



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13rd Year, Vol. 13, No. 51, Autumn 2024 pp. 1-14

Received: 01/07/2024

Accepted: 18/08/2024

(Research Paper)

Investigation of the synergistic effect of native white rot fungi on laccase and manganese peroxidase enzyme activity during anthracene degradation

Mohadeseh khajezadeh

Biotechnology Research Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
khajezade_85@yahoo.com

Masoomeh Ghobad-Nejhad¹

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
ghobadnejjhad@gmail.com

Hamid Moghimi

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran
hmoghimi@ut.ac.ir

Ali Abolhasani Soorki

Assistant Professor, Oil Microbiology Department, Research Institute of Applied Science, shahid beheshti university, Tehran, Iran
a.abolhasani.s@gmail.com

Abstract

One of the major environmental problems, especially in oil-rich countries, is the increase in pollutants caused by hydrocarbon compounds. Recently the use of white rot fungi for bioremediation of pollutants has shown valuable results. In this study, the synergistic effect of two native white rot fungi on the activity of the enzymes laccase and manganese peroxidase and on the degradation of 400 mg/l anthracene over 28 days was evaluated. The anthracene degradation and enzymatic activity of the fungi were evaluated by GC-FID gas chromatography and spectrophotometric assay, respectively. The results of the mixed cultivation were compared with the individual cultivation of each of the two fungi. Based on the results of gas chromatographic analysis with flame ionization detector (GC-FID), the percentages of anthracene degradation by *Trametes versicolor* v21te and *T. hirsuta* and the mixed culture of the two fungi were 60, 34 and 70%, respectively. In addition, laccase enzyme activity increased by 23% and 16% in the mixed culture compared to the pure culture of *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta*, respectively. The results show that cultivating this group of fungi together resulted in enzyme stimulation and has increased their bioremediation capacity. The results of this research can be a potential step in the removal of pollutants in industries related to petroleum products. In addition, the importance of ligninolytic enzymes in industries such as textile and paper bleaching further highlights the importance of such studies.

Keywords: Anthracene, bioremediation, enzymatic stimulation, mixed fungal culture, ligninolytic enzyme, white rot fungus.

¹ Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



khajezadeh M., Ghobad-Nejjhad M., Moghimi H., Abolhasani Soorki A. Investigation of the synergistic effect of native white rot fungi on laccase and manganese peroxidase enzyme activity during anthracene degradation. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (51): 1-14.

Introduction

Contamination of water, air and soil by hydrocarbon pollutants is one of the major environmental problems. Most of these chemicals are carcinogenic and mutagenic and are considered a serious threat to ecosystems and humans. Therefore, their safe removal from environmental cycles is an important global issue. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are among the pollutants that have shown high toxicity and emission capability. The physical and chemical techniques used to remove these pollutants are relatively costly and time-consuming, and sometimes produce hazardous by-products. As a result, bioremediation has become an increasingly attractive option for the remediation of contaminated sites in recent years, and the use of fungi in biodegradation has been shown to be an effective technique. Meanwhile, the ability of white rot fungi to biodegrade PAHs has produced surprising results. White rot fungi are a group of basidiomycetes that have attracted particular attention for their unique ability to degrade recalcitrant chemicals. This process is carried out by a non-specific enzyme complex that includes laccase, manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP). White rot fungi degrade lignin and convert it to carbon dioxide and water.

Anthracene is a three-ring polycyclic aromatic hydrocarbon pollutant that contaminates water at significant levels. Anthracene degradation has been studied in a number of basidiomycetes. Several studies in recent years have shown that fungal interactions can affect their bioremediation ability and the efficiency of their metabolic pathways. Such a feature has also been identified in white rot fungi. Extracellular ligninolytic enzymes are secondary metabolites produced by white rot fungi and play the main role in bioremediation. Since the role of this group of enzymes in the degradation of pollutants has been demonstrated, exploiting the symbiosis of white rot fungi may be a turning point in increasing their potential for bioremediation. This emerging technique, often referred to as 'co-cultivation', helps to stimulate the biosynthesis of specific secondary metabolites by forcing microorganisms to compete for resources, which can provide a competitive advantage. Researchers have shown that co-cultivation can activate new biosynthetic pathways. As there is limited research in this area, the use of new biological methods, including fungal consortia, and harnessing their enzymatic potential to remove contaminants can be an effective step in bioremediation.

Materials & Methods

Two poroid basidiomycetes including *Trametes versicolor* v21te and *T. hirsuta* were studied. Both isolates were deposited in the National Collection of living fungi of Iran with the international acronym IRAN. The fungus were evaluated for anthracene biodegradability. For this purpose, 100 ml of Tien-Kirk culture medium containing (g/l): glucose 10 g; KH₂PO₄, 2 g; MgSO₄·7H₂O 0.5 g; CaCl₂ 0.1 g; MnSO₄ 0.03 g; NaCl 0.06 g; FeSO₄·7H₂O 6 mg; CoCl₂ 6 mg; ZnSO₄·7H₂O 6 mg; CuSO₄ 6 mg; AlK(SO₄)₂·12H₂O 0.6 mg; H₃BO₃ 0.6 mg; Na₂MoO₄·2H₂O 0.6 mg; diammonium tartarate (C₄H₁₂N₂O₆) 0.2 g; and Tween 80 0.5 g were used. The pH of the culture medium was adjusted to 4.5. After sterilization of the medium, 400 mg/l of anthracene dissolved in acetone was added.

The enzyme activities of laccase and manganese peroxidase (MnP) were measured by spectrophotometric analysis at 420 and 469 nm, respectively. The assays were performed using the supernatant obtained from the fungal culture medium filtered through a 0.22 µm membrane. Laccase activity was measured using 100 mM sodium acetate (pH 4.5) and 0.5 mM ABTS. MnP activity was measured using 50 mM sodium malonate (pH 4.5), 0.5 mM MnSO₄, 1 mM 2, 6-dimethoxyphenol and 0.1 mM H₂O₂. All assays were performed in triplicate at room temperature. Enzyme activity was expressed as units per liter (U L⁻¹), where one enzyme unit is the amount of enzyme capable of oxidizing one micromole of substrate per minute.

All cultures were extracted with 100 ml of dichloromethane to detect anthracene degradation. To completely dissolve the anthracene in the solvent, the treatments were shaken for 12 hours. The solvent phase was then separated with a decanter. One microliter of the solution obtained from the extraction was injected into gas chromatography (GC-FID Shimadzu model GC-15A, Kyoto, Japan) using a capillary column (length 30 meters, diameter 0.25 mm and film thickness 0.25 micrometer). The temperature of the column was set at 80°C and reached 280°C at a rate of 15°C per minute and then held at this temperature for 5 minutes. The flow rate was 1.5 ml/min, the injection volume was 1

microliter, and the nitrogen pressure was 100 kPa. The difference in anthracene between the control and treated samples showed the efficiency of the different modes of the fungus.

Discussion of Results & Conclusions

Enzyme activity was measured and compared in three conditions: *T. versicolor* v21te, *T. hirsuta* and a co-culture of the two fungi. The results showed that the combination of strains stimulated the enzymatic activity of laccase. In this case, the laccase activity reached 220 UL⁻¹, while the highest laccase enzyme activity in the fungi *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta* was 180 and 190 UL⁻¹, respectively. Furthermore, the enzyme activity remained at a high level until day 28. When the fungi were cultivated individually, the enzyme activity decreased from day 14 onwards. The maximum MnP activity was found in the mixture of two fungi, reaching 120 UL⁻¹ on day 14, which was a significant increase compared to *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta* (114 and 105 UL⁻¹, respectively). At the end of the 28 days, the enzyme activity of the individual cultures had decreased by almost 50%, whereas in the fungal co-culture only about 20% of the activity had decreased. This result indicates the synergistic effect of fungal co-culture on enzyme activity.

The gas chromatography results showed that the mixture of the two fungi enhanced the bioremediation of anthracene. *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta* degraded 60 and 34% of the pollutant, respectively, while the degradation by the mixture of the two fungi was 70%. Most of the degradation occurred in the mixture of two fungi, where the concentration of anthracene decreased from 400 mg/l to 80 mg/l. The degradation process started in the first week and reached its maximum in 28 days.

Due to the presence of non-specific ligninolytic enzymes such as laccase and MnP, white rot fungi are not only able to degrade lignin, but also to metabolize a diverse group of pollutants, in particular PAHs. Anthracene is one of the persistent and carcinogenic PAHs found in abundance around industrial sites such as gas and oil fields. The bioremediation capacity of white rot fungi is directly related to their enzymatic activity. In addition, studies have shown that co-cultivation of these fungi stimulates the production of their ligninolytic enzymes and is one of the most effective methods for improving bioremediation efficiency. In the present study, native fungi with the ability to produce enzymes were used for biological purification. The activity of ligninolytic enzymes in the mixed culture of *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta* and in the single culture of each strain was investigated. To the best of our knowledge, the interaction between these two fungi has not been reported before.

The laccase activity in the mixed culture did not decrease on day 14 but increased until day 21, demonstrating the synergistic effect of these fungi on each other's enzyme production. Laccase activity in the mixed culture increased by 22% and 15%, compared to *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta*, respectively. Other researchers have previously demonstrated the positive effect of mixed culture of white rot fungi in stimulating enzyme production. On the other hand, MnP activity increased by 5% and 11% in the mixed culture compared to *T. versicolor* v21te and *T. hirsute* alone. Laccase activity increased more than MnP, suggesting that the fungi had a greater effect on each other's laccase production. A significant difference was observed between the peak activity of MnP and laccase, which can be considered as an advantage for their cooperation in bioremediation. The highest percentage of pollutant degradation occurred at the same time as the peak of enzymatic activity of the fungi. It is therefore suggested that there is a significant correlation between enzyme activity and pollutant degradation.

بررسی اثر هم‌افزایی قارچ‌های پوسیدگی سفید بومی بر فعالیت آنزیم‌های لاکاز و منگنز پراکسیداز در تجزیه آنتراسن

محدثه خواجه زاده

گروه زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران khajezade_85@yahoo.com

معصومه قبادنژاد*

گروه زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران ghobadnehad@gmail.com

حمید مقیمی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران hmoghimi@ut.ac.ir

علی ابوالحسنی سورکی

گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران a.abolhasani.s@gmail.com

چکیده

یکی از مشکلات مهم محیط زیست به‌ویژه در کشورهای نفت‌خیز، افزایش آلاینده‌های ناشی از ترکیبات هیدروکربنی است. در سال‌های اخیر به‌کارگیری قارچ‌های پوسیدگی سفید برای زیست‌بهبودی آلاینده‌ها نتایج ارزشمندی داشته است. در این مطالعه اثر هم‌افزایی دو گونه از قارچ‌های پوسیدگی سفید بومی بر فعالیت آنزیم‌های لاکاز و منگنز پراکسیداز و تجزیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن طی یک دوره ۲۸ روزه ارزیابی و سنجش شد. درصد تجزیه آنتراسن و فعالیت آنزیمی قارچ‌ها به‌ترتیب با استفاده از کروماتوگرافی گازی GC-FID و سنجش اسپکتروفوتومتری ارزیابی شدند. نتایج کشت آمیخته با کشت انفرادی هر یک از دو قارچ مقایسه شدند. براساس نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی با آشکارساز یونیزاسیون شعله (GC-FID)، تجزیه آنتراسن توسط هر یک از دو قارچ *Trametes versicolor* و *T. hirsuta* و کشت آمیخته دو قارچ به‌ترتیب ۶۰، ۳۴ و ۷۰ درصد به دست آمد. علاوه بر این، فعالیت آنزیم لاکاز در کشت آمیخته نسبت به کشت منفرد قارچ *T. versicolor* و *T. hirsuta* به‌ترتیب ۲۳ درصد و ۱۶ درصد افزایش یافت. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهند کشت این دسته از قارچ‌ها در کنار یکدیگر باعث تحریک آنزیمی و افزایش قدرت زیست‌بهبودی آنها شده است. نتایج این تحقیق گامی بالقوه برای حذف آلاینده‌ها در صنایع مرتبط با محصولات نفتی است. علاوه بر این، اهمیت آنزیم‌های لیگنینولیتیک در صنایع کاربردی همچون نساجی و سفید کردن کاغذ اثبات شده است و اهمیت این بررسی را روشن می‌کند.

واژه‌های کلیدی: قارچ پوسیدگی سفید، آنزیم لیگنینولیتیک، کشت آمیخته قارچی، تحریک آنزیمی، زیست

بهبودی، آنتراسن



مقدمه

امروزه یکی از اصلی‌ترین مشکلات زیست‌محیطی جهان، آلودگی آب، هوا و خاک توسط آلاینده‌های هیدروکربنی است. از آنجا که اکثر این مواد شیمیایی سرطان‌زا و جهش‌زا هستند و خطری جدی برای اکوسیستم و انسان‌ها محسوب می‌شوند، حذف آنها از چرخه محیط زیست از رویکردهای مهم جهانی است. هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)^۱ از جمله آلاینده‌هایی هستند که سمیت و قابلیت انتشار بالایی از خود نشان داده‌اند (۱-۳). تکنیک‌های فیزیکی و شیمیایی استفاده‌شده برای رفع این نوع آلاینده‌ها نسبتاً پرهزینه و وقت‌گیر است و بعضاً محصولات ثانویه خطرناکی ایجاد می‌کنند؛ در نتیجه، در سال‌های اخیر، تمایل به انجام زیست‌به‌سازی^۲ به‌عنوان یک گزینه کارآمد در احیای مناطق آلوده افزایش یافته است. به‌کارگیری قارچ‌ها در زیست‌به‌سازی به‌عنوان یک تکنیک مؤثر توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. در این میان، توانایی قارچ‌های پوسیدگی سفید^۳ در تجزیه زیستی PAHها نتایج شگفت‌انگیزی داشته است (۳-۵). قارچ‌های پوسیدگی سفید گروهی از بازیدیومیست‌ها هستند که با توجه به داشتن قابلیت منحصره‌فرد در فرایند تجزیه شایان توجه قرار گرفته‌اند. این فرایند توسط یک کمپلکس آنزیمی غیراختصاصی شامل لاکاز، منگنز پراکسیداز (MnP)^۴ و لیگنین پراکسیداز (LiP) انجام می‌شود. قارچ‌های پوسیدگی سفید لیگنین را تجزیه و به دی‌اکسید کربن و آب تبدیل می‌کنند (۶-۸).

آنتراسن یک آلاینده هیدروکربنی آروماتیک سه حلقه‌ای است که به‌دلیل وزن مولکولی پایین نسبت به سایر PAHها محلول‌تر است و می‌تواند آب را در سطوح قابل توجهی آلوده کند (۹). تخریب آنتراسن در تعدادی بازیدیومیست از جمله *Bjerkandera* sp. *Pleurotus* *Phanerochaete chrysosporium* و *Trametes* sp. *ostreatus* ارزیابی

شده است و نتایج رضایت‌بخشی به دست آمده‌اند (۱۰-۱۲). بررسی‌های مختلف در سال‌های اخیر اثبات کرده‌اند تعاملات میکروبی می‌توانند در متابولیسم آنها تأثیر داشته باشند و باعث افزایش یا کاهش کارایی مسیرهای متابولیکی آنها شوند. قارچ‌های پوسیدگی سفید نیز از این قضیه مستثنی نیستند؛ به‌طوری‌که به‌تازگی در بررسی‌های متعددی به اثر هم‌زیستی این قارچ‌ها پرداخته شده است (۱۳-۱۵). در واقع قارچ‌ها برای بقای خود در محیط طبیعی، بر سر منابع با سایر ارگانیسم‌ها رقابت می‌کنند. این رقابت از طرق مختلفی از جمله رشد سریع، هاگ‌زایی، مهار بازدارنده‌ها و تولید انواع متابولیت‌های ثانویه است. بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه احتمالاً امکان زنده‌ماندن قارچ‌ها در محیط‌هایشان را فراهم می‌کند. در این میان، آنزیم‌های لیگنینولیتیک خارج سلولی یکی از ده‌ها نوع متابولیت ثانویه‌ای هستند که در این سیستم رقابتی توسط قارچ‌های پوسیدگی سفید تولید می‌شوند (۱۴, ۱۶). از آنجایی که نقش این گروه آنزیمی در تجزیه آلاینده‌ها اثبات شده است، به‌کارگیری قابلیت هم‌زیستی قارچ‌های پوسیدگی سفید می‌تواند نقطه عطفی در افزایش پتانسیل آنها در زیست‌به‌سازی باشد. این تکنیک نوظهور که اغلب به آن «هم‌کشت» گفته می‌شود، با وادار کردن میکروارگانیسم‌ها به رقابت برای منابع، به تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه منحصره‌فرد کمک می‌کند که نقش آن می‌تواند ایجاد مزیت رقابتی باشد. محققان اثبات کرده‌اند کشت هم‌زمان می‌تواند مسیرهای بیوسنتزی جدیدی را فعال کند که فعل و انفعالات فیزیکی بین قارچ‌ها نقش اصلی را در فعال‌سازی این مسیرها دارند (۱۷). بررسی‌های محدودی در این زمینه انجام شده‌اند و ایران از جمله کشورهای نفت‌خیز دنیاست و سال‌هاست که از مشکلات آلاینده‌ها رنج می‌برد؛ بنابراین، به‌کارگیری روش‌های جدید زیستی از جمله کنسرسیوم‌های قارچی و استفاده از پتانسیل آنزیمی آنها در رفع آلاینده‌ها می‌تواند گام مؤثری در

تجزیه آنتراسن

پس از بررسی اثر هم‌زیستی دو قارچ بر هم، سوبیه‌های قارچی از نظر قابلیت تجزیه زیستی آنتراسن ارزیابی شدند. بدین منظور، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Kirk دارای (گرم بر لیتر): گلوکز ۱۰ گرم، KH_2PO_4 ۲ گرم، $\text{MnSO}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ ۰/۵ گرم، CaCl_2 ۰/۱ گرم، $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۳ گرم، NaCl ۰/۰۶ گرم، $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۶ میلی‌گرم، CoCl_2 ۶ میلی‌گرم، $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۰/۶ میلی‌گرم، H_3BO_3 ۰/۶ میلی‌گرم و $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ۰/۶ میلی‌گرم در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد. pH محیط کشت روی ۵ تنظیم شد (۱۸). محیط کشت‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن حل شده در استون، پس از سرد شدن محیط‌های کشت به آنها اضافه شد.

به‌منظور آماده‌سازی سلول‌های قارچی برای مواجهه با آلاینده و تجزیه زیستی آن، پیش‌کشت هریک از قارچ‌ها روی محیط کشت جامد PDA انجام شد که دارای ۱۰ درصد از غلظت آلاینده بود. مایه‌زنی آزمایش‌ها با افزودن سه پلاگ یک سانتی‌متر مربعی رشد یافته از هریک از قارچ‌ها به محیط کشت مایع اشاره شده در بالا انجام شد. برای مقایسه تولید آنزیم و تجزیه آنتراسن در کشت آمیخته قارچی نسبت به هریک از قارچ‌ها به تنهایی، کشت دو قارچ به صورت جداگانه نیز انجام شد. کشت‌ها با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه به مدت ۲۸ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد دما دهی شدند. تجزیه آنتراسن برای سه حالت شامل هریک از دو قارچ منتخب به تنهایی و کشت آمیخته بررسی و مقایسه شد. فلاسک‌های کنترل شامل یک محیط استریل شده پس از مایه‌زنی و یک محیط بدون انجام مایه‌زنی بودند. تمام تیمارها سه بار تکرار شدند. تجزیه و تحلیل آنتراسن و سنجش‌های آنزیمی هفته‌ای یک بار به مدت ۲۸ روز انجام شد.

زیست بهسازی باشد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت استفاده از کشت آمیخته قارچ‌های پوسیدگی سفید در تولید آنزیم‌های لاکاز و منگنز پراکسیداز و تجزیه آنتراسن است.

مواد و روش

مواد شیمیایی و محیط کشت‌ها

سوبستراها و بافرهای آنزیمی شامل ۲، ۲- Azino-bis (3- ethylbenzothiazoline -6- sulfonic acid) (ABTS)، ۲ و ۶ دی‌متوکسی فنول، گایاکول، استات سدیم، مالونات سدیم، آنتراسن، محیط کشت PDA^o و PDB¹ و سایر مواد معدنی مورد نیاز برای کشت قارچ از سیگما آلدیریج تهیه شدند. حلال‌های آلی شامل دی‌کلرومتان و استون از شرکت مرک خریداری شدند.

سوبیه‌های قارچی

در این تحقیق، دو قارچ *Trametes versicolor* v21te و *T. hirsuta* بررسی شدند که قبلاً توسط خواجه‌زاده و همکاران شناسایی و برای چاپ مقاله ارسال شده‌اند. هر دو قارچ ذکر شده عامل پوسیدگی سفید بوده و اکنون در کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران با نمایه بین‌المللی IRAN ثبت شده‌اند.

ارزیابی اثر آنتاگونیستی قارچ‌ها

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر هم‌زیستی دو قارچ منتخب در تجزیه آنتراسن بود؛ اما با توجه به اینکه ممکن است سوبیه‌ها بر هم اثر آنتاگونیستی داشته باشند، ابتدا میان‌کنش آنها بر یکدیگر بررسی شد. بدین منظور، در ابتدا هریک از قارچ‌ها به صورت جداگانه روی یک پلیت دارای محیط کشت PDA کشت داده شدند. پس از گذشت ۳ روز با مشاهده رشد نسبی در میسلیم‌های قارچی، در سمت مقابل پلیت، قارچ دیگر نیز کشت داده شد. اثر آنتاگونیستی قارچ‌ها بر هم از روی اندازه رشد آنها مشخص شد (۱۳).

سنجش آنزیمی

دقیقه به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید و سپس به مدت ۵ دقیقه در این دما نگهداری شد. سرعت جریان ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، حجم تزریق ۱ میکرولیتر و فشار نیتروژن ۱۰۰ کیلو پاسکال بود (۲۵). تفاوت میان درصد آنتراسن باقی‌مانده در نمونه شاهد و تیمار، نشان‌دهنده درصد تجزیه آنتراسن و بنابراین قدرت زیست بهسازی قارچ مدنظر بود.

نتایج

برهم‌کنش سویه‌های قارچی بر یکدیگر

دو قارچ *T. hirsuta* و *Trametes versicolor* v21te به‌عنوان دو قارچ شاخص برای ارزیابی اثر هم‌زیستی بررسی شدند. یک هفته پس از گرماگذاری قارچ‌ها در یک پلیت، شواهد حاکی از رشد این دو قارچ در کنار یکدیگر و عدم تأثیر منفی آنها بر هم بود؛ به‌طوری‌که مانع رشد یکدیگر نشدند؛ بنابراین، برای ادامه مطالعه به کار گرفته شدند.

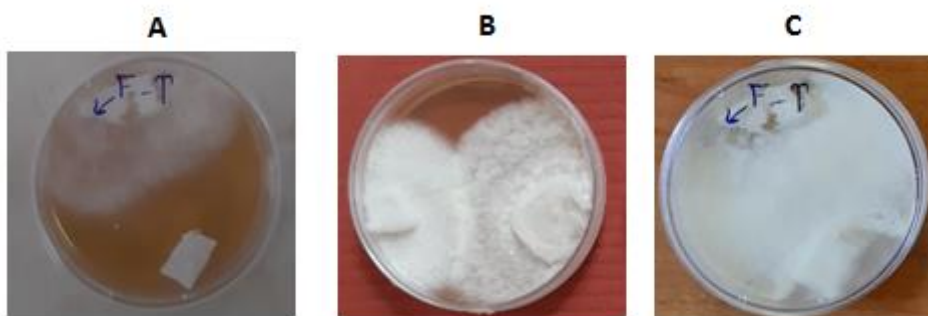
فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیمی برای سه حالت شامل قارچ *T. versicolor* v21te، قارچ *T. hirsuta* و آمیزه این دو قارچ، در طول تجزیه آنتراسن بررسی و مقایسه شد. همان‌طور که در نمودار شکل ۲ مشاهده می‌شود، آمیزه دو سویه باعث تحریک فعالیت آنزیمی لاکاز شده است؛ به‌طوری‌که در این حالت، فعالیت لاکاز به ۲۲۰ واحد بر لیتر رسیده است؛ در صورتی که بیشترین فعالیت آنزیمی لاکاز در هر یک از قارچ‌های *T. versicolor* v21te و *T. hirsuta* به ترتیب ۱۸۰ و ۱۹۰ واحد بر لیتر بوده است. علاوه بر این، فعالیت آنزیم تا روز ۲۸ در سطح بالایی حفظ شده است؛ در صورتی که در کشت منفرد قارچ‌ها این روند از روز ۱۴ به بعد کاهش یافته است.

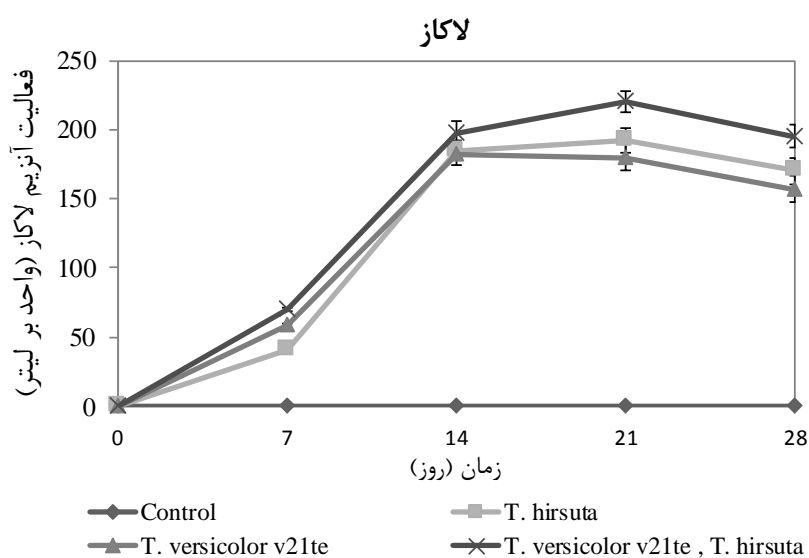
در زمان تجزیه آنتراسن توسط قارچ‌ها، فعالیت آنزیمی لاکاز و منگنز پراکسیداز با اسپکتروفتومتری و به ترتیب در طول موج ۴۲۰ و ۴۶۹ نانومتر انجام شد. سنجش‌ها با استفاده از مایع رویی به‌دست‌آمده از محیط کشت قارچی فیلترشده از طریق یک غشای ۰/۲۲ میکرومتر انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت لاکاز، ۲۰۰ میلی‌مولار استات سدیم و ۲ میلی‌مولار ABTS استفاده شد (۱۹, ۲۰). برای اندازه‌گیری فعالیت منگنز پراکسیداز، ۵۰ میلی‌مولار مالونات سدیم، ۰/۵ میلی‌مولار $MnSO_4$ و ۳ میلی‌مولار H_2O_2 استفاده شد (۲۱, ۲۲). pH هر دو بافر روی ۴/۵ تنظیم شد. تمامی سنجش‌های آنزیمی در دمای اتاق و به مدت ۲۸ روز انجام شدند. فعالیت آنزیمی برای سه حالت شامل هر یک از دو قارچ منتخب به تنهایی و همچنین آمیزه دو قارچ، بررسی و مقایسه و به‌صورت واحد در لیتر ($U L^{-1}$) بیان شد. هر واحد نشان‌دهنده مقدار آنزیمی است که می‌تواند یک میکرومول از سوبسترا را در هر دقیقه اکسید کند (۲۳).

آنالیز کروماتوگرافی گازی

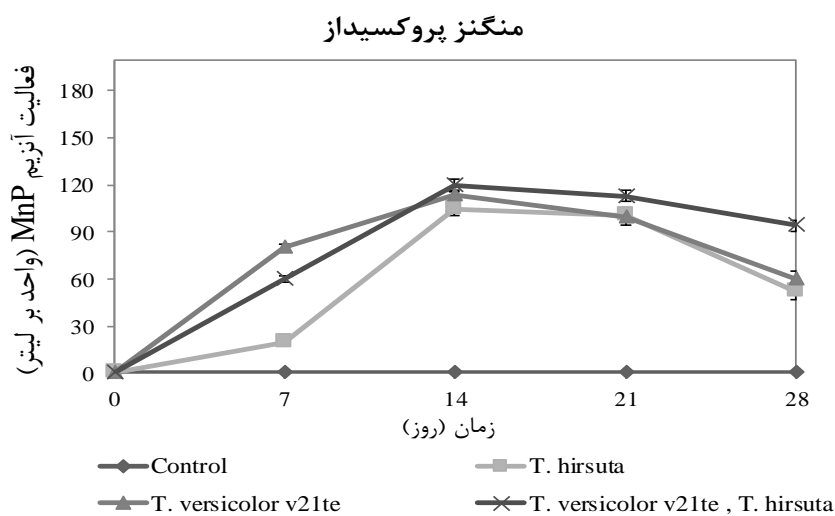
برای تعیین درصد آنتراسن باقی‌مانده، هر یک از کشت‌های قارچی با ۱۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان استخراج شد. به‌منظور حل شدن کامل آنتراسن در حلال، ۱۲ ساعت به تیمارها فرصت داده شد و سپس فاز حلال با استفاده از دکانتور، جدا (۲۴) و توسط یک روتاری چرخشی خلأ تا ۵ میلی‌لیتر تغلیظ شد. آنتراسن باقی‌مانده با تزریق ۱ میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج به کروماتوگرافی گازی (GC-FID Shimadzu مدل GC-15A، کیوتو، ژاپن) مجهز به ستون مویرگی (طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت فیلم) اندازه‌گیری شد. برنامه دمایی ستون روی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و با سرعت ۱۵ درجه سانتی‌گراد در



شکل ۱- ارزیابی میان‌کنش میسلیم قارچ‌ها طی روزهای چهارم (A)، هفتم (B) و دهم (C) روی محیط کشت PDA
 Fig 1- Evaluation of mycelium interaction of fungi during the day 4 (A), day 7 (B) and day 10 (C) on PDA medium



شکل ۲- فعالیت لاکاز در طول تجزیه آنتراسن
 Fig 2- Laccase activity during anthracene degradation



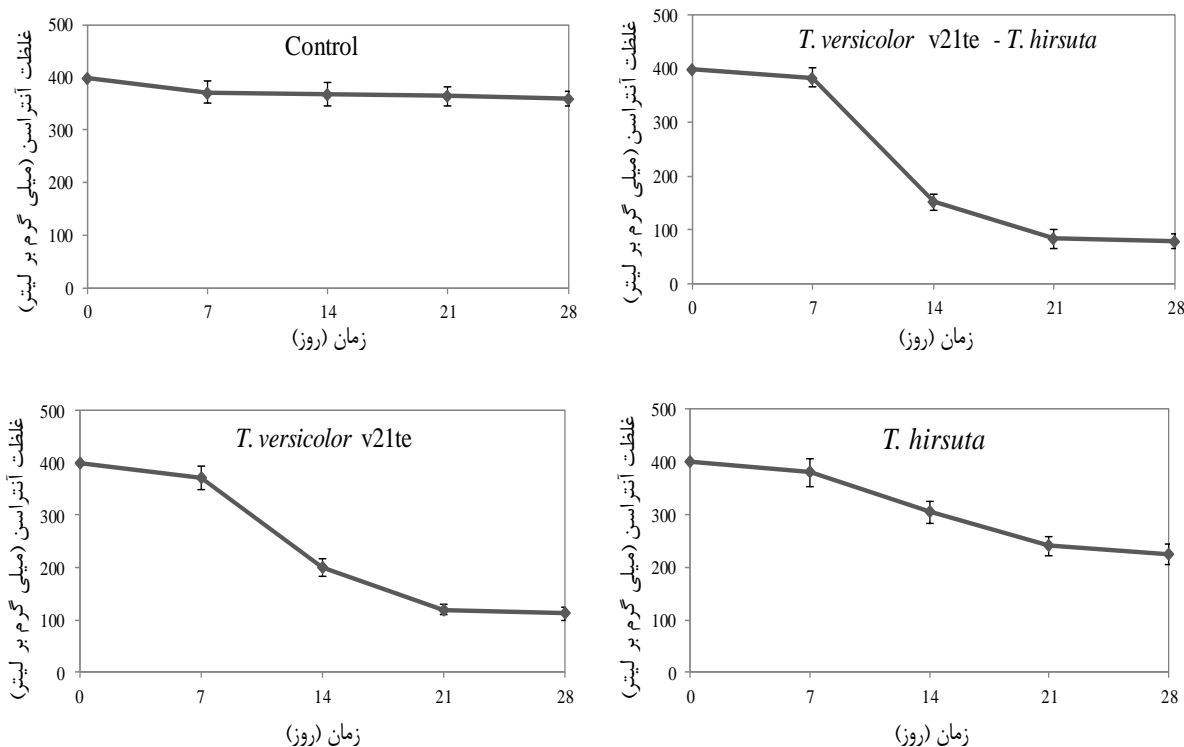
شکل ۳- فعالیت MnP در طول تجزیه آنتراسن
 Fig 3- MnP activity during anthracene degradation

(شکل ۴) و مشاهده اندازه تجزیه حاصل از آمیزه دو قارچ و مقایسه آن با حالتی که از هر قارچ به صورت انفرادی استفاده شده است، مشخص می‌شود آمیزه دو قارچ باعث افزایش زیست بهسازی آنتراسن شده است؛ به طوری که دو قارچ *T. versicolor* v21te و *T. hirsuta* هر یک به تنهایی موفق به تجزیه ۶۰ و ۳۴ درصد از آلاینده شده‌اند؛ در حالی که تجزیه توسط دو قارچ، ۷۰ درصد است. در واقع بیشترین تجزیه، در حالت آمیزه دو قارچ رخ داده است که غلظت آنتراسن از ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر رسیده است. همان‌طور که از نمودارها مشخص است، فرایند تخریب در هفته اول شروع شده و سپس در ۲۸ روز به حداکثر خود رسیده است.

بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۳) حداکثر تولید آنزیم منگنز پراکسیداز نیز در حالت آمیزه دو قارچ بوده که به ۱۲۰ واحد بر لیتر در روز ۱۴ رسیده است و نسبت به *T. versicolor* v21te و *T. hirsuta* که به ترتیب ۱۱۴ و ۱۰۵ واحد بر لیتر بوده‌اند، افزایش معنی‌داری داشته است. در انتهای دوره ۲۸ روزه، فعالیت آنزیمی کشت‌های منفرد، نزدیک به ۵۰ درصد کاهش یافته است؛ در صورتی که در حالت کنسرسیوم قارچی تنها حدود ۲۰ درصد از فعالیت کاسته شده که نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزایی آنها بر استمرار تولید منگنز پراکسیداز است.

آنالیز کروماتوگرافی

با توجه به نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی گازی



شکل ۴- مقایسه تجزیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن، توسط *T. hirsuta*، *T. versicolor* v21te و آمیزه *T. hirsuta* - *T. versicolor* v21te طی ۲۸ روز. نوار خطا نشان‌دهنده انحراف استاندارد است که بر اساس میانگین داده‌ها محاسبه شده است.

Fig 4- Comparison of the degradation of 400 mg/L anthracene by *T. versicolor* v21te, *T. hirsuta* and the combination of *T. versicolor* v21te and *T. hirsuta* during 28 days. The error bar indicates the standard deviation calculated from the mean of the data.

بحث و نتیجه‌گیری

قارچ‌های پوسیدگی سفید به دلیل داشتن آنزیم‌های لیگنینولیتیک غیراختصاصی همچون لاکاز و منگنز پراکسیداز، علاوه بر اینکه قادر به تجزیه کامل لیگنین خوب هستند، قادرند گروه بزرگی از آلاینده‌ها به‌ویژه PAHها را متابولیزه کنند (۳، ۲۶، ۲۷، ۲۸). آنتراسن یکی از PAHهای مقاوم و سرطان‌زا است که به وفور در اطراف مکان‌های صنعتی مانند میدان‌های گاز و نفت یافت می‌شود (۲۹). قابلیت زیست بهسازی قارچ‌های پوسیدگی سفید ارتباط مستقیمی با فعالیت آنزیمی آنها دارد. علاوه بر این، بررسی‌ها نشان داده‌اند کشت همزمان این قارچ‌ها اثر تحریکی بر تولید آنزیم‌های لیگنینولیتیک آنها دارد و یکی از روش‌های مؤثر برای بهبود راندمان زیست بهسازی است (۱۵).

اثر هم‌افزایی معمولاً شامل مسیرهای بیوشیمیایی مکمل است که در آن برخی از موجودات می‌توانند متابولیت تولیدشده توسط دیگری را برای تکمیل فرایندهایی به نفع حیات خود استفاده کنند که می‌تواند شامل تخریب یا تجزیه انواع مولکول‌های ساده و پیچیده محیطی و به کار گرفتن آنها در مسیر تأمین انرژی باشد؛ بنابراین، طراحی یک کنسرسیوم کارآمد متشکل از میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله قارچ‌ها می‌تواند نقطه عطفی برای به‌کارگیری آنها در فرایندهای زیست بهسازی باشد (۳۰، ۳۱). همان‌طور که آمیزه‌های باکتریایی متعددی نیز برای تجزیه‌ی آلاینده‌های هیدروکربنی همچون آنتراسن استفاده شده است (۳۲، ۳۳).

از این‌رو در مطالعه حاضر، قارچ‌های بومی با قابلیت تولید آنزیم، برای پاکسازی زیستی به کار گرفته شدند. فعالیت آنزیم‌های لیگنینولیتیک در کشت آمیخته *T. versicolor* v21te و *T. hirsuta* و کشت منفرد هر یک از این سویه‌ها بررسی شد. با توجه به دانش ما، در میان بررسی‌های محدودی که روی کشت آمیخته قارچ‌های

پوسیدگی سفید انجام شده‌اند، گزارشی مبنی بر مطالعه اثر این دو قارچ بر هم یافت نشد که اهمیت این مطالعه را مشخص می‌کند.

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، فعالیت آنزیم لاکاز در کشت آمیخته پس از روز ۱۴ نه تنها کاهش نیافته است، بلکه تا روز ۲۱ افزایش نیز داشته است که دلیل محکمی بر اثبات اثر هم‌افزایی این قارچ‌ها در تولید آنزیم یکدیگر است. فعالیت لاکاز در کشت آمیخته نسبت به *T. versicolor* v21te و *T. hirsuta* به ترتیب ۲۲ و ۱۵ درصد افزایش یافته است. پیش از این نیز سایر محققان، تأثیر مثبت کشت آمیخته قارچ‌های پوسیدگی سفید را بر تحریک تولید آنزیم در آنها اثبات کرده‌اند (۱۵، ۳۴). همچنین فعالیت منگنز پراکسیداز در کشت آمیخته نسبت به *T. versicolor* v21te و *T. hirsuta* به ترتیب ۵ و ۱۱ درصد افزایش یافته است. فعالیت لاکاز نسبت به منگنز پراکسیداز افزایش بیشتری داشته است که می‌توان افزایش پتانسیل تجزیه آلاینده در کشت آمیخته را بیشتر به دلیل اثر محرکی نسبت داد که قارچ‌ها بر آنزیم لاکاز یکدیگر داشته‌اند.

گروهی از محققان افزایش فعالیت لاکاز در کشت‌های آمیخته را پاسخی به وضعیت رقابتی بین گونه‌ها نسبت داده‌اند (۳۵). این رقابت که بر سر مواد غذایی و زیستگاه میسلیم‌های در حال رشد ایجاد شده، نوعی مکانیسم دفاعی در قارچ‌ها است (۲۳) و با فعال کردن خوشه‌های ژنی خاصی، به تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر آنزیم‌های لیگنینولیتیک خارج سلولی (۱۳، ۱۴) و زیست بهسازی آلاینده‌ها منجر می‌شود. در این مطالعه، روند نزولی فعالیت آنزیمی در کشت‌های منفرد از روز ۱۴ به بعد آغاز شده است؛ در صورتی که این روند در کشت آمیخته پس از ۲۱ روز مشاهده می‌شود و کاهش فعالیت آنزیم‌ها با شدت کمتری ادامه یافته است که دلیل دیگری بر اثر

تحقیقات قبلی، غلظت‌های پایین آنتراسن مانند ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر (۱۲)، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر (۱۰)، ۲۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱۱)، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۶)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۳۷) و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر (۲۰) مطالعه شده‌اند؛ درحالی‌که در اکثر موارد، غلظت آنتراسن بالاتر از این سطوح است، به‌ویژه در مناطقی که در معرض فرآورده‌های نفتی و گازی هستند (۱، ۳۸).

در اغلب مسیرهای پیشنهادی تجزیه آنتراسن، به فرایند اکسیداسیون کربن‌های آن اشاره شده است که نتیجه این فرایند تولید ساختارهای مولکولی حد واسطی همچون فتالیک اسید و بنزوئیک اسید (۲۶، ۳۹) و به‌ویژه آنتراکوئینون‌ها (۴۰) است. این فرایند به تدریج با تولید ساختارهای حد واسط، امکان دسترسی آنزیم‌های قارچی را برای تجزیه آسان‌تر می‌کند و در نهایت ساختارهای شیمیایی همچون کاکتول تولید می‌شوند که سمیت کمتری دارند (۴۱). با دانش کنونی ما، این اولین مطالعه‌ای است که در آن کشت آمیخته دو سویه بومی *T. hirsuta* و *T. versicolor* v21te از لحاظ فعالیت آنزیمی و توانایی زیست بهسازی آنتراسن بررسی شده است. با توجه به اهمیت روزافزون قارچ‌های پوسیدگی سفید در صنایع مختلف از جمله زیست بهسازی آلاینده‌ها، اهمیت مطالعه مشخص می‌شود.

References

- (1) Haritash A., Kaushik, C. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 2009; 169(1-3): 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- (2) Lee H., Jang Y., Lee Y. M., Lee H., Kim G-H., Kim, J-J. Enhanced removal of PAHs by *Peniophora incarnata* and ascertainment of its novel ligninolytic enzyme genes. *Journal of Environmental Management*, 2015; 164: 10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.036>
- (3) Wang C., Sun H., Li J., Li Y., Zhang Q. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot

تحریکی قارچ‌ها بر تولید لاکاز یکدیگر و استمرار فعالیت آن در روزهای بیشتر است. درباره منگنز پراکسیداز، روند نزولی آنزیم در کشت آمیخته همزمان با کشت‌های منفرد آغاز شده است؛ اما در روز ۲۸ که هر دو کشت‌های *T. hirsuta* و *T. versicolor* v21te نزدیک به ۵۰ درصد از فعالیت خود را از دست داده‌اند، کشت آمیخته نزدیک به ۸۰ درصد از فعالیت منگنز پراکسیدازی خود را حفظ کرده است. شایان ذکر است روند نزولی آهسته در فعالیت آنزیم‌ها طی ۲۸ روز برای تجزیه زیستی بهینه بسیار اثربخش خواهد بود.

بر اساس مقایسه نمودار شکل ۲ و ۳، بین نقطه اوج فعالیت MnP و لاکاز تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود. این موضوع ممکن است به‌عنوان یک مزیت برای همکاری آنها در پاکسازی زیستی در نظر گرفته شود (۴). با توجه به شکل ۴ مشخص است بیشترین درصد تخریب آلاینده‌ها در هفته دوم و سوم و مصادف با اوج فعالیت آنزیمی قارچ‌ها رخ داده است؛ بنابراین، همان‌طور که نویسندگان قبلاً ذکر کرده‌اند، می‌توان نشان داد فعالیت آنزیمی و تخریب آلاینده‌ها به‌طور چشمگیری همبستگی دارند (۶، ۲۶، ۳۶).

اهمیت تحقیق حاضر، بررسی دو قارچ بومی *T. hirsuta* و *versicolor* v21te با قابلیت رشد و تولید آنزیم در ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن است. در اکثر

fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere*, 2009; 77(6): 733-8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.028>

- (4) Dao AT., Vonck J., Janssens TK., Dang HT., Brouwer A, de Boer TE. Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Industrial Crops and Products*, 2019; 128: 153-61. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.059>
- (5) Sharma B., Dangi AK., Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of environmental management*, 2018; 210: 10-

22.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>
- (6) Novotny C., Svobodová K., Erbanová P., Cajthaml T., Kasinath A., Lang E, et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004; 36(10): 1545-51. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.019>
- (7) Wen X., Jia Y., Li J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*—A white rot fungus. *Chemosphere*, 2009; 75(8): 1003-7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.052>
- (8) Zhuo R., Fan F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. *Science of the Total Environment*, 2021; 778: 146132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146132>
- (9) Bonnet J., Guiraud P., Dusser M., Kadri M., Laffosse J., Steiman R, et al. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005; 60(1): 87-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.10.001>
- (10) Borrás E., Caminal G., Sarra M., Novotny C. Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010; 42(12): 2087-93. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.003>
- (11) Byss M., Elhottova D., Triska J., Baldrian P. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere*, 2008; 73(9): 1518-23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.030>
- (12) Field J., De Jong E., Feijoo Costa G., De Bont J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, 1992; 58(7): 2219-26. <https://doi.org/10.1128%2Ffaem.58.7.2219-2226.1992>
- (13) Dullah S., Hazarika DJ., Goswami G., Borgohain T., Ghosh A., Barooah M, et al. Melanin production and laccase mediated oxidative stress alleviation during fungal-fungal interaction among basidiomycete fungi. *IMA fungus*, 2021; 12: 1-17. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-147716/v1>
- (14) Knowles SL., Raja HA., Roberts CD., Oberlies NH. Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. *Natural product reports*, 2022; 39(8): 1557-73. <https://doi.org/10.1039%2Fd1np00070e>
- (15) Shi K., Liu Y., Chen P., Li Y. Contribution of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase in lignite degradation by mixed white-rot fungi. *Waste and Biomass Valorization*, 2021; 12: 3753-63. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-020-01275-z>
- (16) Losada L., Ajayi O., Frisvad JC., Yu J., Nierman WC. Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Medical mycology*, 2009; 47(Supplement_1): S88-S96. <https://doi.org/10.1080/13693780802409542>
- (17) Xu X-Y., Shen X-T., Yuan X-J., Zhou Y-M., Fan H., Zhu L-P, et al. Metabolomics investigation of an association of induced features and corresponding fungus during the co-culture of *Trametes versicolor* and *Ganoderma applanatum*. *Frontiers in Microbiology*, 2018; 8: 2647. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02647>
- (18) Tien M., Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in enzymology* 161: Elsevier; 1988. pp. 238-49. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61025-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61025-1)
- (19) Birhanli E., Erdogan S., Yesilada O., Onal Y. Laccase production by newly isolated white rot fungus *Funalia trogii*: effect of immobilization matrix on laccase production. *Biochemical engineering journal*, 2013; 71: 134-9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.002>
- (20) Lee AH., Lee H., Heo YM., Lim YW., Kim C-M., Kim G-H, et al. A proposed stepwise screening framework for the selection of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading white rot fungi. *Bioprocess*

- and biosystems engineering, 2020; 43: 767-83.
<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02272-w>
- (21) Behnood M., Nasernejad B., Nikazar M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2014; 20 (4): 1879-85.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.09.007>
- (22) Wariishi H., Valli K., Gold MH. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of biological chemistry*, 1992; 267(33), 23688-95.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35893-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35893-9)
- (23) Baldrian P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS microbiology ecology*, 2004; 50(3), 245-53.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.005>
- (24) Kanaly RA., Hur H-G. Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH. *Chemosphere*, 2006; 63(2), 202-11.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.022>
- (25) Pourfakhraei E., Badraghi J., Mamashli F., Nazari M., Saboury AA. Biodegradation of asphaltene and petroleum compounds by a highly potent *Daedaleopsis* sp. *Journal of basic microbiology*, 2018; 58(7), 609-22.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201800080>
- (26) Li X., Pan Y., Hu S., Cheng Y., Wang Y., Wu K., et al. Diversity of phenanthrene and benz [a] anthracene metabolic pathways in white rot fungus *Pycnoporus sanguineus* 14. *International biodeterioration & biodegradation*, 2018; 134: 25-30.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.07.012>
- (27) Pointing S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 2001; 57: 20-33.
<http://dx.doi.org/10.1007/s002530100745>
- (28) Torres-Farrada G., Manzano-Leon AM., Rineau F., Ramos Leal M., Thijs S., Jambon I, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by native *Ganoderma* sp. strains: identification of metabolites and proposed degradation pathways. *Applied microbiology and biotechnology*, 2019; 103: 7203-15. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09968-9>
- (29) Usman S., Yakasai HM., Gimba MY., Shehu D., Jagaba AH. Anthracene degradation by *Achromobacter xylosoxidans* strain BUK_BTEG6 isolated from petrochemical contaminated soil. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2023; 8: 100418.
<https://doi.org/10.1016/j.cscee.2023.100418>
- (30) Cheng Z., Li C., Kennes C., Ye J., Chen D., Zhang S., et al. Improved biodegradation potential of chlorobenzene by a mixed fungal-bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017; 123: 276-85.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.008>
- (31) Ghorbannezhad H., Moghimi H., Dastgheib SMM. Evaluation of pyrene and tetracosane degradation by mixed-cultures of fungi and bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 2021; 416: 126202.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126202>
- (32) Marzuki I., Asaf R., Paena M., Athirah A., Nisaa K., Ahmad R, et al. Anthracene and pyrene biodegradation performance of marine sponge symbiont bacteria consortium. *Molecules*, 2021; 26(22): 6851.
<https://doi.org/10.3390/molecules26226851>
- (33) Zhang L., Qiu X., Huang L., Xu J., Wang W., Li Z, et al. Microbial degradation of multiple PAHs by a microbial consortium and its application on contaminated wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 2021; 419: 126524.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126524>
- (34) Score AJ., Palfreyman JW., White NA. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1997; 39(2-3): 225-33.
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00012-7)
- (35) Hiscox J., Baldrian P., Rogers HJ., Boddy L. Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010; 47(6): 562-71.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.007>
- (36) Ting W., Yuan S., Wu S., Chang B. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011;

- 65(1): 238-42.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.007>
- (37) Giraud F., Guiraud P., Kadri M., Blake G., Steiman R. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water research*, 2001; 35(17): 4126-36.
[https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00137-3](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00137-3)
- (38) Kuppusamy S., Thavamani P., Megharaj M, Lee YB., Naidu R. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) degradation potential of a new acid tolerant, diazotrophic P-solubilizing and heavy metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. MTS-7 isolated from long-term mixed contaminated soil. *Chemosphere*, 2016; 162: 31-9.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.052>
- (39) Ye J-S., Yin H., Qiang J., Peng H., Qin H-M., Zhang N, et al. Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of hazardous materials*, 2011; 185(1): 174-81.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.015>
- (40) Wu Y., Teng Y., Li Z., Liao X., Luo Y. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008; 40(3): 789-96.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.10.013>
- (41) Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2003; 46(1): 1-15.
[https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00228-5)

¹ Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

² Bioremediation

³ White rot fungi

⁴ Manganese peroxidase

⁵ Potato dextrose agar

⁶ Potato dextrose broth