

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Gašper PIRNAT

**BIOREMEDIACIJA Z ORGANSKIMI BIOCIDI ZAŠČITENEGA LESA  
Z GLIVAMI BELE TROHNOBE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**BIOREMEDIATION OF ORGANIC BIOCIDES TREATED WOOD  
WITH WHITE-ROT FUNGI**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Lesarstva. Opravljeno je bilo na Katedri za Patologijo in zaščito lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja imenoval prof. dr. Franca Pohlevna, za recenzenta pa doc. dr. Miho Humar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Gašper PIRNAT

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 630\*844.2
- KG glive razkrojevalke lesa/bioremediacija/organski biocidi/glive bele trohnobe
- AV PIRNAT, Gašper
- SA POHLEVEN, Franc (mentor)/HUMAR, Miha (recenzent)
- KZ SI-1000 LJUBLJANA, Rožna dolina, c. VIII/34
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
- LI 2006
- IN BIOREMEDIACIJA Z ORGANSKIMI BIOCIDI ZAŠČITENEGA LESA Z  
GLIVAMI BELE TROHNOBE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 38 str., 3 pregl., 17 sl., 24 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Glive, ki okužijo in razkrojijo impregniran les, lahko uporabimo za bioremediacijo – razgradnjo oz. razstrupitev polutantov iz določenega okolja. Glive bele trohnobe lahko razgradijo tudi organske biocide z ligninu podobno kemijsko strukturo. Uporabili smo 4 vrste gliv: *Gloeophyllum trabeum*, *Hypoxylon fragiforme*, *Pleurotus ostreatus* ter *Trametes versicolor*. Z njimi smo inokulirali petrijevke s papirčki, prepojenimi z različnimi koncentracijami (20; 6,595; 2,175; 0,717; 0,236 ter 0,078 mmol/L) Lindana, natrijevega pentaklorofenolata, Permetrina ter polikloriranega bifenila. Ugotovili smo, da organske biocide najboljše razkraja *Trametes versicolor*, najslabše pa *Pleurotus ostreatus*. Permetrin ter poliklorirani bifenil sta se pokazala kot lažje, Lindan ter natrijev pentaklorofenolat pa kot težje razgradljiva organska biocida.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 630\*844.2
- CX wood decay fungi/bioremediation/organic biocides/white-rot fungi
- AU PIRNAT, Gašper
- AA POHLEVEN, Franc (supervisor)/HUMAR, Miha (reviewer)
- PP SI-1000 LJUBLJANA, Rožna dolina, c. VIII/34
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology
- PY 2006
- TI BIOREMEDIATION OF ORGANIC BIOCIDES TREATED WOOD WITH WHITE-ROT FUNGI
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 38 p., 3 tab., 17 fig., 24 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Wood decay fungi can be used in bioremediation — detoxification of pollutants from specific environment. White-rot fungi are able to bioremediate some of organic pollutants, because their chemical structures are similar to lignine. 4 wood decay fungi: *Gloeophyllum trabeum*, *Hypoxylon fragiforme*, *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* were used. Agar plates with paper discs were impregnated with different concentrations (20; 6.595; 2.175; 0.717; 0.236 and 0.078 mmol/L) of organic biocides — Lindane, sodium pentachlorofenolate, Permetrin and polychlorinated biphenyl were afterwards inoculated with those fungi. *Trametes versicolor* was found as the best fungi for bioremediation of organic biocides, *Pleurotus ostreatus* showed the worst results. Permetrin and polychlorinated biphenyl were more, while Lindane and sodium pentachlorofenolate less bioremedegrable.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI)</b>	<b>III</b>
<b>Key Words Documentation (KWD)</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic</b>	<b>VII</b>
<b>Kazalo slik</b>	<b>VIII</b>
<b>Okrajšave in simboli</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 DOSEDANJE RAZISKAVE	2
2.2 ORGANSKI BIOCIDI ZA ZAŠČITO LESA	5
2.3 KLORIRANA ORGANSKA ONESNAŽEVALA	6
<b>2.3.1 Načini onesnaževanja okolja</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Vpliv na človeka – toksikologija</b>	<b>6</b>
2.4 BIOREMEDIACIJA SINTETIČNIH ORGANSKIH ONESNAŽEVAL	7
<b>2.4.1 Načini odstranjevanja kloriranih organskih molekul iz okolja</b>	<b>7</b>
<b>2.4.2 Alternative bioremediacije kloriranih organskih molekul</b>	<b>8</b>
<b>2.4.3 Bioremediacija z glivami bele trohnobe</b>	<b>9</b>
2.5 BIOREMEDIACIJA ANORGANSKIH SNOVI	10
2.6 NAMEN RAZISKAVE	10
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIAL	11
<b>3.1.1 Testni organizmi</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2 Kemikalije</b>	<b>12</b>
<b>3.1.3 Laboratorijska oprema in inventar</b>	<b>13</b>
3.2 METODA DELA	13
<b>3.2.1 Ugotavljanje rasti micelija glive pri različnih koncentracijah izbranih testnih substanc</b>	<b>13</b>

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>15</b>
4.1	LINDAN	15
4.1.1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	15
4.1.2	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	16
4.1.3	<i>Pleurotus ostreatus</i>	17
4.1.4	<i>Trametes versicolor</i>	18
4.2	NATRIJEV PENTAKLOROFENOLAT	19
4.2.1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	19
4.2.2	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	20
4.2.3	<i>Pleurotus ostreatus</i>	21
4.2.4	<i>Trametes versicolor</i>	22
4.3	PERMETRIN	23
4.3.1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	23
4.3.2	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	24
4.3.3	<i>Pleurotus ostreatus</i>	25
4.3.4	<i>Trametes versicolor</i>	26
4.4	POLIKLORIRANI BIFENIL	27
4.4.1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	27
4.4.2	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	28
4.4.3	<i>Pleurotus ostreatus</i>	29
4.4.4	<i>Trametes versicolor</i>	30
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>31</b>
5.1	RAZPRAVA	31
5.1.1	<i>Trametes versicolor</i>	32
5.1.2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	33
5.1.3	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	33
5.1.4	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	34
5.1.5	<b>Biocidi</b>	<b>34</b>
5.2	SKLEPI	34
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>36</b>
7.1	CITIRANI VIRI	36
7.2	DRUGI VIRI	38

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Snovi, ki jih razgrajujejo glive bele trohnobe	5
Preglednica 2: Bakterijska bioremediacija	9
Preglednica 3: Rast različnih inokulatov gliv na različnih organskih spojinah po več kot 20 dneh	31

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema testne petrijevke s petimi filtrnimi papirčki	14
Slika 2: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive <i>Gloeophyllum trabeum</i>	15
Slika 3: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive <i>Hypoxylon fragiforme</i>	16
Slika 4: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
Slika 5: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive <i>Trametes versicolor</i>	18
Slika 6: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive <i>Gloeophyllum trabeum</i>	19
Slika 7: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive <i>Hypoxylon fragiforme</i>	20
Slika 8: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
Slika 9: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive <i>Trametes versicolor</i>	22
Slika 10: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive <i>Gloeophyllum trabeum</i>	23
Slika 11: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive <i>Hypoxylon fragiforme</i>	24
Slika 12: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
Slika 13: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive <i>Trametes versicolor</i>	26
Slika 14: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive <i>Gloeophyllum trabeum</i>	27
Slika 15: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive <i>Hypoxylon fragiforme</i>	28
Slika 16: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
Slika 17: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive <i>Trametes versicolor</i>	30



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki
HPLC	tekočinska kromatografija
PCP	Pentaklorofenol
CCA	soli iz bakra, kroma ter arzena
CCF	soli iz bakra, kroma ter fluora
CC	soli iz bakra in kroma
Na-PCP	natrijev pentaklorofenolat
PCB	poliklorirani bifenil
Lac	lakaze
LiP	lignin peroksidaze
MnP	mangan peroksidaze
Gt	<i>Gloeophyllum trabeum</i>
Hf	<i>Hypoxylon fragiforme</i>
Plo	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Tv	<i>Trametes versicolor</i>
DMSO	dimetilsulfoksid
PDA	krompirjev glukozni agar

## 1 UVOD

Les je organski material, zato je podvržen razkroju abiotskih (dejavniki nežive narave) ter biotskih (dejavniki žive narave) dejavnikov. Abiotski dejavniki delujejo mehansko, fizikalno ter kemijsko (npr. ogenj, voda, svetloba, sneg...). Med biotske dejavnike uvrščamo lesne insekte in glive. Glive imajo poleg negativnih (okužba in razkroj lesa, toksičnost nekaterih vrst za človeka, psihoaktivne gobe...) tudi številne pozitivne učinke (kulinarične dobrote, zdravilni učinki za človeka...) ter so široko uporabljene v biotehnologiji. V te namene največ uporabljajo glive iz skupine *Deuteromycotina* (nepopolne glive), npr. *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum-chrysogenum*, *Trichoderma viride*. Glive iz skupine *Basidomycotina* (prostotrošnice) pa postajajo zelo pomembne na okoljskem področju, saj imajo sposobnost razgrajevanja velikega števila organskih kemikalij, kar jim omogočajo ekstracelularni oksidativni encimi nespecifičnega značaja, kot so lakaze, lignin in mangan peroksidaze. *Phanerochaete chrysosporium* je gliva, s katero je bilo opravljenih največ raziskav ter je široko uporabna za razgrajevanje ksenobiotikov, saj ustvarja različne peroksidaze in ligninaze (Wainwright, 1992).

Možnosti uporabe gliv v biotehnologiji (Wainwright, 1992):

- proizvodnja biokemikalij (organske kisline, industrijski alkoholi, polisaharidi, encimi, lipidi, vitamini, aminokisline...),
- medicinska biotehnologija (antibiotiki, farmakološka sredstva...),
- papirna industrija,
- okoljevarstvena biotehnologija (razgradnja pesticidov, bioremediacija, biosorpcija ionov težkih kovin),
- prehrabena industrija (užitne gobe, barvila za hrano, živilska tehnologija...),
- kmetijstvo,
- lesarstvo (razstrupljanje zaščitenega lesa, miko les, lepljenje, kompostiranje...);

## 2 PREGLED OBJAV

V postopku bioremediacije uporabljamo organizme (glive, bakterije) za razgradnjo ali pretvorbo polutantov iz določenega okolja (les, zemlja, voda...), pri čemer organizem lahko porablja polutant tudi kot vir hrane.

Odpaden zaščiten les se lahko razstrupi na različne načine. Kontrolirano sežiganje v inceneratorjih z namenom pridobivanja energije je relativno drago. Fizikalna remediacija (mletje ter spiranje z H<sub>2</sub>O) s poznejšo bioremediacijo je cenejši ter obenem bolj učinkovit način. Postopek lahko nadaljujemo z reciklažo — ponovno uporabo lesa ter zaščitnega sredstva (Messner in Böhmer, 1998).

Za razstrupljanje lesa, zaščitenega z organskimi pripravki, uporabljamo glive bele trohnobe in bakterije (Humar in Pohleven, 2005). Razgradnja in presnova policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) običajno poteka intracelularno. Iz tega dejstva izhajajo naslednje ugotovitve (Messner in Böhmer, 1998):

- bakterije imajo večjo sposobnost razgrajevanja PAH kot glive,
- večina organizmov lahko razkraja le PAH, ki imajo v svoji strukturi manj kot štiri aromatske obročje,
- glive bele trohnobe z nespecifičnimi encimi imajo sposobnost razgrajevanja PAH z več kot štirimi aromatskimi obroči v strukturi (Humar in Pohleven, 2005),
- glive bele trohnobe lahko hitro oksidirajo PAH v metabolite, ki se lahko nato temeljiteje razgradijo z bakterijami ter drugimi vrstami gliv;

### 2.1 DOSEDANJE RAZISKAVE

Znanstveniki so razvili že nekaj uspešnih načinov bioremediacij. Portier in Kressbach sta leta 1992 s tristopenjskim kombiniranim fizikalno-kemijskim postopkom (mletje ter čiščenje z etanolom) razgradila 98 % vseh PAH v lesnih ostankih, kontaminiranih s

kreozotnim oljem. Tretja stopnja tega postopka je bila bakterijska bioremediacija lesnih delcev (Messner in Böhmer, 1998).

V podjetju TGW Teltow so leta 1995 razvili šeststopenjski postopek čiščenja lesa, zaščitenege s kreozotnim oljem. Uspeli so razgraditi 96 % PAH. Zmlete delce lesa pri tem postopku spirajo z mešanico vode in detergentov v turbulentnem zračnem toku. *Bjerkandera adusta* ter *Phanerochaete chrysosporium* sta se pokazali kot najboljši glivi razkrojevalki, mešanica acetona in etanola pa kot najboljše topilo za izpiranje kreozotnega olja iz lesa (Messner in Böhmer, 1998).

Razgradnjo nekaterih PAH v tekočih kulturah z glivama *Bjerkandera adusta* in *Pleurotus ostreatus* so raziskovali tudi Schützendubel in sodelavci (1999). *Bjerkandera adusta* je pokazala najboljše rezultate, saj je v treh dneh razgradila 38 % pirena, 55 % fluorena, 30 % penantrena, 28 % pirena ter 27 % fluoroantena. *Pleurotus ostreatus* je razgradila 62 % antracena v dvanajstih dneh, 42 % fluorena v sedmih dneh ter 1 – 12 % pirena, penantrena ter fluorantena v osemindesetih dneh raziskave.

Uspešno so razvili tudi dvostopenjski postopek čiščenja zemlje, kontaminirane s PAH. Prva stopnja je postopna mobilizacija PAH iz trdne v tekočo fazo, ki ji sledi mikrobní katabolizem. S to metodo lahko razgradimo le hidrofilne, hidrofobni polutanti pa tvorijo skupke v vodi, ki so zato biorazgradljivi. Delež mobiliziranih PAH je po 11 mesecih bioremediacije (pet ciklov čiščenja z vodno raztopino detergenta) znašal 98 % (Zheng in Obbard, 2002).

Eggen in Sveum (1999) sta proučevala učinek glive *Pleurotus ostreatus*, temperature ter dveh različnih metod (dodatek lubja zemlji z ali brez gnojila) na učinek razgradnje PAH v zemlji, kontaminirani s kreozotnim oljem. Pokazalo se je, da ima gliva pozitiven učinek na razgradnjo PAH, povečujeta ga inkubacija zemlje pri 22 °C pred inokulacijo ter dodajanje lubja brez gnojila. Pri temperaturi 8 °C gliva najbolje razkrajja PAH v zemlji z lubjem brez gnojila. Dodano gnojilo povečuje mikrobnó aktivnost pri nižji temperaturi in s tem razgradnjo PAH.

Walter je s sodelavci leta 2005 raziskoval bioremediacijo zemlje, prepojene s PCP, z glivo *Trametes versicolor*. Raziskava je potekala dve leti in pol v posebej konstruiranih posodah z dobrim prezračevanjem ter kontrolirano temperaturo in vlažnostjo zemlje. V dveh letih se je koncentracija PCP v zemlji znižala približno 200-krat (z 800 – 1000 mg/kg na 4 mg/kg).

Levin je s sodelavci (2003) *in vitro* raziskoval sposobnost glive *Trametes trogii* za razgradnjo antracena in nitrobenzena. Plinsko-tekočinska kromatografija je pokazala, da se je v 12 do 14 dneh razgradilo več kot 90 % obeh organskih ksenobiotikov. Ugotovili so tudi, da gliva ustvarja največ lakaze, manjša pa je produkcija mangan peroksidaze. Zadnje raziskave so pokazale dobro razgradnjo ostalih PAH, zato domnevajo, da je gliva primerna tudi za detoksifikacijo onesnaževal.

McBain in sodelavci (1993) so raziskovali tudi uspešnost razgradnje PCP v lesenih nosilcih z bakterijami *Rhodococcus chlorophenolicus* in *Flavobacterium sp.* ter glivo bele trohnobe *Phanerochaete chrysosporium*. Ugotovili so, da bakterije razgradijo (mineralizirajo) 20 do 25 % PCP v lesu po dveh do osmih tednih. Gliva *Phanerochaete chrysosporium* je razgradila 95 % PCP v lesu in ga večinoma (80 %) pretvorila v pentakloroanizol.

Glive bele trohnobe imajo številne pozitivne lastnosti, ki potrjujejo njihovo primernost za bioremediacijo (Reddy, 1995):

- mineralizacija širokega spektra toksičnih ksenobiotikov (preglednica 1),
- široka razširjenost v naravnem okolju,
- izločanje ekstracelularnih encimov, ki razkrajajo tudi substrate z nizko topnostjo,
- poceni substrati za primarni vir ogljika (slama, trščice, lubje...), ki jih lahko brez škode za okolje dodamo na kontaminirano podlago,
- aktivacija lignolitičnega sistema ob pomanjkanju dušika, ogljika ali žvepla (hranilni viri),
- razraščanje s hifami, na ta način same kolonizirajo kontaminirano področje;

Preglednica 1: Snovi, ki jih razgrajujejo glive bele trohnobe (Reddy, 1995)

Skupina	Vrste	Glive razkrojevalke (primeri)
Barvila	azo barvila	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Belila	klorolignini, klorofenoli, klorirane alifatske spojine	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Klorofenoli	2,4-diklorofenol, 2,4,6-triklorofenol, PCP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Nitrotolueni	2,4-dinitrotoluen, 2,4,6-trinitrotoluen (TNT)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH)	antracen, piren, perilen, benzo(a)piren, benz(a)antracen, benzo(e)piren, pentatren, naftalen	<i>Trametes versicolor</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Chrysosporium lignorum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Coriolopsis polyzona</i>
Poliklorirani bifenili (PCB)	-	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

## 2.2 ORGANSKI BIOCIDI ZA ZAŠČITO LESA

**Lindan** ( $\gamma$ -1,2,3,4,5,6-heksaklorocikloheksan) se v normalnih pogojih nahaja v obliki brezbarvnih negorljivih kristalov, ter ima značilen zatohel vonj. Bolje kot v vodi, je topen v nekaterih organskih topilih (acetonu, etanolu, toluenu). Je insekticid z delovanjem na živčevje. Sunkovito prodre v kutikulo, zavre prenos dražljajev, ter tako onemogoči delovanje insektov (Unger in sod., 2001).

**Na-PCP** (natrijev pentaklorofenolat) spada med klorofenole– sintetične organske spojine, ki nastanejo s kloriranjem fenola oz. hidrolizo klorobenzenov. Dokaj dobro je topen v vodi, v toluenu je netopen. Je fungicid s široko uporabnostjo, ki povzroča okvaro metabolizma, posledično pa izgubo ATP, kar povzroči propad celic (Unger in sod., 2001).

**Permetrin** (3-fenoksibenzil(1-*rs*)-*cis*,*trans*-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat) spada med piretroide. Ima rumeno do svetlo rjavo barvo, je skoraj netopen v vodi, bolje pa se topi v nekaterih organskih topilih (acetonu, heksanu, metanolu). Je insekticid z delovanjem na živčevje. Prekine izmenjavo ionov in s tem prenos dražljajev po živčevju (Unger in sod., 2001).

**PCB** (poliklorirani bifenili) so sintetične organske spojine z značilnim ostrim vonjem. Sestavljene so iz molekule bifenila in enega ali več atomov klora. Bifenil vsebuje 12 C in 10 H atomov. Lastnosti spojin so variabilne, odvisne od števila in položaja Cl atomov v molekuli PCB. Vseh možnih izomerov je 209. PCB so bili uporabljeni kot aditivi v pesticidih in insekticidih, zaradi odličnih tehnoloških lastnosti (negorljivost, kemijska obstojnost) pa tudi v industrijske namene (dielektriki v elektromotorjih, transformatorjih, kondenzatorjih, aditivi v hidravličnih oljih, oljih za izolacijo ali prenos toplote, premazih, asfaltu) (Lovrenčič, 2001).

**Klorofenoli** so se uporabljali kot zaščita proti boleznim rastlin, skupaj z drugimi spojinami pa so se uporabljali tudi za zaščito naravnega usnja (Czaplicka, 2004).

## 2.3 KLORIRANA ORGANSKA ONESNAŽEVALA

### 2.3.1 Načini onesnaževanja okolja

**Klorofenoli** se nahajajo (Czaplicka, 2004):

- v **zraku**, kot posledica sežiganja impregniranega lesa, premoga in drugih kontaminiranih proizvodnih odpadkov,
- v **zemlji**, kot produkt biodegradacije pesticidov, herbicidov oz. stranski produkt različnih tehnoloških procesov, v humusu pa lahko nastanejo tudi kot stranski produkt kloriranja vode,
- v **podtalnico ter površinski vodo** prodrejo spontano z reakcijami kislin;

### 2.3.2 Vpliv na človeka – toksikologija

**Lindan** je močan živčni strup. Lahko se nakopiči v maščobnem tkivu ter materinem mleku. Povzroča negativne krvne spremembe, živčne bolezni (preobčutljivost), pri poskusih na miših pa so odkrili, da povzroča tumor na jetrih (Unger in sod., 2001).

**Na-PCP** draži kožo in sluznico. Je rakotvoren, kar velja za vse klorofenole z več kot dvema atomoma klora. Rakotvornost klorofenolov je odvisna tudi od položaja Cl glede na

–OH skupnino (npr. 3,5-diklorofenol je bolj rakotvoren kot 2,6-diklorofenol). V človeški organizem prodre skozi kožo, oralno ter z dihanjem. Povzroča izgubo apetita, oslabelost, glavobole, motnje spanca ter izgubo koncentracije (Unger in sod., 2001).

**Permetrin** povzroča tresavico, izčrpanost, razburljivost, mišične krče ter motnje imunskega sistema. Dokazano je tudi rakotvoren (Unger in sod., 2001).

**PCB** draži sluznico nosu, grla in oči (Lovrenčič, 2001). Zelo počasi se izloča iz telesa, saj biološki razpolovni čas za PCB z več kot petimi Cl atomi znaša več let (Makovec, 2004).

## 2.4 BIOREMEDIACIJA SINTETIČNIH ORGANSKIH ONESNAŽEVAL

### 2.4.1 Načini odstranjevanja kloriranih organskih molekul iz okolja

V naravnem okolju poleg bioremediacije (z glivami in bakterijami) potekajo še trije načini transformacije klorofenolov v okolju neškodljive produkte (Czaplicka, 2004):

- Fotodegradacija (poteka v zraku ter vodnih okoljih)
- Sorpcija
- Oksidacija in evaporacija (poteka v vodnih okoljih)

**Fotodegradacija** obsega naslednje procese: fotooksidacijo, fotoredukcijo, fotosubstitucijo, fotodisociacijo ter fotoizomerizacijo. Kriteriji za uspešnost fotodegradacije so sposobnost absorpcije svetlobe, valovna dolžina sevanja, čas izpostavljenosti ter stanje okolja, v katerem poteka reakcija. V zraku poteka fotodegradacija s simultanim delovanjem fotolize in hidroksi radikala. V vodnih okoljih je fotodegradacija rezultat fotolize klorofenola ali reakcije klorofenola s kisikom in peroksi radikali, ustvarjenimi od sončne svetlobe.

Struktura končnih produktov je odvisna od strukture vhodne spojine, pH topila, vrste topila, letnega časa ter pH okolja. Pri fotodegradaciji 2,4,6-triklorofenola v vodni raztopini tako nastanejo diklorofenoli in monoklorofenoli. Kadar namesto vode kot topilo uporabimo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nastanejo 2,6-diklorobenzokinon, 2,6-diklorohidrokinon, 3,5-diklorokatehol, dihidroksitriklorobenzen ter trihidroksitriklorobenzen. Na hitrost



fotodegradacije ima glavni vpliv struktura spojine, še posebno položaj Cl atomov (npr. 3,5-diklorofenol je bolj reaktiven od 4,6-diklorofenola) (Czaplicka, 2004; Czaplicka, 2005).

Kadar se ostanki izgorevanja (pepel industrijskih odpadkov), kontaminirani s klorofenoli, z dežjem sperejo v vode, govorimo o **sorpciji**. Največkrat nato v vodah nastajajo sedimenti. Uspešnost sorpcije je odvisna od pH vode ter lipofilnosti klorofenolov (Czaplicka, 2004).

**Oksidacija** klorofenolov v naravnem okolju ni tako pomembna, kot prej omenjena postopka. Njena učinkovitost je odvisna od koncentracije raztopine v okolju in temperature okolja (višja temperatura pomeni tudi hitrejšo reakcijo).

**Evaporacija** klorofenolov je odvisna predvsem tlaka in temperature vodne raztopine, v kateri se nahaja klorofenol. Lahko poteka tudi v vodah, kjer je temperatura okolja do 20 °C (Czaplicka, 2004).

#### **2.4.2 Alternative bioremediacije kloriranih organskih molekul**

Poleg bioremediacije z glivami poznamo tudi bioremediacijo z bakterijami, ki lahko delujejo v aerobnih ali anaerobnih pogojih (preglednica 2). Večina klorofenolov je na razgradnjo v aerobnih pogojih odporna, saj Cl atomi ovirajo delovanje oksigenaz, ki so indikatorji degradacije aromatskih obročev. Kljub temu pa so v aerobnih pogojih z uporabo različnih kultur bakterij, uspešno razstrupili mnogo različnih klorofenolov. Nekatere izmed njih lahko razstrupimo tudi v anaerobnih pogojih, vendar je ta proces bistveno (2 do 10-krat) počasnejši, kar pa ne velja le za PCP, pri katerem je proces anaerobnega razstrupljanja hitrejši. Končni produkti deklorizacije PCP so bodisi Cl in CO<sub>2</sub> (aerobni pogoji), bodisi CH<sub>4</sub> (anaerobni pogoji) (Czaplicka, 2004).

Preglednica 2: Bakterijska bioremediacija (Czaplicka, 2004)

Bakterijska bioremediacija	Primeri razstrujenih klorofenolov	Uporabljene kulture
<ul style="list-style-type: none"><li>aerobna</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>2-klorofenol</li><li>2,4-diklorofenol, 2,6-diklorofenol</li><li>2,4,5-triklorofenol, 2,4,6-triklorofenol</li><li>3-metil-4-klorofenol</li><li>PCP</li></ul>	<i>Norcadia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Mycrobacterium</i> <i>Coeliacum</i> ;
<ul style="list-style-type: none"><li>anaerobna</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>2-klorofenol</li><li>2,4-diklorofenol, 2,6-diklorofenol</li><li>PCP</li></ul>	

### 2.4.3 Bioremediacija z glivami bele trohnobe

V procesu bioremediacije z glivami bele trohnobe so udeležene naslednje vrste encimov (Reddy, 1995):

- Lignin peroksidaze (LiP)
- Mangan peroksidaze (MnP)
- Lakaze (Lac)

**LiP** so ekstracelularni glikozilirani hemoproteini. Prvič so jih odkrili pri glivi bele trohnobe *Phanerochaete chrysosporium*, enako MnP (Anke, 1997). Ob prisotnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sprožijo eno-elektronsko oksidacijo aromatskih obročev lignina v kationske radikale, ki nato oksidirajo v benzilne alkohole in aldehide. Odstranitev glikozidnega dela ne zmanjša njihove encimske aktivnosti. Spojina mora imeti redoks potencial do 1.5 V, da LiP postanejo aktivne.

Slabost LiP je velikost. Molekula je prevelika, da bi prodrla v olesenelo celično steno, tudi če je le-ta že delno razgrajena. Njihova glavna prednost pa je nespecifičnost. Tako lahko oksidirajo tudi ligninu strukturno podobne kemijske spojine (Reddy, 1995; Tavzes, 2003).

**MnP** so ekstracelularni glikozilirani hemoproteini. Ob prisotnosti vodikovega peroksida oksidirajo Mn(II) v Mn(III) ione. Oksidirajo tudi številne fenolne substrate, vendar mnogo

počasneje, kot Mn(II) ione. Njihova aktivnost se poveča ob prisotnosti preprostih organskih kislin, pri depolimerizaciji lignina pa igrajo še pomembnejšo vlogo, kot LiP. Spojina mora imeti redoks potencial do 1.1 V, da MnP postanejo aktivne. (Reddy, 1995; Tavzes, 2003).

**Lac** (benzendiol kisikove oksireduktaze) so ekstracelularni glikoproteini, ki vsebujejo baker. Prvič so bile odkrite pri japonski drevesni vrsti *Rhus vernicifera* (Anke, 1997). Spadajo v majhno skupino encimov, imenovano »modre bakrove oksidaze«. Ob prisotnosti molekularnega kisika oksidirajo fenolne substrate v fenoksi radikale, ob ustreznih aditivih (npr. kisline) pa tudi nefenolne aromatske spojine (Reddy, 1995; Tavzes, 2003).

## 2.5 BIOREMEDIACIJA ANORGANSKIH SNOVI

Za bioremediacijo lesa, zaščitenege s pripravki na osnovi bakra (anorganska zaščitna sredstva), uporabljamo glive rjave trohnobe in bakterije (Humar in Pohleven, 2005). Peek in sodelavci (1993) so raziskovali uspešnost gliv *Antrodia vaillantii*, *Postia placenta* ter *Rigidopturus vitreus* pri razgradnji lesa, impregniranega z bakrovimi, kromovimi ter arzenovimi CCA, CC ter CCF pripravki. Iz borovega lesa, impregniranega z različnimi pripravki, se je po izpostavitvi glivam izpralo:

- Baker: v CCA in CC pod 2 %, v CCF 20 %,
- Krom: v CCA 50 do 60 %, v CC 80 %, v CCF 3 %,
- Arzen: v CCA 60 do 75 %;

## 2.6 NAMEN RAZISKAVE

Glive bele trohnobe v lesu razkrajajo predvsem lignin. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali so sposobne razkrajati organske biocide, ki so strukturno podobni ligninu; sorodna značilnost so aromatski obroči.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Testni organizmi

Iz banke gliv Biotehniška fakultete, Oddelka za lesarstvo, Katedre za patologijo in zaščito lesa smo uporabili naslednje izolate lesnih gliv:

- *Gloeophyllum trabeum* (navadna tramovka): št. izolata ZIM L018, oznaka seva Gt2,
- *Hypoxylon fragiforme* (ogljena kroglica): št. izolata ZIM L108, oznaka seva Hf,
- *Pleurotus ostreatus* (bukov ostrigar): izolat brez oznake (izoliran leta 1998), oznaka seva Plo5,
- *Trametes versicolor* (pisana ploskocevka): izolat brez oznake (izoliran leta 1998), oznaka seva Tv6;

*Gloeophyllum trabeum* je gliva povzročiteljica rjave trohnobe, ki se pojavlja na vgrajenem lesu, izpostavljenemu zunanjim pogojem (les v stiku z zemljo in betonom, strešni tramovi, rudniški les, železniški pragovi, leseni čolni...). Najbolj razširjena je v Evropi, Severni Ameriki, Avstraliji ter nekaterih afriških državah. Okuži in razkraja tako iglavce, kot tudi listavce. Optimalna pogoji za rast:  $T = 35 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $u_{\text{lesa}} = 30 - 50 \%$ . Rast variira od 6 do 11,4 mm na dan. Gliva je tolerantna na arzen ter baker in lahko preživi do 10 let v zračno suhem lesu (Eaton in Hale, 1993).

*Hypoxylon fragiforme* je gliva, ki spada v skupino *ascomycotina* (zaprtotrosnice). Razširjena je v Evropi in Severni Ameriki, okužuje pa listavce (*Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Populus*, *Quercus*, *Sorbus* in *Tilia*). Na bukovini (*Fagus sylvatica*) se pojavlja kot primarna saprofitska gliva (*Hypoxylon fragiforme*, 2006).

*Pleurotus ostreatus* je po svetu zelo razširjena saprofitska gliva bele trohnobe, ki največkrat okuži listavce, posebno bukovino, veliko manj se pojavlja na iglavcih. Okuži tudi furnirske plošče in lesna tvoriva; zaradi tega je bila določena kot testna gliva v

evropskem standardu. Gojijo jo tudi v prehrabene namene. Pri  $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ki je optimalna, zraste 7,5 mm na dan (Eaton in Hale, 1993).

*Trametes versicolor* je gliva bele trohnobe, ki se pojavlja na poškodovanih ali odpadlih drevesih, zelo pogosto tudi na hlodovini in štorih listavcev, razen hrasta in kostanja. Občasno se pojavlja tudi na štorih iglavcev, jamskem lesu ter železniških pragovih in lesu, ki ni v neposrednem stiku z zemljo. Razširjena je predvsem v deželah z zmerno klimo. Optimalni pogoji za rast:  $T = 30 - 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $u_{\text{lesa}} = 40 - 45\%$  (uspešno raste tudi pri višji vlažnosti lesa). Zraste do 15 mm na dan, je tolerantna na organske pripravke, občutljiva pa na bakrove in cinkove soli (Eaton in Hale, 1993).

### 3.1.2 Kemikalije

#### Testne substance (biocidi):

- Lindan (1,2,3,4,5-pentakloro-6-(klorometil)cikloheksan), kataloška številka 233390, proizvajalec Sigma-Aldrich,
- Na-PCP (natrijev pentaklorofenolat), kataloška številka 76480, proizvajalec Fluka,
- PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil), kataloška številka 35602, proizvajalec Sigma-Aldrich,
- Permetrin (3-fenoksibenzil(1-rs)-cis,trans-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat), kataloška številka 45614, proizvajalec Sigma-Aldrich;

#### Topilo:

- DMSO (dimetilsulfoksid), proizvajalec Kemika Zagreb

#### Hranilno gojišče:

- PDA (krompirjev glukozni agar), proizvajalec Difco

### 3.1.3 Laboratorijska oprema in inventar

- Tehnica, proizvajalec Tehnica,
- Avtomatska pipeta 100  $\mu$ L, proizvajalec Ependorf,
- Avtomatska pipeta 1 – 5 mL, proizvajalec Ependorf,
- Laminarij, proizvajalec Kambič,
- Avtoklav, proizvajalec Sutjeska Zagreb;

## 3.2 METODA DELA

### 3.2.1 Ugotavljanje rasti micelija glive pri različnih koncentracijah izbranih testnih substanc

Eksperimentalno določanje rasti micelija izbranih gliv (3.1.1) pod vplivom različnih koncentracij izbranih kemikalij (3.1.2) je potekalo na Katedri za patologijo in zaščito lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

#### Priprava:

Prva faza je bila sterilizacija steklovine. Najprej smo jo oprali z detergentom, nato splaknili v destilirani vodi ter 70 % etanolu, na koncu pa še 30 min avtoklavirali pri tlaku 1,5 bar in temperaturi 121 °C. Temu je sledila priprava PDA gojišča s koncentracijo 39 g PDA / L vode. Tretja stopnja je obsegala pripravo izbranih kemikalij (3.1.2) v šestih različnih koncentracijah: 20; 6,595; 2,175; 0,717; 0,236 ter 0,078 mmol/L.

#### Izvedba:

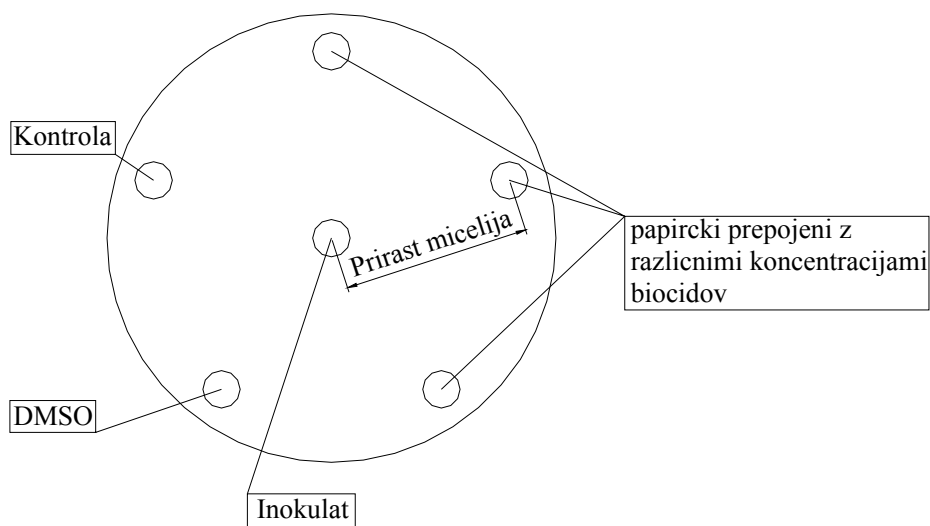
Za vsak testni organizem (3.1.1) smo pripravili dve petrijevki. V posamezno petrijevko smo nalili **od 15 do 20 mL** tekočega PDA gojišča, ki se je z ohladitvijo strdilo.

Nato smo v vsako izmed petrijevok vstavili pet filtrnih papirčkov:

- tri filtrne papirčke prepojene s **100 µL** biocida (3.1.2) (v prvo paralelko koncentracije 20 do 6,595 mmol/L, v drugo koncentracije 0,717 do 0,078 mmol/L),
- en filtrni papirček, prepojen s **100 µL** topila DMSO,
- en filtrni papirček, brez biocida oz. topila DMSO (kontrola);

Zgoraj opisan proces smo še dvakrat ponovili, tako da smo poizkus izvedli v treh paralelkah. Za posamezno kemikalijo (3.1.2) smo tako pripravili 24 petrijevok oz. 120 filtrnih papirčkov, saj je bil poizkus izveden s štirimi glivami.

V zadnji fazi smo trda gojišča v petrijevkah s filtrnimi papirčki inokulirali z micelijem izbrane glive (3.1.1). Vse petrijevke smo nato zložili v rastno komoro. Prirast micelija posamezne glive smo merili vsakih dva dni na mm natančno, celotno rast smo spremljali tri tedne (slika 1).



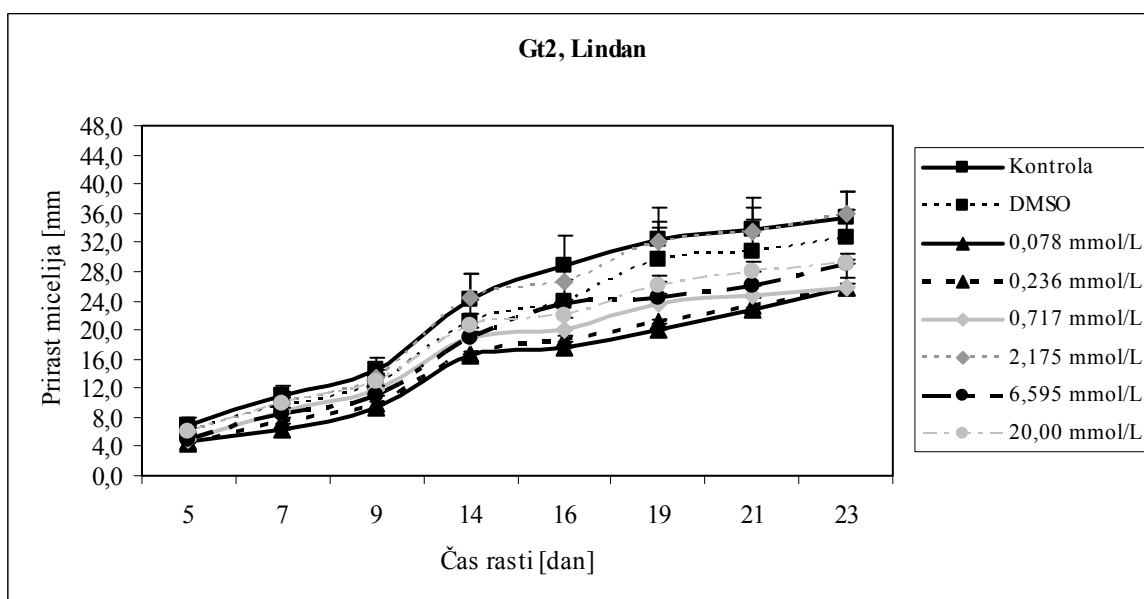
Slika 1: Shema testne petrijevke s petimi filtrnimi papirčki

## 4 REZULTATI

### 4.1 LINDAN

#### 4.1.1 *Gloeophyllum trabeum*

Prirast micelija smo spremljali od petega dneva po inokulaciji do 23 dneva rasti. Gliva je najmanj intenzivno rasla pri koncentraciji 0,078 mmol/L (iz začetnih 5 mm na končnih 26 mm), najbolj je zrasla pri koncentraciji 2,175 mmol/L (iz začetnih 6 mm na končnih 36 mm). Na splošno je bilo priraščanje pri vseh koncentracijah zavrtlo, saj je bila rast v smeri z biocidi prepojenih, počasnejša od kontrolnih papirčkov (slika 2).

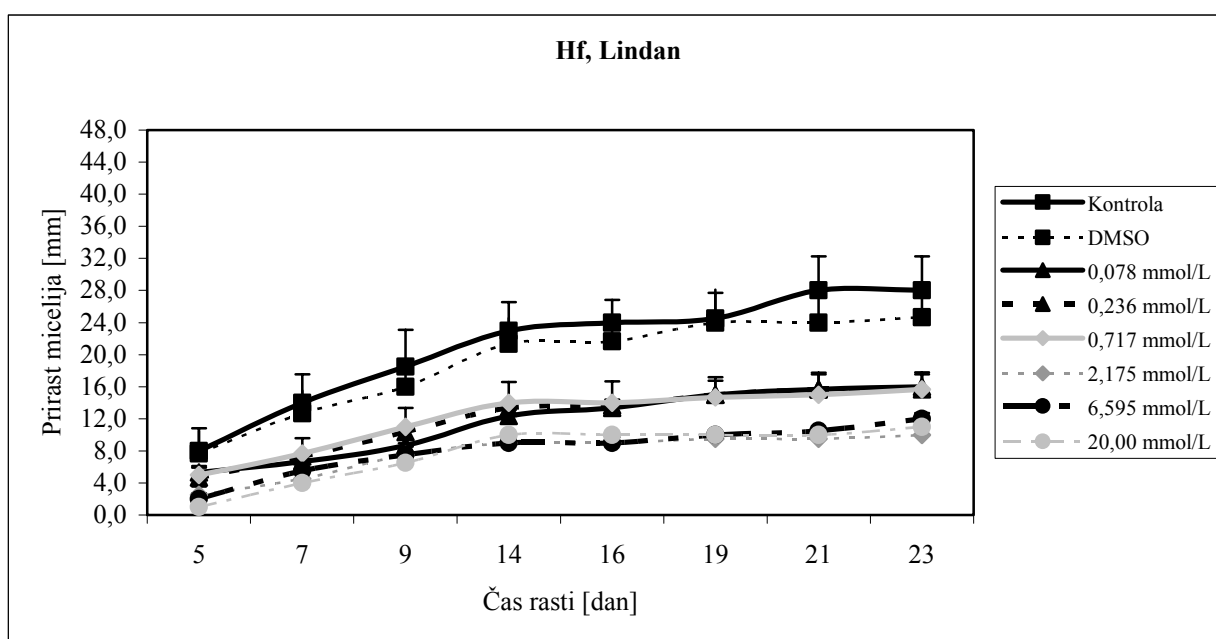


Slika 2: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive *Gloeophyllum trabeum*



#### 4.1.2 *Hypoxylon fragiforme*

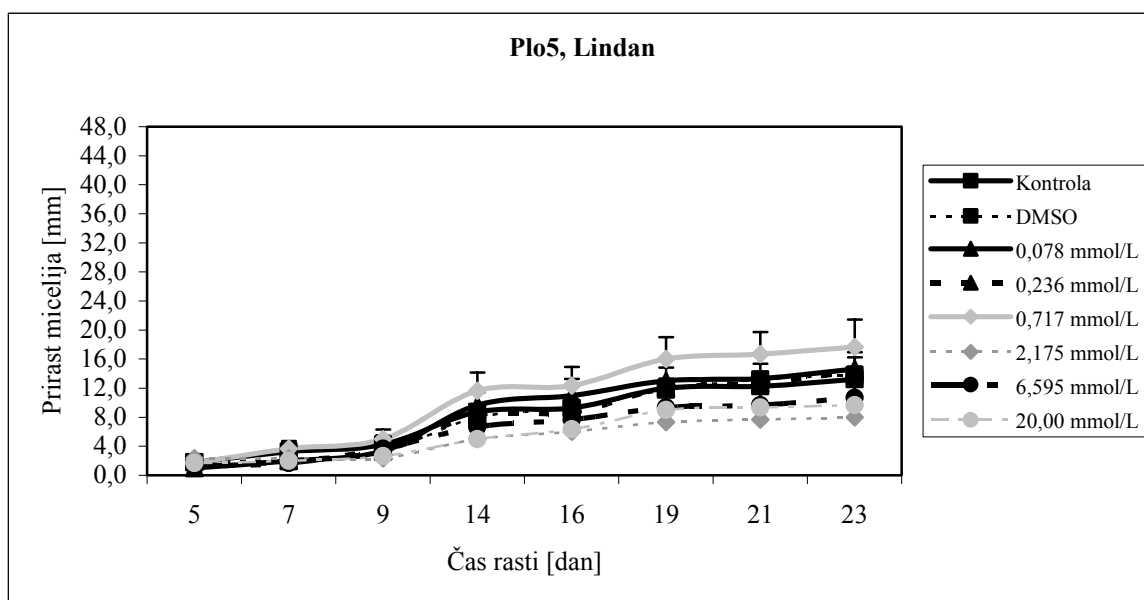
Rast micelija ogljene kroglice je bila zelo zavrta pri vseh koncentracijah Lindana, najbolj pa so jo zavrle višje koncentracije (2,175 mmol/L; 6,595 mmol/L ter 20 mmol/L). Razlika med ekstremoma rasti je bila najnižja na začetku (5. dan), maksimalno razliko je gliva dosegla v 21 dnevu rasti (18 mm), na koncu je znašala 1 mm manj. Za razliko od z biocidi prepojenih, je gliva bolj rasla v smeri kontrolnih papirčkov (slika 3).



Slika 3: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive *Hypoxylon fragiforme*

#### 4.1.3 *Pleurotus ostreatus*

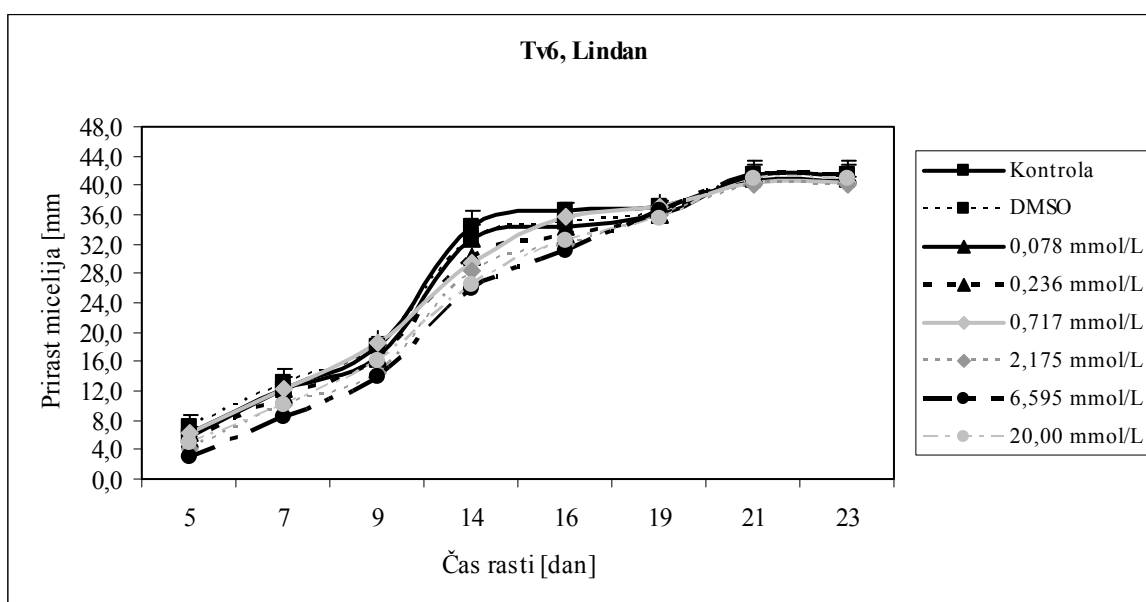
Micelij ostrigarja je bil pri koncentraciji Lindana v papirčkih 0,717 mmol/L dokaj stimuliran, rast je bila na 23. dan za polovico intenzivnejša, kot pri kontroli. Rast je bila najnižja v smeri papirčka s koncentracijo 2,175 mmol/L, kjer je gliva v 18 dneh zrasla za 6 mm (iz začetnih 2 mm na končnih 8 mm). Lindan na začetku skoraj ne vpliva na rast ostrigarja, razlike v rasti opazimo od 9 dneva dalje. Na koncu razlika med ekstremoma rasti znaša 10 mm (slika 4).



Slika 4: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive *Pleurotus ostreatus*

#### 4.1.4 *Trametes versicolor*

Lindan pri vseh koncentracijah ni bistveno vplival na rast micelija pisane ploskocevke. Gliva je najmanj prerasla papirček s koncentracijo 6,595 mmol/L, iz začetnih 3 mm je zrasla na končnih 41 mm. Najboljši prirast se je pojavil pri papirčku s topilom DMSO, iz začetnih 7 mm je gliva na papirček zrasla na končnih 41 mm. Razlike v rasti med različnimi koncentracijami so bile zelo majhne, saj maksimum znaša 5 mm (14. dan), na koncu bistvenih razlik med ekstremoma ni bilo (slika 5).

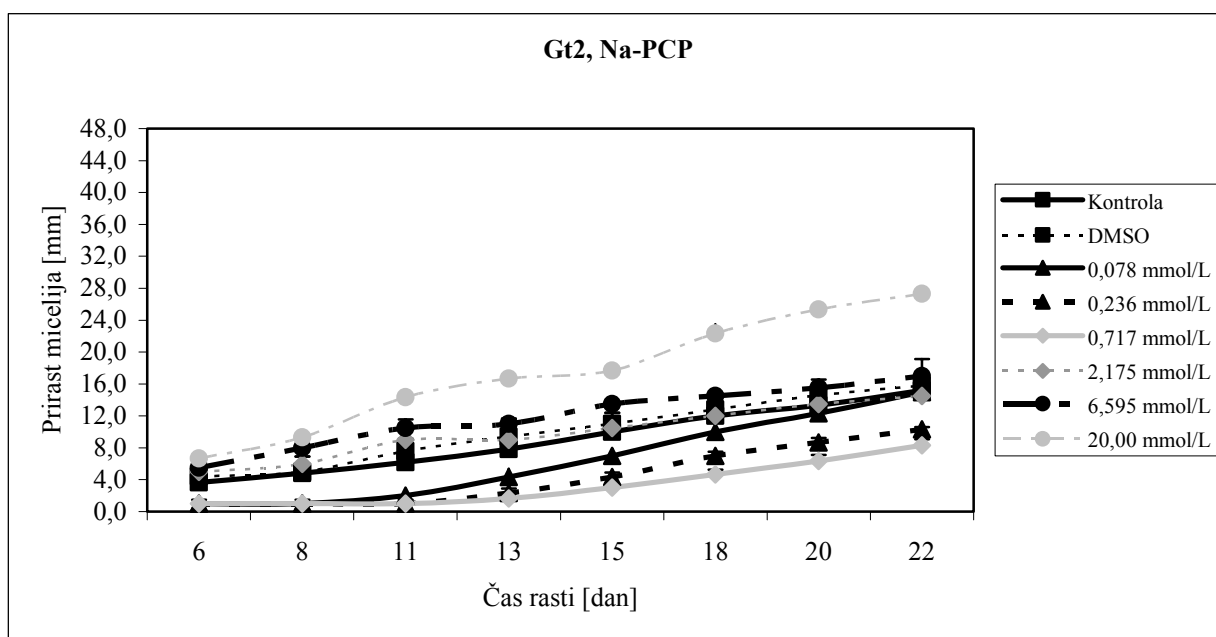


Slika 5: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Lindana na rast micelija glive *Trametes versicolor*

## 4.2 NATRIJEV PENTAKLOROFENOLAT

### 4.2.1 *Gloeophyllum trabeum*

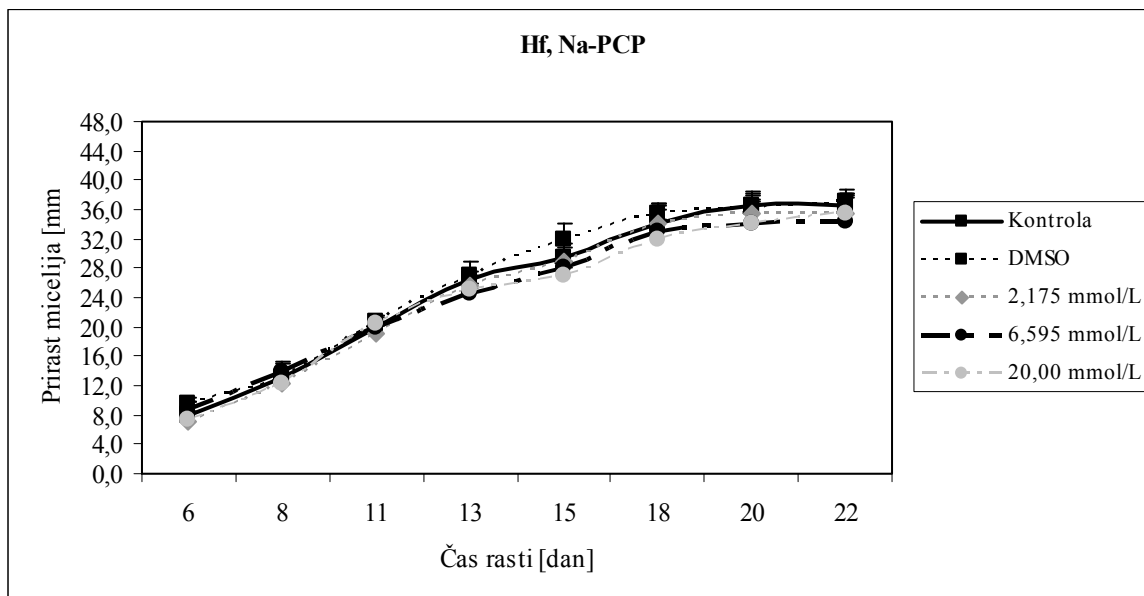
Rast glive v petrijevkah s papirčki, prepojenimi z Na-PCP je trajala 22 dni, merili smo jo 16 dni, od 6 dneva dalje. Micelij je izkazal najnižjo rast pri koncentraciji 0,717 mmol/L (iz začetnega 1 mm na končnih 8 mm), pospešeno pa je tramovka zrasla pri koncentraciji 20 mmol/L (iz začetnih 7 mm na končnih 27 mm). Na splošno so papirčki, prepojeni z višjimi koncentracijami Na-PCP, stimulirali rast micelija tramovke. Razlika med omenjenima ekstremoma rasti je bila najnižja na začetku (5. dan), najvišja pa na koncu (22. dan) (slika 6).



Slika 6: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive *Gloeophyllum trabeum*

#### 4.2.2 *Hypoxylon fragiforme*

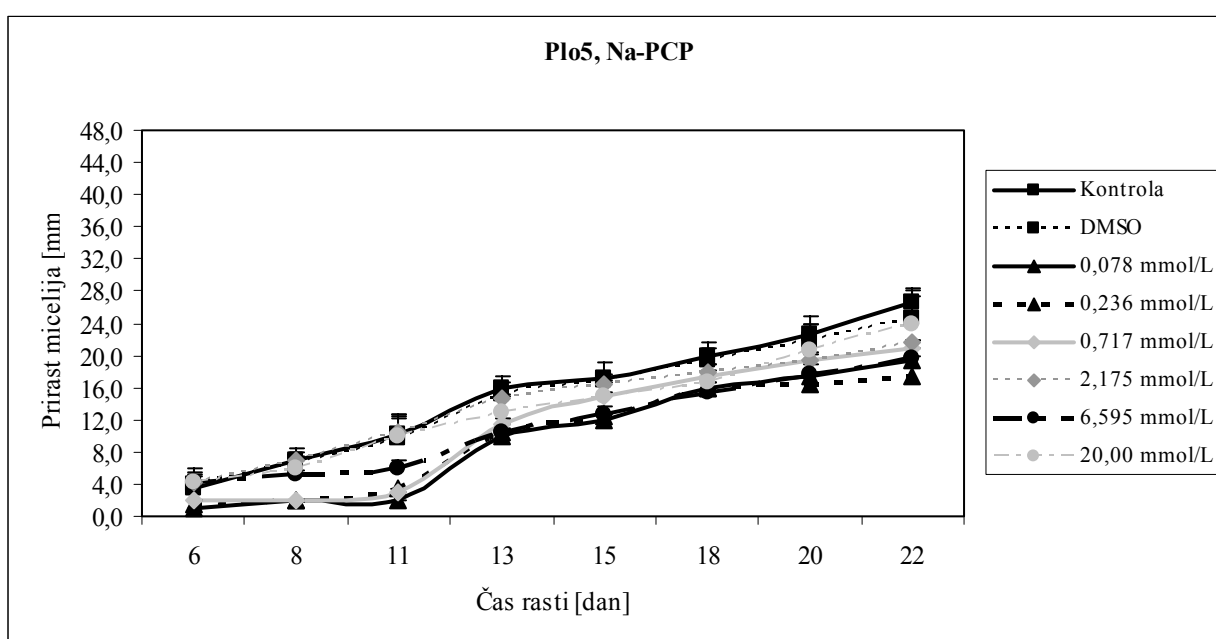
V 22 dneh rasti Na-PCP ni imel bistvenega vpliva na rast ogljene kroglice pri vseh uporabljenih koncentracijah, saj je bila rast zelo podobna kontrolnim vrednostim (slika 7).



Slika 7: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive *Hypoxylon fragiforme*

#### 4.2.3 *Pleurotus ostreatus*

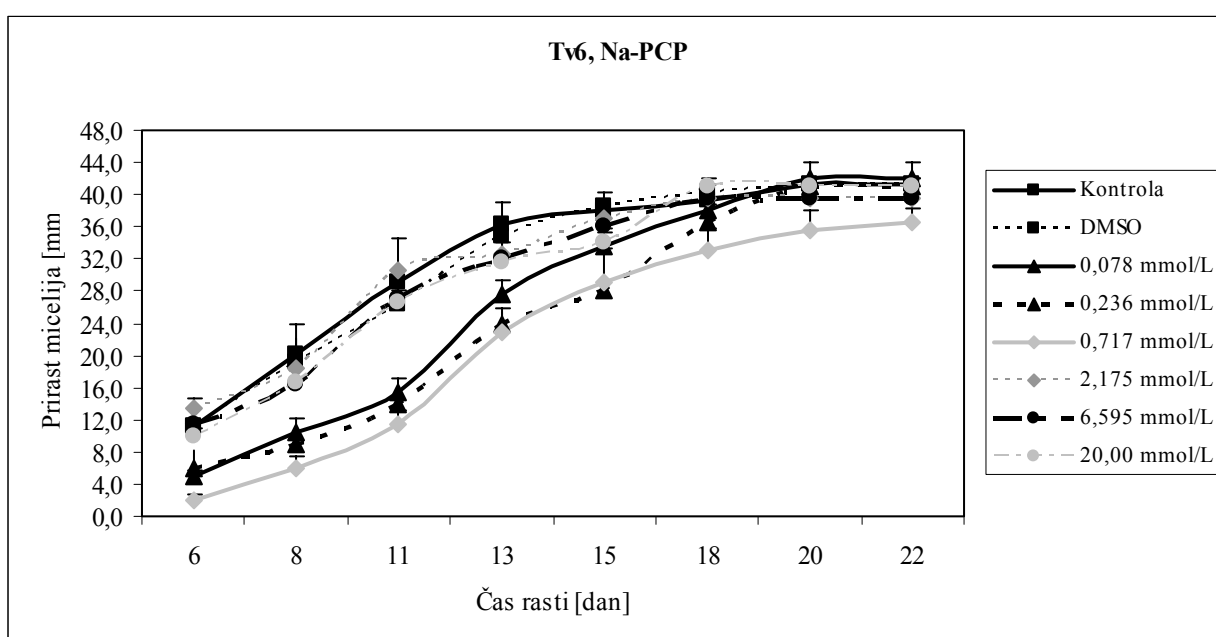
Rast micelija ostrigarja je bila najnižja pri papirčku s koncentracijo 0,236 mmol/L, kjer je gliva v 16 dneh zrastle za 16 mm (iz začetnih 1,5 mm na končnih 17,5 mm). Najboljša rast je bila pri kontrolnem papirčku (iz začetnih 3 mm na končnih 27 mm). Na splošno so vse koncentracije Na-PCP nekoliko zavrle rast micelija, ekstremnih razlik pa nismo opazili (slika 8).



Slika 8: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive *Pleurotus ostreatus*

#### 4.2.4 *Trametes versicolor*

Na splošno je bila rast micelija pisane ploskocevke pri vseh koncentracijah Na-PCP nižja od kontrole. Gliva je najmanj obrasla papirček s koncentracijo 0,717 mmol/L, iz začetnih 2 mm je zrasla na končnih 37 mm. Razlika med kontrolo in rastjo na papirček s koncentracijo 0,717 mmol/L je bila največja na začetku, nato se ustali ter na koncu znaša le 5 mm (slika 9).

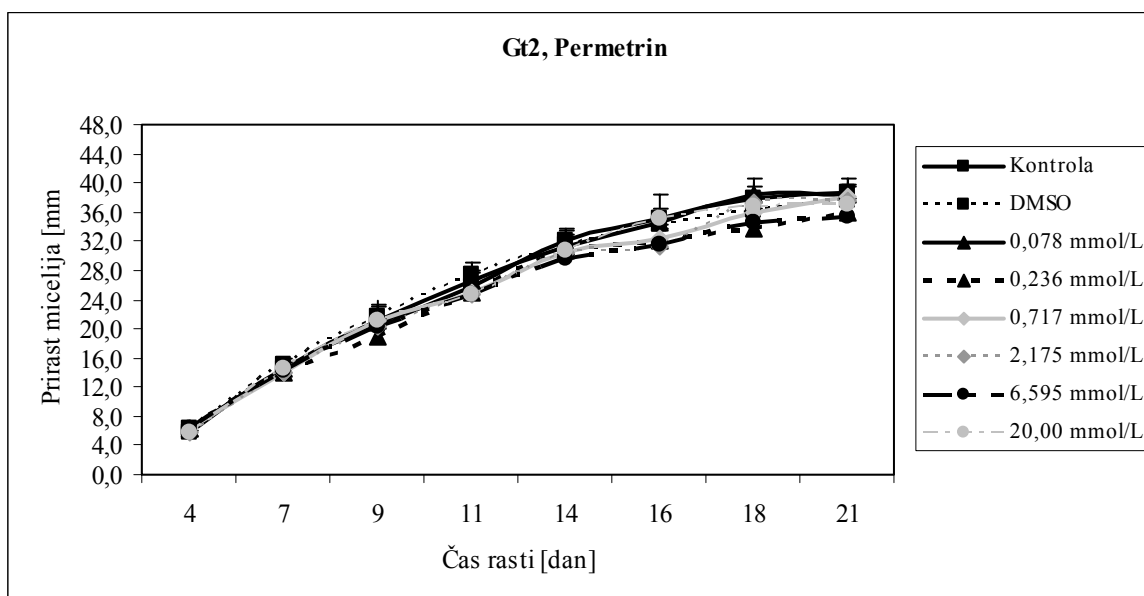


Slika 9: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Na-PCP na rast micelija glive *Trametes versicolor*

### 4.3 PERMETRIN

#### 4.3.1 *Gloeophyllum trabeum*

Glivo smo inkubirali 21 dni, rast smo merili 17 dni (od 4 dneva dalje). Permetrin na splošno ni vplival na rast micelija tramovke, saj je bila le-ta ves čas primerljiva s tisto pri kontroli. Razlike v rasti glive so bile zelo majhne, saj je polmer micelija 4. dan povsod znašal približno 6 mm. Torej Permetrin ni zaviral rasti, kar nakazuje na to, da tramovka morda razkraja ta biocid (slika 10).

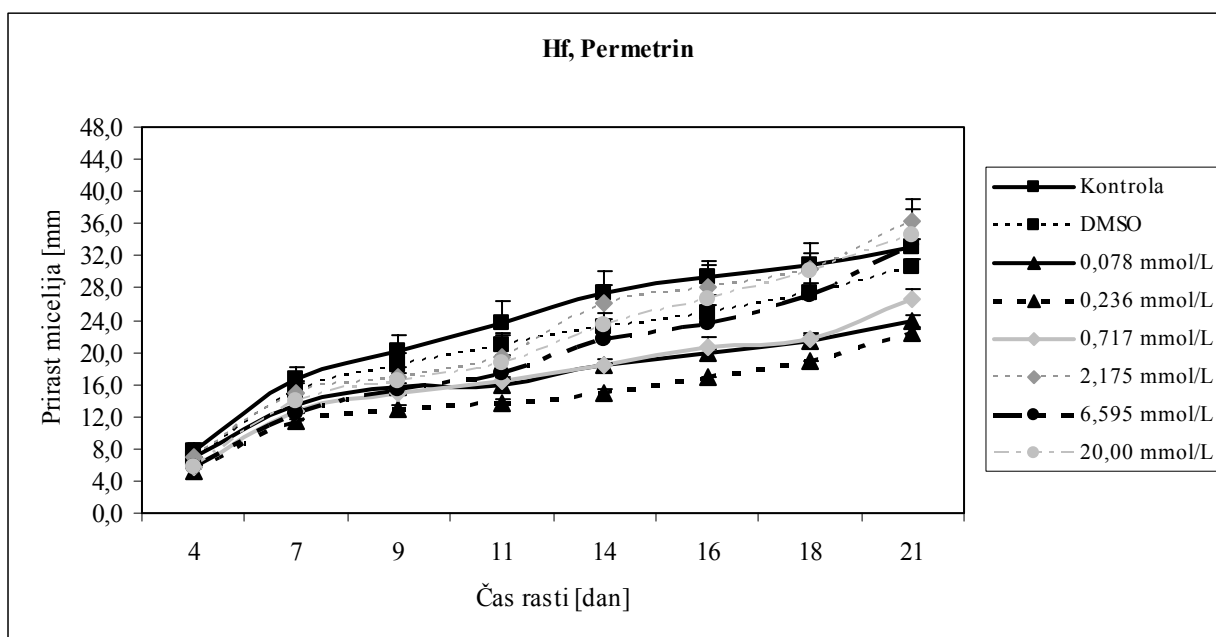


Slika 10: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive *Gloeophyllum trabeum*



### 4.3.2 *Hypoxylon fragiforme*

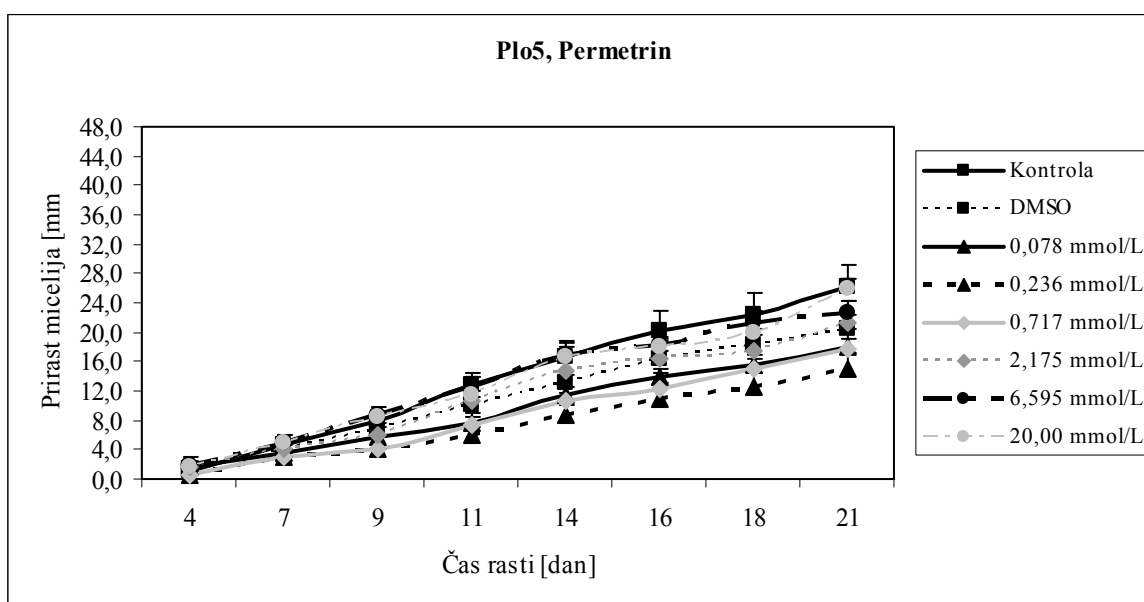
V 21 dneh rasti sta micelij ogljene kroglice najbolj zavrli koncentraciji 0,236 mmol/L ter 0,078 mmol/L. V primerjavi s kontrolo je micelij najbolj prerasel papirček s koncentracijo 2,175 mmol/L ter 20 mmol/L — razlika med omenjenima koncentracijama in kontrolo je bila najvišja v 11 dnevu rasti, na koncu je bila zanemarljiva (slika 11).



Slika 11: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive *Hypoxylon fragiforme*

### 4.3.3 *Pleurotus ostreatus*

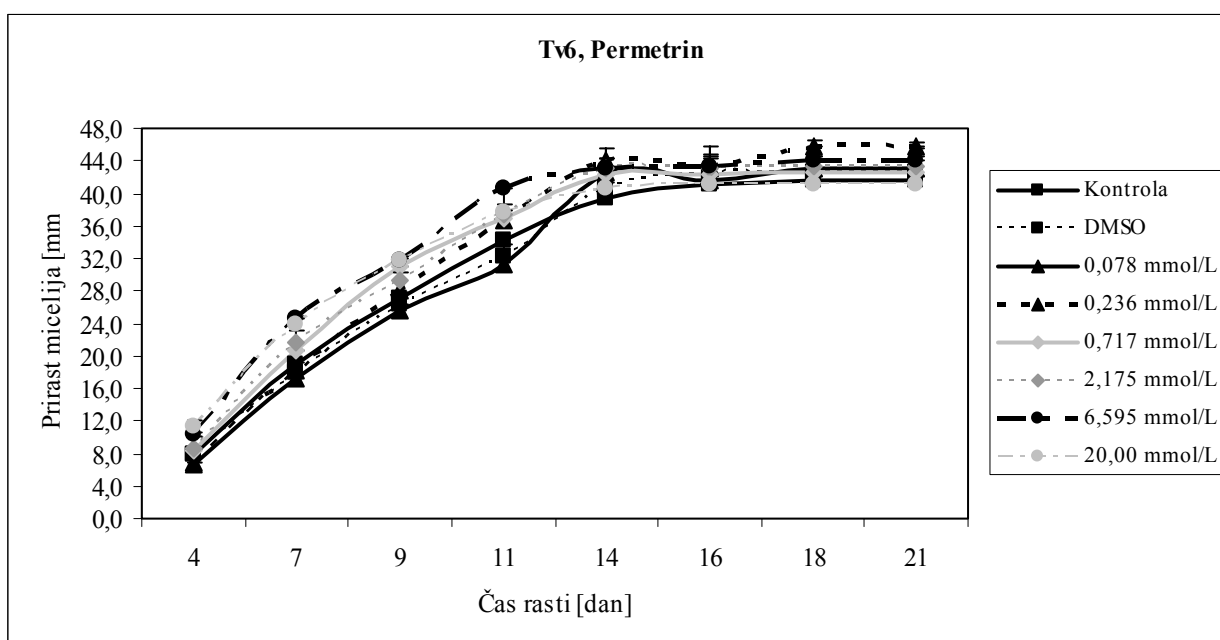
Vse koncentracije Permetrina so na splošno zavirale rast micelija ostrigarja ali pa je bila rast na impregniranih papirčkih podobna kontrolnim vrednostim. Rast glive je bila najnižja na papirček s koncentracijo 0,236 mmol/L, kjer je gliva v 17 dneh zrasla za 14 mm (iz začetnih 1 mm na končnih 15 mm). Najbolj je gliva rasla pri koncentraciji 20 mmol/L (iz začetnih 2 mm na končnih 26 mm). Razlike med omenjeno koncentracijo in kontrolo so najvišje v 18 dnevu rasti, na koncu razlike skoraj nismo opazili (slika 12).



Slika 12: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive *Pleurotus ostreatus*

#### 4.3.4 *Trametes versicolor*

Gliva je najmanj prerasla papirček s koncentracijo 20 mmol/L Permetrina, saj je kljub najboljši začetni rasti 11 mm dosegla minimalnih 41 mm. Pospešena rast se je pojavila pri papirčku s koncentracijo 6,595 mmol/L, saj je iz začetnih 10 mm micelij zrasel na končnih 44 mm. Razlike v rasti med različnimi koncentracijami so bile relativno majhne, saj je začetna razlika znašala 4 mm, maksimalna pa 9 mm (11. dan), na koncu je razlika med ekstremoma znašala le 3 mm (slika 13).

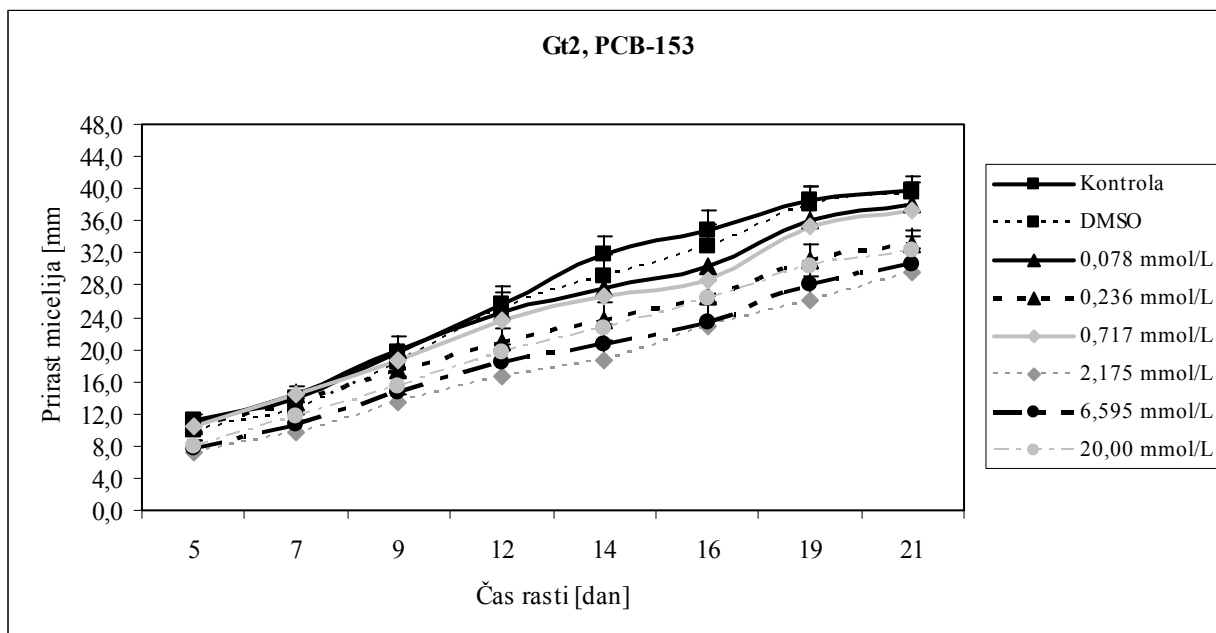


Slika 13: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami Permetrina na rast micelija glive *Trametes versicolor*

#### 4.4 POLIKLORIRANI BIFENIL

##### 4.4.1 *Gloeophyllum trabeum*

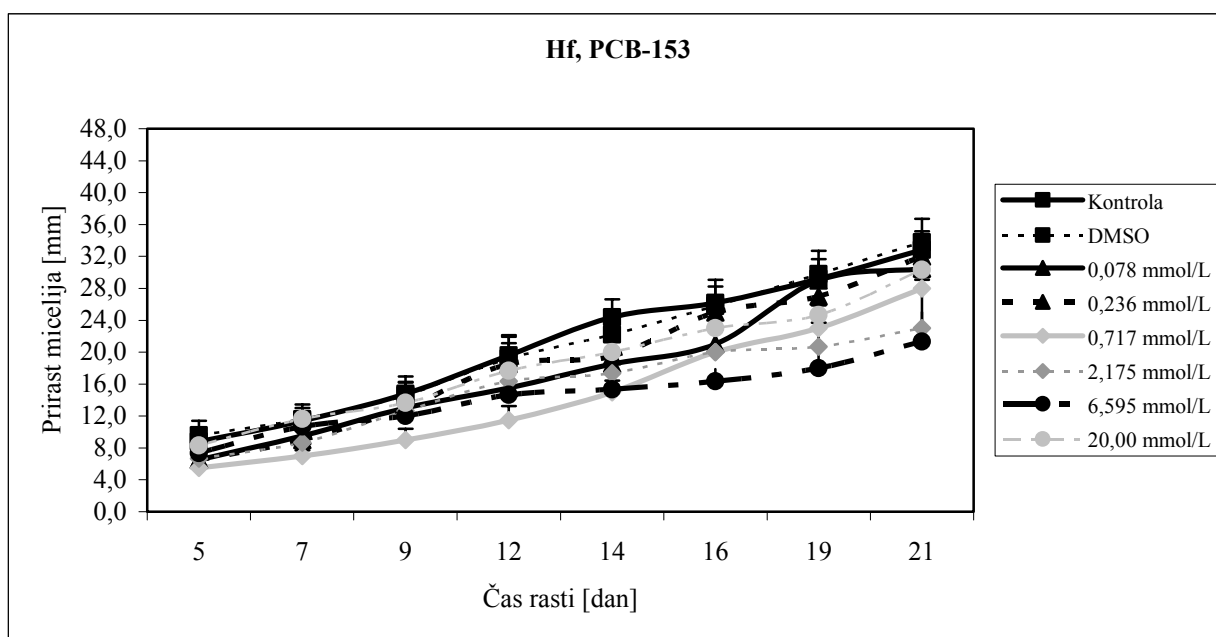
Poskus s polikloriranim bifeniлом je trajal 21 dni, prirast glive pa smo merili 16 dni (od 5 dneva dalje). Gliva je pokazala najnižjo rast pri koncentraciji 2,175 mmol/L (iz začetnih 7 mm na končnih 30 mm). V povprečju je bila rast na impregviranih papirčkih najbolj inhibirana pri visokih koncentracijah PCB (slika 14).



Slika 14: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelijja glive *Gloeophyllum trabeum*

#### 4.4.2 *Hypoxylon fragiforme*

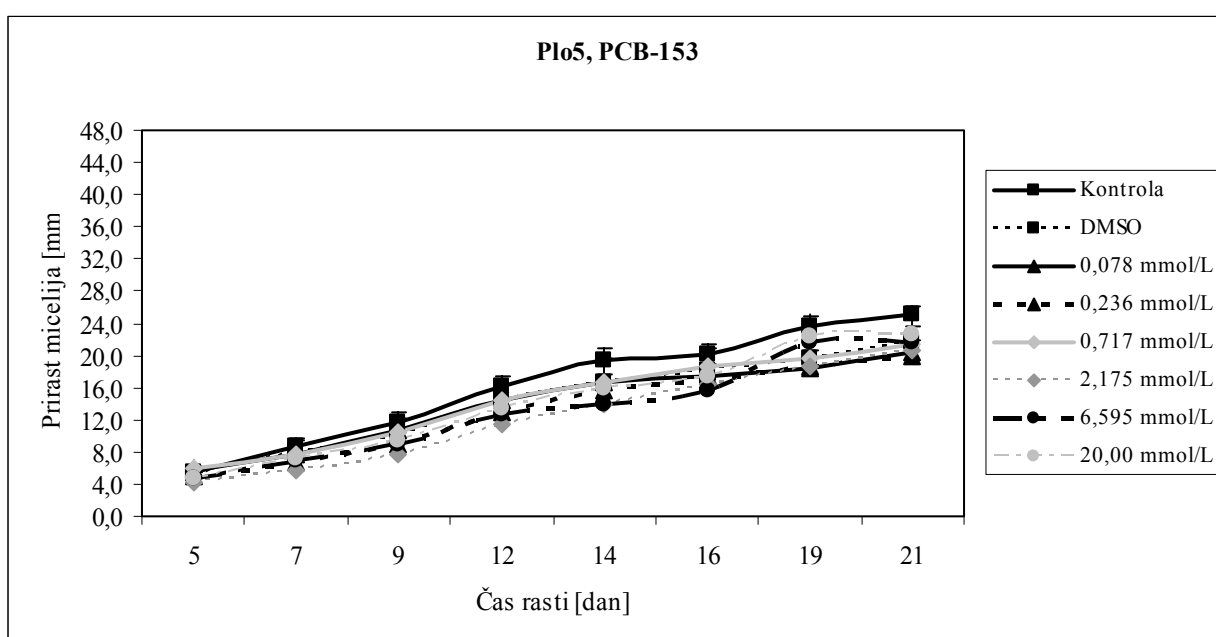
Vse koncentracije so zavrle rast micelija ogljene kroglice, saj je bila ta na vseh papirčkih, impregniranih s PCB nižja od kontrole. Najbolj je gliva zrasla pri koncentraciji 0,236 mmol/L. Razlika med impregniranimi papirčki je bila največja v 14 dnevu rasti. Rast glive na splošno je najbolj zavrla koncentracija 0,717 mmol/L (slika 15).



Slika 15: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive *Hypoxylon fragiforme*

#### 4.4.3 *Pleurotus ostreatus*

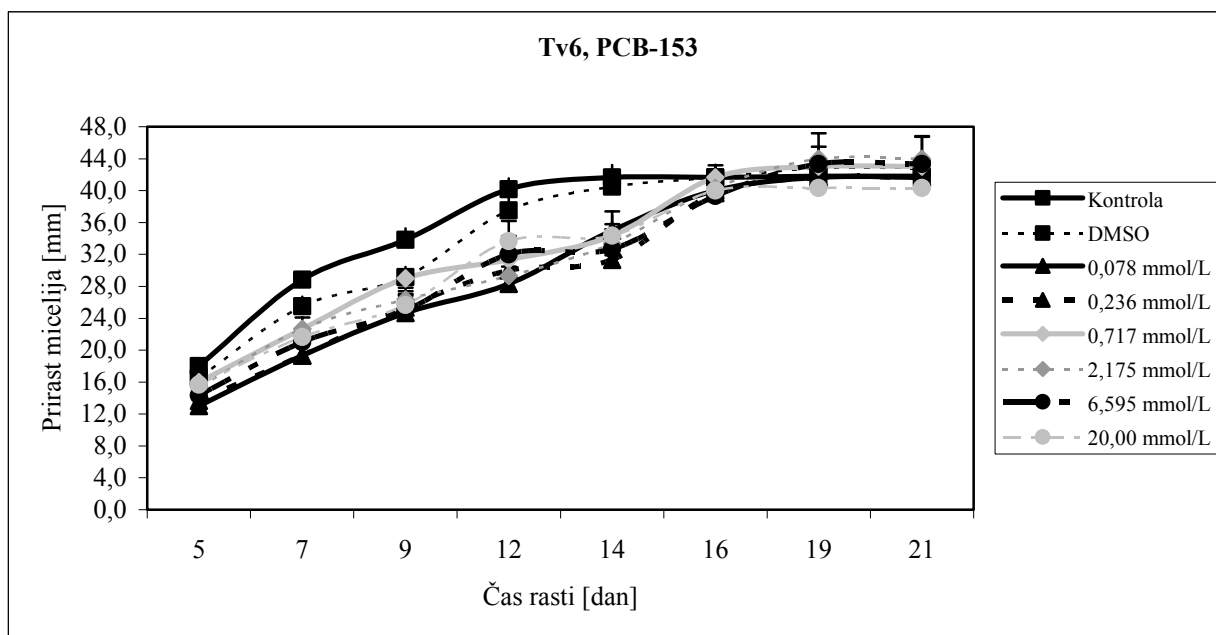
Rast micelija ostrigarja je bila pri vseh koncentracijah biocida zavirana, najbolj pri 0,236 mmol/L, najmanj pri koncentraciji 20 mmol/L. Največji ekstrem v rasti je nastopil v 14. dnevu, kjer je gliva najmanj zrasla pri koncentracijah 6,595 mmol/L in 2,175 mmol/L. Najbolj pa je v tem dnevu gliva prirasla k papirčku s koncentracijo 0,717 mmol/L (slika 16).



Slika 16: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive *Pleurotus ostreatus*

#### 4.4.4 *Trametes versicolor*

V začetku poskusa je PCB pri vseh koncentracijah biocida zavrl rast pisane ploskocevke, v 16 dnevih pa je bila rast proti impregniranim papirčkom hitrejša, kot na kontrolni papirček. Tako je gliva na koncu najmanj zrasla na papirček s koncentracijo 20 mmol/L (40 mm), najbolj pa je prerasla papirček s koncentracijo 2,175 mmol/L (44 mm) (slika 17).



Slika 17: Vpliv papirčkov, prepojenih z različnimi koncentracijami PCB na rast micelija glive *Trametes versicolor*

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Na štirih različnih biocidih (Lindan, natrijev pentaklorofenolat, Permetrin ter poliklorirani bifenil) smo testirali uspešnost bioremediacije s štirimi različnimi vrstami gliv in sicer *Gloeophyllum trabeum*, *Hypoxylon fragiforme*, *Pleurotus ostreatus* in *Trametes versicolor*. Rast micelija je bila odvisna od vrste glive ter od vrste in koncentracije biocida (preglednica 3).

Preglednica 3: Rast različnih inokulatov gliv na različnih organskih spojinah po več kot 20 dneh

oznaka seva	konc. sredstva [mmol / L]	Gt2		Hf		Plo5		Tv6	
		<i>P*</i> [mm]	<i>SD**</i> [mm]	<i>P*</i> [mm]	<i>SD**</i> [mm]	<i>P*</i> [mm]	<i>SD**</i> [mm]	<i>P*</i> [mm]	<i>SD**</i> [mm]
Lindan	Kontrola	35,3	3,7	28,0	4,2	13,3	1,7	40,6	0,4
	DMSO	32,8	3,7	24,7	4,3	13,8	1,1	41,4	1,4
	0,078	25,7	0,8	16,0	1,8	14,7	2,3	41,3	2,0
	0,236	25,7	1,4	15,7	1,9	14,3	1,9	41,3	1,3
	0,717	25,7	3,3	15,7	1,9	17,7	3,8	40,3	2,3
	2,175	36,0	2,8	10,0	0,0	8,0	0,9	40,0	0,7
	6,595	29,0	1,4	12,0	0,7	10,7	2,8	41,5	0,4
	20,00	29,0	0,7	11,0	0,0	9,7	2,4	41,0	0,0
Na-PCP	Kontrola	15,2	1,4	36,7	1,6	26,6	1,7	41,4	0,6
	DMSO	15,8	0,7	37,0	1,8	24,6	3,4	41,2	0,4
	0,078	15,0	1,0	-	-	19,5	0,4	42,0	2,1
	0,236	10,3	0,3	-	-	17,5	1,8	41,0	0,7
	0,717	8,3	0,8	-	-	21,0	2,1	36,5	1,8
	2,175	14,5	1,8	35,3	3,2	21,7	0,3	39,7	1,3
	6,595	17,0	2,1	34,3	3,6	19,7	1,2	39,7	1,0
	20,00	27,3	0,8	35,3	2,3	24,0	3,3	41,0	1,0
Permetrin	Kontrola	38,7	1,9	33,2	0,9	26,3	3,1	41,7	1,2
	DMSO	37,5	2,2	30,5	1,2	20,5	1,8	42,5	2,0
	0,078	38,3	1,8	24,0	0,5	18,0	1,0	43,0	1,0
	0,236	36,0	1,8	22,3	0,8	15,0	2,2	45,7	1,0



	0,717	38,0	0,5	26,7	1,2	17,7	2,8	42,7	2,0
	2,175	37,7	0,6	36,3	2,3	21,3	0,8	43,3	2,1
	6,595	35,3	2,3	33,3	4,5	22,7	1,6	44,0	1,7
	20,00	37,0	2,6	34,7	1,5	26,0	1,3	41,0	1,0
PCB-153	Kontrola	39,8	0,9	32,8	2,3	25,2	1,1	41,8	1,2
	DMSO	39,5	2,0	33,8	2,9	21,7	1,9	42,8	0,6
	0,078	38,0	1,8	30,5	1,8	20,3	1,3	41,7	1,3
	0,236	33,0	1,8	32,0	2,8	20,0	1,0	41,7	0,8
	0,717	37,3	0,3	28,0	1,4	21,3	1,2	43,0	0,9
	2,175	29,7	2,3	23,0	6,1	20,7	2,0	44,0	1,0
	6,595	30,7	3,4	21,3	3,7	21,7	1,4	43,3	0,8
	20,00	32,3	2,8	30,3	2,9	22,7	0,3	40,3	1,5

\**P* = povprečna rast

\*\**SD* = standardni odklon

### 5.1.1 *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor* je na splošno dobro rasla na vseh štirih organskih spojinah. Njena minimalna rast je znašala 36 mm pri 0,717 mmol/L natrijevega pentaklorofenolata, maksimalno pa je gliva zrasla 45 mm pri 0,236 mmol/L Permetrina.

Pri preraščanju:

- Lindana ni statistično značilnih razlik,
- natrijevega pentaklorofenolata so razlike veliko večje (6 mm), minimum rasti znaša 36 mm pri 0,717 mmol/L, maksimum rasti pa nastopi pri koncentraciji 0,078 mmol/L in znaša 42 mm,
- Permetrina je razlika podobna prej navedeni (5 mm), minimum znaša 41 mm pri koncentraciji 20 mmol/L, maksimum rasti pa je 45 mm pri 0,236 mmol/L,
- polikloriranega bifenila razlika znaša 4 mm, minimum nastopi pri koncentraciji 20 mmol/L ter znaša 40 mm, maksimum pa je 44 mm (koncentracija 2,175 mmol/L);

### 5.1.2 *Pleurotus ostreatus*

*Pleurotus ostreatus* je najslabše prenašal prisotnost katerega koli biocida, razen natrijevega pentaklorofenolata. Minimalna rast glive znaša 8 mm pri 2,175 mmol/L Lindana, maksimalna pa 26 mm pri 20 mmol/L Permetrina.

Pri preraščanju:

- Lindana so razlike v rasti glive relativno visoke (10 mm), minimum znaša 8 mm pri 2,175 mmol/L, maksimum pa 17 mm pri koncentraciji 0,717 mmol/L,
- natrijevega pentaklorofenolata so razlike nekoliko manjše (7 mm); minimum rasti znaša 17 mm pri 0,236 mmol/L, maksimum rasti pa nastopi pri koncentraciji 20 mmol/L in znaša 24 mm,
- Permetrina je razlika podobna, kot pri preraščanju Lindana (11 mm), minimum znaša 15 mm pri koncentraciji 0,236 mmol/L, maksimum rasti pa je 26 mm pri 20 mmol/L,
- polikloriranega bifenila razlika znaša 3 mm, minimum nastopi pri koncentraciji 0,236 mmol/L ter znaša 20 mm, maksimum pa je 23 mm (koncentracija 20 mmol/L);

### 5.1.3 *Gloeophyllum trabeum*

*Gloeophyllum trabeum* je organske spojine preraščala manj uspešno kot *Trametes versicolor* in bolj kot *Pleurotus ostreatus*. Njen minimum rasti je znašal 8 mm pri 0,717 mmol/L natrijevega pentaklorofenolata, maksimum rasti pa 38 mm pri 0,078 mmol/L Permetrina. Gliva najslabše od vseh štirih testiranih sevov prerašča natrijev pentaklorofenolat, saj maksimum rasti znaša le 27 mm (koncentracija 20 mmol/L), ostale vrednosti rasti so najmanj 10 mm manjše.

#### 5.1.4 *Hypoxylon fragiforme*

Na *Hypoxylon fragiforme* so testirani biocidi vplivali podobno, kot na *Gloeophyllum trabeum*, vendar je bila rast bolj zavrtta, saj minimum znaša 10 mm pri 2,175 mmol/L Lindana, maksimum pa 36 mm pri 2,175 mmol/L Permetrina.

#### 5.1.5 Biocidi

Glede na rezultate meritev (preglednica 3; slike 2 – 17) domnevamo, da sta Lindan in natrijev pentaklorofenolat za glive težje razgradljivi organski spojini. Lindan najslabše preraste *Pleurotus ostreatus*, najboljše pa *Trametes versicolor*. Natrijev pentaklorofenolat je najslabše prerasla gliva *Gloeophyllum trabeum*. Najboljše preraščanje Lindana smo izmerili z glivo *Trametes versicolor*.

Domnevamo, da sta Permetrin in poliklorirani bifenil za glive bele trohnobe lažje razgradljiva biocida. Najslabše ju preraste gliva *Pleurotus ostreatus*, najboljše pa *Trametes versicolor*.

## 5.2 SKLEPI

V diplomskem delu smo ugotovili, da:

- izmed testnih gliv *Trametes versicolor* najboljše, *Pleurotus ostreatus* pa najslabše preraste organske biocide,
- *Gloeophyllum trabeum* in *Hypoxylon fragiforme* organske biocide preraščata slabše, kot *Trametes versicolor*, vendar boljše kot *Pleurotus ostreatus*,
- sta Lindan ter Natrijev pentaklorofenolat za glive težje razgradljiva organska biocida, saj so ju glive manj prerasle,
- Permetrin ter Poliklorirani bifenil pa sta lažje razgradljivi organski spojini, saj so ju glive bolj prerasle;

## 6 POVZETEK

Glive, ki razkrajajo impregniran les, imajo poleg nekaterih negativnih tudi koristne lastnosti, med drugim se lahko uporabljajo v bioremediaciji. Bioremediacija je uporaba bioloških procesov za razgradnjo ali odstranitev polutantov iz določenega okolja (les, zemlja, voda...), pri čemer lahko organizem porablja polutant kot vir hrane ali pa ga vključi v metabolizem.

V diplomski nalogi smo ugotavljali, ali so glive bele trohnobe sposobne razgraditi ligninu strukturno podobne organske biocide (ključna podobnost so aromatski obroči). V ta namen smo uporabili štiri vrste lesnih gliv *Gloeophyllum trabeum*, *Hypoxylon fragiforme*, *Pleurotus ostreatus* in *Trametes versicolor*, ki smo jih izpostavili štirim različnim biocidom (Lindan, natrijev pentaklorofenolat, Permetrin ter poliklorirani bifenil) v šestih različnih koncentracijah (20; 6,595; 2,175; 0,717; 0,236 ter 0,078 mmol /L). Poskus smo izvedli v petrijevkah, v katerih so bili na hranilnem gojišču razporejeni papirčki z različnimi koncentracijami organskih biocidov. Med razraščanjem micelija smo merili vpliv biocida na rast, kot je prikazano na diagramih (slike 2 – 17).

Ugotovili smo, da organske biocide najbolj preraste *Trametes versicolor*, najslabše preraščanje je pokazala gliva *Pleurotus ostreatus*. Lindan ter natrijev pentaklorofenolat sta bila težje razgradljiva organska biocida, medtem ko sta bili lažje razgradljivi spojini Permetrin ter Poliklorirani bifenil, kar domnevamo glede na rezultate.

## 7 VIRI

### 7.1 CITIRANI VIRI

Anke T. 1997. Fungal biotechnonlogy. Weinheim, Chapman & Hall: 409 str.

Czaplicka M. 2004. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *The Science of the total environment.*, 322, 1 – 3: 21 – 39

Czaplicka M. 2005. Photo-degradation of chlorophenols in the aqueous solution. *Journal of hazardous materials* (v tisku)

Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. Wood – Decay, pests and protection. London, Chapman & Hall: 546 str.

Eggen T., Sveum P. 1999. Decontamination of aged creosote polluted soil: the influence of temperature, white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, and pre-treatment. *International biodeterioration & biodegradation*, 43, 3: 125 – 134

Humar M., Pohleven F. 2005. Biotehnologija v lesarstvu. *Les*, 57, 11: 316 – 321

*Hypoxylon fragiforme*. 2006.

[http://pyrenomycetes.free.fr/hypoxylon/html/Hypoxylon\\_fragiforme.htm](http://pyrenomycetes.free.fr/hypoxylon/html/Hypoxylon_fragiforme.htm) (28. sep. 2006)

Levin L., Viale A., Forchiassin A. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International biodeterioration & biodegradation*, 52, 1: 1– 6

Lovrenčič V. 2001. Tehnična pojasnila k Pravilniku o odstranjevanju polikloriranih bifenilov (PCB) in polikloriranih terfenilov (PCT). Ministrstvo za okolje in prostor. [http://www.arso.gov.si/podrocja/odpadki/porocila\\_in\\_publikacije/tehpojpc.doc](http://www.arso.gov.si/podrocja/odpadki/porocila_in_publikacije/tehpojpc.doc) (27. feb. 2006)

Makovec T. 2004. Detoksifikacija ksenobiotikov. (9.jan. 2004).

<http://www2.mf.uni-lj.si/~bikevams/detoksifikacija.html> (27. feb. 2006)

McBain A., Cui F., Ruddick J. 1993. The Microbiological Treatment of Chlorophenolic Preservatives in Spent Utility Poles. International Symposium, Cannes – Mandelieu, 8. in 9. feb. 1993. Faculty of Forestry, The University of British Columbia, 2357 Main Mall, Vancouver, B.C., V6T 1Z4: 350 – 359

Messner K., Böhmer S. 1998. Evaluation of fungal remediation of creosote treated wood. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium "The Challenge Safety and Environment in Wood preservation", Cannes – Mandelieu, 2. in 3. feb. 1998. Stockholm, IRG Secretariat: 322 – 330

Peek R.D., Stephen I., Leithoff H.B. 1993. Microbial decomposition of Salt Treated Wood. 2<sup>nd</sup> International Symposium, Cannes – Mandelieu, 8. in 9. feb. 1993. Federal Research Centre for Forestry and Forest Products (BFH), Institute of Wood Biology and Wood Protection, POB 8000210, 2050 Hamburg: 313 – 325

Raspor *et al.* 1995. ZIM – Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov Ljubljana, Katalog biokultur. 1. izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 98 str.

Reddy C.A. 1995. The potential of white-rot fungi in the treatment of pollutants. Current opinion in biotechnology, 6: 320 – 328

Schützendubel A., Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A. 1999. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoroanthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. International biodeterioration & biodegradation, 43, 3: 93 – 100

Unger A., Schniewind A.P., Unger W. 2001. Conservation of wood artifacts. New York, Springer: 577 str.

Tavzes Č. 2003. Proučevanje encimskih in neencimskih procesov razgradnje lesa  
Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 152 str.

Wainwright M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. West Sussex, Wiley &  
Sons Ltd: 202 str.

Walter M., Boyd-Wilson K., Boul L., Ford C., McFadden D., Chong B., Pinfold J. 2005.  
Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. International  
biodeterioration & biodegradation, 56, 1: 51 – 57

Zheng Z., Obbard J.P. 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by  
Surfactant Solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* Oxidation. Journal of  
environmental quality. 31, 6: 1842 – 1847

## 7.2 DRUGI VIRI

Božičnik M. 2005. Študij razgradnje kloriranih fenolov z glivo *Hypoxylon fragiforme* na  
poševnem gojišču. Diplomsko delo. Ljubljana, Pedagoška fakulteta: 86 str.

Lipovec T. 2004. Biorazgradnja poliaromatskih ogljikovodikov in polikloriranih fenolov z  
glivo *Trametes versicolor*. Diplomsko delo. Ljubljana, Pedagoška fakulteta: 101 str.

Stopar D. 2006. Upravljanje z odpadki. Biotehniška fakulteta.

<http://www.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/bioremediacija.pdf> (29. avg. 2006)

## **ZAHVALA**

Najprej bi se rad zahvalil prof. dr. Francu Pohlevnu za mentorstvo pri diplomski nalogi. Zahvalil bi se tudi mlademu raziskovalcu, univ. dipl. biol. Iztoku Vidicu, za pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu diplomske naloge. Zahvala gre tudi doc. dr. Mihi Humarju za recenzijo, ter univ. dipl. kem. Gregorju Repu za praktične nasvete. Za pomoč bi se zahvalil tudi inž. kem. Andreji Žagar, tehnični sodelavki na Katedri za Patologijo in zaščito lesa. Na koncu bi se rad zahvalil še staršema za moralno in gmotno pomoč, ter vso podporo v času študija.



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Gašper PIRNAT

**BIOREMEDIACIJA Z ORGANSKIMI BIOCIDI  
ZAŠČITENEGA LESA Z GLIVAMI BELE  
TROHNOBE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006