

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ajda ULČNIK

**UGOTAVLJANJE REMEDIACIJSKEGA
POTENCIALA LIGNINOLITIČNIH GLIV ZA
RAZGRADNJO LINDANA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ajda ULČNIK

**UGOTAVLJANJE REMEDIACIJSKEGA POTENCIALA
LIGNINOLITIČNIH GLIV ZA RAZGRADNJO LINDANA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF REMEDIATION POTENTIALS OF
LIGNINOLYTIC FUNGI FOR DEGRADATION OF LINDANE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Katedri za analizo kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za dodiplomski študij oddelka za biotehnologijo z dne 12. 09. 2008 je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Franc Pohleven, za somentorja pa dr. Črtomir Tavzes.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franc Pohleven
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: dr. Črtomir Tavzes
Inštitut za lesarstvo in trajnostni razvoj, Ljubljana

Članica: prof. dr. Lucija Zupančič Kralj
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ajda Ulčnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 630*844.2
- KG mikoremediacija/lindan/glive/bela trohnoba/metoda ekstrakcije
- AV ULČNIK, Ajda
- SA POHLEVEN, Franc (mentor)/TAVZES, Črtomir (somentor)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2009
- IN UGOTAVLJANJE REMEDIACIJSKEGA POTENCIALA LIGNINOLITIČNIH
GLIV ZA RAZGRADNJO LINDANA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 49 str., 6 pregl., 13 sl., 54 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Proučevali smo razgradnjo kloriranega organskega pesticida lindana z izbranimi vrstami lesnih gliv. Lindan smo v tekočih kulturah za različna časovna obdobja izpostavili štirim vrstam gliv bele trohnobe (*Trametes versicolor*, *Hypoxylon fragiforme*, *Chondrostereum purpureum* in *Pleurotus ostreatus*) ter eni glivi rjave trohnobe (*Gloeophyllum trabeum*). Iz tekočih kultur gliv smo lindan ekstrahirali z ekstrakcijo iz filtratov in iz homogenatov tekočih kultur gliv. Proučevali smo tudi primernost načina ekstrakcije lindana iz tekočih kultur gliv za določanje razgradnje lindana. Pri vrstah *T. versicolor*, *H. fragiforme* in *P. ostreatus* izbira metode ekstrakcije lindana iz tekočih kultur gliv ni vplivala na določanje razgradnje lindana. Razgradnja lindana z glivami bele trohnobe je, razen v tekočih kulturah glive *C. purpureum*, naraščala s časom izpostavitve lindana kulturam gliv. Po 21 dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv *T. versicolor*, *H. fragiforme* in *P. ostreatus* smo določili več kot 90 % razgradnjo lindana. Razgradnja lindana z glivo rjave trohnobe *G. trabeum* ni bila uspešna. Domnevamo, da smo manjšo količino lindana po izpostavitvi lindana kulturam gliv *C. purpureum* in *G. trabeum* določili predvsem zaradi njegove adsorpcije na površino micelija.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 630*844.2
CX mycoremediation/lindane/fungi/white-rot/extraction method
AU ULČNIK, Ajda
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)/TAVZES, Črtomir (co-supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biotechnology
PY 2009
TI DETERMINATION OF REMEDIATION POTENTIALS OF LIGNINOLYTIC FUNGI FOR DEGRADATION OF LINDANE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 49 p., 6 tab., 13 fig., 54 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The ability of four white-rot fungi (*Trametes versicolor*, *Hypoxylon fragiforme*, *Chondrostereum purpureum* and *Pleurotus ostreatus*) and one brown-rot fungus (*Gloeophyllum trabeum*) to degrade an organochlorine insecticide, lindane, in liquid cultures was studied. Lindane was exposed to fungal liquid cultures for various lengths of time. In order to extract lindane from fungal liquid cultures two different methods of extraction were used: extraction of lindane from filtrates, and from homogenised fungal liquid cultures. Both extraction methods were examined for their appropriateness in determining the exact amount of lindane in liquid cultures. White-rots were able to degrade lindane. The degradation rate increased with incubation period of lindane in liquid cultures inoculated with all white rots but *C. purpureum*. After 21 days of incubation over 90 % of lindane degradation by *T. versicolor*, *H. fragiforme* and *P. ostreatus* was measured. Degradation of lindane by a brown rot *G. trabeum* did not occur. The selection of extraction method used to establish the amount of lindane in liquid cultures of *T. versicolor*, *H. fragiforme* and *P. ostreatus* had no noticeable effect on the determined degradation values. Lindane removal from the culture media, inoculated with *C. purpureum* and *G. trabeum*, presumably occurred via adsorption onto the fungal biomass.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PESTICIDI	2
2.1.1 Lindan	4
2.2 BIOREMEDIACIJA	5
2.2.1 Mikoremediacija (bioremediacija z ligninolitičnimi glivami)	6
2.2.1.1 Glive bele trohnobe	6
2.2.1.2 Mehanizem razgradnje lignina in ligninolitični encimi	8
2.2.1.2.1 Lignin peroksidaza	9
2.2.1.2.2 Mangan peroksidaza	9
2.2.1.2.3 Lakaza	10
2.2.2 Glive rjave trohnobe	11
2.2.3 Mikoremediacija ksenobiotikov	11
2.2.3.1.1 Primeri uspešnih razgradenj lindana z glivami bele trohnobe	13
2.2.4 Uporabnost biotehnoških postopkov za bioremediacijo v industrijskem merilu	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 VRSTE GLIV	16
3.2 PRIPRAVA GOJIŠČ	16
3.3 INOKULACIJA IN GOJENJE GLIV	17
3.4 DODAJANJE LINDANA IN VERATRIL ALKOHOLA	17
3.5 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO S PLINSKO KROMATOGRAFIJO	18
3.5.1 Ekstrakcija lindana iz filtratov tekočih kultur gliv	18

3.5.2	Ekstrakcija lindana iz homogenatov tekočih kultur gliv	19
3.6	DOLOČITEV LINDANA S PLINSKO KROMATOGRFIJO	19
3.6.1	Določanje razgradnje lindana	20
4	REZULTATI	22
4.1	RAST GLIV V TEKOČEM GOJIŠČU	22
4.2	RAZGRADNJA LINDANA S KULTURAMI GLIV	23
4.2.1	<i>Trametes versicolor</i>	23
4.2.2	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	25
4.2.3	<i>Hypoxyton fragiforme</i>	27
4.2.4	<i>Chondrostereum purpureum</i>	28
4.2.5	<i>Pleurotus ostreatus</i>	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	RAZPRAVA	31
5.1.1	Gojenje kultur gliv v tekočem mediju	31
5.1.2	Rast gliv	31
5.1.3	Priprava vzorcev za analizo s plinsko kromatografijo	32
5.1.4	Razgradnja lindana	33
5.1.4.1	<i>Trametes versicolor</i>	35
5.1.4.2	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	36
5.1.4.3	<i>Hypoxyton fragiforme</i>	37
5.1.4.4	<i>Chondrostereum purpureum</i>	39
5.1.4.5	<i>Pleurotus ostreatus</i>	41
5.1.5	Razgradni produkti lindana	41
5.2	SKLEPI	42
6	POVZETEK	44
7	VIRI	45
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Skupine pesticidov glede na ciljne organizme.	2
Preglednica 2: Skupine organskih pesticidov glede na kemično sestavo.	3
Preglednica 3: Vrste oziroma sevi testiranih gliv.	16
Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča po Hadarju, modificiranega za potrebe mikoremediacije.	16
Preglednica 5: Kromatografski pogoji za določanje lindana z GC-ECD.	20
Preglednica 6: Temperaturni program za analizo GC-ECD.	20

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Lindan ($1\alpha, 2\alpha, 3\beta, 4\alpha, 5\alpha, 6\beta$ -heksaklorocikloheksan, γ -HCH).	4
Slika 2: Predlagan model strukture lignina.	7
Slika 3: Katalitični cikel LiP.	9
Slika 4: Dodajanje lindana tekočim glivnim kulturam.	18
Slika 5: Določitev lindana z GC.	21
Slika 6: Primeri tekočih kultur gliv <i>G. trabeum</i> (a), <i>H. fragiforme</i> (b), <i>C. purpureum</i> (c) in <i>P. ostreatus</i> (d).	22
Slika 7: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive <i>T. versicolor</i> .	24
Slika 8: Povprečna količina lindana v pozitivnih kontrolah, uporabljenih za določanje razgradnje lindana s kulturo glive <i>G. trabeum</i> .	25
Slika 9: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive <i>G. trabeum</i> .	26
Slika 10: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive <i>H. fragiforme</i> .	27
Slika 11: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive <i>C. purpureum</i> .	29
Slika 12: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive <i>P. ostreatus</i> .	30
Slika 13: Primer homogenizirane tekoče glivne kulture pred centrifugiranjem.	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

GC	plinska kromatografija
Lac	lakaza
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
obrati min ⁻¹	obrati na minuto
PDA	krompirjev dekstrozni agar
RH	relativna vlažnost
VA	veratril alkohol

1 UVOD

Eden izmed večjih problemov, s katerimi se soočamo v industrializiranem svetu, je onesnaženost okolja z nevarnimi in toksičnimi kemikalijami. Njihovo proizvodnjo in vnašanje v okolje skušamo zakonsko preprečiti ali omejiti, vendar se je znaten delež onesnaževanja zgodil že v preteklosti. Onesnaževanja kljub preprečitvenim ukrepom ne moremo preprečiti niti v prihodnosti.

Les večine evropskih drevesnih vrst je neodporen proti lesnim škodljivcem, zato ga moramo zaščititi in tako povečati njegovo odpornost. Večina klasičnih zaščitnih sredstev za les predstavlja nevarnost za okolje in človeka v postopku njihove proizvodnje, transporta, zaščite in uporabe lesa, pa tudi po tem, ko je zaščiteni les umaknjen iz uporabe. Lindan je kloriran organski pesticid, ki se je v preteklosti široko uporabljal za zatiranje škodljivcev v kmetijstvu in za zaščito lesa. Pri uporabi zaščitenega lesa v zaprtih prostorih prihaja do dolgotrajne izpostavljenosti lindanu. Zaščitenega lesa ni dovoljeno prosto odlagati, ker se biocidi lahko izločajo v prst ter površinske in podtalne vode. Sežiganje z biocidi zaščitenega lesa je dovoljeno le v posebnih napravah, kar pa je relativno drago. Posebno težavo predstavljajo leseni predmeti kulturne dediščine, ki so zaščiteni s takšnimi pripravki, saj to omejuje možnosti za njihovo proučevanje, restavriranje in razstavljanje.

Ostanke lindana zaradi izjemne obstojnosti v okolju danes najdemo praktično povsod. Zaradi škodljivih učinkov na organizme želimo zmanjšati njegovo prisotnost v okolju. Okolju prijazno rešitev bioremediacije predstavljajo postopki razgradnje z lesnimi glivami. Ligninolitčne glive s pomočjo ektoencimov razgrajujejo komponente lesa, sposobne pa so tudi razgradnje ligninu strukturno podobnih biocidov.

V diplomskem delu smo proučevali razgradnjo lindana z lesnimi glivami v odvisnosti od časa izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv. Ugotavljali smo primernost metode ekstrakcije za določitev količine lindana v tekočem mediju. Proučevali smo tudi sposobnost posamezne vrste glive za mikoremediacijo lindana.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PESTICIDI

Pesticidi so snovi, ki se uporabljajo za zatiranje škodljivcev, plevelov in rastlinskih bolezni. Večinoma se uporabljajo v kmetijstvu za povečanje poljedeljske proizvodnje, poleg tega pa se uporabljajo tudi kot dezinfekcijska in deratizacijska sredstva za zatiranje živali, ki prenašajo bolezni, za dezinfekcijo, razkuževanje pitne in bazenske vode, v lesarstvu in gozdarstvu pa kot zaščitni pripravki pred škodljivci. Ostanke pesticidov ali njihovih razgradnih produktov predstavljajo okoljsko težavo po vsem svetu.

Po izvoru pesticide delimo na sintetične in naravne. Med slednje uvrščamo določene mikroorganizme ali pa snovi, izolirane iz rastlin. Sintetični pesticidi lahko ob neustrezni rabi ogrožajo okolje in človeka. Stopnja toksičnosti je odvisna od njihove kemijske sestave. Pesticidi, tako kot zdravila, vsebujejo aktivno substanco, ki ji je dodan inertni medij oziroma stabilizator. Zaradi velike uporabe pesticidov so ti prisotni v okolju, živilih in celo ljudeh. V okolje lahko pridejo tudi zaradi neprimernega načina odlaganja odpadnih snovi, zaradi nesreč pri transportu ali nepravilne rabe.

Negativni vpliv pesticidov na žive organizme je odvisen od koncentracije pesticida, stopnje razgradljivosti, obstojnosti v okolju, sposobnosti bioakumulacije, vključevanja v prehranjevalne verige, mutagenosti in drugih dejavnikov.

Pesticide najpogosteje delimo glede na ciljno skupino organizmov, ki jih skupina pesticidov uničuje (preglednica 1), in glede na kemično sestavo (preglednica 2).

Preglednica 1: Skupine pesticidov glede na ciljne organizme.

Ciljna skupina organizmov	Skupina pesticidov	Nekatere aktivne snovi
glive	fungicidi	kaptan, benomil, triadimefon, folpet, mankozeb
žuželke	insekticidi	DDT, metidation, metomil, lindan, heptaklor
pleveli	herbicidi	atrazin, alaklor, simazin, 2,4-D
pršice	akaricidi	dikofol, propargit, klorfentazin
glodavci	rodenticidi	endrin, varfarin, cinkfosfid
polži	limacidi	metaldehid, metiokarb

Preglednica 2: Skupine organskih pesticidov glede na kemično sestavo.

Kemična skupina	Nekatere aktivne snovi
ORGANOFOSFORNI PESTICIDI - fosfatni estri - fosfotio estri	fosfamidon, dikrotofos matamidofos klorpirifos, diazinon, malation
KARBAMATI - tiokarbamati - ditokarbamati	karbaril, klorprofam, propoksur butilat, tiobenkarb tiram
ORGANOKLORNI PESTICIDI - diklorodifeniletani - ciklodieni - klorirani benzeni in cikloheksani - klorirani fenoli in bifenili	DDT, dikofol, metoksiklor, klordan, dieltrin, eldrin, toksafen, heksaklorbenzen (HCB), heksaklorocikloheksan (HCH), pentaklorofenol, bifenili (PCB)
KLORFENOKSI KISLINE	2,4-D, MCPA, silveks
DRUGI PESTICIDI - acetanilidi - bipiridili - fenilureati - ftalimidi - triazini	alaklor, metolaklor parakvat, dikvat diuron, linuron kaptan, folpet atrazin, simazin cianazin, desetilatrazin

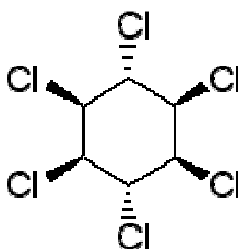
Organoklorni pesticidi, kot je lindan, večinoma vsebujejo ogljik, vodik in klor. Njihov razpad je počasen in v okolju lahko ostanejo še dolgo časa po uporabi, v organizmih pa dolgo časa po izpostavitvi. Topni so v nepolarnih topilih in maščobah, zaradi česar lahko prehajajo preko hrane v organizme. V telesu se nabirajo v maščobnem tkivu, pa tudi v jetrih in mleku. Pesticide zaužijemo tudi s sadjem in zelenjavo, ki so bili z njimi zaščiteni pred škodljivci.

S pesticidi kontaminiran prah se lahko prenaša po zraku in se lahko odloži na oddaljene kraje, zato so pesticidi v okolju zelo razširjeni.

Snovi, ki jih organizmi ne tvorijo sami (za njihov nastanek nimajo metabolne poti), jih pa najdemo v organizmih, imenujemo ksenobiotiki. Ksenobiotiki so tudi snovi, ki so v okolju ali v organizmih prisotne v mnogo višjih koncentracijah od običajnih (Vidic, 2008). Izraz ksenobiotik uporabljamo tudi v povezavi z onesnaževali in pomenijo snovi, ki so tuje celotnemu biološkemu sistemu oziroma snovi, ki v naravi niso obstajale, preden jih je sintetiziral človek.

2.1.1 Lindan

Lindan ($1\alpha,2\alpha,3\beta,4\alpha,5\alpha,6\beta$ -heksaklorocikloheksan, γ -HCH) (slika 1) je organoklorni insekticid. Pridobivajo ga z adicijo treh molekul klora na molekulo benzena, reakcijo pa aktivirajo z ultravijoličnim obsevanjem (Alloway in Ayres, 1993). Teoretično lahko nastane osem geometričnih izomerov, kjer so atomi klora razporejeni na različnih mestih v obroču cikloheksana. Pri reakciji nastane pet različnih izomerov, delež gama izomera pa je med 10 in 15 odstotki. Lindan je prvič opisal Van de Linden leta 1912, komercialno proizvodnjo pa je leta 1942 pričelo podjetje Imperial Chemical Industries.



Slika 1: Lindan ($1\alpha,2\alpha,3\beta,4\alpha,5\alpha,6\beta$ -heksaklorocikloheksan, γ -HCH).

Lindan ima v kristalni obliki belo barvo ter rahel zatohel vonj. Tališče ima pri 112 do 113°C, vrelišče pa pri 323,4 °C (pri 760 mm Hg) (Phillips in sod., 2005). V vodi je skoraj netopen (7 do 10 mg/l pri 20 °C), bolje se topi v etanolu, etru, benzenu in acetonu. Lindan je izredno odporen na vročino, svetlobo, zrak, ogljikov dioksid ter močne kisline. V prisotnosti baz lahko poteče deklorinacija.

V okolju je lindan zelo obstojen. Poleg tega ima tudi težnjo po bioakumulaciji. Kopiči se v maščobah, kjer lahko ostane dolgo časa (Zucchini-Pascal in sod., 2009). Toksičen je tudi za neciljne organizme, vključujoč ljudi (Singh in Kuhad, 1999). Lindan deluje kot živčni strup. Pri ljudeh povzroča nevrološke bolezni, pri podganah in miših pa raka na jetrih (Siddique in sod., 2002). Domnevno deluje tako, da z vezavo na njegov receptor prepreči delovanje nevrottransmitterja gama aminobutirična kislina (GABA), s čimer prepreči prenos živčnega potenciala vzdolž živčnih celic (Toxicological profile ..., 2005).

Čeprav je lindan v primernih pogojih tudi biorazgradljiv, lahko v zemlji ostaja prisoten več let. Lindan razpada na sončni svetlobi. Stopnja razgradnje je odvisna od temperature in intenzitete svetlobe. Odstranitev lindana iz zemlje je največkrat posledica mikrobne razgradnje (Phillips in sod., 2005).

Lindan se je uporabljal po vsem svetu predvsem kot insekticid. Uporabljali so ga v kmetijstvu in za zaščito lesa, pa tudi za zatiranje komarjev. Danes lindan v te namene še vedno uporabljajo v nekaterih državah v razvoju, drugod pa lindan uporabljajo kot sredstvo za zdravljenje naglavnih uši in garij pri ljudeh in živalih. V mnogih razvitih državah je uporaba lindana prepovedana, vendar pa je zaradi obstojnosti v okolju še vedno prisoten, kar predstavlja resen toksikološki problem (Gadd, 2001).

2.2 BIOREMEDIACIJA

Razgradnja onesnaževal v okolju poteka z biološkimi, kemijskimi in fotokemijskimi procesi. Proces, v katerem onesnaženo okolje povrnemo v prvotno stanje, imenujemo remediacija.

Bioremediacija je uporaba organizmov za razgradnjo ali odstranitev onesnaževal iz okolja. Pri tem organizem (mikroorganizem, gliva, rastlina ali njihovi encimi) onesnaževalo porablja kot vir hrane, ga kometabolizira ali pa kopiči. Namen bioremediacije je zmanjšati količino onesnaževal na nivo nezaznavnih ali netoksičnih koncentracij. Cilj je popolna razgradnja organskih onesnaževal do CO₂, v primeru kovin pa njihova odstranitev s sorpcijo ali transformacijo v manj toksične oblike (Pointing, 2001).

Glede na uporabljene organizme delimo bioremediacijo na fitoremediacijo (uporaba rastlin), baktoremediacijo (uporaba bakterij) in mikoremediacijo (uporaba gliv) (Vidic, 2008).

Bioremediacija je običajno najcenejša metoda remediacije, vendar pa zahteva več časa kot druge metode. Prav tako je bioremediacijo težje nadzorovati in voditi (Stopar, 2009). Prednosti bioremediacije pred drugimi postopki so (Diehl in Borazjani, 2000; Stopar, 2009):

- varnost: bioremediacija je manj nevarna za ljudi, ki jo izvajajo, poleg tega pogosto poteka na mestu onesnaženja in zato transport odpadkov ni potreben,

- ekonomičnost: stroški razstrupljanja se lahko zmanjšajo za 20 do 50 %, postopek pa lahko poteka kontinuirano,
- okoljska sprejemljivost: pri bioremediaciji se onesnaževala razgradijo v netoksične produkte,
- družbena sprejemljivost: bioremediacija predstavlja naraven način čiščenja okolja in je za javnost bolj sprejemljiva.

Bioremediacija je manj učinkovita v primeru nizke biodostopnosti onesnaževala. Med pomanjkljivosti lahko uvrščamo njeno odvisnost od okoljskih pogojev ter relativno počasnost samega postopka. Neustrezna je v primeru, ko onesnaženo območje vsebuje toksične snovi za organizem, s katerim želimo opraviti bioremediacijo.

Razgradnja organskih molekul v vodi in v zemlji je skoraj vedno posledica mikrobne aktivnosti. Pri tem se organski substrat pretvori v anorganski produkt. Posledica mineralizacije je detoksifikacija, razen v primerih, ko nastali produkt predstavlja nevarnost za okolje. Organske molekule, ki so v okolju zelo obstojne in dolgo prisotne, mikroorganizmi razgrajujejo zelo počasi ali pa jih niso sposobni razgraditi (Alexander, 1981). Iskanje novih bioremediacijskih načinov za takšne snovi zato ostaja izziv mnogim znanstvenikom.

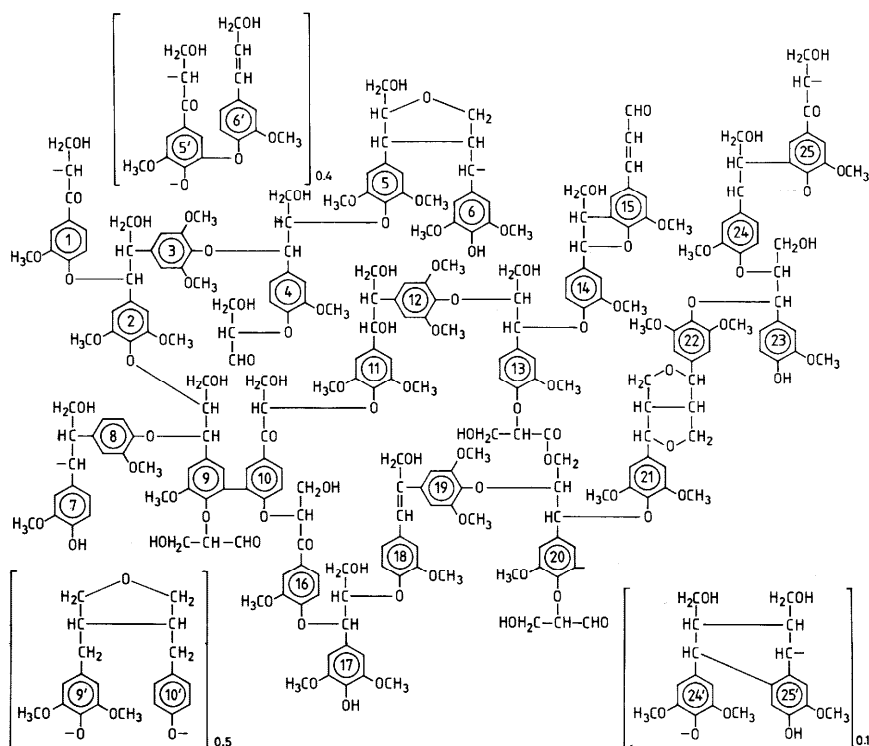
2.2.1 Mikoremediacija (bioremediacija z ligninolitičnimi glivami)

Lesne glive so sposobne transformacije izredno raznolikih nevarnih kemikalij. Iz okolja lahko odstranijo kovine, z vidika bioremediacije kloriranih organskih biocidov pa so še posebej pomembne glive povzročiteljice bele trohnobe. Te imajo razvite relativno nespecifične encimske sisteme za razgradnjo lignina, ki so zato lahko učinkoviti tudi pri razgradnji ligninu strukturno podobnih organskih onesnaževal. Ligninolitične glive lahko razgradijo in mineralizirajo fenole ter klorirane fenolne spojine, poliklorirane bifenile, poliaromske ogljikovodike, klorirane pesticide, nafto in njene derivate, eksplozive, barvila ter druge kemijsko podobne snovi (Singh, 2006; Quintero in sod., 2008).

2.2.1.1 Glive bele trohnobe

Glive povzročiteljice bele trohnobe imajo edinstveno sposobnost popolne depolimerizacije in razgradnje lignina do ogljikovega dioksida (Aust, 1990). Lignin spada med najbolj

razširjene naravne aromatske polimere, poleg celuloze in hemiceluloz pa spada med glavne kemične in strukturne komponente olesenele celične stene. Lignin sestavlja 20 do 30 % celične stene ter okoli celuloze in hemiceluloz tvori matriks, s čimer jih varuje pred razgradnjo. Lignin je zelo razvejana amorfna polimerna makromolekula iz fenilpropanskih podenot (slika 2) (Zabel in Morrell, 1992; Schoemaker in Piontek, 1996). Raznolikost ligninskih podenot in vezi med njimi zahteva nespecifičen razgradni sistem, ki ga posedujejo glive bele trohnobe. Razgradnja biopolimerov navadno poteka z visoko specifičnimi encimi; ti se vežejo na regije polimerov točno določene topografije in vezi cepijo le med specifičnimi podenotami polimera. Lignin je hidrofoben in netopen ter ima kompleksno tridimenzionalno strukturo. Podenote lignina se v polimer združujejo naključno, med seboj pa so povezane z različnimi tipi kemijskih vezi. Zato razgradnja lignina ne more potekati tako kot pri drugih, bolj linearnih in hidrofilnih polimerih ter z encimi, ki so aktivni v vodnem okolju, delujejo le na specifična zaporedja podenot v polimerih ter cepijo le določen tip kemijskih vezi (de Sousa Fragoeiro, 2005). Mineralizacija lignina je aerobni oksidativni proces (Kirk in Farrell, 1987; Quintero in sod., 2008; Sánchez, 2009).



Slika 2: Predlagan model strukture lignina (Fengel in Wegener, 1989).

Glive bele trohnobe lahko metabolizirajo vse glavne komponente lesa, tako celulozo, hemiceluloze in predvsem lignin. Razkrojeni del lesa je zaradi oksidativnega razkroja lignina svetlejši, zato to vrsto razkroja imenujemo bela trohnoba. Belo trohno delimo na simultano in selektivno (Schwarze in sod., 2000). Glive bele trohnobe, ki najprej razgradijo lignin in nato celulozo in hemiceluloze, imenujemo selektivne delignifikatorke. Tiste glive, ki razgrajujejo lignin in polisaharidne sestavine lesa hkrati, pa imenujemo neselektivne ali simultane delignifikatorke (Zabel in Morrell, 1992; Tavzes, 2003, Martínez in sod., 2005).

Polimer lignina je prevelik za endocitozo, zato je sistem za njegovo razgradnjo ekstracelularen (lizotrofen). Encimski sistem, ki ga glive uporabljajo za razgradnjo lignina, je oksidativen, zaradi prostorske neurejenosti lignina pa tudi relativno nespecifičen (Hammel, 1995).

2.2.1.2 Mehanizem razgradnje lignina in ligninolitični encimi

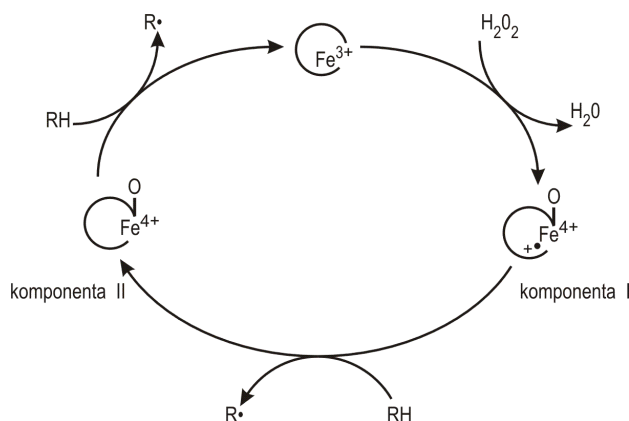
Ligninolitični encimski sistem gliv bele trohnobe temelji na treh ekstracelularnih encimih: lignin peroksidazi (LiP), od mangana odvisni peroksidazi (MnP) in lakazi (Lac) (Reddy, 1995). Večina gliv bele trohnobe izraža vsaj dva ali vse tri ligninolitične encime, nekatere vrste pa najverjetneje le enega (Pointing, 2001). Razgradnja lignina poteka z oksidacijo, ki jo katalizirajo omenjeni encimi, pri čemer nastajajo prosti kationski radikali ligninskih podenot. Ti so nestabilni in reaktivni ter povzročijo številne spontane cepitve ligninske makromolekule v manjše enote (Kirk in Farrell, 1987; Zabel in Morrell, 1992; Tavzes, 2003).

Glive bele trohnobe so najpomembnejši razgrajevalci lesa v naravi. Da bi prišle do celuloze in hemiceluloz, morajo razgraditi ligninski matriks, ki jih obdaja. Ligninolitične glive lignina ne uporabljajo kot edini vir energije in ogljika (Sánchez, 2009). Ligninoliza poteka v sekundarnem metabolizmu oziroma ob pomanjkanju hranil, predvsem dušika in ogljika (Bumpus in sod., 1985). Na ta način se gliva ob prisotnosti laže dosegljivih substratov izogne sintezi in sekreciji metabolno potratnih ligninolitičnih encimov (Hammel, 1997). Novejše raziskave kažejo, da lahko pride do izražanja ligninolitičnih encimov tudi v začetni fazi glivne okužbe lesa, ko ima gliva na voljo še dovolj hranil (Janse in sod., 1998; Messner in sod., 1998; Tavzes, 2003).

2.2.1.2.1 Lignin peroksidaza

Lignin peroksidaze so bili prvi odkriti ligninolitični encimi. Tako kot ostale peroksidaze, predvsem hrenova peroksidaza, vsebujejo molekulo hema z železovim ionom in so glikozilirane.

LiP delujejo s peroksidacijskim ciklom (slika 3). Vodikov peroksid oksidira LiP, pri čemer nastane intermediat, imenovan komponenta I, ki mu primanjkuje dva elektrona. Komponenta I se v prvotno stanje vrne z dvema enoelektronskima oksidacijama substrata – lignina. Pri tem nastane kationski radikal, ki nadalje reagira brez posredovanja encima. Po prvi redukciji iz komponente I nastane vmesna stopnja, imenovana komponenta II. LiP so močnejši oksidanti kot ostale peroksidaze in lahko poleg običajnih substratov, kot so fenoli in aromatski amini, oksidirajo tudi množico policikličnih aromатов in drugih aromatskih etrov, ki so strukturno podobni ligninu (Aust, 1995; Reddy, 1995; Tavzes, 2003).



Slika 3: Katalitični cikel LiP (Aust, 1995).

2.2.1.2.2 Mangan peroksidaza

MnP so prav tako kot LiP glikozilirani hemoproteini in tudi delujejo podobno kot LiP. Komponenta I, ki nastane po oksidaciji MnP z vodikovim peroksidom, se preko pretvorbe Mn(II) v Mn(III) spremeni v komponento II, ki se z enako pretvorbo Mn(II) v Mn(III) povrne v izhodiščno stanje encima. Mn(III), ki nastaja pri reakciji, kelirajo organske kisline, tako pa postane bolj stabilen in se lažje sprosti z encima. Kelati Mn(III) delujejo kot difuzivni oksidanti in oksidirajo številne fenolne substrate, vključno z ligninom, pri čemer

nastajajo prosti kationski radikali (Hammel, 1997; Wariishi in sod., 1992; Podgornik, 2000; Tavzes, 2003; Sánchez, 2009).

Kot drugi encimi, sta LiP in MnP preveliki, da bi prehajala v olesenelo celično steno, zato je njuno delovanje omejeno na površino celične stene. Vendar pa raziskave kažejo, da lahko glive bele trohnobe razgrajujejo lignin v notranjosti celične stene še preden je ta razgrajena do stopnje, pri kateri bi encimi lahko prodirali vanjo. Hammel (1997) je zato predlagal posredno delovanje peroksidaz z oksidacijami substratov z majhno relativno molekulsko maso. Ti bi lahko prodirali v lignocelulozni matriks in oddaljeni od encimov delovali kot oksidanti. Takšna substrata naj bi bila veratril alkohol (VA) in Mn(II). Veratril alkohol je naravni sekundarni metabolit glive. Po oksidaciji iz njega nastane $VA^{\bullet+}$, vendar pa je vloga VA kot posrednika pri razgradnji lignina vprašljiva, če upoštevamo izjemno kratko življenjsko dobo njegovega radikala, ki znaša največ milisekundo (Candeias in Harvey, 1995; Podgornik, 2000; Tavzes, 2003). Vloga Mn(III) v procesu oksidacije z MnP je splošno privzeta in nesporna (Zabel in Morrell, 1992; Schmidt, 2006).

2.2.1.2.3 Lakaza

Lakaze so ekstracelularni glikoproteini, ki spadajo med oksidaze in vsebujejo štiri bakrove atome. Najdemo jih v rastlinah, glivah in mikroorganizmih, odkrili pa so jih tudi pri insektih (Martínez in sod., 2005; Sharma in Kuhad, 2008). Vloge, ki jih imajo lakaze v naštetih organizmih, so različne. Pri glivah so tako na primer udeležene v razkroj lignina, pri rastlinah pa v njegovo sintezo. Lakaze v tekočih kulturah proizvajajo tudi nekatere glive rjave trohnobe (Martínez in sod., 2005).

Lakaze katalizirajo enoelektronsko oksidacijo številnih organskih substratov, pri čemer se bakrovi atomi reducirajo in nastanejo kationski radikali (Yaropolov in sod., 1994). V prvotno stanje se encim povrne z redukcijo molekularnega kisika do vode (Hammel, 1997; Tavzes, 2003). Lakaze so zaradi relativno velike nespecifične oksidacijske sposobnosti uporabne za številne biotehnološke aplikacije. Uporabili so jih že v encimskih imunskih analizah (Enzyme immunoassay, EIA), kjer so z njimi zamenjali uveljavljene hrenove peroksidaze, v biosenzorjih pa so z njimi analizirali fenolne snovi v čajih (Yaropolov in sod., 1994; Podgornik, 2000). Zaradi sposobnosti oksidacije številnih komponent se lakaze uporabljajo tudi za različne kemijske sinteze (Yaropolov in sod., 1994). Komercialno se

lakaze uporabljajo za beljenje tekstila ter na področjih medicine, prehrane, okolja in pri proizvodnji papirja (Sharma in Kuhad, 2008). V pivovarstvu se lakaze uporabljajo za preprečitev nastanka neželenih arom, proizvodnja lakaz za te namene pa poteka s submerzno kultivacijo gensko spremenjene nitaste glive *Aspergillus oryzae*, ki izraža gen za lakazo iz glive *Myceliophthora thermophila* (Olempska-Beer, 2004). Lakaze so v lesarstvu uporabne pri proizvodnji ivernih plošč ter za izboljšanje penetracije zaščitnih sredstev v les (Mai in sod., 2004).

2.2.2 Glive rjave trohnobe

Glive povzročiteljice rjave trohnobe razgrajujejo celulozo in hemiceluloze v oleseneli celični steni, ne pa tudi lignina. Ta je po razgradnji modificiran, vendar večinoma nerazgrajen ter rjave barve, zaradi česar to vrsto razkroja imenujemo rjava trohnoba (Gadd, 2001). Za bioremediacijo lesa, zaščitene s pripravki na osnovi bakra (anorganska zaščitna sredstva), uporabljamo glive rjave trohnobe in bakterije (Humar in Pohleven, 2005). Anorganski biocidi so nerazgradljivi, zato jih je potrebno iz lesa izpirati. Izpiranje je možno z izpostavitvijo odpadnega zaščitene lesa glivnim izolatom, ki so odporni na bakrove pripravke. Glive rjave trohnobe izločajo velike količine oksalne kisline, ki ima visoko afiniteto do tvorbe topnih kompleksov s kovinami. Po izpostavitvi lesa glivam lahko takšne komplekse izperemo iz lesa. Razgradnja organskih onesnaževal je mnogo bolj kot z glivami rjave trohnobe raziskana z uporabo gliv bele trohnobe.

2.2.3 Mikoremediacija ksenobiotikov

Glive bele trohnobe so sposobne razgradnje širokega spektra izjemno odpornih organskih onesnaževal, ki so strukturno podobni ligninu. Z glivami bele trohnobe so tako v številnih raziskavah razgradili različna sintetična barvila, klorirane fenole, policiklične aromatske ogljikovodike ter poliklorirane bifenile (Gadd, 2001). Mnogi ksenobiotiki v okolju niso naravno prisotni, zato je ta sposobnost toliko bolj presenetljiva. Nemalokrat so lesne glive edini organizmi, ki so sposobni njihove razgradnje. Sposobnost razgradnje ksenobiotikov z ligninolitčnimi glivami pripisujemo mehanizmu prostih radikalov, ki ga sprožijo ekstracelularne peroksidaze in oksidaze (Pointing, 2001). Za uspešno mineralizacijo glive potrebujejo primarni vir ogljika in primanjkljaj katerega od hranilnih virov (predvsem dušika), ki sproži izražanje ligninolitčnih encimov (Pointing, 2001; Humar in Pohleven,

2005). Z vidika razgradnje onesnaževal so še posebej zanimive LiP, saj imajo v primerjavi z ostalimi peroksidazami visok oksidacijski potencial in je posledično obseg snovi, ki jih lahko oksidirajo, večji (Aust, 1995; Reddy, 1995).

Primernost gliv bele trohnobe za bioremediacijske postopke določajo njihove številne pozitivne lastnosti. Te vključujejo (Reddy, 1995):

- sposobnost mineralizacije širokega spektra toksičnih ksenobiotikov,
- pogosto pojavljanje teh vrst gliv v naravnem okolju,
- zmožnost oksidacije substratov z nizko topnostjo zaradi izločanja ekstracelularnih encimov,
- uspevanje na poceni substratih, ki služijo kot primarni vir ogljika in jih dodamo na onesnaženo mesto,
- aktivacijo ligninolitičnega sistema ob pomanjkanju hranil,
- razraščanje s hifami, kar glivam omogoča, da same kolonizirajo onesnaženo področje in dosežejo tudi tista onesnaževala, ki so drugim organizmom nedosegljiva.

Gliv bele trohnobe pred postopkom bioremediacije ni potrebno vnaprej prilagajati oziroma izpostavljati določenemu onesnaževalu (drugače kot bakterije, ki jih je potrebno predhodno izpostaviti toksični kemikaliji, s čimer se inducira sinteza razgradnih encimov, poleg tega pa je za ta korak potrebna še znatna koncentracija onesnaževala) (Barr in Aust, 1994). Glive tako preprosto gojimo na substratu, ki inducira tvorbo ligninolitičnih encimov (npr. žaganje, slama, koruzni storži) (Aust, 1990). Zaradi tega za mikoremediacijo niso potrebne velike koncentracije onesnaževal, sinteza encimov pa poteka neodvisno od njihove prisotnosti (Bumpus in sod., 1985; Aust, 1990). Ker ligninolitični sistem razgradnje temelji na nespecifičnem mehanizmu prostih radikalov, lahko glive bele trohnobe razgradijo tudi več toksičnih snovi, ki skupaj sestavljajo pesticid, ne le ene.

Glive bele trohnobe so uspešne pri razgradnji toksičnih kemikalij v laboratorijskih kulturah (sterilnih razmerah), nekoliko slabše pa razgrajujejo ksenobiotike v naravnem okolju (de Sousa Fragoeiro, 2005). Za uporabo gliv bele trohnobe v bioremediaciji onesnažene zemlje sta v prvi vrsti potrebni produkcija in aktivnost ligninolitičnih encimov (Rigas in sod., 2007). V okolju izven laboratorija je za uspešno razgradnjo pesticidov potrebna tudi učinkovita rast gliv, na katero med drugim vplivajo interakcije z naravno prisotno

mikrobno združbo. Uspešnost bioremediacije je tako poleg abiotskih dejavnikov - temperature, vlage in razmer v zemlji (pH, količina vode, hranil in kisika), ki se spreminjajo in niso vedno optimalni za rast gliv bele trohnobe ali proizvodnjo ligninolitičnih encimov, odvisna tudi od uspešnosti glivne kolonizacije onesnaženega substrata. Pospeševanje rasti in proizvodnje ligninolitičnih encimov v naravnih okoljih se je izkazalo za precej zahtevno. Dostopnost vode v zemlji je morda eden najpomembnejših dejavnikov pri uspešnosti bioremediacije, saj voda vpliva na preskrbo s kisikom, ta pa na rast gliv in proizvodnjo encimov. Prav tako sta vezanje pesticidov na delce prsti in razporeditev pesticidov v zemlji odvisna od dostopnosti vode.

Čeprav je v znanstvenih krogih že dolgo v veljavi mnenje, da razgradnja ksenobiotikov z glivami bele trohnobe poteka zaradi ligninolitičnih encimov, nekateri avtorji dokazujejo nasprotno. Tako je Jackson s sodelavci (1999) poročal o razgradnji TNT z ne-ligninolitičnim sevom lesne glive *Phanerochaete chrysosporium*. Tudi poskusi razgradnje lindana z uporabo glive *P. chrysosporium* so nakazali neodvisnost postopka od ligninolitičnih encimov (Mougin in sod., 1996) ter izključitev vpletenosti peroksidaz pri mineralizaciji lindana. Namesto tega so avtorji predlagali delovanje monooksigenaze citokrom P450, encimskega sistema, ki ga mnogo organizmov uporablja kot detoksifikacijsko orodje. Bending in sodelavci (2002) so z glivami bele trohnobe v tekočih kulturah razgradili več kot 86% atrazina in terbutilazina ter ugotovili, da med ligninolitično aktivnostjo in stopnjo razgradnje ni povezav. Ugotovitev, kateri encimi so udeleženi pri razgradnji določenega pesticida, bi sicer bila koristna za vzpostavitev najprimernejših pogojev za njihovo proizvodnjo in posledično tudi mikoremediacijo *in situ*. Bolje bi bilo potrebno raziskati tudi produkcijo encimov v zemlji, kjer naj bi potekala bioremediacija, saj se je do sedaj večina raziskav osredotočala na proizvodnjo encimov v tekočih kulturah (de Sousa Fragoeiro, 2005).

2.2.3.1.1 Primeri uspešnih razgradenj lindana z glivami bele trohnobe

Večina raziskav razgradnje organskih onesnaževal z glivami bele trohnobe se je osredotočala na glivo *P. chrysosporium*. Bumpus in sodelavci (1985) so ugotovili, da ta gliva v tekoči kulturi poleg drugih organskih onesnaževal razgrajuje tudi lindan, o samem mehanizmu razgradnje lindana z uporabo gliv pa je malo znanega. Mougin in sodelavci

(1996) so ga deloma razjasnili z identifikacijo njegovih glavnih metabolnih produktov pri razgradnji v tekoči kulturi glive *P. chrysosporium*. Razgradnje lindana z glivo *P. chrysosporium* se v literaturi zelo razlikujejo in znašajo od komaj 4 % (Mougin in sod., 1996) do več kot 90 % (Bumpus in sod., 1985).

Lindan so tako v aerobnih kot anaerobnih razmerah sposobni razgrajevati tudi nekateri mikroorganizmi, ki so prisotni v zemlji. Do mineralizacije ponavadi pride le v aerobnih pogojih (Pointing, 2001; Phillips in sod., 2005). V postopkih bioremediacije za komercialne namene se danes uporabljajo predvsem prokariotski organizmi. V zadnjem času se poskusno uvaja tudi uporaba gliv bele trohnobe, pri tem pa je uporaba nekaterih vrst že patentirana. O *in situ* bioremediaciji lindana obstaja malo podatkov, saj večina študij temelji na razgradnji lindana v laboratorijskem merilu in ne na pilotni ali industrijski ravni. Uporabo ligninolitičnih gliv je v svoj program remediacije prsti vključilo zelo malo podjetij, med njimi pa sta EarthFax Development Corp. v ZDA in nemški Gebruder Huber Bodenrecycling (de Sousa Fragoeiro, 2005). Po podatkih podjetja EarthFax je gliva *P. ostreatus* znatno zmanjšala koncentracijo lindana v kontaminirani prsti. V postopku so uporabili 750 ton izkopane kontaminirane zemlje, ki so ji dodali 16 % (w/w) glivnega inokuluma (žaganje in lupine bombažnih semen, kolonizirano s *P. ostreatus*), povprečna koncentracija lindana pa je bila 21 mg/l. Po 24 mesecih se je koncentracija lindana zmanjšala za skoraj 97 % na 0,57 mg/l (de Sousa Fragoeiro, 2005; EarthFax Demonstrates ..., 2008).

2.2.4 Uporabnost biotehnoloških postopkov za bioremediacijo v industrijskem merilu

Glive bele trohnobe so sposobne razgrajevati širok nabor lignoceluloznih substratov. Ta lastnost je izredno zanimiva za razvoj okolju prijaznih biotehnoloških procesov z možnimi aplikacijami v proizvodnji hrane, medicini in omenjenih postopkih bioremediacije (Rigas in sod., 2007). Ligninolitične encime lahko v primernih razmerah gojenja gliv tudi proizvajamo in jih uporabljamo v nekaterih biotehnoloških procesih. Večje količine encimov lahko pridobimo z uporabo tehnologije rekombinantne DNA. Ti encimi imajo široko možnost uporabe tako v papirni in tekstilni industriji kot tudi v lesarstvu (Mai in sod., 2004; Humar in Pohleven, 2005). Biotehnološki postopki uporabe ligninolitičnih gliv ali njihovih encimov na področju bioremediacije onesnaževal v industrijskih procesih so

usmerjeni v razgradnjo na mestu njihovega nastanka ali uporabe. Sposobnost razgradnje lignina daje možnost uporabe lesnih gliv ali njihovih encimov pri pretvorbi lignoceluloznih materialov v kemikalije in goriva (Reddy, 1995) ter za predelavo kmetijskih odpadkov v krmo.

Učinkovitejšo fitoremediacijo organskih ksenobiotikov lahko dosežemo z gensko spremenjenimi rastlinami, ki jim vstavimo gene za razgradnjo ksenobiotikov. Tako so raziskovalci že ustvarili transgeni tobak, ki ima vstavljene gene za lakazo iz glive *Trametes versicolor* (Abhilash in sod., 2009). Encimi se izločajo v rizosfero, kjer nato poteka razgradnja pentaklorofenolov (PCP) in bisfenola A. Podobno so transformirali tudi navadni repnjakovec, ki izraža gene MnP iz *T. versicolor* ter je učinkovit pri zniževanju količine PCP v zemlji (Sonoki in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VRSTE GLIV

Uporabili smo pet različnih vrst gliv, katerih kulture micelija so bile vzete iz Zbirke industrijskih organizmov (ZIM), ki jo hranimo na Katedri za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. V preglednici 3 so podane vrste oziroma sevi gliv, ki smo jih uporabili pri mikoremediaciji lindana.

Preglednica 3: Vrste oziroma sevi testiranih gliv.

Latinsko ime	Slovensko ime	Vir	Okrajšava	Depozitna oznaka	Trohnoba
<i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát	pisana ploskocevka	ZIM	Tv6	1998, Makole	bela
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers. ex Fr.) Murrill	tramovka	ZIM	Gt2	ZIM L018	rjava
<i>Hypoxylon fragiforme</i> (Pers. ex Fr.) Kickx	ogljena kroglica	ZIM	Hf	ZIM L108	bela
<i>Chondrostereum purpureum</i> (Pers. ex Fr.) Pouzar	škrlatnordeča slojevka	ZIM	Chp4	ZIM L007	bela
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. ex Fr.) Kummer	bukov ostrigar	ZIM	Plo5	1998, Škofljica	bela

3.2 PRIPRAVA GOJIŠČ

Za raziskave mikoremediacije lindana smo uporabili tekoč medij po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986), modificiran za potrebe mikoremediacije (Vidic, 2008) z dodatkom 2 mM MnSO₄ ter vrednostjo pH 4,5 (preglednica 4). Kemikalije, ki smo jih uporabili za pripravo gojišč, so bile kupljene pri proizvajalcih Merck, Carlo Erba ali Fluka. Kemikalije so imele čistost »pro analysis« in jih pred uporabo nismo dodatno prečiščevali.

Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča po Hadarju, modificiranega za potrebe mikoremediacije.

Sestavina	Količina
glukoza	20 g
asparagin	0,65 g
kvasni ekstrakt	0,5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,338 g
destilirana voda	do 1 l

Tristomililitrske erlenmajerice smo napolnili s 50 ml tekočega gojišča po Hadarju, modificiranega za potrebe mikoremediacije, ter jih nato sterilizirali v avtoklavu (30 min, 121 °C, 150 kPa).

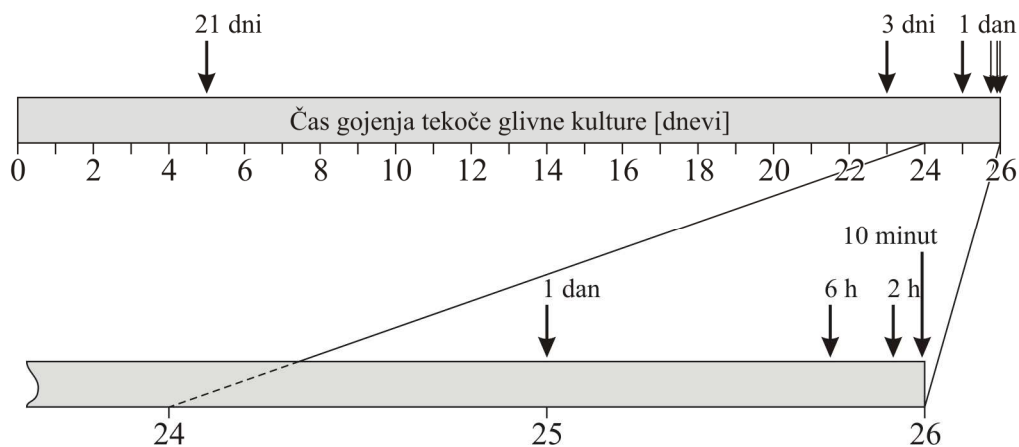
3.3 INOKULACIJA IN GOJENJE GLIV

Vse postopke gojenja gliv smo izvajali v sterilnih razmerah ob upoštevanju načel sterilne tehnike. S tem smo v gojiščih zagotovili prisotnost le ene kulture, katere razgradne sposobnosti lindana smo proučevali. Inokulat za tekoča gojišča smo vzgojili na krompirjevem dekstroznem agarju (PDA, angl. potato dextrose agar) (DIFCO Laboratories, ZDA) v steklenih petrijevkah. Iz trdnega gojišča smo s plutovrtom (premer 9 mm) izrezali vcepke iz sedem dni starega micelija. Ohlajena sterilizirana tekoča gojišča smo v brezprašni komori sterilno inokulirali s po tremi vcepki micelija iz gojišča PDA. Tekoče kulture gliv smo postavili na horizontalni stresalnik, kjer smo jih v temi gojili 26 dni (100 min^{-1} , 25 °C, 60 % RH).

3.4 DODAJANJE LINDANA IN VERATRIL ALKOHOLA

Raztopino lindana smo pripravili v acetonu. Uporabili smo 97 % gama izomer heksaklorocikloheksana (Merck). Tekočim kulturam gliv smo 100 µl raztopine lindana izpostavili za 21 dni, tri dni, en dan, šest ur, dve uri ali deset minut (lindan smo tekočim kulturam gliv dodali po petih dneh, 23 dneh, 25 dneh ali 26 dneh gojenja) (slika 4). Po dodatku raztopine lindana tekočim kulturam gliv je bila koncentracija lindana v gojišču 30 µM. Pri negativnih kontrolah smo namesto lindana tekočim kulturam gliv štiri dni po inokulaciji dodali 100 µl acetona. Štiri dni pred dodatkom lindana smo v gojišče sterilno dodali 15,1 µl veratril alkohola (VA, 3,4-dimetoksibenzil alkohol; končna koncentracija v gojišču 2 mM). Tekočim kulturam gliv, katerim je bil lindan izpostavljen 21 dni, ter vsem kontrolam smo veratril alkohol dodali ob inokulaciji oziroma ob dodatku lindana ali acetona. Pozitivne kontrole smo pripravili sočasno z gojenjem tekočih kultur gliv vsake vrste. Zanje smo uporabili tekoče gojišče, ki ga nismo inokulirali z micelijem, ter smo mu za deset minut oziroma 21 dni dodali 100 µl raztopine lindana. Vse poskuse smo izvajali v šestih ponovitvah. Iz treh ponovitev smo lindan ekstrahirali iz filtratov, iz preostalih treh ponovitev pa smo lindan ekstrahirali iz homogenatov tekočih glivnih kultur.

Pri tekočih kulturah gliv *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *P. ostreatus* smo poleg omenjenih pozitivnih kontrol pripravili tudi po dve ponovitvi pozitivnih kontrol, ki smo jim lindan dodali za en dan oziroma tri dni.



Slika 4: Dodajanje lindana tekočim glivnim kulturam. Puščice označujejo dodatek lindana, čas izpostavitve lindana tekočim glivnim kulturam je zapisan nad puščicami.

3.5 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO S PLINSKO KROMATOGRAFIJO

Lindan smo določali z uporabo plinske kromatografije (GC; angl. gas chromatography). Pri tej analizi lindan vnesemo v sistem v organskem topilu (heksan). Lindan smo iz tekočih glivnih kultur in kontrol ekstrahirali na dva načina: iz polovice paralelnih ponovitev tekočih kultur gliv, ki jim je bil lindan izpostavljen za enak čas, smo ga ekstrahirali iz filtratov, iz druge polovice pa iz homogenatov tekočih glivnih kultur.

3.5.1 Ekstrakcija lindana iz filtratov tekočih kultur gliv

Po koncu izpostavitve lindana delovanju kultur gliv smo v erlenmajerice z gojiščem in kulturo gliv dodali 50 ml heksana ter jih tesno prekrili z aluminijasto folijo. Vsebino erlenmajerice smo nato dobro premešali (stresali 3 min). Biomaso gliv smo od mešanice heksana in gojišča ločili s filtracijo skozi grobi filtrirni papir (Sartorius, Grade 388, 84 g/m²) z uporabo vodne črpalke. Po filtraciji smo pri nekaterih vzorcih v filtratu dobili jasno ločeni spodnjo vodno in zgornjo nepolaro heksansko fazo, pri čemer smo zgornjo fazo previdno odpipetirali v čisto stekleno epruveto. Pri nekaterih vzorcih pa smo po filtraciji dobili spenjen filtrat, kjer dve fazi nista bili razvidni. Takšne filtrate smo razdelili v dve 50 mililitrski plastični centrifugirki in jih centrifugirali (3 min, 4000 obratov min⁻¹).

Po centrifugiranju sta se fazi ločili, zgornjo nepolarno fazo pa smo pazljivo odpipetirali v čisto epruveto. Epruvetam z nepolarno fazo smo za popolno odstranitev vode dodali Na_2SO_4 in jih zaprli s plutovinastimi zamaški, ki smo jih ovili v aluminijasto folijo. Tako pripravljene vzorce smo shranili v zamrzovalni skrinji ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

3.5.2 Ekstrakcija lindana iz homogenatov tekočih kultur gliv

Vsebino erlenmajeric smo po koncu izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv porazdelili v tri 50 mililitrske centrifugirke. V prazne erlenmajerice smo dodali 50 ml heksana in jih tesno prekrili z aluminijasto folijo ter dobro premešali (stresali 30 s). Tako smo ekstrahirali tudi lindan, ki bi se morda adsorbiral na steno steklenic. Enak volumen heksana smo nato iz erlenmajeric prelili v vsako izmed treh centrifugirk s tekočo glivno kulturo. Vsebino centrifugirk smo homogenizirali z napravo Ika T25 Digital Ultra-Turrax (11000 obratov min^{-1} , 30 s). Po homogenizaciji smo nepolarno fazo z ekstrahiranim lindanom ločili od polarne faze s centrifugiranjem (centrifuga Tehtnica LC 321, Tehtnica Železniki, Slovenija) (5 min, 4000 obratov min^{-1}). Zgornjo nepolarno fazo smo pazljivo ločili od spodnje polarne faze s Pasteurjevo pipeto in jo odpipetirali v stekleno epruveto. Ekstraktom smo za popolno odstranitev vode dodali Na_2SO_4 . Vzorce smo do analize shranili v zamrzovalni skrinji ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

V pozitivnih kontrolah, pripravljenih sočasno z gojenjem tekočih kultur glive *H. fragiforme*, kjer je bil lindan v tekočem gojišču prisoten deset minut, in v tekočih kulturah glive *H. fragiforme*, ki jim je bil lindan izpostavljen za deset minut, smo lindan določali tudi na filtrirani biomasi in filtrirnem papirčku. Oboje smo namakali v 50 ml heksana nekaj minut in nato neredčen vzorec heksana analizirali s plinsko kromatografijo.

3.6 DOLOČITEV LINDANA S PLINSKO KROMATOGRFIJO

Prisotnost lindana smo določali s plinsko kromatografijo (GC). Uporabili smo plinski kromatograf (Hewlett Packard 6890 Series, ZDA) z detektorjem za zajetje elektronov ECD (angl. electron capture detector). Kromatografski pogoji so podani v preglednici 5, temperaturni program za GC-ECD analizo pa v preglednici 6.

Preglednica 5: Kromatografski pogoji za določanje lindana z GC-ECD.

Injektorski del	temperatura injektorja: 250°C volumen vbrizganega vzorca: 1 µl način vbrizganja: "splitless"
Kolona	kapilarna kolona RTX-5MS dimenzije: dolžina 60 m, notranji premer 250 µm stacionarna faza: 5% difenil/95% dimetilpolisiloksan, debelina 0,50 µm nosilni plin: dušik, pretok: 2ml/min
Detektorski del	detektor ECD temperatura detektorja: 320°C "make up" plin: dušik, pretok 50 ml/min

Preglednica 6: Temperaturni program za analizo GC-ECD.

Začetna temperatura [°C]	Gradient [°C/min]	Zadrževalni čas [min]	Končna temperatura [°C]
70	-	1	70
70	30	-	300
300	-	5	300

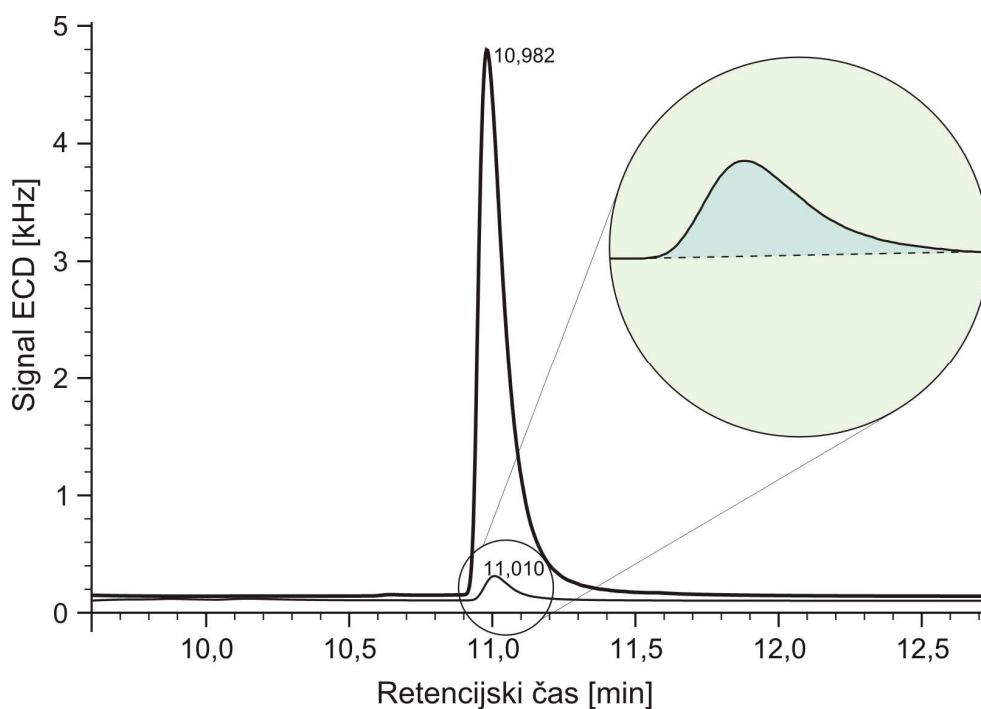
Lindan smo v vzorcih identificirali s primerjavo retencijskih časov kromatografskih vrhov vzorcev in standarda. Na kolono smo nanašali desetkratne razredčine ekstraktov (redčenje s heksanom). Rezultati so povprečja analiz treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami. Vsak ekstrakt smo v GC vbrizgali dvakrat. Ploščina kromatografskega vrha je sorazmerna s količino lindana v vzorcu.

3.6.1 Določanje razgradnje lindana

Deleže razgradnje lindana smo kvantitativno ovrednotili tako, da smo povprečne ploščine kromatografskih vrhov za lindan iz vzorcev tekočih glivnih kultur primerjali s povprečnimi ploščinami kromatografskih vrhov lindana pripadajočih pozitivnih kontrol, ki niso bile inokulirane z micelijem kultur gliv. S tem smo dejansko primerjali povprečne količine lindana v vzorcih. Pri kulturah gliv *T. versicolor* in *G. trabeum*, ki jim je bil lindan izpostavljen dve uri, šest ur, en dan in tri dni, smo povprečne količine lindana (sorazmerne ploščinam kromatografskih vrhov lindana) primerjali z izračunanimi količinami lindana v

pripadajočih pozitivnih kontrolah. Te smo izračunali z linearno interpolacijo povprečne količine lindana v pozitivnih kontrolah, v katerih je bil lindan prisoten deset minut oziroma 21 dni. Pri ostalih treh vrstah gliv smo delež razgradnje lindana izračunali s primerjanjem povprečnih količin lindana pri vzorcih tekočih glivnih kultur s povprečno količino lindana v vseh pozitivnih kontrolah.

Na sliki 5 je prikazana primerjava kromatografskih vrhov vzorca iz kulture glive *P. ostreatus*, v katerem je bil lindan prisoten 21 dni, in kontrole, v kateri je bil lindan v tekočem gojišču prisoten 21 dni. Oba vzorca sta bila pripravljena z ekstrakcijo iz homogenata tekočih kultur. Retencijska časa lindana obeh vzorcev sta prikazana poleg posameznih kromatografskih vrhov. V izseku je prikazano določanje ploščine kromatografskega vrha lindana. Program izračuna ploščino med črtkano črto, ki jo sami postavimo na začetek in konec kromatografskega vrha ter ju tako povežemo, in neprekinjeno črto (osenčeno na izseku na sliki 5).



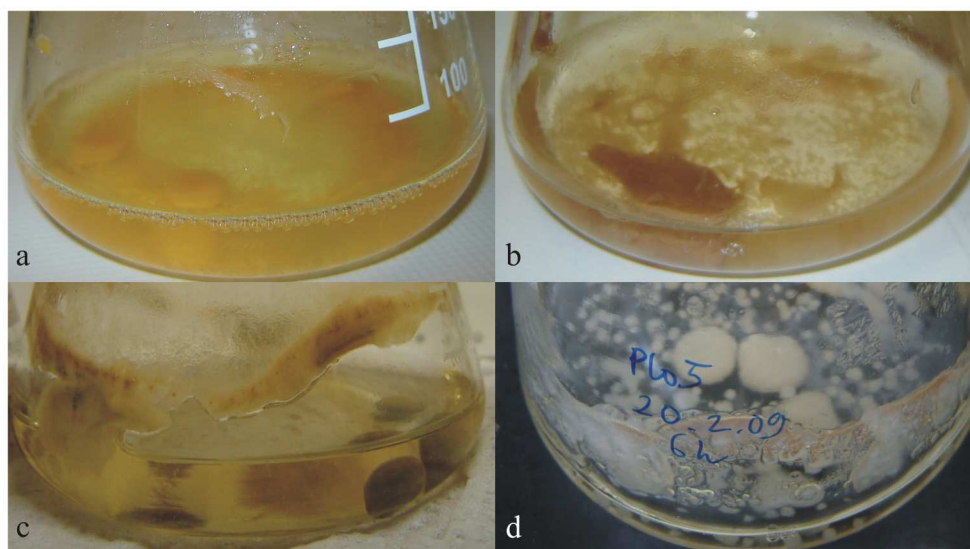
Slika 5: Določitev lindana z GC: primerjava kromatografskih vrhov lindana, prisotnega 21 dni v tekočem gojišču (debela črta) in v tekoči kulturi glive *P. ostreatus* (tanka črta).

4 REZULTATI

4.1 RAST GLIV V TEKOČEM GOJIŠČU

Pri vseh vrstah tekočih kultur gliv, razen pri glivi *C. purpureum*, se je micelij po petih dneh gojenja že nekoliko namnožil. Zato smo ob tem času prvim tekočim kulturam gliv dodali lindan za 21 dni, negativnim kontrolam pa aceton. Primerjava z negativnimi kontrolami je potrdila, da dodatek lindana tekočim kulturam gliv ni vidno upočasnil rasti micelija ali kako drugače vplival na rast.

Med gojenjem tekočih kultur glive *T. versicolor* se je nekaj kultur po barvi razlikovalo od preostalih, vendar gojišče ni bilo motno, kot je navadno ob bakterijski okužbi, niti ni imelo zanjo značilnega vonja. Podoben pojav smo zasledili tudi pri gojenju tekočih kultur gliv *P. ostreatus* in *H. fragiforme* (slika 6), kjer se je barva gojišč razlikovala od blede rumene do svetlo rjave, predvsem v slednjem primeru pa se je ponekod pojavljala tudi motnost gojišč. Najmanj razlik med vzorci smo opazili v primeru gojenja tekočih kultur glive *G. trabeum*, kjer je bila barva gojišč pri vseh kulturah svetlo rjave barve, motnosti pa nismo opazili (slika 6).



Slika 6: Primeri tekočih kultur gliv *G. trabeum* (a), *H. fragiforme* (b), *C. purpureum* (c) in *P. ostreatus* (d).

Rast tekoče kulture glive *C. purpureum* je bila v primerjavi z ostalimi vrstami gliv zelo počasna, saj je bilo pet dni po inokulaciji v tekočem gojišču izredno malo namnožene

kulture, ki smo jo opazili šele ob pozornem opazovanju. Po desetih dneh gojenja se je micelij bolj namnožil, vendar ga je bilo sprva več na stenah erlenmajeric kot v samem gojišču, do konca gojenja pa se je razrasel tudi v njem. Rast micelija na trdnem gojišču PDA ni bila upočasnjena. V tekočem gojišču je bil micelij svetle barve, v nekaterih primerih pa temnejše zelene barve (slika 6).

Videz tekočih kultur se med vzorci ni bistveno razlikoval, razen pri vrsti *C. purpureum*, kjer je micelij rasel v obliki kroglic zelo različnih velikosti, pojavljale pa so se tudi kulture, ki so imele videz kroglic z »lovkami«. Takšne vzorce smo označili in po analizi z GC ugotovili, da se rezultati analize niso razlikovali od rezultatov preostalih vzorcev.

Prirastkov biomase nismo določali in smo jih spremljali samo z vizualnim opazovanjem tekočih kultur gliv. Največji prirast biomase smo opazili v tekočih kulturah gliv *T. versicolor* in *G. trabeum*, nekoliko manjši pa je bil prirast gliv preostalih vrst. Različne so bile tudi količine biomase v kulturah gliv iste vrste, saj smo v nekaterih erlenmajericah opazili več kulture kot v drugih.

4.2 RAZGRADNJA LINDANA S KULTURAMI GLIV

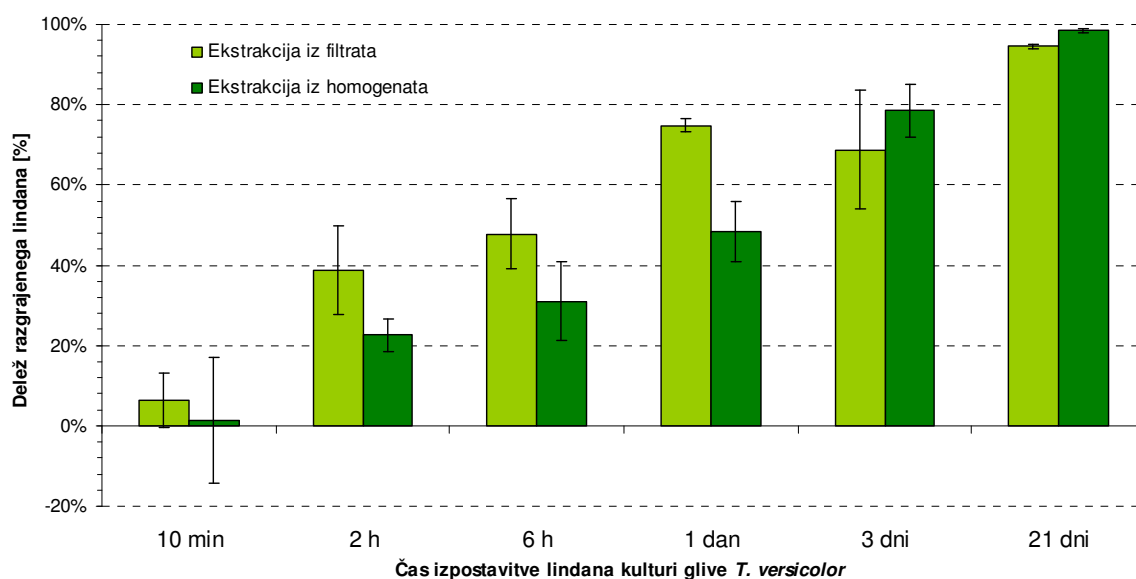
Na slikah 7 do 12 so s svetlo zeleno barvo označeni povprečni deleži razgrajenega lindana v vzorcih tekočih glivnih kultur, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo iz filtratov tekočih glivnih kultur. S temno zeleno barvo so označeni povprečni rezultati vzorcev, pripravljenih z ekstrakcijo iz homogenatov tekočih kultur. Delež razgrajenega lindana je izračunan kot povprečje iz rezultatov analiz treh paralelnih vzorcev. Vsak vzorec smo v GC vbrizgali dvakrat.

4.2.1 *Trametes versicolor*

Razgradnja lindana v desetih minutah je bila izjemno majhna ne glede na načini ekstrakcije lindana (slika 7), pripadajoči standardni odkloni pa so bili večji od samih vrednosti razgradenj. Deleži razgrajenega lindana po dveh ali šestih urah izpostavitve lindana tekočim kulturam glive *T. versicolor* so bili precej majhni in se med seboj niso veliko razlikovali. Večjo razgradnjo lindana smo v teh vzorcih določili po ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih kultur glive.

Po enem dnevu delovanja kultur glive na onesnaževalo smo iz tekočih kultur glive *T. versicolor* iz filtratov ekstrahirali 25 % povprečne kontrolne vrednosti lindana. Delež razgrajenega lindana po enem dnevu izpostavljenosti kulturam glive je bil po ekstrakciji lindana iz homogenatov 48 %. Po treh dneh razgradnje lindana s kulturami te glive se je vsebnost onesnaževala, merjena po ekstrakciji lindana iz filtratov, zmanjšala na 31 % povprečne kontrolne vrednosti (69 % razgradnja), po ekstrakciji iz homogenatov tekočih glivnih kultur pa na 21 % povprečne kontrolne vrednosti (79 % razgradnja). Če upoštevamo velik standardni odklon, se razgradnji lindana po enem in treh dneh izpostavitve kulturam glive nista bistveno razlikovali.

Največjo razgradnjo lindana v tekočih kulturah glive *T. versicolor* smo določili po 21 dneh izpostavitve onesnaževala, tako pri ekstrakcijah lindana iz filtratov kot iz homogenatov tekočih kultur. Povprečna razgradnja lindana je pri ekstrakcijah iz filtratov znašala 95 %, pri ekstrakcijah iz homogenatov tekočih kultur glive pa 98 %.



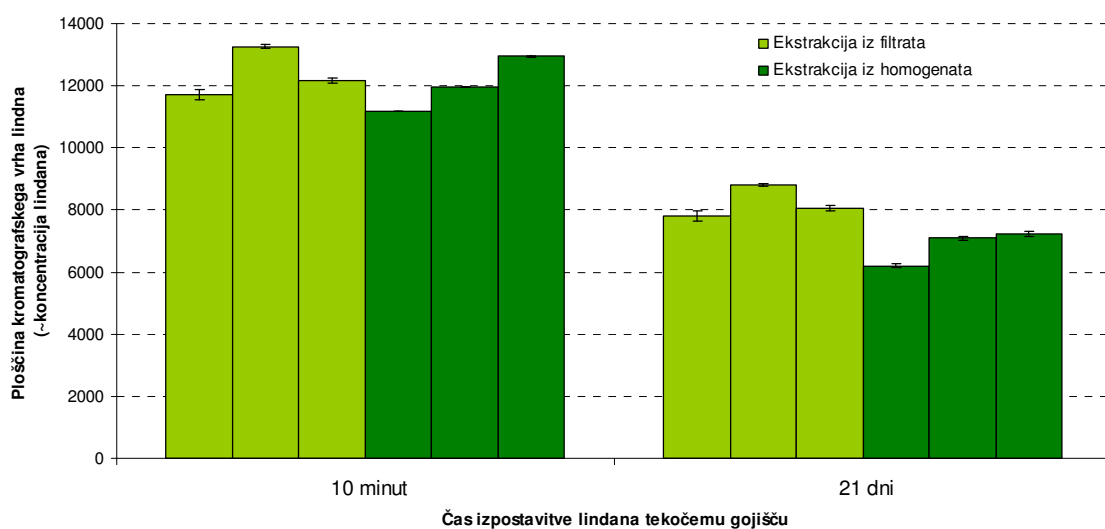
Slika 7: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive *T. versicolor*.

Največja razlika v količini izmerjenega lindana glede na način ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur je opazna pri vzorcih, kjer je bil lindan v tekočih kulturah glive prisoten en dan (slika 7). Najmanjša razlika v vrednostih izmerjenega lindana glede na

način ekstrakcije pa je bila pri najdaljši izpostavitvi lindana tekočim kulturam glive (21 dni).

4.2.2 *Gloeophyllum trabeum*

Pri poskusu razgradnje lindana z glivama *G. trabeum* in *T. versicolor* smo opazili, da se je količina lindana v pozitivnih kontrolah bistveno razlikovala, če je bilo onesnaževalo v tekočem hranilnem mediju brez kultur glive inkubirano deset minut ali 21 dni. Po 21 dneh izpostavitve smo v tekočem gojišču določili precej manj lindana kot po desetih minutah (slika 8). Ta pojav smo opazili pri obeh načinih ekstrakcije lindana iz tekočega gojišča. Zato smo po dveh urah, šestih urah, enem dnevu in treh dneh delovanja gliv na onesnaževalo pri izračunu razgradnje lindana s kulturami gliv *G. trabeum* in *T. versicolor* izhodiščno količino lindana izračunali z linearno interpolacijo obeh dejansko izmerjenih pozitivnih kontrol, ko je bil lindan v gojišču inkubiran deset minut ali 21 dni.



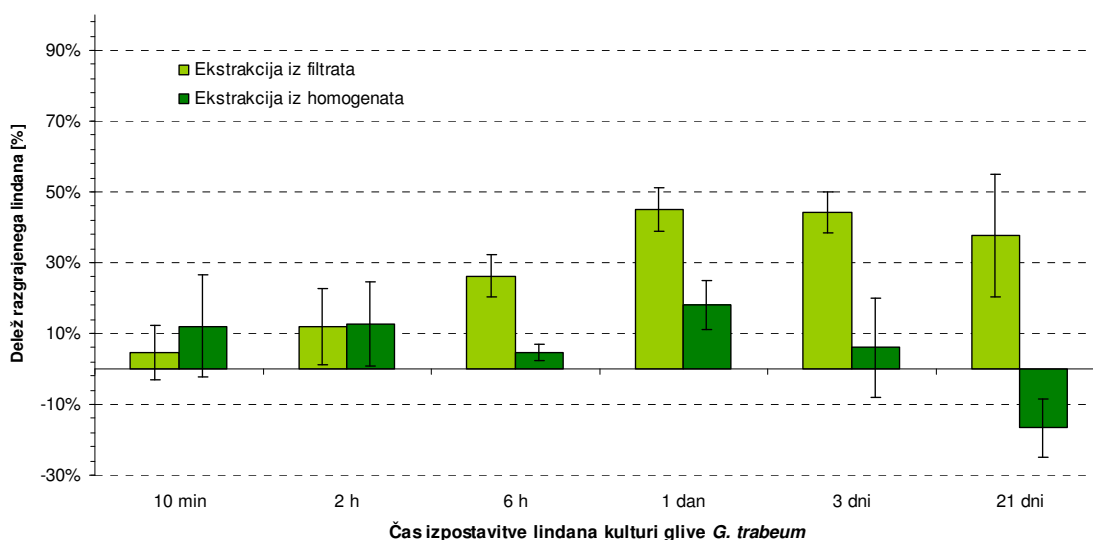
Slika 8: Povprečna količina lindana v pozitivnih kontrolah, uporabljenih za določanje razgradnje lindana s kulturo glive *G. trabeum*.

Razgradnja lindana v tekočih kulturah glive *G. trabeum* je bila v vseh primerih manjša od 50 % (slika 9). Povprečni deleži razgrajenega lindana po desetih minutah, dveh urah in šestih urah izpostavitve lindana tekočim kulturam glive so bili z obema načinoma ekstrakcije lindana manjši od 30 %, z upoštevanjem standardnih odklonov pa tudi približno

enako veliki, z nekoliko bolj izstopajočo razgradnjo, določeno iz filtratov po šestih urah izpostavitve lindana glivi *G. trabeum*.

Po enem dnevu izpostavitve je bila povprečna razgradnja lindana 45 %, po ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih kultur pa je bil po treh dneh povprečni delež razgrajenega lindana 44 %. Deleža razgrajenega lindana po enem dnevu in treh dneh delovanja glive na onesnaževalo sta bila po ekstrakciji lindana iz homogenatov precej manjša. Po enem dnevu izpostavitve lindana glivi je bila povprečna razgradnja lindana po ekstrakciji lindana iz homogenatov sicer največja in je znašala 18 %. Po treh dneh izpostavitve glivi je delež razgrajenega lindana znašal komaj 6 %. Z upoštevanjem standardnih odklonov sta obe razgradnji primerljivi s povprečno razgradnjo po 21 dneh izpostavitve lindana kulturam glive *G. trabeum*. Ta je pri ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih kultur znašala 38 %, pri ekstrakciji iz homogenatov pa je bila povprečna količina razgrajenega lindana negativna, kar pomeni, da je bila količina lindana v teh vzorcih navidezno večja kot povprečna količina lindana v pripadajočih pozitivnih kontrolah.

Razen pri vzorcih, kjer je bil lindan tekočim kulturam glive *G. trabeum* izpostavljen deset minut, so razgradnje lindana večje pri vzorcih, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur.



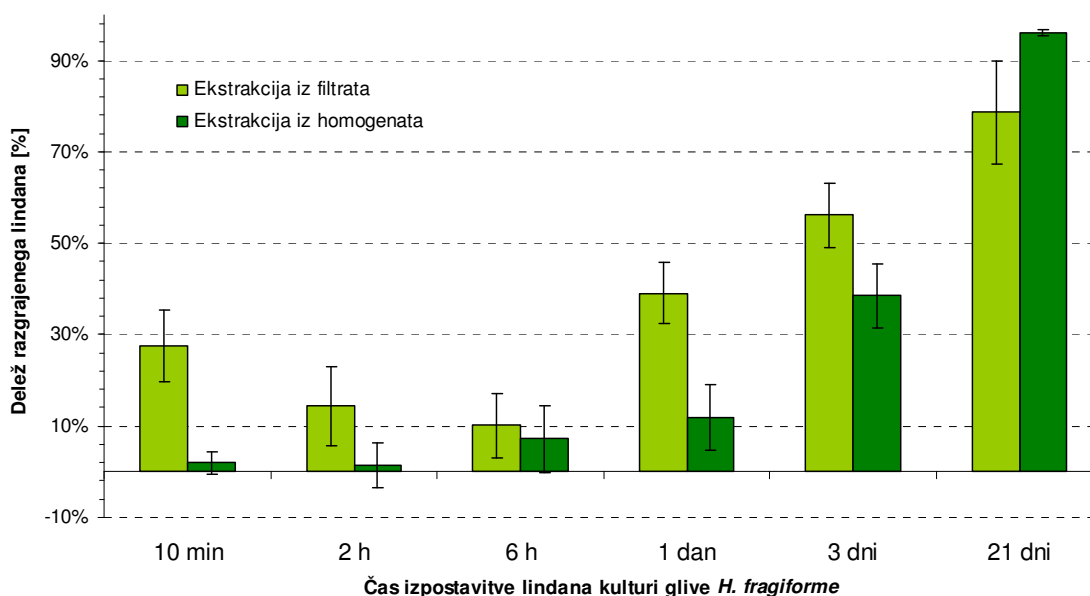
Slika 9: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturam glive *G. trabeum*.

4.2.3 *Hypoxylon fragiforme*

Standardni odkloni določenih razgradenj lindana v tekočih kulturah glive *H. fragiforme*, kjer je bil lindan prisoten deset minut ali dve uri, so bili precej veliki, povprečne razgradnje pa razmeroma majhne (slika 10). Po desetih minutah delovanja glive na lindan je bila povprečna razgradnja lindana v filtratih tekočih glivnih kultur večja kot po dveh ali šestih urah izpostavitve lindana kulturi glivi. Povprečni razgradnji lindana po šestih urah izpostavljenosti kulturam glive sta bili 10 % po ekstrakciji iz filtratov in 7 % po ekstrakciji iz homogenatov tekočih kultur.

Povprečna razgradnja lindana je po enem dnevu delovanja glive na onesnaževalo z ekstrakcijo iz filtratov znašala 39 %, medtem ko je bil povprečni delež razgrajenega lindana z ekstrakcijo iz homogenatov 12 %. Povprečna deleža razgrajenega lindana po treh dneh izpostavitve onesnaževala kulturam glive *H. fragiforme* sta znašala pri ekstraktih iz filtratov 56 % ter pri ekstraktih iz homogenatov 39 %.

Največjo povprečno razgradnjo lindana smo določili po 21 dneh prisotnosti lindana v tekočih kulturah glive. Z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih kultur je bila povprečna razgradnja 79 %, z ekstrakcijo lindana iz homogenatov pa 96 %.



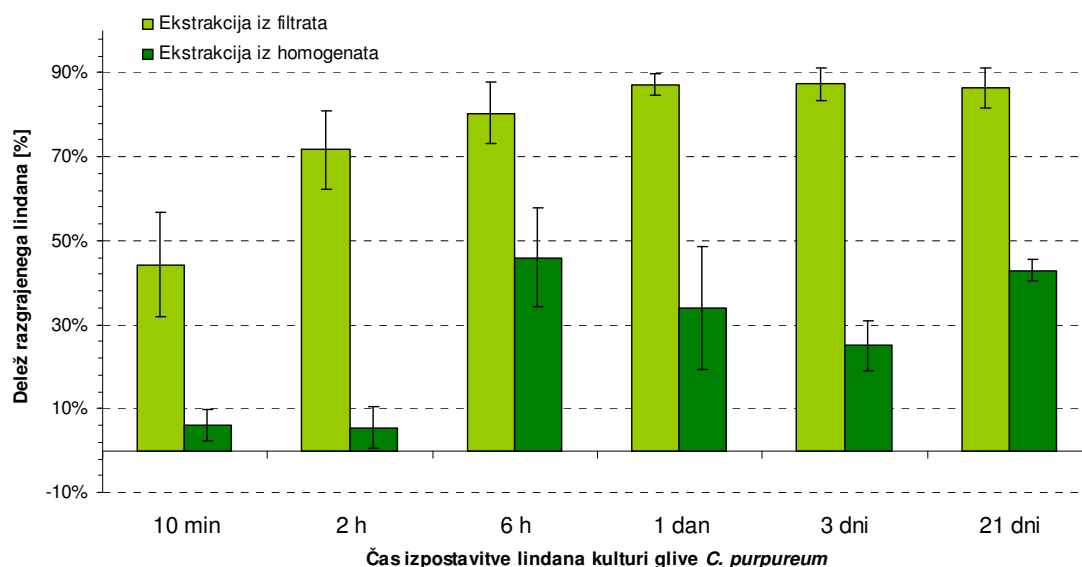
Slika 10: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive *H. fragiforme*.

V heksanu, kjer smo namakali biomaso, ki je po filtraciji ostala na filtrirnem papirčku, in filtrirne papirčke iz pozitivnih kontrol in tekočih kultur glive *H. fragiforme*, v katerih je bil lindan v obeh primerih prisoten deset minut, smo določili izjemno nizke količine lindana (manj kot 1 % količine lindana v enakih vzorcih, pripravljenih s filtracijo tekočih kultur glive *H. fragiforme*).

4.2.4 *Chondrostereum purpureum*

Povprečne razgradnje lindana v tekočih kulturah glive *C. purpureum* so se pri vseh vzorcih znatno razlikovale glede na način ekstrakcije lindana (slika 11). V vseh primerih je bil povprečni delež razgrajenega lindana večji pri vzorcih, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo iz filtratov tekočih glivnih kultur. Že po desetih minutah izpostavljenosti lindana tekočim kulturam glive smo tako določili visoko povprečno razgradnjo, ki je znašala 44 %. Po dveh urah izpostavitve onesnaževala kulturam glive smo z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur povprečno določili 72 % razgradnjo. Po šestih urah izpostavitve lindana je kultura glive *C. purpureum* povprečno razgradila 80 % lindana. Po enem dnevu in po treh dneh delovanja glive na lindan je kultura glive v obeh primerih povprečno razgradila 87 % lindana. Po 21 dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam glive *C. purpureum* je povprečna vrednost razgradnje lindana znašala 86 %.

Pri ekstrakciji lindana iz homogenatov tekočih kultur so bili povprečni deleži razgrajenega lindana manjši. Po desetih minutah delovanja kulture glive je bila povprečna razgradnja 6 % , po dveh urah pa 5 % (slika 11). Največjo povprečno razgradnjo lindana smo s tem načinom ekstrakcije določili po šestih urah izpostavitve kulturi glive (46 %). Po enem dnevu izpostavitve je bila razgradnja 34 %, po treh dneh izpostavitve lindana kulturi glive *C. purpureum* pa 25 %. Po 21 dneh prisotnosti lindana v tekočih kulturah glive je bila povprečna razgradnja 43 %.



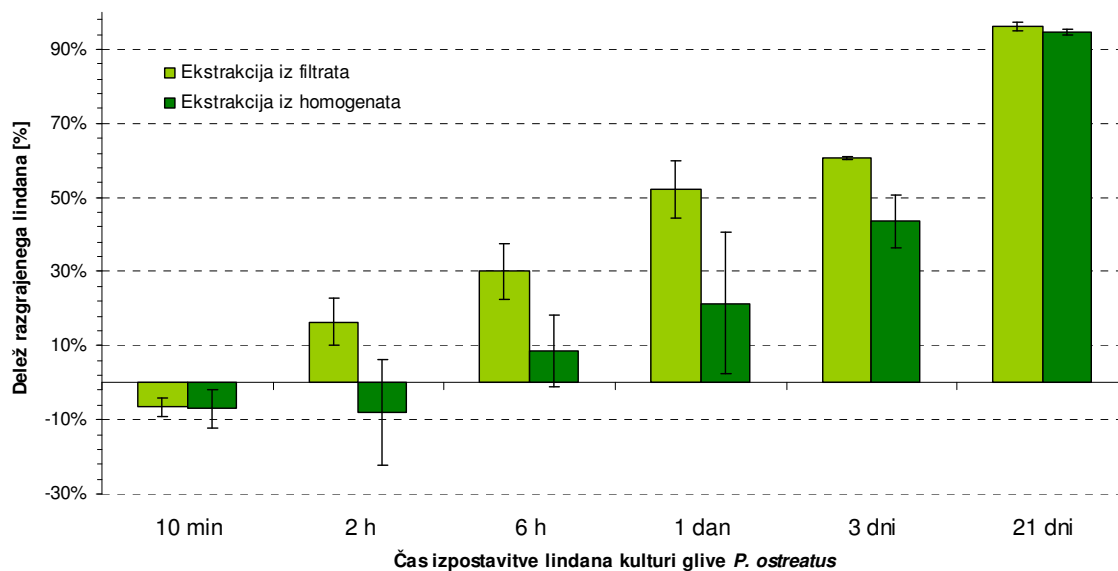
Slika 11: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive *C. purpureum*.

4.2.5 *Pleurotus ostreatus*

Z ekstrakcijo iz homogenatov po desetih minutah izpostavitve lindana tekočim kulturam glive smo v vzorcih povprečno določili več lindana kot povprečno v pozitivnih kontrolah (slika 12). Podobne rezultate smo dobili po dveh urah prisotnosti lindana v tekočih kulturah glive *P. ostreatus* z obema načinoma ekstrakcije. Po dveh urah delovanja kulture glive na onesnaževalo smo razgradnjo lindana določili le pri vzorcih, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo iz filtratov tekočih kultur glive, razgrajenega pa je bilo povprečno 15 % lindana. Po šestih urah izpostavljenosti lindana kulturi glive je bila povprečna razgradnja lindana 30 % v filtratih in precej manjša v homogenatih tekočih glivnih kultur (9 %).

Povprečni delež razgrajenega lindana po enem dnevu izpostavitve onesnaževala kulturi glive je bil pri ekstraktih iz filtratov 52 %, s homogenizacijo vzorcev pa smo v ekstraktih določili 21 % povprečni delež razgrajenega lindana s precej velikim pripadajočim standardnim odklonom ($21 \% \pm 19 \%$). Po treh dneh delovanja je kultura glive *P. ostreatus* povprečno razgradila več lindana, saj je razgradnja pri filtratih znašala 61 % in pri homogenatih 44 %. Kot pri drugih vrstah smo tudi v tekočih kulturah glive *P. ostreatus* najmanj lindana v vzorcih določili po 21 dneh izpostavitve lindana kulturi glive. Po

ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih kultur je bila povprečna razgradnja 96 %, z ekstrakcijo iz homogenatov pa smo povprečno določili 95 % delež razgrajenega lindana.



Slika 12: Povprečne razgradnje lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturi glive *P. ostreatus*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Gojenje kultur gliv v tekočem mediju

Za ugotavljanje zmožnosti biorazgradnje lindana smo izbrane vrste lesnih gliv gojili v tekočem mediju po Hadarju, ki je bil modificiran za potrebe bioremediacije in se od osnovnega medija po Hadarju razlikuje po dodatku 2 mM MnSO₄ in 2 mM veratril alkohola (VA) ter vrednosti pH. Oksidiran encim MnP namreč oksidira Mn(II) v Mn(III), slednji pa nato oksidira lindan. Zato za uspešno razgradnjo lindana v gojišču potrebujemo Mn(II) ione. Veratril alkohol je sekundarni metabolit glive in ščiti LiP pred prekomerno oksidacijo s peroksidom. Glive ga proizvajajo, ko nastopi pomanjkanje hranil, posebej dušika (Faison in sod., 1986). Poleg tega VA inducira izražanje ligninolitičnih encimov (Faison in Kirk, 1985; Faison in sod., 1986; Jaouani in sod., 2006), zaradi česar smo ga dodali v gojišče nekaj dni pred dodatkom lindana. Tako smo sprožili nastanek ligninolitičnih encimov. Vrednost pH gojišča smo uravnali na 4,5, saj je ta vrednost ustrezna za gojenje izbranih vrst gliv, poleg tega pa pri pH 4,5 optimalno delujeta encima lakaza in mangan peroksidaza. Optimalna vrednost pH za delovanje lignin peroksidaze je nižja (2,5 do 3,5), vendar pa je izražanje tega encima manjše oziroma med glivami bele trohnobe ni tako razširjeno kot izražanje MnP in Lac (Tavzes, 2003; Jaouani in sod., 2006; Vidic, 2008). Zaradi tega je tudi prispevek LiP k celotni ligninolitični aktivnosti manjši.

5.1.2 Rast gliv

Rast izbranih vrst gliv v tekočem mediju smo spremljali vizualno. Izgled tekočih kultur se je razlikoval tako med vrstami gliv kot v tekočih kulturah glive iste vrste. Na rast gliv je vplivalo več dejavnikov (temperatura, vlažnost, preskrba s kisikom, sestava gojišča, vrednost pH, dodatek lindana), odziv gliv nanje pa je bil različen. Na samo obliko micelija med drugim vplivajo tudi strižne sile pri stresanju kultur, ki v vseh erlenmajericah niso enake in so odvisne od oddaljenosti od centra nihanja na stresalniku. Poleg tega morda pogoji gojenja niso bili optimalni za vsako vrsto posebej, zaradi česar je prihajalo do razlik tako med kulturami gliv iste vrste kot med vrstami.

5.1.3 Priprava vzorcev za analizo s plinsko kromatografijo

Pri pripravi vzorcev z ekstrakcijo iz filtratov smo imeli težave s filtracijo tekočih glivnih kultur, predvsem pri tekočih kulturah, ki so bile inokulirane z micelijem *T. versicolor*. Po dodatku heksana tekočim glivnim kulturam in dobremu premešanju vsebina erlenmajerice ni ostala tekoča, temveč je nastala mešanica spominjala na emulzijo oziroma gel. Filtracija takšne vsebine je pri nekaterih vzorcih potekala zelo počasi, saj se je gel posedel na vrh filtrirnega papirja in preprečeval filtracijo zgornjih faz. Heksan se je pri mešanju očitno ujel v vsebino gojišča in do ločitve dveh faz ni prišlo. Zaradi počasne filtracije in nizkega tlaka v presesalni erlenmajerici bi lahko prišlo tudi do hlapenja heksana iz filtrata, kar smo želeli preprečiti, saj bi se tako lindan v vzorcih koncentriral in bi posledično določili napačno razgradnjo lindana.

Ker pri takšnih zapletih v filtratu nismo dobili dveh jasno ločenih faz, temveč poleg njiju tudi kompaktno peno, smo vzorce, kjer je nastala podobna mešanica, po filtraciji centrifugirali ter tako zmanjšali količino pene in ločili nepolarno fazo od polarne. Pri pozitivnih kontrolah, ki niso bile inokulirane z micelijem, podobnih težav nismo imeli, pri filtraciji tekočih kultur, inokuliranih z vrstami gliv *H. fragiforme*, *C. purpureum* in *P. ostreatus* pa so se pojavile le nekajkrat, medtem ko je filtracija tekočih kultur glive *G. trabeum* potekala brez zapletov. Domnevamo, da se je »zamreženje« heksana zgodilo zaradi prisotnosti večje količine ekstracelularnih encimov v tekočem gojišču, morda pa celo z razgradnimi produkti lindana. Pojav smo namreč v največji meri opazili pri tekočih kulturah glive *T. versicolor*, ki je bila najuspešnejša pri razgradnji lindana, pri tekočih kulturah glive *G. trabeum*, ki je bila najmanj uspešna, pa ga sploh nismo opazili.

Podobne težave z ločevanjem faz so se pojavljale tudi pri ekstrakciji iz homogenatov tekočih glivnih kultur. Po homogenizaciji je vsebina centrifugirk postala zelo gosta in se ni ločila v dve fazi (slika 13). S centrifugiranjem vzorcev smo vsebino uspeli ločiti na spodnjo polarno fazo in zgornjo heksansko fazo, vendar se je tudi v tem primeru med obema fazama pojavila tanjša plast zbite pene, ki nam je ni uspelo odstraniti niti z daljšim časom centrifugiranja. Takšna vmesna faza se je pojavljala pri vseh vzorcih, ki smo jih pripravili iz homogenatov tekočih glivnih kultur, ne glede na vrsto gliv. Pri homogenizaciji pozitivnih kontrol centrifugiranje ni bilo potrebno, saj sta se polarni in nepolarni del jasno ločila v dve fazi že nekaj minut po končani homogenizaciji.



Slika 13: Primer homogenizirane tekoče glivne kulture pred centrifugiranjem.

5.1.4 Razgradnja lindana

Razgradnjo lindana so v večini raziskav proučevali v tekočih glivnih kulturah (Bumpus in sod., 1985; Mougin in sod., 1996; Arisoy, 1998; Singh in Kuhad, 1999; de Sousa Fragoeiro, 2005; Nagpal in sod., 2008; Quintero in sod., 2008). Pri takšnem načinu gojenja gliv raziskovalci uporabljajo različne načine ekstrakcije lindana iz tekočih kultur. V grobem jih lahko razdelimo na dva glavna načina: ekstrakcijo lindana iz filtratov in iz homogenatov tekočih glivnih kultur. Vrednosti razgradnje lindana z različnimi vrstami ligninolitičnih gliv se v literaturi razlikujejo, pogosto pa se v raziskavah ukvarjajo tudi z izbiro načina ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur. Razlike med rezultati različnih raziskav bi namreč lahko bile posledica različnih načinov ekstrakcije, ne pa učinkovitosti razgradnje, kar običajno želijo ugotoviti v takih raziskavah. Singh in Kuhad (1999) sta razgradnjo lindana proučevala v tekočih kulturah gliv *Trametes hirsutus* in *P. chrysosporium*. Lindan sta iz tekočih kultur ekstrahirala z etilacetatom po filtraciji. Topilo etilacetat sta dodala šele filtratu in ne direktno tekočemu gojišču z micelijem, kakor v našem primeru. V 28 dneh naj bi gliva *P. chrysosporium* razgradila 90 % lindana, gliva *T. hirsutus* pa približno 95 %. Zanimal ju je tudi privzem lindana v glivno biomaso in njegov morebitni intracelularni ali ekstracelularni metabolizem, zato sta micelij, ki sta ga s filtracijo ločila od gojišča, spirala z etilacetatom in destilirano vodo, s čimer sta z njega odstranila adsorbiran lindan. Tako pripravljen micelij sta nato homogenizirala in v njem s

plinsko kromatografijo določila lindan, kar nakazuje, da razgradnja lindana ne poteka intracelularno in so zanjo odgovorni ekstracelularni ligninolitični encimi, kar so predlagali že Bumpus in sodelavci (1985). Temu nasprotujejo Mougin in sodelavci (1996), ki so lindan razgrajevali v tekočih kulturah glive *P. chrysosporium* ter izključili vpletenost LiP in MnP v njegovo razgradnjo. Namesto peroksidaz so predlagali delovanje encimov citokrom P450. V 14 dneh je gliva *P. chrysosporium* razgradila precej manj lindana kot sta v svoji raziskavi določila Singh in Kuhad (1999), saj je razgradnja znašala le okoli 4 %. Singh in Kuhad (1999) sta lindan določila tudi v miceliju izbranih vrst gliv, vendar s tem visoke razgradnje lindana nista povezala. Lindan so z različnimi vrstami gliv razgrajevali tudi Quintero in sodelavci (2008), največ lindana pa sta razgradili glivi *Bjerkandera adusta* (42 %) in *Pleurotus eryngii* (49 %). Lindan so ekstrahirali z dodatkom topila tekočim glivnim kulturam, organsko in vodno fazo pa so ločili z ultrazvočnim postopkom. Izjemno velike hitrosti razgradnje so ugotovili Nagpal in sodelavci (2008), ki so za razgradnjo lindana uporabili glivo rjave trohnobe *Conidiobolus* 03-1-56. Popolno razgradnjo lindana so namreč opazili že po petih dneh inkubacije, poleg tega pa z dodatnimi analizami z masno spektroskopijo niso zaznali nobenih razgradnih produktov, zaradi česar so sklepali, da je gliva lindan popolnoma mineralizirala. Tekoče glivne kulture so centrifugirali in lindan iz supernatantov ekstrahirali s heksanom. Podobno kot Singh in Kuhad (1999) so preverjali tudi adsorpcijo lindana na biomaso s spiranjem micelija s heksanom in kasnejšo homogenizacijo. V miceliju po petih dneh inkubacije z analizo GC niso določili lindana, kar naj bi pomenilo, da odstranitev lindana iz gojišča ni posledica njegove adsorpcije na biomaso.

Razgradnjo lindana smo proučevali s petimi vrstami lesnih gliv, od katerih glivo *G. trabeum* uvrščamo med glive rjave trohnobe, ostale pa med glive bele trohnobe. Zaradi domnev, da se del lindana med gojenjem adsorbira na površino micelija (Pointing, 2001), na notranjo površino steklenih erlenmajeric in celo na filtrirni papir, smo poleg ekstrakcije lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur vzorce pripravljali tudi z ekstrakcijo lindana iz homogenatov tekočih kultur.

5.1.4.1 *Trametes versicolor*

Rezultati razgradnje lindana v vzorcih, pripravljenih z obema načinoma ekstrakcije, kažejo, da je količina razgrajenega lindana s časom izpostavitve kulturi glive naraščala, razgradnja pa se je pričela že v nekaj urah (slika 7). V primerjavi s pozitivnimi kontrolami smo razgradnjo lindana v tekočih glivnih kulturah z obema načinoma ekstrakcije določili že po desetih minutah izpostavitve lindana kulturam glive. Vendar pa so ti rezultati v okviru statistične napake in rezultatov teh vzorcev ne moremo zanesljivo razlikovati od rezultatov pozitivnih kontrol. Do znatne razgradnje lindana pri teh vzorcih najverjetneje ni prišlo. Upoštevajoč standardne odklone naslednjih dveh časovnih vzorcev (izpostavitve lindana kulturam glive za dve uri ali šest ur) lahko ugotovimo, da so bili deleži razgrajenega lindana večji od razgradnje po desetih minutah izpostavitve onesnaževala kulturam glive. Razgradnje lindana so pri teh vzorcih količinsko zelo podobne, tako glede na način ekstrakcije kot glede na čas izpostavitve lindana tekočim kulturam glive. Z ekstrakcijo iz filtratov tekočih glivnih kultur smo zelo visoko povprečno stopnjo razgradnje, glede na podatke iz literature, določili že po enem dnevu razgradnje lindana s kulturami te glive (75 %), z enakim načinom ekstrakcije pa je bila povprečna razgradnja po treh dneh delovanja glive na lindan 69 %. Glede na to, da je povprečna razgradnja lindana s časom naraščala, lahko sklepamo, da bi se morala po treh dneh izpostavitve kulturam glive razgraditi večja količina lindana kot po enem dnevu izpostavitve. To ugotovitev podpira tudi nekoliko večji standardni odklon vzorcev, kjer je bil lindan v tekočih kulturah glive prisoten tri dni. Delež razgrajenega lindana, ki smo ga ekstrahirali iz homogenatov tekočih glivnih kultur, je v času gojenja postopoma naraščal.

Z obema ekstrakcijama določene razgradnje lindana so približno enake, saj se standardni odkloni med načinoma ekstrakcije prekrivajo. Zato ne moremo trditi, da z enim ali drugim načinom ekstrakcije določimo značilno različno razgradnjo, predvsem pa smo po 21 dneh izpostavitve lindana kulturam glive iz vzorcev z obema načinoma ekstrahirali skoraj enake količine lindana (iz filtratov tekočih kultur 5 % in iz homogenatov 2 %). Takšne domneve bi morali preveriti predvsem z večjim številom paralelnih vzorcev, saj so trije premalo za zanesljivost rezultatov.

Na velikost standardnega odklona vpliva tudi merjenje ploščine kromatografskega vrha lindana. Ta vpliv je lahko še posebej velik pri vzorcih, kjer je bil lindan v tekočih kulturah

gliv prisoten 21 dni. Merjenje ploščine kromatografskega vrha lindana pri teh vzorcih namreč ni bilo zelo zanesljivo, saj sta vrh in njegova ploščina zaradi majhne količine nerazgrajenega lindana zelo majhna, zaradi česar so relativne napake pri merjenju ploščine lahko velike. Kljub temu so absolutne napake razgradnje lindana v teh primerih majhne (npr. sliki 7 in 12). Tudi zaradi tega smo pri vseh vrstah gliv iste vzorce v GC vbrizgali dvakrat in pri rezultatih upoštevali povprečno ploščino kromatografskega vrha.

5.1.4.2 *Gloeophyllum trabeum*

Razgradnja lindana je bila najslabša v tekočih kulturah glive *G. trabeum*. Pri skoraj vseh vzorcih je bil povprečni delež razgrajenega lindana značilno večji pri ekstrakciji iz filtratov tekočih glivnih kultur (slika 9). Po dveh urah izpostavitve lindana tekočim kulturam glive smo z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih kultur v vzorcih sicer določili nekoliko manj lindana, vendar so rezultati v okviru statistične napake enaki rezultatom pozitivnih kontrol. Bolj zanesljivo lahko rečemo, da smo opazno stopnjo razgradnje določili po šestih urah izpostavitve lindana kulturam glive. Določena vrednost razgradnje lindana se je po enem dnevu delovanja glive na onesnaževalo še nekoliko povečala, nato pa se ni več spreminjala in je ostala okoli 40 % tudi v vzorcih, kjer je bil lindan v tekočih kulturah glive prisoten tri dni ali 21 dni. Določena vrednost razgradnje je bila, glede na to, da gliva *G. trabeum* sodi v skupino gliv rjave trohnobe, ki v lesu razgrajujejo le celulozo in hemiceluloze, lignin pa ostane skoraj nerazkrojen, razmeroma velika. Ta ugotovitev se ne sklada s predvidevanjem, da so pri razgradnji lindana z lesnimi glivami udeleženi le ligninolitični encimi in je bliže ugotovitvam nekaterih znanstvenikov, ki trdijo, da razgradnja ksenobiotikov ni povezana z encimi, ki so udeleženi pri razkroju lignina (Mougin in sod., 1996; de Sousa Fragoeiro, 2005). Rezultati, dobljeni iz filtratov tekočih kultur gliv, se skladajo z rezultati, do katerih so prišli Nagpal in sodelavci (2008), ki kažejo na popolno razgradnjo lindana v nekaj dnevih ravno z glivo rjave trohnobe in izključujejo odstranitev lindana iz gojišča kot posledico adsorpcije na površino micelija.

Razgradnje lindana, določene po postopku ekstrakcije s homogenizacijo tekočih kultur glive *G. trabeum*, so v vseh primerih precej majhne (okoli 10 %), pripadajoči standardni odkloni pa razen v vzorcih, kjer je bil lindan delovanju glive izpostavljen šest ur ali en dan, večji od povprečnih razgradenj. Po 21 dneh razgradnje lindana s kulturo te glive smo v

vzorcih povprečno določili celo več lindana kot v pozitivnih kontrolah, torej do razgradnje lindana niti v najdaljšem času prisotnosti insekticida v tekočih kulturah glive ni prišlo ali pa se je ta zgodila v zelo majhnem obsegu.

Možen vzrok za izmerjeni in izračunani negativni delež razgrajenega lindana je hlapenje acetona iz pripravljene raztopine lindana, ki smo jo hranili pri sobni temperaturi v 50 mililitrski zaprti bučki. Tudi razlike med količino lindana v pozitivnih kontrolah, ki smo jih pripravili sočasno z gojenjem tekočih kultur gliv *T. versicolor* in *G. trabeum* ter so bile ravno pri slednji vrsti glive največje, nakazujejo, da bi vzrok zanje utegnil biti ravno v izhlapevanju acetona iz osnovne raztopine lindana. To je toliko bolj verjetno, ker smo raztopino lindana pripravili ob začetku poskusov in hkrati z gojenjem tekočih kultur glive *T. versicolor* ter jo ponovno uporabili šele čez nekaj tednov pri gojenju tekočih kultur glive *G. trabeum*. Prav tako je lahko prišlo do hlapenja acetona med samim dodajanjem raztopine lindana vzorcem, saj smo jo pri tem del pretočili v manjšo čašo, v katero smo nato lahko segali s pipeto. Pri preostalih vrstah gliv smo zaradi omenjenih težav pripravili dodatne pozitivne kontrole, kjer smo lindana v tekočem gojišču inkubirali en dan ali tri dni, ustje bučke z raztopino lindana pa smo tesno ovili z aluminijasto folijo in jo hranili v hladilniku. Med samim dodajanjem raztopine lindana nadaljnjim vzorcem smo morebitno izhlapevanje acetona preprečili tako, da smo nekaj raztopine iz bučke pretočili v čašo, ki smo jo med postopkom zapirali s steklenim zamaškom oziroma smo uporabili stekleničke, ki smo jih zapirali z zamaškom na zavoj.

Na podlagi razgradenj lindana v tekočih kulturah glive *G. trabeum*, določenih z obema načinoma ekstrakcije, je verjetneje, da do razgradnje lindana ni prišlo. Adsorpcije lindana na micelij ne moremo povsem izključiti, saj lindana v filtrirani biomasi nismo določali. Na podlagi izračunanih razgradenj v vzorcih, pripravljenih iz homogenatov tekočih kultur pa lahko sklepamo, da je do adsorpcije prišlo. Ekstrakcija lindana iz filtratov tekočih kultur glive *G. trabeum* najverjetneje ni primerna za določanje razgradnje lindana.

5.1.4.3 *Hypoxylon fragiforme*

Pri vzorcih, kjer smo razgradnjo lindana določevali po krajšem času inkubacije lindana v tekočih kulturah glive *H. fragiforme*, je razgradnja v vseh primerih večja pri ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur. Zelo veliko razgradnjo smo s tem načinom

ekstrakcije določili po desetih minutah izpostavitve onesnaževala kulturam glive, pa tudi po dveh urah in enem dnevu delovanja kulture *H. fragiforme* na lindan. Ti rezultati nakazujejo, da je izračunana razgradnja lindana odvisna od načina ekstrakcije lindana iz tekočih kultur. Te trditve pa ne podpirajo rezultati ostalih vzorcev, v katerih je bil lindan tekočim kulturam glive izpostavljen šest ur, tri dni ali 21 dni. V nasprotju s pričakovanji so tudi rezultati analize filtrirane biomase in filtrirnih papirčkov, iz katerih smo ekstrahirali morebitni adsorbirani lindan, saj smo v njih določili zanemarljivo majhno količino lindana. Lindan smo v preostali biomasi in na filtrirnih papirčkih določali le pri nekaj vzorcih (pri vseh je bil lindan v gojišču prisoten deset minut), zato ne vemo, ali je bila količina adsorbiranega lindana pri ostalih vzorcih enaka. Iz rezultatov analiz filtrirnih papirčkov pozitivnih kontrol, kjer glivne biomase ni bilo, lahko sklepamo, da se lindan pri filtraciji ni adsorbiral na filtrirni papirček do tolikšne mere, da bi to vplivalo na zmanjšanje količine lindana v filtratu. Ker smo količino adsorbiranega lindana določali v vzorcih, kjer je bil lindan prisoten deset minut, so imeli ti vzorci največjo koncentracijo lindana, zaradi česar bi bila lahko adsorpcija lindana pri teh vzorcih najbolj opazna. Ker smo ravno v teh vzorcih na biomasi in filtrirnih papirčkih določili izredno majhno količino lindana, domnevamo, da odstranitev lindana iz tekočih gojišč ni bila posledica adsorpcije.

Gliva *H. fragiforme* je izmed izbranih vrst gliv edina, ki jo uvrščamo v skupino zaprtotrošnic (*Ascomycotina*), medtem ko ostale vrste testiranih gliv spadajo v skupino prostotrošnic (*Basidiomycotina*). Ne glede na sistematsko opredelitev pa povzroča belo trohno. Tako kot pri ostalih vrstah gliv, smo tudi pri tej vrsti najuspešnejšo razgradnjo lindana v tekočih kulturah z obema načinoma ekstrakcije določili po 21 dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam glive (slika 10). Po ekstrakciji lindana iz homogenatov tekočih kultur je povprečna razgradnja lindana znašala 96 %, kar je ob upoštevanju merskih napak primerljivo z največjo povprečno razgradnjo, ki smo jo izmerili v tekočih kulturah glive *T. versicolor*. Iz vzorcev, ki smo jih pripravili s homogenizacijo tekočih kultur gliv, smo ekstrahirali tudi lindan, ki bi se lahko adsorbiral na površino micelija ali steno erlenmajerice. Dobljeni rezultat naj bi zato pomenil, da je manjša količina lindana v tekočih kulturah glive *H. fragiforme* po treh tednih inkubacije lindana posledica razgradnje in ne adsorpcije. Na prvi pogled je s to ugotovitvijo nekoliko neskladna povprečna razgradnja, prav tako dosežena po 21 dneh inkubacije lindana v tekočih kulturah glive, v

vzorcih, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo iz filtratov tekočih kultur. Ta je znašala $79 \% \pm 11 \%$. Če privzamemo, da se je del lindana, ki smo ga dodali tekočim kulturam, adsorbiral na notranjo steno erlenmajerice in na površino micelija, naj bi v primeru priprave vzorcev s homogenizacijo tekočih kultur glive ekstrahirali celotno količino lindana, prisotnega v erlenmajericah, vključno z adsorbiranim deležem. Pri vzorcih, pripravljenih z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur, pa naj bi določili le preostanek lindana v tekočih kulturah, ki se ni vezal na prej omenjene površine, lindan pa naj bi se vezal tudi na filtrirni papir. Z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih kultur bi torej lahko določili kvečjemu večjo razgradnjo lindana. Iz opisanih rezultatov meritve razgradnje lindana po 21 dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam glive *H. fragiforme* je razvidno, da je bila povprečna količina lindana, določena po ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur, okoli petkrat večja od količine lindana, določene po ekstrakciji iz homogenatov tekočih glivnih kultur. Ker so vse razgradnje lindana izračunane iz rezultatov treh paralelnih vzorcev, moramo upoštevati tudi standardni odklon povprečne vrednosti razgradnje, še posebej v primerih, ko je ta velik ali pa je razgradnja zelo majhna. Standardni odklon je pri vzorcih te meritve, ki smo jih ekstrahirali iz filtratov, v primerjavi s standardnimi odkloni preostalih vrednosti povprečnih razgradenj, precej velik (11 %). Z upoštevanjem tega bi bila dejanska razgradnja lindana lahko namesto 79 % največ 90 %, kar pa je že zelo blizu razgradnje, ki smo jo določili po ekstrakciji lindana iz homogenatov tekočih kultur glive. Ne glede na način ekstrakcije je bila določena razgradnja lindana po 21 dneh izpostavitve onesnaževala kulturam glive zelo uspešna.

Razgradnja lindana je s časom inkubacije naraščala, glede na rezultate pa lahko trdimo, da se je intenzivna razgradnja lindana z glivo *H. fragiforme* v tekoči kulturi pričela med šestimi urami in enim dnevom izpostavitve lindana tekočim kulturam glive *H. fragiforme*.

5.1.4.4 *Chondrostereum purpureum*

Z gojenjem glive *C. purpureum* v tekočih kulturah smo imeli največ težav. Micelij je za začetno namnožitev potreboval več časa kot miceliji drugih vrst, prav tako smo največ razlik v videzu tekočih kultur glive opazili ravno pri tej vrsti. Večjih odstopanj pri analizi vzorcev z GC kljub temu nismo zaznali. Morda je pri tej vrsti prišlo do nekoliko

drugačnega odziva na sestavo gojišča ali dodatek lindana kot pri ostalih vrstah izbranih gliv, kar se je izražalo v počasni rasti in v nenavadnem videzu kultur.

Že na prvi pogled vidimo, da so povprečne razgradnje, dosežene v tekočih kulturah glive *C. purpureum*, odvisne od načina priprave vzorcev za meritev količine lindana z GC (slika 11). Z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih kultur so povprečne razgradnje izjemno visoke že po desetih minutah inkubacije lindana v tekočih kulturah glive. Količina razgrajenega lindana je po šestih urah izpostavitve onesnaževala kulturam glive še narasla, nato pa se pri daljših časih izpostavitve lindana kulturam glive ni več spreminjala in je bila zelo velika (več kot 85 %). Z ekstrakcijo lindana iz homogenatov tekočih kultur smo v vzorcih določili bistveno večje količine lindana. Rezultati kažejo, da je celotna razgradnja (približno 40 %) potekla že po šestih urah delovanja kultur glive. Količina razgrajenega lindana se kasneje pravzaprav ni več bistveno spreminjala, z izjemo vzorcev, v katerih smo razgradnjo določali po treh dneh izpostavitve lindana kulturam glive, kjer je bila povprečna razgradnja nekoliko manjša. Tudi razgradnje, ki smo jih določili po analizi vzorcev, kjer smo linden ekstrahirali iz filtratov tekočih glivnih kultur, se po primerjavi z razgradnjami lindana, ki smo ga ekstrahirali iz homogenatov, ujemajo z domnevo, da se je razgradnja zgodila po šestih urah delovanja glive na linden. Po desetih minutah in dveh urah izpostavitve lindana kulturam glive smo po ekstrakciji iz homogenatov tekočih kultur glive precej nezanesljivo določilo nizko razgradnjo lindana. Visoki razgradnji pri enakih vzorcih, kjer smo linden ekstrahirali iz filtratov tekočih kultur glive, sta torej možni posledici adsorpcije lindana in ne njegove razgradnje, česar sicer nismo preverjali z namakanjem filtrirane biomase in filtrirnih papirčkov v heksanu, vendar z dvema metodama ekstrakcije lindana izračunane različne razgradnje po enakem času izpostavitve lindana kulturam glive to domnevo potrjujejo. Morda je gliva v gojišče izločala snovi, na katere se je lahko vezal linden.

Razgradnja lindana po dveh urah izpostavitve kulturam glive je z ekstrakcijo lindana iz filtratov sicer večja kot razgradnja, določena po desetih minutah delovanja glive na linden, vendar je vzrok lahko v različni količini biomase v vzorcih. Če je bilo v vzorcih, kjer smo določali razgradnjo lindana po desetih minutah izpostavitve tekočim kulturam glive, nekoliko manj biomase kot pri vzorcih, kjer je bil linden v tekočih kulturah glive prisoten dve uri, je bil lahko tudi delež vezanega lindana manjši.

Najverjetnejša največja razgradnja lindana v tekočih kulturah glive *C. purpureum* je bila okoli 40 % in se je zgodila že po šestih urah izpostavitve lindana kulturam glive. Kjer smo izmerili večje razgradnje lindana, je to bila verjetno posledica njegove adsorpcije na biomase glive.

5.1.4.5 *Pleurotus ostreatus*

Časovni potek razgradnje lindana v tekočih kulturah glive *P. ostreatus* (slika 12) je primerljiv z razgradnjo lindana v tekočih kulturah gliv *T. versicolor* in *H. fragiforme* (sliki 7 in 10). Količina razgrajenega lindana je s časom inkubacije lindana v tekočih kulturah glive naraščala. Razgradnje lindana, ki smo jih določili po desetih minutah in dveh urah delovanja kultur glive na lindan, imajo prevelike pripadajoče standardne odklone, da bi lahko sklepali na znatno razgradnjo lindana. Po šestih urah izpostavitve lindana tekočim kulturam glive pa smo v vzorcih že določili precej manj lindana kot v pozitivnih kontrolah. Z upoštevanjem standardnih odklonov se je intenzivna razgradnja lindana bolj zagotovo pričela po enem dnevu izpostavitve lindana kulturam glive. Po 21 dneh prisotnosti lindana v tekočih kulturah je tudi gliva *P. ostreatus* razgradila skoraj vso količino lindana (okoli 95 %). Razen pri vzorcih, kjer smo razgradnjo lindana določali po 21 dneh izpostavitve lindana kulturam glive, so vidne razlike med načinoma ekstrakcije lindana iz tekočih kultur. Večjo razgradnjo smo določili z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih kultur glive, vendar pa razlike niso tako očitne kot pri glivi *C. purpureum*. V okviru standardnih odklonov so razgradnje približno enake. Tudi pri uporabi te vrste glive za mikoremediacijo lindana domnevamo, da sta oba načina ekstrakcije lindana primerna za določanje razgradnje lindana.

5.1.5 Razgradni produkti lindana

Razgradnja lindana z glivami bele trohnobe je kljub ksenobiotični naravi tega onesnaževala in njegovi intenzivni uporabi v preteklosti manj proučena od razgradnje ostalih kloriranih organskih biocidov. Raziskave o nastanku njegovih razgradnih produktov so redke. Prvi so razgradne produkte lindana identificirali Mougín in sodelavci (1996), ki so z glivo *P. chrysosporium* v tekoči kulturi poskušali razgraditi radioaktivno označen [^{14}C] lindan. Pri tem so poleg $^{14}\text{CO}_2$ zaznali nastanek nekaterih polarnih razgradnih produktov (tetraklorocikloheksena, tetraklorocikloheksen epoksida in

tetraklorocikloheksenola). Slabšo proučitev razgradnje lindana so pripisali majhni količini metabolitov, ugotovili pa so tudi, da razgradni produkti iz vzorcev hlapijo. Prisotnost tetraklorocikloheksana in tetraklorocikloheksanola sta pri razgradnji lindana v tekočih kulturah gliv prav tako določila Singh in Kuhad (1999). V naših raziskavah razgradnih produktov lindana nismo zaznali. Pri analizi z GC se poleg kromatografskega vrha, ki je pripadal lindanu, niso pojavljali drugi ponavljajoči se vrhovi, ki bi bili navzoči pri različnih vzorcih. Nekaj vzorcev smo analizirali tudi s plinsko kromatografijo-masno spektroskopijo (GC-MS), vendar v njih nismo identificirali nobenih kloriranih razgradnih produktov. Če pri razgradnji lindana nastanejo polarni razgradni produkti, kot so ugotovili Mougin in sodelavci (1996), jih z ekstrahiranjem, ki smo jih uporabili, nismo mogli zaznati, saj smo uporabili heksan, ki je nepolarno topilo. Tako smo pri analizi z GC v heksanski fazi lahko zaznali le tiste molekule, ki so topne v nepolarnem heksanu, ostalih pa ne. Možno je tudi, da so nastali razgradni produkti med gojenjem in razgradnjo izhlapeli, tako kot so predlagali Mougin in sodelavci (1996), ali pa je bila njihova količina premajhna in jih z analizami nismo zaznali.

Za bolj natančno proučitev časovnega poteka razgradnje lindana v tekočih kulturah gliv bi morali razgradnjo lindana določati po več različnih časih izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv. Za bolj zanesljive rezultate bi potrebovali večje število paralelnih vzorcev. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno razgradnjo lindana proučiti in ovrednotiti tudi z meritvami encimske aktivnosti ter z učinkovitejšim spremljanjem razgradnih produktov.

5.2 SKLEPI

Razgradnja lindana v tekočih kulturah gliv je odvisna od vrste glive, uporabljene pri mikoremediaciji, in časa izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv.

Glive bele trohnobe so sposobne razgraditi lindan. Pri tem so bile najuspešnejše vrste *T. versicolor*, *H. fragiforme* in *P. ostreatus*, pri katerih je količina razgrajenega lindana s časom izpostavitve kulturam gliv naraščala. Po 21 dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv smo s temi vrstami razgradili več kot 90 % lindana. Razgradnja lindana je bila najhitrejša v tekočih kulturah glive *T. versicolor*. Razgradnja lindana je bila manj

uspešna v tekočih kulturah glive *C. purpureum*, neuspešna pa je bila v tekočih kulturah glive rjave trohnobe *G. trabeum*.

Stopnja adsorpcije lindana na površino micelija je odvisna od vrste gliv. Pri tekočih kulturah gliv *G. trabeum* in *C. purpureum* se je zgodila v obsegu, ki je vplival na določitev uspešnosti razgradnje lindana. Pri teh vrstah gliv je za natančno določitev razgradnje lindana bolj primerna ekstrakcija lindana iz homogenatov tekočih kultur kot ekstrakcija lindana iz filtratov tekočih kultur gliv. Pri tekočih kulturah gliv *T. versicolor*, *H. fragiforme* in *P. ostreatus* smo z obema načinoma ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur določili primerljive razgradnje lindana.

6 POVZETEK

Glive bele trohnobe imajo razvite nespecifične encimske sisteme za razgradnjo lignina, saj so med drugim ligninolitični encimi zelo učinkoviti tudi pri razgradnji ligninu strukturno podobnih organskih onesnaževal. V diplomskem delu smo ugotavljali razgradnjo lindana v odvisnosti od časa izpostavitve tekočim kulturam izbranih lesnih gliv, od katerih so bile vrste *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum* in *H. fragiforme* predstavnice gliv bele trohnobe, vrsta *G. trabeum* pa sodi v skupino gliv, ki povzročajo rjavo trohno. Primerjali smo tudi vpliv načina ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur na določitev njegove koncentracije in razgradnjo.

Po 21 dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv smo z glivami *T. versicolor*, *H. fragiforme* in *P. ostreatus* dosegli skoraj popolno razgradnjo lindana. Odstranitev lindana iz medija je bila posledica razgradnje z glivnimi encimi, izbira načina ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur pa ni bistveno vplivala na izračunano razgradnjo lindana. Visoke razgradnje lindana smo pri teh vrstah določili tudi po enem dnevu in treh dneh izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv. Pri razgradnji lindana je bila najuspešnejša tekoča kultura glive *T. versicolor*, razgradnja s to vrsto glive pa je prav tako potekala najhitreje.

Razgradnja lindana v tekočih kulturah glive rjave trohnobe *G. trabeum* ni bila uspešna, manjše količine lindana v gojiščih pa smo najverjetneje določili zaradi adsorpcije lindana. Prav tako je bila manj uspešna tudi razgradnja lindana v tekočih kulturah glive *C. purpureum*, ki se je sicer zgodila že po nekaj urah, vendar se je potem očitno ustavila, saj se količina lindana v vzorcih ni več spreminjala. Pri poskusih razgradnje onesnaževala s temi vrstami gliv je potrebno pri določevanju količine lindana v tekočih kulturah upoštevati adsorpcijo lindana predvsem na površino micelija gliv v tekočih kulturah.

Dokazali smo, da zmanjšana količina lindana v tekočih kulturah gliv bele trohnobe z izjemo *C. purpureum* ni posledica adsorpcije temveč razgradnje lindana.

7 VIRI

- Abhilash P.C., Jamil S., Singh N. 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances*, 27: 474-488
- Alexander M. 1981. Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. *Science*, 211, 4478: 132-138
- Alloway B.J., Ayres D.C. 1993. Chemical principles of environmental pollution. 2nd edition. London, Blackie academic & professional: 291 str.
- Arisoy M. 1998. Biodegradation of Chlorinated Organic Compounds by White-Rot Fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 872-876
- Aust S.D. 1990. Degradation of Environmental Pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology*, 20: 197-209
- Aust S.D. 1995. Mechanisms of Degradation by White Rot Fungi. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl 5): 59-61
- Barr D.P., Aust S.D. 1994. Pollutant degradation by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 138: 49-72
- Bending G., Friloux M., Walker A. 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212: 59-63
- 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
- Candeias L.P., Harvey P.J. 1995. Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 16745-16748
- de Sousa Fragoeiro S.I. 2005. Use of fungi in bioremediation of pesticides. Ph.D. Thesis. Cranfield, Cranfield University: 241 str.
- Diehl S., Borazjani H. 2000. Bioremediation: Working even better. *Forest and Wildlife Research Center. Research Advances*, 5, 2: 4 str.
- EarthFax Demonstrates Full Scale Degradation of PCP and Lindane. 2008. EarthFax Engineering, Inc. <http://www.earthfax.com/WhiteRot/PCP.htm> (18. maj 2009)
- Faison B.D., Kirk T.K. 1985. Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 2: 299-304

- Faison B.D., Kirk K., Farrel R.A. 1986. Role of Veratryl Alcohol in Regulating Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 52, 2: 251-254
- Fengel D., Wegener G. 1989. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, New York, Walter de Gruyter: 613 str.
- Gadd G.M. 2001. Fungi in bioremediation. Cambridge, Cambridge University Press, 481 str.
- Hadar Y., Cohen-Arazi E. 1986. Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 51, 6: 1352-1354
- Hammel K.E. 1995. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. V: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Young L.Y., Cerniglia C.E. (eds). New York, Wiley-Liss: 331-346
- Hammel K.E. 1997. Fungal Degradation of Lignin. V: Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Cadisch G., Giller K.E. (eds.). Madison (MI) CAB International: 33-45
- Humar M., Pohleven F. 2005. Biotehnologija v lesarstvu. Les, 57, 11: 316-321
- Jackson M., Hou L., Banerjee H., Sridhar R., Dutta S. (1999) Disappearance of 2,4-dinitrotoluene and 2-amino,4,6-dinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* under non-ligninolytic conditions. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology; 62: 390-396
- Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M., Cullen D. 1998. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and glyoxal oxidase in wood. Applied and Environmental Microbiology, 64: 3536-3538
- Jaouani A., Tabka M.G., Penninckx M.J. 2006. Lignin modifying enzymes of *Corioloopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. Chemosphere, 62: 1421-1430
- Kirk K.T, Farrell R.L. 1987. Enzymatic »combustion«: the microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology, 41: 465-505
- Mai C., Kües U., Militz H. 2004. Biotechnology in the wood industry. Applied Microbiology and Biotechnology, 63: 477-494.

- Martínez A. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A., del Río J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204
- Messner K., Koller K., Wall M.B., Akhtar M., Scott G.M. 1998. Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. V: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. Young, R.A., Akhtar, M. John (eds.). New York, Wiley & Sons, Inc.: 385-419
- Mougin C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C., Asther M. 1996. Biotransformation of the Insecticide Lindane By the White rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide Science*, 47: 51-59
- Nagpal V., Srinivasan M.C., Paknikar K.M. 2008. Biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane (Lindane) by a non-white rot fungus *Conidiobolus* 03-1-56 isolated from litter. *Indian Journal of Microbiology*, 48: 134-141
- Olempska-Bier Z. 2004. Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. *Chemical and Technical Assessment (Cta)*. FAO, 61st JECFA. 6 str.
- Phillips T.M., Seech A.G., Lee H., Trevors J. T. 2005. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*, 16, 4: 363-392
- Podgornik H. 2000. Razgradnja nekaterih barvil z ekstracelularnimi encimi glive *Phanerochaete chrysosporium*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 143 str
- Pointing S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 1-2: 20-33
- Quintero J.C., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. 2008. Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH). *Ciencia e Investigación Agraria*, 35, 2: 123-132
- Reddy A.C. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 320-328
- Rigas F., Papadopoulou K., Dritsa V., Doulia D. 2007. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 140: 325-332
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosics residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185-194

- Schmidt O. 2006. Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use. Berlin, Springer: 334 str.
- Schoemaker H.S., Piontek K. 1996. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. Pure and Applied Chemistry, 68, 11: 2089-2096
- Schwarze F.W.M.R., Engels J., Mattheck C. 2000. Fungal strategies of wood decay in trees. Berlin, Springer: 185 str.
- Sharma K.K., Kuhad R.C. 2008. Laccase: enzyme revisited and function redefined. Indian Journal of Microbiology, 48: 309-316
- Siddique T., Okeke B.C., Arshad M., Frankenberger W.T. 2002. Temperature and pH Effects on Biodegradation of Hexachlorocyclohexane Isomers in Water and a Soil Slurry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 5070-5076
- Singh B.K., Kuhad R.C. 1999. Biodegradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) by the white-rot fungus *Trametes hirsutus*. Letters in Applied Microbiology, 28: 238-241
- Singh H. 2006. Mycoremediation: fungal bioremediation. New Jersey, John Wiley and Sons: 592 str.
- Sonoki T., Kajita S., Ikeda S., Uesugi M., Tatsumi K., Katayama Y., Iimura Y. 2005. Transgenic tobacco expressing fungal laccase promotes the detoxification of environmental pollutants. Applied Microbiology and Biotechnology, 67: 138-142
- Stopar D. Bioremediacija. 2009.
<http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro//homepage/bioremediacija.pdf> (18. maj 2009)
- Tavzes Č. 2003. Proučevanje encimskih in neencimskih procesov razgradnje lesa. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 138 str.
- Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane. 2005. U.S. Department of Health and Human Services. 377 str.
- Vidic I. 2008. Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami. Magistrsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 104 str.
- Wariishi H., Valli K., Gold M.H. 1992. Manganese(II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic Mechanism and Role of Chelators. The Journal of Biological Chemistry, 267, 33: 23688-23695
- Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology, 49: 257-280

Zabel R.A., Morrell J.J. 1992. Wood microbiology: decay and its prevention. New York, Academic Press: 476 str.

Zucchini-Pascal N., de Sousa G., Rahmani R. 2009. Lindane and cell death: At the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicology*, 256, 1-2: 32-41

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Francu Pohlevnu, za mentorstvo, napotke in pregled dela. Somentorju dr. Črtomirju Tavzesu se najlepše zahvaljujem za budno spremljanje poteka diplomskega dela ter usmerjanje, pomoč in obilo nasvetov, ki so mi bili, tako kot on, vedno na razpolago.

Prof. dr. Luciji Zupančič Kralj se zahvaljujem za strokovni pregled dela in uporabo raziskovalne opreme ter vse spodbudne nasvete in pomoč. Najlepša hvala tudi dr. Ireni Kralj Cigić, ki mi je bila pri delu in vseh težavah v veliko pomoč.

Za uvajanje v laboratorijsko delo in pomoč pri delu se zahvaljujem tehnični sodelavki Andreji Žagar, za prijaznost in pomoč pa se zahvaljujem tudi Boštjanu Lesarju. Doc. dr. Mihi Humarju se zahvaljujem za številne koristne in vselej razpoložljive nasvete. Za pomoč pri laboratorijski opremi se zahvaljujem tudi asistentu Gregorju Repu.

Za uporabo centrifuge se zahvaljujem prof. dr. Hojki Kraigher ter celotnemu Oddelku za gozdno fiziologijo in genetiko Gozdarskega inštituta Slovenije, še posebej pa dr. Tinetu Grebencu.

Spopadanje z začetnimi težavami ter vsemi nadaljnjimi zapleti bi bilo neznansko težje brez Frančka, ki mi je bil v izredno pomoč, za kar se mu poleg jeklene potrpežljivosti in seveda hrane zahvaljujem do planetov in nazaj.

Maji hvala za prijetna študijska leta in številne zabavne trenutke, v preteklem letu pa še za poslušanje tegob in predvsem za skupne razmisleke in pomenke.

Za vso pomoč in podporo, ki sta mi bili vedno na razpolago tako tekom šolanja kot sicer, se najlepše zahvaljujem staršem. Očetu se še posebej zahvaljujem tudi za urejanje naloge, mami pa za vzpodbudne besede. Maji, ki mi od nekdaj pomaga pri vsem in neomajno stoji ob strani, sem neskončno hvaležna za brezmejno potrpljenje in vso skrb, seveda pa tudi za popravke naloge, briljantne predloge in rešitve ter vse neprecenljive slaščice.

Juriju se zahvaljujem za vse ribe.