

RAZGRADNJA ENDOSULFANA Z GLIVAMA *HYPOXYLON FRAGIFORME* IN *GLOEOPHYLLUM TRABEUM*

Degradation of endosulfan with *Hypoxylon fragiforme* and
Gloeophyllum trabeum

Povzetek: V tekočem mediju smo preučevali vpliv kloriranega insekticida endosulfana na prirast gliv ter njegovo razgradnjo z glivama *Hypoxylon fragiforme* in *Gloeophyllum trabeum*. Dodatek endosulfana v koncentraciji 2,4 mg/L ni vplival na rast micelija. Po 21 dnevih izpostavitve glivi *H. fragiforme* se je endosulfan pretvoril v metabolit endosulfan sulfat, v ekstraktih kultur pa smo s plinsko kromatografijo določili tudi endosulfan eter. Biotransformacije endosulfana z glivo rjave trohnobe *G. trabeum* nismo ugotovili.

Ključne besede: endosulfan, endosulfan sulfat, glive, tekoča gojišča z endosulfanom, plinska kromatografija, razgradnja

Abstract: The effect of endosulfan, an organochlorine insecticide, on the growth yield of *Hypoxylon fragiforme* and *Gloeophyllum trabeum* in liquid media was studied, as well as its degradation by both fungi. The addition of 2.4 mg/L of endosulfan did not have any effect on the growth of both fungal cultures. After 21 days in the liquid culture of *H. fragiforme* endosulfan was transformed to endosulfan sulphate. Endosulfan ether was also detected with gas chromatography. Biotransformation of endosulfan by *G. trabeum* was not detected.

Keywords: endosulfan, endosulfan sulphate, fungi, liquid culture with endosulfan, gas chromatography, degradation

UVOD

Endosulfan ($C_9H_6Cl_6O_3S$) je insekticid širokega spektra, ki spada med ciklodiene (slika 1). Tehnična zmes endosulfana, ki se uporablja v komercialne namene, je sestavljena iz izomerov α in β v razmerju 2:1 oziroma 7:3 (Sutherland in sod., 2002; UNEP, 2009). Endosulfan je v uporabi od sredine petdesetih let prejšnjega stoletja. Čeprav je danes njegova uporaba v mnogih državah prepovedana, je predvsem v manj razvitih državah kljub njegovim znanim škodljivim učinkom še vedno v uporabi za zatiranje škodljivcev v kmetijstvu (Sutherland in sod., 2002). V

preteklosti se je endosulfan uporabljal tudi kot zaščitno sredstvo za les (UNEP, 2009). Endosulfan spada med obstojna organska onesnaževala in je toksičen predvsem za vodne živali ter v zemlji živeče organizme. Tako kot ostali organoklorini pesticidi, je v okolju izredno obstojen ter odporen na razgradnjo. Razpolovni čas obeh izomerov endosulfana v zemlji glede na poskuse v laboratoriju znaša med 28 in 391 dnevi. Nekateri viri navajajo, da je razpolovni čas endosulfana in njegovih metabolitov tudi do šest let (UNEP, 2009).

Endosulfan se bioakumulira v živih organizmih, kjer ga zaznamo v maščobnem tkivu ter tudi v krvi. Za ljudi in večino živali je endosulfan zelo toksičen, saj ima že pri nizkih količinah akutne in kronične škodljive učinke na organizem, med drugim obstajajo domneve, da spada med motilce endokrinega sistema (Varayoud in sod., 2008). Zaradi obstojnosti in dovolj velike hlapnosti je endosulfan prisoten praktično povsod, tako v vodi, zemlji in v zraku, iz-

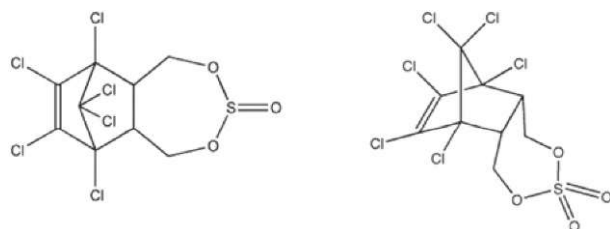
univ. dipl. inž., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: ajda.ulcnik@bf.uni-lj.si

* Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Aškerčeva cesta 5, SI-1000 Ljubljana

**Inštitut za lesarstvo in trajnostni razvoj, raziskovanje, razvoj, svetovanje in izobraževanje d.o.o., Celovška cesta 268, SI-1000 Ljubljana

polnjuje pa tudi pogoje za uvrstitev na seznam obstojnih organskih onesnaževal, ki je del Stockholmske konvencije, katere podpisnica je tudi Republika Slovenija. Trenutno je endosulfan v postopku dodajanja na omenjeni seznam odpornih organskih onesnaževal (UNEP, 2009).

S fotolizo se endosulfan slabo razgradi. V vodi razgradnja endosulfana poteka le pri visokih vrednostih pH (Sutherland in sod. 2002). Biološka transformacija endosulfana lahko poteka z oksidacijo ali s hidrolizo. Glavni metabolit, ki nastane pri oksidaciji, je endosulfan sulfat ($C_9H_6Cl_6O_4S$; slika 1), ki se s počasnimi transformacijami lahko pretvori v bolj polaren in manj toksičen endosulfan diol. Slednji se nadalje lahko razgradi v manj škodljive endosulfan lakton, endosulfan hidroksietar in endosulfan eter. Pri razgradnji endosulfana s hidrolizo je glavni razgradni produkt endosulfan diol. Endosulfan diol je manj toksičen od endosulfana in endosulfan sulfata (Sutherland in sod., 2002; Goswami in sod., 2009; UNEP, 2009). Endosulfan sulfat nastane le pri biološki transformaciji endosulfana, medtem ko endosulfan diol lahko nastaja tudi pri abiotski razgradnji v alkalnem okolju (Sutherland in sod., 2002). Popolna razgradnja endosulfana do ogljikovega dioksida z mikroorganizmi in glivami je zelo počasna (UNEP, 2009; Goswami in sod., 2009).



Slika 1. Endosulfan (levo) in endosulfan sulfat (desno) (Kegley in sod., 2010).

V literaturi je endosulfan sulfat največkrat omenjen kot končni razgradni produkt oksidacije endosulfana. Za je endosulfan sulfat tako kot endosulfan še vedno toksičen in ima prav tako tudi insekticidne lastnosti (Siddique in sod., 2003; UNEP, 2009). Težava pri biološki transformaciji endosulfana tako ni samo v počasnosti temveč tudi v nastanku in kopičenju toksičnega endosulfan sulfata.

Glavni razgradni produkt pri razgradnji z glivami je endosulfan sulfat, pri bakterijski razgradnji pa nastane v glavnem endosulfan diol. Glive bele trohnobe so sposobne razgraditi vrsto nevarnih ksenobiotikov. Pri razgradnji sodelujejo ligninolitični encimi, ki jih glive bele trohnobe sicer uporabljajo za razgradnjo lignina, ta pa poteka z oksidacijo in vključuje nastanek prostih radikalov. Razgradnje endosulfana so sposobne številne glive bele trohnobe in nitaste glive, med drugim *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Nectria ventricosa*, *Mucor thermohyalospora* (Kullman in Matsumura, 1996;

Shetty in sod., 2000; Kim in sod., 2001; Siddique in sod., 2003; Bhalerao in Puranik, 2007). Nekateri avtorji razgradnje endosulfana ne pripisujejo ekstracelularnemu oksidaznemu mehanizmu, temveč hidrolitičnim encimom (na primer mono-oksigenazam in sulfatazam) (Kullman in Matsumura, 1996; Sutherland in sod., 2002; Goswami in sod., 2009). Ker pri razgradnji endosulfana lahko nastane nov in enako škodljiv intermediat (endosulfan sulfat), so v raziskavah metabolizma endosulfana še posebej pozorni na nastanek metabolitov. Raziskovalci poročajo o različnih razgradnih produktih in predlagajo različne poti razgradnje endosulfana, odvisne od vrste uporabljene glive. V našem delu smo preučevali vpliv endosulfana na rast glive bele trohnobe *Hypoxyylon fragiforme* in glive rjave trohnobe *Gloeophyllum trabeum* ter razgradnjo endosulfana z omenjenima vrstama gliv.

MATERIALI IN METODE

Izbor glivnih izolatov in inokulacija, preverjanje topnosti endosulfana v tekočem gojišču

Endosulfan smo za 21 dni izpostavili ogljeni kroglici (*H. fragiforme*, ZIM L108) in navadni tramovki (*G. trabeum*, ZIM L018). Glivo bele trohnobe *H. fragiforme* uvrščamo v deblo zaprtotrošnic (*Ascomycota*), gliva rjave trohnobe *G. trabeum* pa spada v deblo prostotrošnic (*Basidiomycota*). Za analize smo uporabili kulture micelija iz Zbirke industrijskih organizmov (ZIM), ki jo hranimo na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Delovni skupini za patologijo in zaščito lesa. Kulture gliv smo gojili v 300 ml erlenmajericah, napolnjenih s 50 ml tekočega gojišča po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986), ki smo mu dodali $MnSO_4 \cdot H_2O$ (koncentracija v gojišču 2 mM) in veratril alkohol (3,4-dimetoksibenzil alkohol, koncentracija v gojišču 2 mM), pH gojišča pa smo umerili na 4,5 z dodajanjem 0,1 M HCl (Vidic in sod., 2008).

Zaradi skopih podatkov o fizikalno-kemijskih lastnostih endosulfana smo pred pričetkom poskusa preučili topnost endosulfana v tekočem gojišču, saj se pri razgradnji endosulfana v literaturi pojavljajo izredno različno uporabljene koncentracije, ki se ne skladajo z redko dostopnimi informacijami o topnosti endosulfana v vodi (Shetty in sod., 2000; Kim in sod., 2001; Siddique in sod., 2003; UNEP, 2009). Zato smo v tekoče gojišče po Hadarju dodali različne količine osnovne raztopine endosulfana ter z odvzemanjem alikvotov preučili enakomerno porazdelitev insekticida v njem. Osnovno raztopino endosulfana (Supelco, ZDA) smo pripravili v acetonu. Za ugotavljanje topnosti endosulfana v tekočem gojišču po Hadarju smo v 50 ml gojišča dodali osnovno raztopino endosulfana tako, da so bile končne koncentracije v gojišču 0,4 mg/L, 0,8 mg/L, 1,6 mg/L ter 2,4 mg/L. Iz gojišča smo nato petkrat odvzeli po

5 ml vzorca in endosulfan ekstrahirali z dodatkom 3 ml (za koncentraciji endosulfana 0,4 mg/L in 0,8 mg/L) ter 6 ml (za koncentracijo endosulfana 1,6 mg/L in 2,4 mg/L) heksana. Heksansko fazo smo analizirali s plinsko kromatografijo.

VPLIV ENDOSULFANA NA PRIRAST BIOMASE

Inokulat za tekoča gojišča smo vzgajali na krompirjevem dekstroznem agarju (PDA) (DIFCO Laboratories, ZDA), iz katerega smo s plutovrtom (premer 9 mm) izrezali vcepke. Tekoča gojišča smo inokulirali s tremi vcepki micelija. Za ugotavljanje vpliva endosulfana na rast gliv *H. fragiforme* in *G. trabeum* smo kulturam obeh vrst po petih dneh gojenja v tekočih gojiščih dodali 120 μ l osnovne raztopine endosulfana, negativnim kontrolam pa 120 μ l acetona (Fluka, Nemčija). Dodatno smo preučili tudi vpliv acetona na rast gliv, tako da smo glive gojili le v gojišču po Hadarju. Kulture smo stresali 26 dni v temi na horizontalnem stresalniku (100 min^{-1} , 25 °C, 60 % RH). Po koncu poskusa smo glivno biomaso ločili od gojišča s filtracijo skozi grobi filtrirni papir (Sartorius Stedim Biotech, 84 g m^{-2} , grade 388) z uporabo vodne črpalke. Vzorce smo sušili 6 ur pri 50 °C in jih nato stehtali.

RAZGRADNJA ENDOSULFANA Z GLIVAMA H. FRAGIFORME IN G. TRABEUM

Po petih dneh inkubacije smo v inokulirana tekoča gojišča dodali 120 μ l osnovne raztopine endosulfana. Koncentracija endosulfana je bila po dodatku v gojišče 2,4 mg/L. Pri negativnih kontrolah smo namesto raztopine endosulfana v gojišče dodali 120 μ l acetona. Za pozitivne kontrole smo uporabili sterilno tekoče gojišče, v katerega smo dodali 120 μ l raztopine endosulfana. Kulture gliv smo v tekočem mediju gojili še 21 dni v temi na horizontalnem stresalniku (100 min^{-1} , 25 °C, 60 % RH). Vse poskuse smo izvajali v treh ponovitvah.

Po 21 dneh izpostavitve endosulfana glivam smo vsebino erlenmajeric prelili v centrifugirke. Prazne erlenmajerice smo sprali s 50 ml heksana, ki smo ga nato dodali v centrifugirke. Vsebino centrifugirk smo homogenizirali z napravo Ika T25 Digital Ultra-Turrax (11000 vrtljajev min^{-1} , 30 s). Po homogenizaciji smo nepolarno fazo z ekstrahiranim endosulfanom ločili od polarne faze s centrifugiranjem (4000 vrtljajev min^{-1} , 5 min). Nepolarno fazo smo uporabili za nadaljnjo analizo.

Endosulfan smo v ekstraktih določili s plinskim kromatografom (Hewlett Packard 6890 Series, ZDA) z detektorjem za zajetje elektronov (ECD) in kolono RTX-5MS (dolžina 60 m, premer 250 μ m, debelina stacionarne faze 0,50 μ m). Analizni pogoji so bili naslednji: temperatura injektorja 250 °C, temperatura detektorja 350 °C, nosilni plin helij (pretok 3,7 ml min^{-1}), temperaturni program: 70 °C do 300

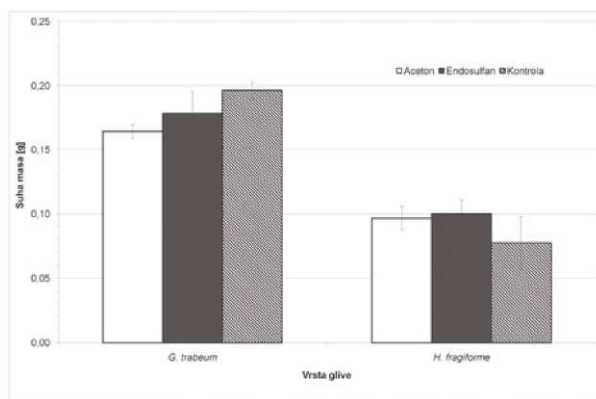
°C, 30 °C min^{-1} , zadrževalni čas 1 minuta pri 70 °C in 5 minut pri 300 °C. Volumen vbrizganega vzorca je bil 1 μ l.

REZULTATI IN RAZPRAVA

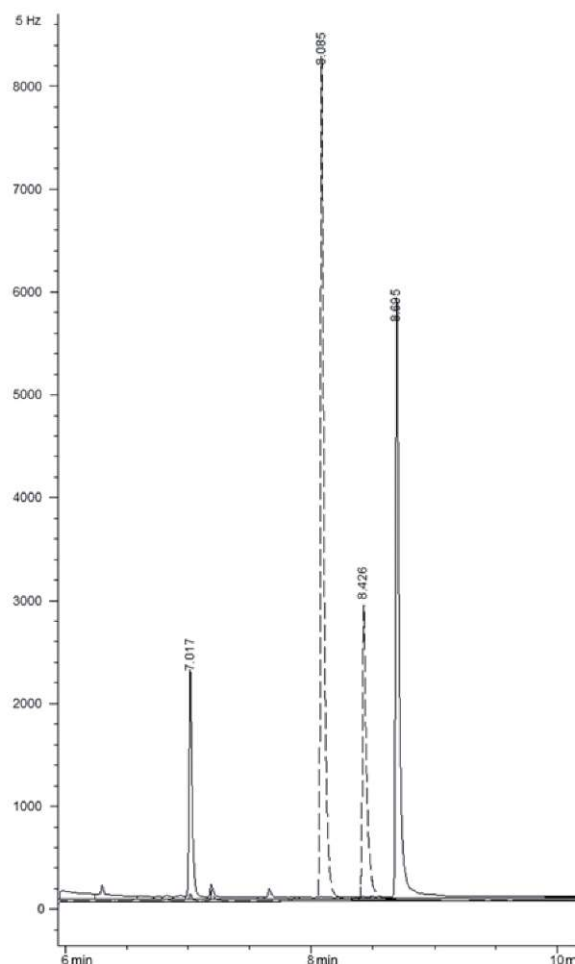
Analiza topnosti endosulfana v tekočih gojiščih ni pokazala značilnih razlik, ne glede na uporabljene izhodne koncentracije. Sklepamo, da se je endosulfan pri vseh uporabljenih koncentracijah popolnoma raztopil v gojišču. Za nadaljnje poskuse smo uporabili najvišjo možno koncentracijo (2,4 mg/L), predvsem zaradi lažje detekcije morebitnih razgradnih produktov.

Rast lesnih gliv smo testirali v modificiranem tekočem gojišču po Hadarju, ki smo mu po petih dneh po inokulaciji z vcepki izbranih gliv dodali endosulfan (končna koncentracija 2,4 mg/L). Povprečna suha masa glive *G. trabeum* je v vseh primerih znašala med 0,15 g in 0,20 g, pri glivi *H. fragiforme* pa okoli 0,10 g (slika 2). Razlike v količini suhe biomase med posameznimi vzorci so bile pri obeh vrstah gliv v okviru standardnih odklonov, zaradi česar sklepamo, da dodatek endosulfana oziroma acetona kulturam gliv v primerjavi s kontrolami (samo gojišče po Hadarju) ni vplival na prirast biomase, prav tako nismo opazili morfoloških sprememb. Pridobljeni rezultati so bili izhodišče za ugotavljanje razgradnje endosulfana. Uporabili smo enako koncentracijo endosulfana, saj pri tej koncentraciji nismo zaznali vpliva na rast gliv.

Z analizo GC ekstraktov pozitivnih kontrol (sterilno gojišče z endosulfanom) smo določili izomer α endosulfana pri retencijskem času 8,1 min in izomer β pri retencijskem času 8,4 min. Po 21 dnevih izpostavitve endosulfana kulturam glive *H. fragiforme* v ekstraktih nismo določili nobenega izmed izomerov endosulfana, saj na kromatogramu ni bilo kromatografskih vrhov pri pripadajočih re-



Slika 2. Prirastek suhe biomase gliv po 26 dneh gojenja v tekočem gojišču po Hadarju, kot srednja vrednost treh ponovitev s pripadajočimi standardnimi odkloni. Aceton in endosulfan smo dodali pet dni po inokulaciji.



Slika 3. Kromatograma endosulfana v kontroli (črtkana črta) in ekstrakta kulture glive *H. fragiforme* z dodatkom endosulfana po 21 dneh izpostavitve (polna črta)

tencijskih časih. Namesto vrhov, ki sta pripadala izomerom endosulfana, sta se pojavila nova kromatografska vrhova pri retencijskih časih 7,0 min in 8,7 min (slika 3), ki smo ju identificirali z analizo GC-MS. Na podlagi analize GC-MS smo sklepali, da je kromatografski vrh pri retencijskem času 7,0 min pripadal endosulfan etru, vrh pri retencijskem času 8,7 min pa endosulfan sulfatu, kar smo dodatno potrdili z analizo GC standarda endosulfan sulfata. Glede na to, da je končni produkt oksidacije najpogostejše endosulfan sulfat, je pri izpostavitvi najverjetneje prišlo do oksidacije endosulfana v endosulfan sulfat z ligninolitičnimi encimi (Aust, 1990; Kullman in Matsumura, 1996; Pointing, 2001; Goswami in sod., 2009).

Ploščina kromatografskih vrhov endosulfana v ekstraktih glive *G. trabeum* je bila v primerjavi s pozitivno kontrolo

nekoliko manjša, vendar zaradi majhnega števila vzorcev ne moremo sklepati, da je prišlo do razgradnje. V ekstraktih, pridobljenih iz kultur glive *G. trabeum*, smo določili oba izomera endosulfana, pojavili pa so se nekateri manjši kromatografski vrhovi, ki niso pripadali endosulfan sulfatu in endosulfan etru, kar nakazuje, da gliva endosulfana ne razgrajuje oziroma ga v le majhnem obsegu razkrajja do nespecifičnih produktov, ki jih nismo identificirali. Gliva *G. trabeum* spada med glive rjave trohnobe, ki razgrajujejo predvsem celulozo in hemicelulozo v oleseneli celični steni. Zaradi odsotnosti ligninolitičnega sistema, ki poleg lignina domnevno povzroča tudi razgradnjo ligninu podobnih ksenobiotikov, razgradnje s to vrsto glive nismo pričakovali (Bumpus in sod., 1985; Hammel, 1995; Reddy, 1995; Gadd, 2001).

SKLEP

Dodatek endosulfana v koncentraciji 2,4 mg/L ni vplival na rast gliv *H. fragiforme* in *G. trabeum* v kulturah. Po 21 dneh izpostavitve endosulfana kulturi glive *H. fragiforme* je bil endosulfan sulfat glavni metabolit, ki smo ga identificirali z GC analizo. V ekstraktih smo potrdili tudi prisotnost endosulfan etra. Z glivo rjave trohnobe *G. trabeum* do razgradnje endosulfana ni prišlo.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo v okviru programa P4-0015-0481.

LITERATURA IN VIRI

1. Aust SD (1990) Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. Microbial Ecology, 20: 197-209
2. Bhalerao TS, puranik PR (2007) Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. International Biodeterioration & Biodegradation, 59: 315-321.
3. bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science, 228: 1434-1436
4. Gadd GM (2001) Fungi in bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, 481
5. Goswami S, vig K, Singh DK (2009) Biodegradation of α and β endosulfan by *Aspergillus sydowi*. Chemosphere, 75: 883-888
6. 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
7. Hammel KE (1995) Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. V: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Young LY (Ur.), Cerniglia CE (Ur.), Wiley-Liss, New York, 331-346
8. Kegley SE, Hill BR, orme S, choi AH (2010) PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network. <http://www.pesticideinfo.org> (17.4.2011)
9. Kim YK, Kim SH, choi Sc (2001) Kinetics of endosulfan degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology Letters, 23: 163-166

10. **Kullman SW, Matsumura F (1996)** Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:593-600
11. **Pointing SB (2001)** Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33
12. **Reddy Ac (1995)** The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 320-328
13. **shetty PK, mitra J, Murthy NKB, Namitha KK, savitha KN, Raghu K (2000)** Biodegradation of cyclodiene insecticide endosulfan by *Mucor thermohyalospora* MTCC 1384. *Current Science*, 79: 1381-1383
14. **siddique T, okeke BC, Arshad M, Frankenberger WT (2003)** Biodegradation kinetics of endosulfan by *Fusarium ventricosum* and a *Pandora* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 8015-8019
15. **sutherland tO, Weir KM, Lacey MJ, Horne I, Russel RJ, Oakeshott JG (2002)** Enrichment of a microbial culture capable of degrading endosulphate, the toxic metabolite of endosulfan. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 541-548
16. **UNEP (2009)** Consideration of draft risk profiles: endosulfan. Persistent Organic Pollutants Review Committee, Fifth meeting, Geneva, 26
17. **Varayoud J, Monje L, Bernhardt T, Munoz-de-Toro M, Luque EH, Ramos JG (2008)** Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17 β -estradiol. *Reproductive Toxicology*, 26: 138-45
18. **Vidic I, Zupančič-Kralj L, sepčić K, Pohleven F (2008)** Degradation of polychlorinated organic biocides by the wood decaying fungi. V: International Research Group on Wood Preservation. IRG Documents IRG 39, Istanbul, 25-29 maj: str. 1-13