

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

VIDIC Iztok

**RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH
BIOCIDOV Z LIGNOLITIČNIMI GLIVAMI**

Magistrsko delo

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

VIDIC Iztok

**RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV Z
LIGNOLITIČNIMI GLIVAMI**

Magistrsko delo

**DEGRADATION OF CHLORINATED
ORGANIC BIOCIDES BY LIGNOLYTIC FUNGI**

Master of science thesis

Ljubljana, 2008

Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na:

- Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za lesarstvo, Katedri za patologijo in zaščito lesa
- Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za biologijo, Katedri za biokemijo
- Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedri za analizno kemijo

Senat Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani je na svoji seji dne 3. marca 2008 po odločitvi Senata Interdisciplinarnega podiplomskega študija biotehnologije odobril temo in naslov magistrske naloge in za mentorja imenoval Prof. dr. Franca Pohlevna.

Mentor: Prof. dr. Franc Pohleven

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Doc. dr. Miha Humar

Članica: Prof. dr. Lucija Zupančič Kralj

Članica: Prof. dr. Kristina Sepčić

Član: Prof. dr. Franc Pohleven

Datum zagovora: 8. julij 2008

Podpisani Iztok Vidic se strinjam z objavo svojega magistrskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Magistrant:

Iztok Vidic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 577.2:582.28(043.2)=163.6
KG	mikoremediacija/biocidi/poliklorirani bifenili/lindan/natrijev pentaklorofenolat/glive/bela trohnoba/lakaza/mangan peroksidaza/lignin peroksidaza/encimska aktivnost
AV	VIDIC, Iztok, univ. dipl. biolog
SA	POHLEVEN, Franc (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2008
IN	RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV Z LIGNINOLITIČNIMI GLIVAMI
TD	Magistrsko delo
OP	XV, 104 str., 18 pregl., 39 sl., 7 pril., 172 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Študirali smo razgradnjo kloriranih organskih biocidov lindana, natrijevega pentaklorofenolata in PCB-153 z izbranimi lesnimi glivami, od katerih so bile vrste <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i> in <i>Hypoxylon fragiforme</i> predstavnice gliv bele trohnobe, vrsta <i>Gloeophyllum trabeum</i> pa sodi v skupino gliv, ki povzročajo rjavo trohnobo. Razgradnja posameznih kloriranih organskih biocidov je bila z glivami bele trohnobe uspešna, pri čemer je največji delež lindana in PCB-153 razgradila gliva <i>P. ostreatus</i> , vrsta <i>T. versicolor</i> pa je uspela popolnoma razgraditi natrijev pentaklorofenolat. Časovno spremeljanje aktivnosti posameznih ligninolitičnih encimov lakaze, mangan peroksidaze in lignin peroksidaze je pokazalo, da vrsti <i>P. ostreatus</i> in <i>T. versicolor</i> izražata veliko večje vrednosti ligninolitičnih encimov, kot ostale testirane vrste gliv. Pri glivah <i>P. ostreatus</i> in <i>T. versicolor</i> , zraslih v prisotnosti posameznih biocidov, je bil vzorec časovnega izražanja ligninolitičnih encimov lakaze, mangan peroksidaze in lignin peroksidaze drugačen, kot pri negativnih kontrolnih skupinah. Proučili smo tudi razgradnjo lindana in kloriranih fenolov s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi (lakazo, mangan peroksidazo in raznoliko peroksidazo), pri čemer sta bili mangan peroksidaza in raznolika peroksidaza v primerjavi z lakazo ustreznejša ligninolitična encima za njihovo razgradnjo. Razgradnja lindana je bila uspešnejša s posameznimi ligninolitičnimi glivami, kot s posameznimi ligninolitičnimi encimi. V prisotnosti natrijevega pentaklorofenolata smo s testi inhibicije oksidacije substrata ABTS s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi ugotovili, da je natrijev pentaklorofenolat potencialen substrat za mangan peroksidazo in za raznoliko peroksidazo, ne pa za lakazo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDK 577.2:582.28(043.2)=163.6
CX mycoremediation/biocides/polychlorinated biphenyls/lindane/sodium pentachlorophenolate/fungi/white-rot/laccase/manganese peroxidase/lignin peroxidase/ enzyme activity
AU VIDIC, Iztok, B.Sc. in biology
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field Biotechnology
PY 2008
TI DEGRADATION OF POLYCHLORINATED BIOCIDES BY LIGNINOLYTIC FUNGI
DT M.Sc. Thesis
NO XV, 104 p., 18 tab., 39 fig., 7 ann., 172 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Four selected white-rot fungi (*Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Chondrostereum purpureum*, *Hypoxyylon fragiforme*) and one brown-rot fungus (*Gloeophyllum trabeum*) were analysed for their mycoremediation potential by following the degradation of polychlorinated organic biocides lindane, sodium pentachlorophenol, and PCB-153, respectively. Among selected white-rot fungi, *P. ostreatus* showed the highest efficiency in degrading lindane and PCB-153, while sodium pentachlorophenol was most efficiently degraded by *T. versicolor*. White rots *C. purpureum* and *H. fragiforme*, and a brown rot *G. trabeum* were considerably less effective in degrading all the tested biocides. Monitoring of ligninolytic enzymes activities showed the highest expression of laccase, manganese peroxidase, and lignin peroxidase in *P. ostreatus* and *T. versicolor*. Temporal expression of ligninolytic enzymes in liquid cultures with addition of lindane, sodium pentachlorophenol, or PCB-153 differed from the negative controls. In comparison to fungal degradation, an application of respective commercially available ligninolytic enzymes laccase, manganese peroxidase, and versatile peroxidase was less efficient in degradation of lindane or chlorinated phenols. Manganese peroxidase and versatile peroxidase were more applicable enzymes in these cases. Inhibition of ABTS oxidation by ligninolytic enzymes in the presence of sodium pentachlorophenol showed that sodium pentachlorophenol may act as a substrate for enzymes manganese peroxidase and versatile peroxidase, and not for laccase.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XII
SEZNAM PRILOG	XV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XVI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PESTICIDI	2
2.1.1 Klorirani fenoli	3
2.1.1.1 Gospodarski pomen kloriranih fenolov	4
2.1.1.2 Izvor kloriranih fenolov	5
2.1.1.3 Prisotnost kloriranih fenolov v okolju	5
2.1.1.4 Vpliv kloriranih fenolov na živa bitja	6
2.1.2 Lindan.....	7
2.1.3 Poliklorirani bifenili	8
2.1.3.1 Gospodarski pomen	8
2.1.3.2 Prisotnost PCB v okolju	9
2.1.3.3 Vpliv PCB na živa bitja	10
2.1.3.4 Lokalna problematika, povezana s PCB	11
2.2 BIOREMEDIACIJA.....	12
2.2.1 Osnovni pojmi.....	12
2.2.2 Bioremediacija z ligninolitičnimi glivami (mikoremediacija)	13
2.2.2.1 Glive bele trohnobe	14
2.2.2.2 Ligninolitični encimski sistem gliv bele trohnobe	16
2.2.2.3 Struktura in lastnosti ligninolitičnih encimov	17
2.2.2.3.1 Lakaza (Lac, EC 1.10.3.2)	17

2.2.2.3.2 Lignin peroksidaza (LiP, EC 1.11.1.14).....	20
2.2.2.3.3 Mangan peroksidaza (MnP, EC 1.11.1.13)	23
2.2.2.4 Bioremediacija ksenobiotikov z ligninolitičnimi glivami ali z njihovimi encimi	25
2.2.2.4.1 Primeri uspešnih razgradenj cikličnih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami ali njihovimi encimi	26
2.2.2.4.2 Mikoremediacija kontaminiranih področij v naravi	30
2.2.2.4.3 Biotehnološka uporabnost v industriji.....	31
3 MATERIAL IN METODE.....	33
3.1 MATERIAL	33
3.1.1 Vrste gliv.....	33
3.1.2 Ligninolitični encimi.....	33
3.1.3 Kemikalije	34
3.1.4 Tekoči mediji.....	35
3.2 METODE	37
3.2.1 Izbira tekočega gojišča za raziskave biološke razgradnje kloriranih organskih biocidov z lesnimi glivami.....	37
3.2.1.1 Priprava gojišč in avtoklaviranje	37
3.2.1.2 Inokulacija in gojenje gliv	37
3.2.1.3 Določanje suhe biomase	38
3.2.2 Spremljanje rasti gliv v mediju po Hadarju z dodanimi biocidi.....	38
3.2.3 Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami v tekočih kulturah.....	38
3.2.3.1 Pogoji gojenja in dodatek kloriranih organskih biocidov.....	38
3.2.3.2 Priprava vzorcev	39
3.2.3.2.1 Priprava vzorcev za določitev razgradnje NaPCP	39
3.2.3.2.2 Priprava vzorcev za določitev razgradnje lindana	39
3.2.3.2.3 Priprava vzorcev za določanje razgradnje PCB-153	40
3.2.3.3 Določanje razgradenje lindana in PCB-153 z ligninolitičnimi glivami z uporabo plinske kromatografije.....	40
3.2.3.4 Določitev deležev razgradnje NaPCP z ligninolitičnimi glivami z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije	42

3.2.4	Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi.....	42
3.2.4.1	Osnovne raztopine ligninolitičnih encimov ter kloriranih fenolov in lindana ...	43
3.2.4.2	Inkubacija kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi v tekočem mediju	43
3.2.4.3	Določanje deležev razgradnje kloriranih fenolov z ligninolitičnimi encimi z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije	44
3.2.4.4	Določanje razgradnje lindana z ligninolitičnimi encimi z uporabo plinske kromatografije	45
3.2.5	Časovno spremljanje aktivnosti zunajceličnih ligninolitičnih encimov gliv v prisotnosti kloriranih organskih biocidov.....	46
3.2.5.1	Pogoji gojenja in vzorčenje	46
3.2.5.2	Meritve aktivnosti ligninolitičnih encimov	47
3.2.5.3	Izračun aktivnosti Lac, MnP in LiP	49
3.2.6	Določanje specifičnosti NaPCP kot substrata za ligninolitične encime	50
3.2.6.1	Čiščenje ligninolitičnih encimov	50
3.2.6.2	Test inhibicije ligninolitičnih encimov	51
3.2.7	Statistične metode	51
4	REZULTATI.....	52
4.1	IZBIRA USTREZNEGA TEKOČEGA GOJIŠČA ZA RAZISKAVE MIKOREMEDIACIJE KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV	52
4.1.1	Rast gliv v tekočih gojiščih brez dodanih biocidov.....	52
4.1.2	Rast gliv v mediju po Hadarju z dodanimi biocidi.....	53
4.2	RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV Z LIGNINOLITIČNIMI GLIVAMI	54
4.2.1	NaPCP	54
4.2.2	Lindan.....	56
4.2.3	PCB-153	59
4.3	RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV Z LIGNINOLITIČNIMI ENCIMI	61
4.3.1	Razgradnja kloriranih fenolov	61
4.3.2	Razgradnja lindana	62
4.4	AKTIVNOSTI ZUNAJCELIČNIH LIGNINOLITIČNIH ENCIMOV GLIV ..	63

4.4.1	Pojavljanje ligninolitičnih encimov gliv v mediju brez biocidov	63
4.4.2	Potek izražanja ligninolitičnih encimov ob prisotnosti biocidov	66
4.4.2.1	Potek izražanja ligninolitičnih encimov pri glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	66
4.4.2.2	Potek izražanja ligninolitičnih encimov pri glivi <i>Trametes versicolor</i>	69
4.5	INHIBICIJA AKTIVNOSTI LIGNINOLITIČNIH ENCIMOV Z NATRIJEVIM PENTAKLOROFENOLATOM.....	71
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	76
5.1	RAZPRAVA.....	76
5.1.1	Izbira tekočega gojišča za raziskave mikoremediacije	76
5.1.2	Rast gliv v mediju po Hadarju z dodanimi biocidi.....	77
5.1.3	Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami	78
5.1.4	Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi.....	82
5.1.5	Potek izražanja ligninolitičnih encimov gliv v tekočem gojišču z dodatkom kloriranih organskih biocidov	83
5.1.6	Kinetika oksidacije ABTS z ligninolitičnimi encimi v prisotnosti NaPCP..	85
5.2	SKLEPI.....	87
6	POVZETEK.....	89
	SUMMARY.....	90
7	VIRI	91
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Skupine pesticidov glede na ciljne organizme.....	3
Preglednica 2: Skupine pesticidov glede na kemično sestavo	3
Preglednica 3: Karakteristični parametri polikloriranih fenolov, ki vplivajo na njihovo biorazgradnjo ali biotransformacijo.....	4
Preglednica 4: Molska masa in delež zvrsti PCB ter vsebnost klora v mešanicah Aroclor 1242, 1248 in 1254.....	9
Preglednica 5: Parni tlak in topnost v vodi nekaterih zvrsti PCB ter tehničnih mešanic Aroclor	10
Preglednica 6: Pregled emisij odpadnega PCB v širšem okolju tovarne Iskra kondenzatorji v Semiču 1962-1985.....	11
Preglednica 7: Sintetični organski onesnaževalci, ki jih razgrajujejo glive bele trohnobe ali njihovi ligninolitični encimi.....	29
Preglednica 8: Vrste oz. sevi gliv, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.....	33
Preglednica 9: Komercialni ligninolitični encimi, uporabljeni za razgradnjo kloriranih organskih biocidov.....	34
Preglednica 10: Klorirani organski biocidi, uporabljeni za razgradnjo z ligninolitičnimi glivami.....	34
Preglednica 11: Sestava tekočega gojišča po Hadarju, modificiranega za potrebe mikoremediacije	35
Preglednica 12: Sestava tekočega gojišča po Shemakhanovi.....	36
Preglednica 13: Sestava tekočega gojišča PDB	36
Preglednica 14: Sestava tekočega medija za razgradnjo biocidov z ligninolitičnimi encimi	36
Preglednica 15: Kromatografski pogoji za določanje lindana in PCB-153 z GC-ECD.....	41
Preglednica 16: Temperaturni program za analizo z GC-ECD.....	41
Preglednica 17: Program gradientne elucije za HPLC analizo razgradnje kloriranih fenolov z ligninolitičnimi encimi.....	44

Preglednica 18: Retencijski časi (t_R) kloriranih fenolov pri izbranih kromatografskih pogojih.....	45
---	----

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Lindan ($1\alpha,2\alpha,3\beta,4\alpha,5\alpha,6\beta$ -heksaklorocikloheksan, γ -HCH).....	7
Slika 2: PCB-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-dekklorobifenil).....	8
Slika 3: Fenilpropanske enote, ki sestavljajo polimer lignina	15
Slika 4: Predlagan model strukture lignina	15
Slika 5: Tridimenzionalna struktura lakaze iz glive <i>T. versicolor</i>	17
Slika 6: Redukcija kisika v vodo, kot jo katalizira lakaza.....	18
Slika 7: Strukturna formula ABTS.....	19
Slika 8: Tridimenzionalna struktura ene podenote LiP iz glive <i>P. chrysosporium</i>	21
Slika 9: Shema katalitskega cikla LiP.....	22
Slika 10: Tridimenzionalna struktura MnP glive <i>P. chrysosporium</i>	24
Slika 11: Shema katalitskega cikla MnP.....	25
Slika 12: Predvidena pot razgradnje PCP z glivo <i>P. chrysosporium</i>	28
Slika 13: Shema nanašanja vzorcev na mikrotitrno ploščico za meritve aktivnosti ligninolitičnih encimov Lac, MnP in LiP.....	48
Slika 14: Prirastek suhe biomase gliv po 21 dneh gojenja v različnih tekočih gojiščih brez dodanih biocidov.....	53
Slika 15: Prirastki suhe teže gliv po 21 dneh gojenja v modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi (NaPCP, lindan, PCB-153) v 30 μ M koncentraciji.....	54
Slika 16: Kromatogrami PCP za analizo bioloških razgradenj NaPCP z glivami.....	55
Slika 17: Deleži razgradnje NaPCP s testiranimi vrstami gliv	56
Slika 18: Določitev lindana z GC; prikazani so reprezentativni kromatografski vrhovi lindana v ekstraktih iz filtratov tekočih glivnih kultur.....	57
Slika 19: Deleži razgradnje lindana s testiranimi vrstami gliv; način priprave vzorcev: z ekstrakcijo iz filtratov tekočih glivnih kultur.....	58

Slika 20: Določitev lindana z GC; prikazani so reprezentativni kromatografski vrhovi lindana v ekstraktih iz homogenatov tekočih glivnih kultur.....	58
Slika 21: Deleži razgradnje lindana s testiranimi vrstami gliv; način priprave vzorcev: z ekstrakcijo homogenatov tekočih glivnih kultur.....	59
Slika 22: Določitev PCB-153 z GC; prikazani so reprezentativni kromatografski vrhovi PCB-153 v ekstraktih iz homogenatov tekočih glivnih kultur.....	60
Slika 23: Deleži razgradnje PCB-153 s testiranimi vrstami gliv.....	60
Slika 24: Deleži razgradnje kloriranih fenolov (PCP, 4CP, 3CP in 2CP) z ligninolitičnimi encimi Lac, MnP in VP.....	61
Slika 25: Deleži razgradnje lindana z ligninolitičnimi encimi lakazo (Lac), mangan peroksidazo (MnP) in raznoliko peroksidazo (VP).....	62
Slika 26: Časovno izražanje Lac pri posameznih vrstah lesnih gliv (<i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>C. purpureum</i> , <i>H. fragiforme</i> in <i>G. trabeum</i>), gojenih v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije in brez dodanih biocidov.....	64
Slika 27 Časovno izražanje MnP pri posameznih vrstah lesnih gliv (<i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>C. purpureum</i> , <i>H. fragiforme</i> in <i>G. trabeum</i>), gojenih v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije in brez dodanih biocidov.....	65
Slika 28: Časovno izražanje LiP pri posameznih vrstah lesnih gliv (<i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>C. purpureum</i> , <i>H. fragiforme</i> in <i>G. trabeum</i>), gojenih v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije in brez dodanih biocidov.....	65
Slika 29: Časovno izražanje Lac pri glivi <i>P. ostreatus</i> , gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153.....	67
Slika 30: Časovno izražanje MnP pri glivi <i>P. ostreatus</i> , gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153.....	68
Slika 31: Časovno izražanje LiP pri glivi <i>P. ostreatus</i> , gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153.....	68
Slika 32: Časovno izražanje Lac pri glivi <i>T. versicolor</i> , gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153.....	69

Slika 33: Časovno izražanje MnP pri glivi <i>T. versicolor</i> , gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153.....	70
Slika 34: Časovno izražanje LiP pri glivi <i>T. versicolor</i> , gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153.....	71
Slika 35: NaDS-PAGE komercialno nabavljenih ligninolitičnih encimov pred čiščenjem z anionsko izmenjevalno kromatografijo: MnP iz glice <i>N. frowardii</i> , VP iz glice <i>B. adusta</i> in Lac iz glice <i>T. versicolor</i> ;.....	72
Slika 36: NaDS-PAGE komercialno nabavljenih ligninolitičnih encimov po čiščenju z anionsko izmenjevalno kromatografijo: VP iz glice <i>B. adusta</i> , MnP iz glice <i>N. frowardii</i> in Lac iz glice <i>T. versicolor</i>	72
Slika 37: Dixonov diagram inhibicije Lac iz glice <i>T. versicolor</i> z NaPCP pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS.....	73
Slika 38: Dixonov diagram inhibicije MnP iz glice <i>N. frowardii</i> z NaPCP pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS.....	74
Slika 39: Dixonov diagram inhibicije VP iz glice <i>B. adusta</i> z NaPCP pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS.....	75

SEZNAM PRILOG

Priloga A: Slika časovnega izražanja lakaze pri glivi *C. purpureum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Priloga B: Slika časovnega izražanja mangan peroksidaze pri glivi *C. purpureum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Priloga C: Slika časovnega izražanja lignin peroksidaze pri glivi *C. purpureum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Priloga D: Slika časovnega izražanja lakaze pri glivi *H. fragiforme*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Priloga E: Slika časovnega izražanja mangan peroksidaze pri glivi *H. fragiforme*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Priloga F: Slika časovnega izražanja lignin peroksidaze pri glivi *H. fragiforme*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Priloga G: Slika časovnega izražanja lakaze pri glivi *G. trabeum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2CP	diklorofenol
3CP	triklorofenol
4CP	tetraklorofenol
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
ECD	detektor na zajetje elektronov
GC	plinska kromatografija
HPLC	visokotlačana plinska kromatografija
K_i	konstanta inhibicije
Lac	lakaza
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
NaPCP	natrijev pentaklorofenolat
obrati min ⁻¹	obrati na minuto
PAH	poliaromatski ogljikovodiki
PCB	polikloriran bifenil
PCP	pentaklorofenol
PDA	krompirjev dekstrozni agar
PDB	tekočem gojišču na osnovi ekstrakta dekstroze iz krompirja
SE	standardna napaka
t_r	retencijski čas
VA	veratril alkohol
VP	raznolika peroksidaza

1 UVOD

Zaščitna sredstva za les na osnovi kloriranih cikličnih organskih spojin (lindan, pentaklorofenol, endosulfan, poliklorirani bifenili (PCB) in poliaromatski ogljikovodiki) predstavljajo nevarnost za okolje in človeka tako v postopku njihove proizvodnje, transporta, zaščite in uporabe lesa, kot tudi po koncu uporabe zaščitenega lesnega izdelka. Ta predstavlja poseben odpadek in ga ne smemo prosto odlagati, ker so biocidi v zaščitnih sredstvih stabilni in se lahko izločajo v prst, površinske in podtalne vode. Nove zahteve o zmanjševanju onesnaženosti zraka z dimnimi plini in odlaganju pepela v državah EU omejujejo sežig zaščitenega lesa (Direktiva EU 75/442/EEC; Direktiva evropskega parlamenta in sveta 2006/12/ES). Sežiganje z biocidi zaščitenega lesa je dovoljeno, a le v posebnih napravah. Izjema je les, ki vsebuje PCB. Recikliranje zaščitenega lesa za ponovno uporabo pa je omejeno s stopnjo vsebnosti biocidov v lesu. Zaradi navedenih razlogov so potrebne ustreerne rešitve predelave odpadnega zaščitenega lesa.

Med obetavne možnosti razstrupljevanja lesa, zaščitenega z organskimi biocidi, sodi bioremediacija z glivami (mikoremediacija). Ligninolitične glive so pri razgradnji cikličnih organskih biocidov učinkovitejše od drugih organizmov. S pomočjo zunajceličnih encimov, ki jih izločajo v les (ektoencimi), razgrajujejo komponente lesa, hkrati pa so potencialno učinkovite pri razgradnji ligninu strukturno analognih organskih biocidov, ki so sestavine impregnacijskih sredstev za zaščito lesa.

Namen magistrske naloge je proučitev možnosti razgradnje kloriranih organskih biocidov lindana, natrijevega pentaklorofenolata in 2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenila (PCB-153) z lesnimi glivami bukovim ostrigarjem (*Pleurotus ostreatus*), pisano ploskocevko (*Trametes versicolor*), ogljeno kroglico (*Hypoxyylon fragiforme*), tramovko (*Gloeophyllum trabeum*) in škrlatnordečo slojevko (*Chondrostereum purpureum*). Predvidevamo, da so glive bele trohnobe in njihovi izolirani ligninolitični encimi sposobni razgradnje kloriranih organskih biocidov. Bukov ostrigar in pisana ploskocevka sta vrsti, ki imata v tovrstnih raziskavah mikoremediacije velik potencial, ostale tri vrste gliv pa so manj proučene.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PESTICIDI

Pesticidi so snovi, ki naj bi selektivno uničevali določeno vrsto škodljivcev. Stopnja njihove toksičnosti je odvisna predvsem od kemične sestave. Pesticid je v bistvu aktivna substanca, ki je v določeni koncentraciji primešana inertnemu mediju (stabilizatorju aktivne substance), oba skupaj pa sestavljata pripravek, ki se ponavadi prodaja pod komercialnim imenom.

Med pesticide uvrščamo zdravila, veterinarska zdravila, fitofarmacevtska sredstva in biocide. Zdravila se v humani in veterinarski medicini uporabljajo za preprečevanje ali zdravljenje nekaterih bolezni. Fitofarmacevtska sredstva se v kmetijstvu v glavnem uporabljajo za povečanje poljedelske proizvodnje (zatiranje škodljivcev, plevelov in rastlinskih bolezni). Biocide pa v lesarstvu, gozdarstvu, ladjedelništvu in drugih panogah uporabljajo kot zaščitne pripravke pred škodljivci ter za javno higieno.

Po svojem izvoru so pesticidi lahko naravne snovi, izolirane iz rastlin, ali pridobljeni s kemijsko sintezo. Predvsem slednji pa lahko ob neustrezni uporabi ogrožajo tako človeka kot ekosfero (biosfero). Negativni vpliv pesticidov na žive organizme je odvisen predvsem od uporabljeni koncentracije, stopnje razgradljivosti, obstojnosti v okolju, sposobnosti bioakumulacije, vključevanja v prehranjevalne verige, mutagenosti, genotoksičnosti in še mnogih drugih dejavnikov. Zaradi nepravilne uporabe lahko najdemo pesticide in njihove razgradne produkte tudi v različnih živilih, vodi, okolju in celo v samemu človeku.

Najpogostejši sta dve razvrstitvi pesticidov, in sicer glede na ciljno skupino organizmov, ki jih posamezna skupina pesticidov uničuje (preglednica 1), in glede na kemično sestavo (preglednica 2).

Preglednica 1: Skupine pesticidov glede na ciljne organizme

Table 1: Groups of pesticides with regard to target organisms

Ciljna skupina organizmov	Skupina pesticidov	Nekatere aktivne učinkovine
glove	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 pesticidov glede na kemično sestavo

Table 2: Groups of pesticides with regard to chemical composition

Kemična skupina	Nekatere aktivne učinkovine
ORGANOFOSFORNI PESTICIDI fosfatni estri fosfotio estri	fosfamidon, dikrotofos, matamidofos, klorpirifos, diazinon, malation
KARBAMATI tiokarbamatni ditiokarbamatni	karbaril, klorprofam, prpoxur, butilat, tiobenkarb, tiram
ORGANOKLORNI PESTICIDI diklorodifeniletani ciklodieni klorirani benzeni in cikloheksani klorirani fenoli in bifenili	DDT, dikofol, metoksiklor, klordan, dieldrin, eldrin, toksafen, heksaklorobenzen (HCB), heksaklorocikloheksan (HCH, lindan), pentaklorofenol, poliklorirani bifenili (PCB)
KLORFENOKSI KISLINE	2,4-D, MCPA, silveks
DRUGI PESTICIDI acetanilidi bipiridili fenilureati ftalimidi triazini	alaklor, metolaklor paraquat, diquat diuron, linuron kaptan, folpet atrazin, simazin, cianazin, desetilatrazin

2.1.1 Klorirani fenoli

Klorirani fenoli so skupina devetnajstih izomerov fenola z vezanimi atomi klora. Te spojine so z izjemo 2-klorofenola trdne snovi, s temperaturo tališča med 33 in 191 °C. Vsi so dobro topni v organskih (nepolarnih) topilih in maščobah, slabo pa v vodi (preglednica

3). Klorirani fenoli so rahlo kisle spojine, s kislostjo nekaj manjšo od fenola. V vodni raztopini lahko reagirajo z alkalnimi kovinami, pri čemer nastanejo soli, ki so v vodi bolj topne od samih klorofenolov.

Preglednica 3: Karakteristični parametri polikloriranih fenolov, ki vplivajo na njihovo biorazgradnjo ali biotransformacijo (Memić, 2006)

Table 3: Characteristic parameters of polychlorinated phenols influencing their biodegradation or biotransformation potential (Memić, 2006)

Spojina	Število atomov klorja	LD ₅₀ (mg/kg) oratno	Log K _{ow}	Topnost v vodi (g/L) (20 °C)	Henrijeva konstanta Pa m ³ /mol, (25 °C)	pK _a
3,4-diklorofenol	2	miš 1685	3,33	< 0,01	0,03	8,63
3,5-diklorofenol	2	miš 2389	3,62	< 0,01	0,03	8,18
2,3,6-triklorofenol	3	podgana 308	3,77	< 0,01	0,023	5,80
2,4,5-triklorofenol	3	podgana 820	3,72	0,948	0,16	7,40
2,4,6-triklorofenol	3	podgana 820	3,69	0,434	0,26	6,23
2,3,4,6-tetraklorofenol	4	podgana 140	4,45	0,183	0,15	5,22
2,3,5,6-tetraklorofenol	4	podgana 140	4,90	0,100	0,035	5,14
pentaklorofenol	5	podgana 27	5,12	0,014	0,0025	4,70

2.1.1.1 Gospodarski pomen kloriranih fenolov

Samo osem klorofenolov (monoklorofenol, 2,4-diklorofenol, 2,4,5-triklorofenol, 2,4,6-triklorofenol, 2,3,4,5-tetraklorofenol, 2,3,4,6-tetraklorofenol in pentaklorofenol) se (je) uporablja(lo) v industriji. Pentaklorofenol in oba izomera tetraklorofenola so, v skladu z njihovimi fungicidnimi lastnostmi, uporabljali kot fitofarmacevtska sredstva v kmetijstvu in gozdarstvu ter kot biocide za impregnacijo lesa in kož. Monoklorofenole so uporabljali kot fitofarmacevtska sredstva ali kot antiseptike (Kringstad in Lindstrom, 1984). Klorofenoli z manj kot tremi substituiranimi klorovimi atomi danes nimajo velikega gospodarskega pomena, razen v proizvodnji višjih klorofenolov in herbicidov na osnovi klorfenoksibutanojske kisline.

2.1.1.2 Izvor kloriranih fenolov

Klorirane fenole industrijsko pridobivajo s kloriranjem fenola ali s hidrolizo klorobenzena. Kot vmesni produkti klorofenoli nastajajo tudi v nekaterih stopnjah sinteze 2,3-diklorobutanojske kisline (Kent in James, 1983) ter med beljenjem lesne pulpe (Kringstad in Lindstrom, 1984). Klorirani fenoli lahko nastajajo tudi kot vzporedni produkti v procesih kloriranja pitne vode, destilaciji lesa (Oberg in sod., 1989) in med pirolizo premoga (Taylor in Dellinger, 1999). Klorofenoli, ki jih najdemo v okolju, nastajajo še med biološko razgradnjo pesticidov, predvsem 2,4-diklorofenoksibutanojske in 2,4,5-triklorofenoksibutanojske kisline, pri čemer nastajajo številni klorofenoli kot vmesni metaboliti njihovega razpada. Zaradi negativnih učinkov na okolje je uporaba teh pesticidov v svetu zelo omejena ali celo prepovedana.

2.1.1.3 Prisotnost kloriranih fenolov v okolju

Raziskave onesnaženja okolja širom sveta so potrdile prisotnost kloriranih fenolov v mnogih ekosistemih: v atmosferi, površinskih in podzemnih vodah, tleh, ledenikih in v globinskih sedimentih (Xie in sod., 1986; Sinkkonen in Paasivirta, 2000; Klan in sod., 2001). Preostanke klorofenolov zasledimo tudi v prehrambenih proizvodih ter v tkivih in telesnih tekočinah rastlin, živali in ljudi. Do antropomorfnega onesnaženja okolja prihaja zaradi uporabe pesticidov na osnovi klorofenoksibutanojske kisline, tehnoloških neustreznosti impregnacijskih postaj za les, odlaganja odpadkov iz industrije, poljedelstva in gozdarstva, kontaminacije s heksaklorobenzenom ter ob spontanem nastanku klorofenolov pri kloriranju vode z namenom razkuževanja ter preprečevanja neprijetnega vonja. Tako predstavlja kontaminacija naravnega okolja s kloriranimi fenoli velik problem, s katerim se srečujejo predvsem v kmetijsko-gozdarskih in industrijskih regijah.

V različnih plasteh atmosfere so prisotni predvsem monoklorofenoli in 2,4-diklorofenol, kar je posledica njihove velike hlapnosti. V zraku lahko zasledimo tudi ostale klorofenole, čeprav so ti manj hlapni. Prisotnost v atmosferi je predvsem posledica njihove industrijske proizvodnje ter sežiganja odpadkov, premoga in lesa. Izmerjene koncentracije pentaklorofenola v zraku okoli obratov za impregnacijo lesa so znašale celo do 500 mg/m^3 (Schroeder in Lane, 1998).

Mnoge raziskave so pokazale prisotnost klorofenolov v površinskih vodah s koncentracijami do 10 ng/l (Grimvall, 1995). V teh primerih je glavni izvor klorofenolov najverjetneje naraven proces kloriranja huminske kisline (Gribble, 1995). Kontaminacija vode je lahko tudi posledica drenaže poljedelskih površin in industrijskih odpadnih voda ali posledica uporabe pesticidov.

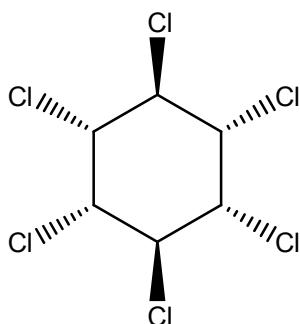
Klorofenoli lahko zaidejo v tla zaradi okoljevarstvene neustreznosti nekaterih tehnoloških procesov, z biodegradacijo pesticidov (predvsem herbicidov) in zaradi sesedanja iz atmosfere. Ugotovljeno je, da so organoklorni pesticidi ponekod kontaminirali znatne površine obdelovalne zemlje tudi na področjih, kjer le-teh niso neposredno uporabljali. S pesticidi kontaminiranim prah se namreč lahko prenaša po zraku (atmosferi) in odloži na površine, ki so precej oddaljene od kraja uporabe. Težava kontaminacije tal s temi kemikalijami obstaja predvsem v državah z intenzivnim gozdno-lesnim gospodarstvom, ki so v šestdesetih in sedemdesetih letih preteklega stoletja uporabljale velike količine klorofenolnih fungicidov za zaščito lesa v impregnacijskih postajah (npr. Kanada, Finska in Švedska) (Valo in sod., 1984). Tla so zelo ustrezni pretočno-transportni medij za klorofenole, predvsem zaradi primerne vsebnosti vode, ustrezne vrednosti pH, vsebnosti organskega materiala, granulacije, hitrosti odparevanja in številnih vzporednih bioloških procesov.

2.1.1.4 Vpliv kloriranih fenolov na živa bitja

Klorofenoli imajo težnjo po bioakumulaciji. Organoklorni pesticidi se prenašajo iz tal v dele rastlin, ki so namenjene za prehrano, pri čemer so obstojnost, razgradljivost in transport klorofenolov odvisni predvsem od vrednosti pH v okolju. Zaradi njihove lipofilnosti lahko z mastmi, olji in voski preko živil preidejo v toplokrvne organizme, kjer se delno metabolizirajo in izločijo, delno pa se nabirajo v maščobnem tkivu, jetrih, mlečni maščobi in organih. Toksičnost klorofenolov se zmanjšuje z manjšanjem števila substituiranih atomov klorja. Njihova akutna toksičnost je relativno nizka, kronični efekti pa so slabo raziskani. Čeprav mutageni, teratogeni ali kancerogeni učinki klorofenolov niso dokazani, lahko te spojine delujejo kot promotorji ali kot ko-kancerogeni dejavniki (Kogevinas in sod., 1992).

2.1.2 Lindan

Lindan ($1\alpha,2\alpha,3\beta,4\alpha,5\alpha,6\beta$ -heksaklorocikloheksan, γ -HCH) (slika 1) je leta 1912 prvi opisal Van de Linden, komercialno pa so ga začeli proizvajati leta 1942 (Alloway in Ayres, 1993). Pridobivajo ga z adicijo treh molekul klora (Cl_2) na molekulo benzena, reakcijo pa aktivirajo z ultravijoličnim obsevanjem. Pri tem nastane pet možnih izomerov heksaklorocikloheksana, od katerih je delež lindana približno 15 % (Alloway in Ayres, 1993). Prečiščen je pri sobnih pogojih v obliki belih kristalov, negorljiv, brez okusa in značilnega zatohlega vonja. Temperatura tališča lindana je 113°C , vrelišča pa 176°C (pri $1,3 \text{ kPa}$). Topnost lindana v vodi znaša $9 - 10 \text{ mg/l}$ (pri 20°C), precej boljša pa je v manj polarnih topilih (topnosti so podane na 100 ml topila pri 25°C): v acetonu $43,5 \text{ g}$, v cikloheksanu $36,7 \text{ g}$, v etilacetatu $35,7 \text{ g}$ in v etanolu $6,4 \text{ g}$.



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

Figure 1: Lindane ($1\alpha,2\alpha,3\beta,4\alpha,5\alpha,6\beta$ -hexachlorocyclohexane, γ -HCH)

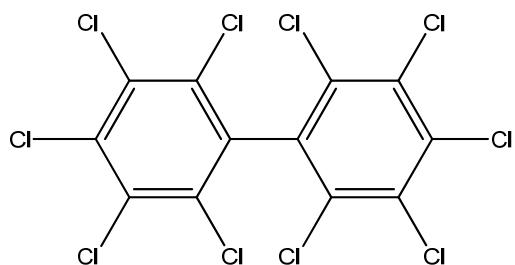
Lindan je širokospektralni insekticid z nevrotoksičnimi učinki, ki hitro prodira skozi kutikulo insektov. Inhibira prenos živčnega signala vzdolž aksona in ima podobne farmakološke lastnosti, kot DDT (Alloway in Ayres, 1993; Unger in sod., 2001). Zaradi farmakoloških lastnosti in cenene proizvodnje, so ga v vodnih pripravkih (koncentracija $0,3 - 0,9 \%$) uporabljali kot insekticid predvsem v kmetijstvu. Za uporabo v poljedelstvu ga je potrebno prečistiti, saj tako nima okusa (Alloway in Ayres, 1993). Lindan so množično uporabljali tudi v lesarstvu za zaščito lesa. Z lindanom imregniran les je, zaradi dobre globinske penetracije, dolgotrajno zaščiten pred poškodbami insektov. Zaradi relativno visokega parnega tlaka lindana, pa zaščita s časom vseeno izgublja na moči. Danes se ga skoraj ne uporablja več, razen ponekod v državah tretjega sveta.

Lindan je zelo toksičen za organizme v okolju, kjer, zaradi relativno visoke topnosti v vodi, predstavlja potencialno nevarnost za onesnaženje vode in zemlje. Čeprav je nevarno vodno onesnažilo, je v okolju manj obstojen, kot ostali klorirani ogljikovodiki, saj ga razgrajujejo sončna svetloba in mikroorganizmi. Zaradi svoje hidrofobne narave pa ima težnjo po kopiranju v prehranjevalnih verigah (Alloway in Ayres, 1993).

Pri sesalcih deluje kot močan živčni strup, ki se akumulira v maščobnem tkivu in materinem mleku. Pri ljudeh povzroča kronične poškodbe, ki se odražajo v hipersenzibilnosti, spremembah krvne slike in nevroloških boleznih. Pri miših povzroča tumorje na jetrih (Alloway in Ayres, 1993).

2.1.3 Poliklorirani bifenili

Poznamo 209 zvrsti polikloriranih bifenilov (PCB, ang. polychlorinated biphenyls), ki se med seboj razlikujejo po številu in mestih vezave substituiranih atomov klora (od 1 do 10) na molekuli bifenila. Zaradi komplikiranega označevanja posameznih zvrsti PCB, je bila sprejeta nomenklatura, po kateri le-te označujemo s številkami od 1 do 209 (slika 2). PCB se odlikujejo po termični in kemični obstojnosti. Pri sobni temperaturi so tekočine (nižje klorirani), pa tudi viskozne smole in trdne snovi (višje klorirani). Parni tlak PCB je zelo nizek in upada s stopnjo kloriranja (Polič, 2005).



Slika 2: PCB-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-dekklorobifenil)

Figure 2: PCB-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decachlorobiphenyl)

2.1.3.1 Gospodarski pomen

Obstajajo različne tehnične mešanice PCB, ki so jih zaradi odlične kemijske stabilnosti PCB in njihove električne neprevodnosti množično uporabljali v različne industrijske

namene: v proizvodnji adhezivnih sredstev, tiskarskih barv, površinskih premazov, plastike, maziv, tekstila, hidravličnih tekočin, protipožarnih zaščit ter hladilnih sistemov v dielektričnih (kondenzatorji in transformatorji). Od dvajsetih let prejšnjega stoletja do leta 1978 so jih proizvajali v Evropi, ZDA in na Japonskem. Med bolj znanimi komercialnimi imeni so Aroclor (ZDA), Kaneclors (Japonska), Sovols (bivša Sovjetska zveza), Clophen (Nemčija), Phenoclor in Pyralene (Francija) ter Fenchlor (Italija) (Singh, 2006). Vsebnost klora v posameznih tehničnih mešanicah PCB je označena z dvomestno številko na koncu imena (npr. Aroclor 1242 – 42 % delež klora) (Unger in sod., 2001). V preglednici 4 so podani deleži posameznih zvrsti PCB in vsebnost klora za Aroclor 12 (Polič, 2005).

Preglednica 4: Molska masa in delež zvrsti PCB ter vsebnost klora v tehničnih mešanicah Aroclor 1242, 1248 in 1254

Table 4: Molecular weight, portion of PCB congeners and content of chlorine in technical mixtures Aroclor 1242, 1248 in 1254

PCB	Molska masa	Vsebnost Cl [%]	Delež zvrsti v Arocloru [%]		
			1242	1248	1254
monoklorobifenil	188,65	18,79	3	/	/
diklorobifenil	223,10	31,77	13	2	/
triklorobifenil	257,54	41,30	28	18	/
tetraklorobifenil	291,99	48,56	30	40	11
pentaklorobifenil	326,43	54,30	22	36	49
heksaklorobifenil	360,88	58,93	4	4	34
heptaklorobifenil	395,32	62,77	/	/	6

2.1.3.2 Prisotnost PCB v okolju

PCB so prisotni tako v živi, kot neživi naravi povsod po svetu in kot takšni predstavljajo globalni problem (Singh, 2006). Pri tem so vzrok onesnaženju okolja s PCB predvsem emisije tehničnih mešanic. Pomembni fizikalni lastnosti, ki prispevata k njihovi dolgotrajni prisotnosti v okolju, sta nizek parni tlak in slaba topnost v vodi (preglednica 5). Raziskave kažejo, da določeni mikroorganizmi lahko razgradijo nekatere zvrsti PCB, vendar v glavnem velja, da so v naravi obstojni, relativno močno vezani v zemlji in sedimentu ter dolgo časa (več desetletij) krožijo v okolju in se kopijo v organizmih (Polič, 2005).

Zaradi svoje nepolarnosti imajo tendenco po bioakumulaciji predvsem v maščobnem tkivu živali na višjih trofičnih nivojih (morski nevretenčarji, ribe, ptice in sesalci) (Hamdy in Gooch, 1986). Iz navedenih razlogov so PCB po merilih UNEP (ang. United Nations Environment Programme) uvrščeni med dvanajst za okolje najbolj škodljivih organskih onesnaževal (ang. Persistent Organic Pollutants, POPs), za katere so sprejeti najstrožji ukrepi nadzora tehnologij in varstva okolja (Polič, 2005).

Preglednica 5: Parni tlak in topnost v vodi nekaterih zvrsti PCB ter tehničnih mešanic Aroclor

Table 5: Steam pressure and water solubility of some PCB congeners and Aroclor technical mixtures

PCB	Parni tlak [Pa]	Topnost v vodi pri 25 °C [$\mu\text{g/L}$]
Aroclor 1242	0,10	100-300
Aroclor 1248	0,07	40-60
triklorobifenil	0,003-0,20	40-200
tetraklorobifenil	0,002-0,05	10-100
pentaklorobifenil	0,002-0,05	5-20

Glavna pot njihovega širjenja tako na lokalnem kot na globalnem nivoju (do 10000 km daleč) je atmosfera. PCB v zraku so bodisi kot hlapi ali adsorbirani na delce (aerosole), njihova koncentracija pa je odvisna od neposrednih emisijskih virov, izhlapevanja iz onesnažene vode, zemlje in sedimentov ter od meteoroloških pogojev. Podtalne in površinske vode ter zemlja se s PCB onesnažujejo z industrijskimi in komunalnimi odplakami ter s spiranjem, izcejanjem in usedanjem iz odlagališč, onesnažene zemlje ter zraka. V vodi so PCB bodisi raztopljeni ali pa so vezani v sedimentu oz. na suspendirane delce v vodi. Močno onesnažen sediment je lahko dolgoleten vir nadaljnega onesnaževanja vode in drugih medijs okolja na velikih razdaljah. Prenos in kroženje PCB v okolju je tako odvisno predvsem od koncentracijskih gradientov ter velikosti tokov med mediji (fazami) okolja: zrak – voda – zemlja – sediment – živa bitja, pa tudi od procesov razgradnje PCB in drugih kemijskih reakcij (Polič, 2005).

2.1.3.3 Vpliv PCB na živa bitja

PCB so strupene biološke učinkovine, ki se kovalentno vežejo na DNK. Njihova toksičnost je odvisna predvsem od stopnje kloriranosti, mest vezave substituiranih atomov klora in od

stereokemične strukture. Pri ljudeh in živalih povzročajo akutne ter kronične okvare na koži, jetrih in dihalih. Povzročajo tudi presnovne motnje ter nepravilnosti v delovanju endokrinega sistema in imunsko preobčutljivost. So mutageni, karcinogeni in teratogeni (Kimbrough, 1995).

2.1.3.4 Lokalna problematika, povezana s PCB

Leta 1962 so v tovarni Iskra Kondenzatorji v Semiču pričeli s proizvodnjo kondenzatorjev z uporabo impregnata iz PCB kot dielektrika. Onesnaženost širšega območja Semiča in belokrangske reke Krupe s PCB je silovito odjeknila v slovenski javnosti in tudi širše, ko so leta 1983 prvič izmerili veliko onesnaženost kraškega izvira (vode in sedimentov) reke Krupe. Leta 1985 so nato uporabo PCB v proizvodnji ukinili. Do takrat je poraba vsega impregnata znašala 3700 ton, pri čemer je nastalo 246 ton ostankov (tehnični izmet) (Polič in sod., 1985; Polič in Leskovšek, 1997). Od slednjih so jih 6,2 tone odprodali, 170 ton so poslali na uničenje (sežig v Franciji), emisijo pa predstavlja 70 ton odpadkov odloženih v okolju (preglednica 6) (Polič, 2005).

Preglednica 6: Pregled emisij odpadnega PCB (70000 kg) v širšem okolju tovarne Iskra kondenzatorji v Semiču 1962-1985 (Polič, 2005).

Table 6: Emissions of waste PCB (70.000 kg) from 1962 – 1985 in the area of Iskra Kondenzatorji factory in Semič (Polič, 2006)

Odpadni PCB	PCB [kg]
Emisije v zrak iz tehnološkega procesa	5000
Tehnološke odplake, razlitja, izgube pri manipulaciji in podobno	5000
Odloženi odpadki: - tovarniško odlagališče	43000
- vrtače v bližini proizvodne hale, divja odlagališča ob cesti Semič-Štrekljevec, neznani odvozi	2000
- ostala odlagališča: Lokve pri Črnomlju, Mladica, Vraoviči, naselja in odlagališča Romov	15000
SKUPAJ	70000

Kraške podzemne in površinske vode porečja reke Krupe je onesnažilo predvsem izcejanje ali izpiranje PCB iz odlagališč odpadkov in onesnažene zemlje v ožjem območju, pa tudi neposredne emisije v zrak. Iz onesnaženega zraka in zemlje so PCB prešli v kopenske rastline in živali. Iz onesnažene vode in sedimenta reke Krupe so PCB kontaminirali ribe in druge vodne ter obvodne organizme. Glavne poti vnosa PCB v ljudi so tako preko prehranjevalne verige (Polič, 2005).

2.2 BIOREMEDIACIJA

2.2.1 Osnovni pojmi

Razgradnja onesnaževal (ksenobiotikov) v okolju poteka z biološkimi, kemijskimi in fotokemijskimi procesi. Vse te procese lahko uporabimo v namene remediacije. Ksenobiotiki so snovi, najdene v organizmih, ki jih ti organizmi ne tvorijo sami (za njihov nastanek nimajo metabolne poti) in jih zato v njih običajno ne zasledimo. Ksenobiotiki pomenijo tudi snovi, ki so v okolju ali v organizmih prisotne v mnogo višjih koncentracijah, od običajnih. V procesu razgradnje ksenobiotikov nastanejo različni vmesni in končni produkti, od katerih imajo nekateri sposobnost akumulacije (Gadd, 2001).

Za procese biološke razgradnje ksenobiotikov obstaja več različnih izrazov, ki se v pomenu skoraj ne razlikujejo, vendar se vseeno pogosto uporablja ločeno. Ti so: biodegradacija, biološka razgradnja, mineralizacija, bioremediacija, biodeterioracija, biotransformacija, bioakumulacija in biosorpcija.

Biodegradacija je v širšem pomenu skupni izraz, ki se uporablja za vse biološke razgradnje kemijskih spojin. Popolna biodegradacija vodi do mineralizacije. Biodegradacija v ožjem kontekstu pomeni proces čiščenja, pri katerem se biološki sistemi uporabljajo za katalizo razgradnje ksenobiotikov ali za pretvorbo strupenih kemikalij v manj toksično obliko (Singh, 2006).

Biotransformacija je korak v biokemijski poti, ki vodi do pretvorbe predhodne molekule (reaktanta) v produkt. Niz takšnih korakov pa je biokemijska pot. S tem v zvezi je lahko nastali produkt manj ali pa bolj škodljiv za zdravje ljudi (Bennett in Faison, 1997).

Izraz biodeterioracija se običajno nanaša na razgradnjo ekonomsko pomembnih dobrin, v kontekstu biološke razgradnje ksenobiotikov pa pomeni razgradnjo odpadnih surovin, kot so kovine, plastika, zdravila, kozmetika, barve, skulpture in lesni predmeti (Rose, 1981).

Bioakumulacija ali biosorpcija pomenita kopičenje toksičnih spojin znotraj celic, ne da bi pri tem prišlo do razgradnje toksičnih molekul. Ta metoda je potencialno učinkovita predvsem v vodnih okoljih, kjer lahko organizme odstranimo, ko le-ti postanejo zasičeni s toksičnimi snovmi (Singh, 2006).

Bioremediacija je izraz, ki opisuje uporabo bioloških sistemov za razgradnjo toksičnih onesnaževal v okolju. Splošni pristop pri tem je povečanje naravne sposobnosti biodegradacije z avtohtonimi organizmi (naravna bioremediacija). Glede na uporabljene organizme delimo bioremediacijo na fitoremediacijo (rastline), baktoremediacijo (bakterije) in mikoremediacijo (glive). Bistvene prednosti bioremediacije pred drugimi postopki so (Dasappa in Loehr, 1991; Diehl in Borazjani, 2000):

- ekonomicnost; bioremediacija lahko zniža stroške razstrupljanja okolja od 20 do 50 %;
- varnost; lahko jo izvajamo na mestu nastajanja odpadkov in se tako izognemo transportu odpadkov skoz naselja ter čez kmetijske površine;
- učinkovitost; bioremedicija omogoča razgradnjo toksičnih onesnaževal v netoksične produkte in lahko poteka kontinuirano 24 ur na dan;
- sprejemljivost za družbo; javnost sprejema bioremediacijo kot "naravni" način čiščenja okolja in ji načeloma ne nasprotuje.

2.2.2 Bioremediacija z ligninolitičnimi glivami (mikoremediacija)

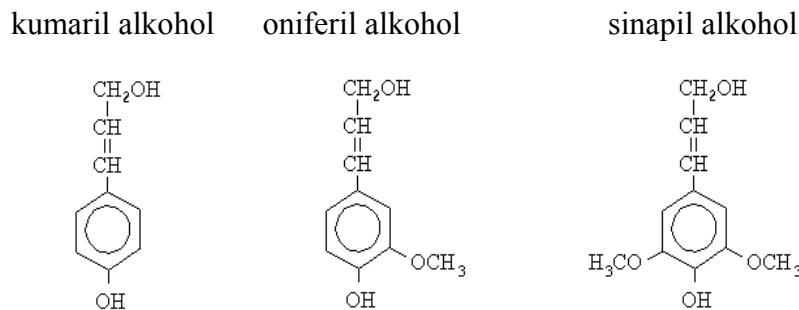
Sposobnost lesnih gliv, da transformirajo različne nevarne kemikalije, je vzbudila velik interes za njihovo biotehnološko uporabo v namene bioremediacije (Alexander, 1994). Lesne glive, ki povzročajo trohnenje lesa, opravlja zelo pomembno vlogo v naravnem ciklu ogljika, saj so edini organizmi, ki so sposobni popolnoma mineralizirati les (Hammel,

1996). Med njimi so z vidika bioremediacije kloriranih organskih biocidov še posebej pomembne glive povzročiteljice bele trohnobe. Slednje imajo razvite nespecifične encimske sisteme za razgradnjo lignina. Ligninolitični encimi so zelo učinkoviti tudi pri razgradnji ligninu strukturno podobnih organskih onesnaževal, npr. polikloriranih bifenilov in fenolov, policikličnih aromatskih ogljikovodikov, sintetičnih barvil ter sinteznih polimerov.

2.2.2.1 Glive bele trohnobe

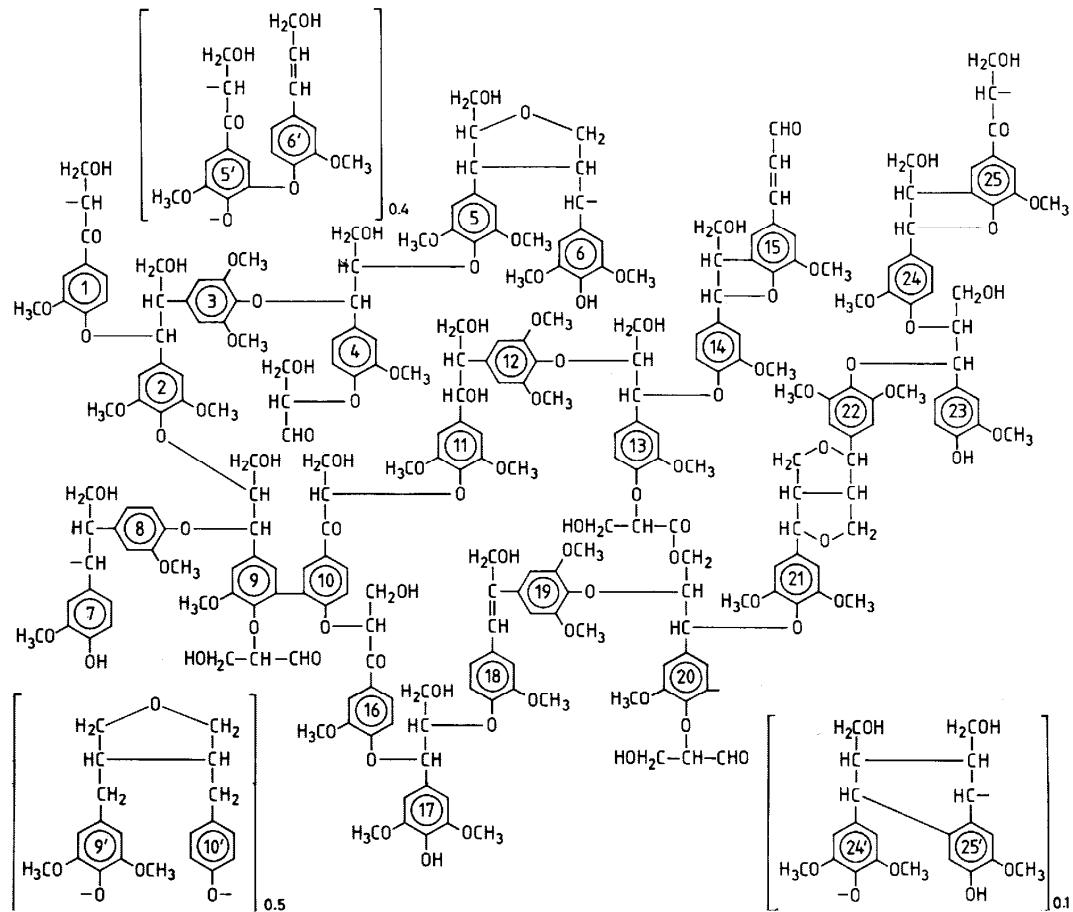
Glive povzročiteljice bele trohnobe lahko razkrajajo vse glavne komponente lesa, tako celulozo in hemicelulozo, predvsem pa lignin. Zaradi oksidativnega razkroja lignina postaja trhleči les svetlejši, zato to vrsto razkroja imenujemo bela trohnoba. Glive bele trohnobe lahko delimo na vrste, ki hkrati razgrajujejo ligninske in polisaharidne sestavine lesne celične stene (neselektivne delignifikatorke), ter vrste, ki najprej razgradijo lignin in šele nato depolimerizirajo hemicelulozo in celulozo (selektivne delignifikatorke) (Liese, 1970; Eriksson in sod., 1990; Eaton in Hale, 1993; Bajpai in Bajpai, 1998; Kirk in Cullen, 1998; Messner in sod., 1998; Tavzes, 2003). Pri tem so predvsem selektivne delignifikatorke potencialno najustreznejše za razgradnjo cikličnih organskih pesticidov (Srebotnik in sod., 1988).

Ker je polimer lignina prevelik za endocitozo, mora biti sistem za njegovo razgradnjo ekstracelularen – lizotrofni način prehranjevanja gliv (Srebotnik in sod., 1988). Monomerne fenilpropanske enote (slika 3), ki sestavljajo polimer lignina, so med seboj povezane z etrskimi vezmi in vezmi ogljik–ogljik, zato je ligninolitični proces oksidativen, in ne hidrolitičen. Zaradi prostorske neurejenosti ligninskega polimera (slika 4) pa so ligninolitični dejavniki bistveno manj specifični, kot so encimi, ki hidrolizirajo celulozo in hemiceluloze (Kirk in Cullen, 1998).



Slika 3: Fenilpropanske enote, ki sestavljajo polimer lignina (Eaton in Hale, 1993)

Figure 3: Phenilpropane monomers constituting the lignin (Eaton and Hale, 1993)



Slika 4: Predlagan model strukture lignina (Fengel in Wegener, 1989)

Figure 4: Schematic representation of lignin (Fengel and Wegener, 1989)

2.2.2.2 Ligninolitični encimski sistem gliv bele trohnobe

Razkroj lignina do enostavnih organskih molekul je kompleksen proces, za katerega je potrebno veliko različnih zunajceličnih encimov. Glive bele trohnobe razkrajajo lignin z zunajceličnimi oksidazami in peroksidazami, ki v ligninu tvorijo proste kationske radikale. Ti so nestabilni in reaktivni ter povzročijo številne spontane cepitve tega polimera. Glavni zunajcelični encimi, ki posredno ali neposredno delujejo na lignin, so lakaza (Lac), od mangana odvisna peroksidaza (mangan peroksidaza, MnP) in lignin peroksidaza (LiP). Vsi trije encimi lahko oksidirajo lignin tudi z mediatorji, ki so molekule z majhno relativno molekulsko maso (Kirk in Cullen, 1998). Večina gliv bele trohnobe izraža vsaj dva ali vse tri encime, nekatere pa očitno le enega (Kirk in Shimada, 1985; Eriksson in sod., 1990; Orth in sod., 1993; Hatakka, 1994; Tavzes, 2003).

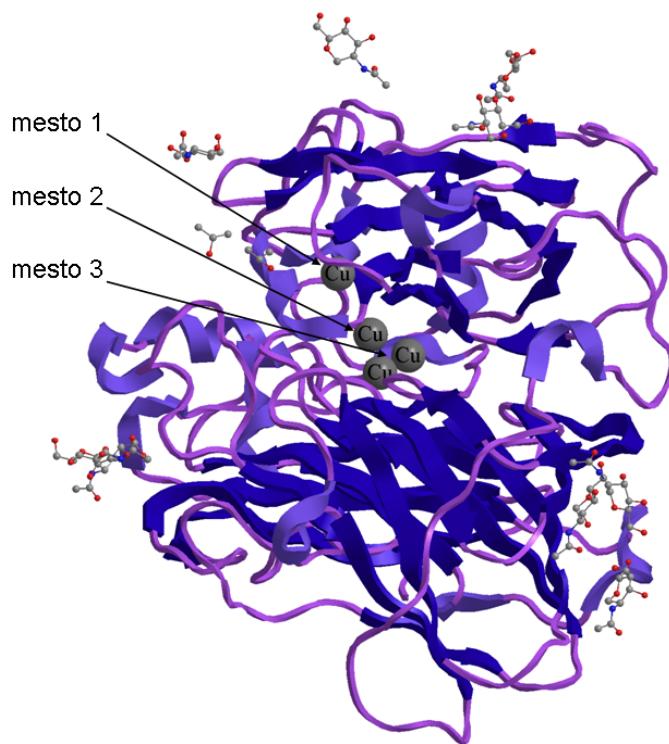
Biokemični procesi razkroja lignina se začnejo, ko se rast micelija v lesu upočasni in preide v stacionarno fazo. Glive bele trohnobe izločajo ligninolitične encime (in zato razgrajujejo lignin) predvsem v sekundarnem metabolizmu (idiofazi), ko nastopi pomanjkanje hrani (predvsem N in C) (Kirk in sod., 1978; Cullen in Kersten, 1996; Hammel, 1996; Kirk in Cullen, 1998; Podgornik, 2000; Tavzes; 2003). Da je razgradnja lignina sekundarni metabolni proces, kaže tudi dejstvo, da glive bele trohnobe ne uporabljajo lignina kot vira ogljika za svojo rast (Kirk in sod., 1978). Prehod iz primarnega v sekundarni metabolizem pri filamentoznih glivahsovпадa z višanjem koncentracije znotrajceličnega cAMP, kar so potrdili MacDonald in sodelavci (1985). Dodatek inhibitorjev cAMP (atropin, teofilin, histamin) zavre tvorbo LiP, delno pa tudi MnP, na ravni transkripcije (Boominathan in Reddy, 1992).

Ugotovili so, da lahko pride do tvorbe encimov tudi že v začetni fazi glivne okužbe lesa (Janse in sod., 1998; Messner in sod., 1998). Analize z elektronskim mikroskopom so pokazale, da so med vraščanjem hif v les ligninolitični encimi prisotni na več mestih: v celični steni hife, v sluznem ovoju, v periplazemskem prostoru ali združeni s plazmalemo oziroma membrano citoplazemskih veziklov (Garcia in sod., 1987; Srebotnik in sod., 1988; Daniel in sod., 1990).

2.2.2.3 Struktura in lastnosti ligninolitičnih encimov

2.2.2.3.1 Lakaza (Lac, EC 1.10.3.2)

Lakaze uvrščamo v majhno skupino encimov, ki se imenujejo "veliki modri bakrovi proteini" ali "modre bakrove oksidaze". V to skupino so vključene tudi rastlinske askorbat oksidaze ter sesalski plazemski protein ceruloplazmin (Thurston, 1994). Lakaze so zunajcelični glikoproteini s tipično molekulsko maso med 60 in 80 kDa, s 15 do 20 odstotnim deležem ogljikovih hidratov. Sladkorji, ki sestavljajo saharidni del glikoproteina, so glukoza, manoza, galaktoza, fukoza in arabinosa. Proteinski del molekule vsebuje okrog 500 aminokislin. Pred denaturacijo je to zelo kompaktna in nesferična molekula, zato so molekulske mase različnih lakaz velikokrat določili napačno (Yaropolov in sod., 1994). Fizikalno-kemijske raziskave so pokazale, da vsebuje lakaza v molekuli proteina štiri bakrove atome. Ti so v molekuli encima v treh različnih okoljih, ki jih imenujemo mesto 1, 2 in 3 (na mestu 3 sta dva atoma bakra) (slika 5).

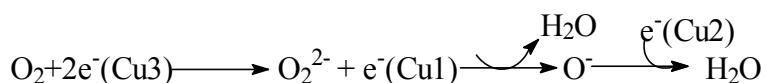


Slika 5: Tridimenzionalna struktura lakaze iz glive *T. versicolor*; označeni so bakrovi atomi na mestih 1, 2 in 3 (vir: Protein Data Bank – PDB koda 1GYC)

Figure 5: Three-dimensional structure of laccase from *T. versicolor*; copper atoms in positions 1, 2, and 3 are marked (source: Protein Data Bank – PDB code 1GYC)

Katalitske funkcije teh mest se razlikujejo glede na topilo in značilnosti okolja, v katerem je encim, ter spekter katalitskega delovanja. Mesto 1 je na voljo za interakcije s topilom in atom bakra je od tam možno odstraniti, vendar s tem povzročimo veliko izgubo aktivnosti lakaze. Ker na katalitskem mestu 1 manjka metionin, ki je dober ligand za baker, je ta vezava precej nestabilna (Yaropolov in sod., 1994; Thurston, 1994). To po nekaterih raziskavah pripomore k višjemu redoks potencialu lakaze, kot ga ima sorodna askorbat oksidaza. Struktura tega mesta pa določa tudi substratno specifičnost lakaze (Bourbonnais in sod., 1997). Bakrovi atomi na mestih 2 in 3 so si zelo blizu, zato bi lahko govorili tudi o triatomskega grozdu. Mesti 1 in 2 posredujeta pri elektronskem transportu, medtem ko mesto 3 sodeluje pri vezavi kisika. Vsa tri mesta so na molekulih encima drugo ob drugem. Tako je optimiziran intramolekularni elektronski prenos z oksidiranega substrata preko bakrovih atomov različnih zvrsti na kosubstrat – kisik, brez sproščanja kateregakoli visoko reaktivnega vmesnega produkta v medij (Yaropolov in sod., 1994; Thurston, 1994).

Intenzivno so proučevali zlasti sposobnost lakaze, da reducira molekulski kisik v vodo, kar je sicer značilno za terminalne oksidaze v aerobni respiraciji. Z lakazami ta reakcija poteče brez vmesne tvorbe peroksida. Redukcijo kisika v molekulo vode običajno spremljajo oksidacije fenolnega substrata. Študije, temelječe na cirkularnem dikroizmu, so pokazale, da so v katalizo vključeni vsi štirje atomi bakra. Do interakcije z molekularnim kisikom prihaja na vseh redukcijskih stopnjah reakcije (slika 6). Ena molekula vode se namreč zelo hitro sprosti v raztopino, druga pa ostane zelo tesno vezana na mesto baker 2. Začetna stopnja redukcije kisika v vodo je zato verjetno prenos dveh elektronov preko bakrove diade 3 na kisik in tvorba O_2^{2-} . Temu sledi prenos enega elektrona z bakra na mesto 1 na intermediat, pri čemer nastaneta voda in radikal O^- . Sprememba redoks stanja encima ta radikal stabilizira. Četrtni elektron se prenese z iona baker 2 na radikal O^- in tvori drugo molekulo vode.



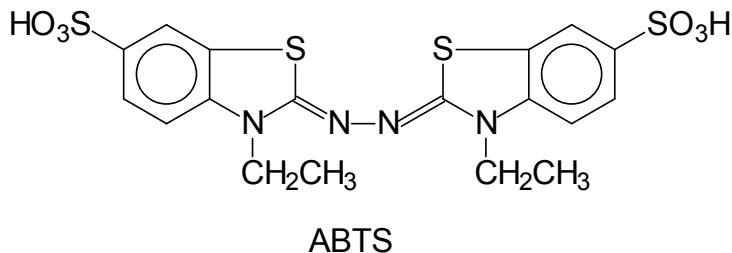
Slika 6: Redukcija kisika v vodo, kot jo katalizira lakaza (Yaropolov in sod., 1994)

Figure 6: Laccase-catalysed reduction of molecular oxygen to water (Yaropolov et al., 1994)

Prva stopnja celotne reakcije je gotovo prenos enega elektrona na mesto baker 1, pri čemer se iz organskega substrata tvori prosti radikal. Verjetno vsi elektroni vstopajo preko mesta baker 1, ki jih posreduje naslednjim katalitskim mestom. Proučevanja interakcij med lakazo in kisikom so pokazala, da je za cepitev vezi O–O potrebna relativno visoka energija, in avtorji razlagajo, da lakaza to energetsko bariero zaobide z “asimetrično” koordinacijo O_2^{2-} na dva različna atoma bakra, kar privede do polarizacije vezi O–O ter njenega razcepa pri nižjih energijah (Yaropolov in sod., 1994).

Oksidacija organskih substratov z lakazami je enoelektronska reakcija, pri kateri z odstranitvijo elektrona iz aromatskega jedra substratne molekule nastane kationski radikal. Ta je nestabilen in lahko vstopa v neencimske reakcije, kot so hidratacije in disproporcionacije. Sodeluje lahko tudi pri polimerizacijah, pri čemer nastajajo netopni, melaninu podobni amorfni produkti (Butler in Day, 1998).

Lakaza oksidira nefenolne spojine z relativno nizkim ionizacijskim potencialom. Vključena je v oksidacije številnih substratov, kot so metoksi-substituirani monofenoli, orto- in para- difenoli, aromatski amini in nefenolne spojine, kot je npr. 2,2'-azino-bis(3-etylbenz-tiazolin-6-sulfonat) (ABTS) (slika7) (Bourbonnais in Paice, 1990; Srinivasan in sod., 1995).



Slika 7: Strukturna formula ABTS

Figure 7: Structure of ABTS

Na aktivnost lakaz bistveno vpliva ionska jakost raztopine (Yaropolov in sod., 1994; Thurston, 1994). Močan inhibitor lakaz je fluoridni ion, saj se veže na mesto baker 2. Lakazo inhibirajo še nekateri halidi in acetati. Za lakaze je značilna tudi močna inhibicija z azidom (Bollag in Leonowicz, 1984).

Pri rastlinah so lakaze del sistema za sintezo lignina, pri glivah bele trohnobe pa so vključene v njegovo razgradnjo (Thurston, 1994). Prav njihova vloga v razgradnji lignina je precej nejasna. Uspešnost gliv tipa LiP-MnP, kakršna je *P. chrysosporium*, namreč kaže, da pri njej lakaze niso bistvene za razgradnjo lignina (Hatakka, 1994). Dokazali so, da lakaza lahko cepi znaten del vezi, ki nastopajo znotraj ligninske strukture, obenem pa je sposobna tudi polimerizacije lignina. Ena od zelo verjetnih vlog je, da polimerizira zelo toksične razgradne produkte ligninolize, ki jih tvorijo peroksidaze, in da zaradi polimerizacije v zunajceličnem prostoru te nevarne majhne molekule ne morejo vstopiti v hife gliv. Pri *P. chrysosporium* naj bi vlogo vezave toksičnih zunajceličnih molekul imel tudi zunajcelični glukan, ki ga tvori ta gliva. Pri drugih glivah pa lakaze tvorijo zunajcelične in znotrajcelične pigmente (Thurston, 1994).

2.2.2.3.2 Lignin peroksidaza (LiP, EC 1.11.1.14)

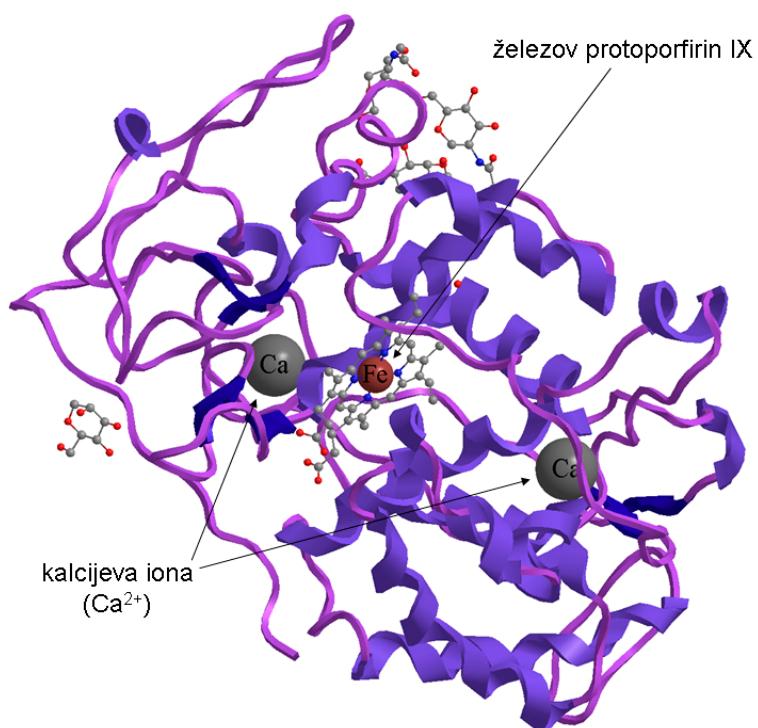
LiP so hemoproteini, ki ob prisotnosti vodikovega perokksida katalizirajo oksidacijo nefenolnih aromatskih obročev lignina v kationske radikale (Bajpai in Bajpai, 1998). Podobne so ostalim peroksidazam, kot je na primer dobro proučena hrenova peroksidaza. Molske mase izoencimov LiP so med 38 in 43 kDa, njihove izoelektrične točke (ang. isoelectric point, pI) med 3,3 in 4,7, za delovanje optimalne vrednosti pH pa so v kislem območju (Boominathan in Reddy, 1992; Kirk in Cullen, 1998). Vsi so N-glikozilirani, verjetno pa imajo vse LiP ogljikove hidrate vezane tudi preko O-glikozidne vezi. Odstranjeni ogljikovi hidrati imajo skupno molsko maso med 2,5 - 3,0 kDa (Glumoff in sod., 1990). Odstranitev glikozidnega dela ne zmanjša njihove encimske aktivnosti, kar je pokazala tudi aktivnost rekombinantnega (neglikoziliranega) H8 (Maione in sod., 1987).

LiP praviloma sestavlja dve podenoti. Kot kaže slika 8, vsaka od njiju vsebuje dva Ca^{2+} iona, molekulo hema z železovim ionom ter sladkorno enoto. Kristalna struktura LiP (Edwards in sod., 1993) je presenetljivo podobna tridimenzionalni strukturi citokrom-C peroksidaze (CCP), čeprav se z njo v aminokislinskem zaporedju ujema le v 20 %. Proksimalni ligand hema je pri obeh encimih His, ki je z vodikovo vezjo vezan na Asp globje v tridimenzionalni strukturi encima. Nasprotno pa je hemov propionat pri LiP z

vodikovo vezjo vezan na Asp, in ne na Asn, tako kot pri CCP. To bi lahko pojasnilo nizko vrednost pH, potrebno za optimalno delovanje LiP (Cullen, 1997).

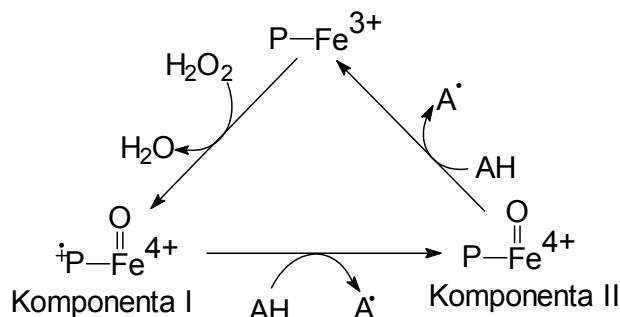
LiP delujejo s tipičnim peroksidacijskim ciklom. H_2O_2 oksidira LiP v vmesno stopnjo, imenovano komponenta-I, ki ima primanjkljaj dveh elektronov. Ta intermedijat se vrne v mirovno stanje z dvema enoeklektronskima oksidacijama substrata (odvzem enega elektrona z aromatskega obroča substrata lignina ali ligninske modelne komponente), pri čemer se tvori kationski radikal (Kersten in sod., 1985). Ta nato reagira brez posredovanja encima. Vmesna stopnja, imenovana komponenta-II, ima primanjkljaj enega elektrona (Kirk in Cullen, 1998) (slika 9).

Ker so LiP močnejši oksidanti, kot ostale peroksidaze, ne oksidirajo le tipičnih peroksidaznih substratov, kot so fenoli in aromatski amini, ampak tudi vrsto drugih aromatskih etrov in policikličnih aromatov z ustreznim ionizacijskim potencialom (Kersten in sod., 1990; Podgornik in sod., 1999; Podgornik in Podgornik, 2002).



Slika 8: Tridimenzionalna struktura ene podenote LiP iz glive *P. chrysosporium*; označena sta kalcijeva iona in molekula hema z železovim ionom (vir: Protein Data Bank – PDB koda 1LLP)

Figure 8: Three-dimensional structure of LiP subunit from *P. chrysosporium*; calcium ions and heme molecule with Fe ion are marked (source: Protein Data Bank – PDB code 1LLP)



Slika 9: Shema katalitskega cikla LiP (Kirk in Cullen, 1998)

Figure 9: Scheme of LiP catalytic cycle (Kirk in Cullen, 1998)

Če LiP deluje neposredno na ligninski polimer, je to mogoče le na površini olesenele celične stene, saj je encim prevelik, da bi prodrli globlje v celično steno, tudi če je ta že precej razgrajena (Blanchette in sod., 1997). Tak način razgradnje lesne celične stene dejansko opazimo pri simultani beli trohnobi. Če pa z elektronskim mikroskopom opazujemo potek selektivne delignifikacije, je videti, da glice odstranijo lignin iz notranjosti olesenele celične stene že v začetnih stadijih razkroja, ko je njena struktura še precej nedotaknjena. Zato je Hammel (1996) predlagal, da lahko LiP na lignin deluje tudi posredno, tako da oksidira substrate z majhno relativno molekulsko maso, ki nato prodrejo globlje v lesno celično steno in tam oksidirajo lignin.

Takšna substrata z majhno relativno molekulsko maso naj bi bila Mn(III) in VA^{•+}. Slednji nastane z oksidacijo iz veratril alkohola (VA). Ta je obenem naravni sekundarni metabolit glice. Vloga Mn(III) v procesu oksidacije z LiP je splošno privzeta in nesporna. Vloga VA^{•+} pri razgradnji lignina, kot edinega posrednika, pa je dvomljiva, če upoštevamo izjemno kratkoživost takega radikala. Njegova življenska doba je največ milisekunda (Candeias in Harvey, 1995). Bolj verjetno je, da VA^{•+} oksidira oksalat in malonat, ki nato v nadaljevanju delujeta kot prava difuzivna oksidanta (Khindaria in sod., 1996).

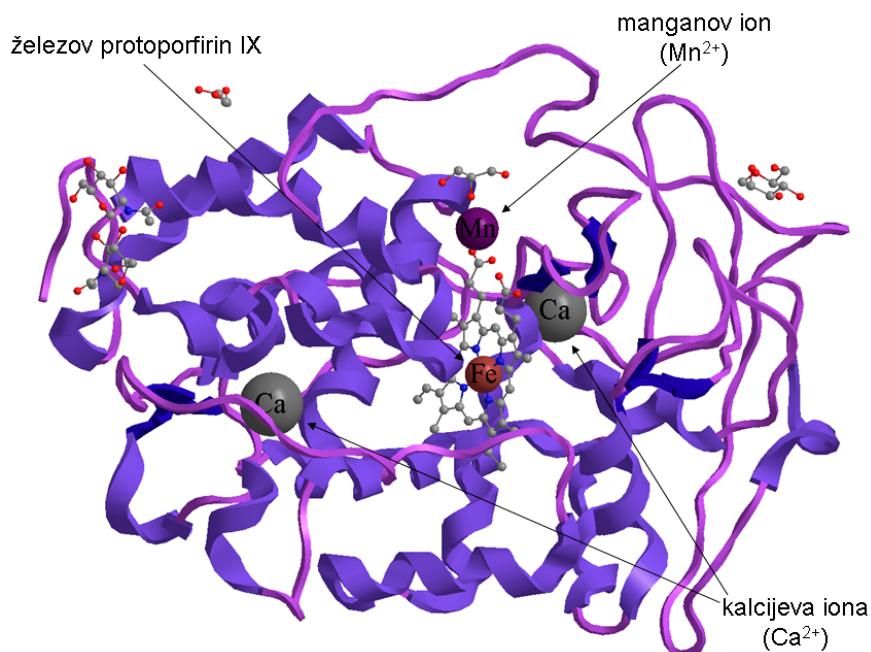
LiP je trenutno edini poznan glivni oksidant, ki poleg drugih katalizirajočih reakcij (Podgornik, 2000), povzroča pretrganje vezi Cα-Cβ *in vitro* in zunajcelično razpre-

aromatski obroč (Kirk in Cullen, 1998). Ta pojava sta značilna za razgradnjo lignina, ki jo povzročajo ligninolitične glive *in vivo*.

2.2.2.3.3 Mangan peroksidaza (MnP, EC 1.11.1.13)

Molekule od mangana odvisne peroksidaze (mangan peroksidaza, MnP) so večje od LiP (50–60 kDa). Prav tako, kot LiP, vsebujejo železov protoporfirin IX. So glikolizirane in imajo izoelektrične točke in pH optimume v kislem območju (Kirk in Cullen, 1998). Kristalna struktura MnP je podobna strukturi LiP. V aktivnem centru je ligand proksimalno z vodikovo vezjo vezan na Asp. Distalno stran žepa, v katerega se veže peroksid, tvorita katalitični His in Arg (Cullen, 1997). Vezno mesto za mangan naj bi predstavljal Asp203, kar so dokazali z mestno usmerjeno mutagenezo (Kusters-van in sod., 1995), Glu59, Glu63 in propionat hema (Sundaramoorthy in sod., 1994).

MnP ima eno podenoto, vsebuje pa, podobno kot ena podenota LiP, dva iona Ca^{2+} , molekulo hema z železovim ionom ter slatkorno enoto (slika 10). Od LiP se MnP ločijo še po 7 - 11 aminokislin dolgi površinski zanki in podaljšanem C-terminalnem delu (Sundaramoorthy in sod., 1994), na katerem je še peti disulfidni mostiček, ki ga pri LiP ne zasledimo (Kirk in Cullen, 1998).

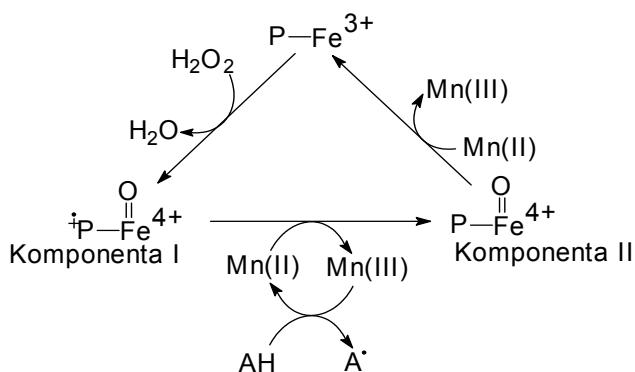


Slika 10: Tridimenzionalna struktura MnP glive *P. chrysosporium*; označena sta kalcijeva iona, manganov ion in molekula hema z železovim ionom (vir: Protein Data Bank – PDB koda 1YZR)

Figure 10: Three-dimensional structure of MnP from *P. chrysosporium*; calcium ions, manganese ion and heme molecule with Fe ion are marked (source: Protein Data Bank – PDB code 1YZR)

Katalitska cikla za obe družini ligninolitičnih peroksidaz (LiP in MnP) sta zelo podobna in se ujemata s ciklom, ki je značilen tudi za hrenovo peroksidazo (Tien, 1987). Primarni produkt reakcije peroksidaze s H₂O₂ je t. i. komponenta-I, ki prevzame oba oksidativna ekvivalenta s peroksida. Protoporfirinski obroč v proteinu tako dobi naravo π -kationskega radikalja. Tvorba komponente-I je odvisna od vrednosti pH, verjetno zaradi distalnih ioniziranih aminokislinskih ostankov na proteinu. Porfirinski kationski radikal prejme en elektron z molekule organskega substrata, s čimer dobimo kationski radikal substrata in encimsko komponento-II. Komponenta-II lahko sprejme naslednji elektron z druge molekule substrata ali pa drugi elektron z istega substrata, tako da je možna tudi dvoelektronska oksidacija substrata. Konverzija komponente-I v komponento-II, kakor tudi njena konverzija nazaj v izhodiščno stanje, potekata pri MnP preko pretvorbe Mn(II) v Mn(III). Prav zato sta ti dve stopnji odvisni od prisotnosti α -hidroksi organske kisline. Ta s tvorbo in stabilizacijo Mn(III)-kompleksa verjetno pospeši disociacijo kompleksa encim-Mn. Medtem ko pri MnP lahko poteče redukcija komponente-I v komponento-II tudi s številnimi fenolnimi substrati, in ne le z Mn(II), poteče redukcija komponente II v nativni

encim le z Mn(II). Brez tega se katalitski cikel MnP ne more zaključiti. Bistvene stopnje cikla MnP so shematično prikazane na sliki 11, pri čemer stranske reakcije, ki vodijo v delno ali popolno deaktivacijo z vodikovim peroksidom, niso navedene (Podgornik, 2000).



Slika 11: Shema katalitskega cikla MnP (Podgornik, 2000)

Figure 11: Scheme of MnP chalytic cycle (Podgornik, 2000)

MnP ob prisotnosti Mn(II) in vodikovega peroksida katalizirajo naslednje tipe reakcij (Kuwahara in sod., 1984; Glenn in Gold, 1985; Huynh in Crawford, 1985): oksidacijo barvil in fenolov, oksidativno cepitev modelnih ligninskih dimerov ter dekarboksilacijo in demetoksilacijo aromatskih substratov. Kasnejše raziskave so potrdile, da večina teh reakcij poteče z Mn(III) v postencimatskih reakcijah (Aitken in Irvine, 1990).

2.2.2.4 Bioremediacija ksenobiotikov z ligninolitičnimi glivami ali z njihovimi encimi

V zadnjih dvajsetih letih je bilo opravljenih mnogo raziskav o ustreznosti gliv bele trohnobe za potrebe mikoremediacije različnih ksenobiotikov (Pointing, 2001; Levin in sod, 2003; Mansur in sod., 2003; Baldrain, 2004; Verdin in sod., 2004). Večina teh raziskav je v laboratorijskih pogojih uspela dokazati, da so ligninolitični encimi, s katerimi glive bele trohnobe razgrajujejo ligninske komponente lesa, potencialno učinkoviti tudi pri razgradnji ligninu strukturno podobnih organskih onesnaževal, npr. polikloriranih bifenilov in fenolov, policikličnih aromatskih ogljikovodikov, sintetičnih barvil ter sinteznih polimerov. Te sintetične snovi najdemo v zemlji na obdelovalnih poljih, na vojaških poligonih (ostanki razstreliv), v zaščitenem lesu, odpadnih vodah in odpadnih produktih kemijske ter tekstilne industrije (barvila). Pri tem so predvsem selektivne delignifikatorke

potencialno najustreznejše za razgradnjo cikličnih organskih biocidov (Srebotnik in sod., 1988). Da bi jih glice bele trohnobe lahko uspešno mineralizirale, potrebujejo sicer primarni vir ogljika ter pomanjkanje katerega od hranil, kar sproži izražanje ligninolitičnih encimov. Pri tem bioremediacija z glivami bele trohnobe ni ne hitra, ne izjemno učinkovita, je pa temeljita in nespecifična, kar je izjemna prednost (Hammel, 1995).

Bistvene lastnosti, ki zagotavljajo uspešnost lesnih gliv v bioremediaciji, so (Reddy, 1995):

- sposobnost razgradnje raznovrstnih toksičnih ksenobiotikov,
- pojavljanje vrst v naravnem okolju,
- vnos gliv na onesnažena področja ne povzroča dodatne škode,
- zunajcelični ligninolitični encimi oksidirajo tudi slabo topne substrate,
- glice dobro uspevajo na cenenih substratih, ki služijo kot primarni vir ogljika,
- hife vraščajo in preraščajo substrat ter tako same kolonizirajo onesnaženo področje
- ligninolitični sistem se aktivira ob mejnih koncentracijah dušika v substratu (lesu).

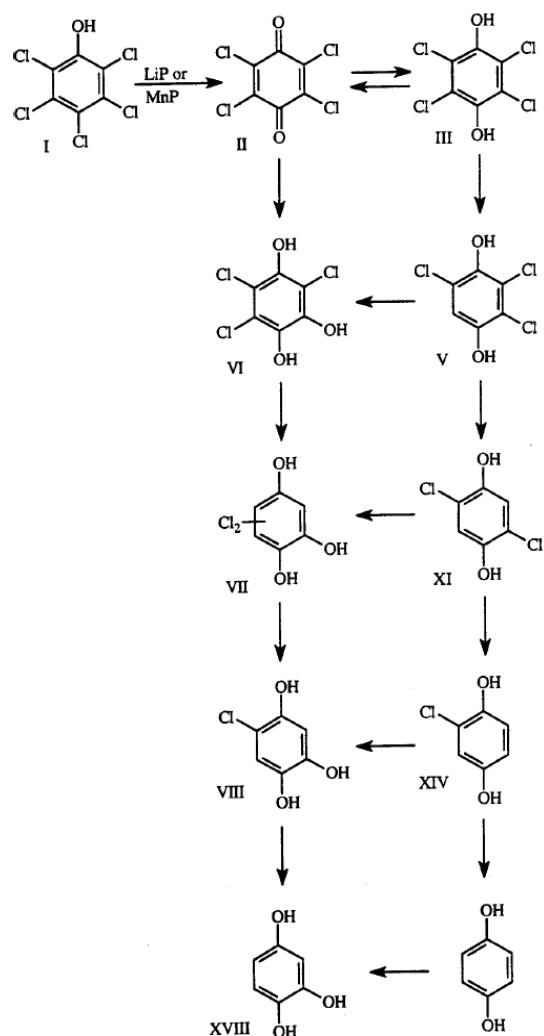
2.2.2.4.1 Primeri uspešnih razgradenj cikličnih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami ali njihovimi encimi

Študije razgradnje benzena in fenola ter njunih derivatov z glivami bele trohnobe imajo z vidika bioremediacije velik biotehnoški potencial, zato so predmet mnogih raziskav. V enem od najzgodnejših poročil je Lyr že leta 1963 poročal o tem, da so glice sposobne razgraditi klorirane fenole. Leto kasneje sta tudi Duncan in Deverall (1964) pokazala, da pride ob izpostavitvi glici *Trichoderma* sp. do 43 % zmanjšanja deleža PCP v lesnih sekancih. Cserjesi in Johnson (1972) pa sta poročala o transformaciji PCP z glivo *Trichoderma virgatum*, ki 10 - 20 % PCP metilira v pentakloroanizol. V raziskavah bioremediacije je ena od bolje proučenih glic *P. chrysosporium*, ki je v 15-ih dneh sposobna popolnoma razgraditi meta- in para-klorofenole, pri čemer je hitrost razgradnje odvisna od mesta substituiranih klorovih atomov. Razgradnja je hitrejša pri zvrsteh s klorom na orto pozicijah (Perez in sod., 1997). Metabolna pot razgradnje fenola z ligninolitičnimi glivami vključuje oksidativno cepitev benzenovega jedra, pri čemer nastanejo različni metaboliti in produkti, ki so predmet nadaljnjih cepitev tako z glivami, kot tudi z mikrobeno populacijo v prsti (Kremer in Anke, 1997). Reddy in Gold (2000) pa

sta opisala pot razgradnje (oz. postopnega odcepljanja atomov klora z molekule) PCP z glivo *P. chrysosporium*. Pri tem MnP in LiP katalizirata oksidacijo PCP v klorobenzokinone, oba encima pa katalizirata tudi oksidacijo tetraklorohidroksibenzokinonov v odgovarajoče benzokinone (slika 12).

Konvencionalne tehnologije remediacije v primeru PCB niso ustrezne zaradi visokih stroškov sežiga in predvsem zaradi prenosa teh kemikalij med mediji zrak-voda-zemlja. Razgradnja PCB z glivami bele trohnobe zato ponuja trajnosten in potencialno učinkovit pristop k nastali problematiki globalnega onesnaženja okolja predvsem s komercialnimi tehničnimi mešanicami PCB. Mnoge vrste gliv bele trohnobe so sposobne razgraditi posamezne zvrsti PCB, kot tudi njihove kompleksne tehnične mešanice. Poleg gline *P. chrysosporium* (Beaudette in sod., 1998; Kubatova in sod., 2001), so to še *Coriolopsis polysona* (Vyas in sod., 1994; Novotny in sod., 1997), *T. versicolor* (Beaudette in sod., 1998; Cloete in Celliers, 1999; Koller in sod., 2000); *Bjerkandera adusta* (Beaudette in sod., 1998) in *Lentinus edodes* (Sasek in sod., 1993; Ruiz-Aguilar in sod., 2002).

Mnoge gline in mikroorganizmi so sposobni hitro razgraditi policiklične aromatske ogljikovodike z nizko molekulsko težo, kot so naftalen, ecenaften, acenafitilen, fluoren, antracen in fenantren (Pothuluri in sod., 1992a, b; Sutherland in sod., 1995; Eriksson in sod., 2000). Policiklični aromatski ogljikovodiki z več kot tremi kondenziranimi benzenovimi obroči pa so mnogo bolj odporni na mikrobično razgradnjo. Nekatere od njih so določene vrste gliv bele trohnobe vseeno sposobne razgraditi: razgradnjo perilena in pirena so dokazali z glivo *P. chrysosporium* (Hammel in sod., 1986); razgradnjo dibenzopirena, benzo[a]pirena in benzo[a,h]antracena pa z različnimi manj znanimi vrstami gliv bele trohnobe (Steffen in sod., 2007).



Slika 12: Predvidena pot razgradnje PCP z glivo *P. chrysosporium* (Reddy in Gold, 2000)

Figure 12: Proposed PCP degradation pathway in *P. chrysosporium* (Reddy in Gold, 2000)

Seznam cikličnih organskih biocidov, pri katerih so doslej dokazali razgradnjo z lesnimi glivami kot organizmi ali z njihovimi ligninolitičnimi encimi, je presenetljiv in se ne konča pri zgoraj naštetih kemikalijah. V preglednici 7 povzemamo izbor raziskav uspešnih razgradienj ali pretvorb organskih onesnaževal, ki so bile objavljene v zadnjih dvajsetih letih.

Preglednica 7: Sintetični organski onesnaževalci, ki jih razgrajujejo gline bele trohnobe ali njihovi ligninolitični encimi

Table 7: Syntetic organic pollutants that were shown to be degraded by the white-rot fungi or their ligninolytic enzymes

<i>Skupine ligninu strukturno podobnih sintetičnih organskih onesnaževalcev</i>		<i>Sintetični organski onesnaževalci</i>	<i>Viri</i>	
I.	Alkil aromatske in heteroaromatske policiklične snovi	1. dibenzo[<i>p</i>]dioksin	Hammel in sod., 1986	
		2. 2,7-diklorobenzo[<i>p</i>]dioksin	Valli in sod., 1992a	
		3. DDT (1,1,1-trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etan)	Bumpus in Aust, 1987; Mitra in sod., 2001; Hunag in sod., 2007	
II.	Poliklorirani bifenili (PCB)	1. 3,3',4,4'-tetraklorobifenil,	Dietrich in sod., 1995;	
		2. 2,3-diklorobifenil, 2,4',5-triklorobifenil, 2,2',4,4'-tetraklorobifenil, 2,2',5,5'-tetraklorobifenil,	Beaudette in sod., 1998;	
		3. komercialna mešanica PCB Delor 103	Kubatova in sod., 2001; Moeder in sod., 2005;	
		4. mešanica PCB: tetraklorobifenili (3,3',4,4'-; 3,4,4',5-), pentaklorobifenili (2,3,3',4,4'-; 2,3,4,4',5-; 2,3',4,4',5-; 2'3,4,4',5-; 3,3',4,4',5-), heksaklorobifenili (2,3,3',4,4',5-; 2,3,3',4,4',5'-; 2,3',4,4',5,5'-; 3,3',4,4',5,5'-) in 2,3,3',4,4',5,5'-heptaklorobifenil	Kamei in sod., 2006a;	
		5. 4,4'-diklorobifenil	Dietrich in sod., 1995; Beaudette in sod., 1998; Kamei in sod., 2006b	
		6. posamezne mešanice tetraklorobifenilov, pentaklorobifenilov, heksaklorobifenilov in heptaklorobifenilov	Takagi in sod., 2007	
III.	Klorirani in poliklorirani fenoli	1. 2,4,6-TCP	Hammel in Tardone, 1988; Reddy in sod., 1998	
		2. 2,4-DCP	Hammel in Tardone, 1988; Valli in Gold, 1991	
		3. 2,4,5-TCP	Hammel in Tardone, 1988	
IV.	Sintetična barvila (kemijsko različne skupine spojin; uporaba v tekstilni industriji)	1. perilen	Hammel in sod., 1986;	
		2. piren	Hammel in sod., 1986	
		3. dibenzopiren	Steffen in sod., 2007	
		4. benzo[<i>a</i>]piren		
		5. benzo[<i>a</i>]antracen		
		6. dibenzo[<i>a,h</i>]antracen		
		7. antracen	Field in sod., 1996	
		8. fenantren	Brodkorb in Legge, 1992	
		9. fluoranten	Pothuluri in sod., 1992a	
		10. fluoren	Bogan in sod., 1996	
		11. acenaften	Pothuluri in sod., 1992b	
V.	Substituirani benzenovi derivati	1. indigo karmin	Podgornik in sod., 2001	
		2. tiazinska barvila	Podgornik in sod., 1999;	
		3. ksantenska barvila (fluorescin, eozin)	Podgornik, 2000	
		4. monoazo barvila	Podgornik in sod., 1999; Swamy in Ramsay, 1999	
		5. antrakinoni		
		6. ftalocianini		
		7. disazo barvila	Swamy in Ramsay, 1999	
		1. metoksibenzeni	Kersten in sod., 1985	
		2. klorometoksibenzeni	Valli in Gold, 1991; Valli in sod., 1992b	
		3. BTEX (benzen, toluen, etilbenzen, ksilen)	Yadav in Reddy, 1993	
		4. TNT (2,4,6-trinitrotoluen)	Kim in Song, 2000; Kim in Song, 2003; Van Aken in sod., 1999	

2.2.2.4.2 Mikoremediacija kontaminiranih področij v naravi

Večina raziskav mikoremediacije je bila opravljena v laboratorijskih pogojih, zato se porajajo pomisleki v zvezi z aplikacijo teh raziskav na velika kontaminirana področja v naravnem okolju. Glive bele trohnobe so uspešne pri razgradnji zelo toksičnih in kompleksnih organskih onesnaževal v sterilnih razmerah (avtoklavirana zemlja ali sintetični medij). Rezultati v okoljskih razmerah pa niso nujno spodbudni, če vzamemo v ozir vse okoljske dejavnike (avtohtona favna in mikroflora, temperatura, vlaga, pH) (Reddy in Mathew, 2001; Hestbjerg in sod., 2003).

V zelo malo raziskavah so se ukvarjali z razgradnjo onesnažil z glivami bele trohnobe v naravnih razmerah. Pri tem so ena od pomembnejših težav stabilni rastni pogoji, potrebni za večino gliv bele trohnobe. Tako npr. *P. chrysosporium*, pomembnejši bioremediator, zahteva visoke temperaturne (30 - 37 °C) za rast in produkcijo ligninolitičnih encimov (Hestbjerg in sod., 2003). Prav tako imajo mnoge vrste gliv bele trohnobe nizke kompetitivne sposobnosti v okolju. Vendar so določene vrste lahko zelo uporabne z vidika okoljskih aplikacij. Vrste iz rodu *Pleurotus* (pomembnejši rod za proizvodnjo užitnih gob in s tem vir glivnega komposta) imajo veliko nižje temperaturne zahteve za rast in produkcijo ligninolitičnih encimov, kot druge podobne vrste, vpliv avtohtone mikroflore in ostalih vrst gliv na njihovo rast pa je manjši (Hestbjerg in sod., 2003).

Izziv pri okoljskih raziskavah bioremediacije predstavlja tudi določanje kemičnih transformacij, ki jih povzročajo organizmi v zemlji. V naravnih razmerah je določanje kemijskih sprememb, ki jih povzročajo glive, precej težavno. Možna rešitev je radioaktivno označevanje onesnaževal za določanje deležev njihove razgradnje in identifikacijo nastalih produktov. Težavo pri tem pa predstavlja visoka stopnja adsorpcije sveže dodanega onesnažila na organski material v prsti. S tem lahko porušimo realne okoljske razmere, kar vpliva na sestavo avtohtone mikrobne združbe (Reddy in Mathew, 2001).

Nekatere študije učinkovitosti bioremediacije s fungicidi kontaminirane prsti, npr. s pentaklorofenolom, so pokazale visoko stopnjo učinkovitosti razgradnje teh spojin z glivami (do 1000 mg/kg prsti) (Pointing, 2001; Walter in Sivakumaran, 2002; Walter in

sod., 2005). Razpolovni časi biorazgradnje pentaklorofenola pri laboratorijskih poskusih so krajši od 48 ur in celo testi v naravi so pokazali ugodne razpolovne čase, krajše od 15 dni (Martinson in sod., 1984; Crawford in Mohn, 1985).

Na področju mikoremediacije si je v zadnjih letih pridobila veljavno tehnika uporabe izrabljenega glivnega komposta (ang. spent-mushroom compost), ki ga dodajo v zemljo na kontaminiranih področjih. Za vsak kilogram vzgojenih užitnih gob se namreč pridela 5 kg glivnega komposta, kar je leta 1999 znašalo 40 milijonov ton (Law in sod., 2003). Kompost lahko uporabimo kot učinkovito orodje za recikliranje kompleksnih organskih onesnaževal, kar hkrati predstavlja trajnostni pristop k bioremediaciji. Uporaba glivnega komposta v onesnaženem okolju temelji na visokih vrednostih Lac in MnP ter visoki vsebnosti ogljika v kompostu (Lau in sod., 2003; Law in sod., 2003; Hestbjerg in sod., 2003). Velik potencial uporabe glivnega komposta v bioremediaciji onesnaženih področij dokazujejo tudi laboratorijske raziskave. Law je s sodelavci (2003) glivni kompost iz pridelave *Pleurotus pulmonarius* uporabil za čiščenje s PCP kontaminirane vode. Z dodatkom glivnega komposta so v dveh dneh odstranili 89 % PCP (prisotnega v nizki koncentraciji), predvsem na račun ligninolitičnih encimov (70 %) in biosorpcije PCP na micelij v kompostu (19 %). Druga raziskava je pokazala, da lahko z glivnim kompostom v dveh dneh popolnoma odstranimo tudi določene poliaromatske ogljikovodike iz kontaminiranih vzorcev zemlje (Lau in sod., 2003).

Čeprav so raziskave bioremediacije v okoljskih razmerah še precej na začetku, so vendarle pomembne za usmerjanje prihodnjih raziskav in predvidevanj možnih zapletov, ki se lahko pojavijo ob bioremediaciji v velikem obsegu.

2.2.2.4.3 Biotehnikoška uporabnost v industriji

Ugotovitev razmer gojenja gliv za selektivno produkcijo ligninolitičnih encimov in proizvodnja večjih količin teh encimov z uporabo rekombinantne DNK tehnologije odpirata možnosti uporabe ligninolitičnih gliv in njihovih encimov v nekaterih biotehnikoških procesih. Prenos tehnologije iz stopnje pilotskega poskusa na industrijsko raven sicer predstavlja najbolj zahteven in nepredvidljiv korak, vendar najnovejši uspehi pri kloniranju ligninolitičnih encimov v znane organizme (hiper-producente) kažejo, da bo

v bližnji prihodnosti te encime mogoče pridobivati po ceni, ki bi omogočila njihovo biotehnološko uporabo v industrijskem obsegu (Bajpai in Bajpai, 1998).

Sposobnost razgradnje lignina daje možnost uporabe gliv ali njihovih encimov pri pretvorbi lignoceluloznih materialov v kemikalije in goriva (Reddy, 1995) ter za predelavo kmetijskih odpadkov v krmo (Kamara in Zadrazil, 1988). Biotehnološki postopki uporabe ligninolitičnih gliv ali njihovih encimov na področju bioremediacije onesnaževal v industrijskih procesih (npr. v papirni, kemični in tekstilni industriji) so usmerjeni v razgradnjo na mestu njihovega nastanka ali uporabe. Več raziskovalcev je dokazalo, da se lahko za razbarvanje odpadnih vod papirne industrije uspešno uporabijo kulture gliv bele trohnobe, predvsem *P. chrysosporium*. Z uporabo omenjene gline so uspeli rjave odpadne vode beljenja v štirih dneh razbarvati za 60 %, kasneje pa so v tankoslojnem reaktorju odplakam odstranili celo 80 % obarvanja. Do razbarvanja pride zaradi encimske razgradnje kloriranih fenolov z metilacijo, oksidacijo in redukcijo (Boominathan in Reddy, 1992). Ker so onesnaževala v odpadnih vodah iz tekstilne industrije (barvila) in iz industrije predelave motornih olj analogne sestave, so s temi glivami poskušali očistiti tudi tovrstne odplake (Sayadi in sod., 1996, Pérez in sod., 1998; Mohorčič in sod., 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vrste gliv

Uporabili smo različne vrste in seve gliv, od katerih sodi ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*) v skupino zaprtotrosnic (*Ascomycota*), ostale pa so predstavnice skupine prostotrosnic (*Basidiomycota*). Kulture micelija teh vrst gliv 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 (Raspor in sod., 1995). Skupaj z okrajšavami in tipom trohnobe, ki jo povrzročajo, jih navajamo v preglednici 8.

Preglednica 8: Vrste oz. sevi gliv, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu

Table 8: Species or strains of fungi used in the experiments

Latinsko ime	Slovensko ime	Vir	Okrajšava	Depozitna oznaka	Trohnoba
<i>Chondrostereum purpureum</i> (Pers. ex Fr.) Pouzar	škrlatnordeča slojevka	ZIM	Chp4	ZIM L007	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>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. ex Fr.) Kummer	bukov ostrigar	ZIM	Plo5	1998, Škofljica	bela
<i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát	pisana ploskocevka	ZIM	Tv6	1998, Makole	bela

3.1.2 Ligninolitični encimi

V poskusih razgradnje kloriranih organskih biocidov (kloriranih fenolov in lindana) s posameznimi izoliranimi ligninolitičnimi encimi in za teste inhibicije teh encimov z natrijevim pentaklorofenolatom (NaPCP) smo uporabili komercialno dostopne encime Lac, MnP in raznoliko peroksidazo (VP – izraža tako mangan peroksidazno kot tudi lignin peroksidazno aktivnost, ang. versatile peroxidase), ki jih skupaj s proizvajalcem navajamo v preglednici 9.

Preglednica 9: Komercialni ligninolitični encimi, uporabljeni za razgradnjo kloriranih organskih biocidov

Table 9: Commercially available ligninolytic enzymes used in the experiments

Ligninolitični encimi	Proizvajalec
Lac iz glive <i>T. versicolor</i> (Laccase from <i>T. versicolor</i> , EC 1.10.3.2)	Sigma-Aldrich, Nemčija
MnP iz glive <i>Nematoloma frowardii</i> (Manganese Peroxidase from <i>Nematoloma frowardii</i> , EC 1.11.1.13)	Jena Bioscience, Nemčija
VP iz glive <i>Berkandera adusta</i> (Versatile Peroxidase from <i>Berkandera adusta</i> , EC 1.11.1.16)	Jena Bioscience, Nemčija

3.1.3 Kemikalije

Kemikalije, ki smo jih uporabili v poskusih, so bile kupljene pri proizvajalcih Merck, Sigma ali Fluka. Heksan za analize s plinsko kromatografijo je imel čistost »pro chromatography«. Ostale uporabljeni kemikalije so imele čistost »pro analysis« in jih pred uporabo nismo dodatno prečiščevali. V preglednici 10 so navedeni klorirani organski biocidi, ki smo jih uporabili v poskusih biološke razgradnje s testiranimi vrstami lesnih gliv.

Preglednica 10: Klorirani organski biocidi, uporabljeni za razgradnjo z ligninolitičnimi glivami

Table 10: Chlorinated organic biocides used in the experiments

Klorirani organski biocidi	Strukturna formula	Proizvajalec
lindan (1 α ,2 α ,3 β ,4 α ,5 α ,6 β -hexachlorocyclohexane – γ -isomer, γ -BHC, lindane)		Aldrich, Nemčija
natrijev pentaklorofenolat (Pentachlorophenol Sodium salt)		Fluka, Nemčija
PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl, PCB-153)		Dr.Ehrenstorfer, Nemčija

3.1.4 Tekoči mediji

Z namenom izbire ustreznega tekočega gojišča za nadaljnje raziskave mikoremediacije kloriranih organskih biocidov, smo rast izbranih vrst lesnih gliv spremljali v treh različnih tekočih gojiščih:

- v mediju po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986), modificiranem za potrebe mikoremediacije z dodatkom 2 mM MnSO₄ in 2 mM VA, pH = 4,5 (preglednica 11);
- v komercialnem, kemijsko nedefiniranem tekočem gojišču na osnovi ekstrakta dekstroze iz krompirja (tekoče gojišče PDB, ang. potato dextrose broth) (Difco Laboratories, ZDA) (preglednica 12);
- in v tekočem gojišču po Shemakhanovi (Shemakhanova, 1960), ki je primeren za rast mikoriznih vrst gliv v razmerah *in vitro* (preglednica 13)

Preglednica 11: Sestava tekočega gojišča po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986), modificiranega za potrebe mikoremediacije

Table 11: Composition of liquid medium defined by Hadar (Hadar in Cohen-Arazi, 1986) and modified for the purpose of mycoremediation

Sestava tekočega medija po Hadarju, modificiranega za potrebe mikoremediacije:	Zatehtano:	Končna koncentracija:
glukoza	20 g	[110 mM]
asparagin	0,65 g	[5 mM]
kvasni ekstrakt	0,5 g	
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g	[2 mM]
KH ₂ PO ₄	1 g	[7 mM]
KCl	0,5 g	[7 mM]
96 % 3,4-dimetoksibenzil alkohol (veratril alkohol)	303 µl	[2 mM]
MnSO ₄ × H ₂ O	0,338 g	[0,2 mM]
bidestilirana voda	do 1 l	
	pH = 4,5	

Preglednica 12: Sestava tekočega gojišča po Shemakhanovi (Shemakhanova, 1960)

Table 12: Composition of liquid medium defined by Shemakhanova (1960)

Sestava tekočega medija po Shemakhanovi:	Zatehtano:	Končna koncentracija:
KH ₂ PO ₄	200 mg	[1,5 mM]
NH ₄ Cl	200 mg	[3,7 mM]
Ca(NO ₃) ₂	50 mg	[0,3 mM]
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	150 mg	[0,6 mM]
1 % FeCl ₃	1,2 ml	[0,1 mM]
sladni ekstrakt (malt extract)	500 mg	
glukoza	5 g	[27,7 mM]
bidestilirana voda	do 1 l	
	pH = 4,5	

Preglednica 13: Sestava tekočega gojišča PDB (Difco Laboratories, ZDA)

Table 13: PDB liquid medium (Difco Laboratories, USA)

Sestava tekočega gojišča PDB:	Zatehtano:
PDB	24 g
bidestilirana voda	do 1 l
	pH = 4,5

Raziskave razgradnje kloriranih organskih biocidov z izoliranimi ligninolitičnimi encimi so potekale v tekočem mediju, katerega sestavo navajamo v preglednici 14.

Preglednica 14: Sestava tekočega medija za razgradnjo biocidov z ligninolitičnimi encimi

Table 14: Composition of liquid medium used for enzymatic degradation of biocides

Sestava tekočega medija za razgradnjo biocidov z ligninolitičnimi encimi:	Zatehtano:	Končna koncentracija:
Na-acetat	1,64 g	[20 mM]
MnSO ₄ × 1 H ₂ O	272 mg	[1,61 mM]
Na ₂ -oksalat	575 mg	[4,29 mM]
bidestilirana voda	do 1 l	
	pH = 4,5	

3.2 METODE

3.2.1 Izberite tekočega gojišča za raziskave biološke razgradnje kloriranih organskih biocidov z lesnimi glivami

Rast izbranih vrst gliv (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum*) smo testirali v treh različnih tekočih gojiščih (tekoče gojišče PDB, medij po Shemakhanovi (Shemakhanova, 1960) in za potrebe mikoremediacije modificiran medij po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986)), z namenom izbere najprimernejšega tekočega gojišča za nadaljnje raziskave mikoremediacije kloriranih organskih biocidov.

3.2.1.1 Priprava gojišč in avtoklaviranje

Tristomililitrske Erlenmayerjeve steklenice smo napolnili s 50 ml tekočega gojišča (tekoče gojišče PDB, medij po Shemakhanovi ali modificiran medij po Hadarju). Steklenice smo zaprli z debelo aluminijasto folijo, tako da se je ta tesno prilegala ustju steklenice, nato pa ustja prekrili še z avtoklavirnim papirjem, ki smo ga pritrdili z gumico. S tem smo preprečili okužbo gojišč iz zraka pri ohlajanju po sterilizaciji ter pri nadalnjem gojenju gliv. Erlenmayerjeve steklenice smo nato 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121°C (150 kPa).

3.2.1.2 Inokulacija in gojenje gliv

Inokulat za tekoča gojišča smo vzgojili na krompirjevem dekstroznem agarju (PDA, ang. potato dextrose agar) (DIFCO Laboratories, ZDA) v plastičnih Petrijevih posodah. Ohlajena sterilizirana tekoča gojišča smo v laminariju sterilno inokulirali s po tremi vcepki sedem dni starega micelija, ki smo jih s plutovrтом (premer 8 mm) izrezali na periferiji zraslega micelija. Tekoče kulture gliv smo 21 dni gojili v temi na stresniku, nameščenem v rastni komori, pri 130 obratih min⁻¹, 25 °C in 60 % relativni zračni vlagi.

3.2.1.3 Določanje suhe biomase

V tekočih gojiščih zraslo biomaso gliv smo po koncu gojenja določili s tehtanjem suhe mase micelija. V ta namen smo biomaso s filtriranjem skozi grobi filtrirni papir (Sartorius 388 black dot) (Sartorius, Nemčija) ločili iz tekočih gojišč z uporabo vakumske komore (Kambič, Slovenija). Odfiltriran micelij smo šest ur sušili v sušilni komori pri 50 °C (Kambič, Slovenija). Poskusi so bili izvedeni v treh ponovitvah in rezultati prirastkov suhih biomas so povprečja treh paralelk z navedenimi standardnimi napakami.

3.2.2 Spremljanje rasti gliv v mediju po Hadarju z dodanimi biocidi

Za potrebe mikoremediacije modificiran tekoči medij po Hadarju se je izkazal za najustreznejšega, zato smo ga uporabili za nadaljnje raziskave spremeljanja rasti gliv v prisotnosti posameznih kloriranih organskih biocidov (natrijev pentaklorofenolat, lindan in PCB-153). To smo izvedli na način, kot je opisano v poglavjih 3.2.1.1 - 3.2.1.2. Po petih dneh gojenja gliv v tekočem gojišču, ko se je micelij gliv že rahlo namnožil, smo v tekočo kulturo sterilno odpipetirali 100 µl predhodno pripravljene osnovne raztopine kloriranega organskega biocida, raztopljenega v acetonu. V vseh primerih je bila končna koncentracija biocida ob njegovem dodatku v gojišče 30 µM. V negativne kontrolne skupine tekočih glivnih kultur smo dodali po 100 µl acetona. Poskuse smo izvedli v treh ponovitvah.

Po 21 dneh gojenja smo biomaso posameznih vrst gliv, zraslo v prisotnosti posameznih biocidov, ovrednotili s tehtanjem suhe mase micelija, kot je opisano v poglavju 3.2.1.3. Prirastke biomase gliv, zraslih v prisotnosti biocidov, smo nato primerjali z negativnimi kontrolnimi skupinami.

3.2.3 Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami v tekočih kulturah

3.2.3.1 Pogoji gojenja in dodatek kloriranih organskih biocidov

Gojenje glivnih kultur v tekočem mediju po Hadarju ter dodatek organskih biocidov je potekal po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2. Deleže razgradnje posameznih kloriranih

organских biocidov z izbranimi lesnimi glivami smo ovrednotili glede na pozitivne kontrole skupine. Te smo pripravili tako, da tekočih gojišč na začetku nismo inokulirali z glivami.

3.2.3.2 Priprava vzorcev

3.2.3.2.1 Priprava vzorcev za določitev razgradnje NaPCP

NaPCP je dobro topen v vodi, zato smo vzorce za določitev njegove razgradnje z glivami odvzeli tako, da smo zrasli micelij odfiltrirali od gojišča, filtrate pa kot vzorce za kasnejšo določitev deležev razgradenj NaPCP s posameznimi vrstami gliv s HPLC shranili pri -21 °C.

3.2.3.2.2 Priprava vzorcev za določitev razgradnje lindana

Za določanje razgradnje lindana smo uporabili plinsko kroatografijo. Pri plinski kromatografski analizi lahko lindan vnesemo v sistem v organskem topilu (npr. heksan). Za določitev deleža razgradnje lindana smo le-tega ekstrahirali iz tekočih glivnih kultur na dva načina:

- a) z ekstrakcijo lindana iz filtrata tekoče glivne kulture
- b) z ekstrakcijo lindana iz homogenata tekoče glivne kulture

Ekstrakcija lindana iz filtrata tekoče glivne kulture

V Erlenmayerjeve steklenice, ki so vsebovale tekoče gojišče (volumen na začetku gojenja 50 ml) z lindanom in vzgojenim micelijem posamezne vrste glive, smo po koncu gojenja dodali 50 ml heksana. Tako pripravljeno raztopino gojišča z micelijem in dodanim heksanom smo dobro premešali (stresali 3 minute) v sami Erlenmayerjevi steklenici, pri čemer smo ustja steklenic tesno prekrili z aluminijasto folijo. Biomaso gliv smo nato ločili od gojišča z dodanim heksanom s filtracijo skozi grobi filtrirni papir z uporabo vakumske komore. Filtrat smo prelili v lij ločnik, s katerim smo zgornjo nepolarno heksansko fazo z ekstrahiranim lindanom ločili od spodnje vodne faze. Heksanskim ekstraktom smo zatem,

za popolno odstranitev ostankov vode, dodali natrijev sulfat (Na_2SO_4). Tako pripravljene vzorce smo do analize shranili v zaprtih steklenih epruvetah pri -20°C .

Ekstrakcija lindana iz homogenata tekoče glivne kulture

Tekoče kulture (oz. gojišča v primeru pozitivnih kontrolnih skupin; volumen na začetku gojenja 50 ml) smo iz Erlenmayerjevih steklenic pretočili v homogenizer, ki je imel rezila in steno posode iz aluminija (Warring Pro Blender, ZDA). Erlenmayerjeve steklenice smo sprali (stresali 30 sekund) s 50 ml heksana, pri čemer smo ustja steklenic tesno prekrili z aluminijasto folijo. Tako smo ekstrahirali tudi lindan, ki se je morda adsorbiral na steno steklenice. Nato smo heksan iz Erlenmayerjevih steklenic prelili v homogenizer s tekočo glivno kulturo (oz. gojiščem) in 30 sekund homogenizirali. Po homogenizaciji smo s tri minutnim centrifugiranjem pri 5000 obratih min^{-1} (centrifuga Tehnica CENTRIC 322A; Tehnica Železniki, Slovenija) nepolarno heksansko fazo z ekstrahiranimi nepolarnimi spojinami (vključno z lindanom) ločili od polarne vodne faze. Zgornjo nepolarno heksansko fazo smo s Pasteurjevo pipeto previdno odpipetirali iz steklenih centrifugirk v lij ločnik, s katerim smo jo še bolj natančno ločili od preostale vodne faze. Heksanskim ekstraktom smo za popolno odstranitev ostankov vode dodali še Na_2SO_4 . Tako pripravljene vzorce smo do analize shranili v zaprtih steklenih epruvetah pri -20°C .

3.2.3.2.3 Priprava vzorcev za določanje razgradnje PCB-153

Tako, kot v primeru lindana, smo za določanje deležev razgradnje PCB-153 uporabili plinsko kroatografijo. Vzorce smo pripravili z ekstrakcijo s heksanom iz homogenta tekoče glivne kulture (na enak način, kot v primeru lindana, poglavje 3.2.3.2.2).

3.2.3.3 Določanje razgradenje lindana in PCB-153 z ligninolitičnimi glivami z uporabo plinske kromatografije

Prisotnost lindana in PCB-153 smo določali s plinsko kromatografijo (GC; ang. gas chromatography). Uporabili smo plinski kromatograf Hewlett Packard 6890 Series z detektorjem na zajetje elektronov ECD (ang. electron capture detector) (Hewlett Packard,

ZDA). Kromatografski pogoji za GC-ECD analizo so podani v preglednici 15, temperaturni program pa je podan v preglednici 16.

Preglednica 15: Kromatografski pogoji za določanje lindana in PCB-153 z GC-ECD

Table 15: Chromatographic conditions for GC-ECD analyses of lindane or PCB-153

<u>INJEKTORSKI DEL:</u>	temperatura injektorja: 250 °C; volumen injicirane raztopine: 1 µl; način vbrizgavanja: "splitless".
<u>KOLONA:</u>	HP-1, kapilarna kolona; dimenzijske: dolžina 30 m, notranji premer 250 µm; stacionarna faza: polidimetilsilosan; debelina 0,25 µm; nosilni plin: dušik; pretok: 2 ml/min.
<u>DETEKTORSKI DEL:</u>	detektor ECD; temperatura detektorja: 300 °C; "make up" plin: dušik; pretok: 50 ml/min.

Preglednica 16: Temperaturni program za analizo z GC-ECD

Table 16: Temperature programme for GC-ECD analyses

	temperatura [°C]	gradient [°C/min]	zadrževalni čas [min]
začetna temperatura	70	-	1
	250	30	0
	270	5	0
končna temperatura	300	15	5

Lindan oz. PCB-153 v vzorcih smo identificirali tako, da smo retencijske čase kromatografskih vrhov primerjali z retencijskimi časi ustreznih standardov. Rezultati so povprečja analiz treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami. Deleže razgradnje lindana in PCB-153 z ligninolitičnimi glivami smo kvantitativno ovrednotili tako, da smo ploščine kromatografskih vrhov za lindan oz. PCB-153 (ekstrahiran iz vzorcev z glivami) primerjali s ploščinami kromatografskih vrhov pozitivnih kontrolnih raztopin lindana oz. PCB-153. V primeru odrezanih kromatografskih vrhov, ki so posledica

prevelikega nanosa spojine na kolono, smo vzorce redčili in redčitve upoštevali pri izračunih deležev razgradnje.

3.2.3.4 Določitev deležev razgradnje NaPCP z ligninolitičnimi glivami z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije

Razgradnjo NaPCP z glivami smo določili z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC). Uporabili smo tekočinski kromatograf Constametric 4100 (Thermo Separation Products, ZDA), opremljen s spektrofotometričnim detektorjem Spectro Monitor 3100 (LDC Analytical, ZDA) in HPLC kolono Hypersil ODS (135 mm × 4 mm, premer delcev stacionarne faze 5 µm) (Thermo Scientific, ZDA). Vzorce smo ločevali z izokratsko elucijo z mobilno fazo, sestavljeno iz 60 % acetonitrila in 40 % milli Q vode (pH = 2).

Pred nanosom na kolono smo vzorce za analizo nakisali s fosforo kislino (H_3PO_4 , pH = 2). Posledično smo v analiziranem vzorcu namesto NaPCP dobili pentaklorofenol (PCP). Tega smo spektrofotometrično detektirali pri valovni dolžini 254 nm. Fenolne spojine močno absorbirajo svetlobo take valovne dolžine.

Deleže razgradnje NaPCP z ligninolitičnimi glivami smo kvantitativno ovrednotili s primerjavo ploščine kromatografskih vrhov za pentaklorofenol s ploščinami kromatografskih vrhov pozitivne kontrolne raztopine. Slednjo smo pripravili na enak način, kot vzorce za določanje razgradnje natrijevega pentaklorofenolata z glivami, le da tekočega gojišča nismo inokulirali z micelijem. Pripravili smo tudi standardno raztopino NaPCP v acetonu (konc. 10 µg/ml), ki je služila za dodatno primerjavo pri izračunu deleža biološke razgradnje. S primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov za PCP v pozitivni kontrolni raztopini in v filtratu gojišča z lesno glivo (vzorcu) dobimo podatek o ostanku NaPCP v vzorcu. Razlika do 100 % predstavlja delež razgradnje NaPCP.

3.2.4 Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi

Za poskuse razgradnje kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi smo uporabili takšne biocide, ki so dobro topni v vodi, saj lahko encimi delujejo izključno v

vodnih raztopinah oz. z vodotopnimi substrati. Zato smo iz te raziskave izključili PCB-153, saj je le-ta v vodi topen le do 3 nM koncentracije, smo pa v poskus vključili klorirane fenole (2,3,4,5,6-pentaklorofenol, 2,3,4,5-tetraklorofenol, 2,4,5-triklorofenol, 2,5-diklorofenol – preglednica 15) in lindan.

Klorirane fenole in lindan smo posamezno inkubirali s komercialno nabavljenimi ligninolitičnimi encimi Lac, MnP in VP. Hoteli smo ugotoviti, ali posamezno uporabljeni ligninolitični encimi lahko razgradijo te biocide. Klorirane fenole nam je priskrbela prof. dr. Lucija Zupančič Kralj s Katedre za analizno kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

3.2.4.1 Osnovne raztopine ligninolitičnih encimov ter kloriranih fenolov in lindana

V Na-acetatnem pufru (20 mM, pH = 4,5) smo pripravili osnovne raztopine posameznih ligninolitičnih encimov Lac, MnP in VP, s koncentracijo 5 EE/ml. Encimsko enoto smo definirali kot količino encima, ki pretvori 1 µmol ABTS v radikal ABTS^{•+}/min, kar smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 405 nm (natančen opis metode v poglavju 3.2.5.2).

Osnovne raztopine posameznih biocidov smo pripravili v 7,5 mM koncentraciji v topilu metanol : voda v razmerju 1 : 1.

3.2.4.2 Inkubacija kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi v tekočem mediju

V 25 mililitrske Erlenmayerjeve steklenice smo natočili po 4 ml medija za ligninolitične encime (20 mM Na-acetat, 1,61 mM MnSO₄, 4,29 mM Na₂-oksalat in 1,07 mM H₂O₂; pH = 4,5) in dodali 1 ml pripravljene osnovne raztopine encima. Tem raztopinam smo nato dodali 20 µl osnovne raztopine biocida, razen v primeru lindana, kjer smo le tega dodali samo 10 µl. Razlog za slednje je, da je lindan slabše topen v vodi (samo do 25 nM koncentracije). S tem smo želeli zagotoviti, da je bil ves lindan raztopljen in tako dostopen ligninolitičnim encimom kot potencialen substrat za razgradnjo. Končna koncentracija v

mediju je tako znašala 1 EE/ml za uporabljen encim in 30 µM za biocid, razen v primeru lindana, kjer je koncentracija bila 15 µM.

Ustja Erlenmayerjevih steklenic smo nato prekrili z debelo aluminijasto folijo in biocide 4 dni (96 ur) inkubirali z ligninolitičnimi encimi v temi v komori na stresalniku pri 130 obratih min⁻¹ ter 25 °C in 60 % relativni zračni vlagi.

3.2.4.3 Določanje deležev razgradnje kloriranih fenolov z ligninolitičnimi encimi z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije

Razgradnjo kloriranih fenolov z ligninolitičnimi encimi smo določili s HPLC. Uporabili smo tekočinski kromatograf Constametric 4100 (Thermo Separation Products, ZDA), opremljen s spektrofotometričnim detektorjem Spectro Monitor 3100 (LDC Analytical, ZDA), in HPLC kolono Thermo Hypersil Keystone (250 mm × 4 mm, premer stacionarne faze 5 µm) (Thermo Scientific, ZDA).

Vzorce kloriranih fenolov, inkubiranih s posameznimi ligninolitičnimi encimi, smo ločevali z gradientno elucijo z začetno sestavo mobilne faze acetonitril : milli Q voda (pH = 2) v razmerju 20 : 80 in gradientom, prikazanim v preglednici 17. Volumen zanke za injiciranje vzorcev v kolono je bil 100 µl. Retencijski časi posameznih kloriranih fenolov pri izbranih kromatografskih pogojih so prikazani v preglednici 18.

Preglednica 17: Program gradientne elucije za HPLC analizo razgradnje kloriranih fenolov z ligninolitičnimi encimi; acetonitril (A), milli Q voda (B), pH = 2

Table 17: Gradient elution programme for HPLC analyses of chlorinated phenols degradation with ligninolytic enzymes

	čas [min]	A [%]	B [%]	pretok [ml/min]
1	0,0	20	80	1,5
2	5,0	20	80	1,5
3	20,0	100	0	1,5
4	25,0	100	0	1,5
4	25,1	20	80	1,5

Preglednica 18: Retencijski časi (t_R) kloriranih fenolov pri izbranih kromatografskih pogojih

Table 18: Retention times (t_R) of chlorinated phenols at selected chromatographic conditions

	Spojina	Struktorna formula	t_R [min]
1.	pentaklorofenol		17,3
2.	2,3,4,6-tetraklorofenol		16,4
3.	2,4,5-triklorofenol		15,9
4.	2,5-diklorofenol		13,6

Deleže razgradenj posameznih kloriranih fenolov s posameznimi ligninolitičnimi encimi smo podobno, kot v primeru razgradnje NaPCP z glivami, kvantitativno ovrednotili s primerjavo ploščine kromatografskih vrhov kloriranih fenolov s ploščinami kromatografskih vrhov teh fenolov pri analizi pozitivnih kontrolnih raztopin. Slednje smo pripravili na enak način, kot vzorce za določanje deležev razgradenj biocidov z encimi, le da smo v medij namesto osnovne raztopine encima dodali 1 ml Na-acetatnega pufra (20 mM, pH = 4,5).

3.2.4.4 Določanje razgradnje lindana z ligninolitičnimi encimi z uporabo plinske kromatografije

Po koncu štiridnevne inkubacije encimov z dodanim lindanom smo vzorce za določanje razgradnje lindana z ligninolitičnimi encimi pripravili z ekstrakcijo s heksanom, podobno, kot v primeru določanja njegove razgradnje z ligninolitičnimi glivami (poglavlje 3.2.3.2.2).

To smo izvedli tako, da smo v Erlenmayerjeve steklenice, ki so vsebovale tekoči medij z encimi in lindanom (volumen raztopine 5 ml), po koncu inkubacije dodali 5 ml heksana in

tako pripravljeno raztopino dobro premešali v sami Erlenmayerjevi steklenici. Nepolarno heksansko fazo z ekstrahiranimi lindanom smo nato previdno ločili od polarne vodne faze. Heksanskim ekstraktom smo dodali še v heksanu netopen Na_2SO_4 za vezavo vode. Tako pripravljene vzorce smo do analize hranili v steklenih epruvetah pri -20°C .

Prisotnost lindana v vzorcih smo določali s plinsko kromatografijo pod enakimi pogoji, kot so opisani v poglavju 3.2.3.3. Deleže razgradnje lindana s posameznimi ligninolitičnimi encimi smo nato kvantitativno ovrednotili tako, da smo ploščine kromatografskih vrhov za lindan iz vzorcev z encimi primerjali s ploščinami kromatografskih vrhov pozitivnih kontrolnih raztopin. Slednje smo pripravili na enak način, kot vzorce za določanje razgradnje lindana z ligninolitičnimi encimi, le da smo v tekoče medije namesto 1 ml raztopine encima dodali 1 ml Na-acetatnega pufra (20 mM, pH = 4,5).

3.2.5 Časovno spremjanje aktivnosti zunajceličnih ligninolitičnih encimov gliv v prisotnosti kloriranih organskih biocidov

Glive bele trohnobe tokom gojenja, predvsem pa ob prehodu v stacionarno fazo rasti, začno tvoriti zunajcelične encime za razgradnjo lignina. V tem sklopu raziskav smo želeli ugotoviti, ali dodatek posameznih kloriranih organskih biocidov (lindana, NaPCP in PCB-153) v tekoče kulture testiranih vrst gliv vpliva na časovni profil izražanja njihovih ligninolitičnih encimov. Analize smo izvedli v treh ponovitvah.

3.2.5.1 Pogoji gojenja in vzorčenje

Micelij testiranih vrst gliv za inokulum smo vzgojili na trdnem gojišču PDA v plastičnih Petrijevih posodah. Ohlajene sterilizirane petlitrske Erlenmayerjeve steklenice, ki so vsebovale po en liter tekočega medija po Hadarju, modificiranega za potrebe delovanja ligninolitičnih encimov, smo inokulirali s po tridesetimi vcepki (premer 8 mm) sveže preraščenega micelija glive. Tekoče kulture gliv smo gojili 21 dni v temi na stresalniku, nameščenem v rastni komori, pri 130 obratih min^{-1} ter 25°C in 60 % relativni zračni vlagi. Osmi dan gojenja, ko se je micelij gliv že razrastel, smo v tekoče kulture sterilno odpipetirali 1 ml osnovne raztopine kloriranega organskega biocida, raztopljenega v

acetonu. V vseh primerih je bila končna koncentracija biocida ob njegovem dodatku v tekoče gojišče 30 µM. V negativne kontrolne skupine tekočih glivnih kultur smo dodali 1 ml acetona.

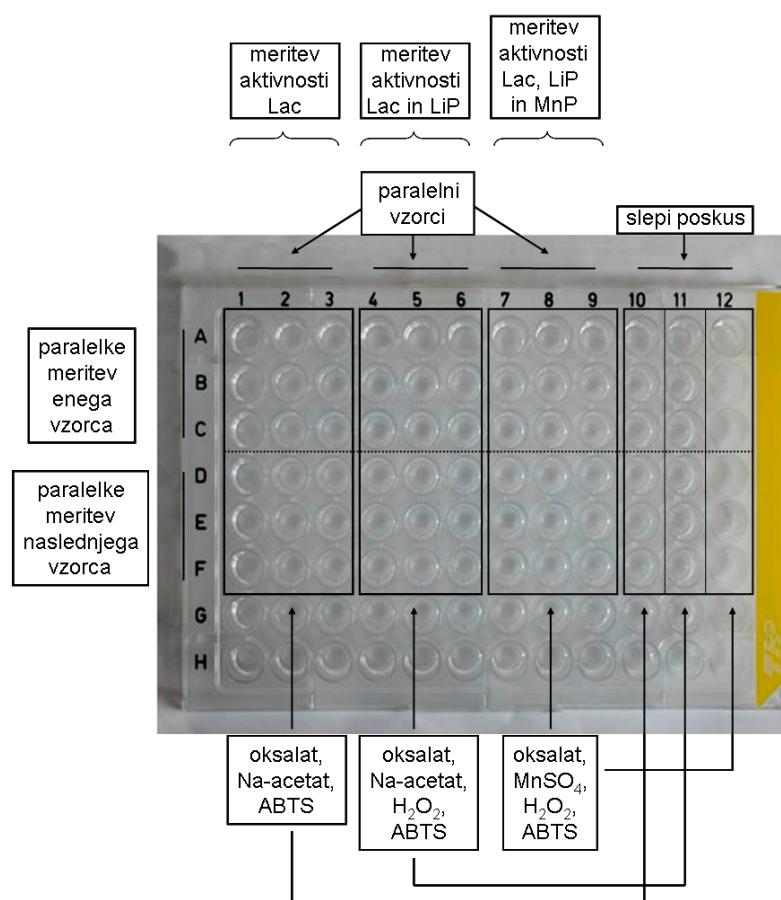
Od osmega dne gojenja smo vsak drugi dan iz tekočih glivnih kultur sterilno odvzeli po 5 ml tekočega gojišča za analize aktivnosti zunajceličnih ligninolitičnih encimskih aktivnosti. Erlenmayerjeve steklenice smo po vsakem vzorčenju sterilno zaprli. Prvi vzorec za encimske teste smo odvzeli, preden smo glivnim kulturam dodali biocid (oz. aceton pri negativnih kontrolnih skupinah). Posamezne vzorce smo do analize shranili v plastičnih epruvetah pri -20 °C.

3.2.5.2 Meritve aktivnosti ligninolitičnih encimov

Aktivnosti ligninolitičnih encimov smo določali spektrofotometrično, z merjenjem hitrosti oksidacije substrata ABTS (2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)) (slika 7 na str. 19) v kationski radikal ABTS^{•+}, ki absorbira svetlobo valovne dolžine 405 nm. Uporabili smo osnove metod, ki jo je v svojem doktorskem delu uporabil Tavzes (2003), in jih za naše poskuse prilagodili in izpopolnili. Aktivnosti ligninolitičnih encimov smo merili s čitalcem mikrotitrnih plošč Zenyth 3100 (Anthos Labtec, Avstrija), ki nam je omogočil hkratno zasledovanje 96 kinetičnih reakcij. Vse spektrofotometrične meritve smo opravljali pri sobni temperaturi (25 °C).

Meritve smo izvedli na mikrotitrnih ploščah (TPP Switzerland, 96 luknjic, površina luknjice 0,31 cm²). Preden smo vzorce nanesli na mikrotitrno ploščo, smo jih v Ependorfovih epruvetah 5 minut centrifugirali pri 10000 obratih min⁻¹, za kar smo uporabili namizno centrifugo Centrifuge 5415D (Eppendorf, Nemčija). Kot je prikazano na sliki 13, smo nato na mikrotitrni plošči v luknjice stolpcov 1 do 9 dodali 20 µl nerazredčenega vzorca, v luknjice stolpcov 10 do 12 pa za slepi poskus 20 µl Na-acetatnega pufra (20 mM, pH = 4,5). V vsak razdelek smo nato z multikanalno pipeto (Biohit, Finska, 1200 µl) dodali še 80 µl oksalatnega pufra (Na₂-oksalatni pufer, 10 mM, pH = 4,5). V stolpce 1 do 6 ter 10 in 11 smo dodali Na-acetatni pufer (20 mM, pH = 4,5), in sicer v stolpce 1, 2, 3 in 10 po 120 µl ter v stolpce 4, 5, 6 in 11 po 60 µl. V stolpce 7, 8,

9 in 12 smo dodali 60 µl MnSO₄ (7,5 mM). V stolpce 4 do 9 in 11 ter 12 smo dodali 60 µl H₂O₂ (5 mM). Mikrotitrno ploščo smo nato 5 min inkubirali pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo z multikanalno pipeto v vsako luknjico dodali še 60 µl ABTS (0,67 mM) in pričeli z meritvijo aktivnosti ligninolitičnih encimov (10 minut, absorpcija pri 405 nm). Vsaka luknjica na mikrotitrni plošči je tako vsebovala 280 µl raztopine. Z omenjeno kombinacijo dodanih raztopin smo v stolpcih 1 do 3 in 10 izmerili lakazno aktivnost, v stolpcih 4 do 6 in 11 skupno lakazno in lignin peroksidazno aktivnost, v stolpcih 7 do 9 in 12 pa skupno lakazno ter lignin in mangan peroksidazno aktivnost. MnP namreč potrebuje za delovanje prisotnost Mn²⁺ ionov, obe peroksidazi (MnP in LiP) pa še H₂O₂.



Slika 13: Shema nanašanja vzorcev na mikrotitrno ploščico za meritve aktivnosti ligninolitičnih encimov Lac, MnP in LiP

Figure 13: Schematic representation of sample application and dilution on a 96-well cell-culture plate for measurements of ligninolytic enzymes activity of Lac, MnP and LiP

V primeru nelinearnega poteka encimske reakcije, kjer je prišlo do prehitre oksidacije razpoložljivega ABTS v kationski radikal, smo takšne vzorce redčili z 20 mM Na-acetatnim pufom v razmerju 1:4 (pH = 4,5), faktor redčitve ($4\times$) pa upoštevali pri izračunu aktivnosti encimov v vzorcu.

3.2.5.3 Izračun aktivnosti Lac, MnP in LiP

Aktivnost encima izračunamo, kot je opisano v enačbi (1), in jo izrazimo v encimskih enotah v enem mililitru vzorca (EE/ml). V našem delu smo encimsko enoto definirali kot sposobnost encima, da tvori 1 μmol ABTS $^{\bullet+}$ /min.

$$\text{Enačba za izračun encimske aktivnosti: } \text{EE/ml} = \Delta E/\text{min} * 1/\epsilon * V/v' * d * f \dots (1)$$

(V = celotni reakcijski volumen (ml); v' = volumen vzorca (ml); ϵ = molarni absorpcijski koeficient; d = pot svetlobnega žarka skozi reakcijsko raztopino; f = faktor redčitve)

Pri izračunu smo upoštevali:

- celotni reakcijski volumen je bil 0,28 ml;
- volumen vzorca je bil 0,02 ml;
- pot svetlobnega žarka skozi reakcijsko raztopino pa je znašala 0,9 cm.

Molarni absorpcijski koeficient za kationski radikal ABTS $^{\bullet+}$ pri 405 nm znaša 36,0 $\text{cm}^2/\mu\text{M}$.

Ker v stolcih 4 do 6 izmerimo skupno lakazno in lignin peroksidazno aktivnost, v stolcih 1 do 3 pa samo lakazno aktivnost, moramo slednjo odšteti od prve, da dobimo encimsko aktivnost LiP (enačba (2)).

$$\text{aktivnost LiP} = (\text{skupna aktivnost Lac in LiP}) - \text{aktivnost Lac} \dots (2)$$

Ob predpostavki, da je skupna aktivnost ligninolitičnih encimov seštevek aktivnosti Lac ter MnP in LiP, moramo od skupne ligninolitične aktivnosti (meritve v stolpcih 7 do 9) odšteti aktivnost Lac in LiP (meritve v stolpcih 4 do 6), da dobimo aktivnost MnP (enačba (3)).

$$\text{aktivnost MnP} = \text{skupna ligninolitična akt.} - (\text{skupna akt. Lac in LiP}) \dots (3)$$

3.2.6 Določanje specifičnosti NaPCP kot substrata za ligninolitične encime

Aktivnost posameznih komercialnih ligninolitičnih encimov Lac, MnP ter VP (preglednica 9 na strani 34) in njihovo inhibicijo z NaPCP, kot potencialnim substratom, smo zasledovali kolorimetrično s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč Zenyth 3100 (Anthos Labtec, Avstrija).

3.2.6.1 Čiščenje ligninolitičnih encimov

Pred začetkom poskusa smo z NaDS-PAGE analizo vseh uporabljenih ligninolitičnih encimov preverili njihovo čistost. S tem smo se želeli izogniti kontaminaciji posameznih encimov z drugimi ligninolitičnimi encimi, ki bi še lahko bili prisotni (kot je bilo napisano v spremnih listih za posamezne encime) in tako motili teste encimske kinetike posameznega encima.

Ker je NaDS-PAGE analiza posameznih encimov pokazala v vzorcih posameznih ligninolitičnih encimov poleg le-teh prisotnost tudi drugih proteinov, smo encime pred njihovo uporabo za encimske teste prečistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo. V ta namen smo uporabili kromatograf Akta FPLC (ang. fast protein liquid chromatography) (Amersham Biosciences, VB), opremljen z avtomatskim zbiralnikom frakcij, in anionsko izmenjevalno kolono MonoQ (Amersham Biosciences, VB). Vzorce smo ločevali z gradientno elucijo (20 - 500 mM Na-acetat, pH = 7,0). Volumen zanke za injiciranje vzorcev v kolono je bil 500 µl.

Prisotnost ligninolitičnih encimov v posameznih frakcijah smo po ločbi s kromatografijo analizirali z encimskimi testi, opisanimi v poglavju 3.2.5.2. Nato smo encimsko aktivne

frakcije ponovno analizirali z NaDS-PAGE in tako ponovno preverili čistost encimov v aktivnih frakcijah.

3.2.6.2 Test inhibicije ligninolitičnih encimov

Na mikrotitrni plošči s 96 luknjicami smo luknjice prvega stolpca napolnili z 220 µl NaPCP (5 mM), raztopljenega v pufru z naslednjo sestavo: 20 mM Na-acetat, 1,61 mM MnSO₄, 4,29 mM Na₂-oksalat in 2,14 mM H₂O₂; pH = 4,5. Vse ostale luknjice smo napolnili s 110 µl pufra brez NaPCP. Iz luknjic skrajnega levega stolpca smo nato prenašali po 110 µl spojine proti desni, s tem da v luknjice zadnjega skrajno desnega stolpca nismo prenesli ničesar. Redčili smo torej v razmerju 1 : 2 od najvišje začetne koncentracije NaPCP (0,5 mM) do njegove najmanjše končne koncentracije. Po končanem redčenju smo povsod dodali po 50 µl encima, raztopljenega v 20 mM Na-acetatinem pufru (pH = 4,5) v koncentraciji 0,02 EE/ml. Na koncu smo dodali še 60 µl substrata ABTS. Test inhibicije ligninolitičnih encimov smo izvedli pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS (1,0 mM, 0,5 mM in 0,25 mM) in pri vsaki od teh koncentracij v treh paralelkah. Reakcijo oksidacije ABTS z ligninolitičnimi encimi smo zasledovali 10 minut pri 405 nm in 25 °C.

3.2.7 Statistične metode

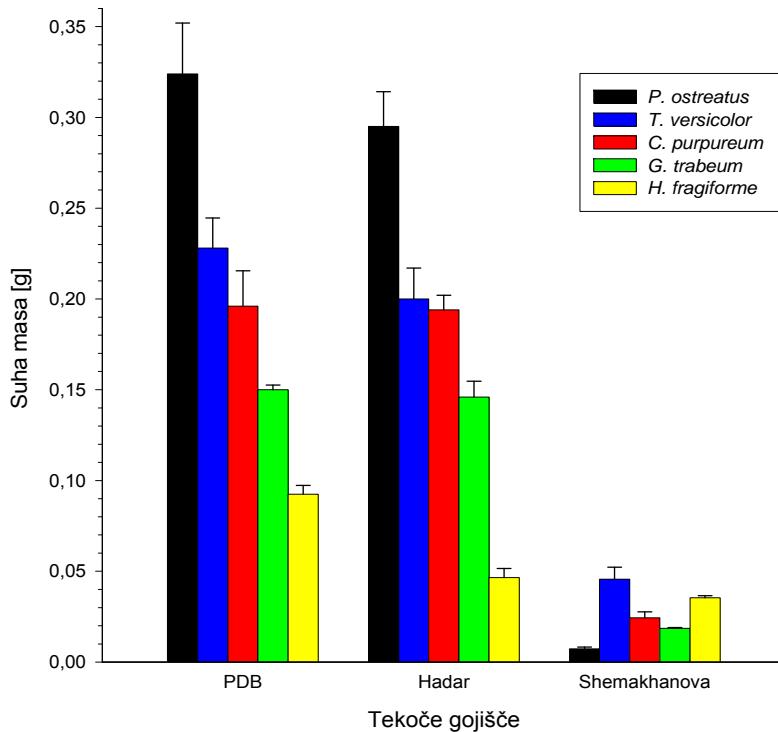
Pri statistični analizi smo uporabili program Sigma Stat (SYSTAT Inc., ZDA). Normalno porazdelitev podatkov smo preverili s testom Kolmogorov-Smirnov. Normalno porazdeljene podatke smo prikazali z aritmetično sredino in pripadajočo standardno napako. Statistično značilne razlike varianc med posameznimi skupinami smo izračunali z analizo varianc (ANOVA) po Holm-Sidakovi metodi.

4 REZULTATI

4.1 IZBIRA USTREZNEGA TEKOČEGA GOJIŠČA ZA RAZISKAVE MIKOREMEDIACIJE KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV

4.1.1 Rast gliv v tekočih gojiščih brez dodanih biocidov

Primerjava posušenih biomas micelija posameznih vrst gliv, zraslih v treh različnih tekočih gojiščih (gojišče PDB, medij po Shemakhanovi in za potrebe mikoremediacije modificiran medij po Hadarju) nam pokaže, da so glive v teh gojiščih proizvedle različno količino biomase. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami (slika 14). Največji prirastki so bili za vsako od testiranih vrst doseženi v kemijsko neundefiniranem gojišču PDB (0,324 g za *P. ostreatus*, 0,228 g za *T. versicolor*, 0,196 g za *C. purpureum*, 0,925 g za *H. fragiforme* in 0,150 g za *G. trabeum*), v obeh kemijsko definiranih gojiščih pa so bili prirastki manjši. Gojišče po Hadarju, modificirano za potrebe mikoremediacije, je rezultiralo v le nekoliko manjših prirastkih micelija (0,295 g za *P. ostreatus*, 0,200 g za *T. versicolor*, 0,194 g za *C. purpureum*, 0,0465g za *H. fragiforme* in 0,146 g za *G. trabeum*) v primerjavi s kemijsko neundefiniranim gojiščem PDB, medtem ko so bili prirastki biomase posameznih vrst gliv v mediju po Shemakhanovi statistično značilno manjši, kot pri obeh ostalih gojiščih, razen v primeru glive *H. fragiforme*, kjer so bili prirastki manjši, vendar se to ni pokazalo v statistično značilni razliki.



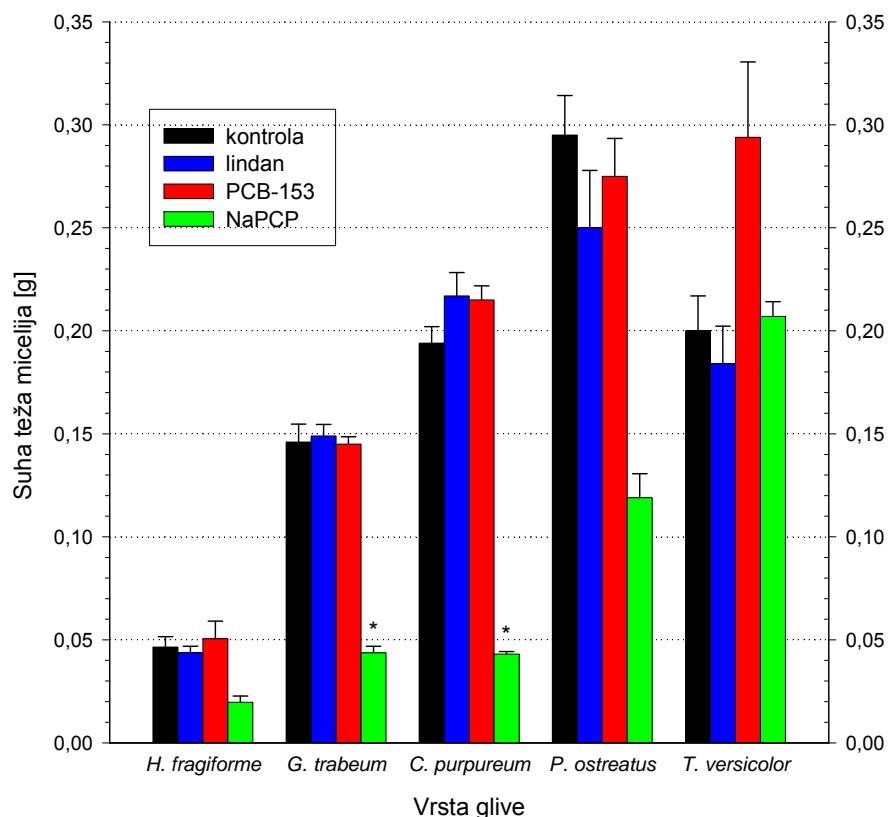
Slika 14: Prirastek suhe biomase gliv po 21 dneh gojenja v različnih tekočih gojiščih brez dodanih biocidov

Figure 14: Dry mass yields of the respective fungal species grown in different liquid media without biocides

4.1.2 Rast gliv v mediju po Hadarju z dodanimi biocidi

V nadaljevanju raziskav smo testirali rast izbranih vrst gliv v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije, ki smo mu peti dan gojenja gliv dodali biocide v 30 µM koncentraciji (NaPCP, lindan oz. PCB-153). Rezultati, prikazani na sliki 15, so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami. Nobena od testiranih vrst gliv, zraslih v prisotnosti posameznih biocidov, ni dala statistično značilnih manjših prirastkov biomase v primerjavi z negativnimi kontrolnimi skupinami, razen v primeru gliv *C. purpureum* in *G. trabeum*, ki sta rasli v prisotnosti NaPCP. Rast v prisotnosti NaPCP je bila sicer inhibirana tudi v primerih gliv *P. ostreatus* in *H. fragiforme*, vendar se prirastki biomas tu niso izkazali statistično značilno različni v primerjavi z negativnima kontrolnima skupinama. Rast glive *T. versicolor* v prisotnosti NaPCP ni bila inhibirana. Prav tako dodatek lindana in PCB-153 v gojišče ni

inhibiral rasti testiranih vrst gliv. V primeru glive *T. versicolor* je bil prirast biomase v prisotnosti PCB-153 celo povečan.



Slika 15: Prirastki suhe teže gliv po 21 dneh gojenja v modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi (NaPCP, lindan, PCB-153) v 30 μM koncentraciji. Negativne kontrolne skupine (kontrola) so rasle brez prisotnosti biocidov.

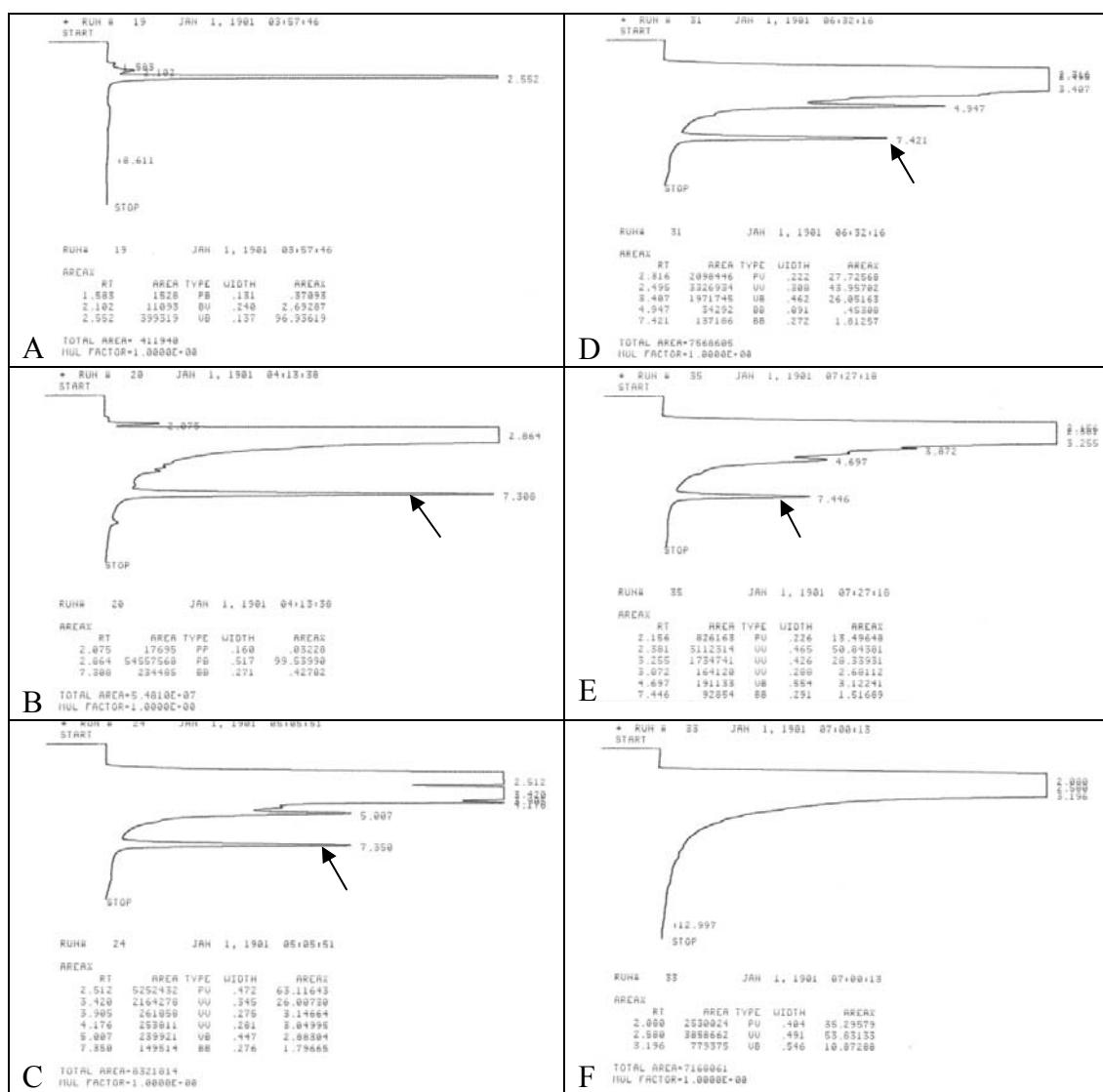
Figure 15: Dry mass yields of the respective fungal species grown for 21 days in a chemically defined liquid medium defined by Hadar with respective additions of 30 μM final concentrations of lindane, PCB-153 or NaPCP, and in control medium groups without any biocide present.

4.2 RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV Z LIGNINOLITIČNIMI GLIVAMI

4.2.1 NaPCP

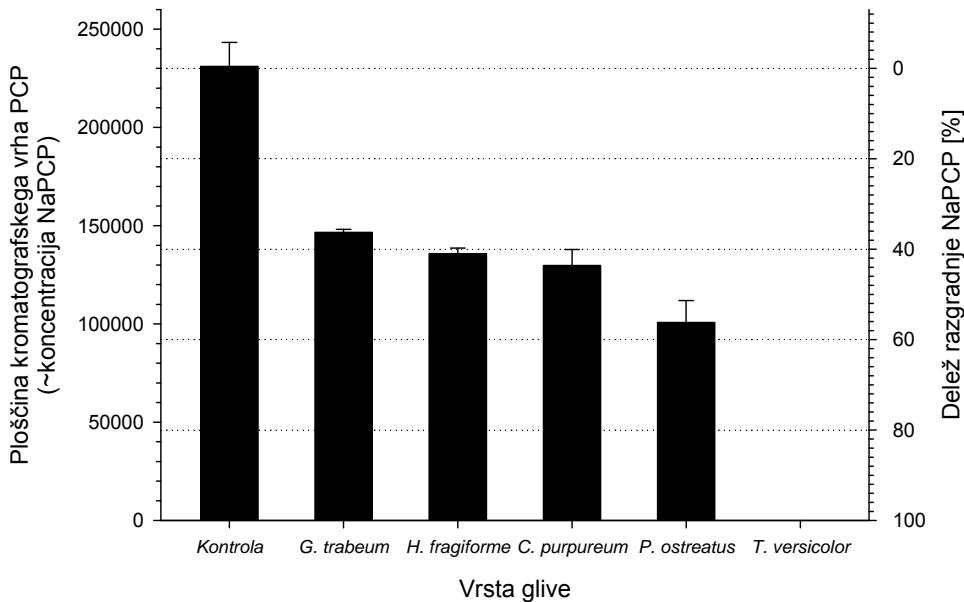
Razgradnja NaPCP s testiranimi vrstami lesnih gliv je bila ovrednotena s HPLC analizo in izračunana s primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov za PCP glede na pozitivno kontrolno skupino, ki ni bila inokulirana z micelijem. HPLC kromatogrami vzorcev posameznih vrst gliv so prikazani na sliki 16. V vzorcu glive *T. versicolor* nismo zasledili prisotnosti vrha za PCP (slika 16 F), kar pomeni, da je ta gliva uspela popolnoma razgraditi

NaPCP. Pri ostalih testiranih vrstah gliv je bila razgradnja NaPCP precej manjša. Tako je znašala razgradnja NaPCP z glivo *P. ostreatus* 56 %, z glivo *C. purpureum* 44 %, z glivo *H. fragiforme* 41 % in z glivo *G. trabeum* 37 %. Ti rezultati so prikazani na sliki 17, izračunani pa so kot srednja vrednost treh meritev z navedenimi standardnimi napakami.



Slika 16: Deleži bioloških razgradenj NaPCP z glivami. Prikazani so HPLC kromatogrami analize NaPCP po 21 dneh gojenja gliv v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije. A – kromatogram mobilne faze; B – pozitivna kontrola, C – *H. fragiforme*, D – *G. trabeum*, E – *P. ostreatus*, F - *T. versicolor*. Puščice označujejo kromatografski vrh za PCP na posameznih kromatogramih.

Figure 16: Representative HPLC chromatograms of cell-free liquid fungal cultures with addition of NaPCP after mycoremediation. Controls were not inoculated with the mycelium. A – HPLC mobile phase only, B – control, C – *H. fragiforme*, D – *G. trabeum*, E – *P. ostreatus*, F - *T. versicolor*. Arrows indicate the peak corresponding to NaPCP.



Slika 17: Deleži razgradnje NaPCP s testiranimi vrstami gliv

Figure 17: NaPCP degradation by tested fungal species

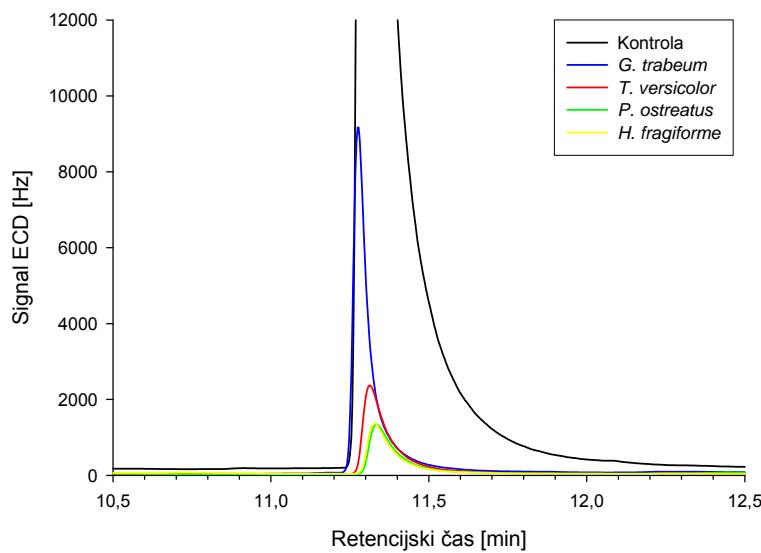
4.2.2 Lindan

Razgradnja lindana s testiranimi vrstami gliv je bila določena s plinsko kromatografijo in izračunana s primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov lindana v vzorcih in pozitivni kontrolni skupini (kontrola), ki ni bila inokulirana z micelijem (sliki 18 in 20).

Če smo lindan ekstrahirali iz filtrata tekočih glivnih kultur, je bila izračunana razgradnja lindana visoka pri vseh testiranih vrstah gliv. Pri tem je bila najuspešnejša razgradnja lindana z glivo *P. ostreatus*, najslabša pa v primeru glive *G. trabeum*. Izračunani deleži razgradnje lindana za posamezne glive v primeru ekstrakcije lindana iz filtrata tekočih kultur so sledeči: *P. ostreatus* 97 %, *T. versicolor* 95 %, *H. fragiforme* 97 % in *G. trabeum* 89 %. Ti rezultati so prikazani na sliki 19, izračunani pa so kot srednja vrednost treh meritev z navedenimi standardnimi napakami. Pri tem načinu ekstrakcije razgradnja lindana z glivo *C. purpureum* ni bila določena.

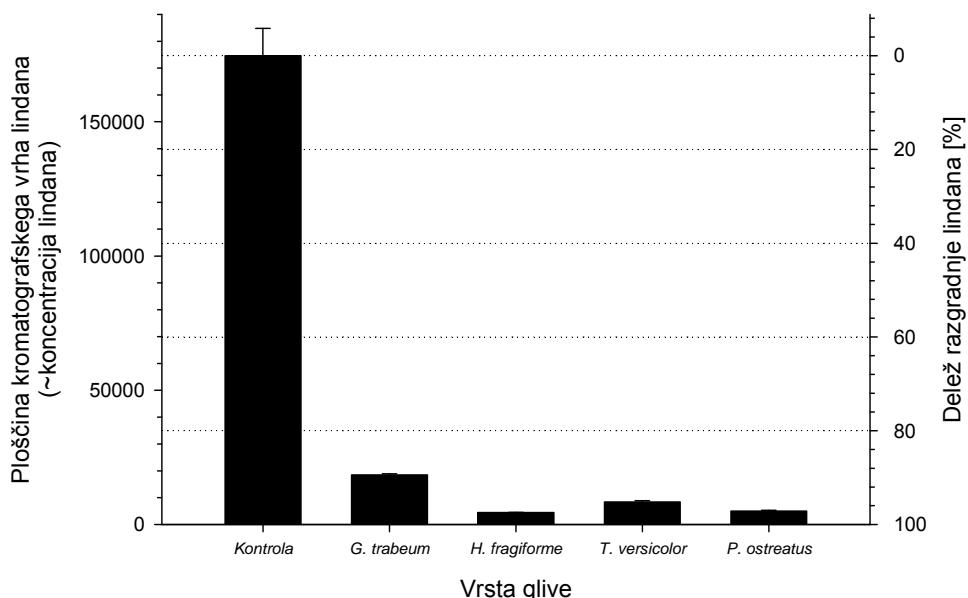
Izračunani deleži razgradnje lindana s testiranimi vrstami gliv so bili precej manjši, če smo lindan ekstrahirali iz homogenata tekočih kultur. Najbolje je lindan uspela razgraditi gliva *P. ostreatus* (delež razgradnje 57 %), delno uspešni sta bili vrsti *T. versicolor* (42 %) in *C.*

purpureum (40 %), zelo slabo je lindan razgradila gliva *H. fragiforme* (13 %), vrsta *G. trabeum* pa je bila neuspešna pri razgradnji lindana (0 %). Ti rezultati so prikazani na sliki 21, izračunani pa so kot srednja vrednost treh meritev z navedenimi standardnimi napakami.



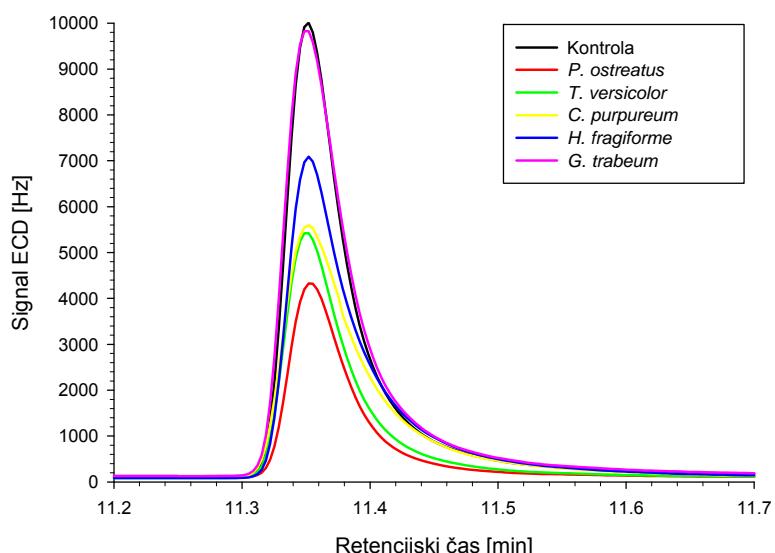
Slika 18: Določitev lindana z GC: na grafu so prikazani reprezentativni kromatografski vrhovi lindana v ekstraktih iz filtratov tekočih glivnih kultur po 21 dneh gojenja in pozitivne kontrolne skupine (kontrola)

Figure 18: Representative GC-ECD spectra of lindane extracted from filtered liquid fungal cultures after mycoremediation; the peaks for lindane are presented only; control – liquid cultures containing biocides, not inoculated with the mycelium



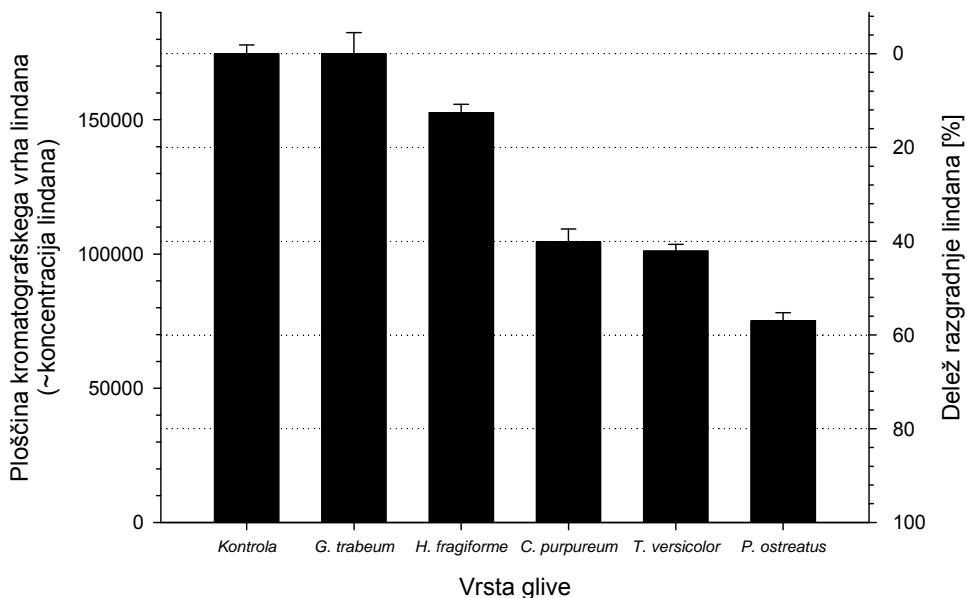
Slika 19: Deleži razgradnje lindana s testiranimi vrstami gliv; način priprave vzorcev: z ekstrakcijo iz filtratov tekočih glivnih kultur

Figure 19: Lindane degradation rates calculated from the lindane peak integrals in chromatograms of filtered liquid fungal cultures



Slika 20: Določitev lindana z GC: na grafu so prikazani reprezentativni kromatografski vrhovi lindana v ekstraktih iz homogenatov tekočih glivnih kultur po 21 dneh gojenja in pozitivne kontrolne skupine (kontrola)

Figure 20: Representative GC-ECD spectra of lindane extracted from homogenized liquid fungal cultures after mycoremediation; the peaks for lindane are presented only; control – liquid cultures containing biocides, not inoculated with the mycelium

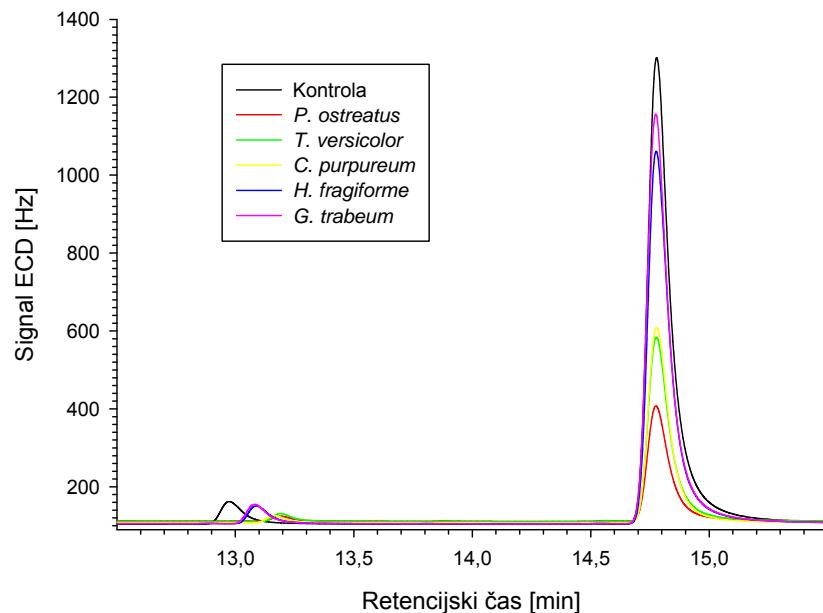


Slika 21: Deleži razgradnje lindana s testiranimi vrstami gliv; način priprave vzorcev: z ekstrakcijo homogenatov tekočih glivnih kultur

Figure 21: PCB-153 degradation rates calculated from the lindane peak integrals in the chromatograms of homogenized liquid fungal cultures

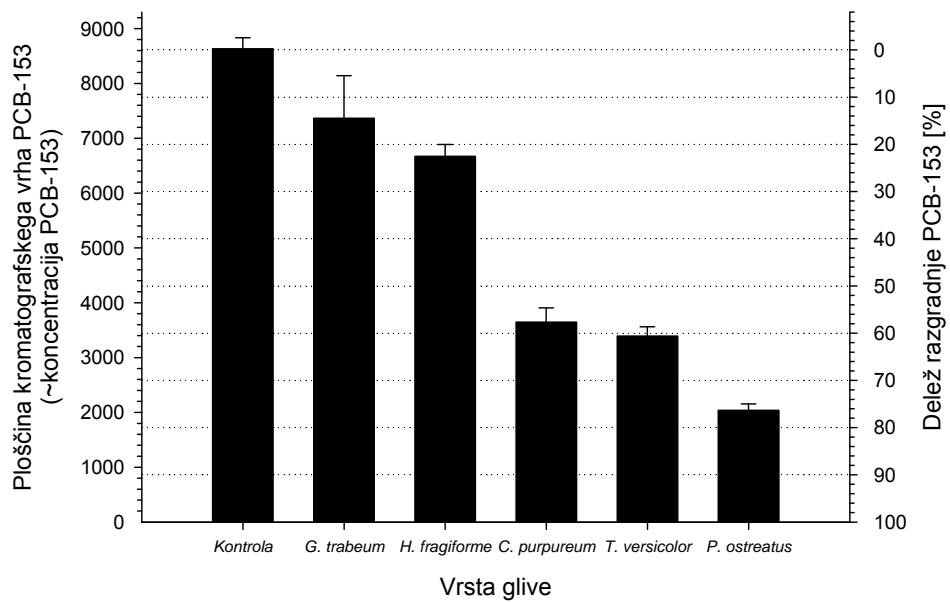
4.2.3 PCB-153

Razgradnja PCB-153 s testiranimi vrstami gliv je bila določena s plinsko kromatografijo in izračunana s primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov PCB-153 v vzorcih in pozitivni kontrolni skupini (kontrola), ki ni bila inokulirana z micelijem (slik 22). Najbolj učinkovita pri razgradnji PCB-153 je bila gliva *P. ostreatus* (delež razgradnje 76 %), sledita pa ji vrsti *T. versicolor* (61 %) in *C. purpureum* (58 %). Vrsta *H. fragiforme* je razgradila le 23 % PCB-153, najslabše pa je PCB-153 razgradila gliva *G. trabeum* (14 %). Ti rezultati so prikazani na sliki 23, izračunani pa so kot srednja vrednost treh meritev z navedenimi standardnimi napakami.



Slika 22: Določitev PCB-153 z GC: na grafu so prikazani reprezentativni kromatografski vrhovi PCB-153 v ekstraktih iz homogenatov tekočih glivnih kultur po 21 dneh gojenja in pozitivne kontrolne skupine (kontrola)

Figure 22: Representative GC-ECD spectra of PCB-153 extracted from homogenized liquid fungal cultures after mycoremediation. Control – liquid cultures containing biocides, not inoculated with the mycelium.



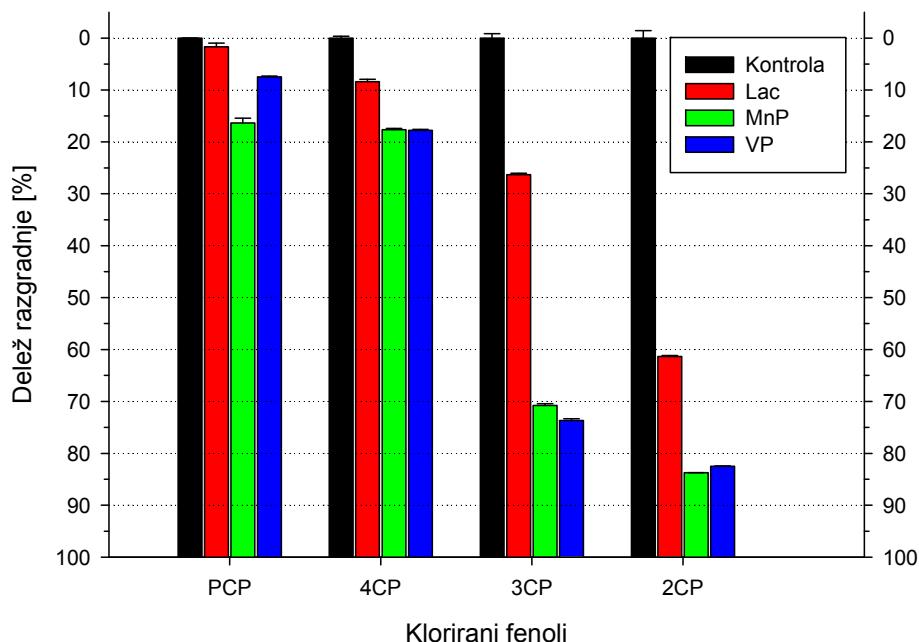
Slika 23: Deleži razgradnje PCB-153 s testiranimi vrstami gliv

Figure 23: PCB-153 degradation rates in liquid fungal cultures

4.3 RAZGRADNJA KLORIRANIH ORGANSKIH BIOCIDOV Z LIGNINOLITIČNIMI ENCIMI

4.3.1 Razgradnja kloriranih fenolov

Razgradnjo posameznih kloriranih fenolov (PCP, tetraklorofenola (4CP), triklorofenola (3CP) in diklorofenola (2CP)) s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi Lac, MnP in VP smo spremljali s HPLC in izračunali s primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov posameznih kloriranih fenolov v vzorcih z encimi glede na pozitivne kontrolne skupine posameznih kloriranih fenolov (brez encima). Deleži razgradnje kloriranih fenolov so v primeru vseh treh posamezno uporabljenih ligninolitičnih encimov naraščali z manjšanjem števila vezanih atomov klora na molekuli fenola. Najslabše je klorirane fenole razgradil encim Lac, med tem ko sta bili obe peroksidazi veliko bolj učinkoviti. PCP je najbolje razgradila MnP, v primeru razgradnje kloriranih fenolov z dvema do štirimi atomi klora pa je bila podobno učinkovita tudi VP. Ti rezultati so prikazani na sliki 24, izračunani pa so kot srednja vrednost treh meritev z navedenimi standardnimi napakami.



Slika 24: Deleži razgradnje kloriranih fenolov (PCP, 4CP, 3CP in 2CP) z ligninolitičnimi encimi Lac, MnP in VP

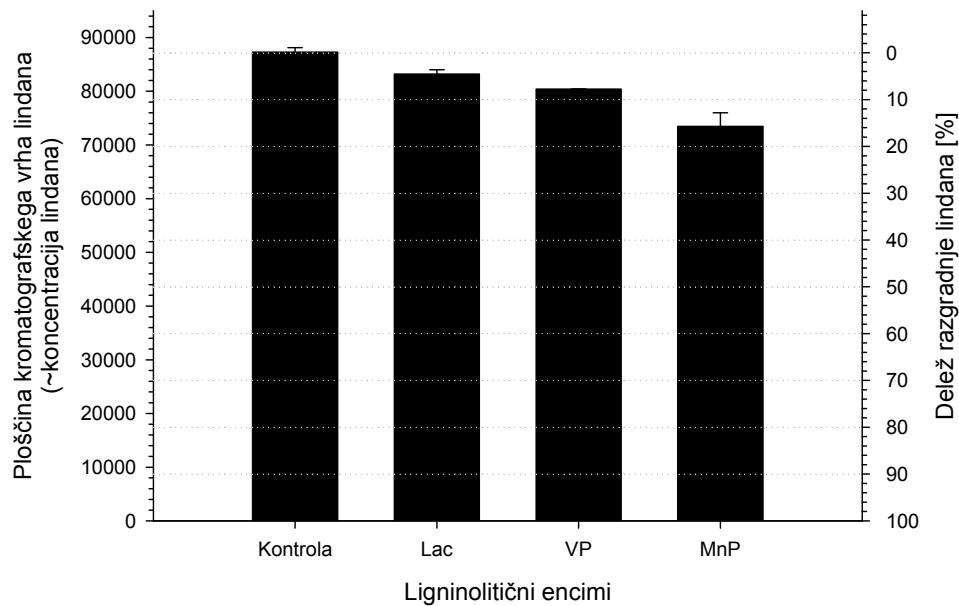
Figure 24: Degradation rates of polychlorinated phenols (PCP, 4CP, 3CP, and 2CP) by ligninolytic enzymes Lac, MnP, and VP

Delež razgradnje:

- PCP je bil z Lac 2 %, z MnP 16 % in z VP 7 %;
- 4CP je bil z Lac 8 %, z MnP 18 % in z VP 18 %;
- 3CP je bil z Lac 26 %, z MnP 70 % in z VP 74 %;
- 2CP je bil z Lac 61 %, z MnP 84 % in z VP 83 %.

4.3.2 Razgradnja lindana

Deleži razgradnje lindana s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi (Lac, MnP in VP) so bili določeni s plinsko kromatografijo in izračunani s primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov lindana v vzorcih z encimi glede na lindan v pozitivni kontroli (kontrola), v katero ni bil dodan noben encim. Lindan je najbolje razgradil encim MnP (16 %), za polovico slabša razgradnja je bila z encimom VP, najslabše pa je lindan razgradil encim Lac (5 %). Ti rezultati so prikazani na sliki 25, izračunani pa so kot srednja vrednost treh meritev z navedenimi standardnimi napakami.



Slika 25: Deleži razgradnje lindana z ligninolitičnimi encimi Lac, MnP in VP

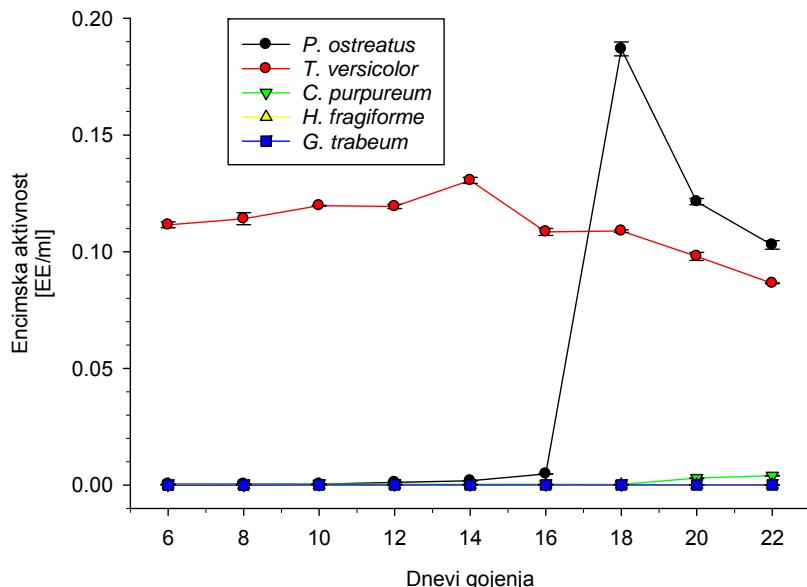
Figure 25: Rates of lindane degradation by ligninolytic enzymes Lac, MnP, and VP

4.4 AKTIVNOSTI ZUNAJCELIČNIH LIGNINOLITIČNIH ENCIMOV GLIV

4.4.1 Pojavljanje ligninolitičnih encimov gliv v mediju brez biocidov

Izražanje posameznih ligninolitičnih encimov Lac, MnP in LiP je bilo pri testiranih lesnih glivah časovno pogojeno, pri čemer so bili maksimumi aktivnosti posameznih encimov pri vseh glivah izmerjeni, ko se je glivna masa že precej namnožila. Nato so aktivnosti prisotnih ligninolitičnih encimov pri vseh glivah postopno upadle proti koncu 21 dnevnega gojenja tekočih glivnih kultur, z izjemo glive *C. purpureum*, kjer trenda upadanja ligninolitične aktivnosti nismo zasledili, saj so bili maksimumi vseh treh encimov izmerjeni v vzorcih, ki so bili vzeti zadnji dan. V primerjavi z glivama *T. versicolor* in *P. ostreatus*, so bili izmerjeni maksimumi prisotnih ligninolitičnih encimov pri ostalih treh testiranih vrstah lesnih gliv mnogo nižji (slika 26).

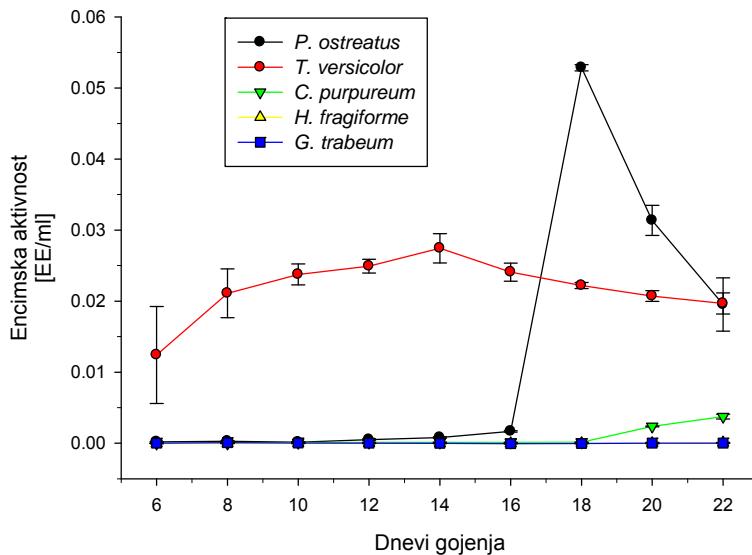
Lac pri glivi *T. versicolor* je bila ves čas gojenja gliche bolj ali manj enakomerno izražena, z doseženim maksimumom že 14. dan gojenja (0,131 EE/ml), čemur je sledilo upadanje njene aktivnosti (izmerjenih encimskih enot). Pri glivi *P. ostreatus* je bil maksimum aktivnosti Lac dosežen 18. dan gojenja (0,187 EE/ml), s podobnim trendom upadanja aktivnosti proti koncu gojenja. Pri ostalih treh testiranih vrstah gliv so bili izmerjeni maksimumi aktivnosti za Lac 0,004 EE/ml pri *C. purpureum*, 0,00013 EE/ml pri *H. fragiforme* in 0,00007 EE/ml pri *G. trabeum* (slika 26).



Slika 26: Časovno izražanje Lac pri posameznih vrstah lesnih gliv (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum*), gojenih v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije in brez dodanih biocidov

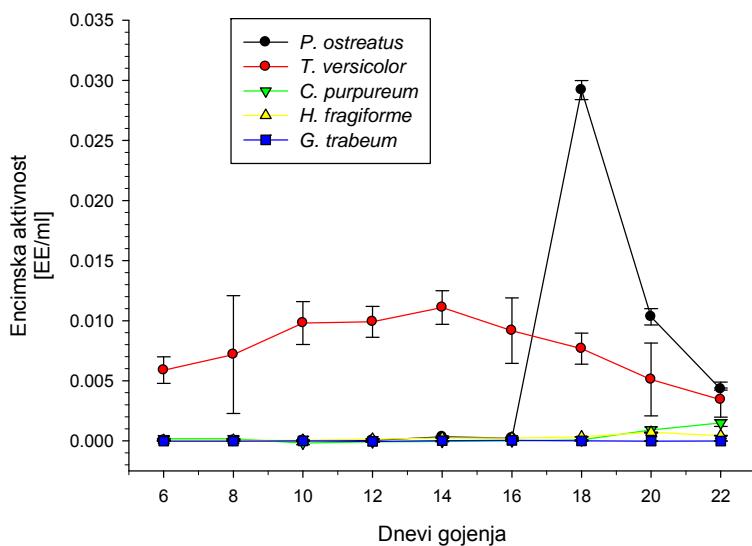
Figure 26: Temporal expression of Lac in respected fungal species (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme*, and *G. trabeum*), grown in Hadar's medium modified for the purpose of mycoremediation

MnP in LiP sta bili v primerjavi z Lac izraženi v manjšem obsegu. Pri glivi *T. versicolor* je bil maksimum njunih aktivnosti dosežen 14. dan gojenja (MnP - 0,027 EE/ml, LiP - 0,011 EE/ml). Tako, kot v primeru Lac, sta bili tudi MnP in LiP pri glivi *P. ostreatus* najbolj izraženi 18. dan (MnP - 0,053 EE/ml, LiP - 0,029 EE/ml). Maksimalne izmerjene aktivnosti MnP in LiP pri glivah *C. purpureum* in *H. fragiforme* so bile mnogo nižje (*C. purpureum*: MnP – 0,0037 EE/ml, LiP – 0,0015 EE/ml; *H. fragiforme*: MnP – 0,00007 EE/ml, LiP -0,0007 EE/ml). Gliva *G. trabeum* ni tvorila MnP in LiP (sliki 27 in 28).



Slika 27: Časovno izražanje MnP pri posameznih vrstah lesnih gliv (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum*), gojenih v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije in brez dodanih biocidov

Figure 27: Temporal expression of MnP in respected fungal species (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme*, and *G. trabeum*), grown in Hadar's medium modified for the purpose of mycoremediation



Slika 28: Časovno izražanje LiP pri posameznih vrstah lesnih gliv (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum*), gojenih v mediju po Hadarju, modificiranem za potrebe mikoremediacije in brez dodanih biocidov

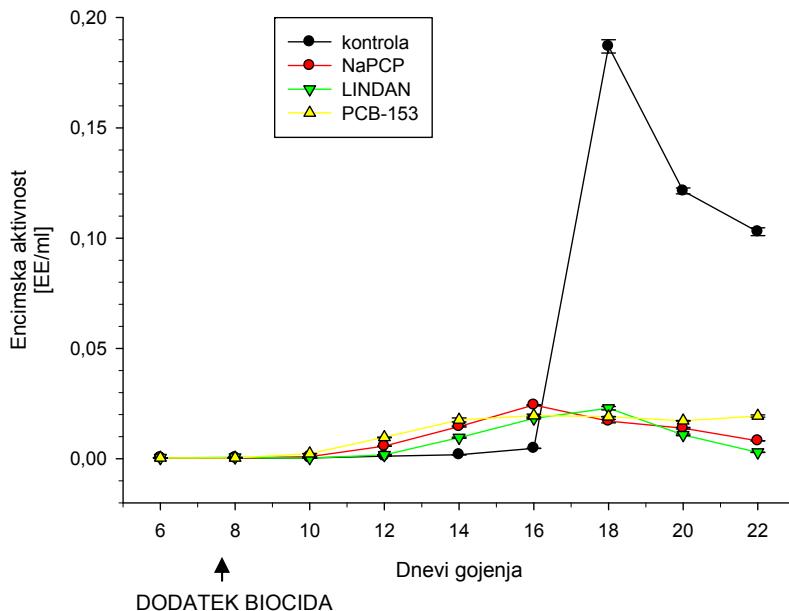
Figure 28: Temporal expression of LiP in respected fungal species (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *H. fragiforme*, and *G. trabeum*), grown in Hadar's medium modified for the purpose of mycoremediation

4.4.2 Potek izražanja ligninolitičnih encimov ob prisotnosti biocidov

Izmerjene aktivnosti posameznih ligninolitičnih encimov gliv, zraslih v mediju brez biocidov, so mnogo nižje v primeru vrst *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum* v primerjavi z vrstama *T. versicolor* in *P. ostreatus*. Zato v tem sklopu raziskav izražanja ligninolitičnih encimov gliv, zraslih v prisotnosti posameznih biocidov (NaPCP, lindan in PCB-153), navajamo le rezultate izmerjenih aktivnosti ligninolitičnih encimov pri vrstah *P. ostreatus* in *T. versicolor*. Rezultati izražanja ligninolitičnih encimov v prisotnosti posameznih biocidov pri ostalih treh vrstah gliv (*C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum*) so prikazani v prilogah A - G.

4.4.2.1 Potek izražanja ligninolitičnih encimov pri glivi *Pleurotus ostreatus*

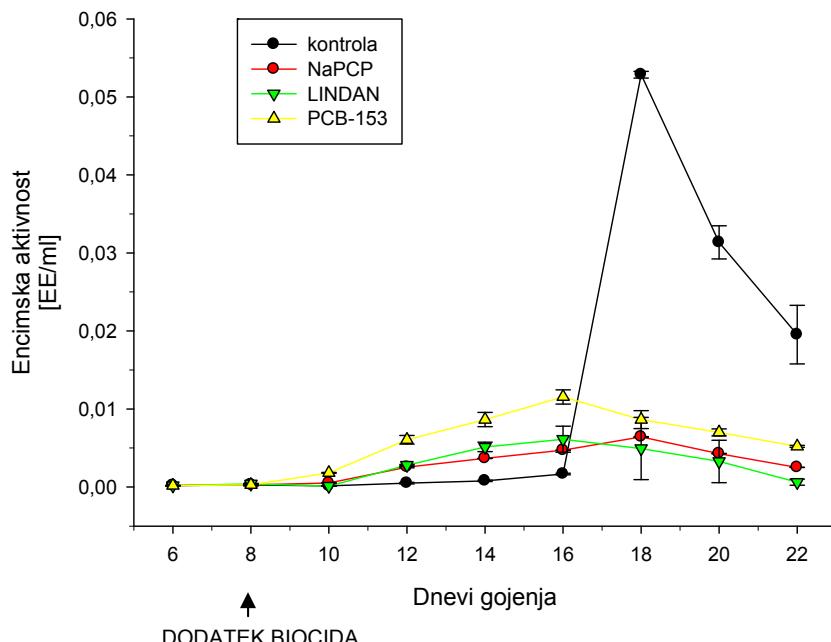
Izražanje Lac pri glivi *P. ostreatus* je bilo v prisotnosti posameznih biocidov (NaPCP, lindan in PCB-153) veliko manjše, so pa v primerjavi z negativno kontrolno skupino izmerjene aktivnosti Lac začele naraščati že takoj po dodatku posameznih biocidov v gojišče (slika 29). Podobno, kot pri negativni kontrolni skupini, so bili tudi v prisotnosti biocidov maksimumi aktivnosti Lac izmerjeni v vzorcih, vzetih 16. ali 18. dan gojenja gliv (negativna kontrola: 0,187 EE/ml; NaPCP: 0,0243 EE/ml; lindan: 0,023 EE/ml; PCB-153: 0,020 EE/ml).



Slika 29: Časovno izražanje Lac pri glivi *P. ostreatus*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

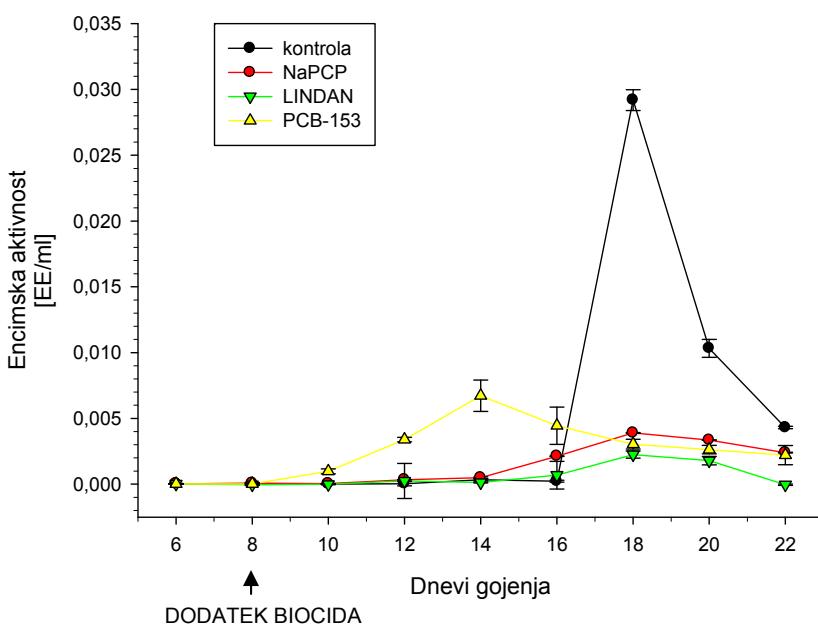
Figure 29: Temporal expression of Lac in *P. ostreatus* grown in modified Hadar's medium with addition of NaPCP, lindane or PCB-153

Pri glivi *P. ostreatus*, ki je rasla v prisotnosti posameznih biocidov (NaPCP, lindan in PCB-153), je bilo v primerjavi z negativno kontrolno skupino manjše tudi izražanje MnP in LiP. Pri tem so izmerjene aktivnosti MnP in LiP začele naraščati že takoj po dodatku posameznih biocidov v gojišče. To je prej, kot pri negativni kontrolni skupini, vendar so bili doseženi maksimumi aktivnosti precej manjši. Ti so znašali za MnP: v prisotnosti NaPCP 0,006 EE/ml; v prisotnosti lindana 0,006 EE/ml za MnP; v prisotnosti PCB-153 0,012 EE/ml. Za LiP pa so maksimumi aktivnosti bili: v prisotnosti NaPCP 0,004 EE/ml; v prisotnosti lindana 0,002 EE/ml; v prisotnosti PCB-153 0,007 EE/ml. Pri negativni kontrolni skupini so bile te vrednosti za MnP 0,053 EE/ml in za LiP 0,029 EE/ml (sliki 30 in 31).



Slika 30: Časovno izražanje MnP pri glivi *P. ostreatus*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Figure 30: Temporal expression of MnP in *P. ostreatus* grown in modified Hadar's medium with addition of NaPCP, lindane or PCB-153

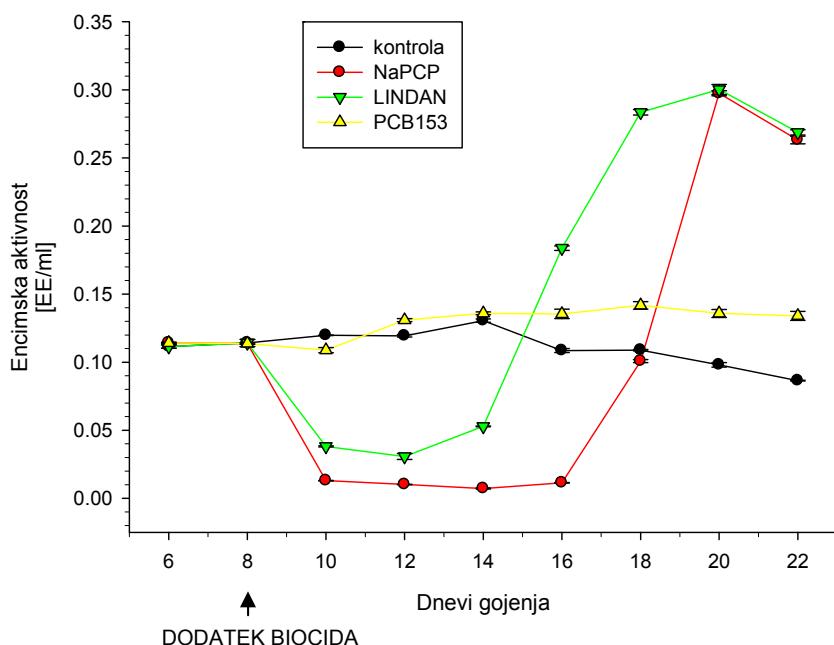


Slika 31: Časovno izražanje LiP pri glivi *P. ostreatus*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Figure 31: Temporal expression of LiP in *P. ostreatus* grown in modified Hadar's medium with addition of NaPCP, lindane or PCB-153

4.4.2.2 Potek izražanja ligninolitičnih encimov pri glivi *Trametes versicolor*

Pri glivi *T. versicolor* je bila Lac v primeru dodatka PCB-153 v gojišče bolj ali manj enakomerno izražena ves čas gojenja glive, podobno kot v primeru negativne kontrolne skupine. Dodatek NaPCP ali lindana pa je sprva inhibiral tvorbo Lac, nato pa v obeh primerih povzročil močno indukcijo aktivnosti Lac, z doseženim maskimumom 18. dan gojenja glive. Izmerjeni maksimumi aktivnosti Lac v vzorcih z dodanimi biocidi so bili za NaPCP 0,298 EE/ml, za lindan 0,300 EE/ml in za PCB-153 0,142 EE/ml (negativna kontrola: 0,131 EE/ml) (slika 32).

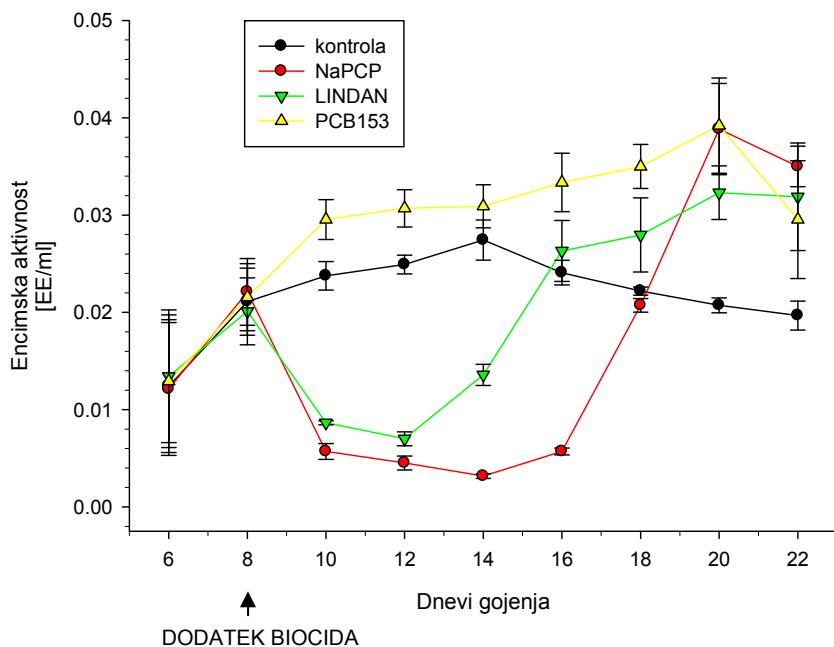


Slika 32: Časovno izražanje Lac pri glivi *T. versicolor*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadaru s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Figure 32: Temporal expression of Lac in *T. versicolor* grown in modified Hadar's medium with addition of NaPCP, lindane or PCB-153

V primeru MnP pri glivi *T. versicolor* je dodatek posameznih biocidov (NaPCP, lindana in PCB-153) sprožil povečanje njenega izražanja v primerjavi z negativno kontrolno skupino. Pri tem smo v primerih NaPCP in lindana sprva zasledili zmanjšanje aktivnosti MnP v vzorcih, podobno kot v primeru Lac, vendar je bil tudi tukaj učinek inhibicije MnP z NaPCP oz. lindanom prehodnega značaja. Izmerjeni maksimumi aktivnosti MnP v vzorcih

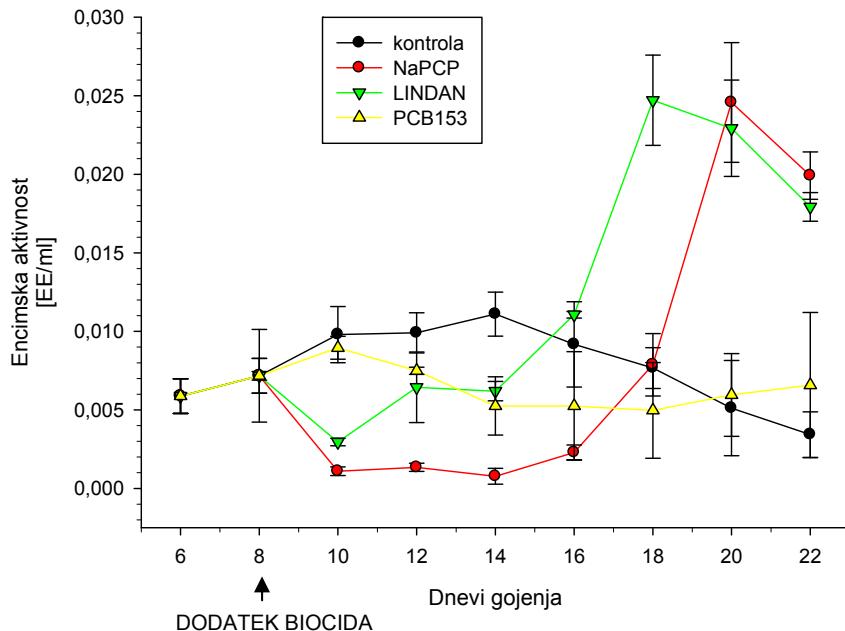
z dodanimi biocidi so bili za NaPCP 0,039 EE/ml, za lindan 0,032 EE/ml in za PCB-153 0,039 EE/ml (negativna kontrola: 0,027 EE/ml) (slika 33).



Slika 33: Časovno izražanje MnP pri glivi *T. versicolor*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Figure 33: Temporal expression of MnP in *T. versicolor* grown in modified Hadar's medium with addition of NaPCP, lindane or PCB-153

Izražanje LiP pri glivi *T. versicolor* je v primeru dodatka PCB-153 v gojišče ostajalo ves čas bolj ali manj na enakomerno, vendar če to primerjamo z negativno kontrolno skupino, je vseeno opaziti inhibicijo izražanja LiP po aplikaciji biocida. Podobno, kot v primerih Lac in MnP, smo tudi pri LiP v primeru dodatka NaPCP oz. lindana v gojišče sprva opazili inhibitoren učinek teh dveh biocidov. Ta učinek je bil tudi tukaj prehodnega značaja in po 10 dneh smo opazili močno povečano izražanje LiP v primerjavi z negativno kontrolno skupino. Izmerjeni maksimumi aktivnosti LiP v vzorcih z dodanimi biocidi so bili za NaPCP 0,025 EE/ml, za lindan 0,025 EE/ml in za PCB-153 0,009 EE/ml (negativna kontrola: 0,011 EE/ml) (slika 34).

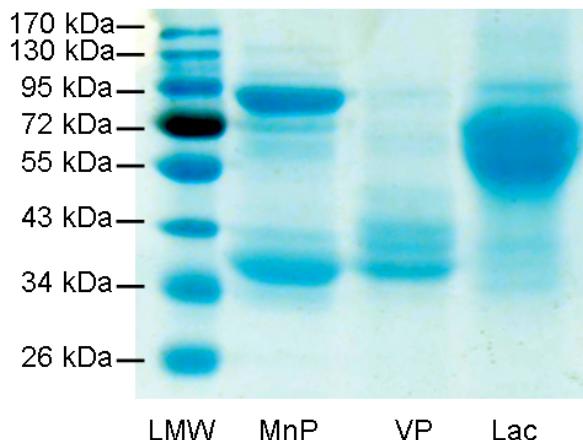


Slika 34: Časovno izražanje LiP pri glivi *T. versicolor*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153

Figure 34: Temporal expression of LiP in *T. versicolor* grown in modified Hadar's medium with addition of NaPCP, lindane or PCB-153

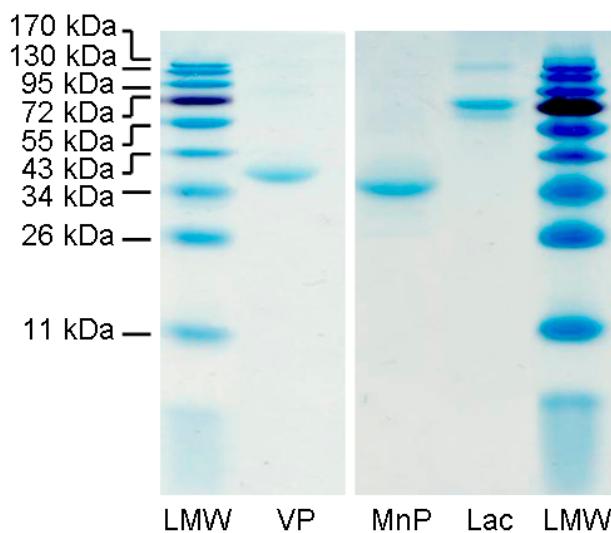
4.5 INHIBICIJA AKTIVNOSTI LIGNINOLITIČNIH ENCIMOV Z NATRIJEVIM PENTAKLOROFENOLATOM

Pri izvedbi encimskih testov ligninolitičnih encimov z ABTS v prisotnosti NaPCP smo se želeli izogniti kontaminaciji posameznih komercialno nabavljenih encimov z drugimi proteini, ki bi še lahko bili prisotni, kar bi lahko pripeljalo do napačne interpretacije rezultatov. Ker je NaDS-PAGE analiza, poleg posameznih encimov, pokazala prisotnost tudi drugih proteinov (slika 35), smo encime pred njihovo uporabo za encimske teste prečistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Slika 36 prikazuje NaDS-PAGE analizo očiščenih frakcij posameznih ligninolitičnih encimov, ki smo jih nato uporabili v nadaljevanju poskusa.



Slika 35: NaDS-PAGE komercialno nabavljenih ligninolitičnih encimov pred čiščenjem z anionsko izmenjevalno kromatografijo: MnP iz glive *N. frowardii*, VP iz glive *B. adusta* in Lac iz glive *T. versicolor*; nizkomolekularni proteinski standardi (LMW)

Figure 35: SDS-PAGE of commercially available ligninolytic enzymes (MnP from *N. frowardii*, VP from *B. adusta*, and Lac from *T. versicolor*) before their purification by anion exchange chromatography; LMW - low molecular weight protein standards



Slika 36: NaDS-PAGE komercialno nabavljenih ligninolitičnih encimov po čiščenju z anionsko izmenjevalno kromatografijo: VP iz glive *B. adusta*, MnP iz glive *N. frowardii* in Lac iz glive *T. versicolor*; nizkomolekularni proteinski standardi (LMW)

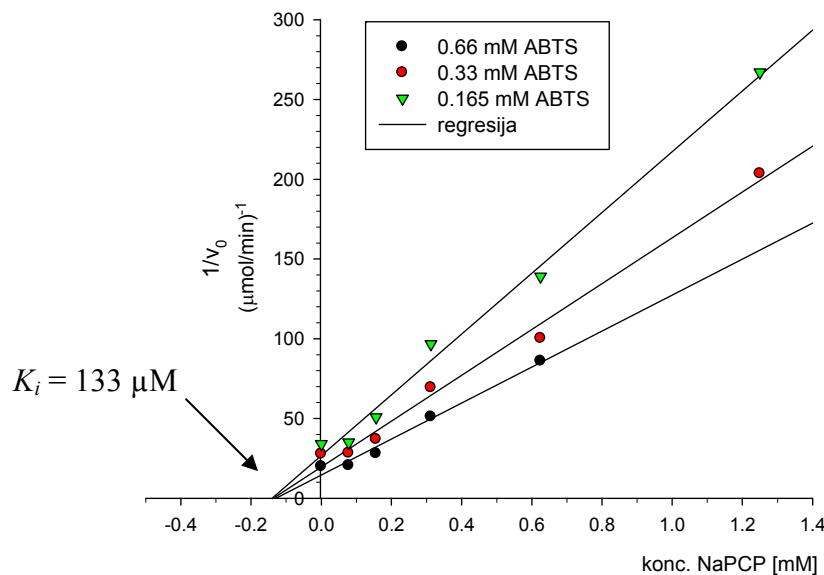
Figure 36: SDS-PAGE of commercially available ligninolytic enzymes (VP from *B. adusta*, manganese MnP from *N. frowardii*, and Lac from *T. versicolor*) following the purification by anion exchange chromatography; LMW - low molecular weight protein standards

Pred izvedbo testov inhibicije posameznih prečiščenih ligninolitičnih encimov lakaze Lac, MnP in VP z NaPCP, smo optimizirali pogoje za dosego linearnega poteka encimske kinetike posameznih encimov. V primeru NaPCP se je izkazalo, da osnovne raztopine tega

biocida s koncentracijami, ki so večje od 1,4 mM, motijo spektrofotometrično meritev kinetike encimskih reakcij z ABTS, saj naredijo reakcijsko raztopino motno. Optimalne koncentracije posameznih ligninolitičnih encimov za linearen potek oksidacije ABTS so bile 0,02 EE/ml, pri čemer smo 1 EE definirali kot količino encima, ki oksidira 1 μmol ABTS v radikal ABTS⁺. Za potek encimskih reakcij smo uporabili pufer z naslednjo sestavo: 20 mM Na-acetat, 1,61 mM MnSO₄, 4,29 mM Na₂-oksalat in 2,14 mM H₂O₂; pH = 4,5. Pri tem smo optimizirali koncentracijo vsake kemikalije posebej.

Ker so vse meritve pokazale linearen potek inhibicije, smo rezultate meritev pri različnih koncentracijah substrata ABTS prikazali s pomočjo Dixonovega diagrama, ki ponazarja odvisnost recipročne vrednosti hitrosti encimsko katalizirane reakcije od koncentracije encimskega inhibitorja. Iz presečišča krivulj, dobljenih s spremeljanjem reakcije pri različnih koncentracijah substrata, lahko sklepamo na vrsto inhibicije in izračunamo konstanto inhibicije. Dixonovi diagrami za posamezne ligninolitične encime so prikazani na slikah 37 - 39.

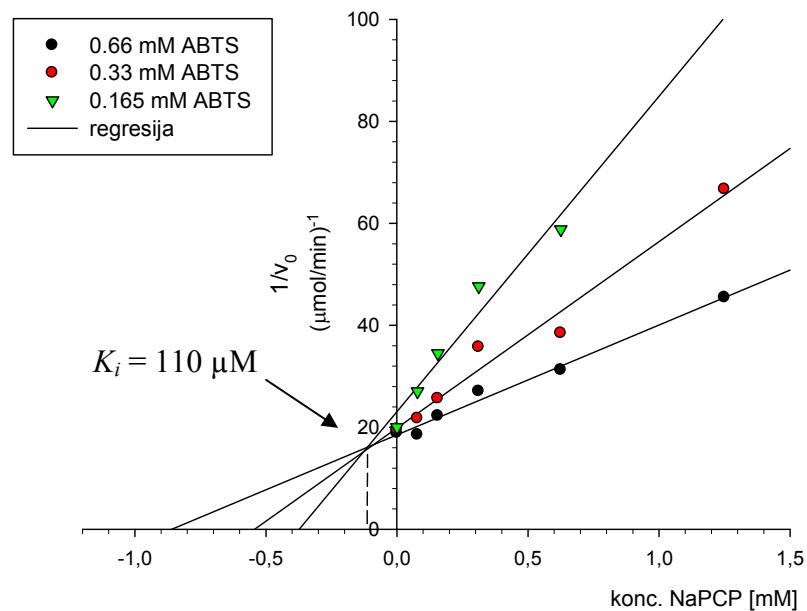
NaPCP je kazal nekompetitivni tip inhibicije Lac, izolirane iz glive *T. versicolor*. Z Dixonovim grafom določena konstanta inhibicije K_i je bila 133 μM (slika 37).



Slika 37: Dixonov diagram inhibicije Lac iz glive *T. versicolor* z NaPCP pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS: 0,660, 0,330 in 0,165 mM.

Figure 37: Dixon's diagram of NaPCP inhibition of Lac from *T. versicolor* at different concentrations of substrate ABTS (0,660, 0,330 and 0,165 mM)

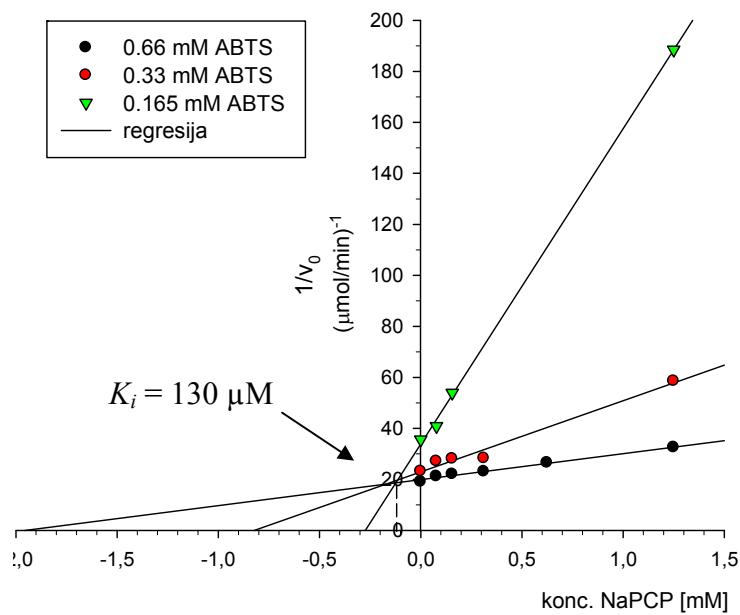
NaPCP je kazal kompetitivni tip inhibicije MnP, izolirane iz glive *N. frowardii*. Z Dixonovim grafom določena konstanta inhibicije K_i je bila $110 \mu\text{M}$ (slika 38).



Slika 38: Dixonov diagram inhibicije MnP iz glive *N. frowardii* z NaPCP pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS: 0,660, 0,330 in 0,165 mM.

Figure 38: Dixon's diagram of NaPCP inhibition of MnP from *N. frowardii* at different concentrations of substrate ABTS (0,660, 0,330 and 0,165 mM)

NaPCP je kazal kompetitivni tip inhibicije VP, izolirane iz glive *B. adusta*. Z Dixonovim grafom določena konstanta inhibicije K_i je bila 130 μM (slika 39).



Slika 39: Dixonov diagram inhibicije VP iz glive *B. adusta* z NaPCP pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS: 0,660, 0,330 in 0,165 mM

Figure 39: Dixon's diagram of NaPCP inhibition of VP from *B. adusta* at different concentrations of substrate ABTS (0,660, 0,330 and 0,165 mM)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Izberite tekočega gojišča za raziskave mikoremediacije

Z izbiro ustreznega gojišča za nadaljnje raziskave mikoremediacije NaPCP, lindana in PCB-153 v tekočih kulturah smo želeli zagotoviti optimalne eksperimentalne pogoje tako za rast izbranih vrst lesnih gliv (prostotrosnic *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum*, *G. trabeum* in zaprtotrosnice *H. fragiforme*), kot tudi za študij razgradnje posameznih kloriranih organskih biocidov s temi glivami. V ta namen smo najprej testirali rast posameznih gliv v treh različnih tekočih gojiščih: v komercialnem tekočem gojišču PDB, v mediju po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986) in v mediju po Shemakhanovi (Shemakhanova, 1960). V vseh treh gojiščih smo vrednost pH uravnali na 4,5, in sicer iz dveh razlogov. Prvi je ta, da vrednost pH 4,5 predstavlja kompromis za gojenje izbranih vrst gliv, z odmikom za največ eno enoto od optimalne vrednosti pH za rast testiranih vrst gliv; drugi razlog pa je, da je vrednost pH 4,5 optimalna tudi za delovanje Lac in MnP. Optimalna vrednost pH za delovanje LiP je mnogo nižja (2,5 - 3,5), vendar je izražanje tega encima mnogo manjše (večina gliv bele trohnobe pa LiP sploh ne tvori), s tem pa tudi njegov prispevek k celokupni ligninolitični aktivnosti (Tavzes, 2003).

Kemijsko nedefinirano komercialno tekoče gojišče PDB nudi optimalne rastne pogoje za rast gliv, kar se je izkazalo tudi v našem primeru. Primerjava suhih biomas micelija posameznih vrst gliv nam je pokazala, da so bili prirastki biomase v gojišču PDB največji, v primerjavi z drugima dvema gojiščema z znano kemijsko sestavo. Najslabšo rast smo zasledili v tekočem mediju po Shemkhanovi, ki so ga uporabljali za gojenje mikoriznih vrst gliv. Hadar pa je kemijsko sestavo svojega tekočega gojišča optimiziral za vzgojo glive *P. ostreatus* (Hadar in Cohen-Arazi, 1986). V našem primeru so prirastki biomase posameznih vrst gliv v mediju po Hadarju le rahlo zaostajali za prirastki v gojišču PDB, razen v primeru zaprtotrosnice *H. fragiforme*, kjer je bil izplen biomase za polovico manjši, kot v gojišču PDB.

Za raziskave mikoremediacije posameznih kloriranih organskih biocidov s testiranimi vrstami gliv smo že v fazi gojenja gliv v tekočem mediju z dodanim biocidom želeli zagotoviti ustrezne eksperimentalne pogoje za kasnejše raziskave razgradnje. Uspešna rast micelija gliv v kemijsko definiranem mediju po Hadarju je zadostila našim zahtevam, zato smo slednjega izbrali za nadaljnje raziskave mikoremediacije. Pomemben fiziološki dejavnik za izražanje ligninolitičnih encimov v glivnih kulturah predstavlja tudi vsebnost dušika. Glive bele trohnobe sintetizirajo ligninolitične encime v sekundarnem metabolizmu (idiofazi), ko nastopi pomanjkanje hranil, predvsem dušika (Keyser in sod., 1978), kar sovpada tudi z večjim mikoremediacijskim potencialom ligninolitičnih gliv (Reddy in Gold, 2000). Tudi s tega vidika je medij po Hadarju ustrezen za raziskave mikoremediacije, saj v njem edini vir dušika predstavlja relativno nizka koncentracija asparagina, ki je tekom 21-dni trajajočega gojenja posameznih vrst gliv po 14-ih dneh omogočila prehod glivnih kultur iz eksponentne v stacionarno fazo rasti. Zadnjih sedem dni gojenja se biomasa v glivnih kulturah navidezno ni več povečevala. To je pomembno z vidika, da je v mikoremediacijo potrebno vključiti različne razvojne stadije, kar poveča bioremediacijski potencial gline (Leisola in sod., 1987; Alleman in sod., 1995).

5.1.2 Rast gliv v mediju po Hadarju z dodanimi biocidi

Osnovni medij po Hadarju (110 mM glukoza, 5mM asparagin, 0,5 g/l kvasni ekstrakt, 2mM MgSO₄, 7 mM KH₂PO₄, 7 mM KCl; pH = 4,5) smo za potrebe bioremediacije z glivami bele trohnobe modificirali tako, da smo mu dodali 2 mM MnSO₄ in 2 mM veratril alkohol (3,4-dimetoksibenzil alkohol, VA). MnP namreč potrebuje Mn²⁺ ione, ker v svojem katalitskem ciklu oksidira MnP kelate Mn(II) v kelate Mn(III), ki so dovolj stabilni, da lahko difundirajo in oksidirajo fenolne substrate (Wariishi in sod., 1992). VA pa je sekundarni metabolit glive, ki je vezan na LiP (Khindaria in sod., 1995) in jo ščiti pred deaktivacijo (prekomerno oksidacijo) s peroksidom. VA služi tudi kot substrat komponente-II encima LiP pri zaključevanju katalitskega cikla LiP (Valli in sod., 1990; Orth in sod., 1991). Mi smo VA v tekoči medij dodali, ker inducira izražanje ligninolitičnih encimov, saj ga glive bele trohnobe proizvajajo, ko nastopi pomanjkanje hranil (Lankinen in sod., 2005; Jaouani in sod., 2006).

Rast testiranih vrst gliv smo v nadaljevanju ovrednotili v modificiranem mediju po Hadarju, ki smo mu peti dan gojenja gliv posamezno dodali biocide (NaPCP, lindan oz. PCB-153) v 30 µM koncentraciji. Dodatek lindana (uporaba v preteklosti kot insekticida, predvsem v lesarstvu) in PCB-153 v gojišče ni inhibiral rasti nobene od testiranih vrst gliv. Pri glivi *T. versicolor* je bila prirast biomase v prisotnosti PCB-153 celo povečana. Rast gliv v prisotnosti NaPCP pa je bila inhibirana v vseh primerih, v primerjavi z negativnimi kontrolnimi skupinami (brez dodanega NaPCP), razen pri glivi *T. versicolor*. Vendar smo statistično značilno manjši prirastek biomase zasledili le pri glivi *G. trabeum*. NaPCP je znan po svojem fungicidnem delovanju in so ga v ta namen kot širokospektralni fungicid uporabljali predvsem v poljedelstvu in lesarstvu (Unger in sod., 2001). Slabša rast gliv v mediju z NaPCP zato ni presenetljiva. Zanimiva pa je ugotovitev, da NaPCP ni inhibiral rasti gline *T. versicolor*, kar nakazuje možnost uporabe te vrste gline za mikoremediacijo substratov, onesnaženih z NaPCP.

5.1.3 Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi glivami

Ker je NaPCP dobro topen v vodi, smo njegovo razgradnjo določali s HPLC. Pred nanosom na kromatografsko kolono smo vzorce nakisali s fosforo kislino (pH = 3), pri čemer je NaPCP prešel v PCP. Sam PCP je šibka kislina, ki kot takšna lahko tvori soli, če ni prisotne močnejše kisline. Slednja, zaradi večje konstante asociacije, pentaklorofenolu odtegne kation. Izpostaviti želimo, da je NaPCP (oz. natrijeva sol pentaklorofenola), zaradi veliko večje topnosti v vodi, mnogo bolj primeren za koncentrirane fungicidne pripravke, kot pa sam PCP, zato so ga v lesarstvu pogosto uporabljali za zaščito lesa (Unger in sod., 2001).

Na kromatogramih vzorcev gline *T. versicolor*, gojene v prisotnosti NaPCP, nismo zasledili vrha za PCP, pri ostalih testiranih vrstah gliv pa je bil PCP prisoten. Izračunani deleži razgradnje NaPCP so bili naslednji: 56 % za glico *P. ostreatus*, 44 % za glico *C. purpureum*, 41 % za glico *H. fragiforme* in 37 % za glico *G. trabeum*. Popolna razgradnja NaPCP z glico *T. versicolor* sovpada z rezultatom prirastka biomase te gline v tekočem mediju z dodanim NaPCP. Po drugi strani pa je v primeru ostalih štirih vrst gliv slabša razgradnja NaPCP v skladu z njihovo slabšo rastjo v prisotnosti tega fungicida. V literaturi

razgradnje NaPCP z lesnimi glivami nismo zasledili. Je pa za rodove gliv *Phanerochaete*, *Armillaria*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Coprinus* in *Volvariella* že bila dokazana razgradnja PCP (Chiu in sod., 1998), vendar pa nekateri s presejalnimi testi novo odkriti sevi gliv (npr. taksonomsko neuvrščena izolata prostotrosnic Wd1 in I6) kažejo mnogo večjo učinkovitost razgradnje PCP – do 68 % (Tayal in sod., 1999). V tem pogledu je gliva *T. versicolor* uspešnejša pri razgradnji fenolov s petimi substituiranimi atomi klora, saj je uspela popolnoma razgraditi NaPCP. Pri analizi deležev razgradnje smo predvidevali, da je NaPCP tako dobro topen v vodi, da se ne adsorbira na površino micelija. Za nesporno potrditev našega rezultata pa bi bilo potrebno določiti vsebnost NaPCP (in tudi PCP) v samem miceliju glice, ki smo ga pripravili vzorcev odstranili s filtracijo skozi filtrirni papir.

Razgradnja lindana z glivami bele trohnobe je kljub njegovi ksenobiotični naravi in intenzivni uporabi v preteklosti manj proučena od razgradnje ostalih kloriranih organskih biocidov. Mougin je s sodelavci (1996) poskušal razgraditi radioaktivno označen [¹⁴C] lindan v tekoči kulturi z glivo *P. chrysosporium*, pri čemer so poleg ¹⁴CO₂ nastali še nekateri polarni razgradni produkti. Subropska vrsta glice bele trohnobe DSPM95, ki proizvaja veliko Lac in MnP, naj bi v bioreaktorju popolnoma razgradila lindan ali pa ga pretvorila v bolj polarne produkte (Tekere in sod., 2002). Razgradnja lindana v tekoči kulturi glice *P. ostreatus*, gojeni na stresalniku, je v 13-ih dneh znašala le 2,6 % (Rigas in sod., 2005)

Singh in Kuhad (1999) sta proučevala razgradnjo lindana v tekočih kulturah gliv *Trametes hirsutus* in *P. chrysosporium*. V tekočem kemijsko definiranem mediju, sta deleže razgradnje določila s plinsko kromatografijo. Vzorce za določitev razgradnje lindana sta pripravila tako, da sta tekoče kulture filtrirala skozi filtrirni papir in nato iz filtratov s heksanom ekstrahirala lindan. Po 28-ih dneh gojenja sta na ta način določila 95 % razgradnjo lindana z glivo *T. hirsutus* in 90 % razgradnjo z glivo *P. chrysosporium*. Tudi v naših raziskavah smo deleže razgradnje lindana z lesnimi vrstami gliv najprej določili na podoben način, kot sta to naredila Singh in Kuhad (1999). Tako so deleži razgradnje lindana v primeru njegove ekstrakcije iz filtrata tekočih kultur za posamezne vrste gliv znašali 97 % za *P. ostreatus*, 95 % za *T. versicolor*, 89 % za *G. trabeum* in 97 % *H.*

fragiforme. Visoka razgradnja lindana z uporabljenimi vrstami gliv v primeru vzorcev, če smo lindan ekstrahirali iz filtratov tekočih kultur, nas je presenetila in hkrati opozorila na previdnost pri interpretaciji rezultatov, zato smo kritično ovrednotili celoten postopek. Začetna koncentracija dodanega lindana v gojišču je bila 30 µM, njegova topnost v vodi pri sobnih pogojih pa je največ 25 µM. Predvidevamo, da se je del lindana adsorbiral na površino micelija, notranjo površino steklenih Erlenmayerjevih posod ali celo na filtrirni papir med filtracijo. Pri drugem načinu priprave vzorcev smo se tej nedoslednosti izognili tako, da smo vzorce pripravili z ekstrakcijo s heksanom iz homogenata tekočih kultur. Pri tem načinu ekstrakcije smo glivno kulturo pretočili v homogenizer, nato pa s heksanom najprej sprali Erlenmayerjevo steklenico in heksan iz steklenice šele zatem pretočili v homogenizer, nato pa pričeli s homogenizacijo. Dobljeni rezultati so v tem primeru pokazali bistveno nižjo razgradnjo lindana za vse testirane vrste gliv – *P. ostreatus* 57 %, *T. versicolor* 42 %, *C. purpureum* 40 %, *H. fragiforme* 13 % in *G. trabeum* 0 %. Razlika v dobljenih rezultatih pri enem in drugem načinu ekstrakcije je očitna, iz česar sklepamo, da v primeru ekstrakcije lindana iz filtrata tekočih glivnih kultur nismo ekstrahirali vsega lindana, ki je ostal nerazgrajen v tekočih glivnih kulturah ob koncu 21-dni trajajoče inkubacije. To dejstvo sta v svoji raziskavi najverjetneje spregledala tudi Singh in Kuhad (1999).

Drugi način ekstrakcije nam je pokazal, da gliva *G. trabeum* ni sposobna razgraditi lindana. Ta vrsta sodi v fiziološko skupino gliv rjave trohnobe, ki v lesu razgrajujejo le celulozo, ne pa lignina, zato ne izražajo ligninolitičnih encimov. Ta ugotovitev potrjuje tudi naše predvidevanje, da so pri razgradnji lindana z lesnimi glivami udeleženi ligninolitični encimi. Gliva *H. fragiforme*, ki sicer povzroča belo trohnobo lesa, pa filogenetsko sodi v poddebelo zaprtotrosnic (*Ascomycotina*), med tem ko so ostale tri testirane vrste gliv bele trohnobe (*P. ostreatus*, *T. versicolor* in *C. purpureum*) predstavnice poddebla prostotrosnic (*Basidiomycotina*). Razgradnja lindana z glivo *H. fragiforme* je mnogo nižja, kot pri ostalih treh vrstah gliv bele trohnobe. Morda bi lahko bil vzrok za to drugačna metabolna strategija povzročanja bele trohnobe, kot posledica vzporednega filogenetskega izvora.

Za proučitev sposobnosti razgradnje PCB-153 z lesnimi glivami smo se odločili, ker je to ena od še danes prisotnih višje kloriranih zvrsti PCB v vzorcih (živila, okoljski vzorci) iz kontaminiranega okolja Bele krajine (Posledice vpliva PCB..., 2005). Kot v primeru lindana, smo razgradnjo PCB-153 spremljali s plinsko kromatografijo in izračunali s primerjanjem ploščine kromatografskih vrhov za PCB-153 v vzorcih glede na pozitivno kontrolno skupino. Izračunani deleži razgradnje PCB-153 za posamezne glive so sledeči: *P. ostreatus* 76 %, *T. versicolor* 61 %, *C. purpureum* 58 %, *H. fragiforme* 23 % in *G. trabeum* 14 %. Glivi *H. fragiforme* in *G. trabeum* sta se tudi v tem primeru izkazali kot slabša bioremediatorja, vzroki pa so verjetno podobni, kot pri lindanu. Kljub temu, da je gliva *G. trabeum* nekoliko razgradila PCB-153, pa je standardna napaka ovrednotenega deleža razgradnje PCB-153 pri njej mnogo večja, kot pri ostalih testiranih vrstah gliv. Pri *G. trabeum* in *H. fragiforme* tudi ne dobimo statistično značilno manjše vsebnosti PCB-153 v vzorcih, v primerjavi s pozitivno kontrolno skupino (neinokulirana z micelijem). Glivi *P. ostreatus* in *T. versicolor* sta vrsti, za katere je že bila dokazana sposobnost razgradnje PCB (Beaudette in sod., 1998; Kubatova in sod., 2001; Cloete in Celliers, 1999; Koller in sod., 2000). Tudi v našem primeru je bila razgradnja PCB-153 najuspešnejša s tem dvema glivama. Pri tem je pomembno dejstvo, da so se ostali raziskovalci bolj, kot na razgradnjo posameznih PCB, osredotočali na razgradnjo kompleksnih tehničnih mešanic PCB, kar je z vidika okoljskih aplikacij seveda bolj smiselno. Vendar pa so bili v teh raziskavah deleži razgradenj posameznih PCB v mešanici večji za nižje klorirane zvrsti; z večanjem števila substituiranih atomov klora na molekuli bifenila pa je sposobnost razgradnje upadla (Zeddel in sod., 1993; Yadav in sod., 1995; Beaudette in sod., 1998; Kubatova in sod., 2001). Thomas je s sodelavci (1992) ugotovil zmanjšanje deleža mineralizacije PCB v sledečem zapovrstju: $[^{14}\text{C}]$ bifenil (23 %) $>$ 2-[^{14}C]klorobifenil (16 %) $>$ 2,2',4,4'-[^{14}C]tetraklorobifenil (10 %). S tem v zvezi so naše raziskave biološke razgradnje PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil) pokazale mnogo večje deleže njegove razgradnje z glivami bele trohnobe (58 - 76 %). Pri glivi *P. chrysosporium* je bil proučen tudi učinek mesta vezave substituiranega atoma klora na molekuli bifenila; gliva je v podobnih rastnih pogojih v 32-ih dneh razgradila okoli 10 % 2,2',4,4'-[^{14}C]-tetraklorobifenila (Bumpus in sod., 1985) in manj kot 1 % 3,3',4,4'-[^{14}C]-tetraklorobifenila (Thomas in sod., 1992).

5.1.4 Razgradnja kloriranih organskih biocidov z ligninolitičnimi encimi

Za študij razgradnje kloriranih organskih biocidov s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi (Lac iz glice *T. versicolor*, MnP iz glice *N. frowardii* in VP iz glice *B. adusta*) smo uporabili takšne biocide, ki so relativno dobro topni v vodi, saj lahko encimi katalizirajo encimske reakcije pretvorbe substrata v produkt izključno v vodnih raztopinah oz. z raztopljenimi substrati. Zato smo iz te raziskave izključili PCB-153, saj je le-ta v vodi topen le do 3 nM koncentracije. Poleg lindana in PCP, smo študirali razgradnjo še drugih nižje kloriranih fenolov (2,3,4,5-tetraklorofenol, 2,4,5-triklorofenol, 2,5-diklorofenol). PCP smo, namesto NaPCP, v raziskavo vključili, zaradi boljše primerljivosti rezultatov njegove razgradnje z razgradnjo ostalih nižje kloriranih fenolov.

Razgradnja kloriranih fenolov s posameznimi ligninolitičnimi encimi je bila določena enako, kot v primeru razgradnje NaPCP z ligninolitičnimi glivami. Pri tem smo pri vseh uporabljenih encimih opazili povečanje razgradnje kloriranih fenolov v smeri zmanjševanja števila atomov klora (Lac: 2 % PCP < 8 % 4CP < 26 % 3CP < 61 % 2CP; MnP: 7 % PCP < 18 % 4CP < 70 % 3CP < 84 % 2CP; VP: 16 % PCP < 18 % 4CP < 74 % 3CP < 83 % 2CP). Delež razgradnje lindana pa je bil z Lac 5 %, z MnP 16 % in z VP 8 %. Obe peroksidazi, še posebno MnP, sta bili za razgradnjo kloriranih fenolov in lindana mnogo učinkovitejši od Lac. So pa bile razgradnje PCP in lindana mnogo nižje od najboljše razgradnje NaPCP in lindana z ligninolitičnimi glivami – v primeru lindana je bila to gliva *P. ostreatus* (57 %), v primeru NaPCP pa gliva *T. versicolor* (100 %). Razgradnja kloriranih organskih biocidov je veliko bolj učinkovita z ligninolitičnimi glivami, kot pa s posameznimi ligninolitičnimi encimi. Vzrok temu bi lahko bile spojine z majhno molekulsko maso, ki jih v sekundarnem metabolizmu tvorijo glive same. Te spojine lahko delujejo kot prenašalci redoks potenciala, kot aktivatorji ligninolitičnih encimov ali pa slednje celo zaščitijo pred inaktivacijo. Ena od takih spojin naj bi bil veratril alkohol (VA) – naravni sekundarni metabolit gliv, ki je nujno potreben za delovanje LiP. VA ščiti encim pred deaktivacijo s peroksidom, služi pa tudi kot substrat komponente-II encima LiP ob zaključevanju katalitskega cikla LiP (Valli in sod., 1990). LiP oksidira VA v radikal, ki lahko deluje kot redoks mediator v homogenih raztopinah, vendar pa kratkoživost kationskega radikala veratril alkohola preprečuje, da bi lahko bil

uspešen difuzivni oksidant ostalih spojin (Koduri in Tien, 1995). Bolj verjetno je, da $\text{VA}^{\bullet+}$ oksidira oksalat in malonat, ki nato v nadaljevanju delujeta kot prava difuzivna oksidanta (Khindaria in sod., 1996). V primeru MnP naj bi takšno vlogo imele nenasičene maščobne kisline. Ugotovili so, da ligninolitična gliva *C. subvermispora* med kultivacijo na žagovini tvori nenasičene maščobne kisline (Nakagame in sod., 1999; Enoki in sod., 2000). MnP lahko namreč katalizira peroksidacijo lipidov in z Mn(III) iz lipidnih hidroperoksidov tvori acilne radikale, ki delujejo kot pravi difuzni oksidanti v procesu delignifikacije (Watanabe in sod., 2000). Lac, ki ob prisotnosti molekularnega kisika oksidira fenolne substrate, lahko z ustreznimi redoks mediatorji oksidira tudi nefenolne modelne spojine lignina (Bourbonnais in Paice, 1990). Eggert je s sodelavci (1996) predlagal, da pri glivi bele trohnobe *Pycnoporus cinnabarinus* to vlogo igra njen metabolit hidroksi antranilna kislina.

Vloga spojin z nizko molekulsko maso priča o tem, da »*in vitro*« biotehnoške aplikacije ligninolitičnih encimov ne morejo biti uspešne brez uporabe mediatorjev za učinkovito delovanje teh encimov. Nekaj takšnih mediatorjev so uspešno preizkusili v papirni industriji, kjer so kot mediator Lac pri beljenju papirne kaše uporabili 1-hidroksibenzotriazol, N-hidroksiacetanilid in violurno kislino (Call in Mücke, 1997; Pfaller in sod., 1998). Kondo pa je s sodelavci (1995) pri beljenju celulozne vlaknine z delno očiščeno MnP iz glive *Phanerochaete sordida* v reakcijsko zmes dodal še kelatorje mangana (oksalat, malat ali glukonat) in s tem precej znižal hitrost inaktivacije MnP zaradi peroksida ter tako zmanjšal porabo encima.

5.1.5 Potek izražanja ligninolitičnih encimov gliv v tekočem gojišču z dodatkom kloriranih organskih biocidov

V tem sklopu raziskav smo spremljali izražanje in aktivnosti zunajceličnih ligninolitičnih encimov, ki jih testirane vrste gliv izločajo v tekoče gojišče v prisotnosti posamezno dodanih kloriranih organskih biocidov in brez njih. V dosedanjih raziskavah so se raziskovalci osredotočili na kvalitativno dokazovanje izražanja zunajceličnih ligninolitičnih encimov pri posameznih glivah bele trohnobe z biokemijskimi metodami ali na proučevanje načinov in kontrole njihovega izražanja (Cullen, 1997; Kirk in Cullen, 1998). Večina novejših člankov na temo izražanja ligninolitičnih encimov opisuje

postopke za povečanje produkcije teh encimov z različnimi biotehnološkimi postopki (Mohorčič, 2002; Rodriguez-Couto in sod., 2002; Rodriguez-Couto in sod., 2003) ali uporabe cenejših substratov za bolj ekonomično pridobivanje ligninolitičnih encimov (Ruiz in sod., 2002; Fenice in sod., 2003). Nekateri avtorji opisujejo tudi vzorce izražanja zunajceličnih ligninolitičnih encimov v submerznih kulturah (Nyanhongo in sod., 2002) ali pa na lesnih substratih v kasnejših fazah glivne razgradnje lesa (Ferraz in sod., 2003).

Prisotnost posameznih ligninolitičnih encimov (Lac, MnP in LiP) je bila v tekočih glivnih kulturah brez dodanih biocidov v testiranih lesnih glivah časovno pogojena, pri čemer so bili maksimumi aktivnosti posameznih encimov pri vseh glivah izmerjeni, ko se je glivna masa predhodno namnožila. Nato so aktivnosti prisotnih ligninolitičnih encimov proti koncu 21-dnevnega gojenja postopno upadle, z izjemo glive *C. purpureum*, kjer trenda upadanja ligninolitične aktivnosti nismo zasledili. Največje aktivnosti vseh treh encimov smo izmerili pri glivah *T. versicolor* in *P. ostreatus*, ki sta v raziskavah mikoremediacije izbranih biocidov le-te tudi najbolj učinkovito razgradili. V primerjavi z njima je bila ligninolitična encimska aktivnost v primeru gliv *C. purpureum*, *H. fragiforme* in *G. trabeum* mnogo nižja. Izražanje obeh peroksidaz (MnP oz. LiP) je bilo v primerjavi z Lac mnogo manjše – doseženi maksimumi aktivnosti so bili v primeru glive *P. ostreatus* manjši za štirikrat v primeru MnP in za šestkrat v primeru LiP, pri glivi *T. versicolor* pa za petkrat v primeru MnP in za dvanajstkrat v primeru LiP.

V nadaljevanju smo aktivnosti teh ligninolitičnih encimov spremljali še v gojiščih s posamezno dodanimi biocidi, pri čemer smo se osredotočili predvsem na vrsti *P. ostreatus* in *T. versicolor* (rezultati časovnega izražanja ligninolitičnih encimov pri ostalih treh vrstah gliv so prikazani v prilogah A - G magistrskega dela). V primeru glive *P. ostreatus* je dodatek posameznih biocidov (NaPCP, lindan in PCB-153) vplival na hitrejši začetek izražanja vseh treh ligninolitičnih encimov, vendar pa so bili doseženi maksimumi aktivnosti posameznih encimov precej nižji. Ti maksimumi pa so časovno sovpadali z maksimumi aktivnosti pri negativnih kontrolnih skupinah (brez dodanih biocidov) in sicer so bili doseženi 18. dan tekom 21-dni dolgega gojenja.

Drugačen vzorec izražanja ligninolitičnih encimov ob dodatku kloriranih organskih biocidov v gojišče pa smo zasledili pri glivi *T. versicolor*. Dodatek PCB-153 ni bistveno

vplival na izražanje Lac v primerjavi z negativno kontrolno skupino, smo pa zasledili rahlo večje aktivnosti MnP in delno inhibirane aktivnosti LiP. Zanimiv pa je bil učinek v primeru dodatka NaPCP in lindana. V obeh primerih smo takoj zasledili padec aktivnosti, po enem tednu pa močno povečanje aktivnosti vseh treh ligninolitičnih encimov (indukcija izražanja) glede na aktivnosti negativnih kontrolnih skupin. V primerjavi z vrsto *P. ostreatus* so bile dosežene aktivnosti pri vrsti *T. versicolor* ob prisotnosti posameznih biocidov večje, še posebej v primeru MnP in LiP. Ker je gliva *T. versicolor* uspela popolnoma razgraditi NaPCP, vrsta *P. ostreatus* pa le do 56 %, sklepamo, da je NaPCP primeren substrat za razgradnjo predvsem z ligninolitičnimi peroksidazami, kar potrjujejo tudi izsledki razgradnje posameznih kloriranih fenolov s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi, kjer sta v primerjavi z Lac obe peroksidazi (MnP in VP) razgradili večji delež kloriranih fenolov.

5.1.6 Kinetika oksidacije ABTS z ligninolitičnimi encimi v prisotnosti NaPCP

Aktvnost encima lahko spremljamo z meritvijo kinetike encimske reakcije, pri kateri je možno substrat ali produkt reakcije spremljati spektrofotometrično. Za ligninolitične encime je takšen substrat ABTS, ki ga posamezni ligninolitični encimi (odvisno od pogojev reakcije, predvsem od sestave pufra) oksidirajo v kationski radikal ABTS^{•+}. Slednji absorbira svetlobo valovne dolžine 405 nm. S testi inhibicije encimske reakcije lahko ugotovimo, ali je morda tudi katera druga molekula lahko substrat za katerega od encimov. Iz presečišča krivulj na Dixonovih diagramih, dobljenih s spremeljanjem reakcije pri različnih koncentracijah substrata, lahko pri reverzibilnih inhibitorjih sklepamo na vrsto inhibicije (kompetitivna, nekompetitivna ali mešana). Pri tem kompetitivni tip inhibicije encima z neko molekuljo kaže na to, da se obe molekuli vežeta v aktivno mesto encima, oz. nakazuje na možnost, da je ta molekula substrat za encim. Točka, v kateri se sekajo krivulje na Dixonovih diagramih (oz. njen podaljšek na x-os) nam poda konstanto inhibicije (K_i), ki je definirana kot razmerje med produktom koncentracije prostega inhibitorja in koncentracije prostega encima ter kompleksom encim-inhibitor (enacba (4)). Nizka vrednost za K_i pomeni, da je afiniteta med inhibitorjem in encimom velika oz. da se ravnotežje reakcije doseže prej, kot v primeru visoke vrednosti K_i .

$$K_i = [E]^*[I] / [EI] \quad \dots (4)$$

V poskusih inhibicije encimske reakcije posameznih komercialnih ligninolitičnih encimov (Lac glive *T. versicolor*, MnP glive *N. fowardii* in VP glive *B. adusta*) smo bili tudi tokrat omejeni s topnostjo kloriranih organskih biocidov, kot potencialnih substratov za te encime. Encimske teste smo izvedli pri treh različnih koncentracijah substrata ABTS (0,660 mM, 0,330 mM in 0,165 mM), zato je temu koncentracijskemu rangu morala ustrezati maksimalna koncentracija uporabljenega biocida. Lindan in PCB-153 nista topna v vodi do te mere, in na razpolago je ostal le NaPCP. Dixonovi diagrami encimske kinetike posameznih ligninolitičnih encimov z ABTS in NaPCP so pokazali nekompetitivni tip inhibicije NaPCP v primeru encima Lac ($K_i = 133 \mu\text{M}$), iz česar sklepamo, da v danih pogojih encimske reakcije NaPCP ne more biti substrat za Lac. V primeru obeh peroksidaz (MnP in VP) pa je bil tip inhibicije kompetitiven, kar kaže na možnost, da je NaPCP potencialen substrat za ta dva encima. Ob tej predpostavki nam nižja konstanta inhibicije NaPCP za MnP ($K_i = 110 \mu\text{M}$) v primerjavi z VP ($K_i = 130 \mu\text{M}$) pove, da je NaPCP boljši substrat za MnP, kot za VP.

5.2 SKLEPI

- Primerno gojišče za raziskave mikoremediacije kloriranih organskih biocidov v tekočih kulturah lesnih gliv je medij po Hadarju, modificiran z dodatkom 2 mM MnSO₄ in 2 mM VA (3,4-dimetoksibenzil alkohol).
- Rast glive *T. versicolor* v tekočem gojišču z dodanim NaPCP v koncentraciji 30 µM ni bila inhibirana, pri ostalih glivah pa je bila delno zavrta, najbolj pri *H. fragiforme*.
- Glive bele trohnobe so sposobne razgraditi posamezne klorirane organske biocide, kot so lindan, NaPCP in PCB-153.
- Razgradnja lindana in PCB-153 v tekoči kulturi na stresniku je bila najuspešnejša z glivo *P. ostreatus*; po deležu razgradnje sledita vrsti *T. versicolor* in *C. purpureum*.
- Gliva *T. versicolor* je v tekoči kulturi na stresniku sposobna popolnoma razgraditi NaPCP.
- Razgradnja lindana je boljša s posameznimi ligninolitičnimi glivami, kot s posameznimi ligninolitičnimi encimi.
- MnP in VP sta v primerjavi z Lac ustreznejša ligninolitična encima za razgradnjo lindana in kloriranih fenolov.
- Posamezni ligninolitični encimi so uspešnejši pri razgradnji kloriranih fenolov, če je število substituiranih atomov klora manjše ($2\text{CP} > 3\text{CP} > 4\text{CP} > \text{PCP}$).
- Izmed testiranih gliv bele trohnobe izražata največ ligninolitičnih encimov vrsti *P. ostreatus* in *T. versicolor*.
- Izražanje vseh treh ligninolitičnih encimov (Lac, MnP in LiP) je največje pri glivi *T. versicolor*, doseženi maksimumi aktivnosti pa so največji pri glivi *P. ostreatus*.
- Dodatek posameznih kloriranih organskih biocidov je induciral izražanje ligninolitičnih encimov pri glivi *P. ostreatus*, vendar so bile dosežene aktivnosti posameznih ligninolitičnih encimov (Lac, MnP in LiP) v primerjavi z negativno kontrolno skupino manjše.
- Pri glivi *T. versicolor* je bilo izražanje ligninolitičnih encimov ob dodatku lindana in NaPCP v gojišče sprva inhibirano, čemur je v šestih do osmih dneh sledil porast

aktivnosti (indukcija izražanja) teh encimov; aktivnosti posameznih ligninolitičnih encimov v primeru dodatka PCB-153 v gojišče so bile primerljive z negativno kontrolno skupino.

- Bazidiomicetna gliva *G. trabeum*, ki povzroča rjavo trohnobo, izraža zelo majhne vrednosti lakaze, ne izraža pa ligninolitičnih peroksidaz.
- NaPCP je potencialen substrat za MnP iz glive *N. fowardii* in VP iz glive *B. adusta*, ne pa tudi za Lac iz glive *T. versicolor*.

6 POVZETEK

Študirali smo razgradnjo kloriranih organskih biocidov lindana, NaPCP in PCB-153 z izbranimi lesnimi glivami, 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 trohnobo. Razgradnja posameznih kloriranih organskih biocidov je bila z glivami bele trohnobe uspešna, pri čemer je največji delež lindana in PCB-153 razgradila gliva *P. ostreatus*, vrsta *T. versicolor* pa je uspela popolnoma razgraditi NaPCP. Časovno spremljanje aktivnosti posameznih ligninolitičnih encimov Lac, MnP in LiP je pokazalo, da vrsti *P. ostreatus* in *T. versicolor* izražata veliko večje vrednosti teh ligninolitičnih encimov, kot ostale testirane vrste gliv. Pri glivah *P. ostreatus* in *T. versicolor*, zraslih v prisotnosti posameznih biocidov, je bil vzorec časovnega izražanja ligninolitičnih encimov Lac, MnP in LiP drugačen, kot pri negativnih kontrolnih skupinah. Proučili smo tudi razgradnjo lindana in kloriranih fenolov s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi (Lac, MnP in VP), pri čemer sta bili MnP in VP v primerjavi z Lac ustreznejša ligninolitična encima za njihovo razgradnjo. Razgradnja lindana je bila uspešnejša s posameznimi ligninolitičnimi glivami, kot s posameznimi ligninolitičnimi encimi. V prisotnosti NaPCP smo s testi inhibicije oksidacije substrata ABTS s posameznimi komercialnimi ligninolitičnimi encimi ugotovili, da je NaPCP potencialen substrat za MnP in za VP, ne pa za Lac.

SUMMARY

Four selected white-rot fungi (*P. ostreatus*, *T. versicolor*, *C. purpureum* and *H. fragiforme*) and one brown-rot fungus (*G. trabeum*) were analysed for their mycoremediation potential by following the degradation of polychlorinated organic biocides lindane, NaPCP, and PCB-153, respectively. Among selected white-rot fungi, *P. ostreatus* showed the highest efficiency in degrading lindane and PCB-153, while NaPCP was most efficiently degraded by *T. versicolor*. White rots *C. purpureum*, *H. fragiforme*, and a brown rot *G. trabeum* were considerably less effective in degrading all the tested biocides. Monitoring of ligninolytic enzymes activity showed the highest expression of Lac, MnP, and LiP in *P. ostreatus* and *T. versicolor*. Temporal expression of ligninolytic enzymes in liquid cultures with addition of lindane, NaPCP, or PCB-153 differed from the negative controls. In comparison to fungal degradation, an application of respective commercially available ligninolytic enzymes Lac, MnP, and VP was less efficient in degradation of lindane or chlorinated phenols. MnP and VP were more applicable enzymes in these cases. Inhibition of ABTS oxidation by ligninolytic enzymes in the presence of NaPCP showed that NaPCP may act as a substrate for enzymes MnP and VP, and not for Lac.

7 VIRI

- Aitken M.D., Irvine R.L. 1990. Characterization of reaction catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Archives in Biochemistry and Biophysics, 276: 405-414
- Alexander M. 1994. Biodegradation and Bioremediation, San Diego, Acad. Press: 453 str.
- Alleman B.C., Logan B.E., Gilbertson R.L. 1995. Degradation of pentachlorophenol by fixed films of white rot fungi in rotating tube bioreactors. Water Research, 29: 61-67
- Alloway B.J., Ayres D.C. 1993. Chemical principles of environmental pollution. London, Blackie academic & professional: 291 str.
- Bajpai P., Bajpai P.K. 1998. Biotechnology in the pulp and paper industry – a route to energy conversion. Surrey, Pira International: 119 str.
- Baldrian P. 2004. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. Applied Microbiology Biotechnology, 63: 560-563
- Beaudette L. A., Davies S., Fedorak P. M., Ward O. P., Pickard M. A. 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. Applied and Environmental Microbiology, 64, 6: 2020-2025
- Bennett J.W. and Faison B.D. 1997. Use of Fungi in Biodegradation. V: Environmental Microbiology. Washington, ASM Press: 960-971
- Blanchette R.A., Krueger E.W., Haight J.E., Akhtar M., Akin D.E. 1997. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. Journal of Biotechnology, 53: 203-213
- Bogan B. W., Lamar R. T., Hammel K. E. 1996. Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. Applied and Environmental Microbiology, 62, 5: 1788-1792
- Bollag J.M., Leonowicz A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology, 48: 849-854
- Boominathan K., Reddy C.A. 1992. cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 89: 5586-5590

Bourbonnais R., Paice M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. FEBS Letters, 267: 99-102

Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin compounds. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4627-4632

Brodkorb T. S., Legge R. L. 1992. Enhanced Biodegradation of Phenanthrene in Oil Tar-Contaminated Soils Supplemented with Phanerochaete-Chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology, 58, 9: 3117-3121

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

Bumpus J.A., Aust S.D. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane] by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology, 53(9): 2001-2008

Butler M.J., Day A.W. 1998. Fungal melanins: a review. Journal of Microbiology, 44: 1115-1136

Call H. P., Mücke I. 1997. History, overview and applications of mediated ligninolytic system, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). Journal of Biotechnology, 53: 163-202

Candeias L.P., Harvey P.J. 1995. Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. Journal of Biological Chemistry, 270: 16745-16748

Chiu H., Ching M.L., Fong K.L., Moore D. 1998. Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. Mycological Research, 102: 1553-1562

Cloete T.E., Celliers L. 1999. Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus *Coriolus versicolor* in the presence of different concentrations of Mn(IV) oxide. Int. Biodeterior. Biodegrad., 44: 243-253

Crawford R.L., Mohn W.W. 1985. Microbial removal of pentachlorophenol from soil using *Flavobacterium*. Enzyme Microbiol., 45: 1122-1125

Cserjesi A.J., Johnson E.L. 1972. Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. Canadian Journal of Microbiology, 18: 45-49

Cullen D., Kersten P.J. 1996. Physiology of lignin degradation. V: The mycota. Vol. III. Brambl R., Marzluf G.A. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 295-314

Cullen D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolitic fungi. Journal of Biotechnology, 53: 273-289

Daniel G., Petterson B., Nilsson T., Volc, J. 1990. Use of immunogold cytochemistry to detect Mn(II)-dependent and lignin peroxidases in wood degraded by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Canadian Journal of Botany, 68: 920-933

Dasappa S.M., Loehr R.C. 1991. Toxicity reduction in contaminated soil bioremediation processes. Water Research., 25 (9): 1121-1130

Diehl S.V., Borazjani H. 2000. Bioremediation: Working even better. Forest and Wildlife Research Center. Research Advances, 5, 2: 4 str.

Dietrich D., Hickey W. J., Lamar R. 1995. Degradation of 4,4'-Dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl by the White-Rot Fungus *Phanerochaete-Chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 11: 3904-3909

Direktiva evropskega parlamenta in sveta 2006/12/ES. Ur.l. EU št. L 114/9

Duncan C.G., Deverall F.J. 1964. Degradation of wood preservatives by fungi. Applied Microbiology, 12: 57-62

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

Edwards S., Raag R., Wariishi H., Gold M., Poulos T. 1993. Crystal structure of lignin peroxidase. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 90: 750-754

Eggert C., Temp U., Dean J. F. D., Eriksson K.-E. L. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letters, 391: 141-148

Enoki M., Watanabe T., Honda Y., Kuwahara M. 2000. A novel fluorescent dicarboxylic acid, (Z)-1,7,-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. Chemistry Letters, 1: 54-55

Eriksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. V: Springer Series in Wood Science. Timell, T.E. (eds.). Berlin, Springer-Verlag.: 354 str.

Eriksson M., Dalhammar D., Borg-Karlson A.K. 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 619-626

European Council Directive of 15 July 1975 on waste. Ur.l. EC 75/442/EEC

Fengel D., Wegener G. 1989. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, New York, Walter de Gruyter: 58-258

Fenice M., Giovannozzi Sermanni G., Federici F., D'Annibale A. 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*, 100: 77-85

Ferraz A., Cordova A.M., Machuca A. 2003. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 59-65

Field J. A., Vledder R. H., vanZeist J. G., Rulkens W. H. 1996. The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: Water mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 4: 300-308

Gadd G.M. 2001. *Fungi in bioremediation*. Cambridge, Cambridge University Press: 481 str.

Garcia S., Latge J.P., Prevost M.C., Leisola M. 1987. Wood degradation by white rot fungi: cytochemical studies using lignin peroxidase-immunoglobulin-gold complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2384-2387

Glenn J.K., Gold M.H. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives in Biochemistry and Biophysicas*, 242: 329-341

Glumoff T., Harvey P.J., Molinari S., Goble M., Frank G., Palmer J.M. 1990. Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*, 187: 515-520

Gribble G.W. 1995. Natural production of organochlorine compounds. V: Chlorine and chlorine compounds in the paper industry. Turoska V. (ed.). Chelsea, Michigan, Ann Arbor Press: 89-107

Grimvall A. 1995. Evidence of naturally-produced and man-made organohalogens in water and sediments. V: Naturally-produced organohalogens. de Leer E.W.B. (ed.). Kluwer Academic Publishers: 3-20

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

Hamdy M.K., Gooch J.A. 1986. Uptake, retention, biodegradation, and depuration of PCBs by organisms. V: PCBs and the environment Vol. II. Weid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 63-88

Hammel K. E., Kalyanaraman B., Kirk T. K. 1986. Oxidation of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons and Dibenzo[P]-Dioxins by *Phanerochaete-Chrysosporium* Ligninase. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 36: 6948-6952

Hammel K.E., Tardone P.J. 1988. The Oxidative 4-Decolorination of Polychlorinated Phenols Is Catalyzed by Extracellular Fungal Lignin Peroxidases. *Biochemistry*, 27, 17: 6563-6568

Hammel K.E. 1995. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health Perspectives*, 103, Suppl. 5: 41-43

Hammel K.E. 1996. Fungal degradation of lignin. V: Driven by nature: Plant litter quality and decomposition. Gadisch, G., Giller, G. (eds.) Madison (MI), CAB International, 33-45

Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Review*, 13: 125-135

Hestbjerg H.P., Willumsen A., Christensen M., Andersen O., Jacobsen C.S. 2003. Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(4): 692-98

Huang Y., Zhao X., Luan S. 2007. Uptake and biodegradation of DDT by 4 ectomycorrhizal fungi. *Science of the Total Environment*, 385: 235-241

Huynh V.B., Crawford R.L. 1985. Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 28: 119-123

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 *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere*, 62: 1421-1430

Kamara D.N., Zadrazil F. 1988. Microbiological improvement of lignocellulosics in animal feed production. V: Treatment of lignocelulosics with white rot fungi. Zadrazil F., Reiniger P. (eds.). London, Elsevier: 46-54

Kamei I., Sonoki S., Haraguchi K., Kondo R. 2006a. Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 4: 932-940

Kamei I., Kogura R., Kondo R. 2006b. Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp MZ142. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 3: 566-575

Kent M., James A. 1983. Riegel's handbook of industry chemistry Van Nostrand Reinhold Company: 747-787

Kersten P. J., Tien M., Kalyanaraman B., Kirk T. K. 1985. The Ligninase of *Phanerochaete-Chrysosporium* Generates Cation Radicals from Methoxybenzenes. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 5: 2609-2612

Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhamar B., Kirk T.K. 1990. Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *The Biochemical Journal*, 268: 475-480

Keyser, P., Kirk, T.K., Zeikus, J.G. 1978. Ligninolytic enzymes system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology*, 135: 790–797.

Khindaria A., Yamazaki I., Aust S. D. 1995. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. *Biochemistry*, 34: 16860-16869

Khindaria A., Yamazaki I., Aust S.D. 1996. Stabilization of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. *Biochemistry* 35: 6418-6424

Kim H. Y., Song H. G. 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by white rot fungus *Irpex lacteus*. *Biotechnology Letters*, 22, 12: 969-975

Kim H. Y., Song H. G. 2003. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 2: 150-156

Kimbrough R.D. 1995. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25: 223-234

Kirk T.K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young R.A., Akhtar M. (eds.). New York, John Wiley and sons, Inc.: 273-307

Kirk T.K., Shimada M. 1985. Lignin biodegradation: the microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white – rot fungi. V: Biosynthesis and biodegradation of wood components. Dickinson R. (ed.). London, Academic Press: 233 – 245

Kirk T.K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young R.A., Akhtar M. (eds.). New York, John Wiley and sons, Inc.: 273-307

Kirk T.K., Schultz E., Connors W.J., Lorenz L.F., Zeikus J.G. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117: 277-285

Klan P., Nosek J., Klanova J., Holoubek I. 2001. Photodegradation of halophenols in water ice. Proceeding Secotox World Congress and Sixth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, Krakow, Poljska: 155-156

Koduri R.S., Tien M. 1995. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. Role of veratryl alcohol. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 22254-22258

Kogevinas M., Saracci R., Bertazzi P.A. 1992. Cancer mortality from soft-tissue sarcoma and malignant lymphoms in an international sohort of workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols. *Chemosphere*, 25(7-10): 1071-1076

Koller G.M., Moder M., Czihal K. 2000. Peroxidation degradation of selected PCB: a mechanistic study. *Chemosphere*, 41: 1827-1834

Kondo R., Tsuchikawa K., Harazono K., Sakai K. 1995. Biobleaching of kraft pulp with lignin-degrading fungi and their enzymes. V: *Biotechnology in the pulp and paper industry: Recent advances in applied and fundamental research*, Proceedings of the Sixth International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Srebotnik, E., Messner, K. (eds.). Vienna, Facultas Universitätsverlag: 33-38

Kremer S., Anke H. 1997. Fungi in bioremediation. V: *Fungal Biotechnology*. Anke T. (ed.). Weinheim, Nemčija, Chapman and Hall: 275-295

Kringstad K.P., Lindström K. 1984. Spent liquors from pulp bleaching. *Environmental science and technology*, 18: 236A-248A

Kubatova A.P., Erbanova I., Eichlerova P., Homolka L., Nerud F., Sasek V. 2001. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere*, 43: 207-215

Kusters-van Someren M., Kishi K., Ludell T., Gold M. 1995. Manganese binding site of manganese peroxidase: Characterisation of an Asp179Asn site-directed mutant protein. *Biochemistry*, 34: 10620-10627

Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169: 247-250

Lankinen P., Hildén K., Aro N., Salkinoja-Salonen M., Hatakka A. 2005. Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 401-407

Lau K.L., Tsang Y.Y., Chiu S.W. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere*, 52: 1539-46

Law W.M., Lau W.N., Lo K.L., Wai L.M., Chiu S.W. 2003. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere*, 52: 1531-37

Leisola M.S.A., Kozulic B., Meussdoerffer F., Fiechter A. 1987. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 419-424

Levin L.A., Forchiassin V.A. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 1-5

Liese W. 1970. Ultrastructure aspects of woody tissue disintegration. *Annual Review of Phytopathology*, 8, 4: 231-258

Lyr H. 1963. Enzymatische detoxification chlorierter Phenole. *Phytopathologische Zeitschrift*, 47: 73-83

MacDonald M.J., Ambler R., Broda P. 1985. Regulation of intracellular cyclic AMP levels in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* during the onset of idiophasic metabolism. *Archives in Microbiology*, 142: 152-156.

Maione T.E., Javaherian K., Belew M.A., Gomez L.E., Farrell R.L. 1987. Lignin enzymatic and microbial degradation. V: Lignin enzymic and microbial degradation. Odier, E. (ed.). Paris, INRA Publications: 117-123

Mansur M.M.E., Copa-Patino A.J.L., Flärdh M., González A.E. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*, 95(6): 1013-20

Martinson M.M., Steiert J.G., Saber D.L., Crawford R.L. 1984. Microbiological decontamination of pentachlorophenol in natural waters. In: *Biodeterioration Society: Proceedings of the Sixth International Symposium*. Ed.: E. E. O'Rear, Commonwealth Agricultural Bureau, 1984.

Memić M. 2006. Studij udjela biorazgradnje poliaromatskih ugljikovodika (PAHs) i kloriranih fenola sa lignikolnim gljivama metodom plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC/MS). Doktorska disertacija. Sarajevo, Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet: 195 str.

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

Mitra J., Mukherjee P.K., Kale S.P., Murthy N.B.K. 2001. Bioremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soil fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation*, 12: 235-245

Moeder M., Cajthaml T., Koeller G., Erbanova P., Sasek V. 2005. Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere*, 61:1370-1378

Mohorčič M. 2002. Biotehnoško pridobivanje mangan peroksidavez glivo *Phanerochaete chrysosporum*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 43 str.

Mohorcic M, Teodorovic S, Golob V, Friedrich J. 2006. Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere*, 63(10): 1709-1717

Mougin C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C., Asther M. 1996. Biotransformation of insecticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide science*, 47: 51-59

Nakagame S., Enoki M., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. 1999. Peroxidizable compounds produced by selective white-rot fungus Ceriporiopsis subvermispora. *Wood Research*, 86: 45-46

Novotny C., Vyas B.R.M., Erbanova P., Kubatova A., Sasek V. 1997. Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. *Folia Microbiol.*, 42: 136-140

Nyanhongo G.S., Gomes J., Gübitz G., Zvauya R., Read J.S., Steiner W. 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology*, 84: 259–263

Öberg L.G., Warman K., Bergstörm J. 1989. Production of chlorinated aromatics in the post-combustion zone and boiler. *Chemosphere*, 19: 319-322

Orth A., Royse D., Tien M. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4017-4023

Perez R.B., Benito G.G., Miranda M.P. 1997. Chlorophenol degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour. Technol.*, 60: 207-213

Pérez J., de la Rubia T., Ben Hamman O., Martínez J. 1998. *Phanerochaete flavid-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2726-2729

Pfaller R., Amann M., Freudenreich J. 1998. Analysis of laccase and mediator interactions at the LMS®. V: 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver, June 16th to 19th, 1998. Vancouver, BPPI: A99-A102

Podgornik H., Grgić I., Perdih A. 1999. Decolorization rate of dyes using lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere (Oxford)*, 38, 6, 1353-1359

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.

Podgornik H., Poljansek I., Perdih A. 2001. Transformation of Indigo carmine by Phanerochaete chrysosporium ligninolytic enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 29, 2-3: 166-172

Podgornik H., Podgornik A. 2002. Characteristics of LiP immobilized to CIM monolithic supports. Enzyme and Microbial Technology, 31, 6: 855-861

Pointing S.B. 2001 Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 57, 1-2: 20-33

Polič S. 1985. Poročilo o sanaciji odlagališč zemljin in drugih odpadkov, onesnaženih s polikloriranimi bifenili v DO Iskra Semič. Ljubljana, Institut Jožef Stefan - SEPO: 123 str.

Polič S., Leskovšek H. 1997. Ekološka sanacija onesnaževanja s PCB – polikloriranimi bifenili ogroženega območja reke Krupe: zaključno poročilo o rezultatih opravljenega znanstveno-raziskovalnega dela na področju aplikativnega raziskovanja (T2-6490-0106-1994). Ljubljana, Institut Jožef Stefan: 137 str.

Polič S. 2005. Recenzija zaključnega poročila »Posledice vpliva PCB na okolje v Beli krajini v letu 2005« (Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto, št. 421-43/05). Ljubljana, Institut Jožef Stefan: 43 str.

Posledice vpliva PCB na okolje v Beli Krajini v letu 2005 - Zaključno poročilo. 2005. Novo mesto, Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto: 140 str.

Pothuluri J.V., Heflich R.H., Fu P.P., Cerniglia C.E. 1992a. Fungal metabolism and detoxification of fluoroanthene. Appl. Environ. Microbiol., 58: 937-941

Pothuluri J. V., Freeman J. P., Evans F. E., Cerniglia C. E. 1992b. Fungal Metabolism of Acenaphthene by Cunninghamella-Elegans. Applied and Environmental Microbiology, 58, 11: 3654-3659

Raspor P., Smole-Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F.V., Rogelj I., Hacin J. 1995. ZIM: zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo: 98 str.

Reddy C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Current Opinion in Biotechnology, 6: 320-328.

Reddy G. V. B., Gelpke M. D. S., Gold M. H. 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by Phanerochaete chrysosporium: Involvement of reductive dechlorination. Journal of Bacteriology, 180, 19: 5159-5164

Reddy G.V.B., Gold M.H. 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology*, 146: 405-413

Reddy C.A., Mathew Z. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. V: *Fungi in bioremediation*. Gadd G.M. (ed.) Cambridge, U.K., Cambridge University Press: 52-78

Rigas F., Drista V., Marchant R., Papadopoulou K., Avramides E.J., Hatzianestis I. 2005. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. *Environment International*, 31: 191-196

Rodriguez-Couto S., Gundin M., Lorenzo M., Sanroman M.A. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38: 249-255

Rodriguez-Couto S., Moldes D., Liebanas A., Sanroman A. 2003. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 15: 21–26

Rose A.H. 1981. *Microbial Biodeterioration*, Vol 6, *Economic Microbiology*. London, Academic Press: 516 str.

Ruiz J.C., de la Rubia T., Perez J., Martinez Lopez J. 2002. Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavid-alba*. *FEMS Microbiology Letters*, 212: 41-45

Ruiz-Aguilar G.M.L., Fernandez-Sanchez J.M., Rodriguez-Vazquez R., Poggi-Verlado H. 2002. Degradation by white rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Adv. Environ. Res.*, 6: 559-568

Sasek V., Volfova O., Erbanova P., Vyas B.R.M., Matucha M. 1993. Degradation of PCBs by white rot fungi, methylotrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 15: 521-526

Sayadi S., Zorgani F., Ellouz R. 1996. Decolorization of olive mill waste waters by free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* cultures. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56: 265-276

Schroeder W.H., Lane D.A. 1988. The fate of toxic airbornepollutants. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 240-246

Shemakhanova N.M. 1960. Conditions for mycorrhiza formation of pines with *Boletus inteus* (Linn.) Fr. in pure culture. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya*: 240:255

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.

Sinkkonen S., Paasivirta J. 2000. Polychlorinated organic compounds in the Arctic cod liver: trends and profiles. Chemosphere, 40: 619-629

Srebotnik E., Messner K., Foisner R. 1988. Penetrability of white-rot degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 54: 260-265

Srinivasan C., D'Souza T.M. Boominathan K., Reddy C.A. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 61: 4274-4277

Steffen K.T., Schubert S., Tuomela M., Hatakka A., Hofrichter M. 2007. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. Biodegradation, 18: 359-369

Sundaramoorthy M., Kishi K., Gold M., Poulos T. 1994. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolution. Journal of Biological Chemistry, 269: 32759-32767

Sutherland J.B., Raff F., Khan A.A., Cerniglia C.E. 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. V: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Young L.Y., Cerniglia C.E. (eds.). New York, Wiley-Liss: 269-306

Swamy J., Ramsay J. A. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. Enzyme and Microbial Technology, 24, 3-4: 130-137

Takagi S., Shirota C., Sakaguchi K., Suzuki J., Sue T., Nagasaka H., Hisamatsu S., Sonoki S. 2007. Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. Chemosphere, 67, 9: S54-S57

Tavzes Č. 2003. Proučevanje encimatskih in neencimatskih procesov razgradnje lesa. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 138 str.

Tayal A.K., Das L., Kaur I. 1999. Biodegradation of pentachlorophenol (PCP) by white rot fungal strains screened from local sources and its estimation by high performance liquid chromatography. Biomedical Chromatography, 13: 220-224

Taylor P.H., Dellinger B. 1999. Pyrolysis and molecular growth of chlorinated hydrocarbons. J Anal Appl Pyrol., 49: 2-29

Tekere M., Ncube I., Read J.S., Zvauya R. 2002. Biodegradation of the organochlorine pesticide, lindane by a sub-tropical white rot fungus in batch and packed bed bioreactor systems. Environmental Technology, 23: 199-206

Thomas D.R., Carswell K.S., Georgiou G. 1992. Mineralization of biphenyl and PCB by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology and Bioengineering, 40: 1395- 1402

Thurston C.F. 1994. The structure and function of laccases. Microbiology, 140: 19-26
Tien M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC Critical Reviews in Microbiology, 15: 141-168

Unger A., Schniewind A.P., Unger W. 2001. Conservation of wood artifacts. Berlin, Springer-Verlag: 578 str.

Valli K., Wariishi H., Gold M.H. 1990. Oxidation of monomethoxylated compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. Biochemistry, 29: 8535-8539

Valli K., Gold M. H. 1991. Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete-Chrysosporium*. Journal of Bacteriology, 173, 1: 345-352

Valli K., Wariishi H., Gold M. H. 1992a. Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-Pa-Dioxin by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium*. Journal of Bacteriology, 174, 7: 2131-2137

Valli K., Brock B. J., Joshi D. K., Gold M. H. 1992b. Degradation of 2,4-Dinitrotoluene by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete-Chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1: 221-228

Valo R., Kitunen V., Salkinoja-Salonen M.S., Räisänen R. 1984. Chlorinated phenols as contaminants of soil and water in the vicinity of two Finnish sawmills. Chemosphere, 13: 835-844

Van Aken B., Hofrichter M., Scheibner K., Hatakka A. I., Naveau H., Agathos S. N. 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. Biodegradation, 10, 2: 83-91

Verdin, A., Sahraoui A.L.H., Durand R. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. International Biodeterioration & Biodegradation, 53: 65-70

Vyas B.R.M., Sasek V., Matucha M., Bubner M. 1994. Degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by selected white rot fungi. Chemosphere, 28: 1127-1134

Walter M., Sivakumaran S. 2002. Fungal Bioremediation. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand: 273 str.

Walter N., Boyd-Wilson K., Boul L. 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. Int. Biodeterior. Biodegrad., 56: 51-57

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. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 23688-23695

Watanabe T., Katayama S., Enoki M., Honda Y., Kuwahara M. 2000. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. *European Journal of Biochemistry*, 267: 4222-4231

Xie T.M., Abrahamsson K., Fogelqvist E., Josefsson B. 1986. Distribution of chlorophenols in a marine environment. *Environ. Sci. Technol.*, 20: 457-463

Yadav J. S., Reddy C. A. 1993. Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (Btex) by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 756-762

Yadav J.S., Quensen III J.F., Tiedje J.M., Reddy C.A. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2560-2565

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

Zeddel A., Majcherczyk A., Huttermann A. 1993. Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicological and environmental chemistry*, 40: 255-266

ZAHVALA

Na svoji poti mladega raziskovalca se najlepše zahvaljujem svojemu mentorju, prof. dr. Francu Pohlevnu. Franci, hvala za usmeritve med podiplomskim študijem in vse napotke ter vzpodbude. Hvala tudi za vztrajnost in pripeljaje, ki so naju spremljali. Najlepše se ti zahvaljujem tudi za vse popravke pri nastajanju končne oblike magistrskega dela.

Prof. dr. Kristini Sepčić in prof. dr. Luciji Zupančič Kralj se iskreno zahvaljujem za možnost uporabe raziskovalne opreme ter prepotrebne nasvete pri raziskovalnem delu. Brez vajine pomoči bi bila vsebina teh strani manj polna. Najlepše se vama zahvaljujem tudi za vajine popravke.

Za pomoč in prijetne trenutke se zahvaljujem tudi ostalim kolegom s Katedre za analizno kemijo (FKKT) in s Katedre za biokemijo (BF – Odd. za biologijo).

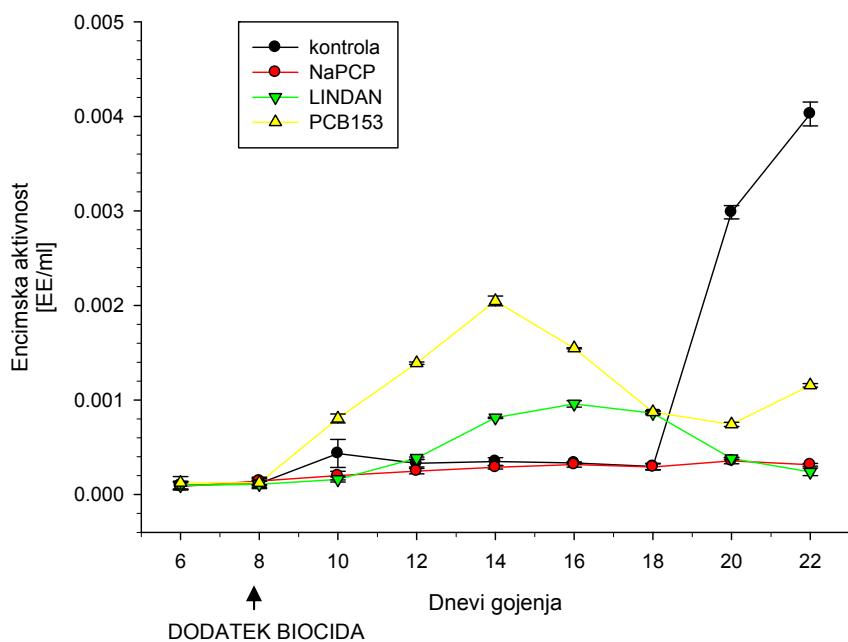
Dragi sodelavci s Katedre za patologijo in zaščito lesa - Gregor, Miha, Boštjan in Andreja, zaradi vas je bilo prijetno prihajati v službo (pa čeprav kdaj z zamudo), ☺. Miha, zahvaljujem se ti tudi za vso pomoč in popravke tega dela.

Zahvaljujem se tudi vsem prijateljem in domačim, posebej pa Suzani, ker ste mi vedno znali prisluhniti in mi pomagali najti energijo za prihodnje korake.

PRILOGE

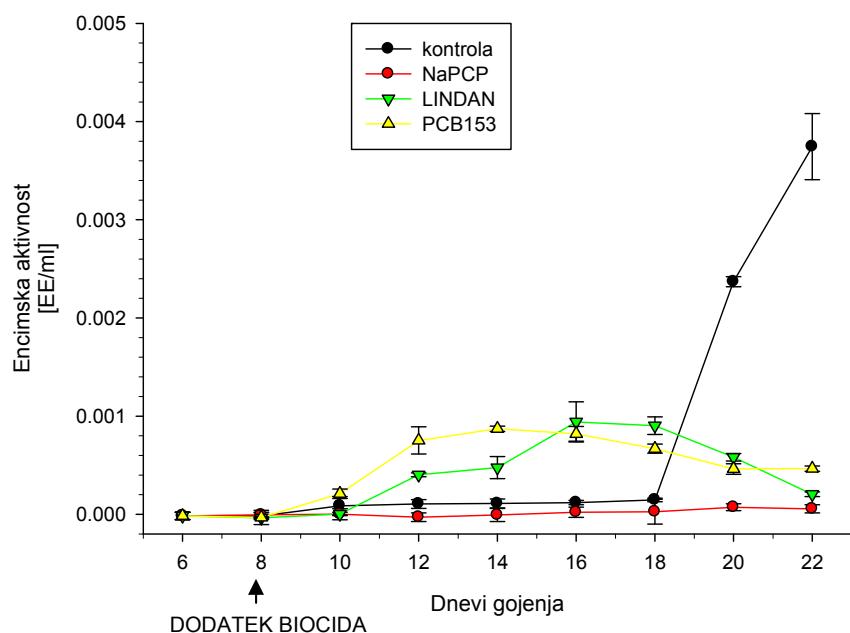
Priloga A

Slika časovnega izražanja lakaze pri glivi *C. purpureum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.



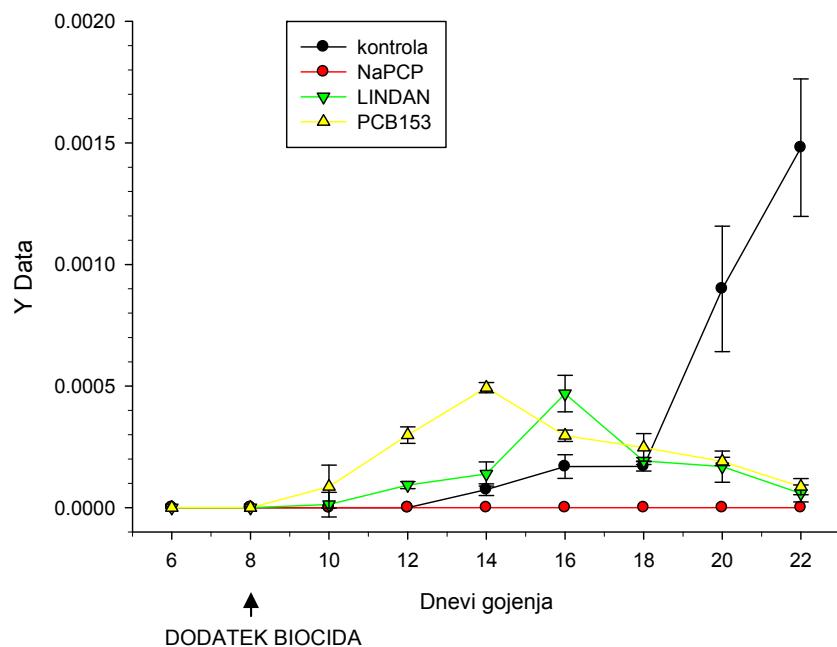
Priloga B

Slika časovnega izražanja mangan peroksidaze pri glivi *C. purpureum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.



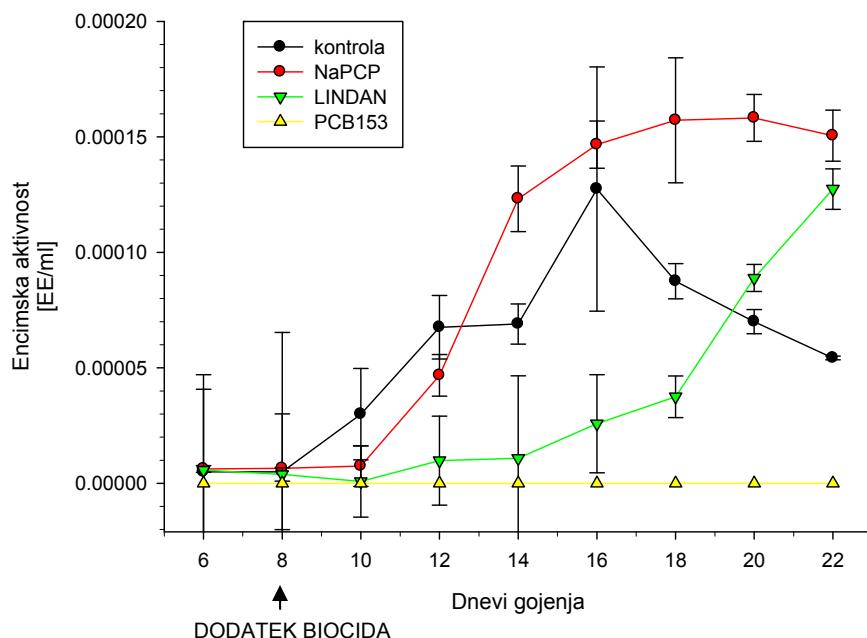
Priloga C

Slika časovnega izražanja lignin peroksidaze pri glivi *C. purpureum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.



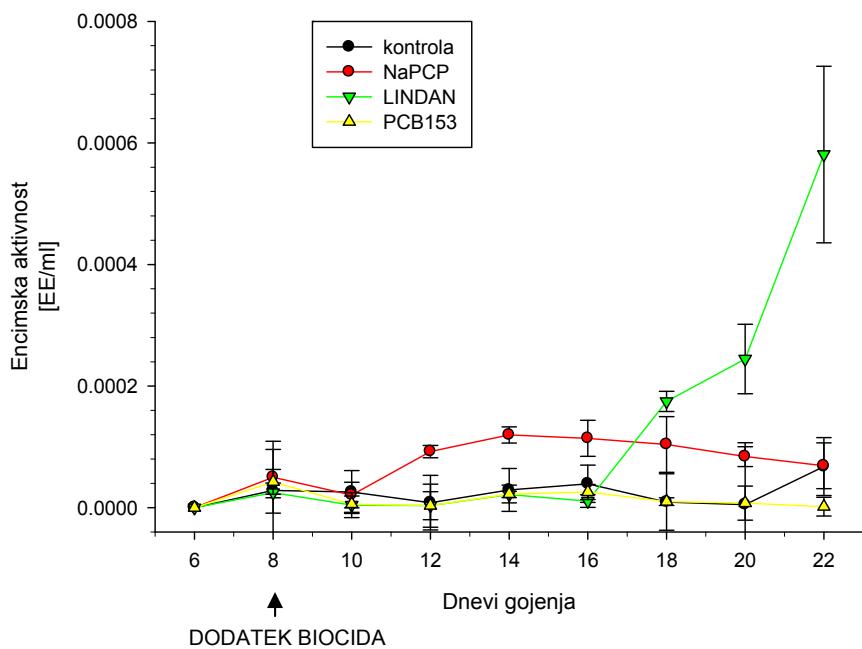
Priloga D

Slika časovnega izražanja lakaze pri glivi *H. fragiforme*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.



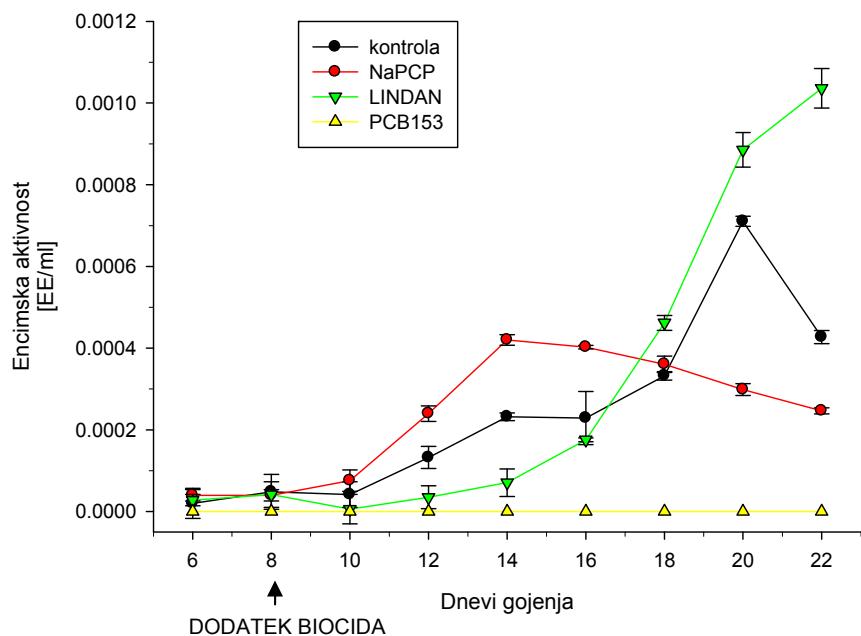
Priloga E

Slika časovnega izražanja mangan peroksidaze pri glivi *H. fragiforme*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.



Priloga F

Slika časovnega izražanja lignin peroksidaze pri glivi *H. fragiforme*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.



Priloga G

Slika časovnega izražanja lakaze pri glivi *G. trabeum*, gojeni v za potrebe mikoremediacije modificiranem mediju po Hadarju s posamezno dodanimi biocidi: NaPCP, lindan in PCB-153. V negativno kontrolno skupino (kontrola) ni bil dodan noben biocid. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost treh paralelnih vzorcev z navedenimi standardnimi napakami.

