

Antifungalna aktivnost odabranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika prema ligninolitičkim gljivama

Mustafa Memić, Alisa Selović, Jasmina Sulejmanović

Prirodno–matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Izvod

Nova pravila o odlaganju pepela u državama Evropske Unije ograničavaju mogućnost bilo kakvog spaljivanja staroga drveta koje je zaštitom sa kreozotnim uljem kontaminirano (IRG/95-50042). Kreozotno ulje je jedan od glavnih izvora policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH), koji su akutno i hronično toksični kako za ljude tako i za druge ekosisteme a pri dugoj izloženosti neki od njih su kancerogeni. Među opcijama koje puno obećavaju spada biorazgradnja pomoću mikroorganizama, a u posljednje vrijeme pomoću gljiva. Ligninolitičke gljive su, najverovatnije, jedina grupa organizama koja može potpuno mineralizovati lignin. U ovom radu je testirana antifungalna aktivnost 12 PAH-ova prema gljivi bijele truleži *Hypoxylon fragiforme* i gljivi smeđe truleži, *Coniophora puteana* koja se može povezati sa sposobnošću ovih gljiva da razgrađuju PAH-ove. Pokazalo se da antifungalna aktivnost testiranih PAH-ova koncentracije 2,5 mmol/L zavisi od osobina testiranih PAH-ova i nije izražena u toj mjeri da spriječi rast gljiva. Uticaj PAH-ova na testirane gljive u direktnoj je vezi sa molekulskom masom, rastvorljivosti u vodi, vrijednosti log K_{ow} , jonizacionim potencijalom i Henrijevom konstantom kao i načinom kondezacije benzenovih prstenova. Veću antifungalnu aktivnost prema gljivama pokazali su prije svega PAH-ovi sa pet i četiri prstena u odnosu na PAH-ove sa manjim brojem prstenova.

Ključne reči: gljive; *Hypoxylon fragiforme*; *Coniophora puteana*; policiklični aromatični ugljovodonici; antifungalna aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) su velika grupa organskih jedinjenja sa dva ili više kondenzovanih aromatičnih prstenova. Po definiciji, PAH-ovi sadrže samo atome ugljenika i vodonika, međutim, atomi azota, sumpora i kiseonika mogu se lako supstituirati u benzenovim prstenovima i formirati heterociklična aromatična jedinjenja, koji su zajednički grupisani pod nazivom policiklični aromatični ugljovodonici. Fizičko–hemijske osobine u velikoj mjeri određuju ponašanje PAH-ova u životnoj sredini i utiču na to da prenos i promet bude puno brži za PAH-ove sa niskom vrijednosti molekulske mase nego one sa višom vrijednosti molekulske mase [1].

PAH-ovi nastaju uglavnom kao rezultat pirolitičkih procesa, prije svega sagorijevanjem uglja i sirove nafte, zatim prirodnog gasa i drugih materija koje se koriste za zagrijavanje. Dalje, izvori PAH-ova su motorna vozila, dim iz domaćinstva i dim od duhana, sagorijevanje otpada, ali i prirodni izvori kao što su vulkanske erupcije i gorenje šuma. Povišene koncentracije PAH-ova javljaju se tokom proizvodnje i upotrebe fosilnih goriva ili proizvoda dobivenih iz fosilnih goriva kao što su ugljeni

katran i kreozot. Analizom sastava kreozota nađeno je više od 200 jedinjenja od kojih su 85% bili PAH-ovi. Kreozot je dugo godina korišten za konzervisanje drveta [2], što je dovelo do toga da su mjesta za impregnaciju drveta također visoko kontaminirana sa PAH-ovima [3]. Zbog njihove rasprostranjenosti u životnoj sredini kao i činjenice da su kancerogeni za ljudski organizam, PAH-ovi predstavljaju ozbiljan ekološki problem. Osim hemijskim i fotohemijskim postupkom, PAH-ovi se mogu transformisati do krajnjih proizvoda mineralizacije, ugljen-dioksida i vode, biološkom razgradnjom uz pomoć bakterija i gljiva. Najpoznatiji od svih PAH-ova, benzo[*a*]piren (BaP) jedno je od poznatih jedinjenja sa najvećom kancerogenošću. Bilo je pokušaja da se procijeni rizik raznih pojedinačnih PAH-ova i kompleksnih smjesa, međutim, BaP je jedini PAH za koji je dostupna baza podataka koja daje kvantitativnu procjenu rizika [4]. Najveći napredak za upotrebu gljiva u biorazgradnji PAH-ova bio je postignut kada su Bumpus i ostali [5] objavili da gljiva bijele truleži, *Phanerochaete chrysosporium* djelimično razgrađuje benzo[*a*]piren do CO₂.

Ovaj početni izvještaj stimulirao je mnoge druge istraživače da pokažu da je lignin degradacioni sistem *P. chrysosporium* koji uključuje lignin peroksidazu (LiP) i mangan peroksidazu (MnP) značajan u razgradnji PAH-ova [6]. Za izolovane forme LiP i MnP također, bilo je pokazano da su pogodne za oksidaciju antracena, pirena, fluorena i benzo[*a*]pirena do odgovarajućih hinona [7-9]. Lignin, skupa sa celulozom i hemicelulozom,

NAUČNI RAD

UDK 547.992:582.28:504

Hem. Ind. 65 (5) 575–581 (2011)

doi: 10.2298/HEMIND110408039M

Preписка: M. Memić, Prirodno–matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Zmaja od Bosne 33–35, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina.

E-pošta: m_memic@yahoo.com

Rad primljen: 8. april, 2011

Rad prihvaćen: 30. maj, 2011

glavna je komponenta drvnog materijala i najobimnija forma aromatičnog ugljenika u biosferi. Zbog tipova veze i njihove heterogenosti, lignin ne može biti razgrađen hidrolitičkim enzimima kao većina drugih prirodnih polimera (celuloza, skrob, proteini, itd). Razgradnja lignina je oksidacioni proces koji izazivaju gljive izlučivanjem ekstracelularnih enzima posredno ili neposredno i tako djeluju na lignin [10,11]. Sposobnost gljiva da transformiraju različite rizične hemikalije potakla je interes za njihovu upotrebu u bioremedijaciji [12]. Kroz veliki broj radova [13–15] pokazano je da gljive bijele truleži mogu degradirati različite aromatične polutante.

U ovom radu ispitivan je utjecaj PAH-ova na gljivu bijele truleži *Hypoxylon fragiforme* i gljivu smeđe truleži *Coniophora puteana* koje nisu ranije testirane. Gljive bijele truleži među koje spada *Hypoxylon fragiforme* i gljive meke truleži su jedinstvene među eukariotima jer imaju razvijene nespecifične metode za degradaciju lignina, ali je interesatno da one ne koriste lignin kao izvor ugljenika za svoj rast [16]. Gljive smeđe truleži među koje spada *Coniophora puteana* za svoj rast koriste hemicelulozu i celulozu iz ćelijskog zida biljaka, ostavljajući lignin nerazgrađen [17]. Zapaženo je da gljive

smeđe truleži modificiraju lignin što je pokazano demetilacijom i akumulacijom oksidativnih polimernih lignin razgradnih proizvoda [18].

MATERIJAL I METODA RADA

Ligninolitičke gljive

– *Hypoxylon fragiforme* (Pers.: Fr.) J. Kickx ZIM L 108 KPZL 508, 1990, izvorna oznaka CBS Hf;

– *Coniophora puteana*, (Schum ex. Fr.) Karst. ZIM L 010, 1995, izvorna oznaka, FCo58 Cp.

Podaci su preuzeti iz ZIM – Zbirke industrijskih mikroorganizama [19].

Izbor optimalne koncentracije PAH-ova za testiranje antifungalne aktivnosti

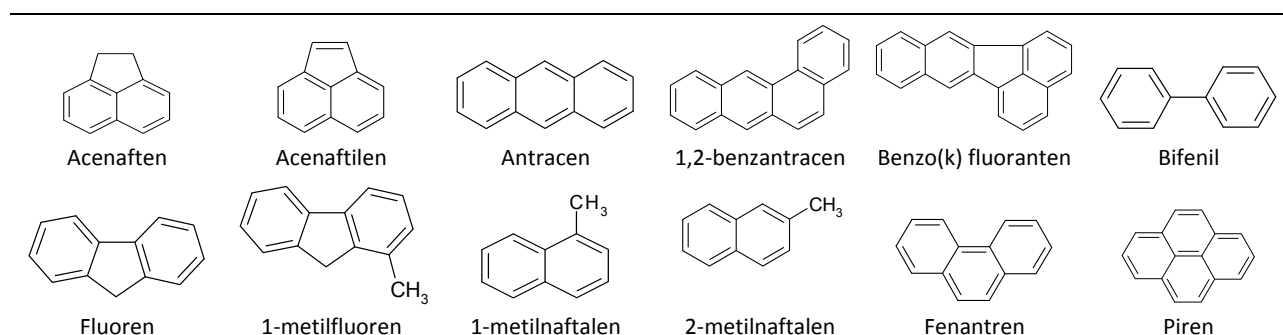
Za odabir odgovarajućih koncentracija jedinjenja za testiranje urađeni su monitoring testovi sa 12 PAH-ova. U tabelama 1 i 2 date su neke fizičko-hemijske osobine i strukture odabranih PAH-ova, redom. Pripremljeno je 9 različitih koncentracija svakog od 12 odabranih PAH-ova (97–99,5% čistoće) u rasponu od 20 do 0,078 mmol/L (20/10/5/2,5/1,25/0,625/0,313/0,156/ 0,078).

Tabela 1. Fizičko-hemijske osobine 12 testiranih PAH-ova
Table 1. Physical-chemical properties of 12 tested PAHs

PAH	Broj prstenova	Molekulska masa ^a , g/mol	Log K_{ow} ^a	Rastvorljivost u vodi, mg/L (25 °C)	Jonizacioni potencijal ^b , eV	Henrijeva konstanta ^a Pa m ³ /mol (25 °C)
Acenaften	3	154,21	3,92	3,8	7,68	15,7
Acenaftilen	3	152,20	4,07	16,1	8,22	1,14
Antracen	3	178,23	4,54	0,045	7,43	4,94
1,2-benzantracen	4	228,29	5,91	0,011	7,56	0,81
Benzo(k)fluoranten	5	252,32	6,00	0,0008	7,48	0,06
Bifenil	2	154,20	4,01	7,48	8,34	30,4
Fluoren	3	166,21	4,18	1,9	7,88	10,1
1-metilfluoren	3	180,25	4,97	1,1	7,78	431,6
1-metilnaftalen	2	142,20	3,87	25,8	7,90	26,3
2-metilnaftalen	2	142,20	3,86	24,6	7,91	52,5
Fenantren	3	178,20	4,57	1,1	8,03	12,6
Piren	4	202,25	5,18	0,13	7,53	1,2

^a[20–23]; ^b[24,25]

Tabela 2. Strukturne formule 12 testiranih PAH-ova
Table 2. Structures of the 12 tested PAHs



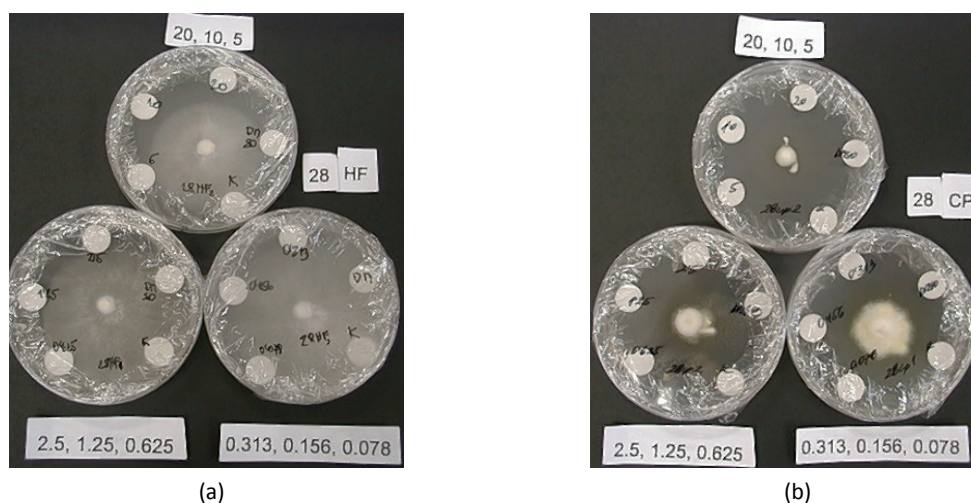
Rastvori navedenih supstanci su pripremani u dimetil-sulfoksidu (DMSO, Fluka, 99,9%). Za rast gljiva korišten je hranidbeni medij 4 %-tni vodeni rastvor krompirovog dekstrozo agara (*Potato Dextrose Agar-PDA*, Difco™, Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, SAD). Pripremljeni hranidbeni medij kao i ostali propratni materijal sterilisani su u autoklavu (Penta, j.p. Selecta, s.a. CTRA National, Abrera, Španija). U Petrijevim posudama (prečnik: 90 mm, plastične sterilisane, Golias laboratehnika, Ljubljana, Slovenija) izvršena je inokulacija gljiva na PDA u Laminar flow (Telastar AH-100, Terrassa, Španija). Na podlozi PDA u sredini Petrijeve posude inokuliran je po jedan komadić gljive *Hypoxyylon fragiforme* (HF) odnosno *Coniophora puteana* (CP), prečnika 5 mm. Istovremeno je na krajevima Petrijeve posude u krugu oko micelija postavljeno pet Whatman papirića (AA DISCS 13 mm). Jedan papirić je korišten kao kontrolni, i na njemu nije inicirana supstanca niti rastvarač, a na prvom sljedećem papiriću inicirano je 0,1 mL čistog rastvarača DMSO. Na preostala tri papirića inicirano je po 0,1 mL rastvora supstance u DMSO odgovarajuće koncentracije, redom 20/10/5 u prvoj, 2,5/1,25/0,625 u drugoj i 0,313/0,156 i 0,078 mmol/L u trećoj Petrijevoj posudi (slika 1). Svaki eksperiment je izveden sa tri jednake paralelke. Petrijeve posude su dobro zatvorene providnom folijom i postavljene u komoru za rast, (Combi Cold Rac Laboratory Refrigerator 5201, LKB Instruments Ltd., Švedska), u mraku sa stalnom temperaturom od 25 °C i uz relativnu vlažnost vazduha od 75%. Rast gljive HF je praćen sedam, a gljive CP dvadeset dana. Nakon određenog perioda mjereno je prirast gljiva prema kontroli, DMSO i supstanci sa odgovarajućom koncentracijom. Širenje (rast) micelije je mjereno u milimetrima, od centra Petrijeve posude prema Whatman papirićima (slika 1). Iz rezultata monitoring testova bilo je vidljivo da veće koncentracije PAH (5–20 mmol/L) imaju znatno veću antifungalnu aktivnost u odnosu na

niže koncentracije PAH-ova. Primjer antifungalne aktivnosti različitih koncentracija 1-metilfluorena predstavljen je na slici 1. Slično se ponašaju obe gljive HF i CP, međutim vidljivo je da gljiva smeđe truleži CP sporije raste u odnosu na gljivu HF.

Na osnovu rezultata monitoring testa zaključeno je da bi optimalna koncentracija PAH-ova koja nema izražen visok stepen antifungalne aktivnosti bila 2,5 mmol/L pa je ova koncentracija korištena za daljnja testiranja.

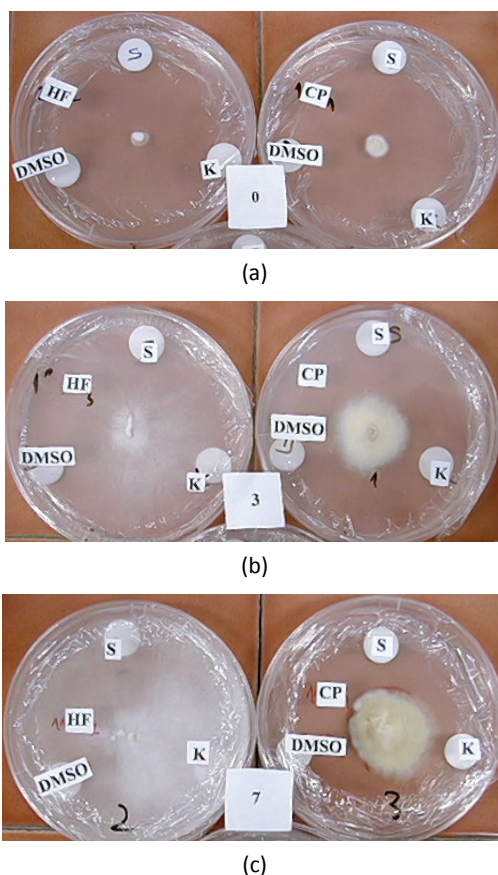
Antifungalna aktivnost 12 odabranih PAH-ova fiksne koncentracije

Test antifungalne aktivnosti 12 odabranih PAH-ova fiksne koncentracije (2,5 mmol/L) prema gljivi bijele truleži (HF) i gljivi smeđe truleži (CP) proveden je na sljedeći način. Na sterilnoj podlozi, PDA u Petrijevim posudama inokulirana je na sredini po jedna micelija odgovarajuće gljive. Okolo su postavljena tri Whatman papirića (WP) pri čemu je na jedan dodano 0,1 mL testirane supstance rastvorene u DMSO, čija je koncentracija 2,5 mmol/L. Na drugom WP dodano je 0,1 mL čistog rastvarača DMSO, na trećem WP nije bilo supstance (kontrolni papirić). Testovi su provedeni sa tri jednake paralelke. Petrijeve posude su zatvorene providnom folijom i postavljene u komoru za rast u mraku na 25 °C i uz relativnu vlažnost vazduha od 75%. Nakon određenog perioda mjereno je rast gljiva (mm) od centra micelije prema rubovima Petrijeve posude. S obzirom na to da gljiva HF u većini primjera naraste do maksimuma nakon sedam dana, mjerenje veličine rasta ove gljive prema kontrolnom papiriću, rastvaraču i supstanci zabilježeno je nakon tri i sedam dana. Za razliku od gljive HF, gljiva CP sporije raste (poprečno) tako da je svoj maksimalni rast prema rubu Petrijeve posude dostigla nakon 20 dana. Mjerenja rasta ove gljive u svim slučajevima su urađena nakon 3, 7, 10 i 20 dana. Izgled micelije gljiva uz prisustvo bifenila koncentracije



Slika 1. Rast gljive HF (a) i gljive CP (b) uz prisustvo različitih koncentracija 1-metilfluorena.
Figure 1. The growth of fungi HF (a) and CP (b) in the presence of different concentrations of 1-methylfluorene.

2,5 mmol/L neposredno nakon inokulacije, nakon 3 i 7 dana vidi se na slici 2.



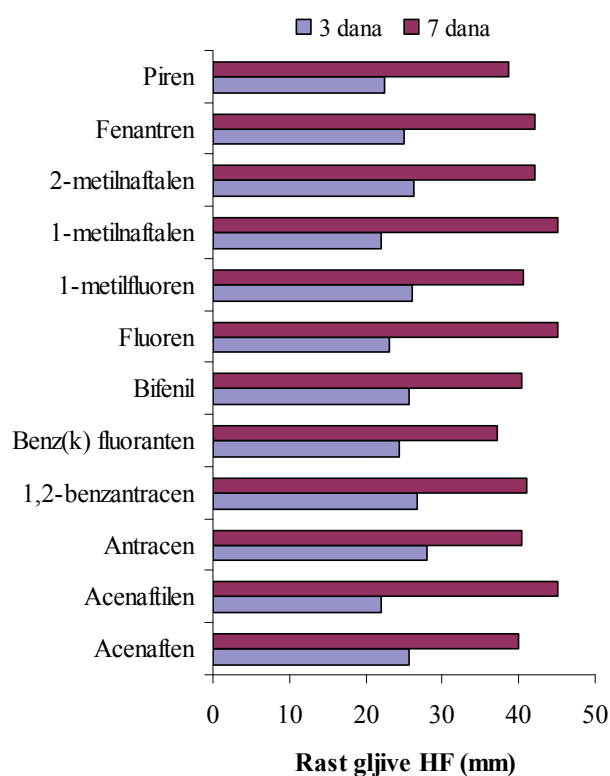
Slika 2. Petrijeve posude sa gljivama HF i CP u prisustvu kontrolnog Whatman-ovog papirića (K), sa DMSO i sa supstancom (S) (Bifenil) na početku inkubacije (a), nakon tri dana inkubacije (b) i nakon sedam dana inkubacije (c).

Figure 2. Petri dishes with fungi HF and CP in the presence of control Whatman paper (K), with DMSO and with the substance (s) (biphenyl) at the beginning of incubation (a), after three days of incubation (b) and after seven days of incubation (c).

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati rasta gljiva HF i CP u prisustvu testiranih PAH-ova prikazani su na slikama 3 i 4. Za razliku od gljive CP, gljiva HF znatno brže raste (poprečno) što se ne može reći i za ukupnu masu gljive. Iz navedenih razloga, testiranje rasta gljive HF u prisustvu PAH-ova provedeno je samo sedam dana jer je u tom periodu gljiva narasla do maksimalnog prečnika u Petrijevoj posudi. Na slikama 3 i 4 se vidi skoro linearan rast gljiva sa vremenom prema svim supstancama, što je naročito vidljivo za gljivu CP gdje je rast mjereno kroz duži vremenski period. Rezultati su pokazali (slika 2) da je rast gljiva HF i CP bio najveći prema kontroli a zatim prema rastvaraču DMSO i na kraju prema testiranom PAH-u. Iako su gljive svoj rast usmjeravale od inicirane supstance prema kontroli i rastvaraču, one ipak rastu i

prema testiranim PAH-ovima. Uočeno je da gljiva HF u kasnijoj fazi, intenzivnije raste prema nekim PAH-ovima (acinaftalen, fluoren i 1-metilnaftalen) što navodi na konstataciju da se gljiva adaptirala na supstance koje su za nju manje toksične, pa ih je, vjerovatno koristila kao izvor ugljenika za rast. Jasno se vidi da rast gljiva nije isti prema svim supstancama. Ograničen rast obje gljive je posebno vidljiv prema benzo(k) fluorantenu, pirenu i 1-metilfluorenu.

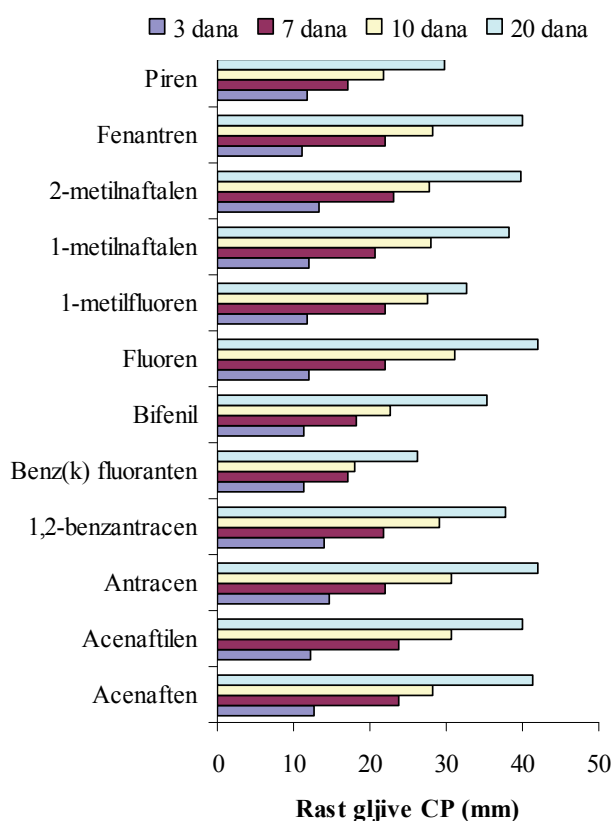


Slika 3. Rast gljive HF prema supstancama (PAH) nakon 3 i 7 dana.

Figure 3. The growth of fungi HF to compounds (PAH) after 3 and 7 days.

Uočljiva je povezanost antifungalne aktivnosti odabranih PAH-ova sa njihovom strukturom i nekim fizičkim i hemijskim osobinama. Strukturne formule odabranih PAH-ova predstavljene su u tabeli 2. Benzo(k)-fluoranten, jedini od 12 testiranih PAH-ova sa 5 prstenova (4 benzenova i jedan petočlani), ima najizraženiju antifungalnu aktivnost prema obje gljive, tj. gljive prema njemu najsporije rastu. Takođe, benzo(k)fluoranten ima najveće vrijednosti molekulske mase i log Kow a najmanju vrijednost Henrijeve konstante i najmanje je rastvorljiv u vodi od svih 12 PAH-ova (tabela 1). Piren koji ima 4 kondenzovana benzenova prstena je sljedeća supstanca prema kojoj su najmanje rasle gljive HF i CP. Piren ima veću vrijednost molekulske mase i log Kow a manju vrijednost Henrijeve konstante i manje je rastvoran u vodi od preostalih 10 PAH-ova, osim 1,2-benzantracena. Za razliku od pirena, 1,2-benzantracen ima

veće vrijednosti molekulske mase i $\log K_{ow}$, a manju vrijednost Henrijeve konstante i manje je rastvoran u vodi, ali pokazuje manju antifungalnu aktivnost. Razlog ovakvog ponašanja 1,2-benzantracena je vjerovatno angularna kondenzacija benzenovih prstenova za razliku od ciklične kondenzacije kod pirena. Dalje je karakteristično da bifenil koji ima samo dva benzenova prstena ograničava rast gljiva više od nekih PAH-ova sa više prstenova u strukturi što se takođe može povezati sa kondenzacijom. Naime, benzenovi prstenovi kod bifenila nisu kondenzovani. Objе gljive maksimalno rastu prema fluorenu sa dva benzenova prstena koji nisu direktno kondenzovani već preko jednog petočlanog prstena. 1-Metilfluoren slične strukture ima znatno veću antifungalnu aktivnost od fluorena, prije svega prema gljivi CP. Bitno je napomenuti da je njegova rastvorljivost u vodi manja od rastvorljivosti fluorena, što može biti razlog njegove antifungalne aktivnosti a ne prisustvo metil grupe. Kod ostalih testiranih PAH-ova zabilježena je približna vrijednost antifungalne aktivnosti.



Slika 4. Rast gljive CP prema supstancama (PAH) tokom 3, 7, 10 i 20 dana.

Figure 4. The growth of fungi CP to compounds (PAH) through 3, 7, 10 and 20 days.

Rast gljiva prema određenom PAH-u možemo povezati i sa eventualnom mogućnošću biorazgradnje PAH-ova sa testiranim lignikolnim gljivama. Iz prethodnih konstatacija može se zaključiti da na antifungalnu aktiv-

nost pojedinih PAH-ova a time i na udio biorazgradnje PAH-ova sa lignikolnom gljivom bijele truleži *Hypoxyylon fragiforme*, i lignikolnom gljivom smeđe truleži *Coniophora puteana*, pored pomenutih osobina (molekulska masa, rastvorljivost u vodi i drugih) utiče i broj benzenovih prstenova, način kondenzacije prstenova, prisustvo petočlanog prstena, potom vrijednosti Henrijeve konstante i jonizacionog potencijala. PAH-ovi sa nižom molekulsom masom su više isparljivi, rastvorni i biorazgradivi od PAH-ova sa visokom molekulsom masom. Biorazgradnja PAH-ova sa dva i tri prstena je dobra za razliku od PAH-ova sa četiri, pet i šest prstenova u molekuli PAH-a. Uređenje benzenovih prstenova je također važno za biorazgradnju i nađeno je da su PAH-ovi sa angularnim uređenjem stabilniji nego oni sa linearnim uređenjem [26] što se slaže i sa antifungalnom aktivnošću pokazanom u ovom radu. Važan kriterijum za oksidaciju PAH-ova pomoću enzima lignikolnih gljiva jeste jonizacioni potencijal [27,28]. Poređenjem jonizacionog potencijala testiranih PAH-ova sa rastom gljiva vidljivo je da benzo(k)fluoranten i piren koji maksimalno ograničavaju rast gljiva imaju najnižu vrijednost jonizacionog potencijala. Gljive bijele truleži se odlikuju sposobnošću da stvore kompleks ekstracelularnih enzima, prvenstveno peroksidaza za degradaciju lignina i njemu srodnih jedinjenja. Iako su razgradni procesi PAH-ova sa gljivama bijele truleži intenzivno proučavani, mehanizam razgradnje još nije jasan. Pretpostavka je da lignolitički enzimi vrše jednoelektronsku radikalnu oksidaciju stvarajući katjon radikale od pojedinih PAH-ova što je praćeno nastankom hinona [29]. Druga mogućnost je stvaranje epoksida preko sistema monooksidaza citokroma P-450. Epoksidi, dalje, mogu biti prevedeni u hidroksidne derivate ili mogu hidrolizirati do dihidrodiola [29]. Gljive smeđe truleži se vjerovatno služe niskomolekularnim razgradnim medijatorima tokom razgradnje. Predpostavlja se da gljive smeđe truleži koriste ekstracelularni Fenton sistem za stvaranje hidroksil radikala ili neki sličan moćni oksidans koji je sposoban razgraditi PAH-ove [30]. Međutim, kako je poznato [31,32], gljive smeđe truleži mogu proizvoditi i LiP, odnosno konkretno *Coniophora puteana* lakazu [33]. To bi značilo da CP ima više mogućnosti za razgradnju PAH-ova u odnosu na HF.

ZAKLJUČAK

Na osnovu praćenja rasta gljiva na čvrstoj podlozi u prisustvu PAH-ova, procijenjena je minimalna koncentracija jedinjenja (2,5 mmol/L) koja značajno ne inhibira rast gljive. Također je pokazano koji su PAH-ovi više toksični za gljive što se u najvećem broju slučajeva može povezati sa mogućnošću biorazgradnje testiranih PAH-ova. U ovom radu je pokazano da ligninolitička gljiva bijele truleži *Hypoxyylon fragiforme* (HF), koja prvenstveno razgrađuje lignin i ligninolitička gljiva smeđe

truleži *Coniophora puteana* (CP) koja razgrađuje prvenstveno hemicelulozu i celulozu drveta, uspješno rastu u prisustvu 12 testiranih PAH-ova koncentracije 2,5 mmol/L pa se može reći da su sposobni i za biorazgradnju istih. Antifungalna aktivnost testiranih PAH-ova prema do sada malo studiranoj lignikolnoj gljivi bijele truleži *Hypoxyylon fragiforme* kao i lignikolnoj gljivi smeđe truleži *Coniophora puteana* u direktnoj je vezi sa njihovom strukturom i nekim fizičkim i hemijskim osobinama. Veći broj benzenovih prstenova utiče na veću energiju π -elektronskog sistema aromatičnog karaktera i tako na veću antifungalnu aktivnost, jer je energija molekule za napad radikala manje povoljna. Linearna kondenzacija, koja se izražava naročito u topološkim deskriptorima, znači i manju antifungalnu aktivnost (veću biorazgradnju) molekule PAH-a, što možemo pretpostaviti da je u vezi sa strukturom aktivnog mjesta enzimskog sistema ligninolitičkih gljiva. Angularna kondenzacija doprinosi većoj antifungalnoj aktivnosti u odnosu na linearnu kondenzaciju, a manjoj u odnosu na cikličnu kondenzaciju (primjer pirena). Prisustvo petočlanog prstena u strukturi jedinjenja koji se, takođe, izražava u topološkim deskriptorima utiče na manju antifungalnu aktivnost jer je povećan karakter dvostruke veze u molekuli. Sa stanovišta zaštite životne sredine, lignikolne gljive vjerovatno igraju značajnu ulogu u prirodnom smanjenju policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Iako su ovi organizmi spori biorazgrađivači, visoko su nespecifični i oni su široko rasprostranjeni stanovnici šumskog područja. Lignikolne gljive *Hypoxyylon fragiforme* i *Coniophora puteana* mogle bi se koristiti za dekontaminaciji otpadnog drveta impregniranog opasnim materijama koje sadrže PAH-ove, kao i u biotehnologiji prečišćavanja otpadnih voda, prije svega iz industrije papira i pesticida gdje su PAH-ovi naročito zastupljeni.

LITERATURA

- [1] S.R. Wild, K.C. Jones, Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United-Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environ. Pollut.* **88** (1995) 91–108
- [2] M. Howsam, K.C. Jones, Sources of PAHs in the environment, in: *Anthropogenic compounds. PAHs and related compounds*, A.H. Neilson (Ed.), Springer, Germany, 1998, pp. 137–174
- [3] J.G. Mueller, P.J. Champan, P.H. Pritchard, Creosote-contaminated sites. Their potential for bioremediation, *Environ. Sci. Tehnol.* **23** (1989) 1197–1201
- [4] J.F. Collins, J.P. Brown, S.V. Dawson, M.A. Marty, Risk assessment for benzo[*a*]pyrene, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **13** (1991) 170–184
- [5] J.A. Bumpas, M. Tien, D. Wright, S.D. Aust, Oxidation of persistent environmental pollutants by white-rot fungus, *Science* **228** (1985) 1434–1436
- [6] S.D. Aust, Degradation of environmental pollutants by *Phenerochaete chrysosporium*, *Microb. Ecol.* **20** (1990) 197–209
- [7] K.E. Hammel, B. Green, W.Z. Gai, Ring fission of anthracene by a eukaryote, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** (1991) 10605–10608
- [8] B.W. Bogan, R.T. Lamar, K.E. Hammel, Fluorene oxidation *in vivo* by *Phenerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation, *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996) 1788–1792
- [9] C.E. Cerniglia, Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **19** (1997) 324–333.
- [10] S. Lundstedt, *Analysis of PAHs and Their Transformation Products in Contaminated Soil and Remedial Processes*, Department of Chemistry, Environmental Chemistry, Umeå University, Sweden, 2003.
- [11] A. Hatakka, Biodegradation of lignin, in: *Biopolymers. Lignin, Humic Substances and Coal*, M. Hofrichter, A. Steinbüchel (Eds.), Wiley-VCH, Germany, 1994, (1) pp. 129–180
- [12] M. Alexander, *Biodegradation and Bioremediation*, Acad. Press, San Diego, CA, USA, 1994
- [13] P.J. Collins, M.J.J. Kotterman, J.A. Field, A.D.W. Dobson, Oxidation of anthracene and benzo[*a*]pyrene by laccases *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996) 4563–4567
- [14] M.J.J. Kottermann, E. Heessels, E. Jong, J.A. Field, The psychology of anthracene biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42** (1994) 179–186
- [15] L. Bazel, Y. Hadar, P.P. Fu, J.P. Freeman, C.E. Cerniglia, Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzotiofene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** (1996) 2554–2559
- [16] T.K. Kirk, W.J. Connors, J.G. Zeikus, Requirement of growth substrate during lignin degradation by two wood rotting fungi, *Appl. Environ. Microbiol.* **32** (1976) 192–194
- [17] J.A. Micales, T.L. Highley, Some physiological characteristics of a nondegradative strain of *Poria* (= *Postia*) *plancenta*, Stockholm. *Int. Res. Group on Wood Pres. Doc. No. IRG/WP/1341*, 1988, 17p
- [18] L. Jin, T.P. Schultz, D.D. Nicolas, Structural characterization of brown-rotted lignin, *Holzforschung* **44** (1990) 132–138
- [19] P. Raspor, M.S. Smole, J. Podjavoršek, F. Pohleven, N. Gogala, V.F. Nekrep, I. Rogelj, J. Hacin, ZIM – Zbirka industrijskih mikroorganizmov, Katalog biokultur, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 1995
- [20] HSDB – Hazardous Substances Data Bank, <http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/hsdbfs.html>
- [21] D. Mackay, W.Y. Shiu, K.C. Ma, *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins and Dibenzofurans*, Lewis Publishers, Michigan, 1992.
- [22] K.T. Semple, A.W.J. Morriss, G.I. Paton, Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soil: fundamental

- concepts and techniques for analysis. *Environ. J. Soil Sci.* **54** (2003) 809–818.
- [23] NIST Chemistry WebBook, <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>.
- [24] B.W. Bogan, R.T. Lamar, One-Electron Oxidation in the Degradation of Creosote Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 2631–2635
- [25] R. Dabestani, N. Ivanov, Invited review: A compilation of physical, spectroscopic and photo physical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Photochem. Photobiol.* **70** (1999) 10–34
- [26] K.S. Park, R.C. Sim, R.R. Dupont, W.J. Doucette, J.E. Matthews, Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity, *Environ. Toxicol. Chem.* **9** (1990) 187–195
- [27] K.E. Hammel, B. Kalyanaraman, T.K. Kirk, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 16948–16952
- [28] E. Cavalieri, E. Rogan, Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.* **64** (1985) 69–84
- [29] C.E. Cerniglia, Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **19** (1997) 324–333
- [30] P. Wood, Pathways for production of Fentons reagent by wood-rotting fungi, *FEMS Microbiol. Rev.* **13** (1994) 313–320
- [31] S. Dey, T.K. Maiti, B.C. Bhattachacharyya, Lignin peroxidase production by brown-rot fungus *Polyporus ostriformis*, *J. Ferment. Bioeng.* **72** (1991) 402–404
- [32] S. Dey, T.K. Maiti, B.C. Bhattachacharyya, Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase production-producing brown-rot fungus, *Polyporus ostriformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization, *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (1994) 4216–4218
- [33] J.S. Alan, W.P. John, A.W. Nia, Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions, *Int. Biodeter. Biodegr.* **39** (1997) 225–233.

SUMMARY

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AGAINST LIGNINOLYTIC FUNGI

Mustafa Memić, Alisa Selović, Jasmina Sulejmanović

Faculty of Science, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

(Scientific paper)

Environmental contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) has been causing increasing concern because of their known, or suspected, carcinogenic and mutagenic effects. Polycyclic aromatic hydrocarbons occurring in the environment are usually the result of incomplete combustion of carbon containing materials. The main sources of severe PAHs contamination in soil come from fossil fuels, *i.e.*, production or use of fossil fuels or their products, such as coal tar and creosote. Creosote is used as a wood preservation for railway ties, bridge timbers, piling and large-sized lumber. It consists mainly of PAHs, phenol and cresol compounds that cause harmful health effects. Research on biodegradation has shown that a special group of microorganisms, the white-rot fungi and brown-rot fungi, has a remarkable potential to degrade PAHs. This paper presents a study of the antifungal activity of 12 selected PAHs against two ligninolytic fungi *Hypoxylon fragiforme* (white rot) and *Coniophora puteana* (brown rot). The antifungal activity of PAHs was determined by the disc-diffusion method by measuring the diameter of the zone of inhibition. The results showed that the antifungal activity of the tested PAHs (concentration of 2.5 mmol/L) depends on their properties such as molar mass, solubility in water, values of log K_{ow}, ionization potential and Henry's Law constant as well as number of aromatic rings, molecule topology or pattern of ring linkage. Among the 12 investigated PAHs, benzo(k) fluoranthene with five rings, and pyrene with four cyclic condensed benzene rings showed the highest antifungal activity.

Keywords: Fungi • *Hypoxylon fragiforme* • *Coniophora puteana* • Polycyclic aromatic hydrocarbons • Antifungal activity