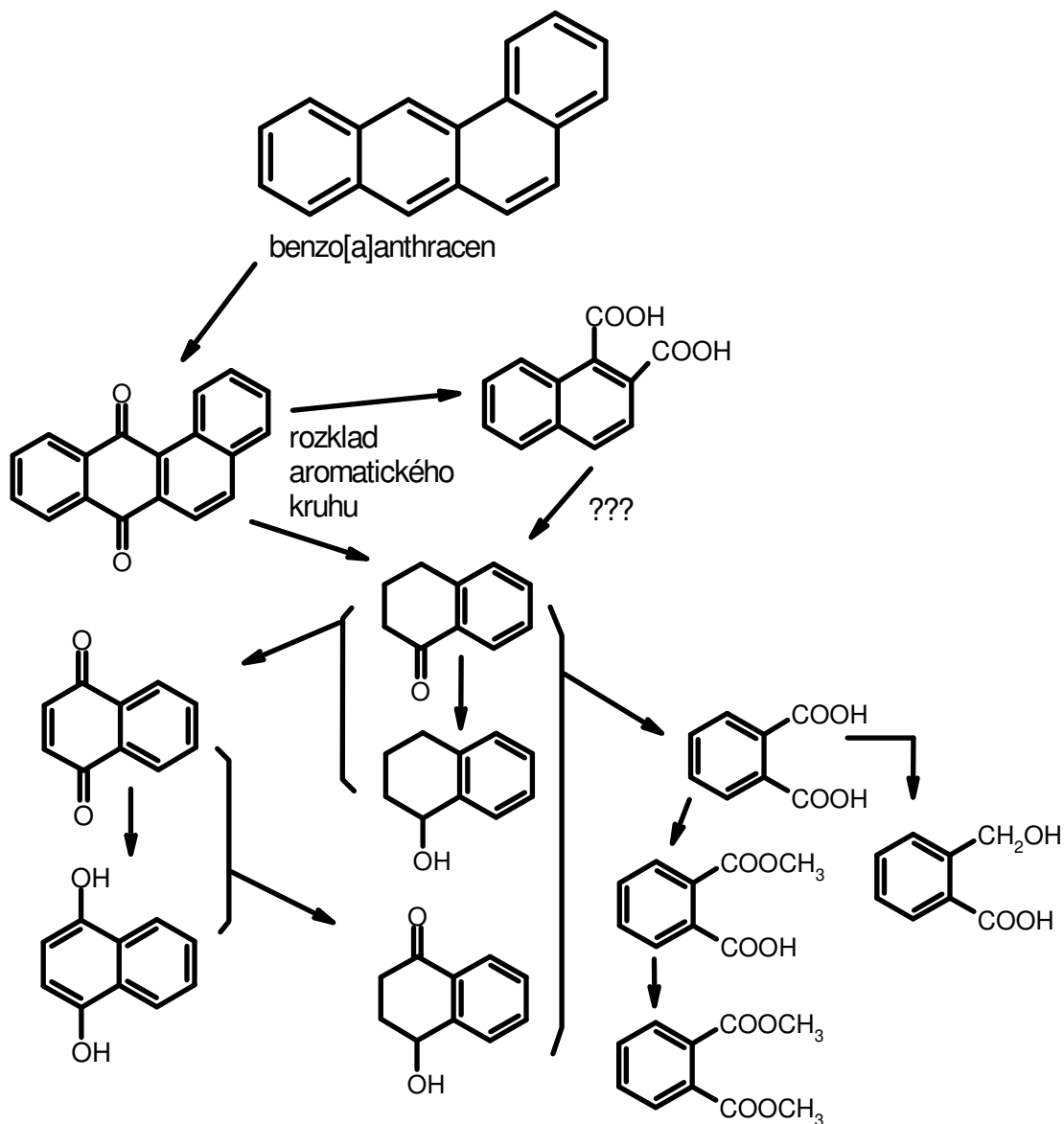
Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) patří mezi nejrozšířenější organické polutanty. Přestože vznikají i přirozenými procesy, jejich největším zdrojem je antropogenní spalování fosilních paliv a biomasy. Chemicky se PAU skládají ze dvou nebo více kondenzovaných benzenových kruhů uspořádaných v lineárním nebo ve shlukovém uspořádání. Několik členů této třídy, např. benzo[a]anthracen, chrysen a benzo[a]pyren, bylo zařazeno mezi hlavní znečišťující látky vzhledem k jejich toxickým, mutagenním a karcinogenním vlastnostem (Haritash a Kaushik, 2009). Perzistence PAU v prostředí je dána především jejich hydrofobicitou, toxicitou a odolností vůči mikrobiálnímu rozkladu, která se značně zvyšuje s rostoucí molekulovou hmotností PAU.

PAU jsou zdaleka nejvíce studované kontaminanty z hlediska možnosti jejich biologického rozkladu houbami. Chemická stabilita PAU je zapříčiněna zejména systémem delokalizovaných π elektronů na koplanární struktuře a počáteční začlenění kyslíku do aromatického kruhu představuje klíčový krok transformace PAU aerobními organismy. Způsob, který obecně houby používají k transformaci PAU, je stejný jako u jiných eukaryot. V první fázi dochází k oxidaci PAU na *trans*-dihydrodioly intracelulárními enzymy (CYP450 monooxygenázy a epoxidová hydroláza), v druhé fázi ke konjugačním reakcím zprostředkovaným transferázami. Tato detoxifikační reakce byla poprvé popsána u *Cunninghamella elegans* Cernigliou a spolupracovníky (1977). Stejný autor pak použil tento druh jako modelový organismus pro

další degradační studie PAU, při kterých byly identifikovány dihydrodioly, chinony a fenoly (Cerniglia, 1997). Studie Bumpuse a spolupracovníků (1985) popisující schopnosti houby *P. chrysosporium* degradovat PAU přitáhla k ligninolytickým houbám a jejich extracelulárnímu enzymatickému systému pozornost mnoha výzkumných skupin. Následně bylo prokázáno, že několik dalších rodů ligninolytických hub, jako jsou *Trametes*, *Pleurotus*, *Bjerkandera*, *Irpex*, *Phlebia*, *Nematoloma* a *Lentinus*, metabolizuje PAU účinně za modelových podmínek v kapalně kultuře nebo v půdě (Bhatt a kol., 2002 – publikace 2; Cajthaml et al, 2008 – publikace 3; Sack a kol., 1997; Pointing, 2001; Giubilei a kol., 2009; Novotný a kol., 2009; Baldrian, 2008; Covino a kol., 2010a,b,c – publikace 10,11,12).

Navíc se ukázalo, že PAU mohou být oxidovány za podmínek *in vitro* za použití Lac a peroxidázy z ligninolytických hub (Hammel a kol., 1986; Majcherczyk a kol., 1998; Eibes a kol., 2006 – publikace 16; Baborová a kol., 2006 – publikace 1; Covino a kol., 2010a) a že použití redoxních mediátorů může zvýšit rychlost rozkladu PAU stejně jako rozšíření spektra substrátů oxidovaných těmito katalyzátory (Sack a kol., 1997; Johannes a Majcherczyk, 2000; Camarero a kol., 2008; Cañas a Camarero, 2010; Covino a kol., 2010a). Také se ukázalo, že systém monooxygenázy CYP450 a epoxidové hydrolázy se může účastnit počátečního rozkladu PAU i v ligninolytických houbách (Bezalel a kol., 1997; Cajthaml a kol., 2008). Při použití sloučenin značených pomocí ¹⁴C bylo prokázáno, že ligninolytické houby jsou schopny úplně mineralizovat PAU na oxid uhličitý (Bumpus a kol., 1985; Bezalel a kol., 1996a; Wolter a kol., 1997; Sack a kol., 1997). Nicméně produkty štěpení aromatických kruhů PAU houbami nebyly dostatečně popsány. Hammel a spolupracovníci (1991) ukázali, že druh *P. chrysosporium* je schopen rozložit antracen na kyselinu ftalovou. Bezalel a spolupracovníci (1996b) publikovali mechanismus produkce kyseliny 2,2'-bifenyldikarboxylové z fenanthrenu. Tito autoři navrhlizjistli, že CYP450 z *Pleurotus ostreatus* se účastnil transformace fenanthrenu, což umožnilo další reakce a otevření aromatického kruhu. Moen a Hammel (1994) dokumentovali tvorbu kyseliny 2,2'-bifenyldikarboxylové z fenanthrenu v důsledku lipidové peroxidace pomocí MnP, zatímco jiní autoři detekovali produkty štěpení aromatického kruhu acenaftylenu a acenaftenu po inkubaci s Lac izolovanou z *Trametes versicolor* (Johannes a kol., 1998, Majcherczyk a kol., 1998). O několik let později Cajthaml a spolupracovníci (2002 – publikace 4) identifikovali několik metabolitů PAU v axenické kultuře *Irpex lacteus*, ke které byl přidán fenanthren, anthracen, fluoranthen a pyren. Detekce produktů štěpení

aromatických kruhů a dihydrodiolů PAU posílila hypotézu, že ligninolytické houby používají jak systém CYP450 tak i extracelulární ligninolytické enzymy. Baborová a spolupracovníci (2006) nejen potvrdili, že purifikovaný enzym MnP z *I. lacteus* může rozkládat rekalcitrantní zástupce PAU, ale také, že může štěpit benzenový kruh za vzniku 2-(2'-hydroxybenzoyl)-benzoové kyseliny. Stejná cesta, jaká byla navržena pro anthracen, byla také navržena pro benzo[a]anthracen s důrazem na přechodné produkty obsahující dva aromatické kruhy, např. 1,4-naftalendion, 1,4-naftalendiol a 1,2,3,4-tetrahydro-1-hydroxynaftalen (Cajthaml a kol., 2006 – publikace 5). Rozkladné produkty metabolické dráhy benzo[a]anthracenu u *I. lacteus* jsou uvedeny na obrázku 2.



Obrázek 2. Biodegradace benzo[a]anthracenu ligninolytickou houbou *I. lacteus* (upraveno Cajthaml a kol. 2006).

Ligninolytická houba *P. ostreatus*, známá jako hlíva ústříčná, patří k nejúčinnějším rozkladačům PAU (Bezalel a kol., 1996b, Wolter a kol., 1997). V experimentu, kdy byla pěstována v přítomnosti několika PAU (benzo[a]pyren, pyren, fluoren, fenanthren, anthracen), se prokázala jejich metabolizace a mineralizace. Hlavními identifikovanými produkty rozkladu PAU byly fenanthren *trans*-9,10-dihydrodiol a kyselina 2,2'-bifenyldikarboxylová, pyren *trans*-4,5-dihydrodiol, anthracen-*trans*-1,2-dihydrodiol a 9,10-antrachinon. Ve studii byla tato houba schopna v přítomnosti otrubových vloček rozložit fenanthren, anthracen a pyren v rozsahu 50%, 92% a 35% za 5 dnů (Pickard a kol., 1999). Schützendübel a kol. (1999) zjistili, že ligninolytický druh houby *Bjerkandera adusta* odstranil 56% fluorenu a 38% anthracenu 3 dny po přidání těchto PAU do houbových kultur, zatímco *P. ostreatus* rozložil 43% a 60% těchto sloučenin. Ostatní PAU byly rozloženy v menší míře. Zjištěné metabolity patřily většinou mezi karbonylové sloučeniny (Schützendübel a kol., 1999).

Další ligninolytická houba s pozoruhodnými schopnostmi rozkladu PAU je *Lentinus tigrinus* (Valentin a kol., 2006; Covino a kol., 2010a,b). Bez ohledu na koncentraci dusíku v kultivačním médiu byla tato houba schopna odstranit až 97% směsi sedmi PAU se třemi až pěti kondenzovanými benzenovými kruhy. Kromě toho bylo prokázáno, že izolované ligninolytické enzymy (Lac a MnP) z *L. tigrinus* účinně rozkládají jednotlivé zástupce PAU za podmínek *in vitro*, buď v přítomnosti a nebo bez přítomnosti redoxních mediátorů s nízkou molekulovou hmotností. Ukázalo se, že MnP vykazuje širší rozsah substrátů PAU a rychlejší oxidaci než Lac produkovaná stejným kmenem této houby. V degradační studii srovnávající *L. tigrinus* a *I. lacteus* odstranil *L. tigrinus* v kontaminované půdě a v kreosotovém dřevu PAU ve vyšší míře než *I. lacteus* (Covino a kol., 2010b). Navíc Valentin a spolupracovníci (2006) prokázali, že *L. tigrinus*, *I. lacteus* a *B. adusta* jsou schopny růst a degradovat PAU v půdě z mokřadu s vysokou salinitou.

V případě druhů hub rozkládajících opad, které jsou rovněž někdy v literatuře počítány mezi ligninolytické houby, bylo ukázáno, že mohou mít i větší aplikační potenciál pro mykoremediaci kontaminované půdy než houby bílé hniloby, a to především díky jejich schopnosti konkurovat přítomné půdní mikroflóře (Šašek 2003, Steffen a kol., 2007). Vedle

publikace týkající se rozkladu benzo[a]pyren pomocí houby *Marasmiellus trojanus* (Wunch a kol., 1999) provedl první rozsáhlý screening potenciálu rozkladu PAU houbami rozkládajícími opad Gramss s kolegy (1999). Zajímavé výsledky byly dosaženy při odstraňování směsi pěti zástupců PAU dvěma houbami, jmenovitě *Gymnophilus sapineus* a *Agrocybe praecox* (92% a 90%, po 14 dnech). Steffen a spolupracovníci (2002) publikovali výsledky biotransformace PAU pomocí devíti různých druhů hub v modelových kapalných systémech a souběžně hodnotili rozsah mineralizace ¹⁴C-benzo[a]pyrenu. Výsledky ukázaly, že všechny houby byly schopny oxidovat PAU, přičemž dva druhy patřící do rodu *Stropharia* (*Stropharia coronilla* a *Stropharia rugosoannulata*) vykázaly podstatně lepší výsledky. Autoři také prokázali pozitivní korelaci mezi přidavkem Mn²⁺, aktivitou MnP a celkovým rozkladem a mineralizací PAU (Steffen a kol., 2002). V důsledku toho MnP z *S. coronilla* purifikovali a inkubovali za podmínek *in vitro* s ¹⁴C-benzo[a]pyrenem. Výsledky potvrdily zapojení tohoto enzymu do mineralizace benzo[a]pyrenu. Navíc oba výše uvedené druhy rodu *Stropharia* byly nejúčinnějšími rozkladači PAU i v uměle kontaminované půdě (Steffen a kol., 2007). Dále bylo ukázáno, že Lac z houby *Marasmius quercophilus* rozkládá PAU, ale pouze ty s ionizačním potenciálem nižším než 7,55 eV, tj. anthracen a benzo[a]pyrenem (Farnet a kol., 2009). Pokud jde o rozklad PAU v reálných kontaminovaných prostředích, byla v laboratorním měřítku testována houba hnojník obecný (*Coprinus comatus*) v mykoremediačním experimentu, který byl zaměřen na půdu a dřevo kontaminované (impregnované) kreosotem. Bez ohledu na použitý lignocelulózový substrát byla účinnost rozkladu PAU této houby podobná jako u zástupců hub bílé hniloby (*Dichomitus squalens* a *P. ostreatus*). Některé PAU s vysokou molekulovou hmotností byly degradovány houbou *C. comatus* ve větším rozsahu, než byl odhad jejich teoretické biologické dostupnosti (Covino a kol., 2010c).

6.2. Polychlorované bifenyly

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou syntetické sloučeniny, jejichž struktura sestává z bifenylové molekuly substituované jedním až deseti atomy chloru. Celá skupina PCB obsahuje 209 tzv. kongenerů. V minulosti byly směsi PCB široce používány v řadě průmyslových aplikací pro jejich tepelnou a chemickou stabilitu a dielektrické vlastnosti. V důsledku jejich rozsáhlého používání docházelo ke kontaminaci životního prostředí buď náhodným únikem a nebo nevhodným způsobem likvidace odpadů. Vzhledem k výše uvedené stabilitě jsou PCB stále přítomny v řadě lokalit, kde byly vyráběny, ačkoliv jejich použití bylo omezeno již dávno (např.

v ČSSR byly zakázány roku 1984). Až posléze se ukázalo, že PCB, původně považované za bezpečné látky, jsou teratogenní, karcinogenní a narušují endokrinní systém organismů. Účinky těchto xenobiotik jsou široce popsány v literatuře (Crinnion a kol., 2011; Helmfrid a kol., 2012; Kramer a kol., 2012; El Majidi a kol., 2013), zejména u koplanárních PCB (nesubstituovány v polohách *ortho*), které vykazují podobné vlastnosti jako dioxiny (US Environmental Protection Agency, 2000; Van den Berg a kol., 2006). PCB jsou dnes považovány za jedny z nejnebezpečnějších kontaminujících látek na světě.

Existuje několik účinných fyzikálně-chemických metod pro dekontaminace lokalit kontaminovaných PCB, nicméně tyto metody jsou založeny na využití velmi drastických podmínek, kdy například dochází k destrukci půdy (incinerace) a tyto metody jsou navíc velmi nákladné. Použití biologických systémů představuje ekonomicky únosnou a šetrnou alternativu k těmto běžně používaným tepelným a fyzikálně-chemickým technologiím (Passatore a kol., 2014).

V literatuře se vyskytuje mnohonásobně více prací popisujících bakteriální degradaci PCB ve srovnání s degradací PCB houbami. Bakterie mají pro rozklad PCB řadu mechanismů a několik z nich je velmi detailně popsáno. V anaerobních podmínkách mohou bakterie využívat organicky vázaný chlor jako akceptor elektronů (chlororespirace) a přeměnit PCB na méně chlorované kongenery, zatímco aerobní bakterie mohou metabolizovat nižší chlorované bifenyly pomocí tzv. bifenylové dráhy (Pieper, 2005; Field a Sierra-Alvarez, 2008). Tento kometabolický proces však vede k tvorbě chlorbenzoových kyselin, které nejsou dále transformovány stejnými bakteriemi. I velmi nízká koncentrace těchto metabolitů působí inhibiční zpětnou vazbu na cestu horní bifenylové degradace, což vede k narušení nebo zpomalení procesu biotransformace PCB jako celku. Navíc je celá bifenylová dráha obvykle indukována přítomností bifenyly (Adebusoye a kol., 2008, Furukawa a Fujihara, 2008).

Vzhledem k širokým transformačním schopnostem ligninolytických hub bylo testováno velké množství druhů patřících do oddělení Basidiomycota v laboratorních modelových kapalinových systémech z hlediska jejich schopnosti rozkladu technických směsí PCB nebo jednotlivých kongenerů PCB. Řada prací se věnuje zejména modelovému druhu *P. chrysosporium* (Eaton, 1985; Thomas a kol., 1992; Vyas a kol., 1994; Yadav a kol., 1995; Kamei a kol., 2006a), dále pak *T. versicolor* (Zeddel a kol., 1993; Vyas a kol., 1994; Cloete a Celliers, 1999), *Lentinus edodes* (Ruiz-Aguilar a kol., 2002), *P. ostreatus* (Kubátová a kol. 2001;

Čvančarová a kol., 2012 – publikace 13) *Grifola frondosa* (Seto a kol., 1999), *Corioloropsis polyzona* (Vyas a kol., 1994; Novotný a kol., 1997), *Phlebia brevispora* (Kamei a kol., 2006b), *B. adusta* (Beaudette a kol., 1998; Čvančarová a kol., 2012), *I. lacteus* a *Phanerochaete magnoliae* (Čvančarová a kol., 2012).

Všechny tyto studie potvrdily, že účinnost rozkladu výrazně klesá se zvyšujícím se obsahem chloru. Například pro *P. chrysosporium* byla zaznamenána zanedbatelná mineralizace jednotlivých tetra- a hexa-chlorbifenyly (Dietrich a kol., 1995), zatímco úroveň rozkladu výrazně vzrostla pro trichlorované a dichlorované kongenery. Podobné trendy byly pozorovány také u technických směsí PCB. Například Yadav a spolupracovníci (1995) ukázali, že houba *P. chrysosporium* byla schopna odstranit 61%, 31% a 18% sumy směsí PCB Aroclor 1242, 1254 a 1260 (chlorace - 42, 54 a 60%) za 30 dnů.

Navíc bylo prokázáno, že některé druhy hub (např. *P. ostreatus*) umí selektivně odstranit kongenery PCB a preferují sloučeniny s atomem chloru v *ortho* > *meta* > *para* poloze (Kubátová a kol., 2001 Möder et al, 2005 – publikace 20), zatímco jiné (např. *P. chrysosporium*) nevykazovaly žádnou zřetelnou specifitu z hlediska polohy chlorového substituentu (Yadav a kol., 1995).

Řada studií se zabývala interpretací mechanismu rozkladu PCB ligninolytickými houbami. Některé práce ukázaly, že purifikované extracelulární fenoloxidázy a peroxidázy nebyly schopné oxidovat kongenery PCB (Beaudette a kol., 1998; Krčmář a kol., 1999; Takagi a kol., 2007). Například Krčmář a kol. (1999) provedli biodegradační experiment s technickými směsmi PCB obsahujícími nízko a vysoko chlorované kongenery (Delor 103 a Delor 106) za použití mycélia *P. chrysosporium*, nepurifikované extracelulární tekutiny a purifikovaných MnP a LiP. Byl pozorován pokles koncentrace PCB po 44 hodinách expozice myceliu (74%) nebo surové extracelulární kapalině (60%), zatímco MnP a LiP izolované z extracelulární kapaliny nevykázaly žádný rozklad.

Na základě identifikace produktů transformace PCB v kapalných kulturách hub byla vytvořena hypotéza o zapojení jak extracelulárního ligninolytického systému, tak intracelulárního systému CYP450 v procesu rozkladu PCB (Kamei a kol., 2006a; Kamei a kol., 2006b; Čvančarová a kol., 2012). V tomto ohledu byly provedeny další studie, které dokazují, že ligninolytické enzymy byly schopny otevřít aromatický kruh některých meziproductů rozkladu PCB, jako jsou

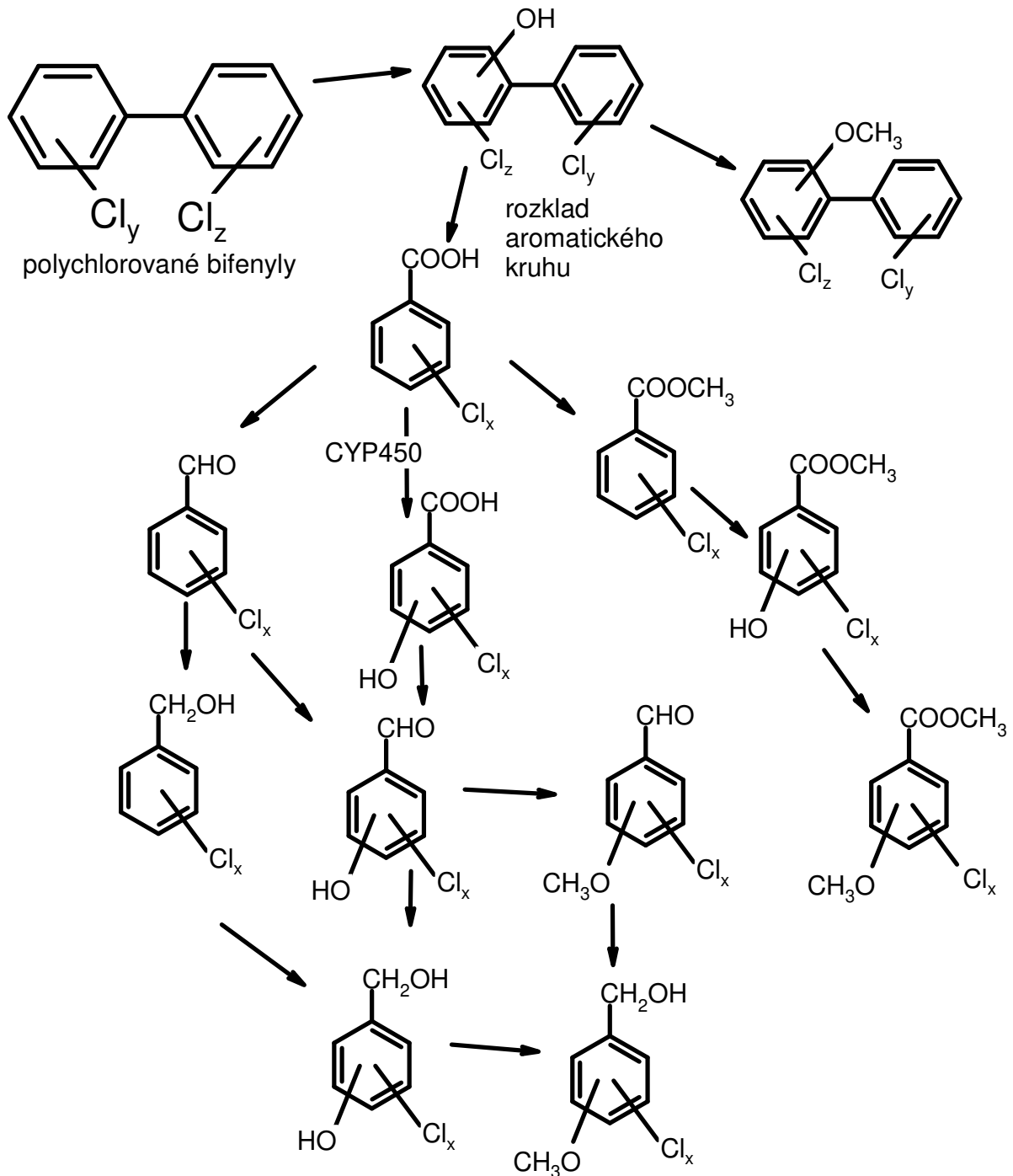
jejich hydroxylované deriváty, které jsou pravděpodobně produkovány systémem CYP450 (Keum a kol., 2004; Takagi a kol., 2007; Kordon a kol., 2010).

Kamei a spolupracovníci (2006a) zkoumali produkty transformace 4,4'-dichlorbifenylu v kultuře *P. chrysosporium* ve snaze zjistit mechanismus rozkladu. Methoxylované a hydroxylované deriváty PCB byly detekovány v tekutých kulturách *P. chrysosporium*, a proto vznikla hypotéza o participaci cytochromu CYP450 v procesu rozkladu. Přidání piperonylbutoxidu, coby typického inhibitoru CYP450 do houbových kultur, inhibovalo produkci hydroxylovaných metabolitů, což dále podporuje původní hypotézu. Chlorbenzoové kyseliny, chlorbenzaldehydy a chlorbenzylalkoholy byly rovněž identifikovány jako produkty rozkladu PCB. Čvančarová a kolegové (2012) dokumentovali tvorbu chlorbenzoátů z hydroxylovaných PCB a navrhli účast dalších redukčních mechanismů. Jakmile CYP450 oxiduje aromatickou strukturu PCB, štěpení kruhu může být zprostředkováno jinými enzymatickými systémy (Cajthaml a kol., 2006; Čvančarová a kol., 2012). Následně může redukční mechanismus působit na karboxylovou skupinu chlorbenzoátů vedoucí k tvorbě chlorovaných aldehydů a alkoholů (Muzikář a kol., 2011 – publikace 21; Stella a kol., 2013 – publikace 22). Přehled průběhu rozkladu PCB u ligninolytických hub, včetně tvorby a další biotransformace chlorbenzoátů, je uveden na obrázku 3.

Přes slibné výsledky dosažené v modelových kapalných kulturách jen málo studií prokázalo schopnost ligninolytických hub rozkládat chlorované bifenyly buď v uměle kontaminované půdě (Zeddel a kol., 1993, Kubatova a kol., 2001) nebo v reálných kontaminovaných půdách (Borazjani, 2005; Federici a kol., 2012). Pokud jde o historicky znečištěné prostředí, nedávná studie prokázala, že bioaugmentační test založený na použití houby *L. tigrinus* inkubované na kukuřičné řezance dosáhl zhruba 34% rozkladu směsi Aroclor 1260 a 23% dechlorace za 60 dnů (Federici a kol., 2012).

Stella a kol. (2017 – publikace 23) testovali rozsáhle použití druhů *P. ostreatus* a *I. lacteus* pro degradaci PCB v reálné kontaminované půdě ze skládky v obci Lhenice (ČR). Experimenty byly prováděny v mikrokosmech s hmotnostním poměrem slámového substrátu s půdou 1:5. Kromě degradace PCB byly sledovány transformační produkty, biodostupnost PCB, toxicita a pomocí sekvenací DNA i změny ve složení přítomné mikroflory. Nejlepší výsledky ve srovnání s biostimulačními uspořádáními byly zaznamenány v případě augmentace při použití *P. ostreatus*, kdy došlo k úbytku 19%, 41% a 51% z podpovrchové, povrchové a rhizosferní půdy

ze zmíněné skládky. Výsledky sekvenací DNA přítomné mikroflory ukázaly, že v případě *P. ostreatus* sice došlo k menším změnám ve složení bakteriální komunity, ale celková biomasa bakterií vzrůstala. Na druhou stranu *P. ostreatus* netoleroval ostatní houbové druhy. Výsledky potvrdily, že *P. ostreatus* je vhodný druh pro další testování z hlediska možných aplikací v mykoremediacích.



Obrázek 3. Degradační dráha PCB rozkládaných ligninolytickou houbou *P. ostreatus* (upraveno dle Čvančarová a kol., 2012; Muzikář a kol., 2011; Cajthaml 2015).

Závěrem lze konstatovat, že i přes velký počet studií týkajících se biodegradací PCB ligninolytickými houbami je před možnou praktickou aplikací zapotřebí dalšího výzkumu fyziologických a biochemických vlastností hub. Kromě toho, jak bylo navrženo v nedávné studii (Stella a kol., 2015 – publikace 24), je pro vývoj účinného způsobu sanace prostředí kontaminovaných PCB založeného na remediaci houbami nezbytně nutné komplexní hodnocení fyzikálně-chemických faktorů (tj. interakce PCB s organickou hmotou v půdě) a biologických faktorů (tj. interakce s přirozenými mikroorganismy v půdě).

6.3. Chlorbenzoové kyseliny

Chlorbenzoové kyseliny představují další skupinu látek znečišťujících životní prostředí. Ačkoliv se jedná o velmi toxické a perzistentní látky, které se rovněž dříve používaly v různých přípravcích (např. herbicidy), tyto látky sami nepředstavují zásadní problém. Jako problematické byly identifikovány z hlediska jejich vzniku při bakteriálních transformacích PCB v aerobních podmínkách (Fieldem a Sierra-Alvarezem, 2008). Během tohoto procesu mají chlorbenzoáty tendenci se hromadit jako výsledný produkt (tzv. dead-end metabolit), který působí jako inhibitor horní bifenylové dráhy, a proto omezují další transformaci PCB (Pieper a kol., 2005; Adebusoye a kol., 2008). Vzhledem k jejich významné rozpustnosti ve vodě jsou chlorbenzoáty charakterizovány mobilitou, která je o několik řádů vyšší než u PCB. Kromě toho některé z chlorbenzoátů jsou vysoce toxické pro vodní organismy (Lee a Chen, 2009), vykazují genotoxicitu vůči vyšším rostlinám (Gichner a kol., 2008) a působí jako látky narušující endokrinní systém (Svobodová a kol., 2009).

Počet publikací, které se zabývají rozkladem chlorbenzoátů houbami, je velmi omezený. Byly testovány čtyři ligninolytické druhy (*P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *Heterobasidion annosum*) a dva ektomykorhizní druhy hub (*Paxillus involutus*, *Suillus bovinus*) z hlediska možnosti růstu v různých koncentracích kyseliny 3-chlorbenzoové (0.1, 1 and 3 mM) a schopnosti způsobit její rozklad za 4 týdny (Dittmann a kol., 2002). Dokonce i nízké koncentrace kyseliny 3-chlorbenzoové vedly k signifikantnímu snížení růstu obou ektomykorhizních kmenů a *P. chrysosporium*, zatímco růst *P. ostreatus*, *T. versicolor* a *H.*

annosum nebyl ovlivněn. Tato studie zejména ukázala, že schopnost skupiny ligninolytických hub růst v přítomnosti kyseliny 3-chlorbenzoové koreluje s vyšší mírou degradace dosažené na konci inkubační doby.

Muzikář a spolupracovníci (2011) provedli komplexnější studii zabývající se rozkladem chlorbenzoátů pomocí hub. U osmi zástupců ligninolytických hub (*I. lacteus*, *B. adusta*, *P. chrysosporium*, *P. magnoliae*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* a *D. squalens*) byla testována schopnost rozkladu směsi dvanácti chlorbenzoátů (mono-, di- a trichlorované) jak za modelových podmínek v kapalném médiu, tak v uměle kontaminované půdě. V tekutých médiích byly *I. lacteus*, *P. cinnabarinus* a *D. squalens* nejúčinnějšími houbami pokud jde o degradaci a snížení akutní toxicity, zatímco *I. lacteus* a *P. ostreatus* byly nejúčinnější v půdě. Analýza rozkladných produktů odhalila, že byly produkovány methoxy a hydroxy deriváty společně s redukovanými formami původních kyselin (benzaldehydy a benzylalkoholy) a byl navržen obecný průběh rozkladu. Nicméně mechanismus, kterým jednotlivé enzymy mohou degradovat chlorbenzoáty, nebyl zcela objasněn. Následně byla studována ze stejného hlediska houba *L. tigrinus* (Stella a kol., 2013). *In vivo* degradační experiment ukázal, že tento organismus byl schopen transformovat většinu cílových zástupců chlorbenzoátů v průběhu 20 dnů inkubace s výjimkou 2,6-dichlorbenzoátu, 2,3,6-trichlorbenzoátu a 2,4,6-trichlorbenzoátu. Autoři navrhli, že rekalcitrance těchto látek může být způsobena sterickou překážkou dvou chlorových substituentů sousedících s karboxylovou skupinou a schopností halogenů ovlivňovat reaktivitu aromatické sloučeniny. K získání poznatků o mechanismu rozkladu chlorbenzoátů pomocí *L. tigrinus* byly prováděny *in vitro* experimenty jak s extracelulárními enzymy (Lac a MnP), tak s intracelulárním materiálem (mikrozomální část obsahující CYP450 monooxygenázu) izolovaným z kultur *L. tigrinus*. Lac a MnP se neúčastnily počátečních kroků transformace, dokonce ani v přítomnosti účinných redoxních mediátorů, zatímco CYP450 chlorbenzoáty oxidoval. Úloha, kterou hrál CYP450 při rozkladu chlorbenzoátů v podmínkách *in vitro*, byla potvrzena nutnou přítomností NADPH v průběhu reakce a možností inhibice piperonylbutoxidem a oxidem uhelnatým (Stella a kol., 2013). Navíc detekce hydroxylované kyseliny chlorbenzoové dále prokázala účast systému CYP450 v počátečních krocích biokonverze chlorbenzoátů touto houbou.

6.4. Chlorované dioxiny a furany

Polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDD) jsou skupina polyhalogenovaných organických sloučenin, které se skládají ze dvou benzenových kruhů spojených dvěma kyslíkovými můstky (dibenzo-1,4-dioxin) s jedním nebo několika chlorovými substituenty. Polychlorované dibenzofurany (PCDF) představují skupinu organických látek s vlastnostmi a chemickou strukturou podobnou PCDD, kde dioxinový strukturní motiv je nahrazen furanem. PCDD a PCDF jsou uvolňovány do životního prostředí jako vedlejší produkty průmyslových procesů, včetně spalování odpadu, chemického průmyslu a výroby pesticidů. Vzhledem k jejich lipofilním vlastnostem se kumulují v těle lidí i živočichů a způsobují vývojové poruchy a nádorová onemocnění (Huff a kol., 1980). Z tohoto důvodu byly ve Stockholmské úmluvě uvedeny mezi nejvíce perzistentní nebezpečné organické znečišťující látky.

U některých druhů ligninolytických hub, jmenovitě *P. chrysosporium*, *Panellus stypticus*, *Phlebia* sp. a *Bjerkandera* sp., byly pozorovány schopnosti rozkládat dioxiny. Mineralizace PCDD houbou *P. chrysosporium* byla prokázána již v roce 1985 (Bumpus a kol., 1985), ovšem bez objasnění mechanismu. Později Valli a kol. (1992) prokázali, že kmen houby *P. chrysosporium* rozložil za tzv. ligninolytických podmínek (dusíkem limitovaných podmínek) 50% 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxinu (2,7-diCDD), zatímco pouze 10% se rozložilo za neligninolytických podmínek, čímž bylo naznačeno zapojení LiP a MnP, které produkuje tato houba spíše za dusíkem limitovaných podmínek. Navrhovaný průběh pro transformaci 2,7-diCDD zahrnoval oxidační štěpení 2,7-diCDD pomocí LiP, což vedlo k tvorbě 4-chlor-1,2-benzochinonu a 2-hydroxy-1,4-benzochinonu. Hydrochinony nebo katecholy byly produkovány oxidací zprostředkovanou LiP a/nebo MnP a následovala metylace vedoucí k tvorbě methoxybenzenů. Je zajímavé, že ačkoliv *P. stypticus* neprodukuje ani LiP ani MnP, může transformovat 2,7-diCDD. Tvorba 4-chlorkatecholu jako meziprojektu a inhibice rozkladného procesu po přidání piperonylbutoxidu naznačují průběh rozkladu zahrnující CYP450 odlišný od mechanismu popsaného pro *P. chrysosporium* (Sato a kol., 2002). Stejně degradační mechanismy byly navrženy pro několik druhů rodu *Phlebia*, které mineralizovaly 7% ¹⁴C-2,7-diCDD produkující hydroxylované a methoxylované meziprojektu (Mori a Kondo, 2002a,b; Kamei a Kondo, 2005). Navíc Kamei a spolupracovníci (2005) prokázali, že různé druhy houby rodu *Phlebia* byly schopny rozložit vyšší chlorované dioxiny, jako 2,3,7-triCDD, 1,2,8,9-tetraCDD a 1,2,6,7-tetraCDD. Několik zástupců rodu *Bjerkandera* bylo také zkoumáno

pro jejich schopnost transformovat PCDD. Produkce klíčových enzymů, které katalyzují přeměnu těchto znečišťujících látek, byla hodnocena buď v podmínkách s dostatečným nebo naopak nízkým množstvím dusíku (Manji a Ishihara, 2004). Z testovaných kmenů byl nejúčinnějším rozkladačem 1,3,6,8-tetraCDD (21% původního obsahu odstraněno za 10 dní) kmen *Bjerkandera* sp. MS325, který produkuje vysoké hladiny jak MnP tak LiP i za neligninolytických podmínek. Z hlediska schopnosti rozkládat dibenzodioxiny byly další ligninolytické houby popsány v publikaci Pinedo-Rivilla a kol. (2009). Schopnosti hydroxylace a metoxylace PCDD byly dokumentovány také u *Trametes* sp. CH2, *Irpex* sp. W3 a *Pleurotus pulmonarius* (Yamaguchi a kol., 2007; Nam a kol., 2008).

Publikací zabývajících se rozkladem PCDF ligninolytickými houbami není mnoho. Například směs deseti tetra- až oktachlorodibenzofuranů s chlorovými substituenty na aromatických kruzích v poloze 2-, 3-, 7- a 8- byla částečně rozložena stacionárními kulturami *Phanerochaete sordida* YK-624 v prostředí s nízkým obsahem dusíku. Při rozkladu byly detekovány 4,5-dichlorokatechol a tetrachlorokatechol (Takada a kol., 1996). *Phlebia lindtneri* byla schopna rovněž rozložit 2,8-diCDF produkující hydroxy-diCDF (Mori a Kondo 2002b).

6.5. Nově se objevující polutanty.

V posledních letech se do popředí celosvětového zájmu dostala přítomnost tzv. organických mikropolutantů ve vodním prostředí (tj. povrchových vodách, podzemních vodách a zásobárnách pitné vody) (Luo a kol., 2014). Vývoj účinných a citlivých analytických technik umožnil detekci a kvantifikaci velkého množství cizorodých organických chemikálií v životním prostředí, a tak přiměl vědeckou komunitu, aby považovala tento typ kontaminace za téma, které si zaslouží pozornost (Santos a kol., 2010). Mikropolutanty, také nazývané jako "nově se objevující organické kontaminanty" (Gasser a kol., 2014), zahrnují rozsáhlou a stále se rozšiřující skupinu látek zejména antropogenního původu, které jsou detekovány ve stopových koncentracích (ng až µg na litr). Mezi typické mikropolutanty vyskytující se ve vodě patří léčiva a výrobky osobní péče (PPCP z angl. Pharmaceuticals and Personal Care Products) jako jsou antibiotika, protizánětlivá léčiva, cytostatika, dezinfekční prostředky, beta-blokátory, UV-filtry, vonné látky a další sloučeniny (Verlicchi a kol., Luo a kol., 2014). Další nově identifikovaná skupina problematických látek je charakterizována schopností narušovat endokrinní systém, tzv. endokrinní disruptory (ED). Do značné míry se obě tyto skupiny překrývají. ED zasahují do

endokrinního systému a mohou proto poškodit zdraví lidí a živočichů. Nejvíce studovanými a detekovanými ED jsou přirozené hormony estron a 17 β -estradiol, syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2), průmyslové sloučeniny a aditiva nonylfenoly (NP), bisfenol A (BPA) a také desinfekční látka triclosan (Cajthaml a kol., 2009a – publikace 6). Kromě toho byly popsány schopnosti narušit endokrinní systém také u PAU (Arcaro a kol., 1999), PCB, chlorbenzoových kyselin, PCDD a dalších perzistentních organických polutantů. Tyto dodatečně nalezené vlastnosti vysvětlily částečně jejich toxické účinky (Cajthaml, 2015 – publikace 9). Schopnost narušovat endokrinní systém je pravděpodobně nejzásadnější negativní vlastnost mikropolutantů. Výskyt nově se objevujících organických mikropolutantů v životním prostředí je spojen s řadou negativních účinků, zejména pokud jde o vodní ekosystémy (viz níže). Pro regulaci šíření většiny mikropolutantů však do dnešního dne neexistují závazné pokyny a standardy. Pro malou skupinu mikropolutantů (např. NP, BPA, diethylhexyl ftalát-DEHP a diuron) jsou koncentrační limity v životním prostředí stanoveny ve směrnici 2008/105/ES (European Parliament and The Council, 2008). Nonylfenol a nonylfenol-ethoxyláty byly rovněž kanadskou vládou uznány jako toxické látky (Canadian Environmental Protection Act, 1999), ale další problematické mikropolutanty, jako jsou látky z PPCP a látky zasahující do endokrinního systému, nebyly dosud zahrnuty do seznamu regulovaných látek (Luo a kol., 2014).

Přestože se většina mikropolutantů zasahujících do endokrinního systému nepovažuje za tolik rekalitrantní jako jsou perzistentní organické polutanty (např. PAU, PCB, PCDD atd.), široké použití a kontinuální přísun nízkých koncentrací těchto kontaminantů do ekosystémů může vyvolat toxické účinky v prostředí (Santos a kol., 2010). Bylo prokázáno, že nízké tzv. environmentálně relevantní koncentrace cizorodých estrogenů způsobují "feminizaci" samčích tkání a přítomnost samičích reprodukčních orgánů u samců spolu s dalšími dysfunkcemi reprodukčních systémů zejména u mnoha vodních živočichů (Liu a kol., 2009; Santos a kol., 2010, Eggen a kol., 2014). Od čtyřicátých let dvacátého století je pozorován pokles kvality spermatu a rostoucí výskyt rakoviny varlat u mužů, avšak přímá souvislost mezi expozicí látkami zasahujícími do endokrinního systému a projevy negativních účinků byla prozatím prokázána pouze u modelových organismů (UNEP, 2012). Podobná je situace v případě řady vědeckých studií uvádějících účinky látek zasahujících do endokrinního systému

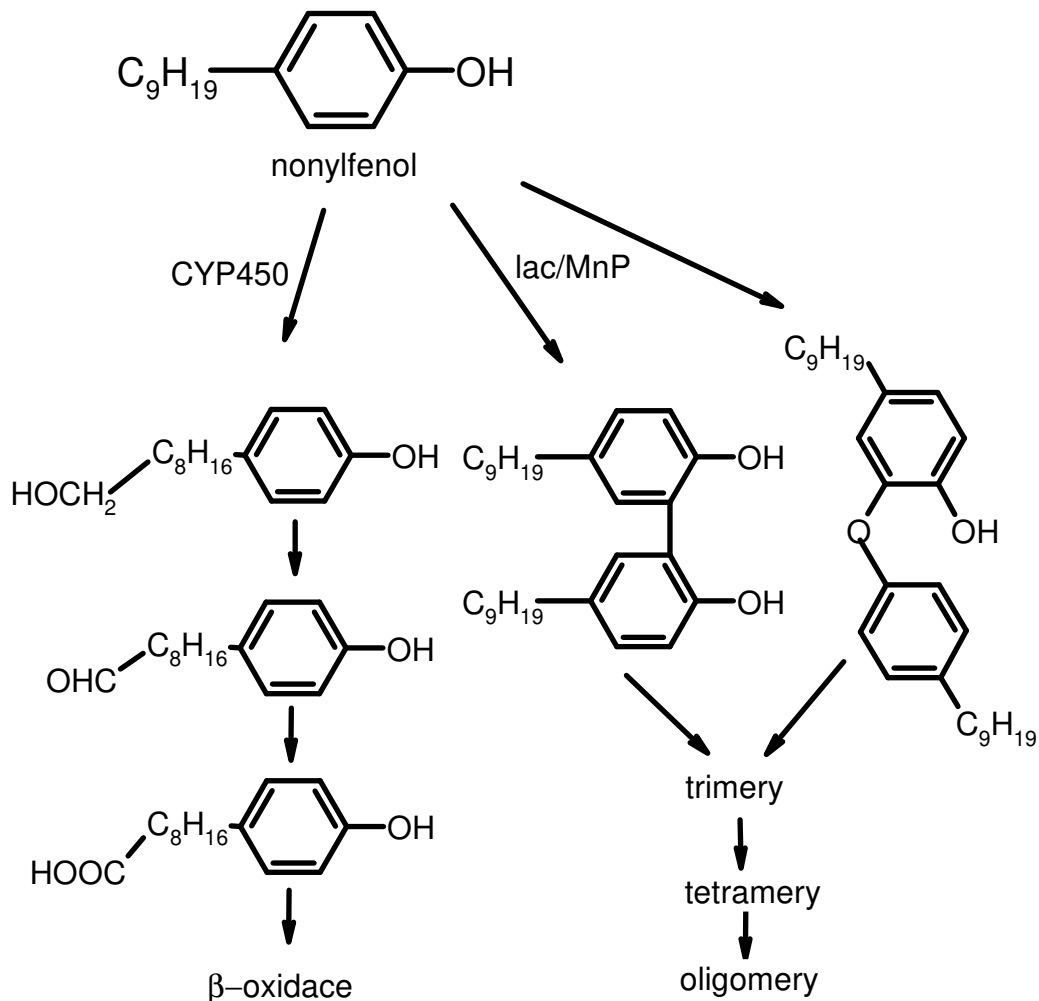
a dalších mikropolutantů v oblasti životního prostředí, které narušují činnost štítné žlázy (např. BPA, ftaláty a perfluorované chemikálie) (Boas a kol., 2012).

Nejvíce, přesto však nedostatečně prozkoumanou skupinou, která pravděpodobně představuje největší riziko, jsou estrogenní ED označované také jako xenoestrogeny. Typické lidské ED s účinkem podobným estrogeneru zahrnují (NP, BPA a EE2). NP izomery se vyskytují v prostředí hlavně jako degradační produkty nonylfenol-polyethoxylátu, který se v mnoha průmyslových procesech používá jako neionogenní povrchově aktivní látka. BPA je klíčovým stavebním kamenem pro polykarbonátové plasty a epoxidové pryskyřice, ale používá se také v řadě dalších materiálů. Syntetické estrogeny, jako je EE2, se celosvětově používají jako perorální antikoncepce. Nemetabolizovaný EE2 a jeho konjugáty se nejprve vylučují do městských kanalizačních systémů a po neúplném rozkladu v procesech čištění odpadních vod dosáhnou ekosystémů povrchových vod. Byla zdokumentována schopnost výše uvedených sloučenin vázat se na lidské receptory a způsobit poruchy endokrinního systému (Cabana a kol., 2007a).

6.6. Biodegradace ED houbami

Počet vědeckých publikací zabývajících se rozkladem ED a dalších mikropolutantů ve vodě houbami se v posledních desetiletích neustále zvyšuje. Řada takových studií se soustředila na skupinu dřevokazných hub, zejména kvůli jejich schopnosti produkovat nespecifické degradativní enzymy (Ashger, 2008; Cajthaml a kol., 2009a). Tyto silné biokatalyzátory atakují fenolické části přítomné v chemické struktuře mnoha estrogenních mikropolutantů (vazební motiv steroidních hormonů), což vede k tvorbě fenoxylových radikálů, které následně podléhají polymeračním reakcím. Jakmile se vytvoří dimery, tetramery nebo oligomery, je celková biologická a endokrinní systém narušující aktivita významně snížena nebo úplně odstraněna (Cabana a kol., 2007a; Cajthaml, 2015). Rovněž byla prokázána účast intracelulárních enzymatických komplexů, jako je CYP450, podílejících se na rozkladu několika sloučenin houbovými kulturami (Marco-Urrea a kol., 2010a; Cajthaml, 2015). Vzhledem k počtu a rozmanitosti sloučenin v této skupině jsou následně ve stručném přehledu nejvýznamnějších vědeckých publikací uvedeny pouze některé ze studovaných sloučenin.

Bylo zjištěno, že NP se velmi účinně rozkládají kulturami ligninolytických hub a purifikovanými ligninolytickými enzymy (viz. Corvini a kol., 2006; Cabana a kol., 2007a; Cajthaml a kol., 2009a; Cajthaml, 2015). Mezikroky biotransformace NP, včetně vazebných reakcí (C-O) a oxidace na koncovém uhlíku alkylového řetězce, jsou shrnuty na obrázku 4.



Obrázek 4. Transformace nonylfenolu ligninolytickými houbami (upraveno dle Cajthaml 2015).

Několik studií zdokumentovalo tvorbu dimerních a oligomerních transformačních produktů NP za použití Lac z *Coriopsis gallica* a *C. polyzona* (Cabana a kol., 2007b; Torres-Duarte a kol., 2012), tedy mechanismus, o kterém je známo, že potlačuje estrogenní aktivitu původních sloučenin. Tsutsumi a kolegové (2001) navrhli podobné produkty transformace po oxidaci pomocí MnP z *P. chrysosporium*. Tyto oligomerní metabolity jsou pravděpodobně

produkovány v důsledku působení MnP na fenolické hydroxylové skupiny, což vede ke zmíněné tvorbě fenolových radikálů, které následně procházejí různými spontánními reakcemi, včetně polymerizace (Hofrichter, 2002; Dec a kol., 2003). Dubroca a kolegové (2005) navrhli možnost vytváření přímé vazby C-C mezi fenolickými kruhy a podobná struktura byla konečně identifikována Wangem a kolegy (2012). Produkce oligomerů NP byla podobně pozorována jinými autory, kteří testovali např. rozkladné schopnosti Lac z houby *Clavariopsis aquatica* (Junghanns a kol., 2005). Potvrdilo se, že produkce polymerizovaných NP vede ke snížení estrogenní aktivity (Tsutsumi a kol., 2001). Syed a kolegové (2011) testovali transformační schopnosti CYP450 z *P. chrysosporium* a popsali další mechanismus transformace alkylfenolů. Zdokumentovali jejich oxidaci (včetně NP) na koncovém uhlíku alkylového řetězce (omega oxidace) vedoucí přes alkoholy k aldehydům. Na základě literatury a známých průběhů transformací u kvasinek a dalších hub při rozkladu alkylfenolové části autoři dospěli k závěru, že terminální oxidace alkylového postranního řetězce je následována odstraněním koncových uhlíků pomocí β -oxidace NP, což bylo pozorováno i u jiných hub, např. u kvasinky *Candida aquatextoris* (Vallini a kol., 2001; Corvini a kol., 2006; Rozalska a kol., 2010). Možný vstup transformačních produktů NP do bazálního metabolismu je rovněž podpořen studií Dubroca a kolegů (2005), kteří pozorovali mineralizaci NP pomocí kultury *T. versicolor* při použití NP značeného ^{14}C . Překvapivě nebyly dosud zjištěny potenciálně očekávané metabolity po přímé hydroxylaci aromatického jádra NP pomocí CYP450 z ligninolytických hub (Corvini a kol., 2006).

Dále bylo prokázáno, že rovněž BPA je náchylný k biologickému rozkladu ligninolytickými houbami a jejich enzymy. Fukuda a kolegové (2001) ukázali, že purifikovaná Lac z *Trametes villosa* účinně transformovala BPA v *in vitro* podmínkách bez jakéhokoliv přídavku redoxního mediátoru. Strukturní analýza produktů rozkládaného BPA za použití nukleární magnetické rezonanční spektroskopie ukázala, že oligomery BPA byly vytvořeny jako výsledek následné oxidace-kondenzace, což představuje tvorbu C-C vazby (Fukuda a kol., 2004). Přítomnost oligomerních částic, z nichž každá obsahuje fenolovou skupinu, naznačuje možnost štěpení oligomerních produktů s následným uvolněním 4-isopropenylfenolu. Nicméně ani rozpustná frakce ani nerozpustné částice reakčních produktů BPA neměly estrogenní účinek ani při vysokých koncentracích (Fukuda a kol., 2004). Podobné metabolity byly také zjištěny Michizem a kolegy (2005), kteří identifikovali 4-isopropylfenol po transformaci BPA pomocí

Lac (*Trametes* sp.) v systému reverzních micel v organickém mediu. Stejně tak Cabana a kol. (2007b) našli polymerní struktury BPA. Wang a kolegové (2012; 2013a) testovali LiP z *P. sordida* a identifikovali dimerizovaný BPA s vazbou C-C a také s C-O můstkem. Stejní autoři také našli hydroxylovaný BPA a naznačili zapojení CYP450 do jeho transformace (Wang a kol., 2013b). Je třeba poznamenat, že ve všech studiích, kde autoři rovněž sledovali estrogení aktivity vzorků, bylo odstranění BPA buď purifikovanými LE a nebo houbovými kulturami vždy doprovázeno současným vymizením estrogení aktivity (Tsutsumi a kol., 2001; Cabana a kol., 2007a; Cajthaml a kol., 2009a; Torres-Duarte a kol., 2012).

Syntetické a přírodní estrogeny se považují za hlavní příčiny estrogení aktivity odpadních a vyčištěných vod. Příčinou je jejich neúplné odstranění v konvenčním procesu čištění odpadních vod (Clouzot a kol., 2008). EE2 je obecně odolnější látkou vůči biologickému rozkladu než přírodní estrogeny (Cajthaml a kol., 2009b – publikace 7; Tran a kol., 2013). Mnozí autoři uvádějí vysokou účinnost ligninolytických hub a enzymů v biodegradaci nebo transformaci EE2 (viz přehled Cabana a kol., 2007b; Cajthaml a kol., 2009b; Demarche a kol., 2012; Blánquez a Guieysse, 2008, Cajthaml a kol., 2009a). Estrogení aktivita obecně klesá s postupující degradací EE2, avšak během testů biodegradace EE2 pomocí *I. lacteus*, *P. ostreatus*, *P. cinnabarinus* a *P. magnolia* byla pozorována zbytková nebo zvýšená estrogení aktivita, což naznačuje produkci rozkladných produktů podobných estrogenům (Cajthaml a kol., 2009a). Suzuki a kolegové (2003) zkoumali odstranění steroidních hormonů 17 β -estradiolu a EE2 v organickém rozpouštědle s použitím systémů Lac s mediátory (hydroxybenzotriazol) a MnP z kmenů *P. chrysosporium* ME-446 a *T. versicolor* IFO-6482. Monitorovali také vývoj estrogení aktivity a dokumentovali vysoký potenciál enzymů pro biodegradaci EE2. Podobné výsledky získali i jiní autoři (Tanaka a kol., 2001), kteří používali Lac z *Trametes* sp. a *Pycnoporus coccineus* v rotujícím reaktoru. Auriol a kolegové (2007) studovali Lac z houby *T. versicolor* a při konverzi přírodních estrogenů a EE2 katalyzované tímto enzymem ukázali, že účinnost systému nebyla významně ovlivněna přítomností reálné komunální odpadní vody. Navíc, když byl hydroxybenzotriazol použit jako mediátor, systém katalyzovaný Lac vykazoval zvýšenou účinnost. Nicméně jsou k dispozici omezené informace o produktech houbové biotransformace EE2. Křesinová a kolegové (2012 – publikace 18) publikovali studii obsahující široký soubor *in vivo* a *in vitro* experimentů využívajících buněčné frakce a purifikované ligninolytické enzymy z *P. ostreatus* a navrhli, že mechanismy rozkladu EE2 by mohly zahrnovat

intracelulární mikrozomální enzymy, s myceliem asociované enzymy s lakázovou aktivitou a extracelulární enzymy (MnP a Lac). Byly dokumentovány synergické příspěvky jednotlivých transformačních kroků a snižující se estrogenní aktivita každé fáze transformace. Autoři také zjistili řadu meziproductů, které jasně ukazují, že navzdory své rekalcitranci je EE2 účinně transformován ligninolytickým systémem a také systémem CYP450 monooxygenázy. K meziproductům transformace patřily metoxylovaný estron a dioxo-17 β -estradiol, které byly pravděpodobně vytvořeny působením Lac a další dehydrogenované a hydroxylované metabolity EE2. V jiné studii Tanaka a kolegové (2009) detekovali dimerní produkty EE2 po vystavení lakáze houby rodu *Trametes*. Pozorovali významné snížení estrogenní aktivity, ale neprovedli podrobnější analýzu meziproductů. Jiní autoři studovali EE2 a biotransformaci přirozeného estrogenu pomocí Lac z neligninolytické askomycety *Myceliophthora thermophila* v membránovém bioreaktoru (Lloret a kol., 2013) a detekovali dimery a trimery EE2 spolu s několika transformačními produkty 17 β -estradiolu. Podobné výsledky byly získány použitím Lac z *Myceliophthora* sp. a *Trametes pubescens* adsorbovaných na skleněných kuličkách po transformaci přirozeného estrogenu 17 β -estradiolu (Nicotra a kol., 2004). Reakční produkty byly také charakterizovány jako C-C dimerní sloučeniny s vazbou buď mezi 4'-4 nebo 2'-2 a C-O (fenolovým kruhem) na pozicích 4' nebo 2'. Zmínění autoři obecně pozorovali pokles v estrogenní aktivitě v průběhu biotransformace EE2.

6.7. Biodegradace farmak

Schopnosti ligninolytických hub rozkládat léčiva byly publikovány zejména v posledních letech. V rámci této problematiky jsou sledovány hlavně nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID z angl. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; např. diklofenak, naproxen, ibuprofen, ketoprofen), regulátory krevních lipidů (kyselina klofibrová), β -blokátory (např. propranolol, atenolol), léky proti epilepsii (karbamazepin) a antibiotika (např. sulfamethoxazol, ciprofloxacin, erythromycin), která patří mezi nejvíce studované farmaceutické sloučeniny (Marco-Urrea a kol., 2009; 2010a,b,c,d; Accinelli a kol., 2010; Rodarte-Morales a kol., 2011; 2012; Domaradzka a kol., 2015; Čvančarová 2013; 2015 – publikace 14, 15).

Marco-Urrea a kolegové (2009) prokázali schopnost čtyř druhů ligninolytických hub (*T. versicolor*, *I. lacteus*, *Ganoderma lucidum* a *P. chrysosporium*) kometabolizovat ibuprofen,

kyseliny klofibrovou a karbamazepin v modelových tekutých systémech. Všechny kmeny účinně odstranily ibuprofen, přičemž *T. versicolor* byla nejúčinnější v biotransformaci rekalcitrantní kyseliny klofibrové a karbamazepinu. Studium rozkladných mechanismů s využitím Lac a Lac s redoxními mediátory v podmínkách *in vitro* a důkazy o vlivu přítomnosti inhibitorů CYP450 na rychlost biotransformace a zároveň detekce hydroxylovaných a dihydroxylovaných derivátů ibuprofenu vedly k závěru, že systém CYP450 monooxygenázy je zodpovědný za počáteční oxidační atak této látky. Další experimenty, ve kterých byl *T. versicolor* inkubován v přítomnosti jiných NSAID (naproxen, ketoprofen a diklofenak), ukázaly, že jsou tyto farmaka rozkládány enzymy intracelulárních (CYP450) a v menší míře extracelulárních (Lac) enzymatických systémů této houby (Marco-Urrea a kol., 2010b,c,d). Ve všech případech byl časový průběh rozkladu NSAID doprovázen výrazným snížením akutní toxicity, což bylo monitorováno testem s luminiscenční bakterií *Vibrio fischeri* a rovněž přítomností přechodných biotransformačních produktů, jejichž chemická struktura byla objasněna metodou nukleární magnetické rezonance.

Autoři Čvančarová a kol. (2013, 2015) studovali možnosti rozkladu fluorochinolonových antibiotik, které patří mezi extrémně rekalcitrantní fluorované látky používané ve veterinární medicíně a předpokládá se, že výskytem v životním prostředí mohou přispívat ke vzniku antibiotických rezistencí bakterií. Jedna z prací byla zaměřena na studium biotransformace flumequinu v modelových podmínkách pomocí pěti zástupců ligninolytických hub. Výsledky ukázaly, že nejúčinnějšími kmeny byly *T. versicolor*, *I. lacteus* a *D. squalens*, jejichž působením došlo k degradaci více než 90 % této látky za 3–6 dnů. Autoři rovněž detekovali transformační produkty a bylo charakterizováno osm metabolitů se strukturními motivy methylesterů, ethylesterů a hydroxy derivát flumequinu. *D. squalens* rovněž redukoval flumequin na aldehyd a alkohol za následného vzniku etheru nebo acetylu. V práci byly rovněž sledovány antibiotické účinky, které byly významně potlačeny v souvislosti s degradací flumequinu houbami *T. versicolor* a *I. lacteus*. Pouze redukční dráha houby *D. squalens* produkovala metabolit, u kterého byla zaznamenána významná reziduální antibakteriální aktivita. Stejná skupina autorů testovala schopnost zástupců ligninolytických hub rozkládat i další fluorochinolonová antibiotika. Ukázalo se, že ofloxacin, ofloxacín a ciprofloxacin byly vůči degradaci houbami *T. versicolor* a *I. lacteus* rekalcitrantnější než flumequin. Antibiotika byla transformována dekompozicí nebo substitucí piperazinového kruhu. Biotransformace fluorochinolonových

antibiotik nebyla do té doby pomocí ligninolytických hub studována. Ve zmíněné studii byly monitorovány antibiotické aktivity a jejich úplná eliminace byla pozorována pouze v případech vzorků s norfloxacinem a ofloxacinem po rozkladu houbou *I. lacteus*. Oproti tomu *T. versicolor* sice odstranil původní antibiotika, ale vzniklé transformační produkty vykazovaly vysokou reziduální antibiotickou aktivitu.

Bylo rovněž publikováno několik studií naznačujících možnosti používání ligninolytických hub pro dekontaminace vodní matrice. *T. versicolor* byl testován ve zvětšeném měřítku při biodegradaci PPCP v provzdušňovaném reaktoru v různých uspořádáních (Blázquez a Guieysse, 2008; Jelić a kol., 2012), a to i v přítomnosti nesterilní reálné odpadní vody (Cruz-Morató a kol., 2013). V této studii byly přidávány externí zdroje uhlíku a dusíku (glukóza a tartrát amonný). V některých případech však také byla zaznamenána produkce hydroxylovaných metabolitů se zvýšenou toxicitou vzhledem k původním molekulám (Cruz-Morató a kol., 2013). Křesinová a kol. (2018 – publikace 17) testovali vyplozený substrát komerčního kmenu *P. ostreatus* HK 35 rovněž v různých bioreaktorových uspořádáních v průtočném režimu. Nejvíce se osvědčil tzv. „trickle-bed reactor“, kdy došlo k odstranění více než 90% ED látek v reálné nesterilní vodě z komunální čistírny odpadních vod. Výsledky ukázaly, že kmen *P. ostreatus* KH 35 byl schopen rozkládat typické ED i v přítomnosti bakterií a reaktor byl finálně testován v lokalitě příslušné čistírny.

V závislosti na hydrofobicitě mají některé mikropolutanty vyskytující se v odpadních vodách tendenci sorbovat se na čistírenské kaly. Stabilizované kaly jsou často aplikovány jako hnojiva (tzv. biosolids) obsahující značná množství legislativně nesledovaných nově se objevujících polutantů (Cabana a kol., 2007a; Clarke a Smith, 2011). Vzhledem k tomu Rodriguez-Rodriguez a kolegové (2012) testovali přístup založený na bioaugmentaci kalu za použití mycelia *T. versicolor* pro odstraňování organických mikropolutantů. Houba, která byla předem pěstována na lignocelulózových peletách, byla smíchána (38% suché hmotnosti) s čistícím kalem a kontrolní mikrokosmy byly smíchány s neinokulovanými peletami. Přítomnosti houby bylo přisuzováno rychlejší vymizení některých mikropolutantů (ranitidin a fenofibrát) a zrychlené odstraňování atorvastatinu, diklofenaku a hydrochlorothiazidu v počáteční fázi inkubace. Nicméně *T. versicolor* pravděpodobně neúspěšně kompetoval se zástupci mikroflóry kalu a celkový rozklad několika sloučenin na konci inkubační doby zůstal podobný rozkladu pozorovaného v neinokulovaných kontrolách (Rodriguez-Rodriguez a kol., 2012).

6.8. Biodegradace mikropolutantů pomocí imobilizovaných enzymů

Aplikace samotných ligninolytických enzymů ve vodném prostředí není příliš realistická vzhledem k denaturačním a inaktivačním podmínkám (teplota, pH, kovové ionty apod.), které se často vyskytují ve splaškových a odpadních vodách (Cabana a kol., 2007a; Demarche a kol., 2012; Kües, 2015). Proto jsou testovány techniky jako imobilizace a zapouzdření (ang. encapsulation) z důvodu zachování katalytických vlastností enzymů a pro možnost separace a opětovného použití takových biokatalyzátorů v procesech s kontinuálním průtokem.

Imobilizace Lac pro její potenciální využití v různých aplikacích, včetně bioremediace, byla předmětem intenzivního výzkumu v posledních desetiletích (viz přehled Duran a kol., 2002; D'Annibale a kol., 1999; 2000). Jako nosiče pro imobilizaci/zapouzdření enzymu byly v řadě studií a aplikací úspěšně použity přírodní (chitin, chitosan, agaróza, celulózová nanovlákná) a syntetické (polystyren, nylon 6, polyakrylamid) polymery předem aktivované pro iontovou nebo kovalentní vazbu s enzymem, skleněnými a mesoporézními křemennými kuličkami, keramikou a jílovými minerály (Duran a kol., 2002; Ba a kol., 2013; Kües, 2015). Technickou nevýhodou takové imobilizované nebo zapouzdřené formy enzymu je obvykle jeho nízký obsah (Cabana a kol., 2007a; Ba a kol., 2013). Tuto skutečnost lze překonat zvýšeným zesíťováním enzymových agregátů (z angl. tzv. Cross-linked enzyme aggregates - CLEA). Technika spočívá v precipitaci enzymů (například Lac) a následném přidání zesíťovacích činidel, které společně vážou aminokyselinové zbytky proteinů za vzniku stabilních a nerozpustných agregátů. Nejčastěji používanými zesíťovacími činidly jsou dialdehydy, jako jsou glutaraldehyd, glyoxal a dextranové polyaldehydy. Tyto chemické látky však mohou mít nepříznivý účinek na vodní organismy (a na člověka), a mimo jiné způsobují určitou ztrátu enzymatické aktivity během přípravy biokatalyzátoru (Ba a kol., 2013). Chitosan představuje užitečnou alternativu dialdehydů jako zesíťovacích činidel za předpokladu, že karboxylové skupiny požadovaného proteinu jsou předem aktivovány karbodiimidem, jako je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoisopropyl) hydrochlorid karbodiimidu (Zhang a kol., 2009; Arsenault a kol., 2011; Cabana a kol., 2011; Ba a kol., 2013).

Některé studie uvádějí, že bez ohledu na použitá zesíťovací činidla CLEA na bázi Lac nebo peroxidáz vykazují lepší biokatalytické vlastnosti (tj. stabilita, katalytická účinnost a opakované použití) ve srovnání s enzymy v jejich volné formě a nabízejí větší potenciál pro dekontaminaci

vod (Cabana a kol., 2007a; Taboada-Puig a kol., 2011; Ba a kol., 2013; Kües, 2015). Ve snaze rozšířit rozsah substrátů oxidovatelných těmito biokatalyzátory někteří autoři nedávno testovali koagulaci různých typů enzymů, tzv. combi-CLEA. Například Ba a spolupracovníci (2014) charakterizovali combi-CLEA obsahující Lac *T. versicolor* a tyrosinázu a poté testovali jeho účinnost při odstraňování acetaminofenu. Taboada-Puig a kolegové (2011) optimalizovali ko-precipitaci *B. adusta* VP a *Aspergillus niger* glukózooxidázy, která slouží jako pomocný enzym produkující H₂O₂. Zajímavým příkladem combi-CLEA je souběžná agregace Lac, VP a glukózooxidázy z *T. versicolor*, *B. adusta* a *A. niger* (Touahar a kol., 2014). Tato univerzální combi-CLEA dokázala oxidovat širší spektrum mikropolutantů (léčivých přípravků) než CLEA na bázi Lac.

Pro odstranění mikropolutantů z umělých nebo reálných odpadních vod byly testovány různé typy reaktorů používající imobilizované nebo insolubilizované enzymy, i když většina výzkumných prací byla provedena pouze v malém měřítku. Lože, fluidní lože, reaktory perfuzního koše a membránové reaktory (Cabana a kol., 2007b; 2009a,b; Taboada-Puig a kol., 2011; Lloret a kol., 2012a,b; Nair a kol., 2013) byly úspěšně použity v sádkovém nebo kontinuálním provozu. Z literatury vyplývá, že membránové reaktory jsou zřejmě nejslibnější metodou pro vyčištění vod obsahujících mikropolutanty v podmínkách kontinuálního průtoku, protože pórovitost membrány umožňuje zadržení biokatalyzátoru, zatímco permeát může dále odcházet (Ba a kol., 2013; Kües a kol., 2015).

Pilotní experiment Gassera a kolegů (2014) prokázal, že reaktor s fluidním ložem (460 litrů celkového objemu) obsahující Lac z *M. thermophila* imobilizovanou na křemičitých nanočásticích a ultrafiltrační membránové jednotky (pórovitost 0,04 μm) byl schopen účinně a kontinuálně odstraňovat BPA z odpadních vod z čistírny. Pokus byl prováděn v terénu ve švýcarské čistírně odpadních vod během 45 dnů. Do reaktoru pracující v cyklickém filtračním režimu byla kontinuálně přidávána odpadní voda. Na konci testu si katalyzátor zachoval přibližně 30-40% své počáteční aktivity a přibližně 66% BPA bylo v reaktoru odstraněno (Gasser a kol., 2014).

7. Pilotní a terénní mykoremediace

Pilotní a provozní aplikace jsou nezbytné pro vyhodnocení účinnosti a ekonomické udržitelnosti mykoremediační technologie. Do dnešního dne však existuje jen málo zpráv o úspěšném použití hub při čištění reálných kontaminovaných prostředí v terénu, jelikož řada technických a inženýrských problémů zůstala pouze v oblasti testování aplikace. Například houba *P. chrysosporium* velmi účinně rozkládá organické znečišťující látky v laboratorních experimentech, ale nikdy nebyla tak účinná při jakémkoliv zkoušce v terénu.

Na počátku 90. let 20. století byla *P. chrysosporium* použita v pilotní studii remediace lokality kontaminované trinitrotoluenem (TNT) v místě bývalé ponorkové základny amerického námořnictva (Bangor, Washington). Počáteční koncentrace TNT 1844 mg/kg byla snížena na 1087 mg/kg během 120 dnů (rozklad 41% původního obsahu TNT). Konečná koncentrace byla však stále výrazně nad stanovenou cílovou hladinou 30 mg/kg a test byl považován za neúspěšný (US EPA Handbook, 1993).

O deset let později se uskutečnila terénní zkouška vyčištění půdy kontaminované ropnými deriváty pomocí technologie tzv. biopile, kde byla účinnost tradičního procesu (provzdušnění a odlehčení půdy pomocí materiálů jako jsou sláma, piliny, třísky atd.) porovnána s přístupem bioaugmentace (Li a kol., 2002). Konkrétně byli izolováni tři zástupci hub charakterizovaní vysokou lipázovou aktivitou (*Mucor* sp., *Cunninghamella* sp. a *Fusarium* sp.) a ve větším množství použiti v původním kontaminovaném prostředí, a to s *P. chrysosporium* nebo bez této ligninolytické houby. Výsledky ukázaly, že inokulum složené pouze z původních hub signifikantně zvýšilo rychlost rozkladu všech ropných uhlovodíků (s ohledem na neinokulovanou půdu), zatímco zavedení alochtonní houby nezlepšilo účinnost procesu odstraňování.

Podobný výsledek byl dosažen o několik let později v pilotním experimentu při remediaci půdy kontaminované TNT, PAU, PCDD a PCDF (Tuomela a kol., 2012). Jako substrát byla vybrána borová kůra pro podporu růstu houby *Phanerochaete velutina*. Jakmile bylo inokulum připraveno, byla alochtonní houba zavedena do půdy a vyhodnocena míra rozkladu cílových znečišťujících látek. Růst *P. velutina* byl zcela zastaven v půdě s vysokou koncentrací PAU (5000 mg/kg) a TNT (>10 g/kg) a nedošlo k žádnému rozkladu. Navíc přítomnost dalších hub, jako je *Trichoderma* sp., pravděpodobně zcela zastavila růst použité ligninolytické houby. Na druhé

straně promíchání půdy kontaminované PAU a TNT se zahradním kompostem výrazně zlepšilo proces rozkladu.

Tyto výsledky byly také potvrzeny o dva roky později, když byl proveden experiment v terénu pro ošetření dvou tun půdy kontaminované PAU (Winqvist a kol., 2014 – publikace 25). V rámci této studie byl testován rozklad PAU nejdříve v laboratorním měřítku a poté v pilotním uspořádání, kdy byla půda smíchána s kompostovaným biologicky rozložitelným odpadem (1:1) a byla inkubována s nebo bez houby *P. velutina*. Vyšší rozsah rozkladu PAU (96% pro 4-kruhové PAU a 39% pro PAU s 5 a 6 kruhy) byl zaznamenán u mikrokosmů inokulovaných ligninolytickou houbou po třech měsících inkubace ve srovnání s biostimulačními kontrolami. V průběhu pilotního experimentu se však ukázalo, že PAU byly odstraněny v podobném rozsahu jak po aplikaci ligninolytické houby, tak v biostimulačním uspořádání (94%), kdy autoři dokumentovali zvýšený výskyt bakteriálních degradačních enzymů, a tedy případné zapojení bakterií do degradačního procesu.

Rovněž byla hodnocena schopnost *T. versicolor* remediovat v reálné půdě kontaminované pentachlorfenolem (Walter a kol., 2005). Kontaminovaná půda pocházela ze zařízení na úpravu dřeva, kde byl pentachlorfenol široce používán jako konzervační prostředek na ochranu dřeva. V předcházející studii provedené v laboratorním měřítku byl pentachlorfenol odstraněn z obou mikrokosmů, biostimulovaného (půda smíchaná pouze s lignocelulózovým substrátem) i obohaceného (lignocelulózový substrát kolonizovaný *T. versicolor*). Úloha houbového inokula při degradaci pentachlorfenolu v přítomnosti autochtonních mikroorganismů nebyla zcela objasněna, ale úplná mineralizace pentachlorfenolu byla pozorována pouze za přítomnosti alochtonní houby.

V následující studii byly experimentální jednotky kontaminované půdy (konečný objem přibližně 500 litrů) dekontaminovány výhradně pomocí *T. versicolor*. Kontaminovaná půda byla zředěna nekontaminovanou půdou (1000mg/kg) a smíchána s dřevními pilinami získanými z odřezků a štěpků. Poté byla tato směs materiálu smíchána se směsí pilin, kukuřičné mouky a škrobu předem inokulované houbou *T. versicolor*, aby se získal konečný poměr půda:substrát:houbové inokulum v hmotnostním poměru 40:20:40 nebo 60:20:20. Po rychlém poklesu koncentrace pentachlorfenolu během prvních 25 týdnů inkubace se rychlost degradace výrazně snížila. Přesto po 2,5 letech bylo v obou jednotkách odstraněno více než 90% původního obsahu PCP (při použití 20% nebo 40% houbového inokula). Ukázalo se, že

hladiny pentachlorofenolu na konci čištění nebyly statisticky odlišné vzhledem k rozdílům v množství houbového inokula.

P. ostreatus je jedním z nejlepších kandidátů na možnou aplikaci pro mykoremediaci půd. Tato ligninolytická houba byla použita pro sanaci lokality kontaminované výbušninami (Yorktown Naval Weapons Station, Virginia, USA), kde byl výrobní proces munice provozován po celá desetiletí (Axtell a kol., 2000). 6 m³ kontaminované půdy bylo smícháno se 3 m³ směsí substrátu kolonizovaného houbou *P. ostreatus*. Koncentrace TNT, HMX (cyklotetramethylentetranitramin) a RDX (1,3,5-cyklotrimethylentritramin) byly znatelně sníženy během 62-denní inkubační doby. Nicméně i v půdě doplněné pouze substrátovou směsí bez *P. ostreatus* byly během stejného období koncentrace TNT, HMX a RDX také výrazně sníženy.

Další aplikace houbové bioaugmentace byla testována při sanaci půdy kontaminované kreosotem z dřevozpracujícího zařízení v Západní Virginii (Lamar a kol., 2002). Po předběžném vyhodnocení degradačních schopností dvou ligninolytických hub, jmenovitě *P. ostreatus* a *I. lacteus*, byl zvolen *P. ostreatus* od komerčního dodavatele. Dvě pilotní jednotky obsahující kontaminovanou půdu, sterilní substrát (dřevěné třísky nebo dřevní štěrka s pilinami) a mycelium *P. ostreatus* byly sledovány po dobu 276 dnů. Koncentrace všech 16 PAU byla snížena u obou testovaných jednotek pod úroveň průmyslových rizik s výjimkou benzo[a]pyrenu (Lamar a kol., 2002). Zapojení původních mikroorganismů do procesu rozkladu však nebylo hodnoceno.

Vliv mycelia *P. ostreatus* na degradaci vybraných PAU v půdě byl zkoumán v terénních podmínkách také v subpolárním podnebném pásu (Hestbjerg a kol., 2003). Homogenizované odpadní vyplozené substráty zbylé po komerční produkci jedlé houby *P. ostreatus* (hlíva ústřičná) byly přidány do půdy kontaminované PAU shromážděné ze dvou zdrojů: bývalé loděnice a skladu uhelného dehtu z továrny produkující asfalt. Remediací obou půd (půdní kontrola, půda smíchaná s pilinovým substrátem a půda smíšená s odpadem *P. ostreatus*) započala v betonových skružích. V případě půdy ze skladu uhelného dehtu přidání hlívy ústřičné výrazně zvýšilo rychlost rozkladu 4-kruhových PAU oproti rychlosti rozkladu v samotné původní půdě nebo v biostimulované vzorku, zatímco PAU s 5ti a 6ti kruhy byly rozloženy pouze v malé míře bez významného rozdílu mezi oběma postupy čištění. Naopak

růst a aktivita *P. ostreatus* se úplně zastavili, když byla tato houba inokulována v druhé půdě z bývalé loděnice. Faktory, které vedly k její neúčinnosti, nebyly objasněny.

8. Závěr

V souvislosti s možnými mykoremediačními aplikacemi byla již od devadesátých let úspěšně použita houbová inokula pro laboratorní experimenty simulující sanace v půdním prostředí, avšak další reálné aplikace ukázaly mnohá úskalí při praktickém uplatňování těchto technologií založených na použití ligninolytických hub (Mir-Tutusaš a kol., 2018 ; Baldrian, 2008).

Důvody, které stojí za tímto neúspěchem, jsou různé. První a nejdůležitější je bezpochyby konkurence mezi alochtonními houbami a přítomnou půdní mikroflórou. Myšlenka, že jediný druh, pro který je ve většině případů půda cizorodým prostředím, by měl přinést úplnou remediaci kontaminovaného prostředí, je zřejmě nerealistická. Houby, stejně jako bakterie a kořeny rostlin introdukované do půdy, jsou ovlivňovány druhem a aktivitou jiných přítomných půdních organismů. Navíc inokulační substrát, který je houbami kolonizován (např. sláma, seno, kukuřice, semena a obaly semen, dřevní štěpka nebo hobliny, kůra apod.), představuje zdroj živin pro autochtonní mikroflóru půdy. To může mít na jednu stranu pozitivní dopad na účinnost bioremediace, jak bylo popsáno v některých případech (Lang a kol., 2000; Steffen a kol., 2007; Federici a kol., 2012), na druhou stranu ale podpora autochtonní mikroflóry může způsobit i zastavení růstu alochtonních hub (De Boer a kol., 2005, Baldrian, 2008). Z tohoto hlediska se jeví jako perspektivní druhy rodu *Pleurotus*, jejichž rozkladné schopnosti jsou méně ovlivněny přítomností půdních organismů a také jsou úspěšnější při kolonizaci kontaminovaného prostředí (Stella a kol., 2017; Lang a kol., 1997; Lang a kol., 1998).

V současnosti je ekologie hub intenzivně studována, a to zejména díky novým technickým možnostem souvisejícím s metodami pokročilého sekvenování. Složení mikrobiální komunity a její dynamika během houbové kolonizace kontaminovaných pevných prostředí, jakož i interakce mezi exogenně zaváděnými myceliemi a původními půdními mikroorganismy, mohou být detailně popisovány prostřednictvím inovativních technik molekulární biologie. Transcriptomika a proteomika se rovněž postupně rozvíjejí a jejich aplikace při studiu mykoremediačních procesů by mohla objasnit, jak je exprese houbových genů a tvorba

enzymů podílejících se na procesu rozkladu regulována v závislosti na změnách stavu prostředí (tj. koncentrace chemikálií/znečišťujících látek, fyziologické a nutriční stresové stavy atd.). Nicméně prozatím je analýza metatranskriptomu a metaproteomu v kontaminovaných a čištěných prostředích stále omezena pouze na několik studií provedených v malém měřítku.

Specifické podmínky růstu, které vyžaduje mnoho ligninolytických hub, představují další významnou podmínku pro aplikaci houbových technologií v terénu. Například *P. chrysosporium* vyžaduje vysokou teplotu pro růst (37°C) a tvorbu ligninolytických enzymů (30°C), jeho aplikace proto není možná v běžných podmínkách mírného pásma (Hestbjerg a kol. 2003). Bohužel tento druh se stal modelovým organismem pro řadu studií. Na druhé straně několik studií ukázalo, že *P. ostreatus* je méně ovlivněn teplotou a zůstává degradačně aktivní i při velmi nízkých teplotách (až do 8°C) (Eggen a Sveum, 1999; Lang a kol. 2000; Hestbjerg a kol., 2001).

Jedním ze zásadních parametrů, které podstatně negativně ovlivňují úspěšnost aplikací všech typů bioremediací, je biologická dostupnost kontaminantů. Tento parametr souvisí zejména s obsahem organických látek v půdě, textuře (např. procentu jílových minerálů) a struktuře (například velikosti půdních agregátů, mikroporéznosti apod.) půdy a hydrofobicitě kontaminantů. Opakovaně bylo potvrzeno, že biodegradaci v reálných podmínkách téměř nikdy není dosaženo úplného odstranění organických polutantů (například PAU a PCB), což platí zvláště v případě historicky kontaminovaných prostředí s vysokým podílem biologicky nedostupných frakcí lipofilních polutantů (Leonardi a kol., 2007 – publikace 19).

Je třeba mít na paměti, že analytické kvantitativní extrakce lipofilních kontaminantů prováděné za velmi účinných podmínek, které umožňují kvantifikaci celkové zátěže kontaminantů v definovaném prostředí (půdě), zahrnují také část znečišťujících látek pevně spojených s půdními složkami, které nejsou reálně přístupné mikrobům a často představují stabilní a netoxickou frakci polutantů. Koncept biologické dostupnosti kontaminantů by měl být tedy brán do úvahy dozorujícími a regulujícími orgány (Naidu a kol., 2013) a také by měl být základem pro hodnocení rizik a sanačních limitů v kontaminovaných lokalitách (Latawiec a kol., 2011; Naidu a kol., 2013).

Dalším kritickým faktorem, který vyžaduje pozornost při řešení mykoremediačních přístupů, je typ a množství inokula, které slouží účinné a dostatečné kolonizaci půdního prostředí.

Ligninolytické houby nejsou vybaveny schopnostmi růstu přímo v půdě, pokud není k dispozici také právě vnější lignocelulózový substrát. Nicméně použití velkého množství substrátu kolonizovaného houbami není ekonomicky realizovatelné a významně zvyšuje objem půdy po vyčištění. Výhodnou alternativou pro eliminaci vysokých nákladů spojených s produkcí houbových inokul je využití tzv. vyplozeného substrátu (spent mushroom compost), který je levným a snadno dostupným zdrojem houbových mycelií a enzymů (Phan a Sabaratnam, 2012). V posledních letech se exponenciálně rozrostl celosvětový trh s komerčně pěstovanými jedlými houbami (např. *P. ostreatus*) a substráty po vyplození plodnic jsou považovány za bioodpad houbového průmyslu, který má být likvidován. Nicméně právě tento bioodpad z *P. ostreatus* byl relativně úspěšně testován jako zdroj životaschopného mycelia pro dekontaminaci materiálů v terénních podmínkách, jak bylo uvedeno v předchozí části.

Důležitým pozitivním aspektem je téměř výhradní zapojení kometabolismu v případě ligninolytických hub, což znamená, že degradační procesy nejsou limitovány např. nízkými koncentracemi polutantů (tzv. koncentrační degradační práh – často pozorovatelný u bakterií).

Použití houbových enzymů (Lac, peroxidázy a peroxigenázy) pro čištění odpadních vod kontaminovaných mikropolutanty nebo odpadních průmyslových vod je mnohdy realističtější než jiné bioremediační přístupy. V tomto ohledu se zdá, že vývoj bioreaktorů s imobilizovanými enzymy je v technologicky vyspělém stadiu. Podle názoru některých autorů je toto jedna z nejslibnějších odvozených mykoremediačních technologií, která by mohla být prakticky využita v blízké budoucnosti.

Jak bylo ukázáno v předchozím textu, není pochyb o tom, že houby a hlavně ligninolytické houby jsou perspektivními organismy z hlediska rozkladu perzistentních organických látek znečišťujících půdy a dalších nově se v životním prostředí objevujících mikropolutantů. Smysl studia biodegradací spočívá nejen v možnosti aplikace mykoremediací, třebaže se tato technologie prozatím v praxi příliš neuplatnila, ale rovněž obecně ve studiu mikrobiálních biodegradačních mechanismů antropogenních látek. Tyto informace jsou cenné zejména z hlediska predikcí a evaluací rizik spojených s produkcí nových cizorodých látek a jejich následnou introdukcí do životního prostředí.

Literatura

REFERENCES.

- Accinelli C., Saccà M.L., Batisson I., Fick J., Mencarelli M., Grabic R. (2010). Removal of oseltamivir (Tamiflu) and other selected pharmaceuticals from wastewater using a granular bioplastic formulation entrapping propagules of *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere* 81: 436-443.
- Adebusoye S.A., Picardal F.W., Ilori M.O., Amund O.O. (2008). Influence of chlorobenzoic acids on the growth and degradation potentials of PCB-degrading microorganisms. *World J. Microb. Biot.* 24: 1203-1208.
- Anastasi A., Tigini V., Varese G.C. (2013). The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi. In: E.M. Goltapeh, Y.R. Danesh, A. Varma (eds.), *Fungi as Bioremediators*, Soil Biology 32. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 29-49.
- Arcaro K.F., O'Keefe P.W., Yang Y., Clayton W., Gierthy J.F. (1999). Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. *Toxicology*. 133: 115-127.
- Arsenault A., Cabana H., Jones J.P. (2011). Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent. *Enzyme Res.* Article ID: 376015.
- Ashger M., Bhatti H.N., Ashraf M., Legge R.L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771-783.
- Auriol, M., Filali-Meknassia, Y., Tyagi, R.D., and Adams, C.D. (2007). Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water. Res.* 41: 3281-3288.
- Axtell C., Johnston C.G., Bumpus J.A. (2000). Bioremediation of soil contaminated with explosives at the naval weapons station yorktown *J. Soil Contam.* 9: 537-548.
- Ba S., Arsenault A., Hassani T., Jones J.P., Cabana H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33: 404-418.
- Ba S., Haroune L., Cruz-Morato C., Jacquet C., Touahar I.E., Bellenger J-P., Legault C.Y., Jones J.P., Cabana H. (2014). Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Sci. Total Environ.* 487: 748-755.
- Baborová P., Möder M., Baldrian P., Cajthamlová K., Cajthaml T. (2006). Purification of new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157: 248-253.
- Baldrian P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 78-91.
- Baldrian P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecol.* 1: 4-12.

- Baldrian P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecol.* 1: 4-12.
- Baldrian P. in der Wiesche C., Gabriel J., Nerud F., Zadrazil F. (2000). Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2471- 2478.
- Beaudette L.A., Davies S., Fedorak P.M., Ward O.P., Pickard M.A., (1998). Comparison of gas chromatography and mineralization experiment for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2020-2025.
- Bernhardt R. (2006). Cytochromes as versatile biocatalists. *J. Biotechnol.* 124:128-145.
- Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1996a). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 292-295.
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P.P., Freeman J.P, Cerniglia C.E. (1996b). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2547-2553.
- Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1996c). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 292-295.
- Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2495-2501.
- Bhatt M., Cajthaml T., Šašek V. (2002). Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiol.* 47: 255-258.
- Blánquez P., Guieysse, B. (2008). Continuous biodegradation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 50: 459-462.
- Boas M., Feldt-Rasmussen U., Main K.M. (2012). Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell Endocrinol.* 355: 240-248.
- Borazjani H., Wiltcher D., Diehl S. Bioremediation of polychlorinated biphenyl and petroleum contaminated soil. Proceedings of environmental science and technology 2005(II). American Science Press. ISBN 0-9768853-5-2
- Bumpus J.A., Tien M., Wright D., Aust S.D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science.* 228: 1434-1436.
- Cabana H., Jones J.P., Agathos S.N. (2007a). Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review. *Eng. Life Sci.* 7: 429-456.
- Cabana H., Jiwan J.L.H., Rozenberg R., Elisashvili V., Penninckx M., Agathos S.N., Jones J.P. (2007b) Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* 67: 770-778.

- Cabana H., Jones J.P., Agathos S.N. (2009a). Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine-disrupting chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 1582-1592.
- Cabana H., Alexandre C., Agathos S.N., Jones J.P. (2009b). Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresour. Technol.* 100: 3447-3458.
- Cabana H., Ahamed A., Leduc R. (2011). Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresour. Technol.* 102: 1656-1662.
- Cajthaml T., Erbanová P., Kollmann A., Novotný C., Šašek V., Mougin C. (2008). Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 53, 289-294.
- Cajthaml T., Möder M., Kačer P., Šašek V., Popp P. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A.* 974: 213-222.
- Cajthaml T., Erbanová P., Šašek V., Möder M. (2006). Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benzo(a)anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64: 560-564.
- Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Möder M. (2009a). Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 6: 745-750.
- Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Sigler K., Řezanka T. (2009b). Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* 157: 3325-3335.
- Cajthaml T., Svobodová K. (2012). Biodegradation of aromatic pollutants by ligninolytic fungal strains. In: S.N. Singh (ed.), *Microbial degradation of xenobiotics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 291-316.
- Cajthaml T. (2015). Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: mechanisms involved in the degradation. *Environ. Microbiol.* 17: 4822-4834.
- Camarero S., Cañas A.I., Nousiainen P., Record E., Lomascolo A., Martínez M.J., Martínez Á.T. (2008). *p*-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environ. Sci. Technol.* 42: 6703-6709.
- Canadian Environmental Protection Act (1999). Priority substances list assessment report, "nonylphenol and its ethoxylates".
- Cañas A.I., Camarero S. (2010). Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.* 28: 694-705.
- Cerniglia C.E., Gibson D.T. (1977). Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 363-370.
- Cerniglia C.E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 324-333.

- Cerniglia C.E., Sutherland J.B. (2006). Relative roles of bacteria and fungi in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and bioremediation of contaminated soils. In: G.M. Gadd (ed.), *Fungi in Biogeochemical Cycles*. Cambridge University Press, pp. 182-211.
- Clarke B.O., Smith S.R. (2011). Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37: 226-247.
- Cloete T.E., Celliers L. (1999). Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus *Coriolus versicolor* in the presence of different concentration of Mn (IV) oxide. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 44: 243-253.
- Clouzot L., Marrot B., Doumenq P., Roche N. (2008). 17 α -Ethinylestradiol: an endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environ. Prog.* 27: 383-396.
- Corvini P.F.X., Schaffer A., Schlosser D. (2006). Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols - our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 223-243.
- Covino S., Svobodová K., Křesinová Z., Petruccioli M., Federici F., D'Annibale A., Čvančarová M., Cajthaml T. (2010a). *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* 101: 3004-3012.
- Covino S., Čvančarová M., Muzikář M., Svobodová K., D'Annibale A., Petruccioli M., Federici F., Křesinová Z., Cajthaml T. (2010b). An efficient PAH-degrading *Lentinus (Panus) tigrinus* strain: effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices. *J. Hazard. Mater.* 183: 669-676.
- Covino S., Svobodová K., Čvančarová M., D'Annibale A., Petruccioli M., Federici F., Křesinová Z., Galli E., Cajthaml T. (2010c). Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere* 79: 855-864.
- Črešnar B., Petrič Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. Review. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 29-35.
- Crinnion W.J. (2011). Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological and endocrinological consequences. *Alternative Medicine Review* 16: 5-13.
- Cruz-Morató C., Ferrando-Climent L., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., Marco-Urrea E., Vicent T., Sarrà M. (2013). Duran Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Res.* 47: 5200-5210.
- Čvančarová M., Křesinová Z., Filipová A., Covino S., Cajthaml T. (2012). Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88: 1317-1323.
- Čvančarová M., Möder M., Filipová A., Reemtsma T., Cajthaml T. (2013). Biotransformation of the antibiotic agent flumequine by ligninolytic fungi and residual antibacterial activity of the transformation mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14128-14136.
- Čvančarová M., Möder M., Filipová A., Cajthaml T. (2015). Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi - Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere* 136: 311-320.

- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Di Mattia E., Sermanni G.G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive mill wastewater treatment. *Process Biochem.* 34: 697-706.
- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Di Mattia E., Sermanni G.G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* 77: 265-273.
- de Boer W., van der Wal A. (2008). Chapter 8 Interactions between saprotrophic basidiomycetes and bacteria. In: L. Boddy, J.C. Frankland, P. van West (Eds.), *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. British Mycological Society Symposia Series. Vol. 28, pp. 143-153.
- Dec J., Haider K., Bollag J. (2003) Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. *Chemosphere* 52: 549-556.
- Demarche P., Junghanns C., Mazy N., Agathos S.N. (2012). Design-of-experiment strategy for the formulation of laccase biocatalysts and their application to degrade bisphenol A. *New Biotechnol.* 30: 96-103.
- Demarche P., Junghanns C.H., Nair R.R., Agathos S.N. (2012). Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnol. Adv.* 30: 933-953.
- Dietrich D., Hickey W.J., Lamar R. (1995). Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :3904-3909.
- Dittmann J., Heyser W., Bücking H. (2002). Biodegradation of aromatic compounds by white rot and ectomycorrhizal fungal species and the accumulation of chlorinated benzoic acid in ectomycorrhizal pine seedlings, *Chemosphere* 49: 297-306.
- Domaradzka D., Guzik U., Wojcieszynska D. (2015). Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14: 229-239.
- Dubroca J., Brault A., Kollmann A., Touton I., Jolival G., Kerhoas L., Mougin C. (2005). Biotransformation of nonylphenol surfactants in soils amended with contaminated sewage sludges. In: E. Lichtfouse, S. Dudd, D. Robert (Eds.), *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 305-315.
- Duncan C.G., Deverall F.J. (1964). Degradation of wood preservatives by fungi. *Appl. Microbiol.* 12: 57-62.
- Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Tech.* 31: 907-931.
- Eaton D.C. (1985). Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enzyme Microb. Tech.* 7: 194-196.
- Eggen R.I.L., Hollender J., Joss A., Schärer M., Stamm C. (2014). Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: the benefits of upgrading wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 8: 7683-7689.

- Eggen T., Sveum P. (1999). Decontamination of aged creosote polluted soil: The influence of temperature, white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, and pretreatment. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 43: 125-133.
- Eibes G., Cajthaml T., Moreira M.T, Feijoo G., Lema J.M. (2006). Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64: 408-414.
- El Majidi N., Bouchard M., Carrier G. (2013). Systematic analysis of the relationship between standardized prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and mental and motor development during follow-up of nine children cohorts. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 66: 130-146.
- European Parliament and The Council. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Union* 2008; L348: 84-97.
- Farnet A.M., Gil G., Ruaudel F., Chevremont A.C., Ferre E. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon transformation with laccases of a white-rot fungus isolated from a mediterranean sclerophyllous litter. *Geoderma* 149: 267-271.
- Federici E., Giubilei M., Santi G., Zanaroli G., Negroni A., Fava F., Petruccioli M., D'Annibale A. (2012). Bioaugmentation of a historically contaminated soil by polychlorinated biphenyls with *Lentinus tigrinus*. *Microb. Cell Fact.* 11: 35.
- Field J.A., Reyes Sierra-Alvarez (2008). Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. Review. *Environmental Pollution* 155: 1-12.
- Fukuda T., Uchida H., Suzuki M., Miyamoto H., Morinaga H., Nawata H., Uwajima T. (2004). Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 1212-1218.
- Fukuda T., Uchida H., Takashima Y., Uwajima T., Kawabata T., Suzuki, M. (2001). Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 704-706.
- Furukawa K., Fujihara H. (2008). Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features. *J. Biosc. Bioeng.* 105: 433-449.
- Gasser C.A., Yu L., Svojitka J., Wintgens T., Ammann E.M., Shahgaldian P., Corvini P.F.-X. Hommes G. (2014). Advanced enzymatic elimination of phenolic contaminants in wastewater: a nano approach at field scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 3305-16
- Gichner T., Lovecká P., Vrchotová B. (2008). Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acids metabolic products of polychlorinated biphenyls. *Mutat. Res.* 657: 140-145.
- Giubilei M.A., Leonardi V., Federici E., Covino S., Šašek V., Novotný Č., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M. (2009). Effect of mobilizing agents on mycoremediation and impact on the indigenous microbiota. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84: 836-844.

- Gramss G., Kirsche B., Voigt K.D., Gunther T., Fritsche W. (1999). Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol. Res.* 103:1009-1018.
- Hammel K.E., Kalyanaraman B., Kirk T.K. (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261: 16948-16952.
- Hammel K.E., Green B., Gai W.Z. (1991). Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10605-10608.
- Hammel K.E. (1995). Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environ. Health Perspect.* 103: 41-43.
- Haritash A.K., Kaushik C.P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169: 1-15.
- Harms H., Schlosser D., Wick L.Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 177-192.
- Helmfrid I., Berglund M., Löfman O., Wingren G. (2012). Health effects and exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and metals in a contaminated community. *Environ. Intern.* 44: 53-58.
- Hendey N.I. (1964). Some observations on *Cladosporium resinae* as a fuel contaminant and its possible role in the corrosion of aluminium alloy fuel tanks. *T. Brit. Mycol. Soc.* 47: 467-475.
- Hestbjerg H., Brinch U.C., Nielsen T. (2001). Potential of *Pleurotus ostreatus* for bioremediation: Temperature requirements and competitiveness. Abstracts, SETAC Organic Soil Contaminants, Copenhagen, Denmark, September 2-5, p. 24.
- Hestbjerg H., Willumsen P.A., Christensen M., Andersen O., Jacobsen C.S. (2003). Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. *Environm. Toxicol. Chem.* 22: 692-698.
- Hofrichter M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30: 454- 466.
- Hofrichter M., Ullrich R. (2014). Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19: 116-125.
- Huff J.E., Moore J.A., Saracci R., Tomatis L. (1980). Long-term hazards of polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ. Health Persp.* 36: 221-240.
- Jelić A., Gros M., Petrović M., Ginebreda A., Barceló D. (2012). Occurrence and elimination of pharmaceuticals during conventional wastewater treatment. Emerging and Priority Pollutants in Rivers. In: H. Guasch, A. Ginebreda, A. Geiszinger (eds.), *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. 19: pp 1-23.
- Johannes C., Majcherczyk A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524-528.

- Johannes C., Majcherczyk A., Hüttermann A. (1998). Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *J. Biotechnol.* 61: 151-156.
- Junghanns C., Möder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D. (2005). Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology.* 151: 45-57.
- Kamei I., Kogura R., Kondo R. (2006a). Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 566-575.
- 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.
- Kamei I., Suhara H., Kondo R. (2005). Phylogenetical approach to isolation of white rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 358-366.
- Kamei I., Sonoki S., Haraguchi K., Kondo R. (2006b). Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 932-940.
- Keum Y.S., Li Q.X. (2004). Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* 56: 23-30.
- Kohlmeier S., Smits T.M.H., Ford R.M., Keel C., Harms H., Lukas Y.W. (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ. Sci. Technol.* 39: 4640-4646.
- Kordon K., Mikolasch A., Schauer F. (2010). Oxidative dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by laccases of white-rot fungi. *Intern. Biodet. Biodegrad.* 64: 203-209.
- Kramer S., Moller Hikel S., Adams K., Hinds D., Moon K. (2012). Current status of the epidemiologic evidence linking polychlorinated biphenyls and non-Hodgkin lymphoma and the role of immune dysregulation. *Environmental Health Perspectives.* Vol. 120, n. 8.
- Křčmář P., Kubátová A., Votruba J., Erbanová P., Novotný Č., Šašek V. (1999). Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 269-276.
- Křesinová Z., Linhartová L., Filipová A., Ezechiáš M., Mašín P., Cajthaml T. (2018). Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. *New Biotechnol.* 43: 53-61.
- Křesinová Z., Möder M., Ezechiáš M., Svobodová K., Cajthaml T. (2012) Mechanistic study of 17 α -ethinylestradiol biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: tracking of extracellular and intracellular degradation mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 46: 13377-13385.
- Kubátová A., Erbanová P., Eichlerová I., Homolka L., Nerud F., Šašek V. (2001). PCB congener selective biodegradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* 43: 207-215.
- Kües U. (2015). Fungal enzymes for environmental management. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33: 268-278.

- Lamar R.T., White R.B., Ashley K.C. (2002). Evaluation of white-rot fungi for the remediation of creosote-contaminated soil. *Remediation J.* 12: 97-106.
- Lang E., Eller G., Zadrazil F. (1997). Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microb. Ecol.* 34: 1-10.
- Lang E., Gonser A., Zadrazil F. (2000). Influence of incubation temperature on activity of ligninolytic enzymes in sterile soil by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens*. *Basic Microbiol.* 40: 33-39.
- Lang E., Nerud F., Zadrazil F. (1998). Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microb. Lett.* 167: 239-244.
- Latawiec A.E., Swindell A.L., Simmons P., Reid B.J. (2011). Bringing bioavailability into contaminated land decision making: The way forward? *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 41: 52-77.
- Lee P.Y., Chen C.Y. (2009). Toxicity and quantitative structure-activity relationships of benzoic acids to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *J. Hazard. Mater.* 165: 156-161.
- Leonardi V., Šašek V., Petruccioli M., D'Annibale A., Erbanová P., Cajthaml T. (2007). Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 60: 165-170.
- Li P.J., Sun T.H., Stagnitti F., Zhang C.G., Zhang H.R., Xiong X.Z., Allinson G., Ma X.J., Allinson M. (2002) Field-scale Bioremediation of soil contaminated with crude oil. *Environ. Eng. Sci.* 19: 277-289.
- Liu Z.H., Kanjo Y., Mizutani S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Sci Total Environ.* 407: 731-748.
- Lloret L., Eibes G., Feijo G., Moreira M.T., Lema J.M. (2012a). Continuous operation of a fluidized bed reactor for the removal of estrogens by immobilized laccase on Eupergit supports. *J. Biotechnol.* 182:404-406.
- Lloret L., Hollmann F., Eibes G., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M. (2012b). Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. *Biodegradation* 23: 373-386.
- Lloret L., Eibes G., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2013). Removal of estrogenic compounds from filtered secondary wastewater effluent in a continuous enzymatic membrane reactor. Identification of biotransformation products. *Environ. Sci. Technol.* 47: 4536-4543.
- Luo Y., Guo W., Ngo H. Hao., Nghiem L. Duc., Hai F. Ibney., Zhang J., Liang S. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473-474: 619-641.
- Majcherczyk A., Johannes C., Huttermann A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 335-341.

- Manji S., Ishihara A. (2004). Screening of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-degrading fungi capable of producing extracellular peroxidases under various conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 438-444.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Vicent T., Caminal G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74: 765-772.
- Marco-Urrea E., Radjenović J., Caminal G., Petrović M., Vicent T., Barceló D. (2010a). Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res.* 44: 521-532.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Blánquez P., Vicent T., Caminal G. (2010b). Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresour. Technol.* 101: 2159-2166.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Cruz-Morató C., Caminal G., Vicent T. (2010c). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J. Hazard. Mater.* 176: 836-842.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Cruz-Morató C., Caminal G., Vicent T. (2010d). White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere* 78: 474-481.
- Michizoe J., Ichinose H., Kamila N., Maruyama T., Goto M. (2005). Biodegradation of phenolic environmental pollutants by a surfactant-laccase complex in organic media. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 642-647.
- Mir-Tutusaus J. A., Baccar R., Caminal G., Sarra M. (2018) Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Res.* 138: 137-151.
- Möder M., Cajthaml T., Koeller G., Erbanová P., Šašek V. (2005). Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 61: 1370-1378
- Moen M.A, Hammel K.E. (1994). Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1956-1961.
- Mori T., Kondo R. (2002a). Degradation of 2, 7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by wood-rotting fungi, screened by dioxin degrading ability. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 127-131.
- Mori T., Kondo R. (2002b). Oxidation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 200-205.
- Mougin C. (2002). Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 22: 1-33.
- Muzikář M., Křesinová Z., Svobodová K., Filipová A., Čvančarová M., Cajthamlová K., Cajthaml T. (2011). Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *J. Hazard. Mater.* 196: 386-394.

- Naidu R., Channey R., McConnell S., Johnston N., Semple K.T., McGrath S., Dries V., Nathanail P., Harmsen J., Pruszinski A., MacMillan J., Palanisami T. (2015). Towards bioavailability-based soil criteria: past, present and future perspectives. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22: 8779-8785.
- Nair R.R., Demarche P., Agathos S.N. (2013). Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. *New Biotech.* 30: 814-823.
- Nam I., Kim Y., Murugesan K., Jeon J., Chang Y. (2008). Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst. *J. Hazard. Mater.* 157: 114-21.
- Nicotra S., Intra A., Ottolina G., Riva S., Danieli B. (2004). Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* 15: 2927-2931.
- Novotný Č., Cajthaml T., Svobodova K., Susla M., Sasek V. (2009). *Irpex lacteus*, a white rot fungus with biotechnological potential - review. *Folia Microbiol.* 54: 375-390
- Novotný Č., Erbanová P., Šašek V., Kubátová A., Cajthaml T., Lang E., Krahl J., Zdražil F. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 10: 159-168.
- Novotný Č., Vyas B.R.M., Erbanová P., Kubátová A., Šašek V., (1997). Removal of PCBs by various white-rot fungi in liquid cultures. *Folia Microbiol.* 42: 136-140.
- Passatore L., Rossetti S., Juwarkar A.A., Massacci A. (2014). Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives. *J. Hazard. Mater.* 278: 189-202.
- Phan C.W., Sabaratnam V. (2012). Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 96: 863-873.
- Pickard M.A., Roman R, Tinoco R., Vazquez-Duhalt R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3805-3809.
- Pieper D.H. (2005). Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 170-191.
- Pinedo-Rivilla C., Aleu J., Collado I.G. (2009). Pollutants biodegradation by fungi. *Curr. Org. Chem.* 13: 1194-1214.
- Pointing S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.
- Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Vasilchenko L.G. (2004). Decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics by fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40: 5-23.
- Rodarte-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema M.J. (2011). Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1839-1846.

- Rodarte-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema M.J. (2012). Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation* 23: 145-156.
- Rodríguez-Rodríguez C.E., Barón E., Gago-Ferrero P., Jelić A., Llorca M., Farré M., Díaz-Cruz M.S., Eljarrat E., Petrović M., Caminal G., Barceló D., Vicent T. (2012). Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. *J. Hazard. Mater.* 233-234: 235-243.
- Rozalska, S., Szewczyk, R., and Dlugonski, J. (2010) Biodegradation of 4-n-nonylphenol by the non-ligninolytic filamentous fungus *Glioccephalotrichum simplex*: a proposal of a metabolic pathway. *J. Hazard. Mater.* 180: 323-331.
- Ruiz-Aguilar G.M.L., Fernandez-Sanchez J.M., Rodriguez-Vazquez R., Poggi-Varaldo H. (2002). Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Adv. Environ. Res.* 6: 559-568.
- Sack U., Heinze T.M., Deck J., Cerniglia C.E., Martens R., Zadrazil F., Fritche W. (1997). Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3919-3925.
- Santos L.H., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater.* 175: 45-95.
- Šašek V. (2003). Why mycoremediations have not yet come into practice. In: V. Šašek, J.A. Glaser, P. Baveye (eds.), *The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solutions*, NATO Science Series. Kluwer Academic Publishers vol. 19: 247-266.
- Sato A., Watanabe T., Watanabe Y., Harazono K., Fukatsu T. (2002). Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2, 7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 213-217.
- Schützendübel A., Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A. (1999). Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 43: 93-100.
- Seto M., Nishibori K., Masai E., Fukuda M., Ohdaira Y. (1999). Degradation of polychlorinated biphenyls by a 'Maitake' mushroom, *Grifola frondosa*. *Biotechnol. Lett.* 21: 27-31.
- Steffen K.T., Hatakka A., Hofrichter M. (2002) Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 212-217.
- Steffen K.T., Schubert S., Tuomela M., Hatakka A., Hofrichter M. (2007). Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation* 18: 359-369.
- Stella T., Covino S., Z., D'Annibale A., Petruccioli M., Čvančarová M., Cajthaml T. (2013). Chlorobenzoic acid degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus*: *In vivo* and *in vitro*

mechanistic study-evidence for P-450 involvement in the transformation. *J. Hazard. Mater.* 260: 975-983.

Stella T., Covino S., Burianová E., Filipová A., Křesinová Z., Voříšková J., Větrovský T., Baldrian P., Cajthaml T. (2015). Chemical and microbiological characterization of an aged PCB-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 533: 177-186.

Stella T., Covino S., Křesinová Z., D'Annibale A., Petruccioli M., Čvančarová M., Cajthaml T. (2013). Chlorobenzoic acid degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus*: *In vivo* and *in vitro* mechanistic study-evidence for P-450 involvement in the transformation. *J. Hazard. Mater.* 260: 975-983.

Stella T., Covino S., Čvančarová M., Filipová A., Petruccioli M., D'Annibale A., Cajthaml T. (2017). Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi. *J. Hazard. Mater.* 324: 701-710.

Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T. (2003). Removal of estrogenic activities of 17 α -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* 37: 1972-1975.

Svobodová K., Placková M., Novotná V., Cajthaml T. (2009). Estrogenic, androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two *in vitro* yeast assays. *Sci. Total. Environ.* 407: 5921-5925.

Syed K., Porollo A., Ying W.L., Yadav J.S. (2011). A fungal P450 (CYP5136A3) capable of oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons and endocrine disrupting alkylphenols: role of Trp129 and Leu324. *PLoS ONE* 6: 1-14.

Taboada-Puig R., Junghanns C., Demarche P., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M., Agathos S.N. (2011). Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresour. Technol.* 102: 6593-6599.

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.

Takagi S., Shirota C., Sakaguchi K., Suzuki J., Sue T., Nagasaka H., Hisamatsu S., Sonoki S. (2007). Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. *Chemosphere* 67: 54-57.

Tanaka T., Tonosaki T., Nose M., Tomidokoro N., Kadomura N., Fujii, T., and Taniguchi, M. (2001) Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 312-316.

Tanaka T., Tamura T., Ishizaki Y., Taniguchi M., Enzymatic treatment of estrogens and estrogen glucuronide. *J. Environ. Sci.* 21: 731-735.

Thomas D.R., Carswell K.S., Georgiou G. (1992). Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1395-1402.

Tien M., Kirk T.K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2280-2284.

- Torres-Duarte C., Teresa V.M., Vazquez-Duhalt R. (2012) Laccase-mediated transformations of endocrine disrupting chemicals abolish binding affinities to estrogen receptors and their estrogenic activity in zebrafish. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168: 864-876.
- Touahar I.E., Haroune L., Ba S., Bellenger J.P., Cabana H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 481: 90-99.
- Tran N.H., Urase T., Ngo H.H., Hu J.Y., Ong S.L. (2013). Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresour. Technol.* 146: 721-731.
- Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T. (2001). Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading Basidiomycetes. *Chemosphere* 42: 271-276.
- Tuomela M., Steffen K.T., Kerko E., Hartikainen H., Hofrichter M., Hatakka A. (2005). Influence of Pb contamination in boreal forest soil on the growth and ligninolytic activity of litter-decomposing fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 179-186.
- Tuomela M., Jørgensen K., Winqvist E., Björklöf K., Schultz E., Anasonye F., Häkkinen L., Räsänen M., Sorvari J., Hartikainen E.S., Steffen K., Valentin L. (2012). Mycoremediation of contaminated soil in field scale. Conference abstract. *Environ. Eng. Manag. J.* 11, S38.
- Ullrich R., Nüske J., Scheibner K., Spantzel J., Hofrichter M. (2004). Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4575-4581.
- UNEP, United Nations Environment Programme (2012). Annual report.
- US Environmental Protection Agency (2000). Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. Part I: Estimating exposure to dioxin-like compounds. Vol. 3EPA/600/P-00/001.
- US EPA Handbook (1993). Approaches for the remediation of federal facility sites contaminated with explosive and radioactive wastes. EPA/625/R-93/013.
- Valentin L., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M. (2006). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 58: 15-21.
- Valli K., Wariishi H., Gold M.H. (1992). Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174: 2131-2137.
- Vallini G., Frassinetti S., D'Andrea F., Catelani G., Agnolucci M. (2001). Biodegradation of 4-(1-nonyl)phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquatextoris*: identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 47: 133-140.
- Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci.* 93: 223-241.

- van den Brink H.M., van Gorcom R.F., van den Hondel C.A., Punt P.J. (1998). Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 23: 1-17.
- Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *J. Hydrol.* 389: 416-428.
- Vyas B.R.M., Šašek V., Matucha M., Bubner M. (1994). Degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by selected white rot fungi. *Chemosphere* 28: 1127-1134.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. (2006). Principles of ecotoxicology. FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Walter M., Boyd-Wilson K., Boul L., Ford C., McFadden D., Chong B., Pinfold J. (2005). Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor* *Int. Biodeter. Biodegradation* 56: 51-57.
- Wang J., Majima N., Hirai H., Kawagishi H. (2012). Effective removal of endocrine-disrupting compounds by lignin peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Curr. Microbiol.* 64: 300-303.
- Wang J., Yamamoto Y., Hirai H., Kawagishi H. (2013a). Dimerization of bisphenol by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under ligninolytic condition. *Curr. Microbiol.* 66: 544-547.
- Wang J., Yamamoto R., Yamamoto Y., Tokumoto T., Dong J., Thomas P., Hirai H., Kawagishi H. (2013b). Hydroxylation of bisphenol A by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under non-ligninolytic condition. *Chemosphere* 93: 1419-1423.
- Winqvist E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen K., Jørgensen K., Tuomela M. (2014). Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi- From laboratory to field scale. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 86: 238-247.
- Wolter M., Zadrazil F., Martens R., Bahadir M. (1997). Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. florida in solid wheat straw substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 398-404.
- Wunch K.G., Alworth W.L., Bennett J.W. (1999). Mineralization of benzo[a]pyrene by *Marasmiellus troyanus*, a mushroom isolated from a toxic waste site. *Microbiol. Res.* 154: 75-79.
- Yadav J.S., Quensen J.F. III, Tiedje J.M., Reddy C.A., (1995). Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (aroclor 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2560- 2565.
- Yamaguchi M., Kamei I., Nakamura M., Takano M., Sekiya A. (2007). Selection of *Pleurotus pulmonarius* from domestic basidiomycetous fungi for biodegradation of chlorinated dioxins as environmentally persistent organopollutants. *Shinrin Sogo Kenkyusho Kenkyu Hokoku.* 6: 231-237.
- 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. *Toxicol. Environ. Chem.* 40: 255-266.

Zhang J., Xu Z., Chen H., Zong Y. (2009). Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochem. Eng. J.* 45: 54-59.

Seznam zkratk

MnP	mangan-dependentní peroxidáza
VP	versatilní peroxidáza
Lac	lakáza
LIP	lignin peroxidáza
CYP450	cytochromu P450
PCB	polychlorované bifenyly
PCDD	dioxiny
DDT	1,1-bis (4-chlorfenyl)-2,2,2-trichlorethan
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PPCP	pharmaceuticals and personal care products
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethinylestradiol
NPs	nonylfenoly
BPA	bisfenol A
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
TNT	trinitrotoluenen
HMX	cyklotetramethylen tetranitramin

Seznam obrázků

Obrázek 1. Obecné schéma mechanismů hub podílejících se na rozkladu organických polutantů (upraveno dle Covino a kol., 2016)

Obrázek 2. Biodegradace benzo[a]anthracenu ligninolytickou houbou *I. lacteus* (upraveno Cajthaml a kol. 2006).

Obrázek 3. Degradální dráha PCB rozkládaných ligninolytickou houbou *P. ostreatus* (upraveno dle Čvančarová a kol., 2012; Muzikář a kol., 2011; Cajthaml 2015).

Obrázek 4. Transformace nonylfenolu ligninolytickými houbami (upraveno dle Cajthaml 2015).

Seznam příložených vědeckých prací

1. Baborová P., Möder M., Baldrian P., Cajthamlová K., **Cajthaml T.** (2006). Purification of new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157: 248-253.
2. Bhatt M., **Cajthaml T.**, Šašek V. (2002). Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiol.* 47: 255-258.
3. **Cajthaml T.**, Erbanová P., Kollmann A., Novotný Č., Šašek V., Mougín C. (2008). Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 53, 289-294.
4. **Cajthaml T.**, Möder M., Kačer P., Šašek V., Popp P. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A.* 974: 213-222.
5. **Cajthaml T.**, Erbanová P., Šašek V., Möder M. (2006). Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benzo(a)anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64: 560-564.
6. **Cajthaml T.**, Křesinová Z., Svobodová K., Möder M. (2009a). Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 6: 745-750.
7. **Cajthaml T.**, Křesinová Z., Svobodová K., Sigler K., Řezanka T. (2009b). Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* 157: 3325-3335.
8. **Cajthaml T.**, Svobodová K. (2012). Biodegradation of aromatic pollutants by ligninolytic fungal strains. In: Singh S.N. (ed.), *Microbial degradation of xenobiotics*, Springer-Verlag, pp. 291-316.
9. **Cajthaml T.** (2015). Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: mechanisms involved in the degradation. *Environ. Microbiol.* 17: 4822-4834.
10. Covino S., Svobodová K., Křesinová Z., Petruccioli M., Federici F., D'Annibale A., Čvančarová M., **Cajthaml T.** (2010a). *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* 101: 3004-3012.
11. Covino S., Čvančarová M., Muzikář M., Svobodová K., D'Annibale A., Petruccioli M., Federici F., Křesinová Z., **Cajthaml T.** (2010b). An efficient PAH-degrading *Lentinus (Panus) tigrinus* strain: effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices. *J. Hazard. Mater.* 183: 669-676.
12. Covino S., Svobodová K., Čvančarová M., D'Annibale A., Petruccioli M., Federici F., Křesinová Z., Galli E., **Cajthaml T.** (2010c). Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere* 79: 855-864.
13. Čvančarová M., Křesinová Z., Filipová A., Covino S., **Cajthaml T.** (2012). Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88: 1317-1323.
14. Čvančarová M., Möder M., Filipová A., Reemtsma T., **Cajthaml T.** (2013). Biotransformation of the antibiotic agent flumequine by ligninolytic fungi and residual antibacterial activity of the transformation mixtures. *Environ. Sci. Technol.*

- 47, 14128-14136.
15. Čvančarová M., Möder M., Filipová A., **Cajthaml T.** (2015). Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi – Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere* 136: 311-320.
 16. Eibes G., **Cajthaml T.**, Moreira M.T, Feijoo G., Lema J.M. (2006). Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64: 408-414.
 17. Křesinová Z., Linhartová L., Filipová A., Ezechiáš M., Mašín P., **Cajthaml T.** (2018). Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. *New Biotechnol.* 43: 53-61.
 18. Křesinová Z., Möder M., Ezechiáš M., Svobodová K., **Cajthaml T.** (2012) Mechanistic study of 17 α -ethinylestradiol biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: tracking of extracellular and intracellular degradation mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 46: 13377-13385.
 19. Leonardi V., Šašek V., Petruccioli M., D'Annibale A., Erbanová P., **Cajthaml T.** (2007). Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 60: 165-170.
 20. Möder M., **Cajthaml T.**, Koeller G., Erbanová P., Šašek V. (2005). Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 61: 1370-1378.
 21. Muzikář M., Křesinová Z., Svobodová K., Filipová A., Čvančarová M., Cajthamlová K., **Cajthaml T.** (2011). Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *J. Hazard. Mater.* 196: 386-394.
 22. Stella T., Covino S., Křesinová Z., D'Annibale A., Petruccioli M., Čvančarová M., **Cajthaml T.** (2013). Chlorobenzoic acid degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus*: *In vivo* and *in vitro* mechanistic study-evidence for P-450 involvement in the transformation. *J. Hazard. Mater.* 260: 975-983.
 23. Stella T., Covino S., Čvančarová M., Filipová A., Petruccioli M., D'Annibale A., **Cajthaml T.** (2017). Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi. *J. Hazard. Mater.* 324: 701-710.
 24. Stella T., Covino S., Burianová E., Filipová A., Křesinová Z., Voříšková J., Větrovský T., Baldrian P., **Cajthaml T.** (2015). Chemical and microbiological characterization of an aged PCB-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 533: 177-186.
 25. Winquist E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., **Cajthaml T.**, Steffen K., Jørgensen K., Tuomela M. (2014). Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi- From laboratory to field scale. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 86: 238-247.