

Analiza koncentracije metala tijekom rasta micelija na drvnoj biomasi

Iva Rezić*, Martina Krajnik**, Tonči Rezić***

*Zavod za primijenjenu kemiju, Tekstilno tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Prilaz baruna Filipovića 28a, Zagreb 10000.
e-mail: iva.rezic@ttf.hr

**Studentica dodiplomskog studija Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu / kolegij:
Biotehnologija 3

***Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Pierottijeva 6, Zagreb 10000
e-mail: trezic@pbf.hr

Sažetak:

U ovom istraživanju analizirana je koncentracija teških metala (bakra, željeza i mangana) na drvnoj biomasi topole i smreke prije i nakon površinskog uzgoja micelija gljiva *Formitopsis pinicola* i *Phanerochaete chrysosporium*. Analiza metala provedena je korištenjem optičke emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Rezultati analize pokazali su utjecaj rasta micelija na promjenu koncentracije iona metala (željeza, bakra i mangana) na površini drva smreke i topole. Također, u radu su opisani razvoj i validacija ICP-OES metode mjerjenja koncentracije metala željeza, bakra i mangana u supernatantima dobivenim ispiranjem površine drva prije i nakon uzgoja micelija gljiva *F. pinicola* i *P. chrysosporium*.

Ključne riječi: drvna biomasa, *Formitopsis pinicola*, ICP-OES spektrometar, *Phanerochaete chrysosporium*, teški metali

1. UVOD

Biorazgradnja lignocelulozne biomase važan je proces za kruženje ugljika u prirodi. Lignoceluloza je makromolekularni kompleks koji se sastoji od lignina, celuloze i hemiceluloze. Fizikalno-kemijska svojstva vezana uz kompleksnu strukturu lignocelulozne biomase čine biomasu otpornom na razgradnju (Kumar i sur., 2006). Stoga je proveden veliki broj istraživanja s ciljem da se istraže mehanizmi biološke razgradnje lignoceluloznih sirovina. U ovim istraživanjima korišteni su mikroorganizmi i gljiva smeđeg i bijelog truljenja s sposobnošću biorazgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze (Pérez i sur., 2002). Gljive bijelog truljenja privukle su posebnu pozornost zbog njihove sposobnosti razgradnje lignina (Hatakka, 2001). *Phanerochaete chrysosporium* istraživane su zbog sposobnosti učinkovite razgradnje lignina korištenjem lignolitičkih enzima (Yu i sur., 2009). Aktivnost lignolitičkih enzima tijekom rasta micelija i razgradnje lignocelulozne biomase ovisi o koncentraciji metala. Stoga, teški metali utječu na rast micelija i uzrokuju morfološke i fiziološke promjene (Pagès i sur., 2007), te posredno utječu na biorazgradnju lignocelulozne biomase. Međutim, nedostatak teških metala negativno utječe na rast micelija i usporava metaboličke procese tijekom rasta gljiva i razgradnje biomase (Tuomela i sur., 2005). Tijekom prethodnih istraživanja istražen je utjecaj koncentracije iona metala bakra i cinka na rast micelija gljiva bijelog truljenja, te je istražena bioakumulacijska sposobnost imobiliziranih stanica micelija *Phanerochaete chrysosporium* (Iqbal i Edyvean, 2004). Pokazalo se da gljive mogu rasti uz nižu koncentraciju metala, razgrađujući lignoceluloznu biosmasu i akumulirajući metale cinka i bakra u biosmasu micelija (Zenget i sur., 2007). Međutim, učinci teških metala na rast micelija i aktivnost lignocelulolitičkih enzima još uvjek nisu istraženi. Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja vezana uz mehanizme vezanja metala i korištenje metala, osobito tijekom rasta micelija gljiva na lignoceluloznoj biomasi „in situ“.

Također potrebno je odrediti utjecaj metala na aktivnost enzima i efikasnost razgradnje biomase. Da bi se moglo pratiti promjene koncentracije metala tijekom rasta micelija gljiva na lignoceluloznoj biomasi „in situ“ potrebno je razviti pouzdanu analitičku metodu za mjerjenje koncentracije metala.

U ovom istraživanju odabранe su dvije vrste micelija gljiva *P. chrysosporium* i *F. pinicola*. *P. chrysosporium* pripada gljivama bijelog truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više lignolitičkih enzima i razgrađuje lignin. *F. pinicola* pripada gljivama smeđeg truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više celulolitičkih enzima i razgrađuje celulozu i hemicelulozu. Uzgoj i rast micelija proveden je na dva različita drva smreke i topole. Smreka je odabrana kao mekše drvo, a topola kao tvrđe drvo. Cilj je bio utvrditi utjecaj rasta micelija na promjenu koncentracije iona metala (željeza, bakra i mangana) u supernatantima prije i nakon uzgoja gljiva na odabranim uzorcima drva smreke i topole. Također u radu su opisani razvoj i validacija metode mjerjenja koncentracije metala u supernatantima korištenjem metode induktivno spregnute plazme s optičko emisijskom spektroskopijom (ICP OES).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Drvna biomasa

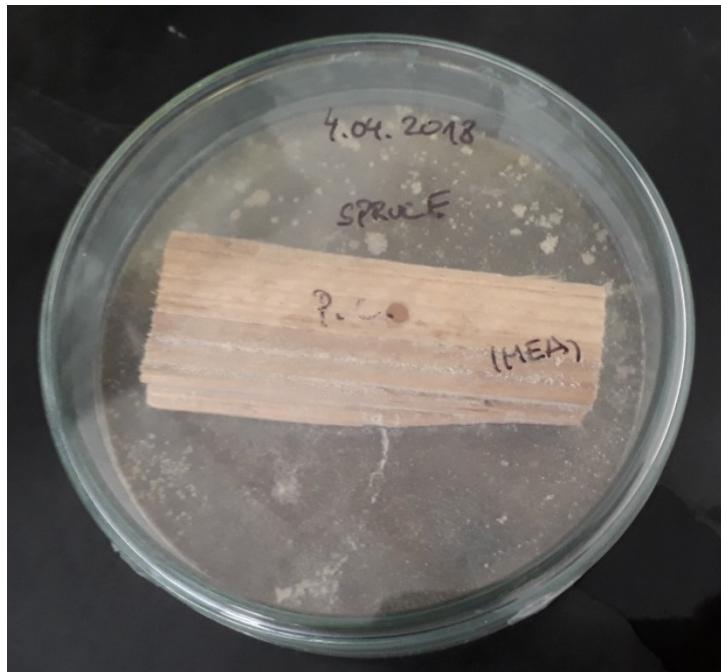
Kao hranjiva podloga za radni mikroorganizam korištena je drvna biomasa smreke kao predstavnika crnogoričnog drveta te topole kao bjelogoričnog.

2.2. Micelij

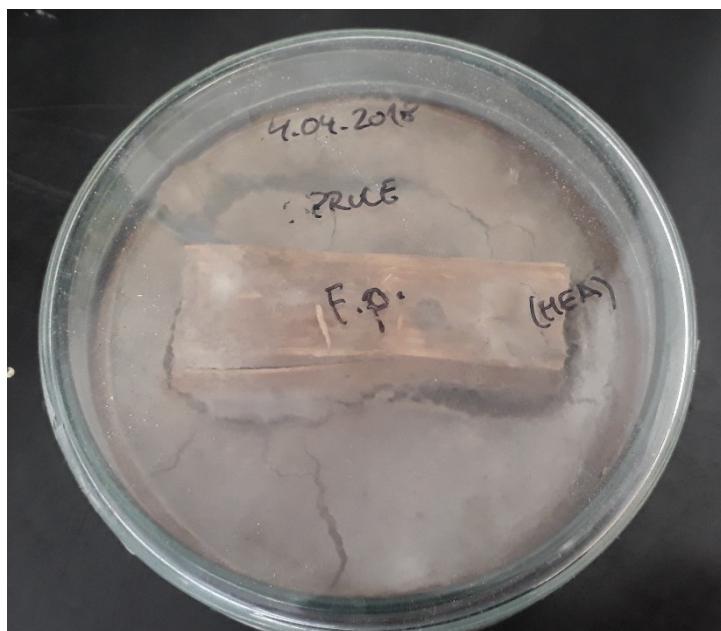
Korišteni su micelij gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* (Slika 1) i gljiva smeđeg truljenja *F. pinicola* (Slika 2). Micelij su uzbajane na drvnoj biomasi smreke i topole kroz 2 odnosno 10 tjedana. Nakon čega su isprane destiliranim vodom s drveta te su u dalnjem eksperimentu korišteni tekući uzorci drveta. Provedena je analiza uzorka prikazanih u tablici 1.

Tablica 1. Uzorci na kojima je provedena analiza.

Uzorci	Vrsta gljive	Supstrat	Vrijeme uzgoja (tjedni)
30	neg. kontrola	topola	2
29	neg. kontrola	smreka	2
28	<i>P. chrysosporium</i>	topola	2
27	<i>P. chrysosporium</i>	smreka	2
26	<i>F. pinicola</i>	topola	2
25	<i>F. pinicola</i>	smreka	2
4	<i>P. chrysosporium</i>	topola	10
3	<i>P. chrysosporium</i>	smreka	10
2	<i>F. pinicola</i>	topola	10
1	<i>F. pinicola</i>	smreka	10



Slika 1. *P. Chrysosporium* porasla na ostacima drveta smreke



Slika 2. *F. Pinicola* porasla na ostacima drveta smreke

2.3. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih za analizu koncentracije metala u drvnoj biomasi nalazi se u tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije za analizu

Kemikalija	Proizvodač
Dušična kiselina (HNO_3)	BDH, Ujedinjeno Kraljevstvo
ICP Multi-element standard	Certipur, Njemačka

2.4. Uredaj

Za određivanje metala u tekućim uzorcima korišten je Shimadzu ICP Emisijski Spektrometar, tip ICPE-9000 (Slika 8, Prilog 1) u Centralnom kemijsko - tehnološkom laboratoriju. Razlog odabira baš tog instrumenta je očekivanje izrazito malih koncentracija metala u uzorku, a limiti detekcije ICP-OES spektrometra su 0.0073845 mg/L za željezo, 0.0024539 mg/L za bakar i $7.776878 \cdot 10^{-4} \text{ mg/L}$ za mangan.

2.5. ICP-OES razvoj i validacija metoda

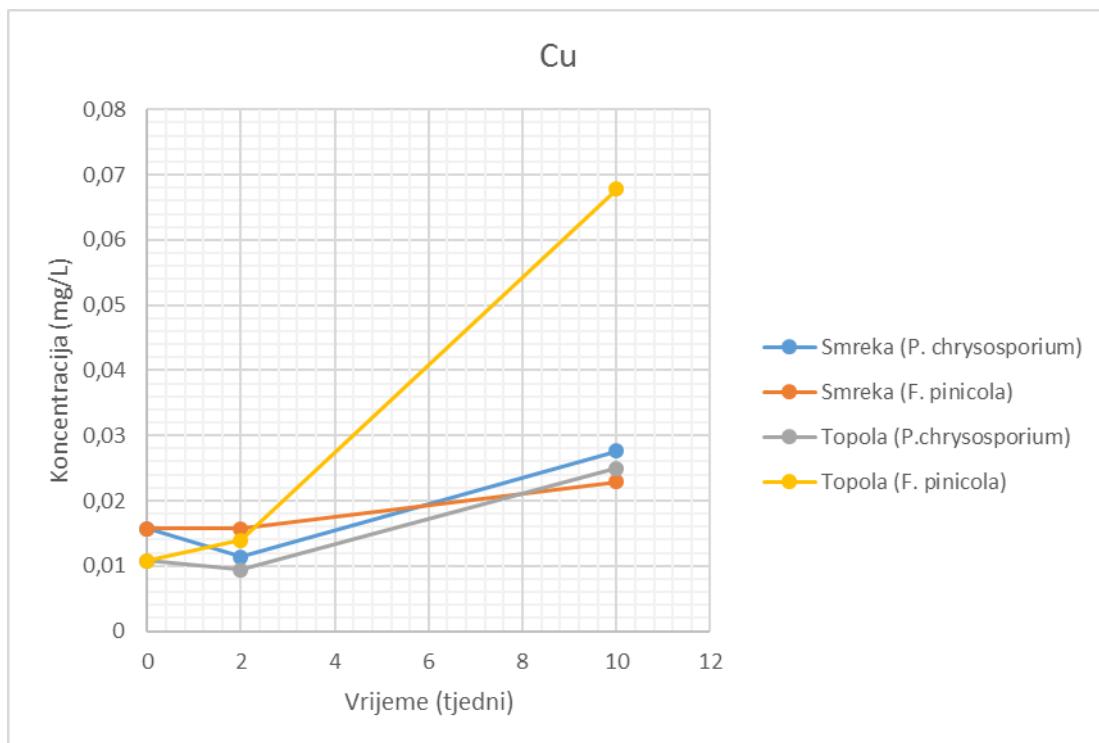
Korištena metoda je QuanBase (Standard mode) za kvantitativnu analizu elemenata, čije su karakteristike korištenjem standardnog raspršivača s peristaltičkom pumpom, uz normalni aksijalni pogled plazme, koji se koristi za postizanje nižih granica detekcije s većom preciznošću. Valne duljine analize određene su pomoću internacionalnog standarda ISO 11885 Water quality – Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Za pripremu standarda korišteno je: zakiseljena voda ($10\%-\text{tni HNO}_3$, pripremljen pomoću vode i $69\% \text{ HNO}_3$) i multi element 1000 mg/L . Pripremljeno je šest različitih koncentracija standarda ($0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2$ i 0.5 mg/L) te smo za svaki element (Cu, Mn, Fe) dobili baždarni dijagram. Prije analize potrebno je zakiseliti uzorku sa HNO_3 (u 10 mL uzorka $100 \mu\text{L} \text{ HNO}_3$) kako bi se vezali metali u otopini. Peristaltička pumpa uvodi tekući uzorak u raspršivač, gdje nastaje aerosol koji se unosi u plazmenu ICP baklju u kojoj otapalo isparava i pobuđuju se elektroni. U sprej komori, velike kapljice odvajaju se u otpad, a fine male kapljice se odvode do plazme. Više od 99% injektiranog uzorka odlazi u otpad, dok se svega 1% ili manje odvodi do plazme. U plazmi se pobuđuju ioni, a pri povratku u osnovno stanje dolazi do emisije zračenja karakterističnih valnih duljina za pojedini element te je upravo intenzitet tog emitiranog zračenja mjera koncentracije analita u plazmi. Zračenje se detektira i pretvara u električne signale koji se potom konvertiraju u informacije o koncentracijama elemenata.

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju odabrane su dvije vrste micelija gljiva *P. chrysosporium* i *F. pinicola*. *P. chrysosporium* pripada gljivama bijelog truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više lignolitičkih enzima i razgrađuje lignin. *F. pinicola* pripada gljivama smeđeg truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više celulolitičkih enzima i razgrađuje celulozu i hemicelulozu. Uzgoj i rast micelija proveden je na dva različita drva smreke i topole. Smreka je odabrana kao mekše drvo, a topola kao tvrde drvo. Cilj je utvrditi utjecaj rasta micelija na promjenu koncentracije iona metala (željeza, bakra i mangana) u supernatantima prije i nakon uzgoja gljiva na odabranim uzorcima drva smreke i topole, odnosno bioakumulacijsku sposobnost istraživanih micelija gljiva.

3.1. Analiza koncentracija iona bakra nakon rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

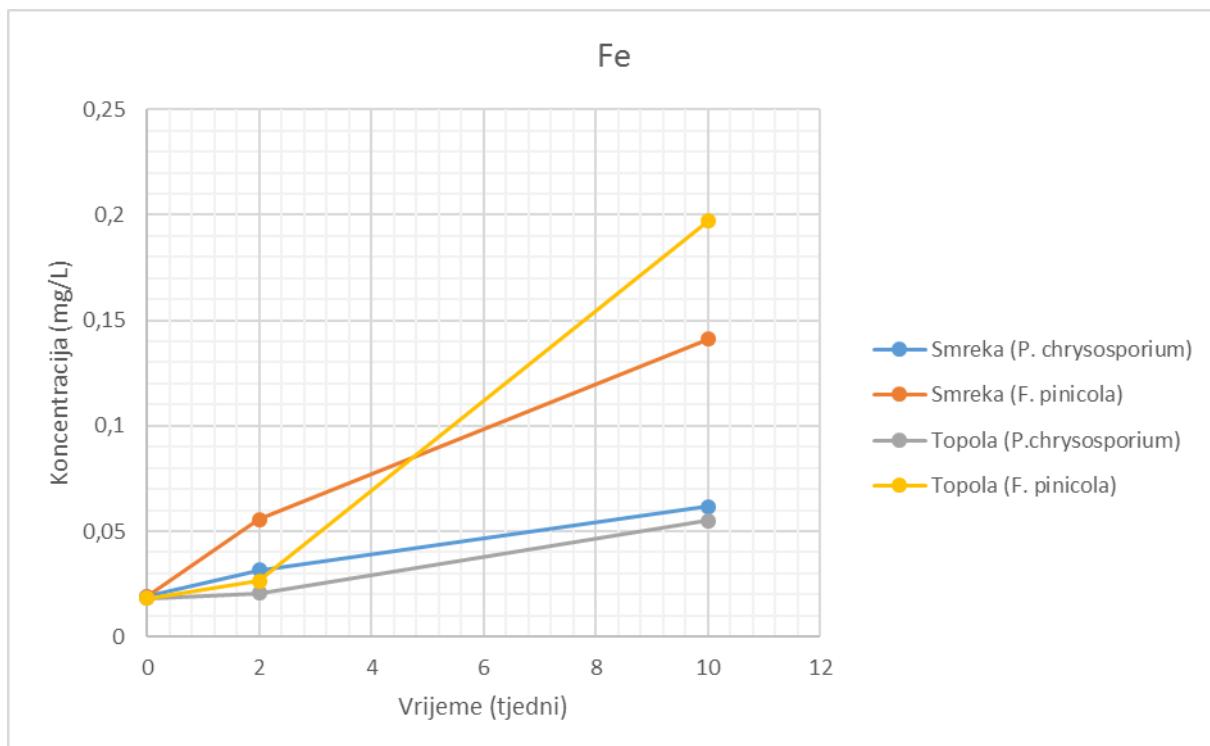
U uzorcima drvene biomase na kojima je rasla *P. chrysosporium* prvo je vidljiv pad koncentracije Cu, a zatim rast. Dok je značajniji porast zabilježen u uzorku topole na kojoj je rasla *F. pinicola* (s 0.0108 na 0.0678 mg/L). Rastom micelija gljiva na površini drva dolazi do razgradnje organskog dijela i oslobođanja mineralnih tvari i iona metala. Oslobođene ione metala, nakon rasta, gljive koriste za rast i sintezu lignolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. Porast koncentracije iona bakra u supernatantu nakon rasta *F. pinicola* na topoli ukazuje na smanjenu aktivnost enzima koji u aktivnom mjestu imaju ion bakra. Ovo se prije svega odnosi na lakazu. Stoga se u ovim supernatantima može očekivati znatno niža aktivnost lakaza (Slika 3.). Razlika u koncentracije iona bakra nakon rasta *F. pinicola* na topoli odnosno na smreki može se objasniti utjecajem fizikalno-kemijskih svojstava biomase drva. Različita mehanička svojstva (čvrstoća, tvrdoća), te struktura istraživanih uzoraka drva značajno utječe na rast gljiva i razgradnju osnovnih jedinica drvene biomase (celuloza, hemiceluloza i lignin). *F. pinicola* (gljiva smeđe truleži) sintetizira više hemicelulolitičkih enzima i razgrađuje celulozne jedinice pri čemu ostaje nerazgrađeni lignin. *P. chrysosporium* koristi drvenu biomasu za sintezu lignolitičkih enzima i razgrađuje lignin pri čemu nerazgrađena ostaje celuloza. *P. chrysosporium* tijekom rasta koristi ion bakra za sintezu lignolitičkih oksidoreduktaza (lakaze) koje u aktivnom mjestu imaju ugrađen ion bakra (Podgornik i sur. 2001). Stoga je nakon rasta *P. chrysosporium* zabilježena znatno niža koncentracija iona bakra u supernatantima. Prepostavka je da su tijekom rasta *P. chrysosporium* ioni bakra iskorišteni za sintezu lakaze. Ovu prepostavku trebalo bi provjeriti mjeranjem aktivnosti lakaze u supernatantima.



Slika 3. Koncentracije iona bakra u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole.

3.2. Analiza koncentracija iona željeza nakon rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

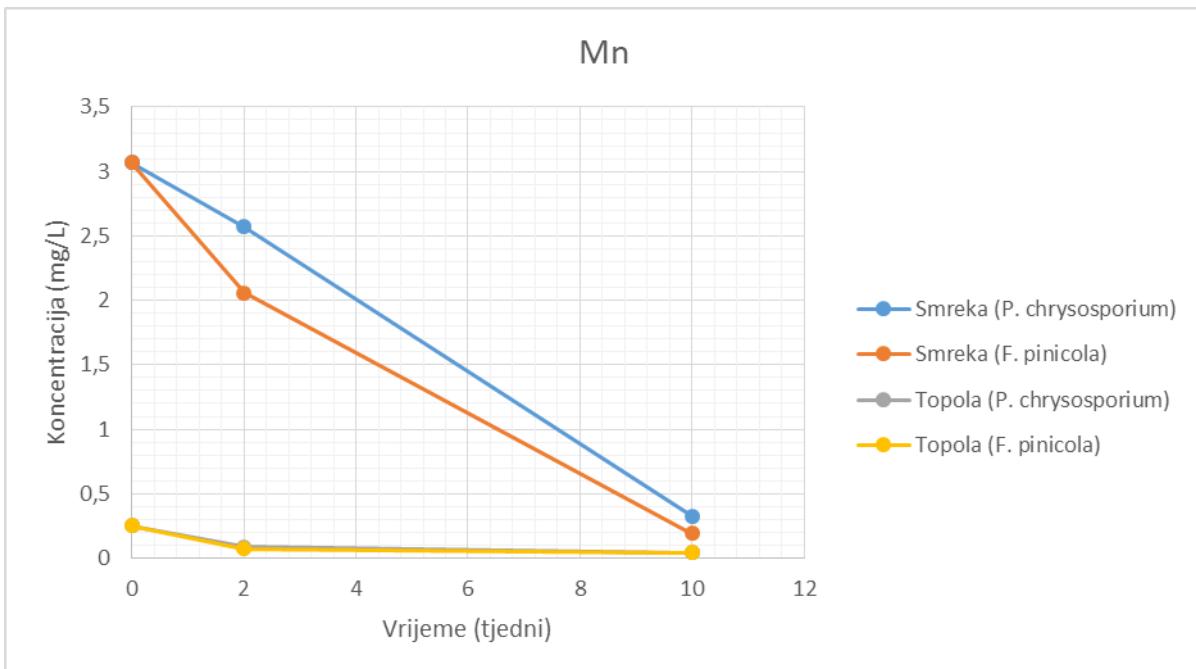
Značajniji rast koncentracije Fe utvrđen je u uzorcima drvne biomase na kojoj je porasla *F. pinicola*, kod smreke sa 0.0191 mg/L na 0.141 mg/L, te kod topole sa 0.0183 mg/L na 0.197 mg/L (Slika 4.). Ioni željeza kao i ioni bakra inhibiraju djelovanje celulaza, a aktiviraju lignolitičke enzime. *F. pinicola* pripada grupi gljiva smeđeg truljenja te sintetizira celulolitičke enzime. Porast koncentracije iona željeza nakon rasta *F. pinicola* na drvu smreke i topole ukazuje na mogućnost inhibicije celulolitičkih enzima i smanjenja njihove aktivnosti u supernatantima (Pereira i sur. 2016). *P. chrysosporium* sintetizira tijekom rasta lignolitičke enzime te ih koristi u razgradnji lignina. Za sintezu lignolitičkih enzima *P. chrysosporium* koristi ione metala te ih ugrađuje u aktivna mjesta lignolitičkih enzima. Stoga je izmjerena koncentracija iona željeza nakon rasta *P. chrysosporium* na drvu topole i smreke niža u uporedbi s koncentracijama iona željeza izmjerenim nakon rasta *F. pinicola*. Navedena zapažanja trebalo bi potvrditi mjerljivom aktivnosti lignolitičkih i celulolitičkih enzima u dobivenim supernatantima nakon uzgoja *P. chrysosporium* i *F. pinicola*.



Slika 4.. Koncentracije iona željeza u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole.

3.3. Analiza koncentracija iona mangana u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

Iz Slike 5 je vidljiv pad koncentracije mangana, najznačajniji u uzorcima smreke, gdje s 3.07 mg/L koncentracije padne na 0.326 mg/L (smreka na kojoj je porasla *P. chrysosporium*), odnosno na 0.190 mg/L (smreka na kojoj je porasla *F. pinicola*). Tijekom razmatranja promjene koncentracija iona mangana, potrebno je uzeti u obzir i utjecaj vezanja iona mangana na biomasu micelija gljiva. Ionska jakost i ionski radius iona mangana različiti je od ionskog radijusa i ionske jakosti iona željeza i bakra. Stoga je afinitet za vezanje iona metala adsorpcijom na površini micelija različit. Efekti adsorpcije i bioakomulacije utječu na bioraspoloživost ovih metala u supernatantima nakon razgradnje drva i rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola*. Ukoliko prevladava efekt adsorpcije koncentracija iona metala u supernatantu se smanjuje tijekom rasta micelija. Adsorpcijski afinitet ovisi o fizikalnim svojstvima biomase odnosno o navedenim svojstvima iona. Bioakomulacija je vezana uz biokemijske procese unutar stanicica micelija i ugradnju iona metala u biomasu. Ukoliko prevladava efekt adsorpcije, koncentracija metala se smanjuje s vremenom, kao u slučaju adsorpcije iona mangana. Da bi potvrdili navedeno potrebno je napraviti analizu koncentracije iona metala vezanih na površini micelija nakon uzgoja. Također potrebno je razmotriti i mineralni sastav korištene biomase odnosno koncentraciju metala nakon spaljivanja korištene biomase te izmjeriti koncentraciju istraživanih metala u korištenom drvu smreke i topole. Iz dobivenih rezultata koncentracije iona mangana nakon uzgoja na drvu topole može se zaključiti da je koncentracija ovih metala u biomasi niža u usporedbi s ionima metala željeza i bakra. Ovakvo zapažanje trebalo bi potvrditi mjerjenjem mineralnog sastava topole i smreke nakon spaljivanja.



Slika 5. Koncentracije iona mangana u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole.

4. ZAKLJUČAK

Značaj prikazanog istraživanja je u razvoju i validaciji metode mjerjenja niskih koncentracija metala tijekom rasta gljiva *F. pinicola* i *P. chrysosporium* na drvu topole i smreke. Pri tome je, zbog mogućnosti analize vrlo niskih koncentracija metala u uzorcima drvene biomase korištena optičke emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Limiti detekcije ICP-OES spektrometra su 0.0073845 mg/L za željezo, 0.0024539 mg/L za bakar i $7.776878 \cdot 10^{-4} \text{ mg/L}$ za mangan. Na osnovu promjene koncentracije metala tijekom rasta micelija gljiva *F. pinicola* i *P. chrysosporium* na drvu smreke i topole određena je bioakumulacijska sposobnost navedenih micelija gljiva. Koncentracija mangana se smanjila u svim analiziranim uzorcima, što ukazuje na sposobnost *F. pinicola* i *P. chrysosporium* da bioakumuliraju teške metale. Navedeno bi trebalo potvrditi analizom koncentracije iona metala vezanih na površini micelija nakon uzgoja micelija.

Nakon rasta *F. Pinicola* na drvu topole u uzorcima su izmjerene najviše koncentracije iona bakra i željeza, što ukazuje na smanjenu aktivnost enzima, poput lakaze. *P. chrysosporium* koristi ione bakra i željeza tako što ih ugrađuje u aktivna mjesta lignolitičkih enzima, stoga su izmjerene koncentracije navedenih metala niže. Ove prepostavke bi trebalo potvrditi dodatnim mjerjenjima aktivnosti enzima u uzorcima nakon rasta istraživanih gljiva.

POPIS LITERATURE

- Anahid S., Yaghmaei S., Ghobadinejad Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi, *Scientia Iranica*, Vol 18, 502-508
- Baldrian P., Gabriel J., Čurdova E., Suchanek M., Rychlovský P. (1999). Heavy and trace metal in wood-inhabiting fungi *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus* and *sterum hirsutum* from medium polluted sites in Czech republic, *Toxicological and environmental chemistry*, Vol 71, 475 – 483
- de Cassia Pereira J., Giese E. C., de Souza Moretti M. M., dos Santos Gomes A. C., Micali Perrone O., Boscolo M., da Silva R., Gomes E., Alonso Bocchini Martins D. (2016). Metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities
- Gaberc-Porekar V., Menart V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *Journal of biochemical biophysical*, Vol 49, 335–360
- Hatakka, A., (2001). Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M., Steinbuchel, A., *Biopolymers: Lignin, humic substances and coal*. Wiley-VCH, Weinheim, 129–180
- ICPEsolution za ICPE-9000, Uputstva za uporabu

- Iqbal, M., Edyvean, R.G.J., (2004). Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*, Miner. Eng. 17, 217–223
- Khopkar S. M. (2004). Basic concepts of analytical chemistry, New age international
- Korn, M. D. A., Morte, E. S. D., dos Santos, D. C. M. B., Castro, J. T., Barbosa, J. T. P., Teixeira A. P. (2008). Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods, Applied spectroscopy reviews, Vol 43, 67–92
- Kumar, A.G., Sekaran, G., Krishnamoorthy, S., (2006). Solid state fermentation of Achras zapota lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*, Bioresour. Technol. 97, 1521–1528
- Lamar R. T., Larsen M. J., Kent Kirk T., Glaser A. J. (1987). Growth of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soil, Land disposal, remedial action, incineration and treatment of hazardous waste: Proceedings of the 13th annual research symposium at Cincinnati, 419-424
- Lind T., Valmari T., Kauppinen E. I., Sfiris G., Nilsson K., Maenhaut W., Volatilization of the heavy metals during circulating fluidized bed combustion of forest residue, Environ. sci. technol. 1999, Vol 33, 496-502
- Pages, D., Sanchez, L., Conrod, S., Gidrol, X., Fekete, A., Schmitt-Kopplin, P., (2007). Exploration of intraclonal adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. Environ. Microbiol. 9, 2820–2835
- Panda H. (2015.). Handbook on coal, coke, cotton, lignin, hemicellulose, wood, wood- polymer composites, lignocellulosic – plastic composites from recycled materials, wood fiber, rosin and rosin derivates, 182-183
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., De la Rubia, T., Martinez, J., (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Int. Microbiol. 5, 53–63
- Podgornik H., Stegu M., Zibert E., Perdih A. (2001). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* an artefact caused by Mn(III), Letters in applied microbiology, Vol 32, 407-411
- Silva, J. C. J., Baccan, N., & Nóbrega, J. A. (2003). Analytical performance of an inductively coupled plasma optical emission spectrometry with dual view configuration. Journal of Brazilian chemical society, Vol 14, 310–315
- Small H. (1989). Ion chromatography, Plenum Press, New York
- Szpunar J., Pellerin P., Makarov A., Doco T., Williams P., Lobin R. (1999). Speciation of metal–carbohydrate complexes in fruit and vegetable samples by size-exclusion HPLC-ICP-MS, Journal of analytical atomic spectrometry, Vol 4
- Timerbaev A. R., Petrukhin O. M., Zolotov Yu. A. (1987). Analytical application of liquid adsorption chromatography of metal chelates, Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie, Vol 327, 87-101
- Tompkins E. R. i Mayer S. W. (1947). Ion exchange as a separation method. III. equilibrium studies of the reactions of rare earth complexes with synthetic ion exchange resins, Journal of the American chemical society, Vol 69, 2859-2865
- 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
- Wellington K. (2002). Applications of laccases in organic synthesis, Green Chemistry, Nova science publishers, 167-211
- Yu, M., Zeng, G.M., Chen, Y.N., Yu, H.Y., Huang, D.L., (2009). Influence of *Phanerochaete chrysosporium* on microbial communities and lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw. Process Biochem. 44, 17–22
- Vaishaly A. G., Blessy B. M., Krishnamurthy N. B., Krishnamurthy T. P. (2015). Bioaccumulation of heavy metals by fungi, SBT Journals, Vol 1, 15-21
- Zaidi A., Oves M., Ahmad E., Khan M. S. (2011). Importance of free-living fungi in heavy metal remediation, Department of agricultural microbiology, Vol 21
- Zeng, G.M., Huang, D.L., Huang, G.H., Hu, T.J., Jiang, X.Y., Feng, C.L., Chen, Y.N., Tang, L., Liu, H.L., (2007). Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus, Bioresour. Technol. 98, 320–326
- Žeger T. (2012). Određivanje pentozana različitim vrsta drva UV-spektrofotometrijskom analizom, Hrvatska znanstvena bibliografija