

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

GLIVE IN MIKOREMEDIACIJA

URBAN SOTENŠEK

VELENJE 2017

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

GLIVE IN MIKOREMEDIACIJA

URBAN SOTENŠEK

Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentor: doc. dr. Martin Batič

VELENJE 2017

SKLEP O IMENOVANJU DIPLOMSKE KOMISIJE

Senat Visoke šole za varstvo okolja je na 17. seji, 5. 10. 2016, sprejel

SKLEP,

s katerim imenuje diplomsko komisijo za zagovor diplomskega dela

GLIVE IN MIKOREMEDIACIJA

kandidata

URBANA SOTENŠKA,

v sestavi:

dr. Lucija Kolar, predsednica,

doc. dr. Nataša Smolar Žvanut, članica,

doc. dr. Martin Batič, član – mentor.

Velenje, 10.10. 2016



Dekan:

izr. prof. dr. Boštjan Pokornj

Visoka šola za varstvo okolja

Trg mladosti 7 | 3320 Velenje

t: 03 898 64 10 | f: 03 89864 13 | e: info@vsvo.si

www.vsvo.si



IZJAVA O AVTORSTVU

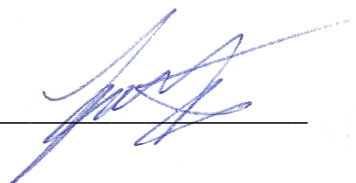
Podpisani Urban Sotenšek z vpisno številko 34130053, študent dodiplomskega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtor diplomskega dela z naslovom Glive in mikoremediacija, ki sem ga izdelal pod mentorstvom doc. dr. Martina Batiča.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni del predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in ga je lektorirala: Maruša Kos;
- dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- sta tiskana in elektronska različica identični.

Velenje, 10.10.2017

Podpis: _____



ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Martinu Batiču za strokovno pomoč in napotke pri pisanju diplomskega dela.

IZVLEČEK

Hitra rast svetovnega prebivalstva je privedla do povečanega izkoriščanja naravnih dobrin in virov, s katerimi zadovoljujemo visoke zahteve po hrani, energiji in drugih potrebah. Industrijska revolucija je bila odgovor na te povečane potrebe človeštva. Vendar pa je s hitrim razvojem nastalo tudi veliko število različnih anorganskih in organskih kemijskih spojin, ki so posredno ali neposredno onesnažile naše habitate.

Z uporabo biotehnologije lahko pripomoremo pri ocenjevanju stanja ekosistemov, pretvorbi onesnaževal v neškodljive snovi, ustvarjanju biološko razgradljivih materialov in razvijanju okolju bolj prijaznih industrijskih procesov. Ob upoštevanju nujnosti učinkovitega okoljskega biotehnološkega procesa se je izoblikovala tehnika bioremediacije, pri kateri s pomočjo živih organizmov skušamo iz različnih ekosistemov odstraniti onesnaževala ali pa zmanjšati njihov učinek na okolje. Treba je poudariti, da pojem bioremediacije ni enak pojmu biorazgradnje. Tehnike bioremediacije lahko vključujejo postopke biorazgradnje, mobilizacije in imobilizacije (npr. biosorpcija, bioakumulacija itd.) ter biokonverzije.

Ena izmed takšnih biotehnoloških tehnik je mikoremediacija. To je trajnostno orodje, ki za remediacijo uporablja prave (gobe) in ne-prave (plesni, kvasovke itd.) glive. Glive imajo zmožnost bioremediacije onesnaženih tal, akumulacijo težkih kovin, biorazgradljivosti, biosorpcije, mineralizacije, transformacije, filtracije ter presnove različnih spojin. Za razgradnjo in transformacijo onesnaževal glive uporabljajo encimske sisteme. Glive, s poudarkom na pravih gobah, imajo velik potencial pri bioremediaciji zaradi svoje hitre rasti, velike proizvodnje biomase in micelij, ki se lahko relativno hitro razširi na območju onesnaženja.

Uporaba pravih gob v namene bioremediacije je ekonomsko upravičena, saj jih lahko gojimo na dostopnih in cenovno ugodnih kmetijskih (npr. slama, koruzni storži itd.) ter gozdarskih odpadkih (npr. žagovina, sekanci ipd.). Micelij gliv, ki se uporablja v postopkih mikoremediacije, se s preprostimi tehnikami gojenja lahko pripravlja v večjih količinah in enostavno uporablja na mestih, kjer je prišlo do onesnaženja.

V prizadevanju po ekonomičnih in ekološko neoporečnih metodah sanacije okolja, predstavljajo mikoremediacije potencialno dober pristop k rešitvi problema onesnaženosti. Obstaja veliko raziskav, kjer je vloga gob v bioremediaciji poudarjena v okviru postopkov biorazgradnje, biosorpcije in biokonverzije. Številne raziskave vključujejo raziskovanje vloge različnih metabolnih poti, encimov gliv in pogojev v procesih biorazgradnje različnih onesnaževal. Še vedno ostaja raziskovalno odprto področje ugotavljanja mikoremediacijskega potenciala različnih gliv in odgovarjajočih onesnaževal, za katere raziskave še niso bile opravljene.

V okviru diplomskega dela so bile preučene raziskave mikoremediacij številnih onesnaževal s poudarkom na PCB (poliklorirani bifenili) onesnaževalu. PCB so v okolju in organizmih kemijsko obstojni in zelo stabilni. Zaradi lipofilnih lastnosti se shranjujejo v maščobna tkiva organizmov in kopičijo v prehranski verigi. Škodljivi učinki PCB se pri ljudeh kažejo na koži, razmnoževalnem, živčnem in imunskem sistemu. Motijo hormonsko ravnovesje, so rakotvorni in lahko negativno vplivajo pri razvoju zarodkov. Največji vir izpostavljenosti PCB predstavlja uživanje hrane v primeru, da izvzamemo nesreče in poklicno izpostavljenost. Zaradi podanih dejstev je pospešena razgradnja PCB v okolju pomembna.

Za PCB onesnaževalo je bil preučen mikoremediacijski potencial z glivama vrste *Grifola frondosa* in *Phanerochaete chrysosporium*. *Phanerochaete chrysosporium* je ena izmed bolj raziskanih gliv na področju mikoremediacij. Njena specifična sposobnost razgradnje lignina in obenem zelo majhna razgradnja celuloze je razlog za številne raziskave. Zaradi specifičnih lastnosti razgradnje kompleksnih molekul se pri glivi *Phanerochaete chrysosporium* pričakuje tudi dober potencial razgradnje drugih kompleksnih molekul. *Grifola frondosa* je užitna gliva in na območju Slovenije vključena na rdeči seznam ogroženih vrst gliv. Razširjena uporaba in namnoževanje te glive v druge namene bi potencialno lahko privedlo tudi do povečanja njenega habitatnega območja.

Glivi sta bili gojeni v različnem eksperimentalnem okolju in pogojih kultivacije. Obe glivi sta v vseh primerih uspešno razgrajevali onesnaževalo PCB, vendar pa je na učinkovitost razgradnje vplival tako medij kot pogoji gojenja. Razgradnja onesnaževala PCB 48 z uporabo glive *Grifola frondosa* je bila proučena v mediju z nizko in visoko vsebnostjo dušika ter v mediju z dodanim ligninom. Ob dodajanju lignina v medij se je tej glivi zaradi povečane aktivnosti encimov povečala tudi razgradnja PCB. Učinkovitost razgradnje PCB je bila odvisna od uporabljenega gojitvenega medija in kongenerja PCB. Zmanjšanje koncentracije PCB onesnaževala se je nahajalo v razponu od 16 % do 89 %.

Uporaba biomase micelija glive *Phanerochaete chrysosporium* pri razgradnji PCB je pokazala 74 % manjšo vsebnost PCB za Delor 103 in 73 % za Delor 106. V primerih dodajanja PCB zmesi zunajceličnemu ekstraktu glive je bilo opaziti podobno zmanjšanje ravni onesnaževala PCB. Rezultati učinkovitosti so pokazali povprečno zmanjšanje vsebnosti onesnaževala 62 % za Delor 103 in 58 % za Delor 106.

Neodvisno od uporabljene glive je za proces razgradnje PCB iz okolja pomembna prisotnost lignina in vsebnost dušika v kultivacijskih medijih. Učinkovitost razgradnje PCB se je pokazala v obeh preučenihi primerih uporabe gliv. Na osnovi dokazanih rezultatov v proučevanihi primerih lahko mikoremediacije uvrščamo med potencialno zelo obetajoče in stroškovno učinkovite načine bioremediacije okolja.

Ključne besede: degradirana območja, bioremediacija, mikoremediacija, glive, gobe, *Phanerochaete chrysosporium*, *Grifola frondosa*, razgradnja PCB, dekompozicija PCB, prisotnost lignina, prisotnost nitroгена.

ABSTRACT

Rapid growth of the world's human population has led to an increased exploitation of natural resources to meet the high demands of food, energy and other needs. The industrial revolution was the response to these increased needs of humanity. However, with rapid development, a large number of different inorganic and organic chemical compounds were created, which directly or indirectly contaminated our habitats.

By using biotechnology, we can contribute to the assessment of the state of ecosystems, conversion of pollutants into harmless substances, creation of biodegradable materials and development of environmentally friendlier industrial processes. Considering the necessity of an effective environmental biotechnological process, different techniques of bioremediation were developed whereby with using living organisms we try to remove pollutants from an ecosystems or reduce the effect of pollutants on the environment. It should be emphasized that the concept of bioremediation is not the same as biodegradation. Bioremediation techniques may include biodegradation, biosorption, bioaccumulation and bioconversion.

One such biotechnological technique is mycoremediation, a sustainable tool for environmental management that uses fungi for remediation. Fungi have the capability to bioremediate contaminated soils, accumulate heavy metals. They have abilities of biodegradation, biosorption, mineralization, transformation, filtration and metabolic conversion of various compounds. For the decomposition and transformation of contaminants, fungi use their enzymatic systems. Fungi have great potential in bioremediation due to their rapid growth, large biomass production and mycelium, which can be easily and rapidly expanded in the polluted location.

The use of fungi for the purposes of bioremediation is economically justified, since it can be cultivated in accessible and affordable agricultural (straw, corn cobs, etc.) and forestry waste material (sawdust, wood chips, etc.). Fungal mycelium, used in mycoremediation procedures, can be prepared in large quantities using simple cultivation techniques and is easily used in places where pollution has occurred.

In the pursuit of economical and ecologically friendly methods of environmental remediation, mycoremediations represent a potentially good approach to solving the problem of pollution. There are many studies where the role of mushrooms in bioremediation is emphasized in the context of biodegradation, biosorption and bioconversion processes. Numerous studies involve exploring the role of different metabolic pathways, fungal enzymes and conditions in biodegradation processes of various pollutants. There remains an open field of exploration for determining the mycoremediation potential of various fungi and corresponding pollutants for which research has not yet been carried out.

Many scientific studies on the subject of mycoremediation were examined as part of this thesis research. In the course of this research priority was given to the subject of PCB pollution. PCBs are chemically stable and very persistent in the environment and in organisms. Due to lipophilic properties, they can concentrate in fat tissues of organisms and accumulate in the food chain. The harmful effects of PCBs in humans are reflected on the skin, the reproductive, nervous and immune system. They disturb the harmonic balance, they are carcinogenic and can have a

negative effect on the development of embryos. The largest source of exposure to PCBs is food consumption, if we exclude accidents and occupational exposure. Due to the facts presented, accelerated decomposition of PCBs in the environment is important.

Mycoremediation potential with fungi species *Grifola frondosa* and *Phanerochaete chrysosporium* in correlation with different PCB pollutants was examined. *Phanerochaete chrysosporium* is one of the more researched fungi in the field of mycoremediation. Its specific lignin degradation abilities and at the same time very low degradation of cellulose is the reason for numerous studies. Due to the specific decomposition properties of complex molecules, *Phanerochaete chrysosporium* is also expected to have good degradation potential for other complex molecules. *Grifola frondosa* is an edible fungus and is included on the red list of endangered fungal species in the territory of Slovenia. The widespread use and reproduction of this fungus for other purposes could potentially lead to an increase in its habitat.

Fungi were grown in a variety of experimental environments and cultivation conditions. In all cases, both fungi successfully decomposed the PCB pollutant, however the success rate of degradation was influenced both by the medium and the conditions of cultivation. Degradation of the PCB 48 pollutant using *Grifola frondosa* was studied in a medium with low and high nitrogen content and in a medium with added lignin. When lignin was added to the medium, degradation of PCBs was increased due to the activity of fungal enzymes. PCB decomposition efficiency was dependent on the used culture medium and PCB congener. Reduction of PCB pollutant concentrations was in the range of 16 % to 89 %.

Using *Phanerochaete chrysosporium* mycelial biomass in the PCB decomposition showed a 74% lower content of PCBs for Delor 103 and 73% for Delor 106. In cases where PCB mixture was added to extracellular fungus extract, a similar decrease in the level of the PCB pollutant was observed. The efficacy results showed an average decrease in the pollutant content of 62 % for Delor 103 and 58 % for Delor 106.

In the process of PCB degradation, the presence of lignin and content of nitrogen in cultivation media is important, regardless of the fungus used. The efficacy of PCB degradation has been demonstrated by both fungi in all case studies. On the basis of the achieved results in the studied cases, mycoremediations can be classified as potentially very promising and cost-effective ways of environment bioremediation.

Keywords: degraded areas, bioremediation, mycoremediation, fungi, mushrooms, *Phanerochaete chrysosporium*, *Grifola frondosa*, PCB decomposition, PCB degradation, lignin presence, nitrogen presence.

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

2,3,7,8-TCDD – 2,3,7,8-tetraklordibenzodioksin

3,4,3,4-TCB – 3,4,3,4-tetraklorobifenil

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)

CBA – klorobenzojska kislina

CO₂ – ogljikov dioksid

DDT – diklorodifeniltrikloroetan

DFA – agar z dodatkom pasje hrane

Delor 103 (Aroclor 1254) – tehnična mešanica PCB (2,2',3,3',4-pentaklorobifenil)

Delor 106 (Aroclor 1260) – tehnična mešanica PCB (2,2',3,3',4,4'-heksaklorobifenil)

FFS – fitofarmaceutvska sredstva

GC – plinska kromatografija

GC-MS – plinska kromatografija in masna spektrometrija

H₂O – voda

H₂O₂ – vodikov peroksid

LiP – lignin peroksidaza

MYA – agar s sladnim in kvasnim ekstraktom

MYPA – agar s sladnim in kvasnim ekstraktom ter peptonom

MnP – mangan peroksidaza

MnSO₄ – mangan (II) sulfat

NO₃ – nitrat

PAH – policiklični aromatski ogljikovodiki

PCB – poliklorirani bifenili

PDA – agar s krompirjevo dekstrozo

PDYA – agar s krompirjevo dekstrozo in kvasniom ekstraktom

POP – obstojno organsko onesnaževalo

PPM – število delcev na milijon

m_M – absolutna molekulska masa

KAZALO VSEBINE

1.	UVOD.....	1
1.1	OPIS PODROČJA IN OPREDELITEV VPRAŠANJA.....	2
1.2	NAMEN, CILJI IN OSNOVNE TRDITVE.....	3
1.3	PREDPOSTAVKE IN OMEJITVE.....	3
1.4	UPORABLJENE RAZISKOVALNE METODE.....	3
2.	GLIVE.....	4
2.1	VLOGA GLIV V NARAVI.....	6
2.2	RAZMNOŽEVANJE GLIV.....	7
2.3	EKOSISTEMSKA FUNKCIJA.....	9
3.	MIKOREMEDIACIJE.....	12
3.1	METODE MIKOREMEDIACIJ.....	13
3.2	POTENCIALNA UPORABNOST GLIV V PRIMERIH SPECIFIČNIH ONESNAŽEVAL.....	15
3.3	GLIVE BELE TROHNOBE.....	20
4.	ONESNAŽEVALA.....	22
4.1	POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB).....	22
4.2	VNOS PCB V ORGANIZME IN OKOLJE.....	23
4.3	RAZGRADNJA PCB Z GLIVAMI.....	24
5.	ANALIZA RAZISKOVALNEGA DELA MIKOREMEDIACIJ Z GLIVAMI.....	26
5.1	ŠTUDIJA PRIMERA.....	26
5.2	VZOREC ALI PREDSTAVITEV IZBRANE ŠTUDIJE PRIMERA.....	26
5.3	METODA ZBIRANJA IN ANALIZE PODATKOV.....	28
5.4	PREDSTAVITEV ANALIZE PRVE ŠTUDIJE PRIMERA MIKOREMEDIACIJE.....	29
5.4.1	OPIS PRIMERA.....	29
5.4.2	GLIVA BELE TROHNOBE IN NJENE ZNAČILNOSTI.....	30
5.4.3	ONESNAŽEVALO IN NJEGOVE ZNAČILNOSTI.....	31
5.4.4	EKSPERIMENTALNO OKOLJE.....	31
5.4.5	SPREMLJANJE PROCESA BIORAZGRADNJE ONESNAŽEVALA PCB.....	31
5.4.6	UČINKOVITOST MIKOREMEDIACIJE PCB.....	32
5.5	PREDSTAVITEV ANALIZE DRUGE ŠTUDIJE PRIMERA MIKOREMEDIACIJE.....	33
5.5.1	OPIS PRIMERA.....	33
5.5.2	GLIVA BELE TROHNOBE IN NJENE ZNAČILNOSTI.....	34
5.5.3	ONESNAŽEVALO IN NJEGOVE ZNAČILNOSTI.....	35
5.5.4	EKSPERIMENTALNO OKOLJE.....	35
5.5.5	SPREMLJANJE PROCESA RAZGRADNJE ONESNAŽEVALA PCB.....	35
5.5.6	DOLOČANJE OSTANKOV PCB ONESNAŽEVALA.....	35
5.5.7	UČINKOVITOST MIKOREMEDIACIJE PCB.....	35
6.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	37
7.	POVZETEK.....	39
8.	VIRI IN LITERATURA.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Rast hif micelija gliv	7
Slika 2: Življenjski krog gobe debla Basidiomycota	8
Slika 3: Sestava rastlinskega tkiva	20
Slika 4: Molekula lignina in aromatične razgradne poti lignina	21
Slika 5: Splošna formula PCB	22
Slika 6: Kroženje PCB	24
Slika 7: Predlagana pot razgradnje PCB pri uporabi ligninolitičnih gliv	25
Slika 8: Rast glive bele trohnobe <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na lesu	30
Slika 9: Rast glive bele trohnobe »Maitake« <i>Grifola frondosa</i> na lesu	34

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Taksonomska razdelitev gliv	5
Preglednica 2: Delež zvrsti PCB v tehničnih mešanicah Aroclor 1248, 1254 in 1260	23
Preglednica 3: Razgradnja mešanic PCB (kongenerjev Delor 103 in Delor 106) z biomaso micelija glive <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , njenim zunajceličnim ekstraktom in encimov MnP in LiP	33
Preglednica 4: Povprečna razgradnja PCB onesnaževala Aroclor 1248 pri kultivaciji glive <i>Grifola frondosa</i> po 60 dneh kultivacije	36

1. UVOD

Onesnaženje lahko definiramo kot prisotnost nezaželene snovi/energije (onesnaževala) v določenem habitatnem tipu (Jogan in sod., 2004). Na tej osnovi lahko problematiko okoljskega onesnaževanja razdelimo na snovno in energijsko onesnaževanje. Snovno onesnaževanje zajema prejemnike:

- zrak,
- tla
- in vodo.

Energijsko onesnaževanje zajema enake prejemnike kot snovno, vendar se v tem primeru pojavlja energija kot onesnaževalo. V okolju pozamo:

- svetlobno,
- zvočno,
- radioaktivno
- in termalno onesnaženje.

O onesnaževanju govorimo takrat, ko količina onesnaževala v določenem habitatu naraste nad dogovorjeno mejo. Vir onesnaževanja je pri tem lahko točkovni ali pa razpršeni. Točkovno onesnaževanje ima en sam določljiv vir, razpršeno pa je iz številnih razpršenih določljivih ali nedoločljivih virov onesnaževanja. Na mestih, kjer je prišlo do onesnaževanja, lahko uporabimo različne procese remediacije, ki pomeni povrnitev ali omilitev stanja, ki je nastalo zaradi onesnaževanja.

V razvitih deželah se je po drugi svetovni vojni pričel hiter razvoj industrije, ki je v svoje procese proizvodnje vključevala produkcijo novih umetnih spojin ali kemikalij, ki so temeljile na uporabi organske sintezne kemije. V naravi in okolju teh sintetičnih snovi prej ni bilo, njihov učinek na človeka in okolje pa je bil ravno zaradi tega nepoznan. Nove sintetizirane spojine in izdelki so bili lahko zelo toksični in strupeni (npr. klorirani ciklični ogljikovodiki, pesticidi, dioksini, klorfenili, poliklorirani bifenili, poliklorirani naftaleni, policikloheksilendimetiltereftalat, težke kovine itd.). Njihov pojav v okolju je začel predstavljati problem za zdravje ljudi in okolje. Snovem, ki v naravi in organizmu naravno niso prisotne, pravimo ksenobiotiki. Z namenom reševanja novih problemov, ki so se zaradi teh snovi pojavili, se začnejo razvijati različne oblike remediacij, med katere se uvršča tudi mikoremediacija (Bhatnagar in sod., 2013).

Mikoremediacija je trajnostno orodje, pri katerem uporabljamo glive (plesni, kvasovke in gobe) za razgradnjo ali izločanje tistih škodljivih snovi ter mikroorganizmov iz okolja, ki so lahko toksični za človeka in druge žive organizme. Glive imajo zaradi svojih encimskih sistemov in metabolizma sposobnost preoblikovanja ali razgradnje različnih toksičnih molekul, ki so pogosto zelo razvejane v preprostejše, manj toksične ali netoksične spojine. Glive uvrščamo med evkariontske mikroorganizme, ki jih delimo na plesni, kvasovke in gobe.

Z mikoremediacijo se lahko prav tako odstranjujejo kovine iz tal. Zaradi hitre rasti in velike absorpcijske ter akumulacijske sposobnosti gliv se kovine v primeru npr. gob med rastjo skladiščijo v miceliju in njihovem nadzemnem delu. Gobe lahko nato v takem primeru po procesu akumulacije odstranimo iz področja onesnaženja. V primerih, da je zemlja onesnažena s kovinami, je potrebno pri mikoremediaciji z uporabo gob predhodno izvesti vnos micelija izbrane gobe v nadzorovanih pogojih v tako onesnaženo področje (Kulshreshtha in sod., 2014).

Vsak biotehnološki proces odstranjevanja onesnaževal iz okolja zahteva najprej ugotovitve povezane z onesnaževanjem. Te so najbolj pogosto vezane na določitev in koncentracijo prisotnega onesnaževala. V nadaljevanju pa je treba narediti pregled in izbor potencialnih organizmov (npr. mikroorganizma, rastline), ki imajo sposobnost mobilizacije ali imobilizacije v procesih razgradnje, adsorpcije, absorpcije ali akumulacije onesnaževala. V primeru trajnostnega orodja mikoremediacij lahko izbira organizma poteka med različnimi kvasovkami, plesnimi ali gobami. Nadaljnji korak pa zahteva postopek namnoževanja izbranega organizma do količin, ki jih lahko nato uporabimo v samem procesu mikoremediacije (Bhatnagar in sod., 2013). Preden pristopimo k samemu procesu mikoremediacije, je potrebno izvesti postopke, ki vključujejo:

- pridobitev mikrobne kulture (seva) – izolacija kulture iz narave (zelo pogosto s področja, kjer je onesnaževalo prisotno) ali nabava iz mikrobne zbirke;
- identifikacijo seva (pomembno je vedeti, katero glivo uporabljamo v primeru, ko mikrobna kultura ne prihaja iz mikrobne zbirke);
- gojenje seva (poznati je treba pogoje namnoževanja glive);
- izboljšanje seva (lahko gre npr. za izboljšanje rasti ali razgradnje/akumulacije onesnaževala z izbrano glivo; za izboljšanje tehnoloških lastnosti lahko uporabljamo različne tehnike tudi gensko inženirstvo);
- ohranjanje seva (glivo je treba znati ohranjati zaradi možnosti njene ponovne uporabe v nadaljnjih procesih mikoremediacije).

Mikoremediacija z gobami zelo pogosto poteka na trdnih gojiščih, lahko pa je vezana na intenzivno proizvodnjo micelijske mase gob v bioreaktorjih, ki se jo nato uporabi za inokulacijo onesnaženih trdnih ali tekočih substratov. Ne glede na uporabljeni pristop, izbira najprimernejšega seva gobe za odstranjevanje onesnaževala, njeno gojenje in ohranjanje vedno predstavlja izziv v postavitvi vsakega procesa mikoremediacije.

1.1 OPIS PODROČJA IN OPREDELITEV VPRAŠANJA

Mikoremediacije so lahko potencialno trajnostno orodje odstranjevanja onesnaževal iz okolja. Vendar je uporaba gliv v remediacijah področje, ki ni povsem raziskano. Potrebna so še vedno številna testiranja in znanstvene ugotovitve, da bi se lahko zagotovila široka uporaba gliv v bioremediacijskih procesih. V tem okviru je nastalo tudi to diplomsko delo, v katerem nas je predvsem zanimala uporaba gliv za odstranjevanje toksičnih snovi iz okolja, saj imajo na osnovi literaturnih podatkov sposobnost razgradnje toksičnih, dolgoverižnih molekul v preprostejše, manj toksične ali celo netoksične spojine.

1.2 NAMEN, CILJI IN OSNOVNE TRDITVE

Osnovni namen diplomskega dela je opredeliti pojem mikoremediacije in na osnovi literaturnih podatkov ugotoviti njihovo potencialno učinkovitost ter določiti njihovo primernost reševanja določnega okoljskega problema, ki je prisoten tudi v slovenskem prostoru, predvsem z uporabo mikoremedianta gobe. V tem okviru so bili analizirani različni pomembni parametri, ki prispevajo k lažjemu izboru ustrezne glive in v tem okviru tudi gobe za mikoremediacijo (npr. pogoji gojenja, ohranjanja seva itd.).

Z nalogo želimo predvsem odgovoriti na dve vprašanji:

- Ali je izbrana gliva učinkovita v procesu odstranjevanja določenih toksičnih onesnaževal ali mikroorganizmov iz okolja?
- Ali so mikoremediacije obetajoč in zanesljiv način bioremediacij okolja?

1.3 PREDPOSTAVKE IN OMEJITVE

Različne raziskave v strokovni literaturi kažejo, da bi z razširjeno uporabo mikoremediacij lahko dosegli več različnih pozitivnih učinkov, vendar pa bi bilo treba paziti tudi na neprimerno uporabo, saj bi potencialno lahko imela negativne posledice na okolje in tudi zdravje ljudi (Kulshreshtha in sod., 2014).

Omejitve pri pripravi diplomskega dela o mikoremediacijah so predstavljale predvsem dve vrsti težav, in sicer:

- a. široka uporaba mikoremediacij in s tem gliv za reševanje okoljskih problemov je še vedno v relativno začetnih fazah raziskav, zato v nekaterih primerih ni možno dati dokončnih odgovorov;
- b. obstoj različnih vrst gliv in njihovih lastnosti, ki niso še povsem dobro raziskane lahko predstavlja omejitveni faktor uporabe mikoremediacij v samem procesu remediacije (Kulshreshtha in sod., 2014).

1.4 UPORABLJENE RAZISKOVALNE METODE

V diplomskem delu so uporabljene deskriptivna (opisna) metoda za korektno uporabo, študijo in interpretacijo obstoječe literature (knjižnice, internet), metoda razčlenjevanja in analiziranja podatkov in grafična metoda prikazovanja podatkov. V okviru empiričnega dela pa so uporabljene metode razčlenjevanja in analiziranja podatkov.

2. GLIVE

Kraljestvo gliv je heterotrofna skupina organizmov, ki ne more neposredno vezati energije in hranil, zato je za svojo rast uporabljajo energijo shranjeno v rastlinski in živalski biomasi. Zaradi medsebojne interakcije z biotskim in abiotskim okoljem ima kraljestvo gliv eno od ključnih vlog v urejanju ekosistemskih procesov in kroženja snovi v okolju (Dighton in sod., 2005).

Glive so prisotne povsod okoli nas. V zraku, vodi, tleh, kot tudi znotraj biomase drugih živih organizmov. DNK analiza talnih vzorcev je pokazala, da znaša ocenjeno število gliv od 3,5 do 5,1 milijonov organizmov (O'Brien in sod., 2005). Vprašanje, ki še vedno ostaja odprto, je, ali so te ocene števila gliv pravilne, saj bodo šele nadaljne natančne raziskave lahko dale odgovor na današnja ugibanja. Dejstvo, ki ostaja, je, da je še vedno veliko število gliv in njihovih lastnosti neraziskanih.

Veliko strokovnih knjig in publikacij opisuje glive, njihovo fiziologijo ter habitate, v katerih jih lahko najdemo. Namen diplomskega dela v tem okviru je podati širši pregled ekosistemov, v katerih se glive nahajajo. V pregledu so poudarjeni predvsem procesi in pomen gliv v teh procesih. V ta namen so pregledane nekatere ključne značilnosti gliv in njihova fiziologija, ki jim omogoča, da sodelujejo v procesih, ki potekajo v posameznih ekosistemih (Dighton in sod., 2005).

Glive lahko glede na način prehranjevanja razdelimo na štiri osnovne vrste.

1. **Mikorize** ali **sožiteljice**, ki tvorijo obojestransko koristne odnose z rastlinami. Večina rastlin ima mikorizne partnerje. Micelij mikoriznih gliv raste onkraj rastlinskih korenin, kar prinaša rastlini gostiteljici oddaljena hranila in vodo, do katerih rastlina sama ne more. Micelij razširja absorpcijski potencial rastline zunaj njenega koreninskega sistema in s tem posredno zagotavlja rastlini večjo vsebnost in raznolikost hranil in drugih pomembnih elementov (npr. Cu, Zn, N, P, C, idr.) v sami rastlini. Rastline z mikoriznimi partnerji so bolj odporne na morebitne škodljivce in bolezni. Na drugi strani pa je korist gliv v tem medsebojnem odnosu v njihovi lažji dostopnosti do hranil, predvsem do sladkorjev, ki jih izločajo rastline (Stamets, 2005).
2. **Saprofiti** ali **gniloživke**, ki so razkrojevalci in se prehranjujejo z odmrli organskimi snovmi in posledično sodelujejo v procesih nastajanja prsti. Saprofitske glive izločajo ekstracelularne encime (npr. peroksidaze, lakaze, ureaze ...) in kisline (npr. citronska, glukonska in itakonska), ki razgrajujejo organske snovi v okolju v preprostejše molekule (Vrabl in sod., 2012). V procesu razgradnje tako nastaja ogljik, dušik, fosfor in minerali, ki postanejo zaradi te funkcije gliv dostopni drugim organizmom v habitatu (Stamets, 2005).
3. **Paraziti** ali **zajedavke**, ki zajedajo druge organizme in izkoriščajo njegove snovi. Pogosto je prisotnost parazitskih gliv značilna za gozdove, kjer nastopajo tudi druga neravnovesja, kot je npr. kisli dež, onesnažena podtalnica ali nastala škoda zaradi insektov. V gozdnem ekosistemu je lahko prisotnost parazitskih gliv naravni način izločanja šibkejših rastlin z uravnavanjem populacijske dinamike in popravilo poškodovanih habitatov. Veliko zajedavk se prehranjuje tudi saprofitsko (Stamets, 2005).
4. **Endofiti** ali **glive sožiteljice**, katere živijo znotraj drugega organizma in so predvsem nemikorizne glive, ki živijo v sožitju z mnogimi rastlinami. Micelij endofitne glive prodre med celične stene rastline, vendar ne prodre v samo rastlinsko celico. S tem gliva povečuje rast rastlin in sposobnost absorpiranja hranilnih snovi. Z obsežno kolonizacijo rastlinskih tkiv

endofiti odganjajo parazite, okužbe, druge glive ter rastlinojede živali. Kolonizacija rastlinskega tkiva z endofiti ustvarja "pregrado", ki preprečuje ali otežuje vstop patogenih organizmov. Endofiti lahko prav tako tudi proizvajajo kemijske spojine, ki zavirajo rast ostalih organizmov (Stamets, 2005). Bistvena razlika med mikoriznimi glivami in endofiti je ta, da se prve nahajajo zunaj na koreninah rastline, medtem ko endofiti prodrejo v sam organizem med njegove celične stene.

Glive je zelo težko taksonomsko razvrstiti, ker imajo širok razpon lastnosti in so tesno prepletene z drugimi oblikami organizmov. V preteklosti so taksonomijo kraljestva gliv že večkrat preuredili, trenutno pa jo razdelimo v 7 glavnih debel.

Preglednica 1: Taksonomska razdelitev gliv

Deblo	Predstavnik	Ključne značilnosti	Približno št. živih vrst
<i>Microsporidia</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Mikrosporidiji so znotrajcelični paraziti živali.	1279
<i>Blastocladiomycota</i>	<i>Allomyces macrogynus</i>	Kopenski in sladkovodni, saprofitni ali paraziti alg, kopenskih rastlin, nevretenčarjev in gliv.	37
<i>Neocallimastigomycota</i>	<i>Anaeromyces elegans</i>	Razgrajujejo celulozo v rastlinojedih živalih.	11
<i>Chytridiomycota</i>	<i>Allomyces</i>	Saprobní ali parazitni, pretežno vodni organizmi.	1526
<i>Glomeromycota</i>	<i>Glomus</i>	Tvorijo mikorizo v povezavi z rastlinami.	307
<i>Basidiomycota</i>	<i>Bolétus edúlis</i> (jurček), <i>Amanitaceae</i> (mušnice)	Spolno razmnoževanje z bazidiosporami se oblikuje na bazidiju; nespolno razmnoževanje je občasno.	111307
<i>Ascomycota</i>	<i>Tuberaceae</i> (tartufi ali gomoljike), <i>Morchella esculenta</i> (mavrah)	Spolno razmnoževanje z askosporami, ki se oblikujejo znotraj askusa; nespolno razmnoževanje je pogosto.	223467

Vir: Povzeto in prirejeno po medmrežje 1 in Mason in sod., 2017

V okviru diplomskega dela je bila dana pozornost predvsem glivam iz debela *Basidiomycota* in *Ascomycota*, ki skupaj tvorita podkraljestvo gliv »*Dikarya*« (Hibbet in sod., 2007) in imajo trenutno v mikoremediaciji eno od najbolj poznanih pomembnih vlog.

2.1 VLOGA GLIV V NARAVI

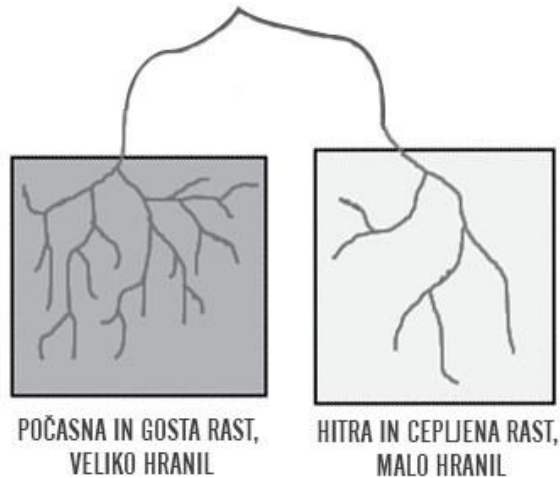
Glive so enocelični ali večcelični organizmi. Pogosto nastanejo z združitvijo spor ter tvorijo strukturo hif, katere imajo povprečen premer 5–6 μm in s prostim očesom niso vidne. Hife, ki imajo rigidno celično steno, običajno sestavljajo posamezne celice, ki jih med seboj ločujejo septe (perforirane celične membrane, skozi katere se vzdržuje in ohranja povezava s sosednjimi celicami in njihovo citoplazmo). V primeru, da raste veliko število hif skupaj v neposredni bližini, se začne tvoriti skupek hif, ki ga imenujemo micelij (Moore in sod., 2002). Z izjemo enoceličnih gliv, ostale glive tvorijo hife.

Hife imajo torej ozek premer in lahko tvorijo veliko dolžino, kar jim zagotavlja veliko površino. Ta lastnost jim omogoča optimalno absorpcijo hranil ter mineralnih snovi iz širšega okolja. Hife lahko rastejo samostojno ali pa se povezujejo v večje strukturirane združbe imenovane rizomorfi, katerih zgradba je podobna rastlinskim koreninam. Te linearne strukture so večje in bolj robustne od individualnih hif in omogočajo boljši prenos vode in hranil (Lindahl in sod., 2004).

Zaradi obširne razporeditve hif po celotnem habitatu obstaja večja možnost za prenos hranil iz območij z visoko razpoložljivostjo virov na področja z nizko razpoložljivostjo. Pretok hranil med takšnimi habitati je poznan kot translokacija (Lamour in sod., 2007). Ta lastnost micelija gliv omogoča prenos hranil na kratke (več milimetrov), kot tudi na dolge (več metrov) razdalje. Micelij tako časovno kot prostorsko povezuje ekosistem in s svojim delovanjem zmanjšuje heterogenost razporeditve hranil, ki so na razpolago.

Časovna komponenta te aktivnosti je prav tako pomembna kot prostorska. Pri rasti micelija se hranila prenašajo in imobilizirajo v biomasi hif. Medtem ko je micelij živ in aktiven, so ta hranila vezana v sami strukturi ali v citoplazmi. Ob odmiranju delov micelija pa se material lahko translocira na žive dele glive oziroma sprošča v okolje preko procesa razgradnje ali mineralizacije. Čas zadrževanja neke snovi, preden se vključi v biomaso določenega organizma, imenujemo faza imobilizacije. V tem času hranilo ali druga imobilizirana snov drugim organizmom ni na razpolago. Čas trajanja imobilizacije je odvisen od organizma. V primerjavi z bakterijami, katerih imobilizacija traja nekaj ur ali dni, je imobilizacijska faza nekaterih višjih gliv merljiva v tednih oz. tudi letih. Iz tega razloga so glive lahko pomembni dolgoročni zadrževalci tako hranil kot drugih snovi, ki so lahko v okolju tudi toksične. Tovrstno zadrževanje vpliva na časovno razpoložljivost teh snovi v okolju za druge organizme (Dighton in sod., 2005).

Smer in stopnja rasti ter razvejanost hif je nadzorovana apikalno. Lokacija hranil je zaznana s strani receptorjev na strukturah hif, ki so aktivirani kot posledica določene koncentracije zunanjih hranil (Rutherford J., 2005). Stopnja in smer prepletanja hif je nadzorovana z mehanizmi, ki omogočajo povratne informacije. Posledično se hife lahko širijo glede na kakovost virov hranil potrebnih za rast in presnovno aktivnostjo hif (Rayner in sod., 1984). Hitra rast hif se pojavi, ko je na razpolago manjša količina hranil. Na ta način gliva poveča površino hif in sproščanje encimov ter s tem poveča tudi absorpcijsko sposobnost za hranila v okolju. Počasna in gosta rast gliv se pojavi v primerih, kadar je na voljo veliko hranil (slika1).



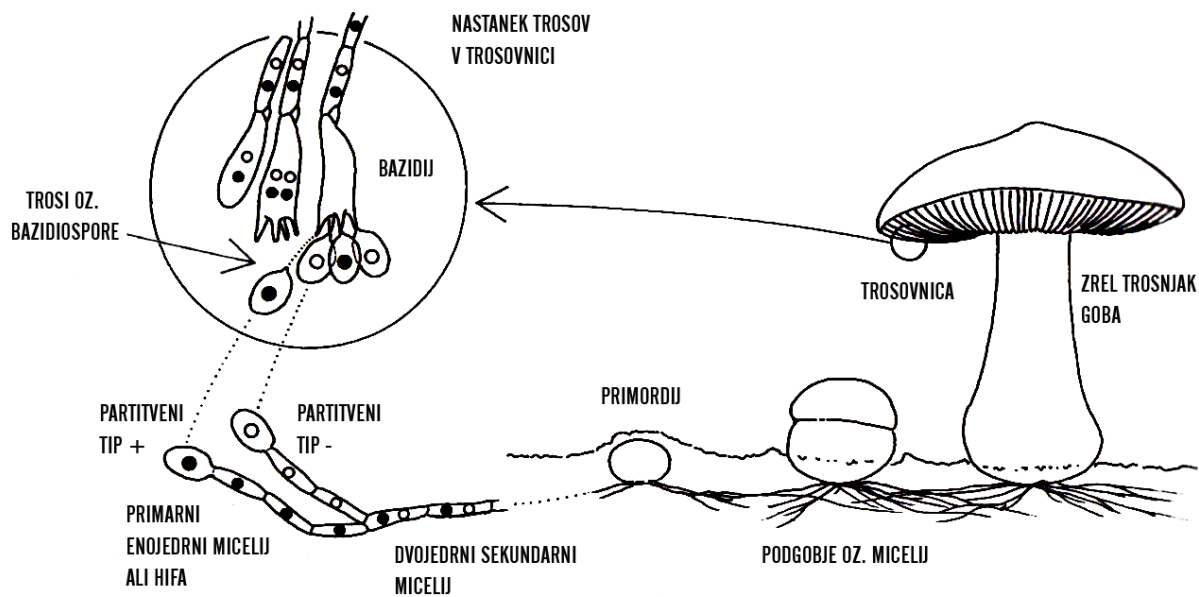
Slika 1: Rast hif micelija gliv

Vir: Lasten

2.2 RAZMNOŽEVANJE GLIV

Razmnoževanje gliv je lahko zelo raznoliko in kompleksno. Poteka na spolni ali nespolni način, lahko pa kot oboje. Novi genetski potomci posledično nastanejo iz razpršenih spor. Višje glive debla *Basidiomycota* (prostotrosnic) in *Ascomycota* (zaprtotrosnic) imajo biomaso potomčevega telesa veliko in očem vidno. Ker proizvodnja spor zahteva energijo in dodatne hranilne snovi, služijo novonastali plodovi kot veliko korito prenesenih nutrientov iz okolja. Zatorej so glive s poudarkom na gobah idealen vir hrane tudi za živali, ki so v zameno pomemben vektor prenosa in ponovnega raztrosa spor v okolje (Piattoni in sod., 2014).

V nadaljevanju je prikazan primer razmnoževanja višjih gliv debla *Basidiomycota*, v katerega uvščamo prave gobe (slika 2).



Slika 2: Življenjski krog gobe debla Basidiomycota

Vir: Prirejeno po Arzenšek B. in sod., 2015

Ob primernih fizioloških, vremenskih ter hranilnih pogojih iz podgobja (micelija) vzkljujejo gobe. V trosovnici se v zrelem trosnjaku na bazidiju začnejo tvoriti trosi oz. bazidiospore. Gobe tvorijo spore v času pomanjkanja hranil ali zaradi omejitvenih dejavnikov okolja in prostora. V bazidiju v procesu mejoze nastanejo štiri bazidiospore. Vsaka bazidiospora ima eno jedro. Praviloma sta dve spori paritvenega tipa minus (-) in dve spori paritvenega tipa plus (+). V primeru raztrosa spor se ob stiku s tlemi razvijejo bazidiospore v enojedrni micelij (skupek hif). Spore se nato apikalno združujejo v enojedrni micelij paritvenega tipa minus (-) ali paritvenega tipa plus (+).

Vsak micelij ima v svojih hifah eno jedro istega paritvenega tipa, kot je bil tros (spora). Primarni micelij se razrašča po habitatu, dokler ne trči ob primarni micelij nasprotnega paritvenega tipa. Vsak paritveni tip bazidiospore vsebuje le polovico genetske informacije svojih staršev, zato se mora za genetsko celoto združiti z nasprotnim paritvenim tipom, ki vsebuje drugo polovico genetske informacije. V procesu plazmogamije se oba primarna enojedrna micelija združita v sekundarni micelij. Ne pride do zlitja jeder, temveč nastane dvojedrna celica (*dikarion*), iz katerega v ugodnih razmerah požene zasnova nove gobe. Micelij se v iskanju vode in hranil širi v vse smeri in s tem tvori gosto, mreži podobno strukturo. Sprožilni dejavnik nastanka gob je pomanjkanje hranilnih virov ali pa sprememba okoljskih pogojev (pH, temperatura, vlažnost, kisik). Micelij se začne kopičiti in nastane primordij – majhen vlaknat izrastek. Biomasa primordija se v ugodnih razmerah eksponentno poveča v le nekaj dneh in nastane prava goba. Zrela goba nato v trosnjaku začne proizvajati spore, katere z visoko silo izvrže v okolico. V enem dnevu lahko zrela goba izvrže milijone spor in s tem ohranja nadaljevanje življenjskega cikla (Stamets, 2005).

2.3 EKOSISTEMSKA FUNKCIJA

Planet Zemlja je s kemijskega vidika relativno zaprt sistem. V smislu energije je odprt sistem, ki od sonca dobiva energijo v obliki različnih valovnih dolžin. Način medsebojne interakcije organizmov je zapleten, saj so soudeleženi pri biogeokemičnem kroženju snovi in zajemanju ter porabljanju energije. Za pridobivanje bistvenih elementov potrebnih za življenje so vsi organizmi, vključno s človekom, odvisni od posebnih sposobnosti drugih organizmov; evkariontov (rastlin, alg, gliv, živali ter protistov) in prokariontov. Interakcije med vrstami določajo, kako se kemične snovi in energija giblje skozi ekosisteme in kako so same skupnosti strukturirane (Mason in sod., 2017).

Ekosistem vključuje vse organizme, ki živijo na določenem mestu, skupaj z abiotskim (neživim) okoljem. Obstajajo številni ekosistemi z značilno prevladujočo vegetacijo (npr. listnati gozd, iglasti gozd, travniki, tundra). Vsak ekosistem sestavljajo skupnosti organizmov, ki sobivajo in vplivajo en na drugega in na okolje. Natančne podrobnosti o sestavi organizmov v ekosistemu so odvisne od geografske lege, klime in stopnje razvoja te skupnosti. Sestava ekosistemskih skupnosti se spreminja v času in prostoru.

Atomi in iz njih sestavljene molekule so gradniki vseh organskih ter anorganskih snovi. Planet Zemlja je sestavljen iz atomov, ki se v procesu biogeokemičnega kroženja snovi neprestano vključujejo v enostavne in kompleksne kemijske reakcije in premikajo skozi različne ekosisteme. Izraz poudarja, da se kemijski elementi ne vključujejo samo v biološke organizme in procese, temveč tudi v geološke (abiotske) procese. Svojo celovitost ohranjajo med nastajanjem nove ter razpadanjem stare snovi. Vsak organizem na zemlji je sestavljen iz atomov, ki so se lahko predhodno nahajali v tleh, zraku, drugih organizmih ali tudi v delih neživega okolja. Ob zaključku življenjskega cikla organizma se njegovi atomi sprostijo v okolje. V procesu kroženja snovi jih lahko uporabijo drugi organizmi, ki se nahajajo v tem okolju ali pa postanejo del abiotskega okolja. Biogeokemična kroženja vključujejo procese, ki se pojavljajo na številnih prostorskih ravneh; od celične ravni do planetarne. Časovni razpon biogeokemičnega procesa je v primeru različnih biokemičnih reakcij lahko zelo kratek ali pa daljši, kot npr. pri razpadanju kamnin (Mason in sod., 2017).

V ekosistemih je tok energije nadzorovan z interakcijami in s povratnimi mehanizmi med sestavnimi organizmi ekosistema za namen ohranjanja stabilnosti le-tega. V ekosistemu ti organizmi zasedajo nišo, ki je definirana kot položaj organizma v svoji skupnosti, kot posledica strukturnih prilagoditev organizma, fizioloških odzivov in specifičnega vedenja. Za opravljanje svojih funkcij v ekosistemu organizmi zatorej delujejo v okviru okoljskih omejitev, interakcij z drugimi organizmi in svojih fizioloških lastnosti (Dighton in sod., 1986). V tem kontekstu glive niso nobena izjema. Njihova raznolikost jim zagotavlja ustrezne sposobnosti za življenje v različnih ekosistemskih nišah. Glive so modularni organizmi in sposobni spremeniti širino svoje obstoječe ekosistemske niše glede na spreminjanje sestave ter koncentracije snovi in obstoječega okolja ekosistemske niše (Swift in sod., 1979).

Glive so razširjene v vodnem in kopenskem okolju in se pojavljajo v prostoživečih ter simbiotskih oblikah. Kopensko okolje je tisti del biosfere, ki je najtesneje povezano z dejavnostmi gliv. Bistven pomen imajo pri razkroju biomase organizmov, kot rastlinski patogeni ter kot simbioti. Kljub pomembni vlogi v biosferi je ob primerjavi z bakterijami, preučevanje gliv v širšem okolju pogosto zanemarjeno. Iz okolja poznamo primere, ko so simbiotične (ali simbiotske) mikorizne glive

povezane z večino rastlinskih vrst, pri katerih so odgovorne za transformacijo, absorbcijo in distribucijo anorganskih in organskih snovi. Glive imajo v okolju pomembno vlogo tudi pri razgradnji in utekočinjanju materiala rastlinskega izvora in drugih organskih materialov vključno s ksenobiotiki (Gadd in sod., 2007).

Ena od težav, ki se nanaša na vlogo gliv v ekosistemskih procesih, je velika razlika v prostorskem merilu delovanja ekosistemov (cm do km) in delovanju hif gliv (μm do m). Ekosistemi so opredeljeni po klimatskih območjih in vegetacijskih skupnostih, ki delujejo na lestvici od 10 km² do 1000 km². Hifa glive pa je velikostnega reda premera 5–10 μm in je zaradi tega njihov takojšnji učinek na okolje omejen samo na nekaj mikrometrov na vsaki strani hife (Oberle-Kilic in sod., 2013). Fiziološke lastnosti glivam omogočajo izkoriščanje velike količine njihovega okolja. Zaradi tesnih povezav z rastlinami in živalmi so učinki gliv vidni na prostorsko velikem področju.

Specifični ekosistemski dejavniki, na katere imajo glive velik vpliv, so formacija tal, zagotavljanje rodovitnosti za primarno produkcijo, primarna produkcija, sekundarna produkcija, sprememba strukture okolja in snovi v biogeokemičnih procesih ter v skladiščenju in shranjevanju ogljika ter drugih kemijskih elementov in spojin.

Primarna produkcija je aktivnost avtotrofov v ekosistemu, ki so tesno povezani z mikoriznimi glivami ali pa saprofiti, kateri zagotavljajo rodovitnost tal. Avtotrofi so večinoma vaskularne rastline, mahovi, alge in bakterije. Postopek nastajanja avtotrofne biomase je odvisen od razpoložljivosti svetlobe in ogljikovega dioksida v atmosferi za proces fotosinteze. Ali pa razpoložljivosti donorjev elektronov specifičnih kemijskih vezi v primeru kemoavtotrofov.

Rast rastlin iz tal zahteva razpoložljive vire mineralnih hranil predvsem dušika, fosforja in kalija. Zagotavljanje teh hranil lahko prihaja delno iz mineralov kamninske podlage, ki so v toku časa erodirali in se vključili v profil tal ter delno iz recikliranih rastlinskih in živalskih ostankov. Kot lišaji so glive sestavni del talne biološke skorje in kot ektomikorizi so vključeni v razgradnjo kamninske podlage v procesu zagotavljanja mineralne komponente tal (Finlay in sod., 2009). Druga hranila se reciklirajo v ekosistemu z razgradnjo mrtvih živalskih in rastlinskih ostankov ter s tem postanejo na voljo rastlinskim koreninam. To razgradnjo izvajajo saprofitne glive v povezavi z bakterijami in talno fauno. Hranila v mrtvi biomasi napadejo eksoencimi bakterij in gliv. Zaradi neučinkovitega zajetja končnih proizvodov encimskega delovanja je določen del hranil na voljo drugim organizmom (Kubicek in sod., 2007).

Približno 90 % vseh vrst rastlin ureja sprejem hranil za svoje aktivnosti s pomočjo simbioze med mikoriznimi glivami in svojimi koreninskimi sistemi. Poleg zagotavljanja hranil lahko mikorizne glive zaščitijo rastline tudi pred drugimi mikroorganizmi in patogeni (Sikes in sod., 2009).

Vsi organizmi, ki sestavljajo biotsko komponento ekosistemov, sobivajo v skupnostih. Interakcije med člani skupnosti lahko vključujejo tekmovanje za razpoložljive vire (hrana, svetloba, prostor) in konkurenco med njimi. V kontekstu urejanja populacij rastlin in živali imajo glive pomembno vlogo bodisi kot hrana (spodbujajo rast in zdravje organizmov) bodisi kot patogeni (zmanjšujejo rast in zdravje organizmov).

Glive so vzdržljivi organizmi, ki se pogosto pojavljajo v času pomanjkanja hrane rastlinskega izvora in igrajo pomembno vlogo v prehranjevalni verigi. Ta vir hrane je pomemben za rast populacij favne. Dostop do gliv kot vira hrane lahko vpliva na konkurenčno sposobnost določenih vrst organizmov in s tem na razvoj flore in favne v ekosistemu (Dighton in sod., 2005).

Interakcijo gliv z rastlinami pa lahko obravnavamo tudi v smislu patogenega odnosa, ki je za rast rastlin škodljiv. Glivični patogeni v živalih lahko prav tako povzročajo upad populacij ali zdravja teh živali. Interakcije gliv z rastlinami in živalmi so lahko zelo zapletene, saj so glive obenem lahko tako patogeni, kot tudi simbionti (Dighton in sod., 2005).

V večini ekosistemov po vsem svetu je vedno bolj viden intenzivni vpliv ljudi na okolje. Človekove dejavnosti so s toksičnimi spojinami povzročile škodljive vplive na skupnost gliv in njihove fiziološke ter biokemijske procese. Vendar pa glive pogosto kažejo odpornost na kemijske spojine, ki jih sprošča človek v okolje in sposobnost zadrževanja teh spojin v oblikah, ki negativno ne vplivajo na glivo. Tako lahko govorimo o povsem novi vlogi gliv v okolju, kot o bioremediantu okoljskih problemov, ki jih je povzročil človek (Shen in sod., 2013). Glive imajo funkcijo akumulacije anorganskih kovin in razgrajevanja organskih onesnaževal, s čimer izboljšujejo stanje okolja v onesnaženih območjih. Glive lahko zaradi svoje fiziologije hitreje razvijajo odpornost na motnje v okolju kot drugi višji organizmi (Fomina in sod., 2008).

3. MIKOREMEDIACIJE

Bioremediacije štejejo za eno od varnejših, čistejših, stroškovno učinkovitejših in okolju prijaznejših orodij za dekontaminacijo onesnaženih območij. Številne industrijske in antropogene dejavnosti so povzročile povečano število onesnaženih območij zaradi nepoznavanja učinkov teh dejavnosti na okolje. Pri postopku bioremediacije za dekontaminacijo uporabljamo različne organizme, kot so bakterije, kvasovke, glive, alge in rastline. Prizadevanja za učinkovitejšo rabo in poznavanje tehnologije bioremediacij zahteva neprestano iskanje novih bioremediantov in njihovih funkcij. Te funkcije so v številnih mikroorganizmih še nepoznane, zato štejejo bioremediacije za tehnologijo v razvoju (Bhatnagar in sod., 2013).

Izraz mikoremediacija je sestavljena iz dveh delov:

- "miko" izhaja iz grške besede »mykes« in pomeni gliva;
- beseda "remediacija" se nanaša na reševanje problema.

Mikoremediacija je uporaba gliv kot trajnostnega orodja za reševanje, zmanjševanje ali preprečevanje okoljskih problemov, kot so onesnažena tla ali podtalnica. Encimi gliv imajo sposobnost razgradnje onesnaževal, ki se nahajajo v okolju. V ta namen se uporabljajo biotehnološki postopki za odstranjevanje škodljivih snovi iz okolja predvsem z namenom obnove naravnega okolja ali preprečevanja nadaljnjega onesnaženja. Zgodovina obvladovanja procesov mikoremediacij sega le nekaj desetletij nazaj.

Glive imajo dobro razvite konstitutivne in inducibilne encimske sisteme, ki jim omogočajo širok spekter rasti na različnih naravnih in sintetičnih podlagah. Glive lahko proizvajajo in v svoje okolje izločajo visoke koncentracije različnih zunajceličnih encimov. Sproščeni encimi izven celice razgrajujejo različne substrate z dolgimi molekulskimi verigami v manjše molekule, katere nato s celičnim transportom prehajajo v celico, kar omogoča rast gliv. Evolucijsko opazna značilnost morfologije gliv so razvejane hife, ki jim omogočajo širši dostop do še neizkoriščenih hranilnih in energetskih virov v okolju. V hifah potekajo procesi, ki omogočajo skladiščenje hranilnih snovi in energijo, ki je potrebna za nadaljnjo apikalno rast hif.

Poleg specifične rasti gliv v obliki hif, omogoča raznolikost proizvedenih in izločenih encimov bolj učinkovito rabo virov hranil in energije na substratih, kjer se pogosto pojavljajo različne molekule, ki zavirajo rast in absorbcijo hranil v celice. Nadaljnja prednost uporabe gliv v procesih mikoremediacij je tudi ta, da je veliko število encimov, ki so inducibilni ob pogojih primanjkovalja hranil (Mansur in sod., 2003).

Stopnja rasti gliv je razmeroma dovolj hitra za uporabo v procesih bioremediacije. Zaradi sposobnosti razgradnje onesnaženih substratov in učinkovite rasti ob pomanjkljivih virih hranil so glive lahko primerno trajnostno orodje za bioremediacijo okolja. Glive so sposobne preživeti, rasti in se razmnoževati v toksičnih pogojih (Gan in sod., 2003).

Večina gliv (poudarek na prave gobe) ima kratek življenjski cikel in visoko stopnjo sporulacije. Sporulacija je proces tvorbe spor in njihove sprostitve v okolje. Proces se običajno stimulira zaradi pomanjkanja hranil v okolju. Zaradi visoke stopnje sporulacije se populacija lahko poveča v precej kratkem času. Razgradnja substratov z uporabo gliv je lahko hitrejša kot razgradnja z uporabo

bakterij. Ugotovitev je utemeljena na apikalni sposobnosti rasti hif gliv v dolžino. V primerjavi z bakterijami imajo glive dostop do hranil iz oddaljenih območij. Poleg tega glive v tleh za premeščanje ne potrebujejo kapilarne vode, ki je v primeru bakterij najpogostejši transport za premeščanje enoceličnih bakterij. Brez razmnoževanja je doseg bakterij na tak način lahko zelo omejen (Gadd, 2010).

Vse predhodno naštet lastnosti nas spodbujajo k obravnavi gliv kot zelo primernega trajnostnega orodja za uporabo v procesu bioremediacije. Uspešnost mikoremediacije je odvisna tudi od okoljskih parametrov, kot so temperatura, vlažnost in stanje tal. Razpoložljivost vode, pH vrednost tal, prehransko stanje in raven kisika so pomembni parametri, ki se v prostoru in času razlikujejo. Vrednosti predhodno omenjenih parametrov v okolju niso vedno optimalne za rast gliv in zunajcelično produkcijo encimov in s tem tudi ne za preoblikovanje prisotnih onesnaževal (Gadd, 2001). Zato je razgradnja onesnaževal pogosto dvofazni proces, ki se odraža v hitri stopnji razgradljivosti v prvi fazi, kateri sledi počasni in daljši razpad v drugi fazi. Ostanki procesa razgradnje so pogosto zelo odporni na nadaljnjo razgradnjo (Alexander, 1999).

V vrsti različnih okoljskih parametrov je razpoložljivost vode v tleh zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na uspešnost bioremediacije. Voda vpliva na razpoložljivost kisika in s tem rast gliv in produkcijo encimov. Poleg tega, da razpoložljivost vode vpliva na vse mikroorganizme, vpliva tudi na medsebojno povezovanje onesnaževal in njihovo porazdelitev v tleh. Obnašanje organskih spojin v vodnem okolju ima zelo pomembno vlogo v njihovi dostopnosti za organizme (Atagana in sod., 2003). Drugi dejavniki, ki vplivajo na učinek biorazgradnje, vključujejo kemijske lastnosti in koncentracijo onesnaževala, vrsto podlage, količino organskih snovi in mikrobnost strukturo ter njihovo aktivnost.

3.1 METODE MIKOREMEDIACIJ

Glive z izločanjem različnih ekstracelularnih encimov uporabljajo različne načine dekontaminacije onesnaženih območij in stimulacije njihovega okolja od biorazgradnje, biosorpcije, biokonverzije.

Biorazgradnja

Biorazgradnja je razgradnja kompleksnih molekul z organizmi ali njihovimi deli do enostavnejših molekul ali mineralnih sestavin. V primeru gliv lahko razgradnja poteka v celoti tako, da mineralizirajo vhodne molekule v preprostejše spojine, kot so CO₂, H₂O, NO₃ in druge enostavne anorganske spojine. Veliko raziskav je že bilo opravljenih na področju gliv na temo njihove sposobnosti biorazgradnje (Bhatnagar in sod., 2013). Glive lahko proizvajajo zunajcelične encime, kot so: peroksidaze, ligninaze, celulaze, pektinaze, ksilanaze in oksidaze. Nastanek teh zunajceličnih encimov je induciran ob prisotnosti primerne substrata v okolju. Lahko razgrajujejo težko razgradljiva onesnaževala, kot so policiklični aromatski ogljikovodiki, organska in sintetična barvila ter polimere, kot je npr. plastika. Mehanizem biorazgradnje je zelo zapleten. Razlog za to je vpliv drugih biokemijskih reakcij ter medsebojna interakcija encimov in hidroksilnih skupin ter raven H₂O₂ (Kulshreshtha in sod., 2014).

Biosorpcija

Drugi pomemben proces odstranjevanja onesneževal iz okolja z uporabo trajnostnega orodja mikoremediacij je biosorpcija. Biosorpcija je proces akumuliranja snovi v ali na površino biomase gliv. Običajno se te snovi (onesnaževala) pojavljajo v obliki kovinskih ionov. Gobe med glivami najbolj pogosto kažejo izrazito odpornost do visokih koncentracij kovinskih ionov in drugih škodljivih snovi. Biosorpcija onesnaževal/ksenobiotikov z biomaso gob vključuje kombinacijo dveh postopkov:

- a) bioakumulacijo – aktivni proces presnove onesnaževala vključuje njegov prenos v celico in kopičenje teh snovi v znotrajceličnih strukturah (npr. vakuole, proteini itd.);
- b) biosorpcijo – pasivni proces vezave onesnaževala na površino biomase.

Številni kemijski procesi so lahko vključeni v biosorpcijo, vključno z adsorpcijo, s kovalentno vezavo in procesi ionske izmenjave. Polarne skupine proteinov, aminokislin, lipidov in strukturnih polisaharidov (hitin, hitozan, glukan) so lahko vključeni v proces biosorpcije. Raziskave kažejo, da ima v določenih primerih neživa biomasa večjo biosorpcijsko sposobnost kot biomasa z živimi celicami. Odmrta biomasa gob ima v teh procesih določene prednosti pred uporabo živih celic, saj ni odvisna od pogojev rasti, energije metabolizma in translokacije hranil. Kaže se močna afiniteta do kovinskih ionov zaradi pomanjkanja protonov, ki nastajajo med procesom metabolizma v živi celici. Zaradi tega toksičnost kovinskih ionov potencialno nima negativnega vpliva na neživo biomaso (Gadd, 2001). V namene biosorpcije težkih kovin se neživa biomasa gob pridobiva lahko kot odpadke iz drugih gospodarskih panog. Za razliko od žive, odmrla biomasa gob ni občutljiva na visoke koncentracije strupenih snovi in učinke toksičnosti ali na neugodne življenjske pogoje (pH, temperatura, oskrba s hranili, koncentracija celic itd.). V nasprotnem primeru je absorpcija onesnaževal v žive celice gob odvisna od njene vrste in časa izpostavljenosti. Biosorpcija je učinkovita metoda remediacije zaradi visoke zmogljivosti absorpcije in stroškovno dostopnih vhodnih surovin za potrebe metabolizma gliv (Kulshreshtha in sod., 2014).

Biokonverzija

Trenutno je veliko raziskav usmerjenih predvsem v potencial pretvorbe odpadkov kmetijsko-predelovalne industrije v neko drugo uporabno obliko (Kulshreshtha in sod., 2014). V našem primeru je proizvod uporabe takšne biokonverzije – goba. V principu je vsak lignocelulozni odpadke, ki nastaja v industriji potencialno uporaben kot substrat za gojenje gob. V procesu gojenja gob je običajno izbira substrata določena z regionalno razpoložljivostjo takega substrata. Primeri gojenja gob so bili v praksi uspešno izvedeni na različnih industrijskih odpadkih. Biokonverzija industrijskih odpadkov z gobami istočasno zagotavlja proizvodnjo gob (tudi v prehranske namene) in pomaga pri reševanju problema onesnaženja (Kulshreshtha in sod., 2014).

3.2 POTENCIALNA UPORABNOST GLIV V PRIMERIH SPECIFIČNIH ONESNAŽEVAL

Emisije policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) industrije nafte

Veliko rodov gliv je bilo določenih za namen uporabe v mikoremediaciji poliaromatičnih ogljikovodikov nafte. Rodovi, ki so bi vključeni v različne študije, so: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Graphium*, *Hansenula*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sphaeropsidales*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichoderma*, *Trichosporo* (Stamets, 2005). Podobne sposobnosti presnove nafte so našli tudi pri številnih vrstah kvasovk, ki pripadajo rodovom *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces in Sporobolomyces*. Filamentozne glive – plesni so zastopane s številnimi vrstami, ki vključujejo predvsem plesni *Aspergillus terreus*, *Blastomyces*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Pleurofragmium* in *Trichoderma harzianum* (Obire, 1988).

V seriji poskusov, ki so potekali od laboratorija do uporabe v realnem okolju, so Haught in sod. (1995) dokazali obstoj potenciala za biološko razgradnjo PAH z glivami *Phanerochaete chrysosporium* in *Phanerochaete sordida*. V istih poskusih glive bele trohnobe niso kazale veliko učinkovitost v razgradnji višjih razvejanih PAH, v primerih, ko je bilo v molekuli PAH prisotnih nad pet aromatskih obročev.

Poskuse, ki so jih izvedli May in sod., (1997) v pilotnem biorektorskem sistemu s PAH, so opravili tako, da so uporabili dve ločeni biorektorski posodi. V prvo biorektorsko posodo so vnesli zemljino onesnaženo s PAH. V drugo biorektorsko posodo pa so dali tekoči hranilni medij, ki je bil prezračevan in inokuliran z glivo *Phanerochaete chrysosporium*. Obe biorektorski posodi so povezali tako, da se je lahko med prvo in drugo biorektorsko posodo pretakal hranilni medij z dodanim polisorbitom 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) (0,1 % v / v), ki je omogočal uspešno odstranjevanje PAH iz zemljine v prvem bioreaktorju ter njegovo razgradnjo z glivo v drugem. Na osnovi opisane raziskave so ugotovili, da je gliva sposobna zmanjšati celokupno koncentracijo PAH v tleh za 45 %.

Raziskava Lamarja in sod., (1999) je pokazala, da je užiten bukov ostrigar *Pleurotus ostreatus* v 35 dneh sposoben 80 % razgradnje celotnih PAH v tleh. V poskusu so primerjali učinkovitost razgradnje PAH in merili produkcijo lignolitičnih encimov treh različnih gliv: *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* in *Trametes versicolor*. Izkazalo se je, da je *Pleurotus ostreatus* v primerjavi z ostalima glivama boljša tako v kolonizaciji sterilne podlage kot tudi pri razgradnji antracena, fenantrena in pirena (različni poliaromatski ogljikovodiki). Ugotavljali so tudi, da gobi *Pleurotus ostreatus* in *Trametes versicolor* proizvajata podobno koncentracijo encimov mangan peroksidaze in lakaze v tleh. Na drugi strani goba *Phanerochaete chrysosporium* proizvaja le malo teh encimov.

Emisije fitofarmaceutskih sredstev kmetijstva

Letna uporaba različnih fungicidov, herbicidov in insekticidov ima negativen vpliv na gibanje koncentracije dušika, fosforja in kalija v različnih plasteh tal (Ivanov, 1974). Tovrstna uporaba

različnih kemijskih spojin v kmetijstvu ima vpliv na mikroorganizme, ki sodelujejo pri transformaciji ogljika in dušika. Že nižje koncentracije fitofarmaceutskih zaščitnih sredstev (FFS), kot so simazin, atrazin in zeazin zavirajo aktivnost encima ureaze in drugih encimov ter spodbujajo kopičenje fitotoksičnih bakterij in gliv v tleh (Grodnitskaya in sod., 2006). Poznano je, da gliva *Trichoderma viride* razgrajuje insekticide fenitrotion, fenitrookson in malation (Baarschers in sod., 1986). Na drugi strani je bilo v raziskavah razgradnje klorpirifosa v primerjavi uporabljenih gliv *Aspergillus niger* in *Trichoderma viride* ugotovljeno, da je *Trichoderma viride* v procesu razgradnje omenjenih FFS bolj aktivna, saj je bilo v 14 dneh razgrajenega 95,7 % klorpirifosa v primerjavi z 72,3 % z *Aspergillus niger*.

Tudi pri glivi *Trichoderma harzianum* je bila ugotovljena učinkovita razgradnja spojin, kot so diklorodifeniltrikloroetan (DDT), dieldrin, endosulfan, pentakloronitrobenzen in pentaklorofenol. V izbranih kemijskih spojinah gliva ni imela pozitivnega učinka razgradnje samo v primeru kemijske spojine heksaklor-cikloheksana. Ugotovljeno je bilo tudi, da gliva razgrajuje endosulfan v različnih fazah rasti in pogojih prisotnosti hranil (Katayama in sod., 1993). Askar in sod. (2007) izpostavljajo tudi možnost biorazgradljivosti z glivama *Trichoderma harzianum* in *Trichoderma viride* v primeru herbicida bromoksnil. Sposobnost preživetja in rast vrst *Trichoderma* na agarnem mediju zelo obetavno nakazuje možnost mikoremediacije agro-ekosistemov. Obe predhodno omenjeni glivi imata poleg mikoremediacijskega potenciala tudi lastnosti fungicida. Uporabljata se za zatiranje različnih bolezni, ki jih povzročajo patogeni gliv. Možnost izkoriščanja teh potencialov gliv nakazuje na možnost opuščanja raznoraznih agrokemičnih ksenobiotikov, ki bi sicer lahko negativno vplivali na prihodnje kmetijske pridelke in ekosistem (Pakdaman in sod., 2002).

Uporaba vrste gliv *Trichoderma* tako ne bi samo očistila kmetijski ekosistem onesnaženosti s fitofarmaceutskimi sredstvi (FFS), ampak bi njihova uporaba v prihodnosti lahko vodila tudi do povečanega donosa pridelkov, zaradi biološkega nadzora prisotnosti rastlinskih patogenov in indukcije rastlinskega obrambnega mehanizma s pomočjo prisotnosti omenjene glive (Pakdaman in sod., 2006). Gliva *Trichoderma* se lahko uporablja tudi v bioremediaciji tal onesnaženih s toksičnimi metaboliti mikroorganizmov (Grodnitskaya in sod., 2006).

Glive iz vrst *Trichoderma* uvrščamo med dobro znano kontrolno biološko sredstvo, ki se lahko uporablja namesto kmetijskih zaščitnih sredstev, kot so fungicidi, nematicidi, akaricidi, insekticidi, herbicidi, rodenticidi ipd. Medtem ko gliva *Trichoderma* opravlja svojo funkcijo mikoremedianta, lahko obenem živi v sožitju z glivami *Piriformospora indica* in *Sebacina vermifera*, ki spodbujata rast rastlin. To kaže na možnost souporabe vseh treh gliv naenkrat in s tem izboljšavo posameznih učinkov (Ghahfarokhy in sod., 2011). Raziskave nakazujejo, da ima gliva *Lentinus edodes* 61 % zmogljivost odstranitve pesticida pentaklorofenola iz tal. Rezultati raziskav dodatno nakazujejo, da ostane gliva *Lentinus edodes* aktivna tudi pri nižjih temperaturah, s katerimi se srečujemo v srednji in severni Evropi (Pletsch in sod., 1999).

Ugotovljeno je bilo tudi, da je *Pleurotus ostreatus* ustrezen kandidat za remediacijo tal onesnaženih z odpornimi onesnaževali, kot so npr. poliklorirani ogljikovodiki. Prisotnost kontaminantov, kot je npr. PAH, ne vpliva toksično na rast glive in proizvodnjo zunajceličnih encimov. Rast micelija skozi onesnažena tla in aktivnost encimov je predpogoj, ki je ključnega pomena pri odstranjevanju onesnaževal iz tal. Poleg vnosa glive v tla je za izboljšano razgradnjo škodljivih molekul prisotnih onesnaževal pomembno uspešno izpodrivanje ostalih mikroorganizmov v boju za prostor s hranili (Harbhajan, 2006).

Testi z uporabo glive *Pleurotus ostreatus* nakazujejo, da lahko v 45 dneh učinkovito zmanjšamo koncentracijo pesticida lindana, in sicer s koncentracije 345 mg/l na 30 mg/l. Pilotni poskus z uporabo iste glive na površini ploskve tal približno 1,5 m² je pokazal, da se je v 274 dneh koncentracija lindana zmanjšala s 558 mg/l na 37 mg/l. Na osnovi dobljenih rezultatov testov so izkopali približno 750 ton kontaminirane zemljine onesnažene s pesticidom lindanom. Onesnaženi zemljini so nato dodali 16 % inokuluma glive *Pleurotus ostreatus*. Začetne določene koncentracije lindana v onesnaženi zemljini so bile v povprečju 21 mg/l. V procesu razgradnje pesticida je gliva v 24 mesecih zmanjšala koncentracijo lindana za 97 % oziroma na vrednost 0,57 mg/l (medmrežje 2).

Fragoeiro (2005) je proučevala bioremediacijski potencial osmih izolatov gliv bele trohnobe na agar ploščah, ki so vsebovale ekstrakt zemljine, kateri je dodala herbicide simazin, trifluralin in dieldrin. Raziskava je vključevala glive vrste *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Polystictus sanguineus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus sajor-caju* in *Trametes socotrana*. Ugotovila je, da sta med izolati najboljši glivi *Trametes versicolor* in *Pleurotus ostreatus*. Glivi sta se zkazali kot uspešni v razgradnji lignina, dobri odpornosti proti herbicidom in proizvodnji encima lakaze v prisotnosti teh herbicidov. Aktivnost teh izolatov vključno z glivo *Phanerochaete chrysosporium* je bila preučevana v povezavi z diferencialno razgradnjo zmesi pesticidov v različnih koncentracijah pri različnih osmotskih nivojih stresa.

Nadalje so spremljali encim lakazo, produkcijo ostalih encimov, sproščanje fosforja in dušika ter kroženje ogljika. Rezultati so pokazali, da imajo uporabljeni izolati sposobnost razgradnje različnih herbicidov v različnih vodnih okoljih. Glivi *Phanerochaete chrysosporium* in *Trametes versicolor* sta uspešno razgradili mešanico pesticidov neodvisno od dejavnosti encima lakaze, medtem ko je *Pleurotus ostreatus* pokazala večjo proizvodnjo tega encima. V poskusu na ekstraktu zemljine z malo hranili je pršlo do popolne razgradnje dieldrina in trifluralina, medtem ko je bilo simazina razgrajenega približno 80 %. Dobljeni rezultati raziskave nakazujejo na možnost popolne presnove pesticidov (Fragoeiro, 2005).

Zaradi možnosti razgradnje onesneževal in produkcije številnih encimov je uporaba predhodno omenjenih specifičnih gliv ob večji količini inokuluma primerna tudi za mikoremediacijo v večjem merilu. V poskusih je bila preučevana zmožnost biorazgradljivosti kontaminirane prsti z mešanico herbicidov (simazin, trifluralin in dieldrin). Onesnažena zemljina z zmesjo naštetih herbicidov je bila inokulirana z glivami *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* in *Phanerochaete chrysosporium* na lesnih sekancih pri temperaturi 15°C. Vsi trije uporabljeni izolati so v tleh uspešno rastle in proizvajali zunajcelične encime. Zaznana je bila tudi povečana respiratorna aktivnost, ki je bila na splošno višja v prisotnosti mešanice herbicidov, kar kaže na povečano aktivnost mineralizacije. Encima gliv celulaza in dehidrogenaza sta bila v inokulirani prsti višja kot v kontrolni skupini, zlasti po 12 tednih inkubacije. Encim lakaza se proizvaja v visokih koncentracijah le ob prisotnosti *Trametes versicolor* in *Pleurotus ostreatus* (Fragoeiro, 2005). V predhodno omenjenem poskusu je bila največja razgradnja vseh treh herbicidov dosežena z glivo *Trametes versicolor*. V 6 tednih trajanja poskusa je bila razgradnja herbicidov v prsti v primerjavi s kontrolno skupino višja za 46 % v primeru simazina, 57 % v primeru trifluralina in 51 % v primeru dieldtrina (Fragoeiro, 2005).

V primeru proučevanja glive *Ganoderma australe* se je pokazalo, da ima zmožnost razgradnje lindana v tekoči kulturi. Encimi lignin peroksidaza, mangan peroksidaza in lakaza, ki jih te glive proizvajajo, so pogosto navedeni kot tisti encimi, ki so potrebni za razgradnjo ligninov. Našteti encimi se uvrščajo med inducibilne encime, ki jih inducirajo spojine, ki sestavljajo lignin. V

raziskavi so še posebej dobro indukcijo teh encimov dosegli v primerih, ko so bili v rastnih gojiščih prisotni pšenični otrobi. Rigas in sod. (2007) so proučevali tudi bioremediacijski potencial glive *Ganoderma australe* v zemljini kontaminirani z lindanom. Opredelili in ovrednotili so pet parametrov, ki so v njihovi raziskavi vplivali na učinkovitost procesa mikoremediacije (temperatura, vlažnost, vsebnost slame, vsebnost lindana in vsebnost dušika). Ugotovili so, da je proces razgradnje lindana najbolj učinkovit pri temperaturi 17,3 °C, vlažnosti 58 %, vsebnosti slame 45 %, vsebnost lindana 13 ppm in vsebnost dušika 8,2 ppm.

Emisije kovin v industriji

V 60-ih letih prejšnjega stoletja so v različnih ekosistemih ljudje začeli opažati škodljive posledice emisij kovin v okolje. Opazili so, da povišane koncentracije kovin negativno vplivajo na različne procese v tleh. Negativni vplivi so se odražali na mikroorganizmih, rastlinah, živalih in ljudeh. Kovine so pogosto strupene zaradi svojih ionskih lastnosti. Vežejo se lahko na številne celične ligande in izpodrinejo izvirne kovine. Te kovine lahko motijo beljakovine s tem, ko se vežejo na sulfhidrilne skupine in nukleinske kisline. Rezultat vezave kovin je lahko sprememba sestave ter posledično funkcije beljakovin in DNK v organizmu (Harbhajan, 2006).

Raziskava o metabolizmu polifosfata v glivi *Trichoderma harzianum*, gojeni v prisotnosti različnih koncentracij kadmija, je pokazala, da uporabljene koncentracije vplivajo na produkcijo biomase. Ugotovljeno je bilo, da je gliva *Trichoderma harzianum* v primerjavi s kontrolnim poskusom po 3 dneh tvorila 46,31 % manj biomase ob prisotnosti 1 mM Cd v mediju, 32,62 % manj pri 2 mM Cd in 29,99 % v primeru 3mM Cd. Freitas in sod., 2011 ugotavljajo, da se proizvodnja biomase zmanjšuje sorazmerno s povečanjem koncentracije Cd v mediju. Prisotnost Cd v rastnem gojišču je inducirala zmanjšanje vsebnosti polifosfata v celici glive v korelaciji s koncentracijo kadmija v mediju. Morfologija glive je bila v raziskavi spremljana z uporabo elektronske mikroskopije. Na tej osnovi so ugotavljali vpliv prisotnosti in koncentracije težkih kovin na celično zgradbo glive. Gliva *Trichoderma harzianum* je v poskusu z učinkovitim odstranjevanjem Cd iz ravnega gojišča nakazala na potencialno uporabnost glive v procesih mikoremediacije (Freitas in sod., 2011).

Ne samo individualno, ampak tudi v povezavi z drugimi organizmi (alge, bakterije, rastline) lahko glive izvajajo svoje pozitivne bioremediacijske vplive na okolje. Poznani so primeri, ko se lahko mikorizna združenja uporabljajo pri kreptvi fitoremediacijskega potenciala rastlin (Gohre in sod., 2006). Mikorizne glive lahko neposredno ali posredno povečajo fitoekstrakcijo težkih kovin s kreptvijo razvoja rastline in rastlinskih korenin. Rastline inokulirane z mikoriznimi glivami, ki so bile odstranjene iz okolja onesnaženega s kovinami, kažejo na povečano sposobnost fitoakumulacije kovin. Vendar se je treba zavedati, da odpornost gliv na prisotnost kovin in vsebnost hranil lahko vpliva na končen rezultat fitoremediacije ali bioremediacije (Harbhajan, 2006).

Mikorizne glive lahko prav tako zmanjšajo rastlinsko absorpcijo kovin. V primeru arbuskularne mikorize gliva prodre v korenine celice vaskularne rastline in s tem zmanjša prenos težkih kovin v poganjke rastline gostiteljice. Zmanjšanje toksične koncentracije kovine je lahko doseženo tako, da se le-ta veže na mikorizno strukturo ali pa se imobilizirajo in ostajajo v neposrednem okolju (Christie in sod., 2004). Obstojna fiksacija kadmija in svinca s tvorbo učinkovite ektomikorizne ovire (gliva se simbitotično "pritrdi" na zunanjo stran rastlinske korenine) kaže na zmanjšano translokacijo kovin v tkivo breze (Krupa in sod., 2004). Naravne organske spojine, kot je glikoprotein glomalin, se tvorijo na hifah arbuskularnih mikoriznih gliv. Ti proteini lahko nato zadržijo in stabilizirajo potencialno toksične kovine, kot so baker, kadmij, svinec in mangan v

okolju. Zaradi predhodno opisanih lastnosti uvrščamo glive, ki proizvajajo ta protein, med uporabne biostabilizatorje v mikoremediaciji (Harbhajan, 2006).

Razvoj odpornih mikoriznih asociacij med glivami in rastlinami na različne okoljske dejavnike stresa se kaže kot obetavna fitoremediacijska strategija. Učinkovitost simbiotičnih združenj v rastlinah družine *Ericaceae* je tako visoka, da lahko te rastline kolonizirajo zelo onesnažena območja (Cairney in sod., 2003). Eksperimentalne študije opravljene na različnih mikoriznih glivah kažejo, da številne mikorizne vrste lahko kovine, kot so cink, kadmij, bakrove fosfate in svinčev klorofosfat (piromorfit), vezane v različnih trdnih spojinah »utekočinjajo« in jih v okolje sproščajo kot fosfate in kovinske ione (Fomina in sod., 2004). Ugotovitve lahko pripomorejo k praktični uporabi gliv v mikoremediacijah ali pri ponovni ozelenitvi degradiranih območij. Kljub temu je treba poudariti, da mikorizna simbioza na območju onesnaženemu s kovinami ne prinaša vedno samo koristnih posledic. Odvisno od lokalnih pogojev lahko takšna simbioza vodi tudi do nevtralnih ali celo škodljivih posledic za okolje.

Tudi med glivami in bakterijami so bili v procesu bioremediacije zabeleženi sinergijski učinki. Poleg neposredne razgradnje ogljikovodikov lahko micelij glive zaradi različnih ekstracelularnih encimov hidrolizira večje molekule na manjše. S tem poveča dostopno površino, ki je na voljo različnim bakterijam in njihovim aktivnostim v biorazgradnji. Prav tako raziskave kažejo, da se lahko kljub začetni bakterijski razgradnji ogljikovodikovih spojin stopnja biorazgradnje ob prisotnosti sinhronega delovanja glive lahko poveča do dvakrat. Martens in sod. (1998) so proučevali različne vrste gliv in njihovo sposobnost razgradnje PAH v bioreaktorju, ki je vseboval slamo in zemljo. Višjo stopnjo razgradnje PAH so opazili v bioreaktorju, katerih micelij je koloniziral samo slamo kot v primerih, kjer je micelij koloniziral oboje zemljo in slamo. Nastale razlike so avtorji pojasnili na način, da je bila rast talnih bakterij in razgradnja PAH spojin bolj učinkovita zaradi hranil, ki so jih glive z encimsko razgradnjo slame nudile tudi prisotnim bakterijam v zemlji ter jim na ta način omogočile boljšo rast in razgradnjo v zemljini.

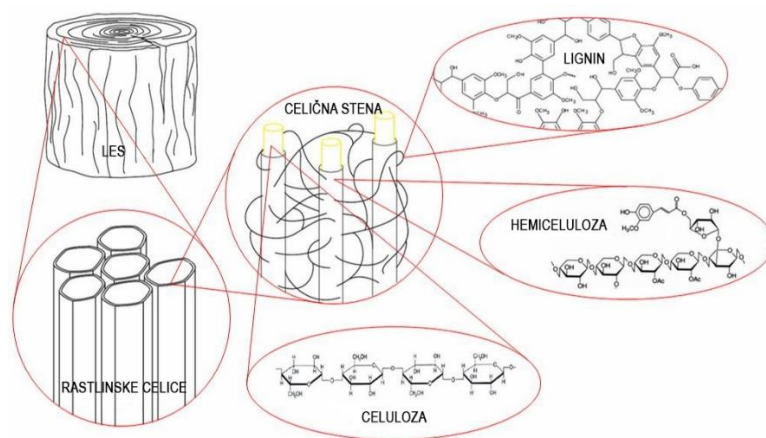
Ostale emisije onesnaževal

Glive bele trohnobe razgrajujejo lignin in celulozo ter povzročajo, da je les na otip vlažen, mehak in spužvast. So različnih odtenkov bele ali rumene barve in imajo sposobnost razgradnje široke palete strukturno različnih ksenobiotikov, vključno z DDT, PCB, fenciklidin, antracen, fenantren, poliklorirane bifenile, dioksine, 2,3,7,8-TCDD, 3,4,3,4-TCB, benzo(a)piren, Aroclor 1254, 3,4-dikloroanilin, 4-kloroanilin, kloroanilin-lignin konjugati, pentaklorofenol, trifenil-metan barvila, barvilo kristal vijolično, pararosanilin, krezol rdeča, bromofenol modra, etil vijolična, malahit zelena, briljantno zelena, 2,4,5-triklorofenoksiocetna kislina, fenantren, policiklični aromatski ogljikovodiki, fluoranten, benzo (b) fluoranten, benzo (k) fluoranten, indenopiren, benzoperilen, heterociklična barvila, Tropaeolin O, Orange II, Azure B, kongo rdeča, trinitrotoluen (Harbhajan, 2006).

3.3 GLIVE BELE TROHNOBE

Les je sestavljen predvsem iz (bele) celuloze in (rjavega) lignina (slika 3). Glive bele trohnobe ob encimskem delovanju na lesu za seboj puščajo »belo trohno« (slika 4). Primarno to pomeni, da se v teh bioprocesih bolj razgrajuje lignin kot celuloza, ki ostane povečini nerazgrajena (zato tudi ime glive bele trohnobe). Obstajajo tudi glive, ki povzročajo »rjavo trohno«. V teh bioprocesih encimi bolj razgrajujejo celulozo kot lignin, zaradi česar jih imenujemo tudi glive rjave trohnobe (Stamets, 2000).

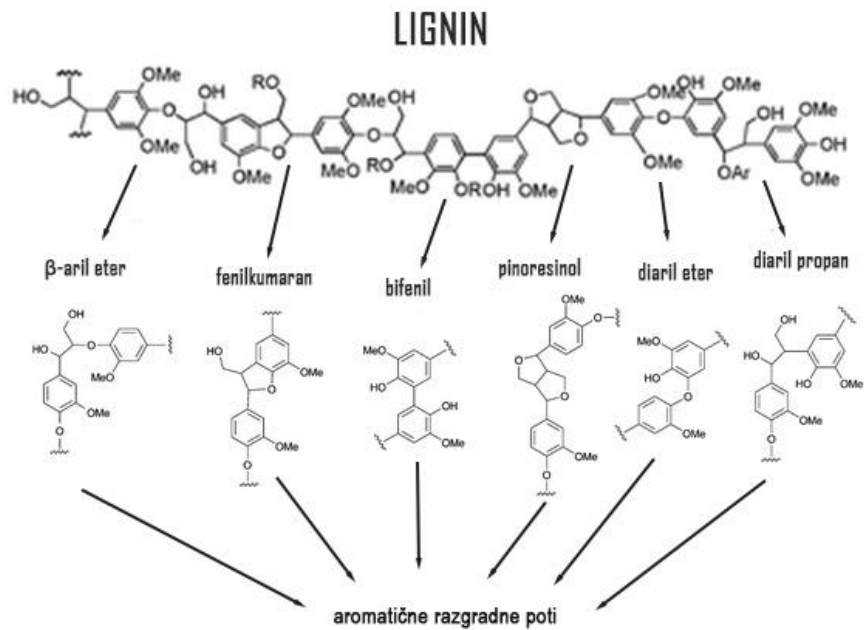
Glive bele trohnobe imajo sposobnost selektivne razgradnje lignina v rastlinskem tkivu. So edini trenutno poznani organizmi, ki lahko bistveno mineralizirajo lignin v ogljikov dioksid in vodo. Lignin je kompleksna molekula (slika 4), ki je nenavadno odporna na encimsko katalizirane reakcije in hidrolitično cepljenje. V izvornem stanju lignin zagotavlja dodatno zaščito lažje razgradljivim polimerom glukoze, celuloze in hemiceluloze. Lignin različnim hidrolitičnim encimom omejuje dostop do omenjenih polisaharidov in tako upočasnjuje njihovo razgradnjo v naravi (Gadd in sod., 2007).



Slika 3: Sestava rastlinskega tkiva

Vir: Prirejeno po medmrežju 6

Encimi gliv bele trohnobe so zunajcelični in njihovi radikali so relativno nespecifični glede vsebnosti snovi v substratu. Izkazalo se je, da so ti encimski sistemi sposobni razgradnje velikega števila težko razgradljivih spojin. Podobno kot lignin so zaradi svoje kemijske zgradbe ti encimi v okolju težko razgradljivi (lignin peroksidaza, mangan peroksidaza, lakaza). Zaradi sposobnosti mineralizacije kompleksnih polimerov predstavljajo glive bele trohnobe s svojimi encimski sistemi dober potencial za mikoremediacije (Gadd in sod., 2007).



Slika 4: Molekula lignina in aromatične razgradne poti lignina

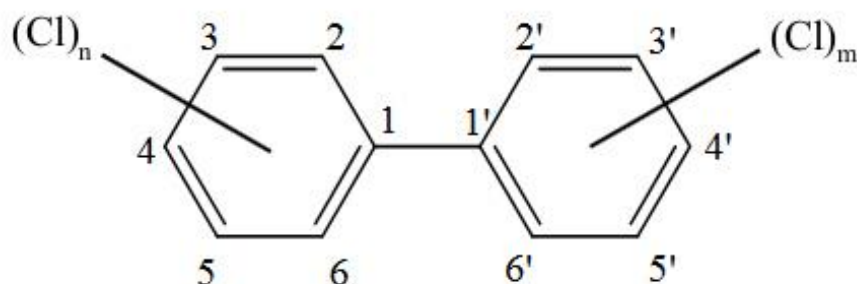
Vir: Prirejeno po Bugg T. in sod., 2011

4. ONESNAŽEVALA

4.1 POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)

Poliklorirani bifeniili (PCB) so sintetične kemijske spojine, katerih struktura je sestavljena iz molekule bifeniila (dva aromatska obroča povezana z C-C vezjo), ki veže od enega do deset atomov klora. Poliklorirani bifeniili spadajo v skupino obstojnih organskih onesnaževal (POPs), kamor sodijo tudi herbicidi, insekticidi, pesticidi, furani dioksini, policiklični aromatski ogljikovodiki idr. Po merilih Okoljskega programa Združenih narodov so značilnosti obstojnih organskih onesnaževal v okolju naslednje; obstojnost, toksičnost, bioakumulacija ter prenos na velike razdalje (Pezdirc, 2008).

Zaradi toplotnih, kemijskih in dielektričnih lastnosti se zmesi polikloriranih bifeniilov pogosto uporabljajo v različnih tehnoloških postopkih v industriji. Posledično je njihova uporaba privedla do obsežne onesnaženosti okolja, bodisi zaradi nenamernih izpustov v okolje bodisi neprimernih metod odstranjevanja. Proizvodnja in uporaba PCB-jev je bila zaradi toksičnosti pred desetletji močno omejena, vendar pa v okolju še vedno ostaja onesnaženje (Harbhajan, 2006).



Slika 5: Splošna formula PCB

Vir: Lasten

Iz kemijske strukture dveh povezanih fenilnih obročev je na sliki 5 razvidna možnost nastanka večjega števila kloriranih spojin. Celoten sklop PCB homolognih vrst obsega 209 različnih kemijsko sorodnih spojin (kongenerjev). Na sliki 5 označbe $(Cl)_m$ in $(Cl)_n$ prikazujejo število klorovih atomov vezanih na posamezen fenilni obroč.

Posamezni kongenerji PCB-jev v komercialni uporabi niso izolirani. V industriji se uporabljajo različne tehnične mešanice izomerov PCB. Vsebnost klora določa lastnosti in uporabo take mešanice PCB. Povprečna koncentracija klora v mešanicah izomerov PCB znaša od 21 do 68 %. V komercialne namene se tehnične mešanice prodajajo pod različnimi imeni; npr. Aroclor®, Clophen®, Fenclor®, Kanchlor®, Pyralene® in Delor®. Sestava PCB tehničnih mešanic različnih proizvajalcev je primerljiva sestavi iz serije tehničnih mešanic Aroclor, katere se uporabljajo kot referenčne za ostale komercialne mešanice (preglednica 2) (Pezdirc, 2008).

Preglednica 2: Delež zvrsti PCB v tehničnih mešanicah Aroclor 1248, 1254 in 1260.

PCB	Delež zvrsti PCB (%)		
	Aroclor 1248	Aroclor 1254	Aroclor 1260
Monoklorbifenil	0,07	-	0,02
Diklorobifenil	1,55	0,24	0,08
Triklorobifenil	21,27	1,26	0,21
Tetraklorobifenil	32,77	10,25	0,35
Pentaklorobifenil	42,92	59,12	8,74
Heksaklorobifenil	1,64	26,76	43,35
Heptaklorobifenil	0,02	2,66	38,54
Oktaklorobifenil	-	0,04	8,27
Nonaklorobifenil	-	0,04	0,70

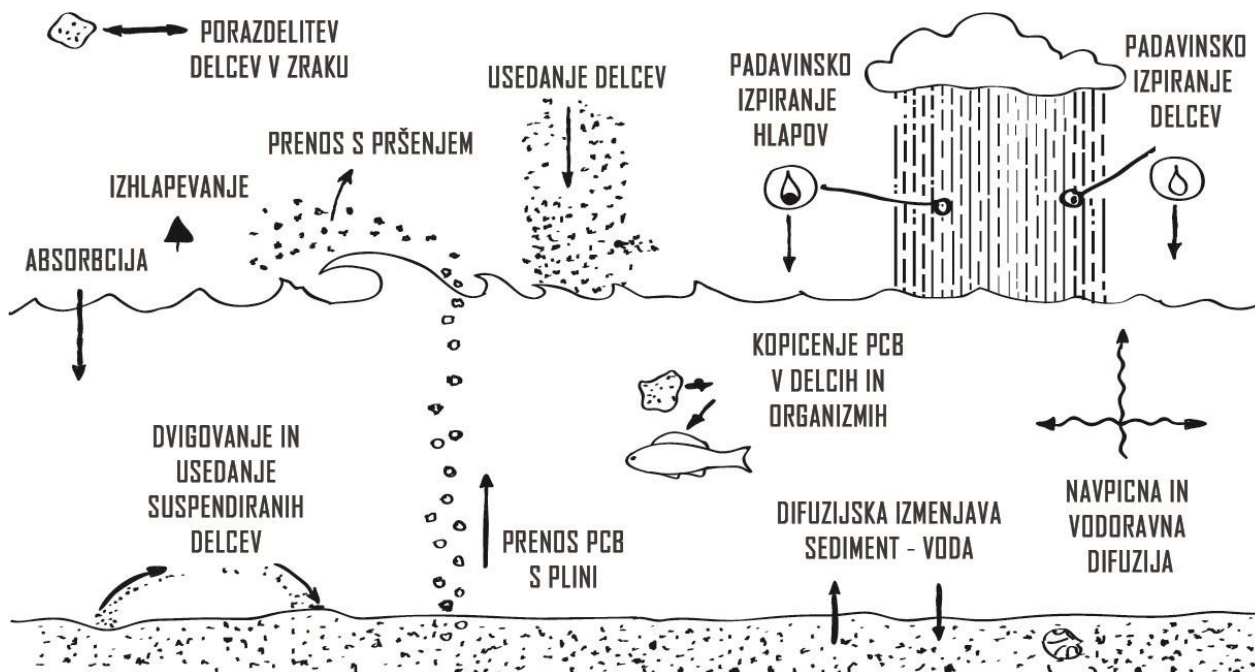
Vir: Povzeto in prirejeno po Frame in sod., 1996

"Aroclor®" je blagovna znamka iz serije komercialnih mešanic PCB-jev. Aroclori so sestavljeni iz kombinacij različnih PCB-jev. Kombinacije so izbrane za namene izdelave Aroclorov s specifičnimi koncentracijami klora. Zaradi različnih kombinacij in koncentracij PCB-jev imajo Aroclori različne lastnosti, kot so parni tlak, topnost, viskoznost itd., s čimer ustrezajo različnim načinom uporabe.

Danes štejemo PCB-je med človeku najbolj nevarna onesnaževala prisotna v okolju. Odstranjevanje PCB-jev iz onesnaženih območij je postala globalna naloga. Med različnimi pristopi sanacije uporaba mikoremediacij predstavlja učinkovito, stroškovno ugodno in okolju prijazno alternativo bolj pogosto uporabljenim fizikalno-kemijskim pristopom remediacije teh spojin iz okolja (Harbhajan, 2006).

4.2 VNOS PCB V ORGANIZME IN OKOLJE

Fizikalno-kemijske lastnosti PCB in sestava biote ter abiote določajo način prenosa in hitrost kroženja PCB v okolju. PCB se najhitreje in najlažje prenašajo z gibanjem zračnih tokov. V atmosferi se vežejo na druge zračne delce ali pa se širijo na oddaljena območja v obliki aerosolov. Zračni tokovi so na ta način razširili PCB tudi na območja, kjer jih niso nikoli uporabljali. Najdemo jih tako na polarnem območju, kot tudi na dnu oceana (Pezdiric, 2008).



Slika 6: Kroženje PCB

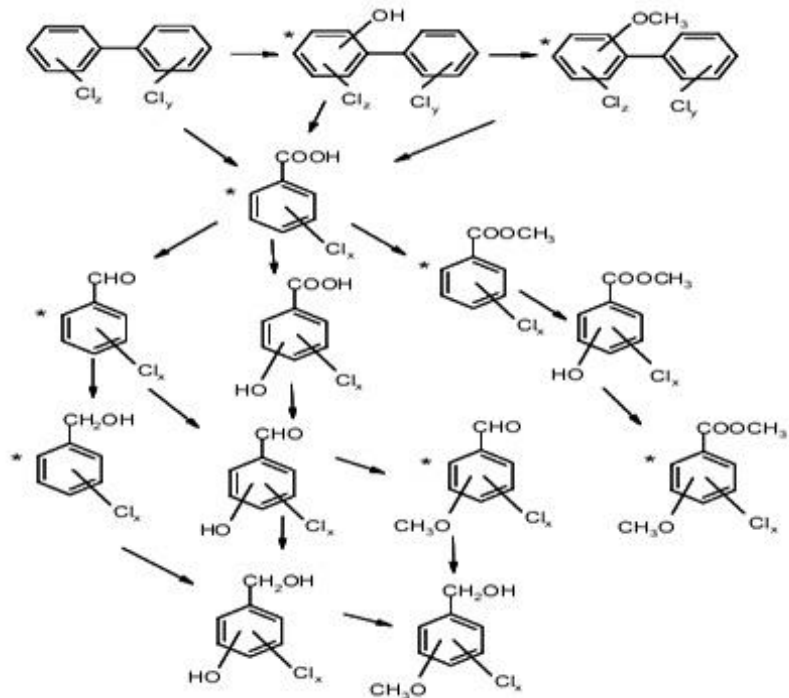
Vir: Prirejeno po Pezdirc, 2008

Suho in mokro usedanje delcev iz zraka omogoča vnos PCB v vodo in tla. Vodna in zemeljska območja se onesnažijo tudi s komunalnimi in z industrijskimi odpadki ali pa z izcejanjem PCB iz onesnaženega območja. V organizme se PCB kopiči preko zraka, vode ali hrane. Hrana je glavna pot vnosa pri kopenskih organizmih. V vodne organizme pa se PCB kopiči tudi zaradi procesa dihanja skozi škrge (Polič, 2005). Pomembna značilnost kopičenja PCB v organizmih je biomagnifikacija. Vsebnost PCB v organizmu se viša sorazmerno z nivojem organizma v prehranjevalni verigi. Tako je npr. vsebnost PCB v jajcih nekaterih divjih ptic tudi do 50.000-krat večja kot v fitoplanktonu (Baird, 2003).

4.3 RAZGRADNJA PCB Z GLIVAMI

Večina raziskovalnega dela v preteklosti je bila pri preučevanju možnosti razgradnje PCB v okolju posvečena bakterijam. Nasprotno je potencial gliv za razgradnjo PCB še vedno malo raziskan. Glive lahko razgrajujejo slabo biološko razpoložljive ali v vodi netopne kompleksne mešanice organskih onesnaževal. Prednost razgradnje PCB z glivami v primerjavi z bakterijami se kaže tudi v njihovi večji sposobnosti proizvodnje zunajceličnih encimov in s tem tudi nevtralizaciji prostih radikalov (Tigini in sod., 2009).

Zavedati se je potrebno tudi, da različni pogoji gojenja gliv, kot so vsebnost hranil v mediju, temperatura, začetna koncentracija PCB, vlažnost itd., lahko zelo vplivajo na učinkovitost razgradnje PCB. Natančen potek in metabolna pot razgradnje PCB z glivami trenutno ostaja še vedno ne povsem pojasnjen proces (Trigini in sod., 2009). Vendar Čvančarova in sod. (2012) v svoji raziskavi predlagajo naslednjo pot razgradnje PCB z glivami, kot je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Predlagana pot razgradnje PCB pri uporabi ligninolitičnih gliv
Vir: Čvančarova in sod., 2012

Posamezne skupine odkritih vmesnih metabolitov vključujejo kemijske spojine, kot so diklorirani, triklorirani in tetraklorirani derivati hidroksi in metoksi bifenilov. Nadaljnje odkrite snovi PCB-transformacije so klorobenzojske kisline, klorirani benzaldehidi in klorirani alkoholi. Opazili so tudi nekaj hidroksiliranih derivatov teh monoaromatskih spojin. Raziskava je pokazala, da glive verjetno pretvorijo PCB s hidroksiliranimi in z metoksiliranimi derivati v klorobenzojske kisline, ki se v nadaljevanju tudi transformirajo. Koncentracije vmesnih metabolitov so bile zelo nizke, kar nakazuje na nizko stopnjo kopičenja teh snovi v bioprocesu razgradnje (Čvančarova in sod., 2012).

Podatki iz nekaterih raziskav dokazujejo sposobnost razgradnje PCB z glivami vrste *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete magnoliae*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* in *Dichomitus squalens*. Poleg tega je bila dokumentirana tudi istočasna razgradnja PCB skupaj s klorobenzojskimi kislinami. Dobljeni rezultati razgradnje v raziskavi obetajoče nakazujejo potrebo po nadaljnjih raziskavah. Poudarek je še posebej na raziskavah različnih encimskih mehanizmov, katerih vloga pri razgradnji onesnaževal ostaja še vedno ne povsem pojasnjena (Čvančarova in sod., 2012).

5. ANALIZA RAZISKOVALNEGA DELA MIKOREMEDIACIJ Z GLIVAMI

5.1 ŠTUDIJA PRIMERA

Študija primera je raziskovalni pristop in metoda v različnih vrstah znanostih. Je celovit opis značilnosti primera in analiza le-tega (Verschuren, 2003). V razponu študije primera lahko analiziramo en sam primer (singularna študija primera) ali več primerov (pluralna študija primerov). V pluralni študiji primerov najprej proučimo vsak primer posamezno, kot da bi preučevali in analizirali posamično študijo. Vsak nadaljnji primer nato med seboj primerjamo oziroma gradimo na spoznanjih, ki smo jih dobili pri analizi prejšnjih primerov (Gerring, 2004).

Študija primera se pogosto povezuje s kvalitativnim raziskovanjem, vendar velja opozoriti, da lahko vsebuje različne metodološke pristope. Čeprav so paradigmatična izhodišča kvalitativnega raziskovanja (bolj) blizu opredelitvam študije primera, pa le-ta ne izključuje uporabe (tudi) kvantitativnega pristopa raziskovanja. Za študijo primera se tako lahko uporabi kvalitativni in/ali kvantitativni pristop, ki pa naj bi se med seboj dopolnjevala (Sagadin, 2004). Kar zadeva uvrstitve naše študije primera v metodološko polje, smo v diplomskem delu uporabljali študijo primera kot vrsto kvalitativne raziskave glede na zastavljene cilje in metode raziskovanja (analiza dokumentov) sekundarnega empiričnega gradiva (kvantitativni in kvalitativni podatki zbrani in analizirani v izbranih dokumentih). Pri interpretaciji empiričnega gradiva pa smo uporabili študijo primera kot obliko deskriptivne (opisne) metode.

5.2 VZOREC ALI PREDSTAVITEV IZBRANE ŠTUDIJE PRIMERA

V širšem polju raziskovanja študijo primera razumemo kot podroben opis posameznega primera: (1) njegovih značilnosti, (2) dogajanja in (3) procesa raziskovanja oziroma procesa odkrivanja proučevanih značilnosti primera (Mesec, 1998). V našem primeru se je uporaba študije primera vezala na proučevanje dveh primerov razgradnje onesnaževala (PCB) z uporabo različnih vrst gliv bele trohnobe. Avtor Mesec (1998) prav tam proučevanje večjega števila primerov imenuje pluralna ali multipla študija primerov.

V diplomskem delu smo za študij primera izbrali dva znanstvena dokumenta, in sicer:

(1) Krčmar, P., Kubatova, A., Votruba, J. 2, Erbanova, P., Novotny, Č. in Šašek, V. (1999). Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, str. 269–276.

(2) Seto, M., Nishibori, K., Masai, E. Fukuda, M., in Ohdaira, Y. (1998). Degradation of polychlorinated biphenyls by a 'Maitake' mushroom, *Grifola frondosa*, *Biotechnology Letters*, 22, str. 27–31.

Izbor dveh znanstvenih dokumentov v študiji primera ni bil izveden stihijsko, ampak na osnovi upoštevna sledečih kriterijev (Vogrinc, 2008):

- Avtentičnosti glede izvora dokumenta oziroma nevprašljivosti avtorstva. V primerih osebno uradnih dokumentov je ta kriterij zagotovljen, saj so avtorji znanstvenih besedil uradno zabeleženi v različnih podatkovnih bazah.
- Kredibilnosti v smislu neobstoja nepravilnosti in enoznačnega razumevanja besedila/podatkov. V tem okviru je bilo presoјano, ali so predstavljeni eksperimentalni procesi in njihovi rezultati korektno (pravilno) predstavljeni.
- Sporočilnosti v kontekstu jasnosti, logičnosti in razumljivosti besedila/podatkov. Sporočilnost v osebno uradnih dokumentih, v našem primeru izbranih znanstvenih dokumentih, ni problematična, saj sta bila izbrana znanstvena dokumenta (pred objavo v znanstveni publikaciji) recenzirana.
- Reprezentativnosti vezane na to, da je izbran dokument običajen za takšno vrsto dokumentov.
- Zunanje koherentnosti ali stopnje, do katere se interpretacija analiziranih podatkov ujema s teorijami, ki smo jih uporabili v diplomskem delu.
- Bogatosti v smislu, da sta nam izbrana znanstvena dokumenta omogočala nove poglede in dognanja vezana na proučevano problematiko.

Za transparenten prikaz raziskovalnega dela (analize podatkov) kot tudi jasnejše predstavitve rezultatov smo naše raziskovalno polje klasificirali v kategorije ali spremenljivke. S pomočjo kategoriziranja smo primarno oblikovali »prototip« analize. Oblikovanje kategorij je izhajalo iz teoretičnih izhodišč, saj se predpostavlja, da imajo teoretično utemeljene kategorije določeno predinformativno vrednost, torej da sama kategorija oziroma prisotnost le-te v kontekstu posamezne študije primera lahko vodi do rezultata (Kogut in Ragin, 2006).

Kasifikacija uporabljenih kategorij in spremenljivk v študiji izbranega primera v diplomski nalogi (DN) je sledil naslednjim zahtevam:

- krajši opis posameznega proučevanega primera,
- vrsta uporabljene glive bele trohnobe in njene značilnosti,
- vrsta in značilnosti (npr. koncentracija) onesnaževala (PCB),
- eksperimentalno okolje,
- način beleženja procesa razgradnje onesnaževala (npr. časovni intervali),
- način beleženja procesa odstranjevanja onesnaževal iz okolja,
- določanje stopnje učinkovitosti izbrane glive pri razgradnji onesnaževala iz okolja,
- določanje učinkovitosti mikoremediacije pri bioremediaciji okolja.

V diplomskem delu smo sprva vsak izbrani primer (znanstveno besedilo) proučevali ločeno. V drugi fazi raziskovanja pa smo proučevana primera med seboj primerjali oziroma analizirali glede na predhodno določene kriterije/spremenljivke.

Proučevana primera sta bila izbrana tudi zaradi tega, ker je na področju bioremediacij v raziskave veliko bolj vključena uporaba bakterij, medtem ko uporaba gliv ostaja še vedno manj raziskana. Posebej pri onesnaženjih s PCB je metabolna pot njegove razgradnje z bakterijami v vodi omejena zaradi nastanka klorobenzojskih kislin (CBA) (Kobayashi in sod., 1996). Zaradi kopičenja teh kislin kot končnega produkta je nadaljna uporaba bakterij v procesu razgradnje omejena, saj teh spojin ne morejo vključiti v svoj metabolizem. Posledično se razgradnja PCB z bakterijami v tej točki ustavi (Adebusoye in sod., 2008). V takih primerih onesnaženj se uporaba gliv v bioprocesu mikoremediacije ponuja kot ena od možnih rešitev nastalega problema.

Namen diplomskega dela je tudi zapolniti vrzel s primeroma, ki dokazujeta potencialno primernost uporabe gliv v remediaciji okolja z zahtevnimi kompleksnimi molekulami. Izbira obeh znanstvenih člankov je bila zato zasnovana na izbrani tematiki specifične mikoremediacije onesnaženja s PCB, izbranih predstavnikih gliv bele trohnobe, kot tudi pridobljenih rezultatov.

Izbrana gliva *Phanerochaete chrysosporium* v prvi študiji primera je reprezentativna gliva bele trohnobe in ena izmed bolj raziskanih gliv na področju mikoremediacij. Razlog zato je v njeni specifični sposobnosti razgradnje lignina in obenem zelo majhni razgradnji celuloze. Zaradi teh lastnosti se pri glivi *Phanerochaete chrysosporium* pričakuje dober potencial razgradnje tudi drugih kompleksnih molekul (Jennings, 1995). Gusse in sod. so leta 2006 v svoji raziskavi potrdili ta pričakovanja, saj je gliva bele trohnobe *Phanerochaete chrysosporium* v poskusih, ki so jih izvedli, razgrajevala kompleksne polimere fenolnih smol, ki je vrsta plastike. Izbran znanstveni članek uporabljen v analizi primera je poleg izbrane specifične glive dokaj enkratno tudi v pristopu razgradnje PCB, saj zajema štiri možne načine razgradnje PCB. Razgradnja PCB se je v bioprocesu mikoremediacije proučevala z uporabo encimov glive mangan peroksidaze in lignin peroksidaze, intaktnim micelijem glive in tudi njenim zunajceličnim ekstraktom.

V drugi študiji primera je bila izbrana *Grifola frondosa*, ki je užitna gliva in na področju Slovenije uvrščena na rdeči seznam ogroženih vrst gliv. Namnoževanje in razširjena uporaba te glive v druge namene bi lahko potencialno privedla tudi do razširitve njenega habitatnega območja. V nekaterih delih sveta to glivo pogosto gojijo v prehrabene namene. V takih primerih bi lahko izrabljeni rastni substrat prepreden z micelijem glive *Grifola frondose* predstavljal stroškovno učinkovito mikoremediacijsko orodje. Izbran znanstveni prispevek je v študiji primera poleg specifičnosti izbrane glive dober primer raziskave pomembnosti vpliva prisotnosti dušika v rastnem mediju na tvorbo micelija glive in s tem na sposobnost odstranjevanja PCB iz okolja.

Izbrana primera znanstvenih prispevkov omogočata tudi jasnejši vpogled v izbrano in proučevano problematiko in podajata dobra izhodišča za nadaljne raziskave na področju mikoremediacij odstranjevanja onesnaženj s PCB v okolju.

5.3 METODA ZBIRANJA IN ANALIZE PODATKOV

V diplomskem delu je bila pri zbiranju in analizi empiričnega gradiva uporabiljena kvalitativna metoda analize dokumentov oziroma sekundarnega (empiričnega) gradiva. V primerjavi z drugimi metodami zbiranja podatkov je analiza dokumentov nevsiljiva in nereaktivna metoda zbiranja podatkov. Pri tem se nevsiljivost analize dokumentov razume v kontekstu, da se analizira empirično gradivo, ki obstaja neodvisno od raziskovalnega procesa in ga lahko analiziramo, ne da bi s tem motili avtorja gradiva. Avtorji pogosto niti ne vedo, da se njihovo besedilo analizira. Slednje velja tudi za naš proces zbiranja in analize podatkov. Temelji namreč na »nemih« dokumentih, ki že obstajajo (Vogrinc, 2008). Analizirano gradivo tudi ni nastalo za potrebe raziskave in s tem smo se izognili temu, da bi se proučevana situacija spremenila zaradi raziskave.

Prednosti uporabe analize dokumentov so bile v kontekstu naše raziskave prepoznane v tem, da: (1) nas ni časovno in prostorsko omejevala; (2) nam je bilo empirično gradivo vedno na voljo in s tem nam je bila dana možnost večkratne ponovitve analize podatkov; (3) nam je analiza dokumentov omogočila proučevanje fizično nedostopne situacije (proces razgradnje

onesnaževala na glivah bele trohnobe) in (4) nam pridobivanje dokumentov ni povzročilo večjega finančnega stroška kot tudi ne opreme za analizo zbranih podatkov (Vogrinc, 2008).

Poleg naštetih prednosti pa smo pri uporabi metode analize dokumentov zaznali tudi nekaj pomanjkljivosti. Med slednje je potrebno izpostaviti dve pomanjkljivosti. Prva je ta, da je analiza dokumentov omejena le na dostopno gradivo (Vogrinc, 2008). V našem primeru pomeni, da lahko obstajajo še druge (bolj eksaktne in poglobljene raziskave vezane na razgradnjo onesnaževala pri glivi bele trohnobe), vendar je bilo to gradivo nam nedostopno ali pa ni bilo izbrano iz drugih razlogov. Drugo pomanjkljivost uporabe analize dokumentov pa smo prepoznali v tem, da je interpretacija izbranega gradiva lahko odvisna od naše subjektivne presoje. Na subjektivno presojo pa vplivajo tako naše (metodološke in analitične) izkušnje, teoretična izhodišča kot tudi pričakovanja glede raziskovalnih dognanj/ciljev oziroma potrditve hipotez/raziskovalnih vprašanj (Vogrinc, 2008).

Izbrana dokumenta v naši raziskavi uvrščamo med osebne uradne dokumente. Gre za dokumente, ki so rezultat znanstvenega dela avtorja (ali več teh) in so namenjeni zunanji komunikaciji. S tovrstnim gradivom želijo avtorji obveščati širšo javnost o raziskovalnih aktivnostih in ključnih dognanjih le-teh.

5.4 PREDSTAVITEV ANALIZE PRVE ŠTUDIJE PRIMERA MIKOREMEDIACIJE

5.4.1 OPIS PRIMERA

V znanstvenem dokumentu z naslovom »Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor« so se proučevale sposobnosti razgradnje izbrane glive ob prisotnosti onesnaževal PCB (Delor 103 in Delor 106 kot ekvivalenta Aroclor 1254 in Aroclor 1260 – glej 4. poglavje). Za namene odstranjevanja PCB se je biomasa glive *Phanerochaete chrysosporium* namnožila v bioreaktorski posodi, kjer se je med rastjo glive spremljala aktivnost dveh encimov, ki sta lahko pomembna za razgradnjo PCB, in sicer mangan peroksidaza (MnP) in lignin peroksidaza (LiP). Najvišja aktivnost encimov glive je bila dosežena po enajstih dneh kultivacije, ko se je bioproces namnoževanja biomase micelija glive prekinil. V nadaljnjih poskusih odstranjevanja PCB iz okolja so uporabili namnožen micelij glive, njen zunajcelični ekstrakt ter na osnovi izoelektričnega fokusiranja ločena oba encima mangan peroksidaza in lignin peroksidaza. Na osnovi izvedenih poskusov so prišli do naslednjih zaključkov, da:

- je bilo z micelijem glive *Phanerochaete chrysosporium* z dodanim onesnaževalom odstranjenih več kot 70 % PCB (v primeru kongenerja Delor 103 je bila dosežena 74 % razgradnja, medtem ko je bila v primeru Delor 106 uspešnost razgradnje kongenerja 73 %);
- je bilo z zunajceličnim ekstraktom, ki je bil pridobljen z ločitvijo od biomase micelija, dosežena več kot 55 % odstranitev PCB iz tekočega medija (62 % v primeru kongenerja Delor 103 in 58 % v primeru Delor 106);
- uporaba čistega encima mangan peroksidaze ali lignin peroksidaze ne vpliva na odstranjevanje PCB iz okolja, saj ni bilo doseženo nikakršno zmanjšanje dodanega PCB v tekočem mediju;

- pri razgradnji PCB kongenerjev dodanih v tekoči medij ni bilo opaznih posebnosti glede na izbran kongener. V posameznih stopnjah razgradnje PCB namreč ni bilo zaznanih razlik glede na izbrani (di-, tri-, tetra-, penta-, heksa-, hepta-, okta- ali nona- klorinirani) kongener.

5.4.2 GLIVA BELE TROHNOBE IN NJENE ZNAČILNOSTI

Glive *Phanerochaete chrysosporium* za razmnoževanje ne tvorijo oblike prave gobe. Trosovnica je po videzu zelo majhna in ravna ter se pojavlja kot skorja na hlođu. Gliva je bela, ravna, vlažna ter nazobčana in se lahko namnožuje v laboratoriju. Zaradi tankega pajčevinastega izgleda jo zlahka spregledamo. *Phanerochaete chrysosporium* v naravi raste predvsem na trdem lesu. Značilna je rast te glive na tisti vrsti lesa, na katerem je rasel njen genetski prednik. Rast micelija je najboljša pri temperaturi od 25 °C do 40 °C in optimalnem pH substrata 4,5 do 5,5. V laboratorijskih razmerah jo lahko namnožujemo, saj raste na petrijevkah na krompirjevem agarju z dekstrozo (Potato Dextrose Agar), agarju z dodanim sladnim ekstraktom (Maltose Extract Agar) ali agarju z dodanim kvasnim ekstraktom (Yeast Maltose Agar) (Jennings, 1995).



Slika 8: Rast glive bele trohnoobe *Phanerochaete chrysosporium* na lesu

Vir: Medmrežje 4

Gliva vrste *Phanerochaete chrysosporium* je prva goba debla Basidiomycetes, kateri so določili nukleotidno zaporedje. Ta gliva je najbolj intenzivno preučevana goba bele trohnoobe. Visoki oksidacijski potencial encimov je vzbudil veliko zanimanje za uporabo v bioprocesih razgradnje onesnaževal. Ima več funkcij, zaradi katerih je lahko v mikoremediaciji koristna. Za razliko od nekaterih drugih gob bele trohnoobe v procesu razgradnje lesa skoraj nima zmožnosti razgradnje celuloze. V procesu razgradnje lignina pušča celulozo v veliki meri intaktno in ima zelo visoko optimalno temperaturo rasti. Lahko raste na kompostiranem substratu. Te lastnosti glive kažejo na njene možne vloge v različnih biotehnoloških procesih (Jennings, 1995).

5.4.3 ONESNAŽEVALO IN NJEGOVE ZNAČILNOSTI

Delor 103 je komercialni proizvod, ki vsebuje izomere z manjšim številom atomov klora v svoji strukturi. To je mešanica približno 100 PCB kongenerjev z dodatkom polikloriranih dibenzofuranov. Delor 103 je kemijsko primerljiv z Aroclor 1254. Povprečna vsebnost klora je 54 % (National Toxicology Program, 2016) (glej 4. poglavje).

Delor 106 je komercialni proizvod, ki vsebuje izomere z večjim številom atomov klora v svoji strukturi. Delor 106 je kemijsko primerljiv z Aroclor 1260. Povprečna vsebnost klora je v tej spojini 60 % (National Toxicology Program, 2016) (glej 4. poglavje).

5.4.4 EKSPERIMENTALNO OKOLJE

V analizi prvega primera je bila v poskusu uporabljena gliva vrste *Phanerochaete chrysosporium*, sev ATCC 24 725. Kultivacija micelija glive je potekala v aerobnem bioreaktorju, ki je bil dodatno prirejen za kultivacijo glive. Sterilizacija bioreaktorja je bila izvedena pri 121 °C, 30 minut. Bioreaktor je bil nato aseptično napolnjen s 4 L mineralnega rastnega medija, v katerem je bil limitni faktor dušik. Limitacija z dušikom je bila uporabljena zaradi doseganja povečane tvorbe encimov mangan peroksidaza in lignin peroksidaza v bioprosesu. Rastni medij je bil inokuliran z 10 % inokulumom spor koncentracije $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Temperatura kultivacije 32 °C je bila konstantna skozi celoten bioproses namnoževanja micelija. V prvih treh dneh kultivacije glive je potekalo prezračevanje medija s čistim kisikom (pretok $0,2 \text{ Lmin}^{-1}$). Četrty dan kultivacije glive je bil rastnemu mediju dodan 3,4-dimetoksibenzil alkohol (veratril alkohol) in zamenjano prezračevanje medija iz kisika na sterilni zrak. Pretok zraka je bil 0.5 Lmin^{-1} . Dodani 3,4-dimetoksibenzil alkohol je sekundarni metabolit nekaterih vrst gliv bele trohnobe, ki prispeva k učinkovitosti encimov v razgradnji lignina (Zapanta in sod., 1997).

V bioprosesu namnoževanja micelija glive *Phanerochaete chrysosporium* se je spremljala aktivnost MnP in LiP, ki je dosegla največjo vrednost po končanem tretjem dnevu kultivacije glive, ko je bil bioproses tudi zaključen. V nadaljnjih poskusih odstranjevanja PCB iz tekočega medija so se uporabili namnožen micelij glive, njen zunajcelični ekstrakt ter na osnovi izoelektričnega fokusiranja ločena oba ekstracelularna encima mangan peroksidaza in lignin peroksidaza.

5.4.5 SPREMLJANJE PROCESA BIORAZGRADNJE ONESNAŽEVALA PCB

In vitro razgradnja PCB je bila izvedena v treh eksperimentalnih postopkih. V prvem postopku se je koncentrirani kongener PCB dodal biomasi micelija. V drugem je bil koncentrirani kongener PCB dodan zunajceličnemu ekstraktu glive. V tretjem sklopu pa so posamezno merili aktivnosti encimov LiP in MnP ter njihovo učinkovitost razgradnje PCB. Vsi eksperimentalni postopki in

dobljeni rezultati so bili primerjani s kontrolami, ki so vsebovale toplotno obdelano biomaso micelija glive.

- 1) V prvem eksperimentalnem postopku so uporabili biomaso micelija glive in določili razgradnjo PCB onesnaževala.

Izvedba: 1 g mokre biomase micelija glive je bilo dodanih 50 µl Delor mešanice PCB. Razgradnja PCB ob prisotnosti biomase micelija je potekala 44 ur pri temperaturi 20–22 °C v temnem prostoru.

- 2) V drugem eksperimentalnem postopku je bila razgradnja onesnaževala PCB določena z uporabo ekstracelularnega ekstrakta glive.

Izvedba: v 950 µl zunajceličnega ekstrakta glive je bilo dodanih 50 µl Delor mešanice. Razgradnja PCB ob prisotnosti zunajceličnega ekstrakta je potekala 44 ur pri temperaturi 20–22 °C v temnem prostoru.

- 3) Tretji eksperimentalni sklop se je delil na dva dela. V prvem delu so proučevali razgradnjo onesnaževala PCB z encimom MnP. V drugem delu pa razgradnjo onesnaževala z encimom LiP.

Izvedba: liofilizirane frakcije encima MnP in LiP so bile raztopljene v 450 µl in 300 µl vode in združene z rastnim medijem. Reakcijski zmesi (1 ml) sta vsebovali 100 µl MnP 238 U/l in 100 µl LiP 24 U/l ter 50 µl zmesi Delor. Razgradnja PCB ob prisotnosti zunajceličnega ekstrakta je potekala 44 ur pri temperaturi 20–22 °C v temnem prostoru.

V vseh izvedenih poskusih je postopek po inkubacijski dobi zahteval ekstrakcijo ostankov PCB onesnaževala z mešanico n-heksana in acetona. Ekstrakcija se je za vsak postopek ponovila trikrat. Metoda ekstrahiranja PCB je temeljila na postopkih, ki so jih opisali Yadav in sod. (1995) ter Zachar in sod. (1996). Učinkovitost ekstrakcije PCB je bila primerjana s količino PCB v kontrolah brez dodanih micelija glive, zunajceličnega ekstrakta, encimov MnP ali LiP.

Učinkovitost ekstrakcije PCB iz reakcijskega medija je bil največja 61 %, v primeru uporabe encimov MnP in LiP. V mediju z biomaso micelija je bila ta učinkovitost 48 %, medtem ko je bila dosežena 44 % učinkovitost ekstrakcije pri mediju z zunajceličnim ekstraktom. Določanje koncentracij preostankov PCB v reakcijskih mešanicah je potekalo z uporabo kombinirane plinske kromatografije in masne spektrometrije (GC-MS).

5.4.6 UČINKOVITOST MIKOREMEDIACIJE PCB

Rezultati razgradnje kemijskih zmesi PCB (kongenerjev Delor 103 in Delor 106) z biomaso micelija glive in njenim zunajceličnim ekstraktom ter encimov MnP in LiP z glivo *Phanerochaete chrysosporium* so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Razgradnja mešanic PCB (kongenerjev Delor 103 in Delor 106) z biomaso micelija glive *Phanerochaete chrysosporium*, njenim zunajceličnim ekstraktom in encimov MnP in LiP

PCB mešanica	Povprečne vrednosti razgradnje mešanic PCB (%)		
	biomasa micelija	zunajcelični ekstrakt	encima MnP in LiP
Delor 103	74	62	0
Delor 106	73	58	0

Vir: Povzeto in prirejeno po Krčmar in sod., 1999

Iz podatkov prikazanih v preglednici je razvidno, da se je pri biomasi micelija glive raven PCB po 44 urnem časovnem intervalu zmanjša za 74 % za Delor 103 in 73 % za Delor 106.

Primerljivo zmanjšanje ravni onesnaževala PCB je bilo opazno tudi v primerih, ko so se PCB zmesi dodale v zunajcelični ekstrakt glive. Doseženi so bili rezultati 62 % za Delor 103 in 58 % za Delor 106 zmanjšanja PCB v mediju.

Večjih razlik pri razgradnji di-, tri-, tetra-, penta-, heksa-, hepta-, okta- ali nona- kloriniranih kongenerjev avtorji ne poročajo.

Iz rezultatov eksperimentalne mikoremediacije je razvidno, da aktivnost encimov LiP in MnP bistveno ne vpliva na razgradnjo onesnaževal PCB.

5.5 PREDSTAVITEV ANALIZE DRUGE ŠTUDIJE PRIMERA MIKOREMEDIACIJE

5.5.1 OPIS PRIMERA

V drugem znanstvenem dokumentu z naslovom »Degradation of polychlorinated biphenyls by a 'Maitake' mushroom *Grifola frondosa*« so proučevali procese razgradnje z užitno gobo »Maitake« *Grifola frondosa*, sev M51. Proučevana gliva je v izvedenem poskusu razgrajevala 40 PCB kongenerov. V eksperimentu se je uporabilo onesnaževalo PCB 48 kot ekvivalent Aroclor 1248.

Avtorji znanstvene publikacije so sev gobe pridobili pri podjetju Mori Sangyo Co., Ltd., Gunma na Japonskem. Goba je bila gojena na mediju z nizko vsebnostjo dušika. Rastni medij je vseboval glukozo (20g/l), 2,2'-sukcinata (1,46 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), NaH_2PO_4 (0,2 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l), amonijevega tartrata (0,2 g/l), tiamonijevega-hidroklorida (100 $\mu\text{g/l}$), CaCl_2 (100 $\mu\text{g/l}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 $\mu\text{g/l}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 $\mu\text{g/l}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 $\mu\text{g/l}$).

Medij z visoko vsebnostjo dušika je vseboval 0,94 gL^{-1} amonijevega tartrata v primerjavi z medijem z nizko vsebnostjo dušika, kjer je bila koncentracija 0,2 gL^{-1} amonijevega tartrata. Sev gobe M51

je bil pred-kultiviran v mediju z dekstrozo PDA (pH 5,1) pri 25 °C na stresalniku (75 o_{min}⁻¹) v časovnem intervalu 14 dni.

5.5.2 GLIVA BELE TROHNOBE IN NJENE ZNAČILNOSTI

Gliva *Grifola frondosa* v naravi raste predvsem na drevesnih štorih in lesu odmirajočih listavcev. Najdemo jo zlasti na lesu hrasta, bresta, javorja, bukve in občasno na macesnu. Pogosto raste na istem mestu od 5 do 10 let zapored. Gliva je užitna ter v Sloveniji zaščitena goba, katere okus je podoben okusu mesa kokoši.



Slika 9: Rast glive bele trohnoobe »Maitake« *Grifola frondosa* na lesu

Vir: Medmrežje 5

Optimalni temperaturni razpon rasti micelija gobe je od 21 °C do 24 °C, telo same gobe pa se pojavi ob temperaturah od 13 °C do 18 °C. Optimalni pH substrata je 4,5 do 5,5. Najboljša rast in gostota micelija glive je dosežena v odsotnosti svetlobe. V laboratorijskih razmerah se lahko goji v petrijevkah na agarju z dodanima sladnim in s kvasnim ekstraktom (MYA), agarju s sladnim in kvasnim ekstraktom ter peptonom (MYP A) ali agarju s krompirjevo dekstrozo in kvasnim ekstraktom (PDYA). Poleg sposobnosti razgradnje številnih kemijskih spojin ima goba *Grifola frondosa* tudi nekatere antitumorne, antivirusne, imunsko stimulirajoče in antioksidativne aktivnosti (Stamets, 2000).

5.5.3 ONESNAŽEVALO IN NJEGOVE ZNAČILNOSTI

Aroclor 1248 (PCB 48) je komercialna mešanica PCB-jev s povprečno vsebnostjo klora 48 %. Sestavljen je iz mono do hepta kloriranih homologov (National Toxicology Program, 2016).

5.5.4 EKSPERIMENTALNO OKOLJE

Micelij glive (0,1 g) je bil inokuliran v 10 ml medija z visoko in nizko vsebnostjo dušika (glej sestavo medija v poglavju 5.5.1). Postopek so še enkrat ponovili za dva identična medija, ki pa sta bila obogatena z dodatkom 1 g/l lignina. V vse poskusne mešanice je bil dodan PCB 48 v koncentracijah 10 µg/ml in 100 µg/ml.

Kultivacija glive z dodanim onesnaževalom je potekala 60 dni na stresalniku (75 omin^{-1}) pri 25 °C. V primeru dodajanj PCB 48 v koncentracijah 100 µg/ml v gojišče je bilo mediju v okviru kultivacije vsakih deset dni dodano še 1 ml glukoze. Kontrolni micelij je bil (pred dodajanjem PCB) za 15 minut izpostavljen sterilizaciji pri 121 °C in s tem deaktiviran. Vsi različni mediji z onesnaževalom (kot tudi kontrolni) so bili ob koncu inkubacijske dobe (30 dni) homogenizirani.

5.5.5 SPREMLJANJE PROCESA RAZGRADNJE ONESNAŽEVALA PCB

Razgradnja PCB kongenera je bila določena primerjalno s kontrolnimi vzorci steriliziranega micelija gobe. Vsi poskusi so se izvajali vsaj v dveh ponovitvah.

5.5.6 DOLOČANJE OSTANKOV PCB ONESNAŽEVALA

Ekstrakcija ostankov PCB je potekala z dodajanjem 2 ml etil-acetata v kultivacijsko brozgo in mešanjem. Po zaključeni ekstrakciji se je zmes centrifugirala 15 min pri 4000 x g. Ekstrakcija je bila ponovljena dvakrat z dodajanjem 1 ml etil-acetata.

Določanje koncentracij preostankov PCB v reakcijskih mešanicah je potekalo z uporabo kombinirane plinske kromatografije in masne spektrometrije (GC-MS).

5.5.7 UČINKOVITOST MIKOREMEDIACIJE PCB

Razgradnja PCB 48 z glivo *Grifola frondosa* je bila proučena v inkubacijskem mediju z visoko in nizko vsebnostjo dušika kot tudi v mediju z dodanim ligninom.

Ob dodatku 10 µg PCB 48/ml je gliva kultivirana v mediju z nizko vsebnostjo dušika kazala slabe aktivnosti razgradnje onesnaževala. Aktivnosti encimov pri razgradnji so se bistveno zvišale ob dodajanju lignina v medij, kar je imelo za posledico povečanje razgradnje PCB.

Gliva *Grifola frondosa* gojena v mediju z visoko vsebnostjo dušika je imela bistveno nižjo razgradnjo PCB v primerjavi z rastjo v mediju z nizko vsebnostjo dušika, kar ni izboljšalo niti dodajanje lignina v rastno gojišče. Zaradi zanemarljive razgranje PCB rezultati teh eksperimentalnih meritev v preglednici 3 niso vključeni.

V primerih, ko je bilo gojišču dodanih 100 µg PCB 48/ml je gliva v mediju z nizko vsebnostjo dušika in dodanim ligninom kazala dobro razgradnjo onesnaževala. V nasprotnem primeru je kultura glive v mediju z visoko vsebnostjo dušika in lignina razgradnja PCB ostala nizka.

Preglednica 4: Povprečna razgradnja PCB onesnaževala Aroclor 1248 pri kultivaciji glive *Grifola frondosa* po 60 dneh kultivacije

PCB Substitucija klora	Razgradnja PCB (%)		
	10 µg/ml*		100 µg/ml*
	MND	MND+lignin	MND+lignin
2,3	82	89	70
3,4	67	79	55
4,5	/	33	18
5,6	/	32	16

MND - Medij z nizko vsebnostjo dušika; * dodane koncentracije Aroclor 1248

Vir: Povzeto in prirejeno po Seto in sod., 1998

6. REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz primerjalne analize izbranih študij ugotavljamo, da se je v prvi študiji primera uporabljala gliva vrste *Phanerochaete chrysosporium*, sev ATCC 24 725, v drugem pa gliva *Grifola frondosa* sev M51. Obe glivi se uvrščata v deblo *Basidiomycota* z razliko, da se gliva *Phanerochaete chrysosporium* uvršča med neužitne, *Grifola frondosa* pa med užitne gobe. Obe glivi najdemo tudi v Sloveniji. Dodatno je goba *Grifola frondosa* v naravi zaščitena in je ni dovoljeno nabirati. Uvrščena je tudi na rdeči seznam ogroženih gliv.

Dodatna razlika poleg uporabljenih gliv je bila zaznana tudi v uporabi različnih PCB-jev v poskusih. V prvem primeru se je uporabil PCB Delor 103 in Delor 106, ki sta ekvivalenta Aroclor 1254 in Aroclor 1260. V drugem primeru so v eksperimentalnem postopku razgradnje PCB uporabljali PCB 48, ki je ekvivalent Aroclor 1248. Pomembna razlika med uporabljenimi PCB spojinami je, da imajo različne koncentracije klora v svoji kemijski strukturi. Koncentracije klora so bile v primeru glive *Phanerochaete chrysosporium* višje.

Opazna razlika med izbranimi primeroma je tudi v načinu pristopa h kultivaciji uporabljenih gliv. V prvem primeru so glivo *Phanerochaete chrysosporium* kultivirali v bioreaktorju in z izjemno natančnimi podatki o postopkih eksperimentalnega okolja. V drugem primeru je bilo zaznati pomanjklivosti v samem postopku kultivacije glive *Grifola frondosa*, vendar pa je bila poudarjena razlika v uporabljenih gojitvenih medijih. Rezultati so kljub različnim uporabljenim medijem pokazali, da je v rastnem mediju pomembna koncentracija dušika, saj vpliva na tvorbo lignolitčnih encimov in s tem posledično na sposobnost razgradnje PCB. Dodatno je bilo v drugem primeru dokazano tudi, da na učinkovitost razgradnje PCB v okolju vpliva prisotnost lignina v mediju.

Zadnja četrta opazna razlika v eksperimentalnem postopku je bil časovni interval kultivacije gliv v prisotnosti onesnaževala PCB. V prvem primeru je eksperiment trajal 11 dni, v drugem primeru pa 60 dni. V tem časovnem intervalu je bil v prvem primeru PCB dodan v medij na začetku kultivacije, medtem ko je bil v drugem primeru dodajan v desetdnevni intervalih.

Kljub številnim in signifikantnim razlikam v eksperimentalnih pristopih lahko zaključimo, da je neodvisno od uporabljene glive za procese mikoremediacije PCB iz okolja zelo pomembna vsebnost dušika in prisotnost lignina v kultivacijskih medijih. V obeh primerih je bilo dokazano, da rastna gojišča, v katerih je dušik limitni faktor, stimulirajo tvorbo in izločanje ekstracelularnih lignocelulitičnih encimov. Številne raziskave nakazujejo, da se v medijih z omejeno količino dušika glive odzovejo s produkcijo več encimov, ki bi lahko bili odgovorni za razgradnjo PCB kot tudi drugih onesnaževal (Gadd in sod., 2001). Dodatno je bilo v primeru glive *Phanerochaete chrysosporium* ugotovljeno, da sama ekstracelularna encima MnP in LiP neposredno ne vplivata na lastnosti razgradnje PCB same glive. V primeru glive *Grifola frondosa* pa je bila ugotovljena pomembnost prisotnosti lignina v gojišču, ki stimulira tvorbo encimov in sposobnost razgradnje PCB.

Ključna ugotovitev primerjalnih študij je, da obe glivi kljub različnim pogojem kultivacije ter eksperimentalnega okolja potencialno zelo dobro razgrajujeta kemijsko različne vrste (kongenerje) PCB onesnaževal. Rezultati tudi nakazujejo, da je lahko uporaba različnih gliv v mikoremediacijah učinkovit in zanesljiv način bioremediacije PCB v okolju. Rezultati nakazujejo, da se mikoremediacije lahko enostavno in stroškovno učinkovito izvajajo na kraju onesnaženja.

Zaključimo lahko, da rezultati obeh primerov potencialno nakazujejo zanesljiv in primeren način in pogoje uporabe gliv za namen mikoremediacij onesnaženja s PCB v okolju. Na tej osnovi lahko zaključimo tudi, da je za zanesljivost in učinkovitost mikoremediacij izrednega pomena poznavanje lastnosti onesnaževala, potencialni način in metabolizem razgradnje ter pogoje kultivacije uporabljene glive kot mikoremedianta. Pogosto na področju mikoremediacij še vedno ostajajo odprta raziskovalna vprašanja, ki so vezana na poznavanje samega metabolizma razgradnje določenega onesnaževala z glivo, saj nam to omogoča boljše vodenje samega procesa mikoremediacije v realnih pogojih. To se je pokazalo tudi v proučevanih primerih razgradnje PCB-jev, ko so v bioprocseh, kjer je bil dušik limitni faktor in dodatek lignina, imeli vpliv na razgradnjo onesnaževala v bioprocusu.

7. POVZETEK

Temeljni cilj diplomskega dela je bilo predstaviti problematiko onesnaženega okolja in remediacijo tega z uporabo gliv. Hiter razvoj industrije v prejšnjem stoletju je vključeval produkcijo novih umetnih spojin, ki so temeljile na uporabi organske sintezne kemije. Nove sintetizirane spojine so bile lahko zelo toksične, strupene in v okolju težko razgradljive. Z namenom reševanja problemov, ki se zaradi teh spojin pojavijo, se začnejo razvijati različni načini remediacije okolja, med katere uvrščamo tudi mikoremediacije.

V prvem delu smo s pomočjo strokovne literature predvsem opisali fiziologijo gliv, njihovo vlogo v naravi in osnove mikoremediacije. Glive imajo zmožnost biorazgradljivosti, biosorpcije, bioremediacije onesnaženih tal, akumulacije težkih kovin, mineralizacije, filtracije, transformacije ter presnove različnih spojin. Transformacija in razgradnja onesnaževal v glivah poteka preko encimskih sistemov. V diplomskem delu smo na podlagi zbranih in analiziranih strokovnih del predstavili potencial gliv pri razgradnji onesnažil v okolju.

Drugi del diplomskega dela je vseboval analizo in primerjavo že znanih podatkov iz dveh različnih znanstvenih raziskav. V raziskavah je bil prikazan postopek in učinkovitost razgradnje kemijsko različnih vrst onesnažila PCB. Rezultati analize podatkov nakazujejo, da imata glivi *Phanerochaete chrysosporium* in *Grifola frondosa* v različnem eksperimentalnem okolju in pogojih kultivacije uspešen potencial razgradnje onesnaževala PCB. Neodvisno od uporabljene glive so analize in rezultati pokazali pomembnost prisotnosti lignina in vsebnosti dušika v kultivacijskih medijih pri procesu razgradnje PCB.

Pregled tega področja v okviru diplomskega dela izpostavlja uporabnost gliv pri odstranjevanju toksičnih snovi iz okolja. Na osnovi literaturnih podatkov imajo sposobnost razgradnje toksičnih in dolgotrajnih molekul, kot je PCB, v preprostejše in manj toksične ali celo netoksične spojine. Na osnovi pregleda področja zaključujemo, da lahko štejemo mikoremediacije z uporabo gliv med potencialno zanesljive tehnologije, ki jih lahko enostavno in tudi stroškovno učinkovito izvajamo na kraju samem.

8. SUMMARY

The main aim of this thesis was to present the problems of environmental pollution and remediation of polluted areas using fungi. Rapid industrial development in the last century involved the production of new synthetic compounds which are based on organic synthetic chemistry. Newly synthesized compounds are potentially toxic and very difficult to degrade in the environment. In order to solve the problems that occurred due to these compounds, various ways of environment remediation began to develop, among which are also mycoremediations.

In the first part of the thesis, we have, through professional literature study, mainly described the physiology of fungi, their role in nature and the basics of mycoremediation. Fungi have abilities of biosorption, bioremediation of contaminated soils, biodegradability, accumulation of heavy metals, mineralization, filtration, transformation and metabolism of various compounds. Transformation and degradation of pollutants in fungi is carried out through their enzymatic systems. In the diploma thesis, on the basis of collected and analyzed professional works, we presented the potential of fungal degradation of pollutants in the environment.

Analysis and comparison of already known data from two different scientific studies was included in the second part of the thesis. Research demonstrated the process and effectiveness of PCB degradation. Results of the analysis indicate that *Phanerochaete chrysosporium* and *Grifola frondosa* have good potential for PCB degradation in different environment and cultivation conditions. PCB degradation process results showed the importance of lignin presence and nitrogen content in cultivation media, regardless of the fungus used.

Review of mycoremediation methods under the framework of this thesis highlights the promising use of fungi in removing toxic substances from the environment. Literature data suggests they have the ability to decompose toxic and long chain molecules such as PCBs into simpler and less toxic or non-toxic compounds. Based on our literature review, we conclude that using fungi is a potentially very reliable and cost effective technology that can easily be performed »in situ«.

9. VIRI IN LITERATURA

Adebusoye S.A., Picardal F.W., Ilori M.O., Amund O.O. (2008). Influence of chlorobenzoic acids on the growth and degradation potentials of PCB-degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, str. 1203–1208.

Alexander M. (1999). *Biodegradation and bioremediation* 2nd edition. Boston, Academic Press, str. 455.

Arzenšek B., Tratnik B., Malovrh B. (2015). *Slovenski gobarski vodnik*. Ljubljana, Modrijan založba d.o.o. , str. 363.

Askar A., Ibrahim G., Osman K. (2007). Biodegradation kinetics of bromoxynil as a pollution control technology. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 33, str. 111–121.

Atagana H., Haynes R., Wallis F. (2003). The use of surfactants as possible enhancers in bioremediation of creosote contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution* 142, str. 137–149.

Baarschers W., Heitland H. (1986). Biodegradation of fenitrothion and fenitrooxon by the fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34, str. 707–709.

Baird C. (2003). *Environmental chemistry*. 2nd edition. New York, W.H. Freeman and company, str. 557.

Bhatnagar S., Kumari R. (2013). Bioremediation: A sustainable tool for environmental management – A review. *Annual Review & Research in Biology*, 3(4), str. 974–993.

Bugg T., Ahmad M., Hardiman E. M., Rahmanpour R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports: Current Developments in Natural Product Chemistry* 28, str. 1871–1960.

Cairney J., Meharg A. (2003). Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *European Journal of Soil Science* 54, str. 735–740.

Christie P., Li X., Chen B. (2004). Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant Soil* 261, str. 209–217.

Čvančarova M., Kresinova Z., Filipova A., Covino S., Cajthaml T. (2012). Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88, str. 1317–1323.

Dighton J., White F. J., Oudemans P. (2005). *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem* 3rd edition. Florida, CRC Press, str. 936.

Finlay R., Wallander H., Smits M. (2009). The role of fungi in biogenic weathering in boreal forest soils. *Fungal Biology* 23, str. 101–106.

Fomina M., Alexander I., Hillier S., Gadd G. (2004). Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi. *Geomicrobiology Journal* 21, str. 351–366.

Fomina M., Charnock J., Hillier S., Alvarez R., Livens F., Gadd G (2008). Role of fungi in the biogeochemical fate of depleted uranium. *Current Biology* 18, str. 375–377.

Fragoheiro S. (2005). Use of fungi in bioremediation of pesticides. Cranfield, Applied Mycology Group Institute of Bioscience and Technology, str. 241.

Freitas A., Moura G., Lima M., Souza P., Silva C., Campos G., Nascimento A. (2011). Role of the morphology and polyphosphate in *Trichoderma harzianum* related to cadmium removal. *Molecules* 16, str. 2486–2500.

Gadd G. M., Watkinson S. C., Dyer P.S. (2007). *Fungi in the environment*. New York, Cambridge University Press, str. 386.

Gadd G.M. (2001). *Fungi in bioremediation*. Cambridge, Cambridge University Press, str. 385.

Gadd G.M. (2010). Metals, minerals and microbes. *Geomicrobiology and bioremediation. Microbiology* 156, str. 609–643.

Gan J., Zhu P., Aust S., Lemley A. (2003). *Pesticide Decontamination and Detoxification*. Washington DC, Oxford University Press, str. 280.

George A. L., Bennett A. (2005). *Case studies and theory development in the social science*. Cambridge: MIT Press, str. 350.

Gerring J. (2004). What is a case study and what is it good for? *The American Political Science Review*, 98, št. 2, str. 341–354.

Ghahfarokhy M., Goltapeh E., Purjam E., Pakdaman B., Modarres S., Varma A. (2011). Potential of mycorrhiza-like fungi and *Trichoderma* species in biocontrol of take-all disease of wheat under greenhouse condition. *Journal of Agricultural Science and Technology* 7, str. 185–195.

Gohre V., Paszkowski U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, str. 1115–1122.

Grodnitskaya I., Sorokin N. (2006). Use of micromycetes *Trichoderma* for soil bioremediation in tree nurseries. *Biological Bulletin* 33, str. 400–403.

Gusse A., Miller P., Volk J. T. (2006). White-Rot fungi demonstrate first biodegradation of phenolic resin. *Environmental Science & Technology* 40, str. 4196–4199.

Harbhajan S. (2006). *Mycoremediation. Fungal bioremediation*. New Jersey, John Wiley & Sons, str. 592.

Haight R., Neogy R., Vonderhaar S., Krishnan E., Safferman S., Ryan J. (1995). Land treatment alternatives for bioremediating wood preserving wastes. *Hazardous Waste and Hazardous Materials* 12, str. 329–344.

Hibbett D. S., Bindera M., Bischoff J. F, Blackwell M., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological research: volume 111, issue 5*, str. 509–547.

Ivanov A. I. (1974). Effect of simazine on soil feeding conditions. *Agrokimiya* 3, str. 113–115.

Jennings D. H. (1995). *The Physiology of Fungal Nutrition*. Cambridge: Cambridge University Press, str. 623.

Jogan N., Kaligarič M., Leskovar I., Seliškar A., Dobravec J. (2004). *Habitatni tipi Slovenije. Tipologija*. Ljubljana, Agencija RS za okolje, str. 66.

Katayama A., Matsumura F. (1993). Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, str. 1059–1065.

Kobayashi K., Katayama H. K., Tobita S. (1996). Isolation and characterization of microorganisms that degrade 4-chlorobiphenyl to 4-chlorobenzoic acid. *The Journal of General and Applied Microbiology* 42, str. 401–410.

Kogut B., Ragin C. (2006). Exploring complexity when diversity is limited: institutional complementarity in theories of rule of law and national systems revisited. *European Management Review*, 3, št. 1, str. 44–59.

Krčmar P., Kubatova A., Votruba J., Erbanova P., Novotny Č. , Šašek V. (1999). Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, str. 269–276.

Krupa P., Kozdroj J. (2004). Accumulation of heavy metals by ectomycorrhizal fungi colonizing birch trees growing in an industrial desert soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, str. 427–430.

Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2007). *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Ed. Berlin, Springer-Verlag, str. 350.

Kulshreshtha S., Mathur N., Bhatnagar P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 2014, 4:29, str. 7.

Lamar R.T., Bogan B.W., Burgos W.D., Tien M. (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[*a*]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology* 28, str. 250–254.

Lamour A., Termorshuizen A. J., Volker D., Jeger M. (2007). Network formation by rhizo-morphs of *Armillaria lutea* in natural soil. Their description and ecological significance. *FEMS Microbiology Ecology* 62, str. 222–232.

Lindahl B. D., Olsson. S. (2004). Fungal translocation. Creating and responding to environmental heterogeneity. *Mycologist* 18, str. 79–88.

Mansur M., Arias L., Copa-Patino M., Flardh M., Gonza´lez A. (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95, str. 1013–1020.

Martens R., Zadrazil F. (1998). Screening of white-rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia Microbiologica* 43, str. 97–103.

Mason A. K., Losos, J. B., Singer S. R. (2017). *Biology* 11th edition. New York, McGraw-Hill, str. 1282.

May R., Schröder P., Sandermann H. Jr. (1997). Ex-situ process for treating PAH-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Science & Technology* 31, str. 2626–2633.

Medmrežje 1: Global Biodiversity Information Facility. www.gbif.org (8. 2. 2017).

Medmrežje 2: Results of fungal bioremediation application in soil. <http://www.earthfax.com> (19. 2. 2017).

Medmrežje 3: Aroclor 1248 - National Library of Medicine HSDB Database. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6356> (22. 5. 2017).

Medmrežje 4: *Phanerochaete chrysosporium*. http://www.diark.org/diark/species_list/Phanerochaete_chrysosporium_RP-78 (22. 8. 2017).

Medmrežje 5: *Grifola frondosa*. http://www.diark.org/diark/species_list/Grifola_frondosa (22. 8. 2017).

Medmrežje 6: Structure of lignocellulosic biomass. http://www.ltr.ethz.ch/en/research/green_chemistry.html (16. 9. 2017).

Mesec B. (1998): Uvod v kvalitativno raziskovanje v socialnem delu. Ljubljana: Visoka šola za socialno delo, str. 470.

Moore D., L. A. Novak Frazer (2002). *Essential Fungal Genetics*. Berlin, Springer Verlag, str. 357.

NTP - National Toxicology Program (2016). Report on Carcinogens, Fourteenth Edition.; Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, str. 875.

O'Brien B. L., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J. M., Vilgalys R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, str. 5544–5550.

Oberle-Kilic J., Dighton J., Arbuckle-Keil G. (2013). Atomic force microscopy and micro-ATR–FT-IR imaging reveals fungal enzyme activity at the hyphal scale of resolution. *Mycology* 4, str. 44–53.

Obire O. (1988). Studies on the biodegradation potentials of some microorganisms isolated from water systems of two petroleum producing areas in Nigeria. *Nigerian Journal of Botany* 1, str. 81–90.

Pakdaman B., Goltapeh E. (2006). An in vitro study on the possibility of rapeseed white stem rot disease control through the application of prevalent herbicides and *Trichoderma* species. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, str. 7–12.

Pakdaman B., Khabbaz H., Goltapeh E., Afshari H. (2002). In vitro studies on the effects of sugar beet field prevalent herbicides on the beneficial and deleterious fungal species. *Pakistan Journal of Phytopathology* 1, str. 23–24.

Pezdiric M. (2008). Določanje vsebnosti polikloriranih bifenilov - PCB v človeških ribicah (*Proteus anguinus*, *Amphibia: Urodela*) in v sedimentu s področja reke Krupe. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, str. 101.

Piattoni F., Amicucci A., Iotti M., Ori F., Stocchi V., Zambonelli A. (2014). Viability and morphology of *Tuber aestivum* spores after passage through the gut of *Sus scrofa*. *Fungal Ecology* 9, str. 52–60.

Pletsch M., Araujo B., Charlwood B. (1999). Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology advances* 17, str. 679–687.

Polič S. (2005). Onesnaženost in ekološke obremenitve okolja kraškega območja reke Krupe s polikloriranimi bifenili - PCB. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, str. 146.

Rayner A. D. M., Cooke R. C. (1984). *Ecology of saprotrophic fungi*. New York: Longman, str. 415.

Rigas F., Papadopoulou K., Dritsa V, Doulia D. (2007). Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials* 140, str. 325–332.

Rutherford J. (2011). Direct sensing of nutrient availability by fungi. *Fungal biology reviews*. Vol. 25, str. 111–119.

Sagadin J. (2004). Tipi in vloga študij primerov v pedagoškem raziskovanju. *Sodobna pedagogika*, 55, št. 4, str. 88–99.

Seto M., Nishibori K., Masai E., Fukuda M., Ohdaira Y. (1998). Degradation of polychlorinated biphenyls by a 'Maitake' mushroom, *Grifola frondosa*, *Biotechnology Letters*, 22, str. 27–31.

Shen M., Liu L., Li W. (2013). The effect of endophytic *Peyronellaea* from heavy metal-contaminated and uncontaminated sites on maize growth, heavy metal absorption and accumulation. *Fungal Ecology* 6, str. 539–545.

Sikes B. A., Cottenie K., Klironomos J. N. (2009). Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology* 97, str. 1274–1280.

Simons, H. (2009). Case study research in practice. London: Sage Publications, str. 200.

Stamets P. (2000). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Third edition. Hong Kong, Ten Speed Press, str. 574.

Stamets P. (2005). Mycelium running. How mushrooms can help save the world. Hong Kong, Ten Speed Press, str. 343.

Swift M. J., Heal O. W., Anderson J. M. (1979). Decomposition in Terrestrial Ecosystems. London, Blackwell, str. 372.

Tigini V., Prigione V., Di Toro S., Varese G.C. (2009). Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. Microbial cell factories, str. 14.

Verschuren P. J. M. (2003). Case Study as a Research Strategy: some Ambiguities and Opportunities. International Journal of Social Research Methodology, 6, št. 2, str. 121–139.

Vogrinc J. (2008). Kvalitativno raziskovanje na pedagoškem področju. Ljubljana: Pedagoška fakulteta, str. 225.

Vrabl P., Fuchs V., Pichler B., Schinagl C.W., Burgstaller W (2012). Organic Acid Excretion in *Penicillium ochrochloron* Increases with Ambient pH. Frontiers in Microbiology 2012;3, str. 121.

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

Zachar P., Novotny Č., Voznakova Z., Matucha M., Tesarova E., Sykora D., Kubatova A., Popl M., Šašek V. (1996). Physical factors negatively affecting evaluation of long-term biodegradation experiments of polychlorinated biphenyls. Chemosphere 33, str. 2411–2421.