

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kaja TUDJA

**TOLERANCA IN PRIVZEM Cd, Pb IN Zn PRI DVEH
TEMNIH SEPTIRANIH ENDOFITIH IZ KORENIN
IVE (*Salix caprea* L.) V AKSENIČNIH KULTURAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kaja TUDJA

**TOLERANCA IN PRIVZEM Cd, Pb IN Zn PRI DVEH TEMNIH
SEPTIRANIH ENDOFITIH IZ KORENIN IVE (*Salix caprea* L.) V
AKSENIČNIH KULTURAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**TOLERANCE AND THE UPTAKE OF Cd, Pb AND Zn IN TWO
DARK SEPTATE ENDOPHYTES FROM ROOTS OF GOAT
WILLOW (*Salix caprea* L.) IN AXENIC CULTURES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Marjano Regvar in za somentorja doc. dr. Matevža Likarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Marjana REGVAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matevž LIKAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Polona JAMNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Diploma je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Kaja TUDJA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 581.1(043.2)=163.6

KG toleranca/privzem/Cd/Pb/Zn/temni septirani endofiti/DSE/*Salix caprea*
L./remediacija

AV TUDJA, Kaja

SA REGVAR, Marjana (mentor)/ LIKAR, Matevž (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije

LI 2013

IN TOLERANCA IN PRIVZEM Cd, Pb IN Zn PRI DVEH TEMNIH SEPTIRANIH
ENDOFITIH IZ KORENIN IVE (*Salix caprea* L.) V AKSENIČNIH KULTURAH

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP VIII, 55 str., 1 pregl., 10 sl.

IJ sl

JI sl/en

AI Namen raziskave je bil med izoliranimi endofiti korenin ive (*Salix caprea*), rastoče na onesnaženem območju Mežiške doline, izbrati in identificirati najbolj tolerantne seve na težke kovine Cd, Pb in Zn, ter določiti lastnosti izolatov, pomembne za akumulacijo in toleranco izbranih kovin. Glivne izolate smo štiri tedne gojili na trdnem gojišču z dodanim Cd, Zn ali Pb (pri končni koncentraciji 50 μM ali 100 μM posamezne kovine) in spremljali njihovo rast. Vsak teden smo zabeležili njihovo površino in izračunali hitrost priraščanja. Ob koncu poskusa smo glive odstranili iz gojišča, jih posušili in z metodo atomske absorpcijske spektroskopije (ASS) izmerili vsebnost posamezne težke kovine. Ker nas je zanimala tudi razlika v vsebnosti kovine med mlajšimi in starejšimi deli micelijev, smo micelij ločili na notranji (starejši) in zunanji (mlajši) del. Filogenetske študije so glivna izolata umestile v razred letiomicet, uvrščamo ju med temne septirane endofite (DSE), vendar točne identifikacije ne poznamo. Rezultati so pokazali, da so tako Cd, Pb kot Zn vplivali inhibitorno na razraščanje kolonij in hitrost rasti, pri čemer pa je treba poudariti, da so glive kljub prisotnosti kovin uspevale dalje. Naša predvidevanja, da bodo starejši deli micelijev v primerjavi z mlajšimi vsebovali višje koncentracije kovin, se niso izkazala za pravilna, saj med njimi ni bilo razlik. Najbolj inhibitoren vpliv na rast in razvoj kolonij obeh izolatov je imel Cd, vendar sta ga kljub visokim privzemom oba uspešno tolerirala. Izolata bi lahko prišla v poštev za odstranjevanje Cd in Zn iz onesnaženih območij. Na Pb sta sicer rasla, vendar ni prišlo do privzema v/na celice.. Odpornost obeh izolatov na te kovine sicer nakazuje možnost njune uporabe v remediaciji rizosfere, a da bi dokončno in popolnoma ocenili primernost ter način uporabe v te namene, so potrebne nadaljnje raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 581.1(043.2)=163.6
- CX tolerance/uptake/Cd/Pb/Zn/dark septate endophytes/DSE/*Salix caprea* L./
remediation
- AU TUDJA, Kaja
- AA REGVAR, Marjana (supervisor)/ LIKAR, Matevž (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Studies of Biotechnology
- LI 2013
- TI TOLERANCE AND THE UPTAKE OF Cd, Pb AND Zn IN TWO DARK SEPTATE
ENDOPHYTES FROM ROOTS OF GOAT WILLOW (*Salix caprea* L.) IN
AXENIC CULTURES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO VIII, 55 pg., 1 tab., 10 fig.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The purpose of this study was to select and identify the strains of fungal endophytes, isolated from roots of goat willow (*Salix caprea*), growing on a polluted area of Mežica Valley, which are most tolerant to heavy metals Cd, Pb and Zn and to determine the characteristics of these strains, important for accumulation and tolerance to selected metals. Fungal isolates were grown for four weeks on solid medium with the addition of Cd, Zn or Pb (at a final concentration of 50 μ M or 100 μ M of each metal) and we monitored their growth. Each week we observed the surface and calculated the growth rate. At the end of the experiment we separated fungal colonies from medium and dried them. We used atomic absorption spectroscopy (AAS) to measure the content of specific heavy metal in dried biomass. Because we were interested in the difference of metal content between younger and older parts of the mycelium we separated the inner (older) and outer (younger) part. Phylogenetic analysis placed fungal isolates inside Leotiomycetes. We rank them among the dark septate endophytes (DSE) but accurate identification is not known yet. The results showed inhibitory effect of Cd, Pb and Zn on the proliferation and colony growth rate. It should be noted that fungi grew on despite the presence of metals. Our hypothesis that the older parts of the mycelium compared to younger contain higher concentrations of metals did not prove to be correct as we did not observe any differences among them. The inhibitoriest effect on growth and development of colonies of both isolates was observed for Cd, but despite the high uptake they successfully tolerated this metal. Both isolates are likely to be considered for withdrawal of Cd and Zn from contaminated sites. Colonies grew on Pb but its uptake was not detected. Tolerance of both isolates to these metals suggests the possibility of their application in rhizosphere remediation, but in order to complete and fully evaluate the suitability of isolates and method of their use for remediation purposes further investigation is needed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 CILJI NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROBLEM ONESNAŽENOSTI TAL S KOVINAMI	3
2.2 Cd, Pb IN Zn – LASTNOSTI IN VPLIV NA ŽIVE ORGANIZME	5
2.2.1 Cd	5
2.2.2 Pb	6
2.2.3 Zn	6
2.3 RASTLINE IN KOVINE	7
2.4 GLIVNI ENDOFITI	8
2.4.1 Kaj so endofiti?	8
2.4.2 DSE glive in mikoriza	9
2.4.3 DSE glive in kovine	10
2.5 BIOREMEDIACIJA TAL ONESNAŽENIH S TEŽKIMI KOVINAMI	10
2.5.1 Mikoremediacija	11
2.6 MEHANIZMI ODGOVOROV NA PRISOTNOST KOVIN IN ODPORNOST NANJE	12
2.6.1 Spiranje kovin, kelacija in vezava na komponente celične stene	12
2.6.2 Transport, znotrajcelična kelacija in kompartmentalizacija	14
2.7 POMEN GLIVNIH ENDOFITOV PRI REMEDIACIJI ONESNAŽENIH OBMOČIJ	15
2.8. TRENUTNA PROBLEMATIKA IN NADALJNJE RAZISKAVE	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Gojišča	18
3.1.2 Kemikalije in reagenti	18
3.1.3 Laboratorijski pribor, naprave in drugi pripomočki	19
3.2 METODE	20
3.2.1 Priprava gojišč	20
3.2.2 Gojenje in rast glivnih izolatov	20
3.2.2.1 Glivni izolati	20

3.2.2.2	Molekularna identifikacija glivnih izolatov	21
3.2.2.3	Sekvenciranje in filogenetska analiza	21
3.2.3	Nacepljanje gliv in rast	22
3.2.4	Priprava vzorcev gliv za merjenje koncentracij Cd, Pb in Zn	22
3.2.4.1	Čiščenje, trenje in tehtanje materiala	22
3.2.4.2	Razklop glivnega materiala za merjenje vsebnosti Cd, Pb in Zn z metodo atomske absorpcijske spektroskopije (AAS)	23
3.2.5	Merjenje vsebnosti Cd, Pb in Zn v vzorcih gliv z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS)	24
3.2.6	Statistična analiza	24
4	REZULTATI	25
4.1	IDENTIFIKACIJA GLIVNIH IZOLATOV	25
4.2.	VPLIV Cd, Pb IN Zn NA RAST KOLONIJ GLIVNIH IZOLATOV	27
4.2.1	Vpliv kovin na rast kolonij izolata 146	27
4.2.2	Vpliv kovin na rast kolonij izolata 148	29
4.3.	ANALIZA KONCENTRACIJE TEŽKIH KOVIN V GLIVAH	31
4.3.1	Analiza Cd	31
4.3.2	Analiza Pb	32
4.3.3	Analiza Zn	32
4.4	VPLIV Cd, Pb IN Zn NA HITROST RASTI KOLONIJ	33
4.4.1	Vpliv kovin na hitrost rasti izolata 146	33
4.4.2	Vpliv kovin na hitrost rasti izolata 148	35
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	RAZPRAVA	37
5.1.1	Identifikacija glivnih izolatov	37
5.1.2	Vpliv težkih kovin na hitrost rasti ter površino kolonij obeh glivnih izolatov in analiza koncentracije kovin v mlajših in starejših delih micelijev	37
5.1.2.1	Cd	37
5.1.2.2	Pb	39
5.1.2.3	Zn	41
5.1.3	Biotehnoška vrednost rezultatov	43
5.2	SKLEPI	44
6	POVZETEK	47
7	VIRI	48
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl.1: Količina Cd, Pb in Zn za dosego posamezne koncentracije kovine v gojišču	18
---	----

KAZALO SLIK

Sl. 1: Uravnoveženi antagonizem med rastlino in endofitom	9
Sl. 2: Ločevanje kolonij na mlajši in starejši del micelija	23
Sl. 3: Filogenetsko drevo združevanja najbližjih sosedov	26
Sl. 4: Morfologija hif kontrolne kolonije in kolonije, rastoče na Cd	27
Sl. 5: Odvisnost površine kolonij glivnega izolata 146 od koncentracije kovin v gojišču	28
Sl. 6: Odvisnost površine kolonij glivnega izolata 148 od koncentracije kovin v gojišču	30
Sl. 7: Primerjava konc. Cd med mlajšimi in starejšimi deli micelijev obeh izolatov	31
Sl. 8: Primerjava konc. Zn med mlajšimi in starejšimi deli micelijev obeh izolatov	31
Sl. 9: Primerjava hitrosti rasti kolonij izolata 146 glede na prisotnost kovin v gojiščih in njihove koncentracije	34
Sl. 10: Primerjava hitrosti rasti kolonij izolata 148 glede na prisotnost kovin v gojiščih in njihove koncentracije	35

1 UVOD

Industrializacija, tehnološki razvoj in pravzaprav celotno človeško delovanje ter moderen način življenja, so poleg mnogih olajšav in napredkov prinesli tudi številne temne posledice, o katerih zadnje čase vse več govorimo. Eno takih predstavlja onesnaženost okolja s težkimi kovinami, ki se kaže v tem, da njihova koncentracija ponekod preseže določene meje in na tak način ogroža vse organizme, živeče v takem okolju. Opredelitve pojma težke kovine temeljijo na različnih kriterijih (specifična gostota, atomsko število in masa,...), sicer pa mednje največkrat uvrščamo nekatere polkovine, prehodne kovine, lantanoide in aktinoide.

V nasprotju s številnimi organskimi snovmi in radioaktivnimi elementi, ki se sčasoma deaktivirajo, njihove negativne lastnosti pa izzvenijo, so kovine obstojne in nerazgradljive. Prst, onesnažena in nasičena s kovinami, predstavlja potencialni vir onesnaženja površine, podzemnih voda, rastlin, živali in na koncu tudi nas samih, saj lahko kovine vstopajo v prehranjevalno verigo in postanejo nevarne za naše zdravje.

Kemijske lastnosti kovin omejujejo učinkovitost razpoložljivih tehnik remediacije, ki so večinoma drage in tehnološko zahtevne. Zadnje čase se vse več uveljavljajo cenovno ugodni in dokaj uspešni procesi bioremediacije, s katero se pri obnovi okolja zanašamo na organizme in procese, ki potekajo v naravi, brez naše pomoči in tehnološkega posredovanja. Eden izmed bolj znanih in izstopajočih procesov bioremediacije je fitoremediacija, ki temelji na uporabi rastlin, le-tem pa so v veliko pomoč številni mikroorganizmi. Največkrat jih povezujemo z mikoriznimi glivami, vendar lahko na tej točki omenimo, da to niso edini ekstremofili in da imajo podobne funkcije tudi glivni endofiti, predvsem temne septirane glive (DSE), ki jih sicer še ne poznamo tako dobro kot prej omenjene mikorizne glive. Na podlagi našega trenutnega znanja o DSE glivah pa sklepamo, da le-te s svojo prisotnostjo v onesnaženih območjih, kjer vladajo ekstremni pogoji in stresne razmere, blagodejno vplivajo na gostiteljske rastline in pripomorejo k obnovi okolja.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

S to raziskavo smo želeli preveriti, kako vpliva prisotnost kadmija (Cd), svineca (Pb) in cinka (Zn) na rast in razvoj kolonij treh glivnih izolatov (oznake 146, 148 in 149), ki smo jih pridobili iz korenin ive, rastoče na s temi kovinami onesnaženem območju Mežiške doline in za katere lahko zagotovo trdimo, da sodijo med DSE glive, vendar točne identifikacije še vedno ne poznamo.

Izolate smo gojili na gojiščih, ki so vsebovala dve različni koncentraciji vsake kovine, velikost s kovinami tretiranih kolonij in hitrost njihove rasti smo primerjali s kontrolnimi kolonijami, poleg tega pa nas je zanimalo, kolikšna je bila koncentracija posamezne kovine, ki so jo glive sprejele vase ter kaj nam lahko pridobljene informacije povedo o bioremediacijskih lastnostih gliv in njihovi toleranci na težke kovine.

1.2 CILJI NALOGE

Namen naše raziskave je bil:

1. Z molekularnimi tehnikami identificirati izbrane najpogostejše glivne izolate izolirane iz korenin ive (*S. caprea*) rastoče na področju s prekomernimi koncentracijami kovin.
2. Testirati rast izolatov v prisotnosti različnih koncentracij kovin, ki so bile prisotne na izvornem rastišču ive (Cd, Zn in Pb).
3. Ugotoviti akumulacijo Cd, Pb in Zn v glivni biomasi.
4. Na podlagi biosorpcijskih lastnosti kolonij glivnih izolatov ugotoviti potencialno primernost njihove uporabe v namene bioremediacijskih tehnik.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pri raziskavah smo postavili naslednje delovne hipoteze:

1. Predvidevali smo, da bo prisotnost Cd, Pb in Zn negativno vplivala na rast in razraščanje kolonij glivnih izolatov ter upočasnila hitrost njihove rasti.

2. Višja kot bo koncentracija posamezne kovine v gojišču, bolj bo inhibitoren njen vpliv na glivo.
3. Starejši deli micelijev bodo privzeli večjo koncentracijo kovin kakor mlajši.
4. Od vseh kovin bo imel Zn (kot esencialni element) najmanj negativen vpliv na rast kolonij.
5. Ker so izolati izolirani iz onesnaženega območja imajo učinkovite mehanizme tolerance, zaradi katerih bodo kolonije preživele tudi višje koncentracije vseh treh težkih kovin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBLEM ONESNAŽENOSTI TAL S KOVINAMI

Opredelitve pojma težke kovine največkrat temeljijo na specifični gostoti kovine v določeni elementarni obliki, atomskem številu in masi, možne so tudi definicije, osnovane na njihovih kemijskih lastnostih in strupenih značilnostih. Med težke kovine največkrat uvrščamo nekatere polkovine, prehodne kovine, lantanoide in aktinoide. Zaradi protislovnih in neenotnih opredelitev se zdi sam izraz zavajajoč, vendar njegove opustitve vsaj še en čas ne moremo pričakovati (Appenroth, 2010).

Kovine v majhnih koncentracijah niso nevarne za organizme, nekatere, kot so Co, Cr, Cu, Mn, Mo in Zn, so celo esencialne za njihovo zdravo rast in razvoj, zato jih tudi imenujemo mikrohranila. O onesnaženosti okolja s kovinami (in posledično njihovi strupenosti za organizme) govorimo, ko koncentracija teh elementov na nekem območju preseže določene meje, pri čemer ni pomembno, ali je določen element mikrohranilo ali ne, saj so visoke koncentracije kovin vedno strupene (Alloway, 1995).

Prekomerna prisotnost kovin v prsti je zaskrbljujoča sama po sebi. V nasprotju s številnimi organskimi snovmi in radioaktivnimi elementi, ki se skozi čas deaktivirajo, so kovine obstojne v okolju in nerazgradljive. Problem torej predstavljajo ravno njihove kemijske lastnosti, ki omejujejo učinkovitost razpoložljivih tehnik remediacije. Prst, onesnažena s

kovinami tako predstavlja potencialni vir onesnaženja površine, podzemnih voda, rastlin, živali in ljudi. Vzroki, da jih najdemo v prsti so lahko naravni procesi, ki sicer predstavljajo le peščico takih emisij, najbolj pa je k njihovem kopičenju prispevalo človeško delovanje – rafinerije, sežigalnice, odpadno blato, gnojila in pesticidi, rudarjenje, metalurgija, vojska, širjenje mest in zgoščevanje prometa. Tveganje, ki ga predstavljajo prekomerne koncentracije kovin v okolju je veliko, da bi ga ocenili pa moramo (poleg količine), poznati tudi njihovo biodostopnost (Vicente in sod., 2008).

V Sloveniji ocenjevanje onesnaženosti tal temelji na določanju celokupne koncentracije onesnažil (v našem primeru so to kovine) v tleh, vendar nam ta informacija ne pove veliko o njihovi dostopnosti za žive organizme. Biodosten je tisti del celokupne koncentracije kovin v tleh, ki ga lahko organizem privzame oz. ki s svojo prisotnostjo vpliva na biološki material. Če želimo določiti tveganje izpostavljenosti ljudi in ostalih organizmov, moramo nujno oceniti biodostopnost kovin v tleh. Pri določanju le-te si lahko pomagamo s testnimi organizmi. Biodostopnost sama pa je pomembna z že prej omenjenega vidika prehajanja kovin v prehranjevalno verigo preko rastja in živalskih organizmov do pridelkov in živil, do katerih dostopamo (Finžgar in Leštan, 2008).

Strupenost kovin v prsti je poleg njihove biodostopnosti ter koncentracije odvisna tudi od fizikalno-kemijskih (pH, organske snovi, teksturni razred itd.) in bioloških (biosorpcija, bioakumulacija, topnost) faktorjev. V kislih tleh se npr. kovine ne obarjajo in ne tvorijo koordinacijskih vezi s talnimi seskvioksidi in organsko snovjo, čemur pravimo kompleksiranje, pač pa prihaja do adsorpcije kovin na talne koloide, kar vodi do posledičnega povečanja njihove mobilnosti ter biodostopnosti. Z nižanjem pH se zaradi tekmovanja s protoni za adsorpcijska mesta na talnih koloidih zmanjšuje delež adsorbiranih kovinskih kationov. Organska snov pa lahko zadrži kovine v tleh s kompleksacijo, adsorpcijo in ionsko izmenjavo. Lastnosti tal imajo torej velik vpliv na dostopnost ter samo usodo kovin (Finžgar in Leštan, 2008).

Pri nas so tla sorazmerno neonesnažena s kovinami, vendar kljub temu obstajajo nekatera žarišča. Območje Celja je onesnaženo s Cd in Zn; Pb, Ni in Cr obremenjujejo območje Jesenic, s Pb, Zn in Cd je onesnažena Mežiška dolina, obremenjena pa so tudi območja ob prometnicah (Lobnik in sod., 1994). Za nas je zanimiva onesnaženost v Mežiški dolini, saj

iz tega območja izhajajo naši glivni izolati. Obremenjenost s kovinami je posledica več stoletij trajajočega rudarjenja in taljenja Pb ter Zn rude. Onesnaževanje se nadaljuje kljub zaprtju rudnika, k čemur prispevajo onesnaženi prašni delci iz talilnice v Žerjavu, odlaganje metalurških odpadkov ter izpusti flotacijskega mulja v reko Mežo. Na tem območju ne gre samo za onesnaženje prsti, temveč tudi za vnos in inhalacijo prašnih delcev ter pitje onesnažene vode, ki je pravzaprav posledica izpiranja kovin iz tal v podtalnico in vire pitne vode, zato je poleg biodostopnosti pomembno določiti tudi mobilnost kovin (Finžgar in Leštan, 2008).

2.2 Cd, Pb in Zn – LASTNOSTI IN VPLIV NA ŽIVE ORGANIZME

2.2.1 Cd

Prekomerno sproščanje Cd v okolje je posledica delovanja elektrarn, grelnih sistemov, kovinske industrije, cementarn in urbanega prometa, sicer pa se v okolje sprošča tudi z mineralizacijo matične kamnine. Pogosto nastopa kot stranski produkt v industriji Zn, s katerim se sicer velikokrat pojavlja tudi v naravi. Najdemo ga v prsti, vodi in rastlinah, ki ga iz prsti tudi privzemajo (Adriano, 2001).

Cd je neesencialna strupena kovina za rastline, ki pa je kemično izrazito podobna mikrohranilu Zn, zaradi česar lahko pride do zamenjave. Rastlina namesto Zn privzame Cd, le-ta pa povzroča motnje v delovanju metabolizma. Ta podobnost, ki si jo delita z Zn lahko delno pojasni razloge za njegov povečan privzem, višje koncentracije in posledično strupenost za organizme (Wuana in Okieimen, 2011).

Sicer pa je Cd znan po tem, da inhibira rast korenin in poganjkov ter vpliva na privzem hranil in homeostazo. Poleg tega moti pravilno delovanje encimov, inhibira z DNK pogojene transformacije pri rastlinah, ovira simbiozo med mikrobi in rastlinami, a obenem poveča predispozicijo rastlin, da jih kolonizirajo glive. Problem nastane, ker ga privzemajo kmetijsko pomembne rastline, zaradi njegove akumulativne narave pa obolevajo živali in ljudje, ki take poljščine uživajo. Pri ljudeh povzroča motnje v metabolizmu Ca in vitamina D, kar se kaže v degeneraciji kosti in hudih poškodbah ledvic, ki lahko vodi tudi do njihove odpovedi, v primeru, da gre seveda za kronično akumulacijo (Kamal in sod., 2010).

2.2.2 Pb

Pb se nahaja v večini kamnin zemeljske skorje in je v tleh slabo mobilan. Večinoma ostaja v vrhnjih slojih tal, vezan na stabilne in netopne minerale (Adriano, 2001). Najbolj stabilna, pogosta in reaktivna oblika svinca je Pb(II), ki tvori mononuklearne ali polinuklearne okside in hidrokside (Wuana in Okieimen, 2011).

Na splošno so rastline dobro zavarovane pred Pb – ker je neesencialna in strupena kovina, ga načeloma ne privzemajo in akumulirajo, vendar tudi to postane mogoče, kadar rastejo na onesnaženih tleh, kjer je njegova koncentracija krepko povečana. V rastlinah lahko Pb zaradi biološkega antagonizma zamenja Ca in nekatere druge elemente, njegovi strupeni učinki pa se večinoma kažejo kot inhibicija respiracije in fotosinteze. Sprejem Pb v rastline je pasiven, primarno se akumulira v koreninah, premeščanje v nadzemne dele pa je omejeno in počasno (Adriano, 2001). Na onesnaženih območjih bodo Pb vase kopicile predvsem listnate rastline (solata), veliko pa se ga nabere tudi na površini korenin, zato moramo posebno pozornost nameniti vrtninam, pri katerih uživamo koren (korenček) (Wuana in Okieimen, 2011).

Pb pri ljudeh povzroča okvare ledvic, vpliva na gastrointestinalni trakt, centralni živčni sistem in rdeče krvničke (Wuana in Okieimen, 2011). Še posebej so nevarnosti zastrupitve s to kovino izpostavljeni otroci, saj le-ta, zaradi pri njih še ne popolnoma razvite bariere med krvjo in možgani, brez težav prehaja v možgane in jih poškoduje, posledice pa se kažejo v hiperaktivnosti, zaostalosti, izpadu motoričnih funkcij, encefalopatiji itd. (Finžgar in Leštan, 2008).

2.2.3 Zn

Prisotnost Zn v naravi je navadno posledica geoloških procesov, običajno se pojavlja kot sestavni del kamninskih mineralov, bogatih s Fe, najdemo pa ga tudi v metamorfnih in magmatskih kamninah, vendar v manjši meri. Obsežen vir Zn predstavljajo tudi raznolike človeške dejavnosti, predvsem mikroelektronika, rudarstvo, tekstilna in pirometalurgična industrija, odpadne vode, pesticidi itd. (Adriano, 2001).

Zn sodi med esencialna rastlinska mikrohranila, saj sodeluje v mnogih ključnih encimskih reakcijah (npr. biosinteza klorofila), poleg tega igra tudi pomembno vlogo v dušikovem metabolizmu (Adriano, 2001). Zn je torej komponenta številnih encimov (dehidrogenaze, proteinaze, peptidaze), vključen je v metabolizem ogljikovih hidratov, proteinov, fosfatov, avksinov ter pri formaciji RNK in ribosomov pri rastlinah (Kamal in sod., 2010).

Pomanjkanje Zn se pri rastlinah kaže kot zmanjšana sinteza proteinov, poleg tega povzroča krajše internodije ter medžilne kloroze, glavni simptomi prekomerne koncentracije Zn pa so izguba turgorja, zmanjšana rast rastlin oz. rastlinskih delov (plodov, listov) ter nekroze na starih listih (Adriano, 2001).

Tako kot za rastline je Zn esencialen element tudi za ljudi. Pomembno vlogo ima pri encimih, povezanih z energijskim metabolizmom, pri izražanju genov ipd. V prehranjevalno verigo vstopa preko rastlinskih pridelkov in živalske hrane, največ Zn pa prehaja v organizem preko zaužitja ali vdihavanja onesnaženega zraka. Akutna zastrupitev se kaže v obliki slabosti, diareje in bolečini v predelu trebuha, kronična strupenost pa se kaže v poslabšani krvni sliki (Adriano, 2001).

2.3 RASTLINE IN KOVINE

Rastline so tako kot ostali organizmi razvile številne mehanizme, s katerimi vzdržujejo fiziološke koncentracije za rast potrebnih kovinskih ionov in zmanjšujejo izpostavljenost neesencialnim kovinam. Za določene mehanizme bi lahko trdili, da so navzoči vedno, vsepovsod, saj so potrebni za ohranjanje globalnega ravnovesja (homeostaze) kovin. Z razstrupljanjem zmanjšujejo količino poškodb, ki nastanejo kot posledica visokih koncentracij kovin, pri čemer pravzaprav prispevajo k sami odpornosti rastlin na stres, ki ga povzročajo kovine. Obstajajo pa tudi mehanizmi, s katerimi rastline preprečujejo kopičenje točno določenih kovin, te strategije vključujejo izločanje kovin iz znotrajceličnega okolja ali pa strupene ione koncentrirajo v posebnih, temu namenjenih predelih (npr. vakuole) in jih na tak način ločijo od občutljivih celičnih komponent. Na povišano koncentracijo kovin v okolju se rastline odzovejo na tri načine. Prvi korak pomeni preprečitev vstopa kovinam preko korenin v rastlino, če pa do tega pride, sledi drugi korak, ki vključuje strategije razstrupljanja ali kopičenja (kelacija, koncentriranje v

vakuolah,...). Nenazadnje sledi aktivacija obrambnih mehanizmov oksidativnega stresa ter sinteza posebnih proteinov in molekul (hormoni) (Manara, 2012). Tudi glive se poslužujejo podobnih mehanizmov odpornosti.

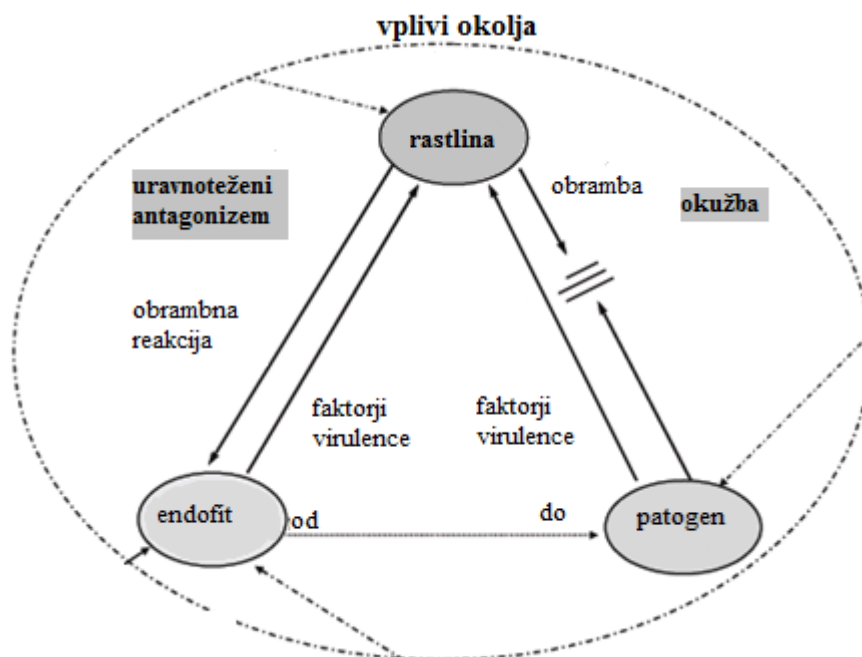
Korenine rastlin so torej tisti organ, ki se praktično prvi sooči s prisotnostjo kovin v prsti in na nek način predstavlja najpomembnejšo zaščito pred vstopom strupenih kovinskih ionov v organizem. Rizosfera je pravzaprav zelo dinamično okolje, v katerem se rastline (preko korenin) srečujejo in integrirajo ne samo s kovinskimi ioni (in prstjo kot tako), pač pa tudi z vodo, hranili in številnimi mikroorganizmi, s katerimi vzpostavijo najrazličnejše odnose. Mnogi med njimi so tudi take narave, da s številnimi mehanizmi izboljšajo, ali pa vsaj olajšajo preživetje tako enim kot drugim akterjem (Kamal in sod., 2010).

2.4 GLIVNI ENDOFITI

2.4.1 Kaj so endofiti?

Endofiti so bakterijski ali glivni organizmi, za katere je značilna notranja kolonizacija tkiv gostitelja ter neopazne oz. neočitne okužbe, kar pomeni, da so okužena rastlinska tkiva vsaj prehodno brez znamenj. Ta definicija sicer opisuje samo trenutno stanje in če jo jemljemo dobesedno, lahko vključuje vse patogene v določenem stadiju razvoja (latentni, zgodnji stadiji virulentne okužbe,...), zato jo moramo zožiti s trditvijo, da zajema vse organizme, ki s svojo okužbo dolgoročno gledano ne povzročajo škode (Schulz in Boyle, 2006).

Znano je, da endofiti prebivajo v celoti znotraj tkiv in lahko rastejo v koreninah, steblih in listih. Ob tem se nam pojavi vprašanje, kako lahko endofiti uspevajo in rastejo v gostitelju, ne da bi povzročili vidne simptome? Taka asimptomatična kolonizacija najbrž predstavlja ravnovesje antagonizmov med gostiteljem in endofitom (Slika 1), kar hipotetično pomeni, da endofiti sicer sintetizirajo metabolite (npr. encime), ki so nujni za okužbo in na prisotnost katerih lahko gostitelj odgovori z enakimi obrambnimi reakcijami, ki se sprožijo v primeru okužbe s patogeni, vendar nobena od reakcij ne bo prevladala. V primeru, da do prevladanja ene strani pride, pa ne govorimo več o interakciji brez simptomov, saj se lahko razvije okužba ali pa gliva odmre (Schulz in Boyle, 2006).



Slika 1: Uravnoteženi antagonizem med rastlino in endofitom (Microbial Root Endophytes, 2006: 8)

2.4.2 DSE glive in mikoriza

Rastline v naravnih ekosistemih torej sobivajo s številnimi organizmi, s katerimi tvorijo raznolike združbe in odnose. Najbolj znana in še vedno zanimiva je mikoriza, ki jo lahko definiramo kot partnerski odnos med glivami in rastlinami. Za večino mikoriznih gliv je značilno, da so obligatni simbionti, kar pomeni, da imajo zelo malo (ali pa sploh ne) sposobnosti za samostojno in neodvisno rast, avtotrofi pa ponavadi niso vključeni v take združbe (Singh, 2006). Včasih smo mislili, da so lahko znotraj korenin rastlin mutualistični simbionti samo mikorizne glive, danes pa vemo, da tak odnos s svojimi gostitelji tvorijo tudi temne septirane endofitske glive (dark septate endophytes, DSE) (Schulz in Boyle, 2006), kamor uvrščamo tudi naše izolate.

DSE glive so v mnogih pogledih neverjetno podobne mikoriznim glivam, v nekaterih primerih znajo celo posnemati njihove strukture (Hartigova mreža, micelijski plašč,...) in predstavljajo najpogostejšo ter najbolj razširjeno skupino nemikoriznih endofitov, ki kolonizirajo (tako kot mikorizne glive) samo korenine. Zanje je značilno, da gre za izjemno raznoliko in prilagodljivo skupino gliv, večinoma askomicet, ki tvorijo melanizirane septirane hife in številne aktivne strukture (klamidiospore, mikrosklerocije) znotraj korenin gostitelja (Sieber in Grünig, 2006).

Za DSE glive velja, da so večinoma ekstremofili, saj se pojavljajo v ekstremnih habitatih, za katere so značilne skrajno neugodne razmere, kakršne so visoka ali nizka temperatura, kisel ali močno bazičen pH, visoka slanost, povečana koncentracija kovin ipd. Tudi mikorizne glive so ekstremofili, vendar njim ravno simbiotski odnos, ki ga imajo z rastlinami, omogoča preživetje v takih razmerah (Singh, 2006). Rastline namreč skozi korenine izločajo v okolje eksudate, to so snovi organskega značaja, in na tak način povečajo vsebnost hranil, poleg tega pa te snovi predstavljajo vir ogljika za številne heterotrofne mikroorganizme, ki jih je ravno zaradi tega toliko v rizosferi. Zanimivo je, da je lahko koncentracija mikroorganizmov v bližini korenin tudi do 500-krat večja kot drugod (Kamal in sod., 2010).

Mikorizne glive v zameno za hranila, ki jih izločajo rastline, s svojim razraščanjem hif občutno povečujejo površino oz. celoten volumen rizosfere, z mrežami hif stabilizirajo prst, izboljšajo njeno strukturo in omogočajo rehabilitacijo zemljišč (Singh, 2006). Podobne funkcije in blagodejen učinek na gostitelja imajo tudi DSE glive in praktično vse endofitske glive, ki s svojo prisotnostjo inducirajo izločanje rastlinskih obrambnih metabolitov (proti patogenom), povečajo njihovo odpornost na bolezni, izboljšajo rast gostiteljev, njihovo toleranco na abiotiki stres ter s sintezo antagonističnih sekundarnih metabolitov zaščitijo rastline pred patogeni in herbivori (Sieber in Grünig, 2006).

2.4.3 DSE glive in kovine

Za območja, v katerih vladajo ekstremni pogoji, je sicer značilna slabša mikorizna kolonizacija, vrstna raznolikost ni tako pestra in prav tako je manj predstavnikov gliv. Veliko vemo o tem, kako taki neugodni pogoji vplivajo na mikorizne glive, kakšni so njihovi mehanizmi odpornosti in v kakšnih odnosih so z gostiteljskimi rastlinami, na drugi strani pa nam DSE glive še vedno predstavljajo veliko uganko. Zaenkrat vemo, da v ekstremnih pogojih relativno dobro kolonizirajo rastline, poleg tega pa kaže, da imajo razmeroma visoko toleranco na povišane koncentracije kovin v okolici, kar nakazuje na njihovo pomembno vlogo pri preživetju gostiteljev v takih ekosistemih (Likar, 2011).

2.5 BIOREMEDIACIJA TAL ONESNAŽENIH S TEŽKIMI KOVINAMI

V grobem poznamo dva načina remediacije onesnaženih tal, in sicer remediacijo s stabilizacijo onesnažil in remediacijo z odstranitvijo le-teh. Izbira je odvisna predvsem od namembnosti območja. Če npr. želimo, da težke kovine ne prehajajo v podtalne vode, bo dovolj, če jih v prsti, ki je sicer ne obdelujemo in na njej ne pridelujemo pridelkov, z metodami stabilizacije zadržimo in tako omejimo njihovo mobilnost (Udovič in Leštan, 2008).

Fizikalno-kemijski in termični postopki remediacije so običajno dragi, zato se vse bolj uveljavljajo cenejši biološki postopki. Tako bioremediacija predstavlja eno izmed najbolj poceni in učinkovitih metod dekontaminacije. Temelji na odstranitvi onesnažila iz trdne ali tekoče faze ali njegovi pretvorbi v manj strupeno obliko in to z uporabo bioloških, kemičnih in fizikalnih naravnih procesov, brez človeškega posredovanja. Dosežena je lahko s procesi, ki dokončno uničijo oz. razgradijo onesnažila (organske snovi), ali s procesi, ki sicer ne razgradijo onesnažil, vendar zmanjšajo njihovo koncentracijo. Bioremediacijo lahko stimuliramo z dodajanjem hranil ali z bogatenjem, t.j. naknadnim dodajanjem aktivnih bioloških udeležencev procesa (Vicente in sod., 2008).

2.5.1 Mikoremediacija

Z izrazom mikoremediacija v splošnem zajemamo uporabo gliv v procesih uničenja oz. odmaknitve strupenih snovi iz okolja. Glive so znane po tem, da lahko razgradijo molekule, kar pomeni, da lahko razbijejo težavne dolgoverižne strupe v enostavnejše, manj strupene komponente (Stamets, 2005). Mikoremediacijske prakse vključujejo umešanje micelijev v onesnaženo prst, polaganje preprog micelijev na onesnažena območja oz. kombinacijo teh tehnik, sami postopki pa so lahko enkratne narave ali pa jih po potrebi ponavljamo (Stamets, 2005).

Uporabnost gliv se kaže tudi na območjih, nasičenih s kovinami, saj lahko akumulirajo znatne količine težkih kovin, in sicer v razponu nekaj odstotkov do 20 % suhe mase – kovine torej privzamejo iz onesnažene prsti s pomočjo mehanizmov, ki so odvisni ali neodvisni od metabolizma. Poleg tega pa glive kot take kvalitativno in kvantitativno vplivajo na mikrobnou populacijo mikorizosfere, saj jih ponavadi vedno spremljajo številne

bakterije in ostale glive, ki vplivajo na vegetacijo z mnogimi interakcijami, pogojenimi z biotskimi in abiotskimi komponentami prsti ali pa s produkcijo vitaminov in hormonov stimulirajo rast rastlin (Turnau in sod., 2006).

Pri iskanju rešitev za vse bolj pereč problem onesnaženosti okolja s kovinami se zato v zadnjih časih veliko govori o biosorpcijskih metodah. Precej zanimanja in idej je usmerjenih v poskuse praktične uporabe kvasovk in gliv, saj jih mikosorpcija težkih kovin dela unikatne. Biološka odstranitev kovin iz okolja je razdeljena v tri kategorije: biosorpcija kovinskih ionov na površini gliv (1), privzem kovin v celice (2) in kemična transformacija kovinskih ionov s strani gliv (3). Za slednji dve točki je potrebna živa biomasa, saj so procesi odvisni od metabolizma (Singh, 2006).

Biosorpcija kovinskih ionov na površini gliv je torej mogoča tudi na neživi biomasi, kar predstavlja zanimivo in alternativno možnost uporabe odmrlih organizmov, ki kažejo visoko afiniteto do kovinskih ionov (kljub pomanjkanju protonov, ki sicer nastanejo med metabolizmom), neobčutljivost na strupenost kovin ter neodvisnost od primernih pogojev za rast, metabolne energije in transporta (Singh, 2006). Kljub vsemu se bomo mi osredotočili na mikoremediacijo s pomočjo živih gliv.

2.6 MEHANIZMI ODGOVOROV NA PRISOTNOST KOVIN IN ODPORNOST NANJE

Nekatere glive kljub težkim razmeram preživijo v okolju, ki vsebuje visoke koncentracije kovinskih ionov in postanejo odporne nanje, kar lahko pripišemo razlikam v privzemu kovin oz. njihovem transportu. Glivne celice namreč poznajo določene mehanizme s pomočjo katerih vzdržujejo homeostazo in na tak način preprečujejo strupenost kovin (Singh, 2006).

2.6.1 Spiranje kovin, kelacija in vezava na komponente celične stene

Glive lahko vplivajo na kovine v prsti na več načinov. V nadaljevanju bodo najprej opisani mehanizmi, kateri se vršijo v rizosferi – v neposredni bližini gliv ter na njihovi površini.

S pomočjo kompleksacije kovinskih ionov z organskimi kislinami, drugimi metaboliti ali siderofori, lahko glive mobilizirajo kovine, s čimer se pravzaprav poveča možnost

privzema le-teh v organizem (višja biodostopnost) in izpiranja kovin iz sistema (Gadd, 2001).

Spiranje (oz. povečana mobilnost kovin) je lahko spodbujeno s protonom ali z ligandom. Kadar je spodbujeno s protonom govorimo o acidolizi, pri čemer glive zakisajo mikrookolje s sekrecijo protonov, organskih kislin in sintezo ogljikove kisline, kar je posledica respiratornega CO₂. Pri spiranju, spodbujenim z ligandom, pa ne gre za nič drugega, kot pa za tvorbo kompleksa med kovino in metaboliti, ki jih izločajo glive. Ti metaboliti so karboksilne kisline, aminokisline, siderofori in fenolne spojine. Oba načina mobilizacije kovinskih ionov sta velikokrat povezana, saj predstavljajo npr. glivne karboksilne kisline vir protonov za raztapljanje (acidoliza) in kelatorskih anionov, ki tvorijo komplekse s kovinskimi ioni (Gadd in sod., 2007).

Spiranje netopnih kovinskih komponent predstavlja pomemben aspekt za sprostitvev anionov (fosfati) in esencialnih kovinskih kationov v oblike, ki jih lahko celice privzamejo in vključijo v biogeokemijske cikle. Na tak način se poveča tudi dostopnost anorganskih hranil rastlinam in ostalim mikroorganizmom. Problem predstavljajo kompleksi kovin in organskih kislin (predvsem citrata), saj so izjemno mobilni in lahko privedejo do izpiranja strupenih kovin iz prsti v podtalnico. Za dokončno obnovo prsti in okolja bi bilo potrebno tako nastale komplekse naknadno razgraditi, možna bi bila tudi biosorpcija (Gadd, 2001).

Najbolj znani ligandi, ekstracelularne molekule, ki nase vežejo kovine, so siderofori, ki imajo sicer visoko afiniteto do železa, vendar lahko nase vežejo tudi druge kovine. Nespecifične ekstracelularne molekule variirajo v velikosti, in sicer od majhnih molekul (organske kisline, alkoholi) do makromolekul (polisaharidi) in vse vplivajo na biodostopnost in strupenost kovin. Zanimiva je sinteza oksalne kisline, ki omogoča imobilizacijo topnih kovinskih ionov ali kompleksov v obliki netopnih oksalatov, ki ravno zaradi te lastnosti izgubijo na strupenosti. Treba je povedati, da obstaja tudi nekaj izjem - topni so oksalati z Li, Na, K in Fe (Gadd, 2001).

Celične stene gliv imajo visoko kapaciteto vezave kovin (biosorpcija), vendar je ta značilnost odvisna tako od vrste glive kot od kovine. V močno onesnaženih prsteh obstaja velika verjetnost, da postanejo vezavna mesta rastočih hifnih vršičkov hitro nasičena s

kovinami. Biosorpcija je sicer mehanizem, ki ni odvisen od metabolne aktivnosti gliv (v nasprotju z izločanjem organskih kislin), možno pa je, da strupenost kovin v glivi povzroči spremembe v kompoziciji celične stene in rasti hif, s čimer se organizem poskuša izogniti ali pa vsaj zmanjšati svojo izpostavljenost kovinam (Colpaert, 2008).

Za DSE glive je značilna močna melaninska pigmentacija. Znano je, da melanini povečajo preživetje v stresnih pogojih, celicam dajejo trdnost in ščitijo glive pred drugimi organizmi. Locirani so v celični steni in/ali na njeni zunanji strani, velikokrat jih najdemo tudi v obliki granul, ki jih lahko glive izločijo v okolje. Glivni melanini vsebujejo veliko komponent (peptidi, maščobne kisline, ogljikovi hidrati,...), ki predstavljajo potencialna vezavna mesta za težke kovine. Sama prisotnost težkih kovin pa mnogokrat inducira oz. pospeši produkcijo melanina pri glivah, za številne melanizirane celične strukture, kakršnih pri DSE glivah ne manjka (mikrosklerociji, melaninske granule oz. klamidiospore), pa je znano, da imajo visoko kapaciteto privzema kovin (White in sod., 1995).

2.6.2 Transport, znotrajcelična kelacija in kompartmentalizacija

Glive se lahko s kovinami spopadejo tudi na tak način, da jih privzamejo, kar se kaže kot vključitev v znotrajcelične komponente, transport ter znotrajcelična precipitacija. Znotrajcelične molekule, ki nase vežejo kovine so npr. metalotioneini in fitokelatini ter sorodni peptidi (Gadd, 2001).

Presežek kovin v celicah lahko povzroči oksidativni stres in z njim povezane poškodbe, pred katerimi se morajo ustrezno zaščititi. Privzem (vsaj esencialnih) težkih kovin in uravnavanje celične homeostaze je striktno nadzorovan. Vsako kovino določajo nje lastne značilnosti, kinetika in poti, skozi katere vstopa in izstopa v celico, njena prisotnost pa povzroči specifične molekularne interakcije in odgovore (Colpaert, 2008).

Znano je, kako penetrirajo esencialne kovine, niso pa še točno znani vsi procesi, ki omogočajo vstop neesencialnim kovinam. Kovine, ki vstopijo v celico, so običajno vezane na proteinske ali neproteinske ligande (zaradi omejene topnosti in reaktivnosti), delež prostih kovin pa je izjemno nizek. Ligandi imajo visoko afiniteto za eno ali nekaj vrst kovin, njihova aktivnost in sinteza pa sta striktno regulirani (Colpaert, 2008).

Vakuole predstavljajo primarno mesto za skladiščenje kovin v glivah. Ker se med drugim v vakuolah nabirajo tudi esencialna mikrohranila, kovine, kakršni sta Zn in Fe, obstaja velika verjetnost, da jih bo organizem slej ko prej potreboval in jih bo moral izčrpati iz vakuole. Zaradi visokega pretoka aktivnih esencialnih kovin, mora biti redoks stanje vakuol precej stabilno, da ne pride do poškodb organelov. V vakuolah pa najdemo tudi številne kelatorje kovin, npr. anorganske ione, fitokelatine, metalotioneine in organske kisline. Kelatorji varirajo glede na vrsto glive in njen hranilni status, poleg tega pa se tudi kovine razlikujejo v afinitetah do kelatorjev, tako Al in Zn kažeta višjo afiniteto za organske kisline, Cu in Cd pa raje tvorita komplekse s fitokelatini (Singh, 2006).

Metalotioneini so proteini z majhno molekulsko maso in imajo visoko afiniteto do Zn, Cd in Cu (Pocsi, 2011). Poleg gliv jih kot odgovor na prisotnost težkih kovin proizvajajo tudi rastline, živali in nekateri mikroorganizmi, fitokelatini pa so proteini, ki jih najdemo večinoma pri rastlinah, algah in številnih mikroorganizmih (Gadd, 2001).

Znotrajcelične precipitacije kovinskih kationov s fosfati, njihove akumulacije v vakuolah in predvsem v posebnih glivnih strukturah, se poslužujejo glivni endofiti, ki s svojim načinom delovanja in zaščite predstavljajo biološko bariero za težke kovine, saj jim omejujejo dostop iz korenin rastlin do poganjkov (Gaur in Adholeya, 2004).

2.7 POMEN GLIVNIH ENDOFITOV PRI REMEDIACIJI ONESNAŽENIH OBMOČIJ

Ko govorimo o bioremediaciji, ne smemo mimo fitoremediacije, s poudarkom na fitostabilizaciji, to je uporabi rastlin v procesu zmanjševanja količin strupenih komponent v prsti, preprečevanju vodne in vetrne erozije ter izpiranja strupenih snovi v podzemne vode. Ključnega pomena pri uporabi rastlin v procesih remediacije so tudi mikroorganizmi, npr. glivni endofiti, ki jo lahko izboljšajo ter pospešijo njeno učinkovitost in namen (Turnau in sod., 2006).

Obnovitvene tehnike, ki vključujejo tako rastline kot mikroorganizme, so že v uporabi na Poljskem, kjer kup odpadkov pokrijejo s plastjo humusa ali kakega drugega materiala, ki prepreči erozijo. Debelina organske plasti niha od 20 cm do 2 m, odvisno od same lokacije. Ta sloj je potreben zato, da se hitreje vzpostavi vegetacija, obenem pa predstavlja nekakšno prepreko, s katero se omejuje prenos težkih kovin v rastline. Zanimivo je, da

vegetacija, s katero umetno naselijo onesnažena območja (dolgoročno gledano) sčasoma propade in izgine, bolj stabilna je vegetacija, ki se spontano pojavi na takih območjih, vendar je ta proces veliko bolj dolgotrajen. Največ težav predstavlja sama aplikacija gliv v praktične namene. Vedeti moramo, da mora biti idealna gliva prilagojena stresnemu okolju, dovolj agresivna, da se lahko razširi preko koreninskega sistema in učinkovita pri zaščiti rastline, poleg tega se mora dobro razmnoževati *in vitro*, dokazana pa mora biti tudi njena toleranca na težke kovine – sevi, ki jih izoliramo iz onesnaženega okolja namreč niso vsi enako odporni na težke kovine (Turnau in sod., 2006).

Glive so s kontroliranjem pretoka hranil pridobile primarno vlogo pri vzpostavljanju ekološkega ravnovesja, saj se lahko z usmerjanjem poteka ciklov hranil hitro prilagodijo spremembam v ekosistemu. Moč in zdravje kateregakoli ekosistema sta posledici raznolikosti glivnih populacij in njihovih interakcij z rastlinami, žuželkami, bakterijami in drugimi organizmi. Z uporabo gliv kot prvih organizmov pri bioremediaciji pride do vzpostavitve temeljev za ostale udeležence bioloških združb, ki sodelujejo pri rehabilitaciji onesnaženega okolja (Stamets, 2005).

2.8 TRENUTNA PROBLEMATIKA IN NADALJNJE RAZISKAVE

Organizmi, ki želijo preživeti v stresnih ekosistemih (v našem primeru je to prekomerna koncentracija kovin), morajo imeti usklajen sistem odgovorov, s pomočjo katerih se lahko soočajo z ekstremnimi razmerami in v njih preživijo. Vrste, ki nimajo učinkovito vodenih procesov razstrupljanja, so slej ko prej obsojene na propad. Nekateri organizmi imajo že vnaprej določeno sposobnost razvijanja specifičnih mehanizmov tolerance na kovine. Taki so npr. prokarionti (pri bakterijah poteka to zelo hitro, pomembno vlogo imajo seveda plazmidi) in nekatere rastline. Še vedno ne vemo, ali so (vsi) glivni endofiti svojo odpornost na težke kovine pridobili zgolj s prilagajanjem (Colpaert, 2008). Vemo npr., da onesnaženje s težkimi kovinami zmanjša (ali celo izniči) infekcijo rastlin z glivami, obenem pa vemo, da na takih težavnih območjih uspevajo avtohotne vrste, ki so na stres prilagojene in so skozi leta in generacije pridobile odpornost na take razmere. Njihova izolacija predstavlja potencialno orožje za inokulacijo rastlin, živečih v ekosistemih, onesnaženih s težkimi kovinami (Gaur in Adholeya, 2004).

Na področju genetike in molekularne biologije je potrebnih še veliko študij s pomočjo katerih bi lahko ločili izolate, ki so občutljivi oz. neobčutljivi na prisotnost kovin. Na tak način bi lahko izolirali prilagodljive, na kovine odporne vrste. Fiziološke študije na kovine odpornih gliv pa bi nam lahko razkrile mehanizme prilagoditve in pravzaprav same odpornosti na kovine, ki jih še ne poznamo (Singh, 2006).

Na splošno imamo še zelo malo znanja o glivnih endofitih, o njihovi uporabi ter gojenju za potrebe v bioremediacijskih postopkih, k čemur pripomorejo tudi težje izvedljive terenske študije (field studies). Za glive je značilna nedoločena rast hif, zato je oteženo določanje še tako enostavnih, a hkrati temeljnih značilnosti populacije, kot so število in velikost posameznih osebkov, sekundarne produkcije itd. To lahko ocenimo le s pomočjo posrednih molekularnih tehnik (Colpaert, 2008).

Problem predstavlja tudi samo gojenje gliv in preučevanje v *in vitro* pogojih. Če DSE glive gojimo v kulturi, pride velikokrat do pojava, ko so reproductivne strukture odsotne, redke ali pa nastanejo pod resnično specifičnimi pogoji, kar otežuje taksonomsko klasifikacijo. Seveda si lahko pomagamo z modernejšimi tehnologijami (molekularna biologija) (Sieber in Grünig, 2006). Določene glive sicer lažje vzgajamo in jih *in vitro* izpostavimo stresu, vendar moramo vedeti, da se lahko glive v laboratorijskih študijah drugače odzovejo na stres, kot bi se sicer v združbi z rastlinami in drugimi organizmi. Če identificiramo toleranco na kovine *in vitro*, moramo nujno napraviti tudi poskus z rastlino (Colpaert, 2008).

Visoka variabilnost in pomanjkanje homogenosti pri eksperimentalnih protokolih, terenskih študijah in bioloških poskusih predstavljajo probleme, ki so značilni za raziskave interakcij med glivnimi endofiti in rastlinami. Variabilnost se kaže pri koncentracijah, trajanju izpostavljenosti komponente, lastnostih prsti, razlikah med toplogrednimi in naravnimi pogoji itd. Te razlike in neenotnosti imajo velik vpliv na pridobivanje podatkov, poleg tega pa otežujejo interpretacijo rezultatov, sklepe in onemogočajo primerljivost (Singh, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Gojišča

Receptura za 800 mL Melin – Norkrans – Marx gojišča:

Kalcijev klorid, CaCl_2 (Merck)	0,04 g
Natrijev klorid, NaCl (Merck)	0,02 g
Kalijev fosfat, KH_2PO_4 (Merck)	0,4 g
Amonijev fosfat, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ (Merck)	0,2 g
Magnezijev sulfat heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	0,12 g
EDTA (Merck)	0,004 g
Glukoza (Kemika)	8 g
Slad (Kemika)	4 g
Agar (Biolife)	8 g
Tiamin (Merck)	8 μg
Destilirana voda	do 800 mL

pH umerjen na 5,7

Glive smo gojili na gojiščih Melin-Norkrans-Marx (Marx, 1969), le da smo osnovni recepturi naknadno dodali ustrezno količino Cd, Pb in Zn (Preglednica 1), da smo dosegli 50 μM in 100 μM koncentracijo posamezne težke kovine.

Preglednica 1: Ustrezna količina $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, PbSO_4 in $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ za doseg ustreznih koncentracij težke kovine v gojiščih:

Kadmijev sulfat, $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	50 μM	100 μM
Svinčev sulfat, PbSO_4 (Kemika)	70,3 mg	140,6 mg
Cinkov sulfat heptahidrat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	17,79 mg	35,58 mg
	50,66 mg	101,32 mg

3.1.2 Kemikalije in reagenti

Molekularna identifikacija in sekvenciranje:

- Komplet GenElute® Plant Genomic Miniprep Kit (Sigma)
- Taq DNK polimeraza (Promega)
- pGEMT-Easy vector (Promega)
- etanol 96 % (Chemo)
- gel za čiščenje (Genomed Jetquick)
- BigDye™ komplet (Applied Biosystems)

Priprava vzorcev gliv za merjenje koncentracij kovin:

- 65 % HNO₃ (Merck)

Merjenje koncentracije kovin v vzorcih z metodo atomske absorpcijske spektroskopije :

- 65 % HNO₃ (Merck) za pripravo 0,2 % HNO₃

3.1.3 Laboratorijski pribor, naprave in drugi pripomočki

Molekularna identifikacija in sekvenciranje:

- terilnica s pestilom
- polavtomatske pipete
- mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- ciklični termostat (MJ Research)
- sekvenator (ABI 3730xl DNA, Applied Biosystems)

Priprava gojišč, nacepljanje gliv in rast:

- tehtnica (Sartorius handy, KERN EW4200-2NM)
- električni gorilnik z magnetnim mešalom (Rotamix 545 MMH Tehnica)
- pH meter (Mettler Toledo)
- steklenice
- merilni valj
- petrijevke premera 9 cm
- alkoholni gorilnik
- plutovrt
- laminarij (PIO LFV 122)

Priprava vzorcev gliv za merjenje koncentracij kovin:

- skalpel
- steklene čaše
- električni gorilnik z magnetnim mešalom (Rotamix 545 MMH Tehnica)
- plastične posodice
- sušilnik (Heraeus instruments SUT 6120)
- terilnica s pestilom
- steklene pipete
- epruvete (16 cm)
- digestorij (Variolab, Mobilien W90 Waldner)

Merjenje koncentracije kovin v vzorcih z metodo atomske absorpcijske spektroskopije:

- steklene pipete
- epruvete
- stojalo za epruvete
- stresalnik (Vibromix 10 Tehnica)
- polavtomatske pipete
- spektrofotometer (Perkin Elmer AAnalyst 100)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava gojišč

Gojišča Melin-Norkrans-Marx smo predhodno avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C in jih prelili v sterilne petrijevke. Pripravili smo povprečno 15 petrijevk za vsak tretma (kontrolne skupine, kolonije, ki so rasle na 50 µM in tiste, ki so rasle na 100 µM koncentraciji težke kovine) posamezne glive.

3.2.2 Gojenje in rast glivnih izolatov

3.2.2.1 Glivni izolati

Za študije vpliva težkih kovin na rast in njihov privzem v organizem smo sprva uporabili tri glivne izolate, DB146, DB148 in DB149, ki smo jih izolirali iz korenin ive, rastoče na območju, onesnaženem s težkimi kovinami (Cd, Pb in Zn). S kolonijami izolata DB149

smo imeli težave, saj niso uspevale – veliko glivnega materiala smo izgubili zaradi okužb, na splošno pa je bila slaba tudi preživelost. Zaradi slabe rasti kolonij izolata DB149 smo se odločili, da glivnega materiala tega izolata ne bomo preučevali dalje, tako da smo v nadaljevanju poskusa upoštevali le rezultate izolatov DB146 in DB148.

3.2.2.2 Molekularna identifikacija glivnih izolatov

Micelije gliv smo strli v tekočem dušiku in iz njih izolirali genomsko DNA z uporabo komercialnega kompleta GenElute® Plant Genomic Miniprep Kit (Sigma), pri čemer smo upoštevali navodila proizvajalca. Vse PCR reakcije smo izvedli v cikličnem termostatu (MJ Research) z uporabo Taq DNA polimeraze (Promega). 25 µL reakcijske mešanice je vsebovalo: 2,5 µL 10x reakcijskega pufra, MgCl₂ v končni koncentraciji 2,5 mM, 200 µM končne koncentracije vsakega nukleotida, 500 nM končne koncentracije vsakega oligonukleotidnega začetnika, 0,75 enot/µL DNA polimeraze in 12,5 µL redčene matrične DNA.

PCR pogoji za ITS1F-ITS4 (Gardes in Bruns, 1993; White in sod., 1990) pare oligonukleotidnih začetnikov so bili 1-minutna denaturacija pri 94 °C, kateri je sledilo 35 ciklov, sestavljenih iz 35 s trajajoče denaturacije pri 94 °C, 53 s prileganja začetnih oligonukleotidov pri 55 °C in 30 s podaljševanja verige pri 72 °C. Čas podaljševanja verige smo z vsakim ciklom podaljšali za 5 s. Na koncu je sledilo še 10- minutno podaljševanje pri 72 °C.

Produkte verižne reakcije s PCR-jem smo očistili z gelom za čiščenje in jih vključili v pGEMT-Easy vektor (Promega, Madison, WI, USA). S tako pridobljenim rekombinantnim vektorjem smo transformirali celice *E. coli* JM109. Transformante smo cepili v petrijevke z LB agarjem (Sigma), ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca ter mu dodali 50 µg/mL ampicilina in X-Gal/IPTG. Uspešno rekombinirane celice smo določili z modro-belimi selekcijskim testom.

3.2.2.3 Sekvenciranje in filogenetska analiza

Pred sekvenciranjem smo preverili pravilnost insertov v vektorjih s PCRjem in začetnima oligonukleotidoma T7 in SP6. Sekvenciranje je bilo opravljeno v družbi Macrogen

(Koreja) na treh kolonijah za glivični izolat (dvoverižno sekvenciranje) s T7 in SP6 začetnimi oligonukleotidi in uporabo BigDye™ kompleta za sekvenciranje (Applied Biosystems) s sekvenatorjem ABI 3730xl DNA (Applied Biosystems).

Da bi ocenili taksonomske značilnosti posameznih glivnih ITS sekvenc smo na podlagi nukleotidnih zaporedij poiskali homologe med objavljenimi nukleotidnimi zaporedji gliv v bazi podatkov GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) z algoritmom BLAST (Altschul in sod., 1997).

Sekvence naših glivnih izolatov so bile poravnane s sekvencami iz genetske banke z uporabo programa MEGA4 (Kumar in sod., 2004). Distančne analize poravnanih zaporedij smo naredili s pomočjo programa MEGA4, analiza po metodi maksimalnega verjetja (ML) pa je bila izvedena v PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003).

Pri distančni metodi združevanja najbližjega soseda (NJ) in ML metodi je bil uporabljen model Tamura-Nei (Tamura in Nei, 1993), ki je bil izbran z Akaikovim informacijskim kriterijem (AIC) v programu jModelTest (Posada, 2008) in Phyml (Guindon in sod., 2003).

3.2.3 Nacepljanje gliv in rast

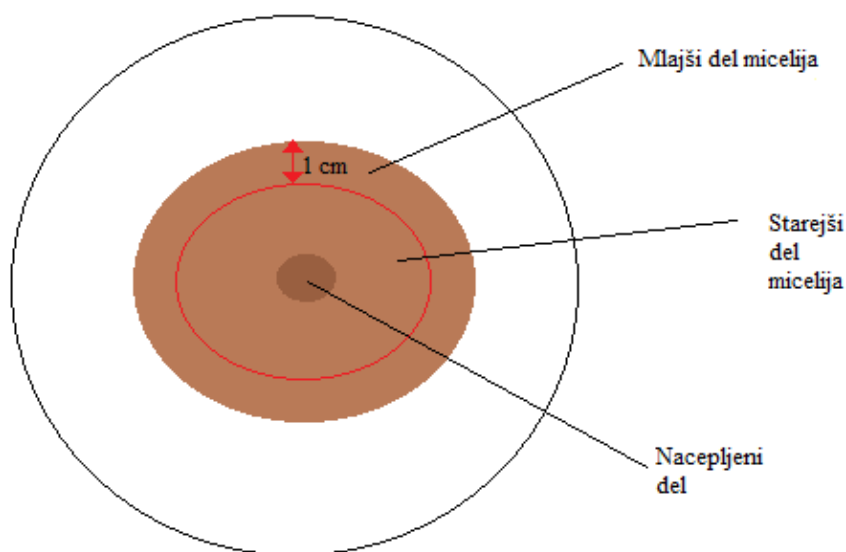
Nacepljanje gliv je potekalo sterilno in v digestoriju. Petrijevke s kolonijami gliv smo približno en mesec hranili v temnici (pri sobni temperaturi) in spremljali rast, pri čemer smo 9., 14., 23. in 28. dan rasti vsako kolonijo fotografirali, kar nam je prišlo prav pri določanju površine in s tem spremljanju rasti. Fotografije kolonij smo analizirali s pomočjo programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), v katerem smo odprli sleherno fotografijo, določili ustrezne parametre, na fotografiji označili premer petrijevk (9 cm) in po robovih kolonij potegnili sklenjeno linijo ter na tak način označili območje, ki ga je zajemala posamezna kolonija. Na podlagi teh podatkov nam je program za vsako fotografijo preračunal površino, ki jo je na gojiščih zavzemala določena kolonija.

3.2.4 Priprava vzorcev gliv za merjenje koncentracij Cd, Pb in Zn

3.2.4.1 Čiščenje, trenje in tehtanje materiala

Po preteku enega meseca smo za potrebe nadaljnjih analiz najprej morali ločiti kolonije gliv od gojišč in jih očistiti vseh nečistoč in ostankov gojišč. To smo naredili tako, da smo

s pomočjo skalpela izrezali kolonije in jih prenesli v čašo z vročo ($T = 80 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$) destilirano vodo, v kateri se je ves preostali agar raztopil in so ostale samo še kolonije. Le-te smo še nekajkrat sprali v destilirani vodi, da smo se rešili morebitnih ostankov agarja in na površino vezanih kovin. Micelij smo ločili na mlajši del (1 cm od roba kolonije) in starejši del micelija, ki je zajemal notranji preostanek kolonije (brez dela, ki smo ga pri nacepljanju prenesli na gojišče) (Slika 2).



Slika 2: Ločevanje kolonij na mlajši in starejši del micelija

Glivni material smo čez noč pustili v sušilniku pri $50 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$, dokler se ni popolnoma posušil. Posušene vzorce smo s pomočjo tekočega dušika strli v prah, natehtali ter ga shranili v označene plastične posodice. Do nadaljnje obdelave smo glivni material hranili na sobni temperaturi.

3.2.4.2 Razklop glivnega materiala za merjenje vsebnosti Cd, Pb in Zn z metodo atomske absorpcijske spektroskopije (AAS)

Najprej smo natehtali po 30 mg suhega in strtega glivnega materiala vsakega vzorca. Za vsak tretma posamezne glive (kontrolne kolonije, kolonije, ki so rasle na gojiščih s $50 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$ koncentracijo težke kovine) smo vzeli 10 ponovitev (od tega 5 za starejši del in 5 za mlajši del kolonije). Material smo natehtali v 16 cm epruvete, v katere smo v digestoriju s steklenimi pipetami odpipetirali po 3 mL 65 % dušikove kisline (HNO_3),

premešali ter pustili stati čez noč v digestoriju, da se je material dobro prepojil s kislino. Nato smo vzorce postopno segrevali v termobloku dokler material ni v celoti mineraliziral.

3.2.5 Merjenje vsebnosti Cd, Pb in Zn v vzorcih gliv z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS)

Atomska absorpcija (Atomic Absorption, AA) je pojav, pri katerem atom po absorpciji svetlobe določene valovne dolžine preide iz svojega osnovnega stanja (t.j. najbolj stabilna orbitalna konfiguracija) v manj stabilno vzbujeno stanje (Ebdon in sod., 1998).

Vsebnost težkih kovin v vzorcih smo določali z metodo plamenske atomske absorpcijske spektroskopije (Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS). Pri tej metodi se vzorec v obliki aerosola v plamenu, ki je mešanica zraka in acetilena, pretvori v paro atomov, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine. Količina absorbirane svetlobe narašča z naraščanjem koncentracije atomov v svetlobnem žarku (Ebdon in sod., 1998).

Pred merjenjem vsebnosti Cd, Pb in Zn z metodo AAS smo razklopljeni material razredčili v 10 mL 0,2 % HNO_3 . Za vsako kovino posebej smo s pomočjo standardnih vzorcev naredili umeritveno krivuljo, ki je tudi osnova za določanje neznanih koncentracij atomov kovin v vzorcih preko zveze med količino absorbirane svetlobe in znano koncentracijo atomov, ki jo predstavljajo standardi. Če je bilo potrebno, smo vzorce še dodatno redčili (5 ali 10-krat) z 0,2 % HNO_3 , tako da se je izmerjena vrednost nahajala v območju umeritvene krivulje.

3.2.6 Statistična analiza

Za statistične analize smo uporabili Daniel's XL Toolbox (brezplačni programski dodatek s katerim smo nadgradili Excel 2007). Grafi so bili izdelani v programu Microsoft Office Excel 2007.

Vpliv prisotnosti in koncentracije težkih kovin na površino (rast) in hitrost rasti kolonij ter koncentracije kovin v miceliju posamezne glive smo ovrednotili z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Bonferroni-Holm post hoc testom pri $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA GLIVNIH IZOLATOV

Filogenetske študije so vse tri glivne izolate umestile v razred letiomicet (Leotiomicete). Distančna metoda združevanja najbližjega soseda (NJ) in metoda maksimalnega verjetja (ML) sta izolat 146 umestili v skupino neizoliranih vrst rodu *Phialophora* iz orhideje *Cypripedium* in ektomikoriznih predstavnikov rodu *Leohumicola*, pozicioniran je bil kot sestrška skupina *Cadophora finlandia/Hymenoschyphus ericae* kompleksa (Slika 3).

Izolata 148 in 149 sta bila postavljena v skupino številnih sekvenc gliv *Cadophora luteo-olivacea*, *Phialophora (Cadophora) malorum* in *Leptodontidium orchidicola*. Pozicija izolatov 148 in 149 je bila podprta z visokimi vrednostmi metode vezanja (»bootstrap«) in sicer 92 % NJ in 77 % ML analizo. Vrednost bootstrap za NJ in ML analize pozicije izolata 146 pa je bila manj kot 60 %.



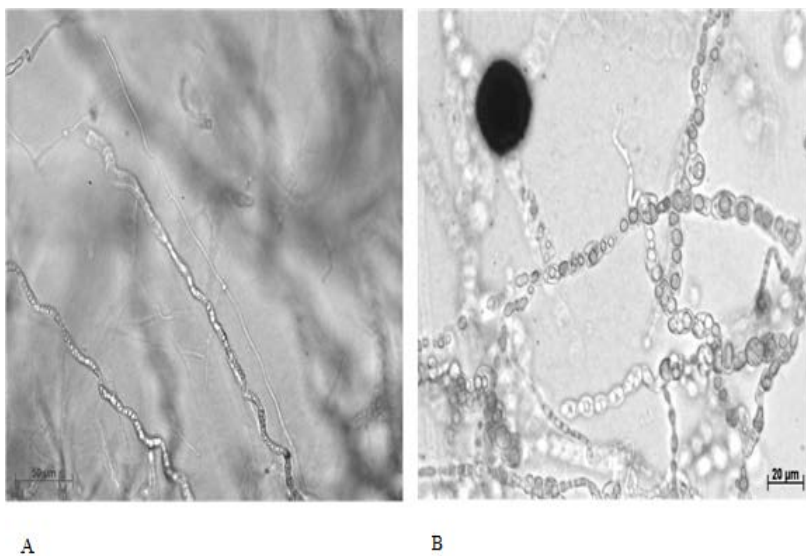
Slika 3: Filogenetsko drevo združevanja najbližjih sosedov (neighbour-joining), ki prikazuje postavitev treh izolatov glivnih endofitov, izoliranih iz korenin ive, *S. caprea* (krepka pisava, v okvirčku), med najbližjimi zadetki iz GenBank in sekvencami glivnih endofitov iz ive, ki je rasla na rastiščih s prekomernimi koncentracijami težkih kovin (krepka pisava). Številke prikazujejo, kje je »bootstrap« podpora nad 60 % (1000 ponovitev).

4.2 VPLIV Cd, Pb IN Zn NA RAST KOLONIJ GLIVNIH IZOLATOV

Glivam, ki so v temi, pri sobni temperaturi en mesec rasle na kontrolnih gojiščih in gojiščih z različnimi koncentracijami posamezne kovine smo 1-krat tedensko ovrednotili njihovo rast z meritvami površine micelija. To smo naredili tako, da smo kolonije fotografirali in jim s pomočjo programa ImageJ in znanega premera petrijevk določili površino. Zaradi slabe rasti kolonij izolata 149 (in ugotovljene tesne sorodnosti izolatov 148 in 149) smo delo nadaljevali le z izolatoma 146 in 148.

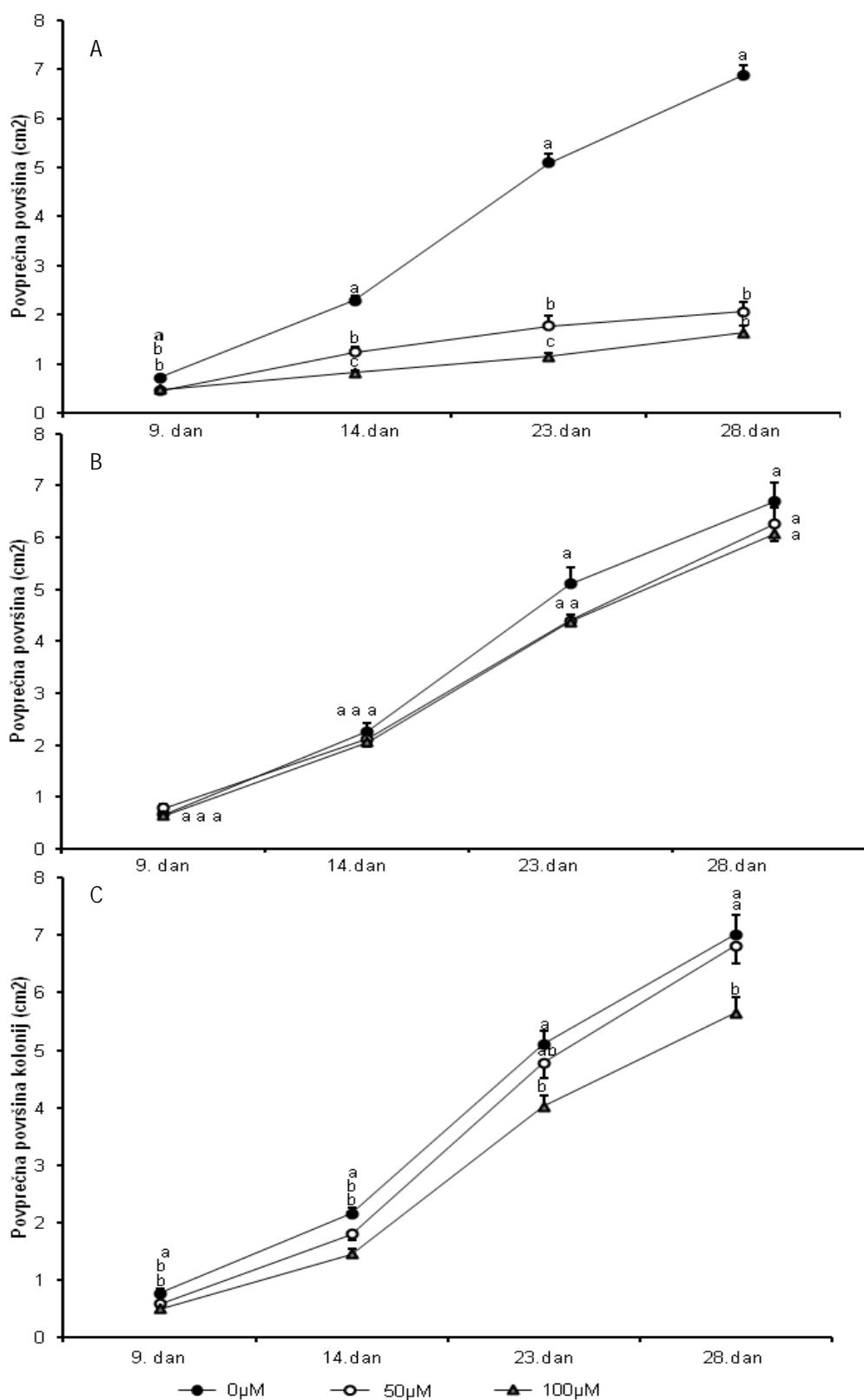
4.2.1 Vpliv kovin na rast kolonij izolata 146

Vpliv Cd na rast kolonij izolata 146 ter njihovo velikost (tretirane kolonije) v primerjavi s kontrolnimi kolonijami brez Cd (Slika 4A) se je med drugim pokazal tudi v spremenjeni morfologiji celic, ki so bile bolj okrogle, kar nazorno prikazuje Slika 4B.



Slika 4: Morfologija hif kontrolne kolonije (A) in spremenjena morfologija hif kolonije, rastoče na 100 µM Cd (B), svetlobni mikroskop

Rezultati prvega tedna rasti na gojiščih s Cd so pokazali, da je njegova prisotnost v dveh različnih koncentracijah močno vplivala na rast kolonij. Zaznali smo statistično značilne razlike med površinami kontrolnih in tretiranih kolonij (Slika 5A).



Slika 4: Odvisnost površine kolonij glivnega izolata 146 od koncentracije Cd (A), Pb (B) in Zn (C) v gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti površin ± standardna napaka, n = (15). Različne črke opisujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami na dan meritve (enosmerna ANOVA, Bonferroni - Holm posthoc test pri $p < 0,05$).

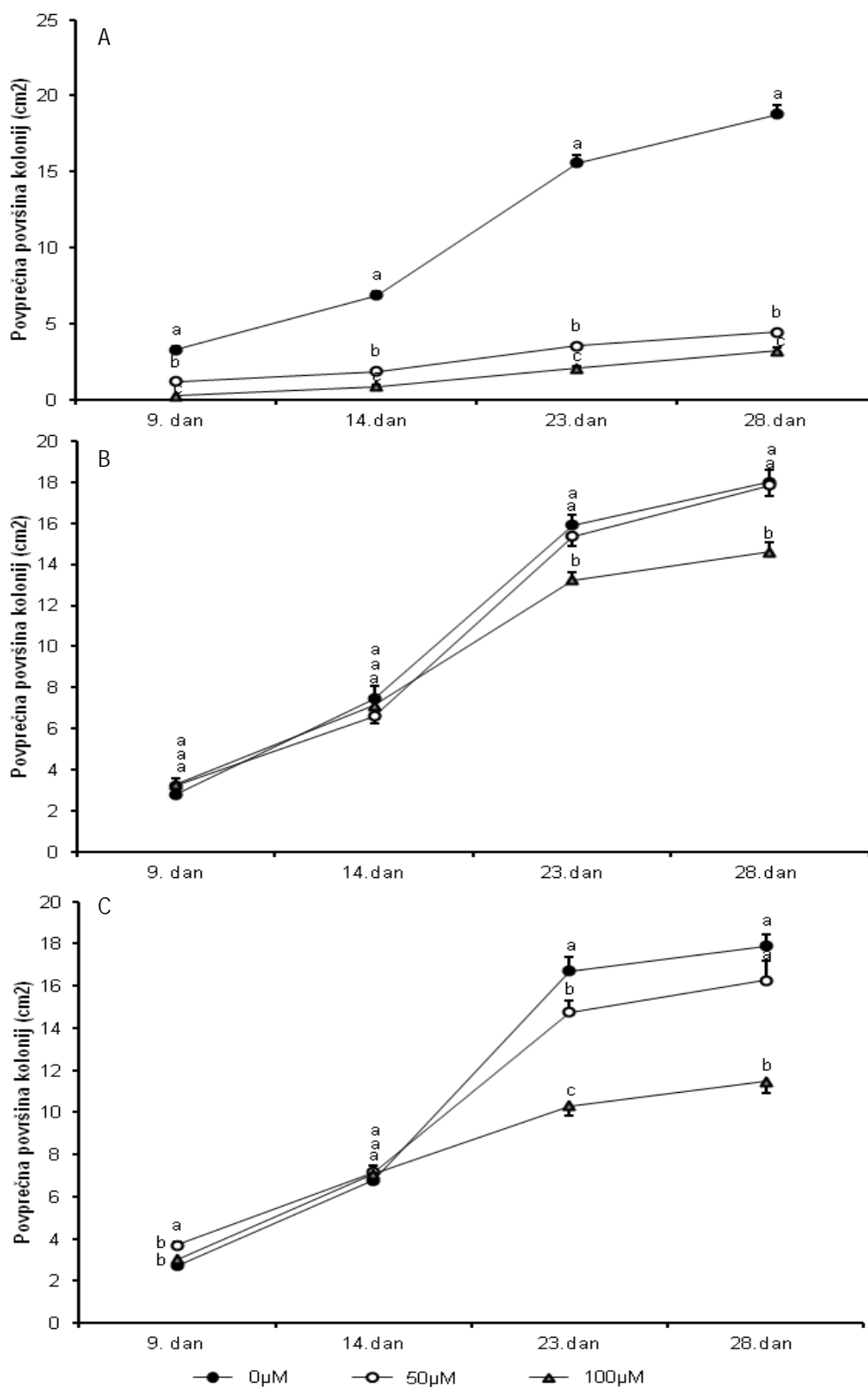
Pri primerjavi površin kontrolnih in tretiranih kolonij v drugem in tretjem tednu rasti smo opazili statistično značilne razlike med vsemi kolonijami, kar pomeni, da se njihova površina spreminja in značilno razlikuje glede na vsebnost Cd oz. glede na njegovo koncentracijo v gojiščih. V četrtem tednu rasti smo zaznali razlike med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, ki so rasle na 50 μM in 100 μM Cd, nismo pa opazili statistično značilnih razlik med tretiranimi kolonijami. Površina kontrolnih kolonij se je na prehodu iz tretjega v četrti teden rasti opazno povečala, česar ne moremo trditi za kolonije, ki so bile izpostavljene Cd.

Za vse štiri tedne rasti na Pb smo ugotovili, da ni statistično značilnih razlik med spremembo površine kolonij gliv glede na koncentracijo Pb v gojišču (Slika 5B), kar pomeni, da prisotnost (oz. odsotnost) te kovine v gojišču nima statistično značilnega vpliva na površino kolonij.

V prvem in drugem tednu rasti na Zn smo zaznali statistično značilne razlike med površino kontrolnih kolonij in kolonij, rastočih na gojiščih s 50 μM Zn in 100 μM Zn, nismo pa opazili razlik pri primerjavi površin tretiranih kolonij. V tretjem tednu smo zabeležili statistično značilne razlike med površino kontrolnih kolonij in kolonij, rastočih na gojiščih s 100 μM Zn, nismo pa zaznali statistično značilnih razlik med tretiranimi kolonijami ter med kontrolnimi kolonijami in tistimi, ki so rasle na gojiščih s 50 μM Zn. V zadnjem tednu smo opazili statistično značilne razlike med površino kontrolnih kolonij in kolonij, ki so rasle na gojiščih s 100 μM Zn, zaznali smo tudi razlike med kolonijami, ki so rasle na 50 μM Zn in tistimi, ki so rasle na 100 μM Zn. Nismo pa opazili statistično značilnih razlik med kontrolami in kolonijami, rastočimi na gojiščih s 50 μM Zn (Slika 5C).

4.2.2 Vpliv kovin na rast kolonij izolata 148

Pri primerjavi površin kolonij smo v vseh štirih tednih rasti na Cd zaznali statistično značilne razlike med vsemi kolonijami, ne glede na koncentracijo te kovine v gojiščih (Slika 6A).



Slika 5: Odvisnost površine kolonij glivnega izolata 148 od koncentracije Cd (A), Pb (B) in Zn (C) v gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti površin ± standardna napaka, n = (15). Različne črke opisujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami na dan meritve (enosmerna ANOVA, Bonferroni - Holm posthoc test pri $p < 0,05$).

V prvem in drugem tednu rasti na gojiščih s Pb pri primerjavi površin kolonij nismo opazili statistično značilnih razlik med njimi, kar pomeni, da v tem času prisotnost (oz. odsotnost) Pb v gojišču ni imela statistično značilnega vpliva na površino kolonij. V tretjem in četrtem tednu pa smo zaznali statistično značilne razlike med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, ki so rasle na gojiščih s 100 μM Pb, ter med kolonijami, ki so rasle na 50 μM Pb in tistimi, ki so rasle na 100 μM Pb, nismo pa opazili statistično značilnih razlik med kontrolnimi kolonijami in tistimi, ki so rasle na 50 μM Pb (Slika 6B).

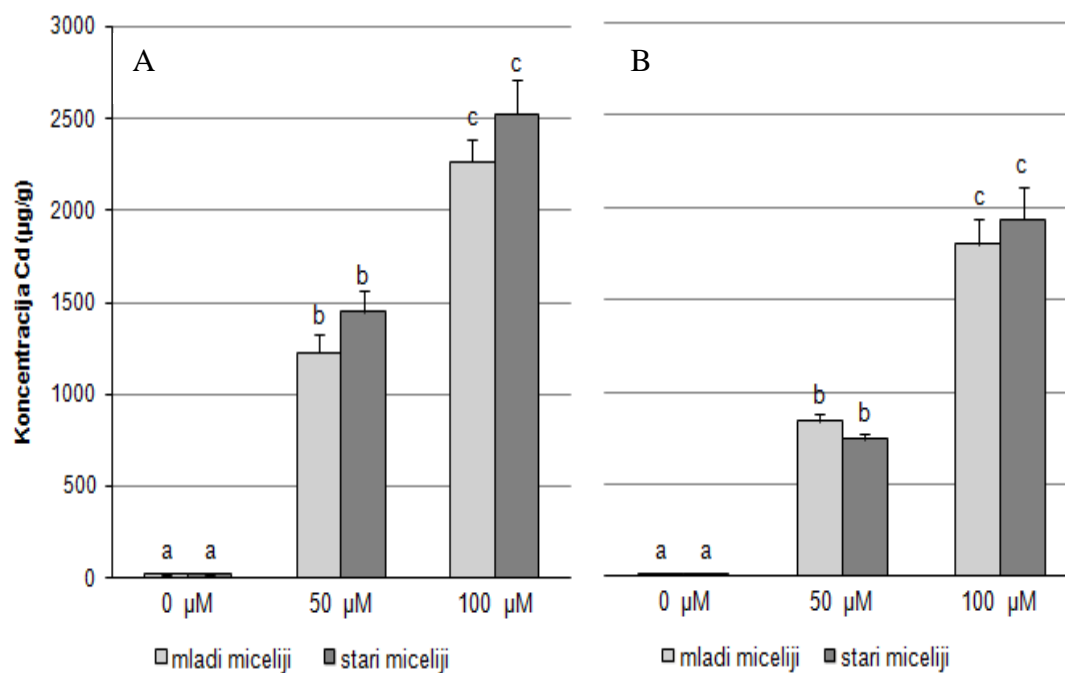
Rezultati prvega tedna rasti na gojiščih s Zn so pokazali statistično značilne razlike med kolonijami, rastočimi na 50 μM Zn in 100 μM Zn, ter med tistimi, ki so rasle na 50 μM Zn in kontrolnimi kolonijami, nismo pa zaznali statistično značilnih razlik med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, rastočimi na 100 μM Zn. V drugem tednu rasti nismo opazili statistično značilnih razlik med kolonijami, v tretjem tednu pa so je situacija spremenila, saj smo opazili statistično značilne razlike med vsemi. V četrtem tednu smo zaznali statistično značilne razlike med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, rastočimi na 100 μM Zn, ter med kolonijami, ki so rasle na 100 μM Zn in tistimi, ki so rasle na 50 μM Zn, nismo pa opazili statistično značilnih razlik med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, rastočimi na 50 μM Zn (Slika 6C).

4.3 ANALIZA KONCENTRACIJE TEŽKIH KOVIN V GLIVAH

Ob zaključku poskusov smo v miceliju (razdeljenem na mlajši in starejši del) izbranih endofitskih gliv izmerili koncentracije Cd, Pb in Zn.

4.3.1 Analiza Cd

Analiza koncentracije Cd med mlajšimi in starejšimi deli micelijev je pokazala, da se je tako v primeru izolata 146 (Slika 7A), kot v primeru izolata 148 (Slika 7B) z višanjem koncentracije kovine v gojišču višal tudi privzem Cd v micelije. Za oba izolata tudi velja, da med mlajšimi in starejšimi deli micelijev kolonij, rastočih na gojiščih znotraj posameznega tretmaja, nismo opazili statistično značilnih razlik v koncentraciji Cd ($p > 0,05$).



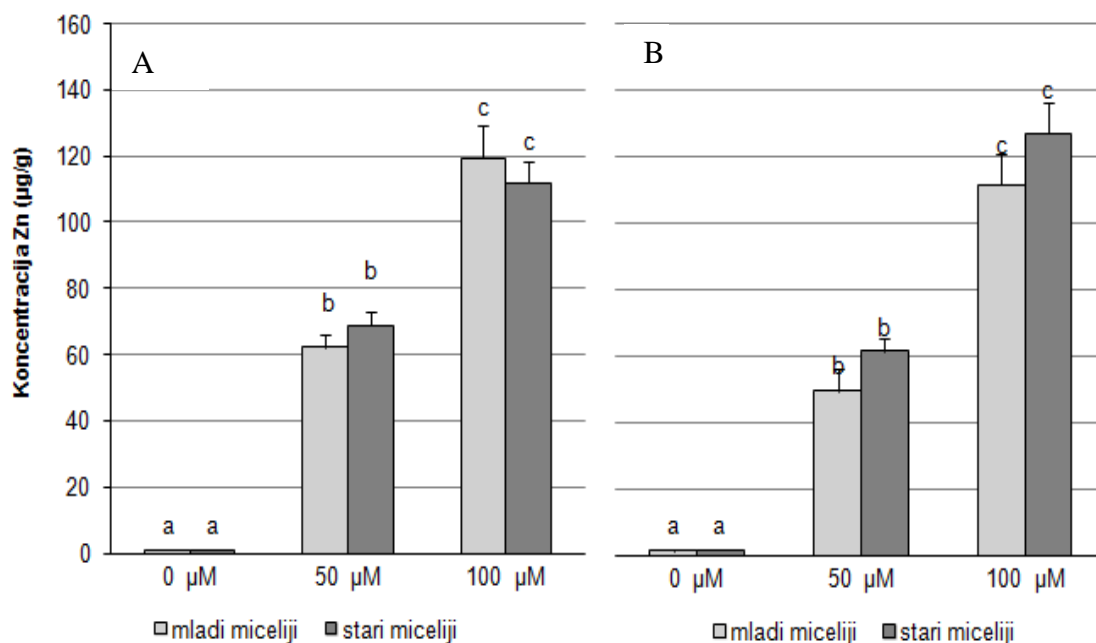
Slika 6: Primerjava koncentracije Cd med mlajšimi in starejšimi deli micelijev izolata 146 (A) in izolata 148 (B) rastočega na gojišču s 50 µM in 100 µM Cd ter brez dodanega Cd. Prikazane so povprečne vrednosti koncentracij ± standardna napaka, n = (5), med mlajšimi in starejšimi deli micelijev ni statistično značilnih razlik.

4.3.2 Analiza Pb

Pri analizi obeh izolatov smo v primeru Pb dobili negativne vrednosti, kar pomeni, da je bila koncentracija te kovine v vzorcih zanemarljiva, oz. pod mejo detekcije, kar smo komentirali, kot da ni prišlo do privzema Pb v glivo.

4.3.3 Analiza Zn

Analiza koncentracije Zn med mlajšimi in starejšimi deli micelijev je pokazala, da se je v primeru izolatov 146 (Slika 8A) in 148 (Slika 8B) z višanjem koncentracije kovine v gojišču višal tudi privzem Zn v micelije. Za oba izolata tudi velja, da med mlajšimi in starejšimi deli micelijev kolonij, rastočih na istovrstnih gojiščih, nismo opazili statistično značilnih razlik v koncentraciji Zn ($p > 0,05$).



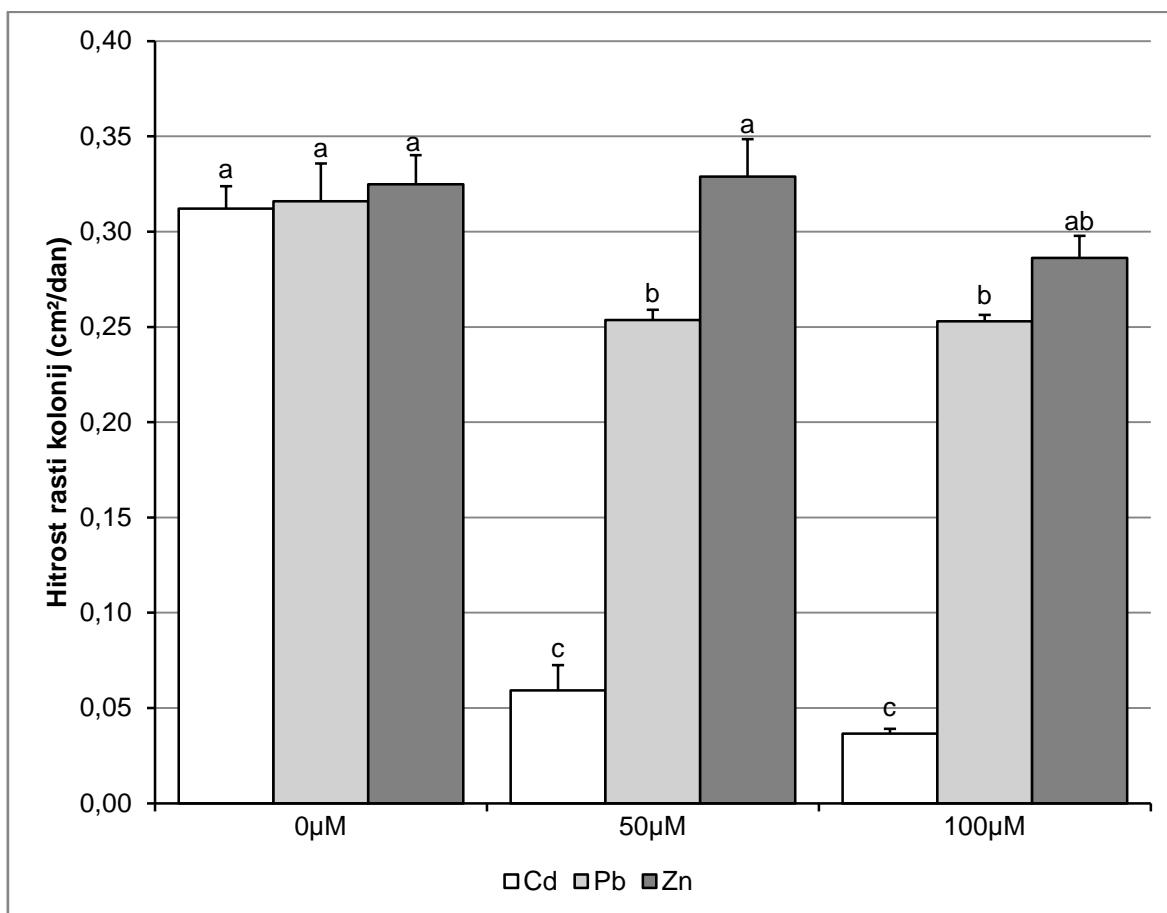
Slika 7: Primerjava koncentracije Zn med mlajšimi in starejšimi deli micelijev izolata 146 (A) in izolata 148 (B) rastočega na gojišču s 50 µM in 100 µM Zn ter brez dodanega Zn. Prikazane so povprečne vrednosti koncentracij ± standardna napaka, n = (5), med mlajšimi in starejšimi deli micelijev ni statistično značilnih razlik.

4.4 VPLIV Cd, Pb IN Zn NA HITROST RASTI KOLONIJ

Hitrost rasti smo izračunali kot koeficient med razliko v površini kolonij med 14. in 23. dnevom (takrat je bil prirastek kolonij največji) in številom dni (9 dni), ki so bili potrebni, da je prišlo do te najbolj občutne razlike med površinama. V primeru obeh izolatov smo ugotovili, da je v veliki večini hitrost rasti padala z višanjem koncentracije težke kovine v gojišču (Slika 9, 10). Statistično značilne razlike v hitrosti rasti med izolatom smo ugotovili v vseh primerih, kar pomeni, da prisotnost kovin v gojišču dovolj različno in občutno vpliva na hitrost rasti kolonij obeh izolatov.

4.4.1 Vpliv kovin na hitrost rasti izolata 146

Pri preučevanju hitrosti rasti kolonij izolata 146 smo prišli do ugotovitve, da je imel Cd najbolj inhibitorjen vpliv, kar je razvidno tudi s slike 9.



Slika 8: Primerjava hitrosti rasti kolonij izolata 146 glede na prisotnost kovin v gojiščih in njihove koncentracije. Prikazane so povprečne vrednosti hitrosti \pm standardna napaka, $n = (15)$. Različne črke opisujejo statistično značilne razlike med hitrostmi rasti kolonij, rastočih na gojiščih z različnimi koncentracijami posamezne kovine (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test pri $p < 0,05$).

Pri ugotavljanju vpliva, ki ga je imel Cd na hitrost rasti kolonij izolata 146, smo opazili statistično značilne razlike med kolonijami, ki so rasle na gojiščih brez Cd in med tretiranimi kolonijami. Med hitrostjo rasti kolonij, rastočih na gojiščih s 50 μM Cd in tistimi, ki so bile tretirane s 100 μM Cd pa nismo zaznali statistično značilnih razlik.

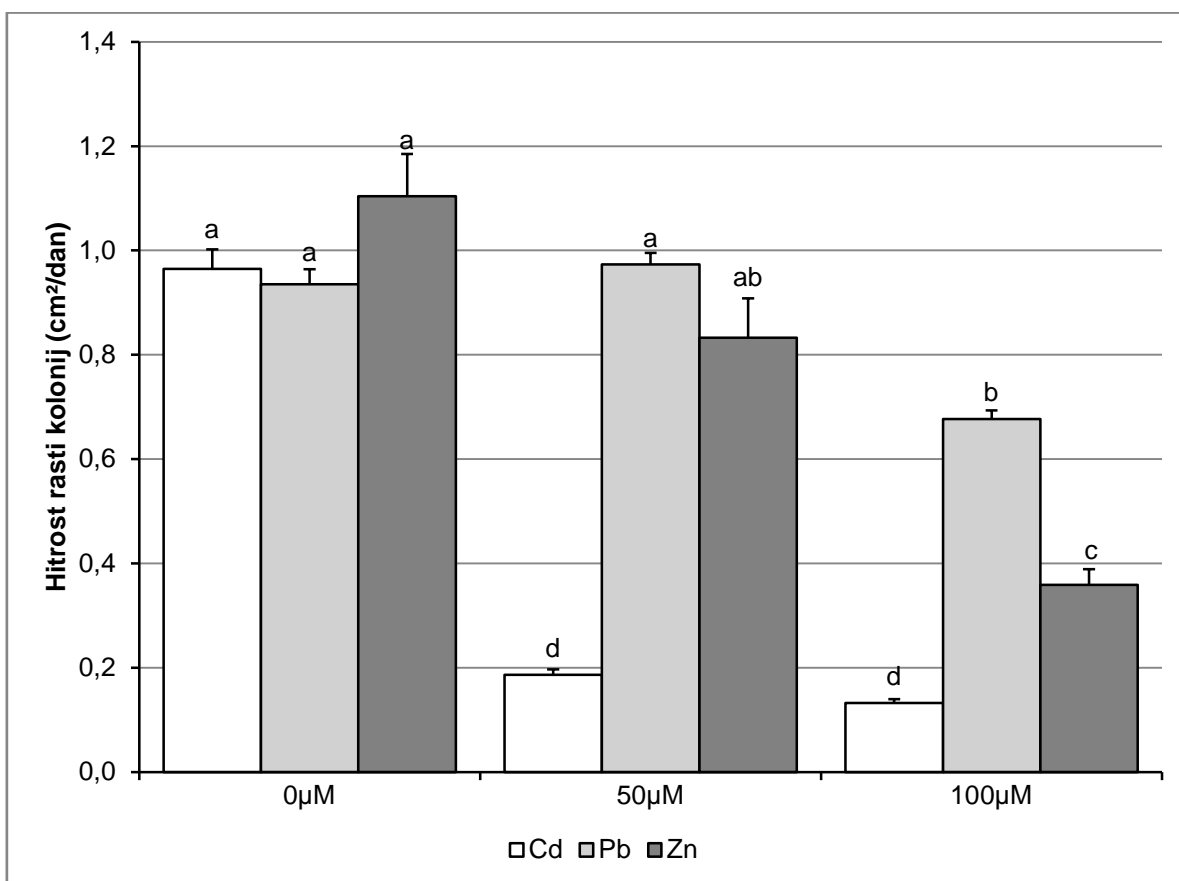
V primeru hitrosti rasti kolonij, rastočih na gojiščih z dodanim Pb smo prav tako opazili podobne rezultate (Slika 9), saj smo statistično značilne razlike zaznali med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, ki so rasle na gojiščih z dodanim Pb. Opazili pa smo tudi, da prisotnost Pb vendarle ni imela tako inhibitornega vpliva na hitrost rasti kolonij izolata 146, kot ga je imel Cd.

Pri preučevanju hitrosti rasti kolonij, rastočih na Zn nismo opazili statistično značilnih razlik med kolonijami, tretiranimi z Zn in tistimi, ki so rasle na gojiščih brez te kovine, kar pomeni, da sama prisotnost Zn v izbranih koncentracijah ni občutno vplivala na hitrost rasti kolonij izolata 146, kar je tudi razvidno s slike 9.

Pri 50 μM koncentraciji smo opazili statistično značilne razlike v rasti izolata 146 med vsemi tremi kovinami, pri najvišji koncentraciji pa je najbolj značilno hitrost zaviral Cd, med hitrostjo rasti v prisotnosti Pb in Zn pa ni bilo statistično značilnih razlik.

4.4.2 Vpliv kovin na rast izolata 148

Tudi na hitrost rasti kolonij izolata 148 je imela prisotnost Cd najbolj občuten vpliv, kar lahko razberemo s slike 10.



Slika 9: Primerjava hitrosti rasti kolonij izolata 148 glede na prisotnost kovin v gojiščih in njihove koncentracije. Prikazane so povprečne vrednosti hitrosti \pm standardna napaka, $n = (15)$. Različne črke opisujejo statistično značilne razlike med hitrostmi rasti kolonij, rastočih na gojiščih s posamezno kovino (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test pri $p < 0,05$).

Pri ugotavljanju vpliva, ki ga je imel na hitrost rasti kolonij izolata 148 Cd, smo statistično značilne razlike opazili med kontrolami in tretiranimi kolonijami. Tudi v primeru izolata 148 lahko torej opazimo močan inhibitoren vpliv te kovine na hitrost rasti.

Pri preučevanju hitrosti rasti kolonij, ki so rasle na Pb, pa smo ugotovili, da so obstajale statistično značilne razlike v hitrosti med kolonijami, rastočimi na 50 μM in tistimi, ki so rasle na 100 μM Pb, ter med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, rastočimi na 100 μM Pb. Med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, rastočimi na 50 μM Pb pa nismo opazili razlik (Slika 10).

Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi pri preučevanju hitrost rasti kolonij, rastočih na Zn (Slika 10). Opazili smo, da so sicer obstajale statistično značilne razlike v hitrosti rasti med kontrolnimi kolonijami in tistimi, ki so rasle na 100 μM ter med tretiranimi kolonijami. Med kontrolnimi kolonijami in kolonijami, rastočimi na 50 μM pa tudi v primeru Zn nismo opazili razlik.

Pri koncentraciji 50 μM je na hitrost rasti kolonij statistično najbolj značilno vplival Cd, med Pb in Zn pa ni bilo statistično pomembnih razlik, pri najvišji koncentraciji pa smo opazili statistično značilne razlike med vsemi tremi kovinami.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Identifikacija glivnih izolatov

Točne identifikacije glivnih izolatov nimamo. Zagotovo lahko trdimo le, da oba izolata uvrščamo med temne septirane endofite.

Izolat 146 je bil umeščen v skupino neizoliranih vrst rodu *Phialophora* iz orhideje *Cypripedium* in ektomikoriznih predstavnikov rodu *Leohumicola*, pozicioniran je bil kot sestrška skupina *Cadophora finlandia/Hymenoscyphus ericae* kompleksa. Za predstavnike teh gliv je značilno, da lahko tvorijo erikoidno mikorizo in/ali ektomikorizo. *Cadophora finlandia* je DSE gliva, ki lahko tvori tako ektomikorizo kot erikoidno mikorizo (Egger, 2006), *Hymenoscyphus ericae* je zmožna erikoidne mikorize, partnerski rastlini pa olajša privzem dušika. *Cadophora finlandia* in *Hymenoscyphus ericae* sta tesno genetsko povezani (Gorzelač in sod., 2012).

Izolat 148 je bil uvrščen v skupino številnih sekvenc gliv *Cadophora luteo-olivacea*, *Phialophora (Cadophora) malorum* in *Leptodontidium orchidicola*. Za te glive je značilno, da so endofiti s pretežno patogenimi lastnostmi. *Cadophora luteo-olivacea* in *Phialophora (Cadophora) malorum* sta si zelo podobni tako po morfologiji, biologiji in ITS sekvencah, skupne pa imata tudi določene gostitelje (trta, kivi) (Gramaje in sod., 2011). *Leptodontidium orchidicola* je filogenetsko blizu pripadnikom rodu *Cadophora*. Zanj je značilno, da tako kot npr. *Cadophora luteo-olivacea* tvori sklerocijem podobne strukture, sorodni sta si tudi v načinu razgrajevanja. Glede na način življenja se *Leptodontidium orchidicola* lahko obnaša kot saprofit, bolj verjetno je, da je šibek patogen ali parazit, kot pa mikorizna gliva (Day, 2010).

5.1.2 Vpliv težkih kovin na hitrost rasti ter površino kolonij obeh glivnih izolatov in analiza koncentracije kovin v mlajših in starejših delih micelijev

5.1.2.1 Cd

Za Cd je znano, da je izredno strupena kovina in da je rast številnih gliv zmanjšana že kadar se le-ta pojavlja v relativno nizkih koncentracijah, sama občutljivost na Cd pa varira

med vrstami (Abler, 2004). Cd poškoduje celice z izpodrivanjem Fe in Zn ionov iz proteinov, visoko afiniteto kaže do glutationa in sulfhidrilnih (tiolnih) skupin, povezujejo pa ga tudi z nastankom reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki povzročijo oksidativne poškodbe v celicah (Zeng in sod., 2010).

Zagotovo lahko trdimo, da Cd inhibitorno vpliva na rast in razvoj kolonij obeh izolatov. Z višanjem koncentracije te kovine v gojiščih se je pri obeh glivah zmanjševala velikost kolonij, prav tako pa je padala tudi hitrost rasti. Pri koncentraciji 50 μM Cd se je, v primerjavi s kontrolnimi kolonijami, obema izolatoma hitrost rasti zmanjšala za približno 5-krat, vendar prisotnost te kovine ni povzročila odmiranja gliv, saj so kolonije obeh izolatov kljub Cd rasle naprej, čeprav so bile manjše, njihova rast pa občutno upočasnjena. Domnevamo, da sta izolata precej omejevala vstop Cd v celice, če pa je do tega prišlo, sta ga najverjetneje kopičila v drugih specializiranih, temu namenjenih strukturah. Na podlagi rezultatov bi lahko sklepali, da sta oba izolata pred vplivom prekomerne koncentracije Cd dobro zaščitena, saj je sicer znano, da lahko povišane koncentracije te kovine povsem ustavijo rast in razvoj manj tolerantnih gliv (Levinskaite, 2001).

Negativni učinki, ki jih ima Cd na glive so bili že velikokrat omenjeni in dokumentirani. Z višanjem koncentracije je bilo opaženo zmanjševanje rasti in upočasnjen razvoj kolonij različnih izolatov (Levinskaite, 2001; Zheng in sod., 2009), velikokrat pa so bile opažene tudi morfološke anomalije, kot so npr. spiralaste hife, vakuoliziranost celic in degenerirani konci hif, ki so izgledali, kot da bi bili na silo ukrivljeni, vse te spremembe pa naj bi povzročile slabše razraščanje kolonij (Ali, 2007). Spremenjeno morfologijo smo opazili tudi v primeru izolata 146. Celice hif kolonij, rastočih na 100 μM Cd, so postale okrogle, nabrekle, kar je najbrž tudi prispevalo k zmanjšani velikosti kolonij in spremembam v hitrosti rasti pod vplivom te kovine.

V večini primerov se Cd najprej veže predvsem na celično steno, torej je prvotna zaščita gliv adsorpcija te kovine na celično steno in na vezavna mesta (Yazdani in sod., 2010). Znano je namreč, da predstavlja glivna biomasa veliko prednost (kar se tiče uporabe v bioremediacijske namene), saj visok delež celičnih sten ponuja veliko vezavnih mest, na katere se Cd veže, kar pa povzroči zaviranje rasti stene (Blaudez in sod., 2000; Zhang in sod., 2008), to pa je najverjetnejši vzrok zmanjšanja površine kolonij v našem primeru.

Veliko te kovine lahko tudi vstopi v celice, kjer se skladišči v citoplazmi oz. v vakuolah (Blaudez in sod., 2000). Podobno velja za glivo *Paxillus involutus*, ki se pred Cd zaščiti tako, da s sintezo in izločanjem oksalne kisline iz micelija (zaradi njegove kelacije) zmanjša privzem Cd tudi za 85 %, nekaj ga pa tudi veže na celično steno. Ob večjih koncentracijah Cd v okolici pa le-ta slej ko prej vstopi v celico. Kar 20 % in 30 % ga gliva skladišči v citosolu in vakuolah, pri čemer je treba poudariti, da je kopičenje Cd v vakuolah esencialnega pomena pri razstrupljanju (Bellion in sod., 2006).

Tako stari kot mlajši deli micelijev so vsebovali podobno koncentracijo Cd (in Zn), kar ne sovпада z našo predpostavko, da bodo večje koncentracije kovin vsebovali starejši deli micelijev. Razlago za ta pojav bi lahko poiskali v sami sestavi celične stene, ki variira skozi čas in se najbrž razlikuje med mlajšimi in starejšimi celicami. Yetis in sod. (2000) so npr. v poskusih s Pb dokazali različne sorpcijske kapacitete biomase, ki se je nahajala v različnih fazah rasti, prav tako pa Baldrian in Gabriel (2003) navajata številne primere, ki potrjujejo, da biosorpcijske sposobnosti mikroorganizmov pogosto variirajo s starostjo kulture oz. fazo rasti, v kateri se določena kultura nahaja. Najverjetnejši vzrok za zavrnitev naše hipoteze pa vidimo predvsem v dejstvu, da so bile glive izolirane iz območja z izredno visoko onesnaženostjo tal s Cd, kar je privedlo do razvoja zelo učinkovitih mehanizmov tolerance na to kovino. Te glive so bile namreč na območjih z visokimi koncentracijami Cd v tleh (91-121 ppm) zelo pogosti simbionti vrbe (5 – 21 %), na manj obremenjenih območjih (44-46 ppm) pa izjemno redki (0,1 – 07 %) (Regvar in sod., 2009).

5.1.2.2 Pb

Pb je neesencialna strupena kovina, katere rastline ne akumulirajo, če že pride do vdora v celico, je njegov sprejem pasiven (Adriano, 2001). Glive se na prisotnost Pb v okolju odzivajo zelo različno - za mnoge je značilno, da ob povišani koncentraciji te kovine izločajo ekstracelularno sluz, v kateri se kopiči kovina (Abler, 2004), v določenih primerih pa Pb ostaja vezan na zunanji sloj celic, torej na celično steno ter membrano (Meyer in Wallis, 1997). V nasprotju z omenjenimi raziskavami pa so Arriagada in sod. (2005) opazili privzem Pb s strani dveh saprofitnih gliv. Prisotnost te kovine je sicer konkretno zmanjšala biomaso obeh gliv in število spor, vendar je izrednega pomena njuna zmožnost umika Pb iz gojišča, torej njegove biosorpcije.

Pri analizi površin kontrolnih kolonij izolata 146 in tistih, ki so rasle na gojiščih s 50 μM ali 100 μM Pb, smo ugotovili, da ta gliva s svojimi mehanizmi uspešno tolerira Pb in njegove strupene (inhibitorne) vplive, saj med površinami kolonij ni bilo večjih razlik, kljub opaženi nekoliko zmanjšani hitrosti rasti, kar pomeni, da sama prisotnost Pb v izbranih koncentracijah ni imela velikega vpliva na razvoj kolonij glive 146.

V primeru izolata 148 je bila situacija podobna, le da smo tokrat v tretjem in četrtem tednu opazili odklon – poslabšala se je rast kolonij, rastočih na 100 μM Pb. V vseh štirih tednih rasti pa nismo opazili razlik med kontrolnimi kolonijami in tistimi, ki so rasle na 50 μM Pb. Iz tega bi lahko sklepali, da višja koncentracija te kovine v gojišču inhibitorno vpliva na rast in razvoj kolonij izolata 148, kar se je izrazilo tudi pri povprečni hitrosti rasti istega izolata. Inhibitoren vpliv Pb na rast in razvoj gliv je bil že večkrat dokumentiran. Ali (2007) je primerjal rast gliv *Dictyuchus carpophorus* in *Saprolegnia delica* na gojiščih z različnimi koncentracijami težkih kovin. Izkazalo se je, da je v primeru Pb gliva *D. carpophorus* tolerirala koncentracije nižje od 10 $\mu\text{g/mL}$, za glivo *S. delica* pa so bile letalne koncentracije tiste, ki so presegale 15 $\mu\text{g/mL}$. Ramasamy in sod. (2011) so ugotovili, da gliva *Aspergillus fumigatus* tolerira 100 $\mu\text{g/mL}$ Pb, pri višjih koncentracijah te kovine v gojišču pa se je že slabšala rast (in biosorpcijski potencial). Da se z višanjem koncentracije Pb zmanjšujeta rast gliv in biomasa, so potrdili tudi Yetis in sod. (2000). Najvišja koncentracija te kovine, ki ji je bila gliva izpostavljena, je znašala 30 $\mu\text{g/mL}$, kar je malce manj, kot v našem primeru (33,25 $\mu\text{g/mL}$). Kolonije naših izolatov so pri tej koncentraciji Pb še vedno uspevale in rasle - zanimivo bi bilo preveriti, pri kako visoki vsebnosti te kovine v gojiščih bi se rast kolonij obeh izolatov popolnoma ustavila. Predvidevamo, da bi naši izolati tolerirali še višje koncentracije Pb, kar bi bilo razumljivo, saj so bili izolirani iz območij z izjemno visokimi vsebnostmi te kovine (51 400 ppm) v tleh (Regvar in sod., 2009). Kljub temu rezultati nakazujejo na razlike v toleranci obeh izolatov na Pb.

Morfološki simptomi strupenosti Pb se v primeru gliv kažejo v obliki zadebeljenih, otečenih in deformiranih konicah hif, kar bi lahko vodilo v reducirano razraščanje micelija (od tod manjša površina kolonij, posebno opazna v primeru izolata 148), sam Pb pa naj ne bi vstopal v celico (Abler, 2004), kar je tudi pokazala analiza koncentracije težkih kovin v suhi masi obeh izolatov. Koncentracija Pb pri obeh izolatih je bila pod mejo detekcije, kar

pomeni, da ni prišlo do pomembnejšega privzema v micelij. Za dokazovanje mehanizmov tolerance izbranih izolatov na Pb pa so potrebne nadaljnje raziskave.

5.1.2.3 Zn

Zn sodi med tiste kovine, za katere pravimo, da so mikrohranila, kar pomeni, da jih organizmi v določeni meri nujno potrebujejo za uspešno rast in razvoj. Meja med optimalno koncentracijo, potrebno za preživetje in normalno delovanje ter viškom je pri kovinah izredno tanka in hitro se lahko zgodi, da postanejo elementi, ki jih organizmi v omejenih količinah potrebujejo in vključujejo v metabolizem, strupeni že pri koncentracijah, ki so le nekajkrat višje od optimalnih. Že prej smo omenili, da so tako esencialne kot neesencialne težke kovine strupene, če se v presežkih nahajajo v oblikah, ki so dostopne živim organizmom (Baldrian, 2010; Alloway, 1995).

Strupenost Zn pri glivah naj bi se po nekaterih raziskavah kazala v zmanjšani možnosti kolonizacije gostiteljskih rastlin ter v reducirani rasti micelijev (Abler, 2004), vendar naj bi imel Zn v primerjavi z ostalimi, predvsem neesencialnimi kovinami, manj negativen vpliv na glive, kar je opazil tudi Levinskaite (2001). Zanimalo ga je, na kakšen način vplivajo Cd, Ni in Zn na razvoj dveh glivnih izolatov. Pri primerjavi učinkov, ki so ga imele izbrane kovine na germinacijo, rast kolonij in sporulacijo je sicer ugotovil, da imajo pri dovolj visokih koncentracijah vse kovine negativen, inhibitoren vpliv, vendar je imel Zn pri nižjih koncentracijah pozitiven učinek na rast, kar je bilo pričakovano, glede na njegovo esencialno naravo. Tudi v našem primeru smo v prvem tednu rasti opazili izboljšano rast kolonij izolata 148, ki so bile tretirane s 50 μM Zn in so zavzemale večjo površino kot tiste, ki kovinam niso bile izpostavljene.

Levinskaite (2001) je dalje ugotovil, da so kolonije uspevale tudi na gojiščih z višjo koncentracijo Zn, ki je segala do 40 mM, medtem, ko se je njihova rast ustavila na gojiščih z 8-krat nižjo koncentracijo (do 5 mM) Cd in Ni. Celokupno gledano je imela prisotnost Zn na kolonije manj obsežen negativen vpliv, ki se je kazal postopoma in ne tako nenadno kot v primeru Cd in Ni. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Ali (2007), ki je pri primerjavi vpliva, ki so ga na rast dveh gliv imeli Cd, Pb in Zn ugotovil, da obe glivi uspevata pri višjih koncentracijah Zn (tudi do 50 $\mu\text{g/mL}$), pri Cd in Pb pa se je rast ustavila že prej, in

sicer v primeru rasti na Cd pri 4 $\mu\text{g/mL}$, na Pb pa je bila koncentracija nekoliko višja (15 $\mu\text{g/mL}$).

Lanfranco in sod. (2002) so preučevali askomicetno glivo, sicer sposobno erikoidne mikorize, za katero je bilo že dokazano, da slabše raste ob prisotnosti Zn in Cd, zanimalo pa jih je, na kakšen način Zn pravzaprav vpliva nanjo. Ugotovili so, da je prisotnost te kovine v gojiščih povzročila močne spremembe v morfologiji samih hif (otekle konice, odebeljene celične stene, razvejanost, septiranost), povečala pa se je tudi vsebnost hitina, ki izredno vpliva na obliko celične stene, njegova sinteza pa igra pomembno vlogo pri rasti in diferenciaciji gliv. Vse te spremembe so povzročile občutno zmanjšanje rasti micelijev, ponekod se je le-ta popolnoma ustavila.

Tudi v našem primeru je prisotnost Zn negativno vplivala na rast kolonij. Sicer nismo opazili večjih razlik v površini med kontrolnimi kolonijami in tistimi, ki so rasle na 50 μM , je bila pa zato zmanjšana rast obeh izolatov pri koncentraciji 100 μM , kar je bilo malce bolj izrazito v primeru izolata 148. Obema izolatoma se je tudi hitrost rasti zmanjševala z naraščanjem koncentracije te kovine, kar je bilo opazno predvsem v primeru kolonij rastočih na 100 μM Zn. Treba je poudariti, da se je z višanjem koncentracije te kovine v gojišču bolj drastično zmanjševala hitrost rasti izolata 148.

Presežek Zn naj bi se privzema v micelij le v manjših količinah, saj ga glive primarno vežejo na celične stene (Yazdani in sod., 2010) in polisaharidno sluz, ki jo nekatere sintetizirajo, ko so pod vplivom povišanih koncentracij Zn (Abler, 2004). To bi pojasnilo relativno majhno koncentracijo te kovine v suhi masi obeh izolatov. Rezultati naše raziskave pa tudi v primeru Zn niso pokazali statistično pomembnih razlik v njegovi koncentraciji med starejšimi in mlajšimi deli micelijev.

Naša izolata smo pridobili iz območja, onesnaženega s Cd, Zn in Pb – zanimivo bi bilo videti, kako bi kolonije uspevale, če bi jih gojili v gojiščih, v katerih ne bi bila samo ena težka kovina ampak dve ali pa vse tri. Vpliv strupenosti Cd je npr. odvisen od prisotnosti oz. odsotnosti drugih kationov. Številni avtorji so zabeležili zmanjšanje strupenosti Cd za glive ob prisotnosti Zn, za ta fenomen pa obstajajo tudi številne razlage (Hartley in sod., 1997; Abler, 2004).

5.1.3 Biotehnološka vrednost rezultatov

Z našo raziskavo smo prišli do določenih zaključkov, in sicer smo ugotovili, da oba izolata kažeta odpornost na vse tri kovine, kar pa nakazuje potencialno uporabnost v namene remediacije rizosfere. Naša izolata bi lahko prišla v poštev za odstranjevanje Cd in Zn iz onesnaženih območij, niso nam pa točno znani mehanizmi odpornosti izolatov na težke kovine. Pri razvoju novih, okolju prijaznih in ekonomsko izvedljivih tehnologij, ki bi jih uporabili v procesih remediacije s kovinami onesnažene prsti, nam je lahko v veliko pomoč biotehnološki pogled, vrednotenje in sistematizacija trenutnega razumevanja odpornosti gliv na kovine. Bioakumulacijske sposobnosti glivnih izolatov (mikosorpcija), bi lahko s pridom izkoriščala okoljska biotehnologija in sicer bi jih lahko uporabili pri vezavi in stabilizaciji kovin v tleh, s čimer bi preprečili njihovo spiranje v podtalnico, raznašanje z vetrom (na delcih substrata) in prenos v rastline. Slednje bi posledično vodilo do zmanjšane prenosa po prehranjevalni verigi preko herbivorov.

Še vedno ostajajo nepojasnjene biosorpcijske sposobnosti starejših in mlajših delov micelijev obeh izolatov, med katerimi ni statistično značilnih razlik. Da bi lahko bolje utemeljili, zakaj je temu tako, bi se morali poglobiti v samo sestavo celičnih sten in preveriti, ali se njihova sestava (in z njo biosorpcijske sposobnosti) spreminja z rastjo in razvojem kulture ter kako na to vplivajo različne koncentracije kovin. Morda bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno lokalizirati težke kovine (npr. z mapiranjem), da bi lahko spremljali, kam se pravzaprav vežejo oz. skladiščijo v celicah. Na tak način bi lahko pridobili odgovore na številna vprašanja in špekulacije.

Pri ocenjevanju učinkovitosti izolatov za potrebe bioremediacijskih tehnik, bi morali opraviti tudi terenske študije ali vsaj poskuse z ostalimi rastlinami, saj se glive, ki jih gojimo same, obnašajo drugače kot takrat, ko so v sobivanju z rastlinami in drugimi organizmi. Endofiti, ki naseljujejo območja, obremenjena s težkimi kovinami, namreč rastejo v nekakšnem ravnovesju s svojimi gostitelji, so pod vplivom določenih pritiskov okolice (tekmovanje z drugimi organizmi, prisotnost težkih kovin...) in omejenim dostopom do hranil. Če jih gojimo *in vitro*, odstranimo večino pritiskov in jim zagotovimo relativno ugodne pogoje za rast ter dovolj hranil, zaradi česar se morda bolj razrasejo in dosežejo večjo biomaso (Xiao in sod., 2009).

Prednosti uporabe avtohtonih izolatov v njihovem naravnem okolju so predvsem v njihovi toleranci na kovine, prilagojenosti na obstoječe mikro- in makroklimatske razmere ter združljivosti z ostalimi talnimi mikroorganizmi. Nadaljnje prednosti naših izolatov se kažejo tudi v njihovi kompatibilnosti z najbolj razširjeno lesno vrsto na onesnaženem območju v Žerjavu, *Salix caprea* (Regvar in sod., 2009). O DSE glivah je še vedno malo poznanega, čeprav rezultati številnih raziskav poročajo o pozitivnih učinkih teh gliv na rastline, kar naj bi podpiralo tezo o blagodejnem vplivu DSE gliv na gostitelje. Likar in Regvar (2009) sta pri primerjavi vzorcev korenin ive, *S. caprea*, ki sta jih pridobila iz onesnaženih in neonesnaženih območij opazila, da so, v primerjavi z arbuskularnimi predstavniki in predstavniki ektomikoriznih gliv, DSE glive prevladovale na vzorcih korenin, ki sta jih pridobila iz onesnaženih območij. Povečevanje kolonizacije izključno DSE gliv z višanjem onesnaženosti okolja je torej že večkrat vzbudilo pozornost (Regvar in sod., 2009; Likar in Regvar, 2009), zato predpostavljamo, da ta pojav nakazuje na funkcionalno pomembnost teh gliv za izboljšano toleranco predstavnikov vrste *S. caprea* in posledično njihove pozitivne učinke. Povišanje tolerance rastlin, ki so kolonizirane s takimi glivami, pa bi omogočilo učinkovitejšo fitoremediacijo, v kolikor bi seveda take rastline uporabili v namene remediacije rizosfere.

Ogromno obeta genetski inženiring, ki bi zagotovo ciljalo na tarče, s katerimi bi dosegli povečanje sekrecije ekstracelularnih kelatorjev kovin (1), utišanje izražanja transporterjev, ki omogočajo privzem strupenih kovin (2), povečano izražanje transporterjev, ki črpajo kovine in njihove komplekse iz celic oz. v temu namenjene celične organele (3), povečano sintezo elementov antioksidativnega obrambnega sistema (4) ter genetske modifikacije mehanizmov splošne odpornosti na kovine (5), vendar je treba, da bi uporabili genetski inženiring, dobro poznati tarče oz. gene, na katere bi ciljali, jih spreminjali in modificirali (Pocsi, 2011). Enkrat, ko poznamo gene, jih lahko tudi uvajamo v druge organizme, ustvarjamo mutante ipd.

5.2 SKLEPI

V tej diplomski nalogi smo z molekularnimi tehnikami poskušali identificirati izbrane najpogostejše glivne izolate, ki smo jih pridobili iz korenin ive (*S. caprea*), rastoče na

področju s prekomernimi koncentracijami kovin, vendar točne identifikacije glivnih izolatov nismo uspeli pridobiti.

Uspešno smo testirali rast dveh izolatov (146 in 148) v prisotnosti različnih koncentracij kovin, ki so bile prisotne na izvornem rastišču ive (Cd, Zn in Pb). Zaradi slabe rasti in nizke preživelosti izolata 149, ter ugotovljene tesne sorodnosti z izolatom 148, smo se odločili, da glivnega materiala tega izolata ne bomo preučevali dalje.

Ugotovili smo, kakšna je bila akumulacija Cd, Pb in Zn v glivni biomasi ter na podlagi rezultatov analiz vpliva izbranih težkih kovin na rast kolonij in njihovih biosorpcijskih lastnosti smo prišli do naslednjih sklepov:

1. Naša predvidevanja, da bo prisotnost treh izbranih težkih kovin negativno vplivala na rast in upočasnila hitrost rasti kolonij glivnih izolatov, so se izkazala za pravilno. Ugotovili smo, da Cd najbolj inhibitorno vpliva na rast in razvoj kolonij obeh izolatov. Na tej točki je treba tudi omeniti, da izolat 148 hitreje raste oz. doseže večjo hitrost rasti med 14. in 23. dnevom, kar smo opazili tako pri kontrolah kot tudi pri kolonijah, tretiranih s kovinami.
2. Potrdili smo, da se je z višanjem koncentracije posamezne kovine v gojišču povečal tudi njen inhibitoren vpliv na glivo. To je bilo najbolj opazno ravno v primeru rasti na gojiščih z dodanim Cd.
3. Predvidevali smo, da bodo starejši deli micelijev privzeli večjo koncentracijo kovin kakor mlajši, vendar se ta hipoteza ni izkazala za pravilno, saj v primeru privzema Cd in Zn nismo opazili statistično značilnih razlik med mladimi in starejšimi deli micelijev, v primeru rasti na Pb pri obeh izolatih sploh ni prišlo do privzema te kovine.
4. Sklepali smo, da bo imel od vseh kovin Zn (kot esencialni element) najmanj negativen vpliv na rast kolonij in ugotovili, da imata oba izolata sicer relativno nizek privzem Zn ter, da se je predvsem pri višji koncentraciji te kovine v gojišču pokazal njen inhibitoren vpliv na rast kolonij. Na podlagi pridobljenih rezultatov ne moremo zagotovo trditi, da je imel Zn najmanj negativen vpliv na

rast in površino kolonij, smo pa v primeru izolata 148 v prvem tednu rasti opazili povečano površino kolonij in izboljšano rast tistih, ki so bile tretirane s 50 μ M Zn.

5. Predvidevali smo, da bodo izolati, ker smo jih pridobili iz onesnaženega območja, imeli učinkovite mehanizme tolerance, zaradi katerih bodo kolonije preživele tudi višje koncentracije vseh treh težkih kovin, kar se je izkazalo za resnično. Oba izolata tudi dobro tolerirata Cd, ki kljub visokim privzemom v/na celice ni dokončno ustavil njune rasti in povzročil odmiranja, opazili pa smo, da so se zaradi vpliva te kovine pojavile tudi morfološke spremembe na izolatu 146, ki so najbrž prispevale k reducirani rasti.

6. Naša izolata bi lahko sicer prišla v poštev za biosorpcijo in s tem zmanjševanje koncentracije teh težkih kovin v onesnaženih območjih ter za potencialno odstranjevanje Cd in Zn iz takih obremenjenih okolj. Na Pb sicer rasteta, vendar ne pride do njegovega privzema v/na celice in s tem umika, poleg tega pa obe glivi privzameta več Cd kot pa Zn. Da bi dokončno opredelili, ali bi bila taka uporaba smiselna, bi morali najprej določiti, kolikšna vsebnost kovin bi bila za naša izolata letalna oz. pri kako visoki koncentraciji bi se njihova rast popolnoma ustavila in bi začele glive propadati. Dobljene rezultate bi morali primerjati z drugimi glivami, šele nato bi lahko sklepali o uporabnosti naših izolatov za odstranjevanje kovin iz onesnaženih območij. Kljub temu se nam zdi bolj smotrno, da bi s toleranco, ki jo na izbrane kovine premoreta naša glivna izolata, lahko potencialno povišali toleranco rastlin za fitoremediacijo in posledično remediacijo rizosfere, v primeru seveda, da bi bile rastline kolonizirane s temi glivami.

6 POVZETEK

Razvoj v preteklosti je na številnih območjih v Sloveniji z napredkom industrializacije, rudarjenja in metalurgije s seboj prinesel tudi povečano onesnaževanje okolja, katerega posledice se kažejo še dandanes. Posebno zaskrbljujoča so tla, nasičena s težkimi kovinami, kamor spadajo tudi Cd, Pb in Zn, ki med drugim predstavljajo glavne onesnaževalce tal v primeru Mežiške doline. Taka območja se običajno uporabljajo tudi v namene pridelovanja hrane in ravno zato onesnaženost s temi kovinami predstavlja velik problem, saj le-te preko členov prehranjevalne verige vstopajo v ljudi in negativno vplivajo na njihovo zdravje, zaradi česar je remediacija takih območij nujna. Bioremediacija, torej vzpostavitev ravnovesja s pomočjo bioloških procesov in organizmov, predstavlja enega izmed finančno ugodnih, relativno enostavnih in učinkovitih procesov, pri čemer ne smemo pozabiti na zmogljivosti rastlin, dreves (fitoremediacija) in ogromnega števila gliv ter drugih mikroorganizmov, ki se nahajajo v prsti. Mnogi med njimi so skozi čas razvili številne mehanizme s pomočjo katerih tolerirajo ekstremne razmere onesnaženih območij, v njih preživijo in obenem sodelujejo pri njihovem umiku.

Iz korenin ive, rastoče na onesnaženem območju Mežiške doline, smo izolirali glivne izolate. Zanimalo nas je, kakšna je njihova toleranca na kovine, v kolikšni meri Cd, Pb in Zn pravzaprav vplivajo na razraščanje in hitrost rasti njihovih kolonij v primerjavi s kontrolnimi kolonijami. Poleg tega nas je zanimala koncentracija kovin v glivnem materialu in njena razporeditev med starejšimi in mlajšimi deli micelijev. Kolonije so štiri tedne rasle na kontrolnih gojiščih in gojiščih, ki so vsebovala 50 μM ali 100 μM posamezne težke kovine. Vsak teden smo zabeležili njihovo površino, na podlagi katere smo izračunali hitrost rasti, po koncu poskusa pa smo v suhi glivni biomasi z metodo atomske absorpcijske spektroskopije (ASS) izmerili vsebnost posamezne težke kovine.

Rezultati so pokazali, da je imela prisotnost kovin v gojiščih velikokrat inhibitoren vpliv na rast kolonij, upočasnjena je bila hitrost rasti, manjša njihova površina. Mehanizmi tolerance so bili vseeno uspešni, saj se nobena rast ni ustavila oz. glive niso propadle. Najbolj negativen vpliv je imel Cd, Pb ni prehajal v/na celice.

7 VIRI

- Abler R.A.B. 2004. Trace Metal Effects on Ectomycorrhizal Growth, Diversity, and Colonization of Host Seedlings: Doctoral dissertation. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute: 149 str.
<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-04282004-124014/unrestricted/Ablerdiss.pdf>
(13. sep. 2012)
- Adriano D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biochemistry, bioavailability and risk of metals. 2nd edition. New York, Berlin, Heidelberg, Springer: 866 str.
- Ali E.H. 2007. Comparative Study of the Effect of Stress by the Heavy Metals Cd⁺², Pb⁺², and Zn⁺² on Morphological Characteristics of *Saprolegnia delica* Coker and *Dictyuchus carpophorus* Zopf. Polish Journal of Microbiology, 56, 4: 257-264
<http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol5642007257.pdf> (20. sep. 2012)
- Alloway B.J. 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals. V: Heavy metals in soils. 2nd edition. Alloway B.J. (ed.). London, Blackie Academic & Professional: 11-35
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25: 3389-3402
- Apenroth K. J. 2010. Definition of »Heavy Metals« and Their Role in Biological Systems. V: Soil Heavy Metals. Sherameti I., Varma A. (eds.). Heidelberg, Springer: 19-30
- Arriagada C.A., Herrera M.A., Ocampo J.A. 2005. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal and Saprobe Fungi to the Tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. Water, Air and Soil Pollution, 166: 31-47
<http://www.bashanfoundation.org/ocampo/ocamposaprobe.pdf> (21. sep. 2012)

- Baldrian P. 2010. Effect of Heavy Metals on Saprotrophic Soil Fungi. V: Soil Heavy Metals. Sherameti I., Varma A (eds.). Heidelberg, Springer: 263-279
- Baldrian P., Gabriel J. 2003. Adsorption of heavy metals to microbial biomass: use of biosorption for removal of metals from solutions. V: The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solutions: proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, Prague, 14-19 jun. 2000. Šašek V., Glaser J.A., Baveye P. (eds.). Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 115-124
- Bellion M., Courbot M.I., Jacob C., Blaudez D., Chalot M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Letters, 254, 2: 173-181
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x/pdf> (15. sep. 2012)
- Blaudez D., Botton B., Chalot M. 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology, 146: 1109-1117
<http://mic.sgmjournals.org/content/146/5/1109.full.pdf+html> (16. sep. 2012)
- Brundrett M.C. 2006. Understanding the Roles of Multifunctional Mycorrhizal and Endophytic Fungi. V: Microbial Root Endophytes. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds.). Berlin, Heidelberg, Springer: 281-298
- Colpaert J.V. 2008. Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi. V: Stress in Yeasts and Filamentous Fungi. Avery S.V., Stratford M., van West P. (eds.). London, Elsevier, Academic Press: 157-173
- Day M.J. 2010. Diaspores and degradative abilities of select dematiaceous hyphomycetes. Doctoral dissertation. Edmonton, University of Alberta, Department of Biological Sciences: 175 str.
<https://era.library.ualberta.ca/public/datastream/get/uuid:c726c76c-de0c-42d3-b951-40958c8efcaa/DS1> (19. sep. 2012)

- Ebdon L., Evans E.H., Fisher A., Hill S.J. 1998. An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry. Chichester, John Wiley & Sons: 193 str.
- Egger K.N. 2006. The surprising diversity of ascomycetous mycorrhizas. *New Phytologist*, 170: 421-423
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2006.01728.x/pdf> (13. sep. 2012)
- Finžgar N., Leštan D. 2008. Ocena dostopnosti težkih kovin iz onesnaženih tal Mežiške doline. V: *Acta agriculturae Slovenica*. Kreft I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 157-166
- Gadd G.M. 2001. Metal transformations. V: *Fungi in Bioremediation*. Gadd G.M. (ed.). Cambridge, New York, Cambridge University Press: 359-382
- Gadd G.M., Burford E.P., Fomina M., Melville K. 2007. Mineral transformations and biogeochemical cycles: a geomycological perspective. V: *Fungi in the Environment*. Gadd G.M., Watkinson S.C., Dyer P.S. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 77-111
- Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118
- Gaur A., Adholeya A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86, 4: 528-534
<http://www.iisc.ernet.in/currensci/feb252004/528.pdf> (9. jul. 2012)
- Gorzela M.A., Hambleton S., Massicotte H.B. 2012. Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal Ecology*, 5, 1: 36-45
<http://www.esf.edu/efb/horton/Gorzela%20etal%202012.pdf> (14. sep. 2012)

- Gramaje D., Mostert L., Armengol J. 2011. Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: 112-126
- Guindon S., Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704
- Hartley J., Cairney J.W.G., Sanders F.E., Meharg A.A. 1997. Toxic interactions of metal ions (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , and Sb^{3-}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 137: 551-562
- Hudson H.J. 1986. *Fungal biology*. London, Edward Arnold: 298 str.
- Kamal S., Prasad R., Varma A. 2010. Soil Microbial Diversity in Relation to Heavy Metals. V: Soil Heavy Metals. Sherameti I., Varma A. (eds.). Heidelberg, Springer: 31-64
- Lanfranco L., Balsamo R., Martino E., Perotto S., Bonfante P. 2002. Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. *European Journal of Histochemistry*, 46, 4: 341-350
- Levinskaite L. 2001. Effect of heavy metals on the individual development of two fungi from the genus *Penicillium*. *Biologija*, 1: 25-30
<http://www.ebiblioteka.lt/resursai/LMA/Biologija/BIO-25.pdf> (15. sep. 2012)
- Likar M. 2011. Dark septate endophytes and mycorrhizal fungi of trees affected by pollution. V: Endophytes of forest trees. Biology and applications. Pirttilä A.M., Frank A.C. (eds.). Dordrecht, Springer: 189-201
- Likar M., Regvar M. 2009. Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavymetal polluted soil. *Science of the Total Environment*, 407, 24: 6179-6187

- Lobnik F., Zupan M., Hudnik V., Vidic N. J. 1994. A Soil and Plant Pollution Case study in Industrial Areas of Slovenia. *Environmental Geochemistry and Health*, 16: 287-299
- Manara A. 2012. Plant responses to Heavy Metal Toxicity. V: *Plants and Heavy Metals: Springer Briefs in Heavy Metals*. Furini A. (ed.). Dordrecht, Heidelberg, New York, London, Springer: 27-53
- Marx D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163
- Meyer A., Wallis F.M. 1997. The use of *Aspergillus niger* (Strain 4) biomass for lead uptake from aqueous systems. *Water SA*, 23, 2: 187-192
http://www.wrc.org.za/Lists/Knowledge%20Hub%20Items/Attachments/5125/1997_Vol_23_no_2_1047_abstract.pdf (20. sep. 2012)
- Pocsi I. 2011. Toxic Metal/Metalloid Tolerance in Fungi – A Biotechnology-Oriented Approach. V: *Cellular Effects of Heavy Metals*. Banfalvi G. (ed.). Dordrecht, Heidelberg, London, New York, Springer: 31-58
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256
- Ramasamy R., Congeevaram S., Thamaraiselvi K. 2011. Evaluation of Isolated Fungal Strain from e-waste Recycling Facility for Effective Sorption of Toxic Heavy Metal Pb (II) Ions and Fungal Protein Molecular Characterization - a Mycoremediation Approach. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2: 342-347
<http://www.ajebs.com/vol6/27.pdf> (21. sep. 2012)
- Regvar M., Likar M., Piltaver A., Kugonič N., Smith J. E. 2009. Fungal community structure goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted soil: the potential of screening in a model phytostabilization study. *Plant and Soil*, 333: 345-356

- Rodriguez R.J., White Jr. J.F., Arnold A.E., Redman R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 2: 314-330
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x/full> (8. jul. 2012)
- Schulz B., Boyle C. 2006. What are Endophytes? V: *Microbial Root Endophytes*. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds.). Berlin, Heidelberg, Springer: 1-13
- Sieber T.N., Grünig C.R. 2006. Biodiversity of Fungal Root-Endophyte Communities and Populations, in Particular of the Dark Septate Endophyte *Phialocephala fortinii* s. l. V: *Microbial Root Endophytes*. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds.). Berlin, Heidelberg, Springer: 107-132
- Singh H. 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.: 592 str.
- Stamets P. 2005. *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*. Berkley, Ten Speed Press: 339 str.
- Swofford D.L. 2003. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526
- Turnau K., Orlowska E., Ryszka P., Zubek S., Anielska T., Gawronski S., Jurkiewicz A. 2006. Role of mycorrhizal fungi in phytoremediation and toxicity monitoring of heavy metal rich industrial wastes in Southern Poland. V: *Viable methods of soil and water pollution monitoring, protection and remediation: proceedings of the NATO*

- Advanced Research Workshop on Viable Methods of Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation, Krakow, 27 jun.-1 jul. 2005. Twardowska I., Allen H.E., Häggblom M.H., Stefaniak S. (eds.). Dordrecht, Springer: 533-552
- Udovič M., Leštan D. 2008. Remediacija zemljine z območja stare cinkarne v Celju z metodo stabilizacije s cementom. V: Acta agriculturae Slovenica. Kreft I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 283-295
- Vicente M.S., Garcia C., Ganzalez F., Ballester A., Blazquez M.L., Munoz J.A. 2008. Bioremediation of Soils Contaminated with Heavy Metals. V: Environmental Management. Theobald R.H. (ed.). Madrid, Nova Science Publishers: 277-296
<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/biohidro/Publicaciones%20del%20Grupo/Environmental%20Management.pdf> (13. sep. 2012)
- White C., Wilkinson S.C., Gadd G.M. 1995. The Role of Microorganisms in Biosorption of Toxic Metals and Radionuclides. International Biodeterioration & Biodegradation, 35: 17-40
<http://envismadrasuniv.org/Microbes%20and%20Radionuclide%20Pollution/pdf/The%20Role%22of%20Microorganisms.pdf> (9. jul. 2012)
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.). New York, Academic Press: 315-322
- Wuana R.A., Okieimen F.E. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: a Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. ISRN Ecology, 2011: 1-20
<http://www.isrn.com/journals/ecology/2011/402647/> (7. jul. 2012)
- Xiao X., Luo S., Zeng G., Wei W., Wan Y., Chen L., Guo H., Cao Z., Yang L., Chen J., Xi Q. 2010. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. Bioresource Technology, 101: 1668-1674

http://ee.hnu.cn/eeold/php/news/pic/yunfeirandompic_1263966025.pdf (20. jul. 2012)

Yazdani M., Yap C.K., Abdullah F., Tan S.G. 2010. An *in vitro* Study on the Adsorption, Absorption and Uptake Capacity of Zn by the Bioremediator *Trichoderma atroviride*. *EnvironmentAsia* 3: 53-59

<http://www.tshe.org/ea/pdf/vol3%20no1%20p53-59.pdf> (20. sep. 2012)

Yetis U., Dolek A., Dilek F.B., Ozcengiz G. 2000. The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research*, 34: 4090-4100

Zeng X., Tang J., Yin H., Liu X., Jiang P., Liu H. 2010. Isolation, identification and cadmium adsorption of a high cadmium-resistant *Paecilomyces lilacinus*. *African Journal of Biotechnology*, 9: 6525-6533

<http://www.academicjournals.org/ajb/PDF/pdf2010/27Sep/Zeng%20et%20al.pdf>
(12. sep. 2012)

Zhang Y., Zhang Y., Liu M., Shi X., Zhao Z. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro*. *The Journal of Microbiology*, 46: 624-632

Zheng W., Fei Y., Huang Y. 2009. Soluble protein and acid phosphatase exuded by ectomycorrhizal fungi and seedlings in response to excessive Cu and Cd. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 1667-1672

ZAHVALA

»Per aspera ad astra.«

(latinski pregovor)

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Marjani Regvar in somentorju doc. dr. Matevžu Likarju za sprejeto mentorstvo, vso potrpežljivost, strokovnost, nasvete, pomoč in čas, ki sta si ga vzela zame in tako pripomogla k nastanku te diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi Mileni in sicer za vso pomoč pri izvedbi poskusov, za prijetno vzdušje, pogovore in sijajen odnos, ki ga ima s študenti.

Hvaležna sem recenzentki doc. dr. Poloni Jamnik za hiter in učinkovit pregled diplomske naloge, koristne nasvete in strokovno mnenje.

Iskreno se zahvaljujem mami Lidiji in očetu Žarku, ki sta mi omogočila šolanje, ker sta od samega začetka verjela vame in mi znala dati moč ter vliti pogum v trenutkih, ko mi je bilo najtežje.

Na koncu gre nič manj pomembna zahvala preostali družini, prijateljem in vsem, ki so mi tako ali drugače pomagali, me podpirali in me znali nasmejati.