



# **Stressz alatti változások a békalencse-fajok biomasszájának fehérje- és keményítőtartalmában**

**Hepp Anna**

DE TTK

I. évf. Biotechnológia MSc



Témavezetők:

**Dr. Mészáros Ilona**

tanszékvezető egyetemi docens

**Dr. Oláh Viktor**

egyetemi adjunktus

**Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar  
Növénytan Tanszék**

**XXXI. OTDK Biológia Szekció  
Debrecen  
2013**

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. BEVEZETÉS</b>                                                                  | <b>3</b>  |
| <b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>                                                        | <b>4</b>  |
| 2.1. A BÉKALENCSE-FÉLÉK ALKALMAZÁSA MODELLNÖVÉNYKÉNT (ÖKOTOXIKOLÓGIA, NÖVÉNYÉLETTAN) | 5         |
| 2.2. A BÉKALENCSE-FÉLÉK ALKALMAZÁSA A SZENNYVÍZTISZTÍTÁSBAN                          | 6         |
| 2.3. A BÉKALENCSE-FÉLÉK ALKALMAZÁSA AZ ALAPANYAG-TERMELÉSBEN                         | 8         |
| 2.3.1. A BÉKALENCSE-FÉLÉK KEMÉNYÍTŐ-FELHALMOZÁSA                                     | 9         |
| 2.3.2. A BÉKALENCSE-FÉLÉK FEHÉRJETARTALMA                                            | 10        |
| <b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>                                                               | <b>11</b> |
| <b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER</b>                                                           | <b>12</b> |
| 4.1. A TESZTNÖVÉNYEK                                                                 | 12        |
| 4.2. A KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK                                                         | 13        |
| 4.3. A VIZSGÁLT PARAMÉTEREK                                                          | 13        |
| 4.3.1. NÖVEKEDÉSI JELLEMZŐK                                                          | 13        |
| 4.3.2. A KEMÉNYÍTŐTARTALOM MÉRÉSE                                                    | 15        |
| 4.3.3. A FEHÉRJETARTALOM MÉRÉSE                                                      | 15        |
| 4.3.4. AZ ADATOK ÉRTÉKELÉSE                                                          | 16        |
| <b>5. EREDMÉNYEK</b>                                                                 | <b>17</b> |
| 5.1. A NÖVEKEDÉSI PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSA                                              | 17        |
| 5.2. A BIOMASSZA KEMÉNYÍTŐTARTALMÁNAK VÁLTOZÁSA                                      | 21        |
| 5.3. A BIOMASSZA FEHÉRJETARTALMÁNAK VÁLTOZÁSA                                        | 22        |
| <b>6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE</b>                                                      | <b>24</b> |
| 6.1. A NÖVEKEDÉSI RÁTA ÉS A BIOMASSZA JELLEMZŐINEK VÁLTOZÁSA                         | 24        |
| 6.2. A KEMÉNYÍTŐTARTALOM VÁLTOZÁSA                                                   | 25        |
| 6.3. A FEHÉRJETARTALOM VÁLTOZÁSA                                                     | 27        |
| <b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b>                                                              | <b>29</b> |
| <b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>                                                        | <b>31</b> |
| <b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b>                                                            | <b>32</b> |

## 1. Bevezetés

A békalencse-félék (*Lemnaceae*, *Araceae*) a sarkvidékek kivételével az egész világon elterjedt, álló vagy lassan folyó vizek felszínén lebegő, redukált felépítésű, egyszikű növények. Számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek miatt környezetvédelmi, ipari és mezőgazdasági alkalmazhatóságukat is régóta vizsgálják. Ilyenek pl.: a hosszú tenyészidő, a magas növekedési és szaporodási potenciál, a jellemzően vegetatív szaporodás, a hatékony tápanyagfelvétel, a kismértékű lignifikáció miatt könnyen bontható biomassza, a termőhellyel szembeni viszonylagos igénytelenség, a széleskörű elterjedés, a laboratóriumban való könnyű tarthatóság.

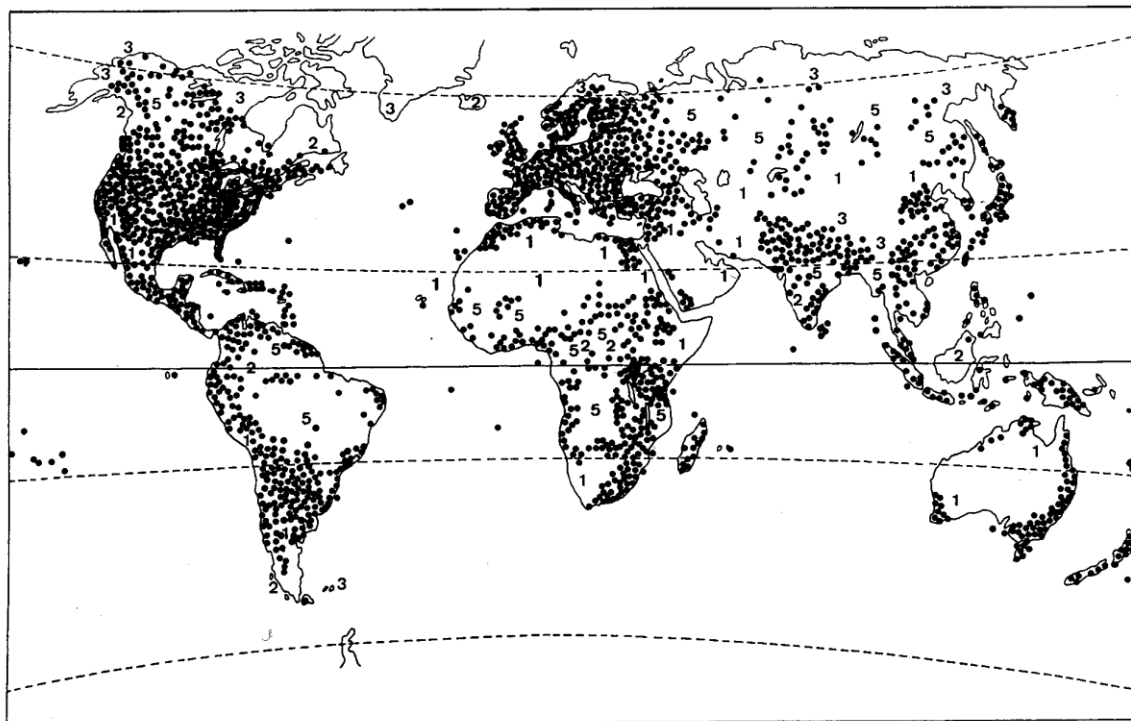
A fenti előnyeik miatt az utóbbi időben az ökotoxikológiai, ökofiziológiai alkalmazásuk mellett a remediációs, szennyvíztisztítási és speciális alapanyag-előállítási (keményítő, fehérje előállítása) vizsgálatokban is kiemelten kutatott növényekké váltak.

A békalencse-félék egyik jellemző tulajdonsága, hogy viszonylag magas keményítőtartalommal rendelkeznek, és kedvezőtlen fiziológiai körülmények, környezeti stressz hatására a felhalmozott keményítő mennyisége tovább emelkedik. A békalencse-növényekből kivonható keményítő alkalmas lehet az ipari etanol-fermentáció alapanyagának is. A hatékony tápanyagfelvétel, és a szennyezett vizek tolerálása pedig alkalmassá teszi őket a foszfor- és nitrogénvegyületek kinyerésére a szennyvizekből.

A fenti két előnyös tulajdonságuk miatt a különböző békalencse-fajok a szennyvíztisztítással kapcsolt bioüzemanyag-előállítás potenciális „haszonnövényei” lehetnek, így fontos a növekedési és keményítő-felhalmozási tulajdonságaik minél jobb megismerése és a fajok közötti esetleges különbségek feltárása.

## 2. Irodalmi áttekintés

A békalencse-félék (*Lemnaceae*, *Araceae*) álló vagy lassan folyó vizek felszínén lebegő, redukált felépítésű, egyszikű növények. Hajtásrendszerük levelek nélküli, lapos vagy gömbölyded szártaggá egyszerűsödött, mely többnyire nem magányosan, hanem 2-10 szártagból álló kolóniákban fordul elő. Egyszerűségük ellenére virágos-magvas növények, melyek a Földön jelenleg ismert legkisebb magvakat képezik. Ennek ellenére szaporodásuk jellemzően vegetatív, az anyanövényen képződő sarjak segítségével történik. A sarkvidékek kivételével az egész világon elterjedtek (1. ábra), de a különböző klimatikus hatásokhoz az egyes fajok eltérően alkalmazkodtak. A *Lemna minor* Európa, Ázsia és Észak-Amerika hűvösebb régiókban őshonos. Ezzel szemben a *Spirodela* fajok Dél-Amerikában a legváltozatosabbak (Landolt, 1986). A békalencsék rendjébe jelenleg 5 nemzetség 38 fajt sorolják (Les és mtsai, 2002).



1. ábra A békalencse-félék (*Lemnaceae*, *Araceae*) globális előfordulása.  
Az arab számokkal jelölt területek éghajlati adottságai a békalencse-növények megtelepedéséhez nem alkalmasak,  
vagy az előfordulásukat még nem írták le ott  
(Landolt, 1986)

A békalencse-növények a vízfelszínen úszó hínár-társulások tagjai, és a számukra kedvező körülmények között gyorsan elszaporodnak, egybefüggő vízfelszíni növényzőnyeget hozva létre (Crawford és Landolt, 1993; Dickinson és Miller, 1998; Driever, 2005).

Számos előnyös tulajdonságuk miatt környezetvédelmi, ipari és mezőgazdasági alkalmazhatóságukat is régóta vizsgálják.

## **2.1. A békalencse-félék alkalmazása modellnövényként (ökotoxikológia, növényélettan)**

Megfelelő hőmérséklet, fény és tápanyagok biztosításával a békalencse-félék tenyésztési mesterségesen is nevelhetők. Számos előnyös tulajdonságuk van, melyek alapján előszeretettel használt ökotoxikológiai teszt-objektumok (Environment Canada, 1999). Ilyen tulajdonságok például:

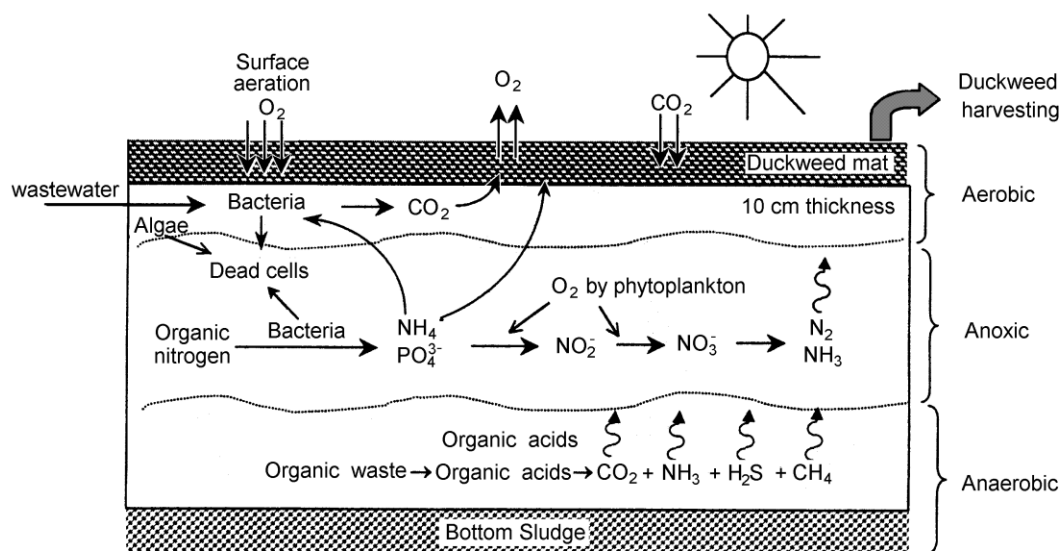
- Laboratóriumban való könnyű tarthatóság, ami az aljzattól való függetlenségüknek és a könnyen szabályozható környezeti feltételeknek köszönhető (fény, hőmérséklet, tápelemek, stb.), továbbá tenyésztéseik folyékony vagy szilárd táptalajon, axenikusan is könnyen nevelhetők, autotróf illetve heterotróf módon.
- Kedvezően kis méret, mely elég nagy a vizuális megfigyelésekhez, de tartásuk nem igényel nagyméretű felszerelést.
- Jellemzően vegetatív szaporodásuk miatt genetikailag homogén tenyészetek nyerhetők.
- Szaporodásuk és növekedésük gyors, megfelelő körülmények között akár 2 nap alatt képesek megduplázni a biomasszájukat.
- Viszonylag nagy a térfogatukhoz viszonyított felületük, illetve nagyon vékony vagy nincs kutikulájuk a tesztközeggel érintkező abaxiális levélfelületükön. A vizsgálandó anyagok ezért gyorsan és nagy dózisban jelenhetnek meg közvetlenül a fotoszintetizáló szövetekben is, elkerülve a gyökérben történő metabolizációt, kompartmentációt.
- Széleskörű elterjedésük miatt alkalmasak egy adott terület magasabbrendű vízinövényeinek reprezentálására az ökotoxikológiai vizsgálatokban.
- Termőhellyel szembeni viszonylagos igénytelenségük és egyszerű testfelépítésük is előnyös tulajdonság.

- Szennyező anyagokra való érzékenységük mellett, több fémes elemnek is kitűnő akkumulátorai a békalencse-növények, ami a vízminőség-monitorozásra, illetve laboratóriumban a felvételi mechanizmusok tanulmányozására is alkalmassá teszi őket. Különösen érzékenyek a felületaktív anyagokra, hidrofób vegyületekre és hasonló kemikáliákra, melyek a víz-levegő határfelületen halmozódnak fel.
- A békalencse-félék előnye, a szintén ökotoxikológiai tesztekhez használt algatesztekkel szemben, hogy a tápoldat a tesztek folyamán is cserélhető, illetve zavaros vagy, színes vegyületet tartalmazó minták is vizsgálhatók.

## **2.2. A békalencse-félék alkalmazása a szennyvíztisztításban**

A békalencsék egyik jellemző, és kutatások szempontjából kedvező tulajdonsága, hogy gyors, elsősorban vegetatív reprodukcióra képesek. A magas szaporodási és növekedési ráta fenntartásához jelentős mennyiségű tápanyagra van szükségük, ezért gyorsan tudják eltávolítani a számukra szükséges növényi tápelemeket a vízből, melynek a felszínén lebegnek. Kutatások igazolták, hogy a békalencsék különösen hatékonyan távolítják el a foszfátokat és a nitrogénvegyületeket (Xu és mtsai, 2011), amelyet biomasszává alakítanak.

A Föld növekvő népessége miatt a foszfát- és nitrogénvegyületek felszíni vizekbe kerülése egyre nagyobb problémát jelent. Főleg álló vizekben való feldúsulásuk veszélyes, mivel a túl sok és könnyen hozzáférhető növényi tápanyagon az elsődleges termelő szervezetek robbanásszerűen elszaporodnak, ami a populáció későbbi összeomlásakor az oxigénhiány miatt a vízben élő élőlények nagy részének elpusztulását eredményezi. (Xu és mtsai, 2010)



Biological Processes in Duckweed-Based Wastewater treatment

2. ábra Békalelencséken alapuló biológiai szennyvíztisztítás (Smith és Moelyowati, 2001)

Mivel a vízfelszínen lebegő, gyorsan növekvő békalelence-félék hatékonyan távolítják el a foszfát- és nitrogénvegyületeket, ráadásul a preferált nitrogénforrásuk nem a nitrát-, hanem az ammónium-ion, kézenfekvőnek tűnik a felhasználásuk a szennyvíztisztításban, meggátolva ezzel a tavak eutrofizálódását. További előnyös tulajdonságuk, hogy kedvező körülmények közt a szennyvíztisztító tavak felszínét hamar beteríti a belőlük képződő növényiszőnyeg, ami az árnyékoló hatása miatt meggátolja az algák hirtelen elszaporodását is (2. ábra).

Xu és mtsai (2010) Kelet-Kínában vizsgálták a növényi tápanyagok eltávolításának lehetőségeit, ahol egy sertésfarmról kijutó, nagymennyiségű szennyvíz jelentett veszélyt a helyi vizekre. A legköltséghatékonyabb megoldásnak a szennyvízzel bejutott többlettápanyag növényi biomasszává való átalakítása bizonyult, mert így tápanyagterhelés csökkentése mellett hasznosítható növényi biomasszát is sikerült előállítani.

Cheng és mtsai (2002) kutatásaiban a *Spirodella punctata* nitrogén- és foszforeltávolítási hatékonyságát vizsgálta egy, az anaerob lebontáson már átesett sertés-szennyvízhez hasonló összetétellel és tulajdonságokkal (pH, szervesanyag tartalom, stb) rendelkező „mesterséges szennyvízből”. Az eredményeik alapján a békalelence-növények jól nőnek magas nitrogén- és foszforkoncentráció mellett is ( $240 \text{ mg NH}_4\text{-N l}^{-1}$  és  $31,0 \text{ mg PO}_4\text{-P l}^{-1}$ ). A maximális tápanyagvisszanyerés nitrogénre  $0,995 \text{ mg N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , foszforra pedig,  $0,129 \text{ mg P l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  volt, a biomassza-gyarapodás pedig  $1,33 \text{ g sz.a. m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  volt.

Bergmann és mtsai (2000) három különböző, sertésszennyvízen nevelt békalencse fajt, a *Lemna gibba*, a *Lemna minor*, és a *S. punctata* növekedését vizsgálták. Az eredményeik alapján megállapították, hogy a *L. gibba*-nak és a *L. minor*-nak (időegység alatt) nagyobb a biomassza produkciója, mint a *S. punctatanak* a tápanyagvisszatartásuk 50%-os hígítású szennyvízen pedig 86,0 mg NH<sub>4</sub>-N l<sup>-1</sup> illetve 25,3 mg PO<sub>4</sub>-P l<sup>-1</sup> volt.

Xu és mtsai (2010) *Spirodela oligorrhiza*-t használtak a sertés-szennyvízből való tápanyag kinyerési kísérleteikhez, és azt tapasztalták, hogy ez a faj is nagy növekedési potenciált mutat a magas nitrogén- és foszforkoncentrációjú szennyvízen, a leggyorsabb növekedést pedig 6%-osra hígított szennyvízen mutatta. Egy vegetációs periódus során a békalencse-tenyészetük átlagosan az összes nitrogénnek a 83,7%-át, az összes foszfornak pedig a 89,4%-át volt képes visszanyerni a sertés-szennyvízből. A kísérleti körülményeik között a *S. oligorrhiza* nyolc hét alatt a kiindulási biomassza 5,3-szorosát állította elő.

### **2.3. A békalencse-félék alkalmazása az alapanyag-termelésben**

A nagy mennyiségben, gyorsan és olcsón előállítható békalencse-biomassza felvetette az esetleges hasznosítás lehetőségét is.

Haszonnövényként az alábbi előnyökkel rendelkeznek (Xu és mtsai, 2011):

- a) hosszú tenyészidő (kora tavasztól késő őszig folyamatosan termelt biomassza)
- b) magas növekedési és szaporodási potenciál
- c) sajátos életmenet: a vízi életmód, miatt nem foglalnak el értékes mezőgazdasági termőterületeket, a testfelület nagy részén zajló hatékony tápanyagfelvétel, vastag növényyszőnyegben való nevelés jó tűrése
- d) a korlátozott lignifikáció miatt a biomassza nagy részét elsősorban könnyen feldolgozható komponensek alkotják (pl. keményítő, fehérjék)
- e) a termőhellyel szembeni viszonylagos igénytelenség (lásd a korábbi fejezeteket)
- f) természetes élőhelyeiken nem tekinthetők invazív vagy agresszív fajoknak (mindenütt előfordulnak), így bárhol felhasználhatók a megfelelő helyi változatok

### 2.3.1. A békalencse-félék keményítő-felhalmozása

A keményítő növényi poliszacharid, mely raktározott tartaléktápanyagként nagy mennyiségben halmozódhat föl a növényi propagulumokban, illetve raktározást is szolgáló sejtekben-szövetekben (Ley és mtsai, 1997). Néhány tanulmány szerint a só stressz is elősegíti a keményítő szintézisét a növényekben (Rathert, 1983; Yin és mtsai, 2010).

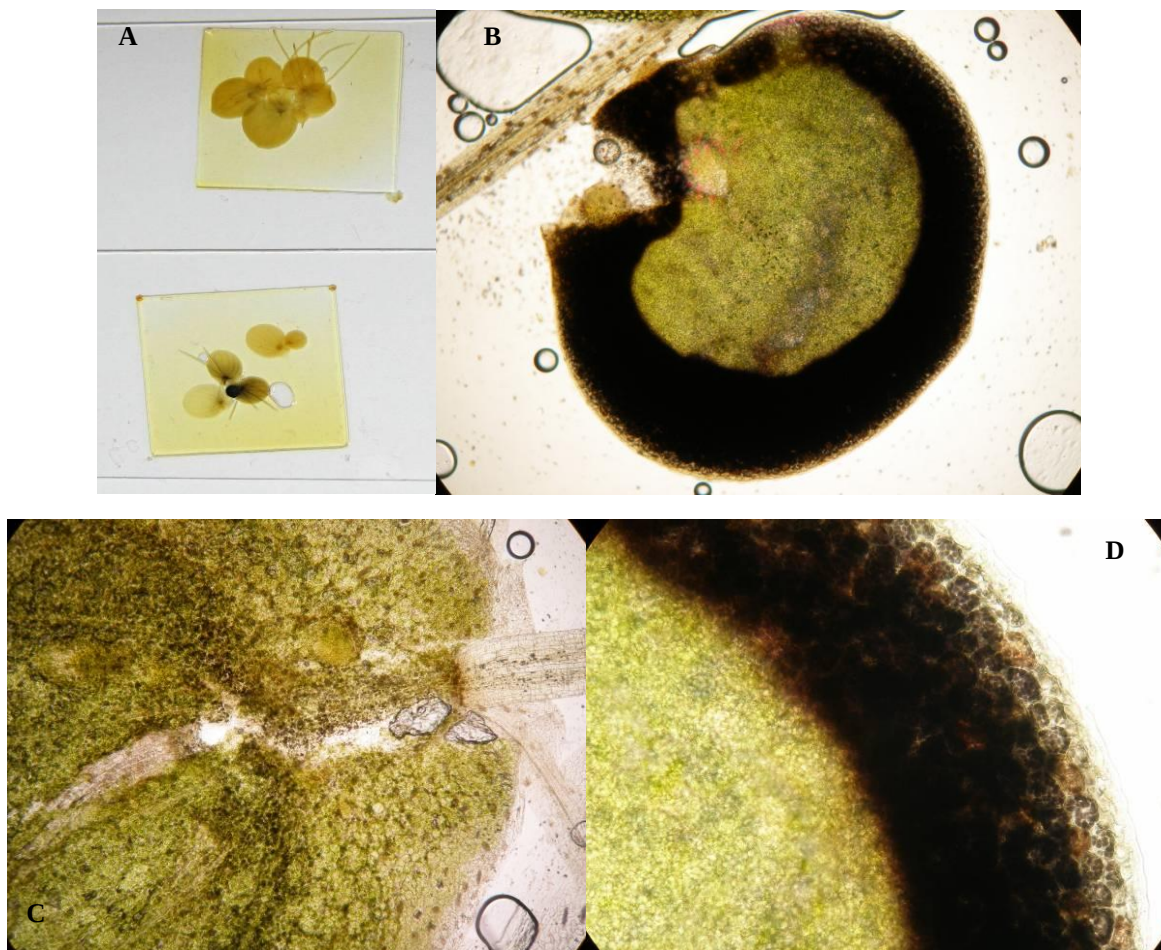
Jelenleg az Egyesült Államok bioetanol iparának legfontosabb alapanyaga a kukorica, illetve annak keményítőtartalma, ez a tény azonban két problémát is felvet:

1. A kukorica fontos élelmiszer- és takarmánynövény is, az élelmiszertermelés helyett üzemanyagként történő feldolgozása etikailag és gazdaságilag is problémás (Sun és Cheng, 2002).
2. Az intenzív kukoricatermesztés környezetvédelmi problémákat is okoz, mivel magas input-igénye (műtrágyák, herbicidek, gépesített művelés) környezetszennyezést és talajeróziót eredményez (Pimentel, 2003).

Ezért szükséges az újfajta keményítőforrások keresése, a kukoricakeményítő-alapú etanol-fermentáció alternatívájaként, hogy az etanol ipar fejlődését fenntarthatóbbá és környezetbarátabbá tehetik.

A békalencse-félék jellemző tulajdonsága, hogy viszonylag magas keményítőtartalommal rendelkeznek, és kedvezőtlen fiziológiai körülmények, környezeti stressz hatására a felhalmozott keményítő mennyisége tovább emelkedik. A jelentős mennyiségű keményítő alkalmas lehet bio-etanol-fermentációhoz is. A különböző békalencse fajtától és a nevelési körülményektől függően a felhalmozott keményítő koncentrációja 3 és 75% is lehet szárazanyagra vonatkoztatva (Landolt és Kandeler, 1987; Reid és Bielecki, 1970).

Xu és mtsai (2011) szabadföldi, sertés hígtrágyával végzett kísérletei alapján a *S. polyrrhiza* egy helyi (Észak-Karolina) ökotípusa által felhalmozott keményítő mennyisége 19-30 sz.a. % (m/m) között mozgott, amely mennyiség már alkalmas lehet az etanol-fermentáció alapanyagául, így a szennyvíztisztításhoz kapcsolt bioüzemanyag előállításra is (Ge és mtsai, 2012). Az eredményeik alapján a keményítőtartalom és a felhalmozás sebessége tápelemhiánnyal illetve kémiai stresszel, (az ő esetükben NaCl-dal) jelentősen fokozható, így az etanol-fermentációhoz is jobb alapanyag állítható elő.



1. kép Felhalmozott keményítő szeneszcens *S. polyrrhiza*-szártagokban. A képek sötétebb részei a KI-os festés hatására az asszimiláló szövetekben elszíneződött keményítőszemcséket mutatják (saját fotók)  
A: *S. polyrrhiza* fiatal (fent) és szeneszcens szártagjai (lent) a fotoszintetikus pigmentek kivonása és KI-os festés után.  
B, C, D: Szeneszcens *S. polyrrhiza*-szártag mikroszkópos képe kisebb (B), illetve nagyobb nagyításban (C és D)

### 2.3.2. A békalencse-félék fehérjetartalma

A békalencse-növények igen magas fehérjetartalommal rendelkezhetnek (FAO, 1999). Landolt és Kandeler (1987) eredményei alapján a sertés-szennyvízen nevelt békalencse-növények fehérjetartalma 15-45% (sz.a.) volt. Cheng és Stomp (2009) eredményei alapján pedig takarmánykiegészítőként adagolva a kísérleti állatok gyorsabb növekedését eredményezte. Ahmad 1990, illetve Islam és mtsai 2004 vizsgálatai alapján a betakarított békalencse-biomassza szerves trágyaként is alkalmazható.

Mivel a szennyvíztisztításban is előszeretettel használt növények, a békalencse-biomassza szennyvízkezeléssel összekapcsolt előállítását és felhasználását is intenzíven kutatják (FAO, 1999; Xu és mtsai, 2011; Bergmann, 2000; Casal és mtsai, 2000; Xu és Shen, 2011; Mohedano, 2012).

### 3. Célkitűzések

A fentebb felsorolt előnyös tulajdonságaik (magas fehérje- és keményítőtartalom, gyors növekedés, hatékony tápanyagfelvétel, tápanyagterhelés jó tűrése) miatt a békalencse-félék potenciális haszonnövényeknek is tekinthetők, és laboratóriumi körülmények között is jól vizsgálhatók.

Mivel fontos a gazdasági hasznosításukhoz szükséges növekedési, fiziológiai tulajdonságaik minél jobb felmérése, munkánk során a DE TTK Növénytani Tanszékén rendelkezésünkre álló, hazai vizekben is elterjedt békalencse-fajok, az apró békalencse (*Lemna minor* L.), és a bojtos békalencse (*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden) axenikus tenyészetekének növekedési, fehérje- és keményítő-felhalmozási jellemzőit vizsgáltuk. Céljaink az alábbiak voltak:

- 1) a vizsgált fajok optimális körülmények között tartott tenyészetek milyen mértékű keményítő-felhalmozást mutatnak?
- 2) indukálható-e rövidtávon, nem-letális kémiai stresszel a keményítő-felhalmozás, és ha igen, milyen mértékű fajok közötti eltérések mutathatók ki?
- 3) rövid távú, nem-letális kémia stressz hatására hogy változik a fehérjetartalom a különböző fajok tenyészetekben?
- 4) milyen összefüggéseket mutat a kémiai stressz indukálta növekedésgátlás a biomassa fehérje- és keményítőtartalmával?

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. A tesztnövények

Vizsgálatainkhoz a hazai vizekben is elterjedt apró békalencse (*Lemna minor* L.) és bojtos békalencse (*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden) axenikus tenyészeteket használtuk. A törzstenyészeteket a DE TTK Növényteni Tanszék Növény és Szövettenyésztési laboratóriumában neveltük.

#### *Lemna minor* L.- apró békalencse

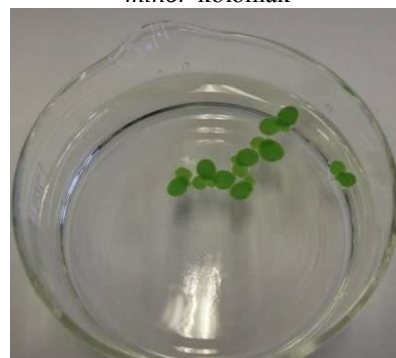
Egyedeinek szártagjai 1-1 gyökérrel rendelkeznek, a víz felszínén úsznak egyedül, vagy 2-4 összenőve. Átmérőjük 2-4 mm, alakjuk tojásdad, majdnem kerek. Levélkéik laposak, alul sem domborúak. Áttelelő példányai kisebbek (Felföldy 1990)(1. kép).



2. kép A tesztekhez használt axenikus tenyészetből kivett *Lemna minor*-kolóniák

#### *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden- bojtos békalencse

A szártagok magányosan vagy összenőve (2-10) úsznak a víz felszínén. Alakjuk kerek vagy széles visszás tojásdad, színük és fonákuk is lapos. A szártagok fonáka bíbor-lilás színű lehet az abaxiális epidermisz közelében felhalmozott antociánok miatt. Gyökérzetük több, 10-13 (2-18) gyökérből álló gyökércsomó. A kedvezőtlen időszakok átvészelését 1-3 mm átmérőjű barna, vese alakú, lapos, gyökértelen, magas keményítőtartalmú, vízfenékre süllyedő telelőrügyek biztosítják (Felföldy 1990)(2. kép).



3. kép A tesztekhez használt axenikus tenyészetekből kivett *Spirodela polyrrhiza*-kolóniák

A törzstenyészeteket a DE TTK Növényteni Tanszék Növény és Szövettenyésztési laboratóriumában neveltük (folyamatos megvilágítás, fehér,  $80 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  hőmérséklet),  $\frac{1}{2}$  erősségű Hutner-táppoldaton (pH 6,3-6,4) (Oláh és mtsai 2010).

## 4.2. A kísérleti körülmények

Az egyes kísérletek teljes időtartama 7 nap volt. A teszteket 7-10 napig előnevelt növényekkel végeztük. 15 darab, 100-100 cm<sup>3</sup> tiszta, ½ erősségű Hutner-tápoldatot tartalmazó 80 mm átmérőjű kristályosító csészékbe helyeztünk 20-30 levélkét (~7-9 kolónia). A kísérletek első 4 napjában a növények akklimálódtak (lag-szakasz), így a kísérletek második felében, a kémiai stressz alkalmazásakor a tenyészetek már alkalmazkodtak az új környezetükhöz, és az exponenciális növekedési fázisban jártak.

A kémiai stressz indukálásához KCl-ot, egy, a szabványos békalencse-tesztekhez is ajánlott „referencia-mérget” alkalmaztunk (Environment Canada 2007). A vegyület nem-specifikus mérgezési tüneteket okoz, a tesztkörülmények között nem bomlik és nem lép reakcióba a tápoldat összetevővel, a használata biztonságos. Biomassza növekedést gátló hatása 1-10 g l<sup>-1</sup> közötti koncentráció tartományban már jelentős (Environment Canada 2007).

A kísérletek 4. napján 250 g l<sup>-1</sup> koncentrációjú KCl-törzsoldatot adtunk a tenyészetek tápoldatához, úgy, hogy a végleges KCl-koncentrációjuk 0; 1; 2; 4; 8; 16 illetve 32 g l<sup>-1</sup> legyen, 3-3 párhuzamos kezelésben. A KCl-kezelések 3 napig (72±4 h) tartottak. Az egyéb feltételek megfeleltek a törzstenyészetek nevelési körülményeinek.

## 4.3. A vizsgált paraméterek

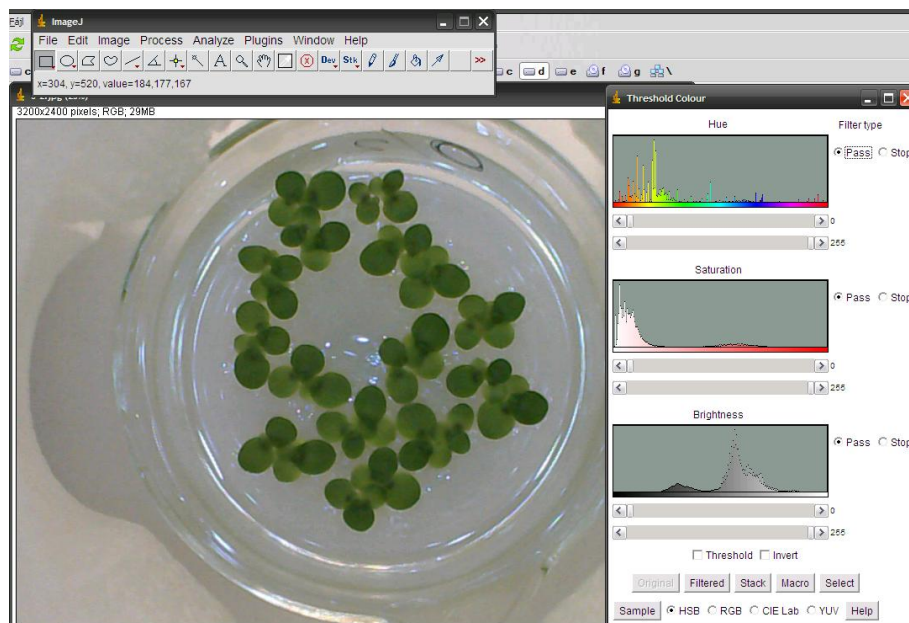
### 4.3.1. Növekedési jellemzők

A kísérlet során vizsgáltuk a KCl hatását a békalencse-tenyészetek növekedésére, különböző koncentrációkban. A KCl-kezelések 0. és 3. napján digitális fényképfelvételeket készítettünk (3200x2400 pixel, ~600 dpi), melyek feldolgozásával (ImageJ v1.45, Abramoff és mtsai 2004) (3. kép) mértük a tenyészetek össz-levélfelületét. A levélfelületek változása alapján számoltuk a tenyészetek relatív növekedési rátáját az alábbi képlettel (Environment Canada 2007):

$$\text{RGR (cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}) = (\ln A_3 - \ln A_0) / t$$

Ahol:  $A_0$  illetve  $A_3 = a$  0. és 3. napon mért levélfelületek ( $\text{cm}^2$ -ben kifejezve),  $t$  = a két mérés között eltelt idő napokban kifejezve.

A növekedési ráták alapján számoltuk a tenyészetek duplázódási idejét is, az alábbi képlet segítségével (OECD 1998):  **$Td = \ln 2 / RGR$**



4. kép A békalencse-tenyészetek digitális felvételeinek felszín-számolási folyamata (ImageJ v1.45)

A különböző KCl koncentrációknál kapott növekedési rátákat a kontroll tenyészetek átlagához viszonyítva kiszámoltuk a KCl-indukált növekedésgátlás (I%) mértékét is az egyes tenyészetekben, az alábbi képlet segítségével (OECD 1998):

$$I\% = ((RGR_{\text{kontroll}} - RGR_{\text{kezelt}}) / RGR_{\text{kontroll}}) * 100$$

### A biomassza mérése

A KCl kezelések 3. napján a felületmérés után az egyes tenyészeteket szűrőpapírral átszűrtük, a rájuk tapadt vizet papírtörülővel leittattuk. Ezt követően az egyes tenyészetek növényi anyagát két kröülbelül egyforma részre osztottuk. Az egyik részét a nedves tömeg megmérése (0,0001 g pontosság, analitikai mérleg) után lefagyasztottuk, és így tároltuk a fehérjetartalom meghatározásához. A másik részének nedves tömegét szintén megmértük, ezt követően a mintákat szárítószekrényben, 24 órán keresztül, 65 °C-on szárítottuk, majd mértük a száraztömegüket. A nedves- és száraztömeg ismeretében számoltuk a biomassza szárazanyagtartalmát (szárazanyagtartalom = száraztömeg / nedves tömeg), illetve az egységnyi asszimiláló felületre eső tömegét (Leaf Mass Area, LMA = levéltömeg /

levélterület), amely a békalencse-félék esetében erős korrelációt mutathat a keményítőtartalommal.\* A szárított biomasszát lezárt 2 ml-es Eppendorf-csövekben tároltuk a keményítőtartalom meghatározásáig.

#### **4.3.2. A keményítőtartalom mérése**

A minták keményítőtartalmát a Chow és Landhäusser (2004) ill. Yemm és Willis (1954) által javasolt módszerek adaptálásával a következő eljárással határoztuk meg:

Az oldható cukrok kivonásához a szárított növényi mintát homogenizáltuk, és 1 ml 96%-os etanollal átmostuk. Ezután a kivonatot centrifugáltuk (10 min), a felülúszót eltávolítottuk, és a fenti műveletet még 4x megismételtük (összesen ötször mostuk és centrifugáltuk az egyes mintákat). A visszamaradt üledéket 5 ml 0,005 N kénsavval 1 h hosszat 95 °C vízfürdőn hidrolizáltuk, majd a kivonatot lehűtöttük és centrifugáltuk (10 min, 4000 g). Az 5 ml-re kiegészített felülúszó 100 µl-ét 400 µl desztillált vízzel hígítottuk, és 3 ml Antron reagenst adtunk hozzá. Az így kapott keveréket 10 percig forraltuk, majd hűtés után 620 nm-en mértük az abszorbanciát (Shimadzu UV/VIS 1601 spektrofotométer, Japán), és glükóz-standardgörbe alapján számoltuk a glükóz ekvivalens keményítőtartalmat.

#### **4.3.3. A fehérjetartalom mérése**

A békalencse-növények fehérjetartalmának meghatározása előtt a fagyasztott nedves biomasszát folyékony nitrogénben eldörzsöltük, majd a fotoszintetikus pigmenteket és a vizet acetonnal vontuk ki belőlük. A visszamaradt üledéket ismételten homogenizáltuk folyékony nitrogénben, majd a minták fehérjetartalmát 100-100 µl proteáz-kivonószerrel (0.1 M Tris-HCl puffer, pH 8.0/150 mM NaOH/1 µl ml<sup>-1</sup> merkapto-etanol) oldottuk fel. A fehérje-kivonatok 30 µl-ét 1,5 ml Bradford-reagenshez (Coomassie Protein Assay Reagent, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products) adtuk, majd 595 nm-en mértük az oldat abszorbanciáját. A minták fehérjetartalmát albumin standarddal szemben (Coomassie Protein Assay Kit, Albumin Standard, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products) határoztuk meg, és a minta frisstömegére, illetve számolt száraztömegére vonatkoztattuk.

---

\* Az egységnyi asszimiláló levélfelületre eső levéltömeg (LMA= Leaf Mass Area) megnevezés kissé félrevezető lehet, mivel a békalencse-növények esetében nem levelekről, hanem ellaposodó szártagokról van szó, azonban a nehézkes körülírás helyett („egységnyi asszimiláló felületre eső biomassza”) a dolgozatban a szárazföldi növények levélnövekedésére elterjedten használt levélterület/-tömeg arányt, illetve annak rövidítését (LMA) használjuk.

#### **4.3.4. Az adatok értékelése**

A vizsgálatokat mindkét békalencse-fajjal kétszer végeztük el. A növekedésanalízishez a 2-2 teszt párhuzamosait összevonva, KCl-koncentrációnként összesen 6-6 minta adatait értékeltük.

A keményítőtartalom meghatározása mindkét békalencse-fajnál 1-1 teszt összegyűjtött szárított biomasszájából történt, mintánként két, egymástól független feltárással és méréssel, így KCl-koncentrációnként 3-3 párhuzamos eredményeit összesítettük és értékeltük.

A fehérjetartalom mérése mindkét békalencse-fajnál 1-1 teszt összegyűjtött, fagyasztott nedves biomasszájából történt, így KCl-koncentrációnként 3-3 párhuzamos eredményeit összesítettük és értékeltük.

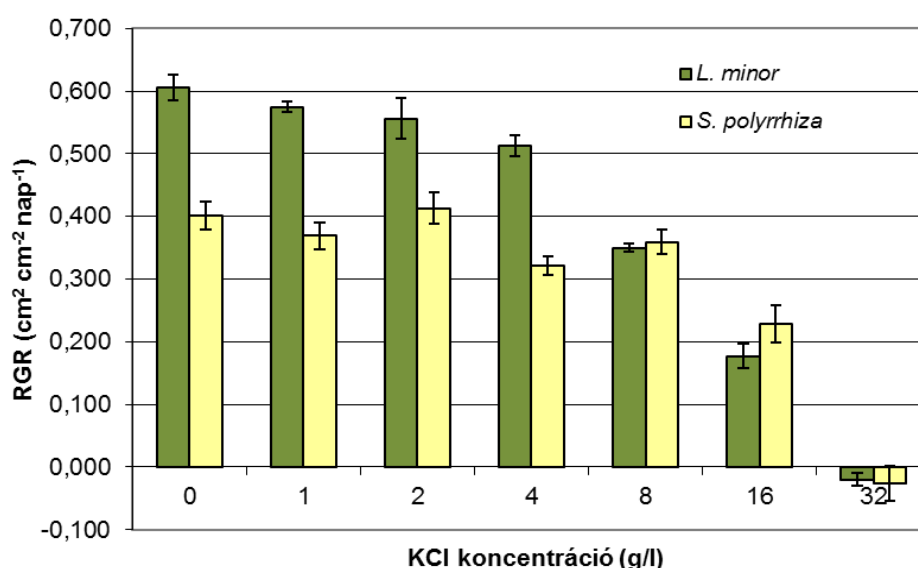
A kapott eredmények feldolgozása, az átlagok és szórások számolása MS Office Excel 2007 szoftverrel történt. A varianciák és átlagértékek fajon belüli összehasonlítása egyutas ANOVA módszerrel, illetve post-hoc Tukey-teszttel, a két faj közötti különbségek összehasonlítása kétoldali t-próbával történt a Past v2.0 statisztikai szoftverrel (Hammer 2001). A különbségeket  $p < 0,05$  szinttől tekintettük szignifikánsnak.

## 5. Eredmények

### 5.1. A növekedési paraméterek változása

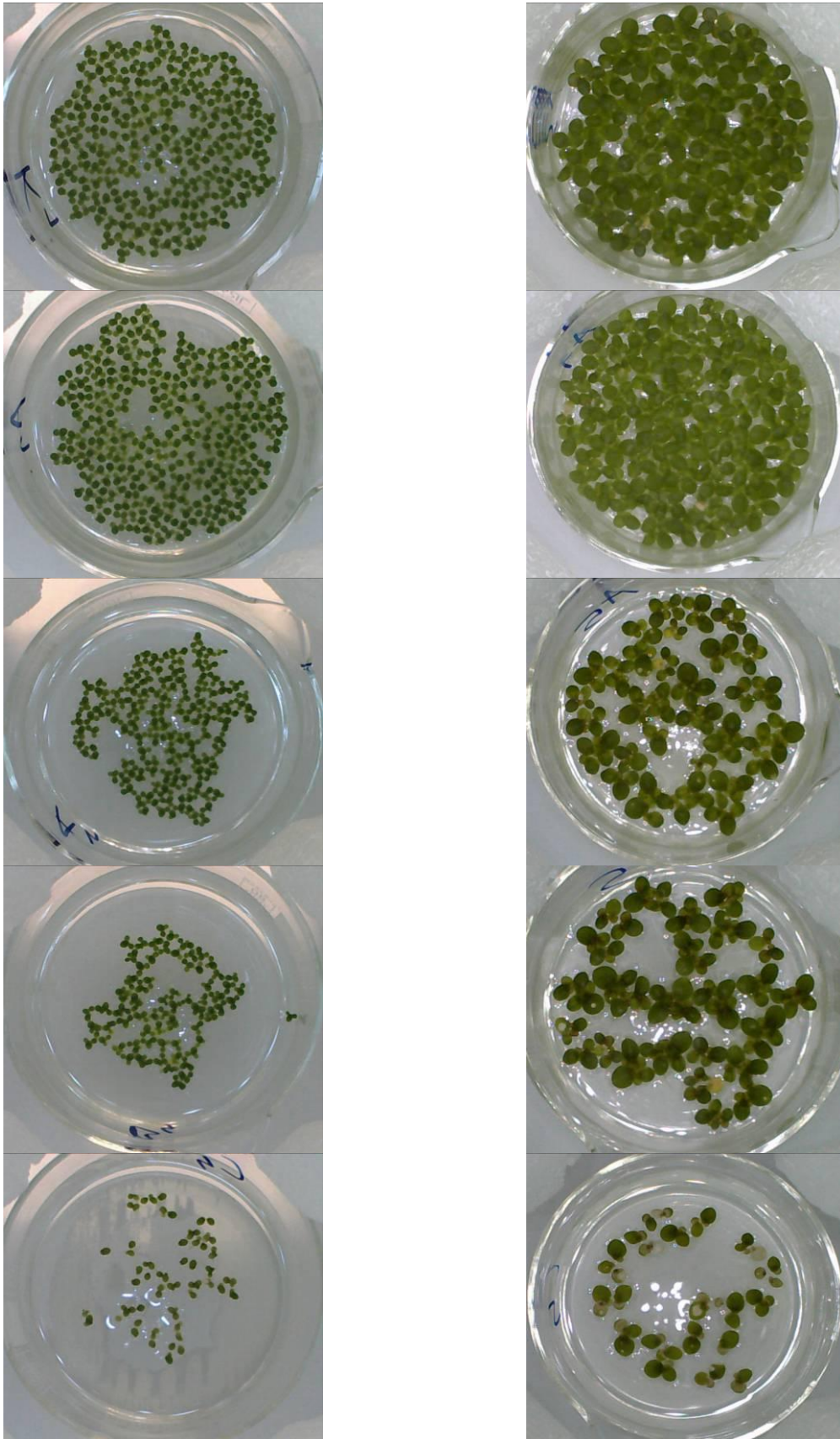
#### A tenyészetek biomasszájának mennyiségi és minőségi változásai

Az eredményeink alapján a két békalencse-faj azonos körülmények között tartott kontroll tenyészetek eltérő levélfelületre vonatkoztatott növekedési sebességet mutattak a tesztek során (3. ábra).



3. ábra A két vizsgált békalencse faj kontroll és KCl-kezelt tenyészetek háromnapos, felületre vonatkoztatott átlagos növekedési rátája (RGR), (átlag±szórás, n=3)

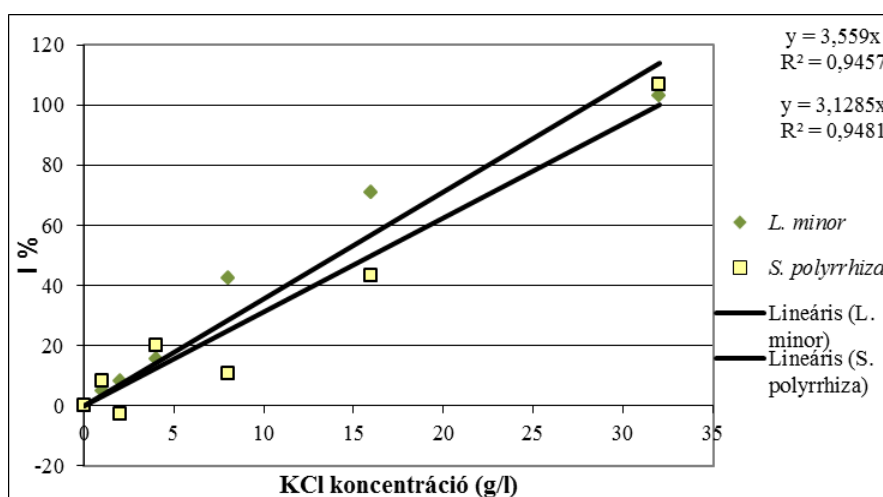
A kontroll tenyészetek esetében a *L. minor* magasabb növekedési rátát mutatott ( $0,606 \pm 0,021 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ,  $T_d = 1,145 \pm 0,040 \text{ nap}$ ), mint a *S. polyrrhiza* ( $0,402 \pm 0,022 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ,  $T_d = 1,728 \pm 0,097 \text{ nap}$ ) és ez az előny az alacsonyabb KCl koncentrációknál is megmaradt, 8 g l<sup>-1</sup> KCl koncentrációtól azonban már nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két faj között. A növekedés gátlása a *L. minor* tenyészetekben 4 g l<sup>-1</sup> koncentrációtól volt szignifikáns ( $I\% = 15,4$ ,  $RGR = 0,512 \pm 0,016 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ). Nagyobb koncentrációk esetén tovább lassult a növekedés (8 g l<sup>-1</sup>-nél  $0,350 \pm 0,006$ , 16 g l<sup>-1</sup>-nél pedig  $0,177 \pm 0,020 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ), olyannyira, hogy 32 g l<sup>-1</sup> KCl hatására a növények pusztulása (4. kép) miatt levélfelület-csökkenést, azaz negatív növekedési rátát tapasztaltunk ( $-0,020 \pm 0,009 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ) (3. ábra).



5. kép: A vizsgált békalencse-fajok axenikus tenyésztetei a KCl-kezelések 3. napján. Az alkalmazott KCl-koncentrációk mindkét faj (*L. minor* - baloldali oszlop, *S. polyrrhiza* - jobboldali oszlop) esetében az alábbi módon változtak a felső sortól az alsóig: 0; 1; 8; 16; 32 g l<sup>-1</sup>

A *Spirodela polyrrhiza* esetében a növekedés  $4 \text{ g l}^{-1}$  KCl hatására már szignifikánsan csökkent ( $0,322 \pm 0,015 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ),  $8 \text{ g l}^{-1}$  KCl esetében azonban a különbség nem bizonyult szignifikánsnak, bár elérte a 10%-ot ( $0,359 \pm 0,020 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ). A további, emelkedő KCl koncentrációk már a *L. minor*-nál tapasztaltnál hasonló gátlást ( $0,229 \pm 0,029 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ;  $16 \text{ g l}^{-1}$  KCl), illetve pusztulást ( $-0,027 \pm 0,028 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$ ;  $32 \text{ g l}^{-1}$  KCl) eredményeztek. A *S. polyrrhiza* esetében a mérgező hatás erősödésével,  $4 \text{ g l}^{-1}$  KCl koncentrációtól már háromnapos kezelés hatására megjelent a szártagok abaxiális felszínén a fajra jellemző antocián-felhalmozás, mely felülnézetben is barnás elszíneződést okoz (4. kép)

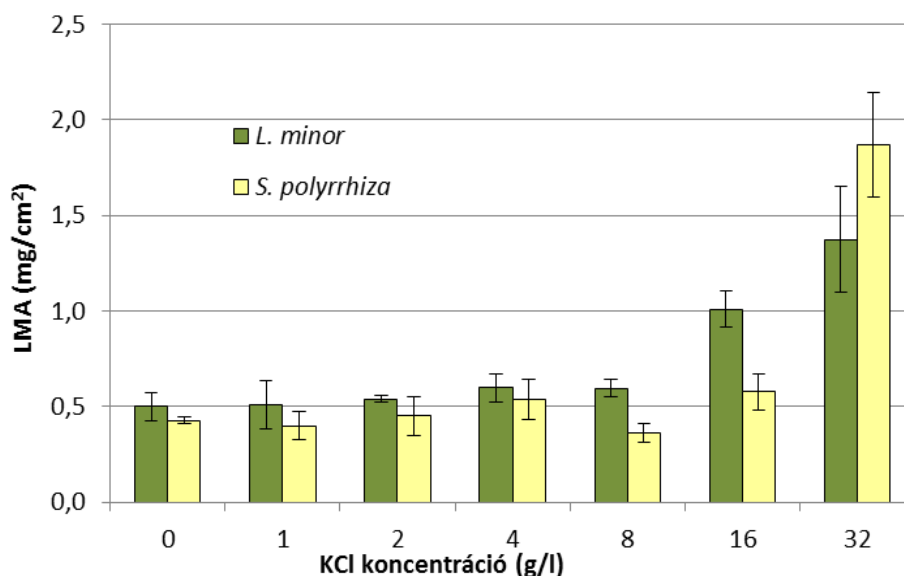
Az alkalmazott KCl koncentráció függvényében számolt növekedésgátlás alapján a két békalencse-faj között nem volt jelentős az eltérés, a háromnapos EC50 érték a *L. minor* esetében  $14,05 \text{ g KCl l}^{-1}$ , a *S. polyrrhiza*-nál  $15,07 \text{ g l}^{-1}$  KCl volt (4. ábra).



4. ábra A vizsgált békalencse-fajok tenyészteteiben a háromnapos KCl-kezelés hatására számolt átlagos növekedésgátlás (I%) a kontroll átlagához viszonyítva.

#### A tenyészetek asszimiláló felületre vonatkoztatott száraztömegének (LMA) változása

Az asszimiláló felületre eső száraz biomassa változása alapján a két vizsgált békalencse-faj kontroll tenyésztetei között nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. Az apró, gömbölyded szártagú *L. minor* esetében kicsit magasabb felületegységre eső száraztömeget mértünk ( $0,500 \pm 0,073 \text{ mg cm}^{-2}$ ), mint a vízfelszínen kiterülő vékony, lapos szártagú *S. polyrrhiza* tenyészetnél ( $0,429 \pm 0,019 \text{ mg cm}^{-2}$ ), a különbség azonban nem volt szignifikáns. A két békalencse-faj között  $8$  és  $16 \text{ g l}^{-1}$  KCl hatására mértünk szignifikáns különbséget az egységnyi asszimiláló levélfelületre eső biomasszára vonatkoztatva (5. ábra).



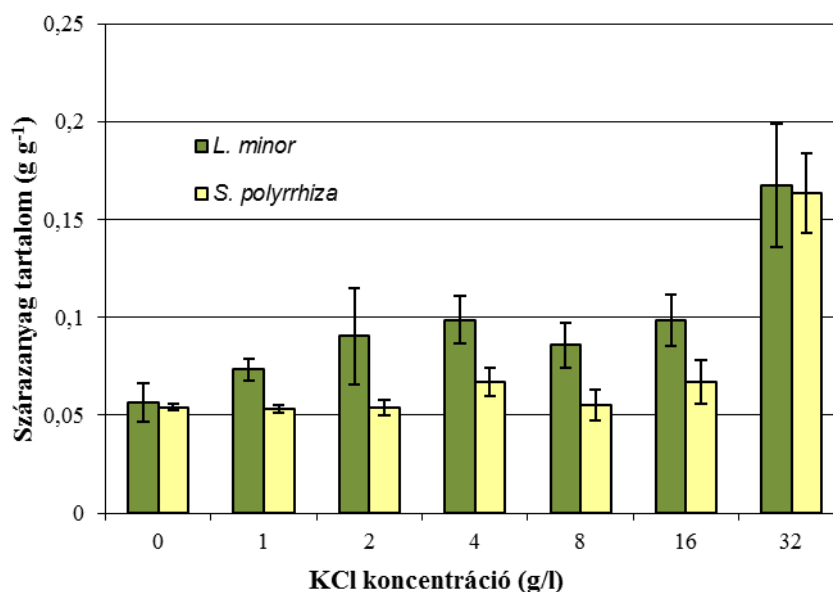
5. ábra A vizsgált két békalencse faj tenyészeinek felületre vonatkoztatott száraztömege (LMA) négynapos KCl-kezelés után (átlag±szórás n=3)

KCl-stressz hatására a levéltömeg-terület arány mindkét faj esetében növekedést mutatott, a változások azonban csak a jelentős növekedésgátlást eredményező 16 és 32 g l<sup>-1</sup> KCl esetében voltak szignifikánsak (5. ábra). A *L. minor* tenyészetekben a kontrollhoz viszonyított emelkedés 16 és 32 g l<sup>-1</sup> KCl esetében 202% (1,011±0,094 mg cm<sup>2</sup>) illetve 275% (1,375±0,277 mg cm<sup>2</sup>) volt. A *S. polyrrhiza* esetében 16 g l<sup>-1</sup>-nél nem volt jelentős az emelkedés (0,579 ±0,095 mg cm<sup>2</sup>, 135% (NS), de 32 g l<sup>-1</sup> KCl koncentrációnál már ugrásszerű, 436%-os (p=0,0001742) növekedést (1,870±0,270 mg cm<sup>2</sup>) mértünk.

### A biomassza szárazanyagtartalmának a változása

Szárazanyagtartalmat tekintve a vizsgált két békalencse-faj esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll tenyészetek között (*L. minor* esetében 0,057±0,01 g g<sup>-1</sup>, *S. polyrrhiza*-nál pedig 0,054±0,00 g g<sup>-1</sup>) (6. ábra). A biomassza szárazanyagtartalma 1-16 g l<sup>-1</sup> KCl koncentrációknál csak a *L. minor* tenyészetekben emelkedett kismértékben (129-174%, NS), a *S. polyrrhiza* esetében a kontrollhoz hasonló értéken maradt (93-135%, NS, 6. ábra). A kismértékű emelkedés miatt 1-16 g l<sup>-1</sup> KCl hatására a *L. minor* szignifikánsan magasabb szárazanyagtartalmat mutatott minden koncentrációnál, mint a *S. polyrrhiza*. 32 g l<sup>-1</sup> KCl koncentrációnál mindkét faj esetében jelentősen emelkedett a szárazanyagtartalom (a *L. minor*-nál 295%-os volt az emelkedés, a *S. polyrrhiza*-nál pedig 303%-os), és ennél a

koncentrációnál a két faj közötti különbség ismét eltűnt ( $0,167 \pm 0,031 \text{ g g}^{-1}$  a *L. minor*-ban, illetve  $0,164 \pm 0,02 \text{ g g}^{-1}$  a *S. polyrrhiza*-ban) (6. ábra).

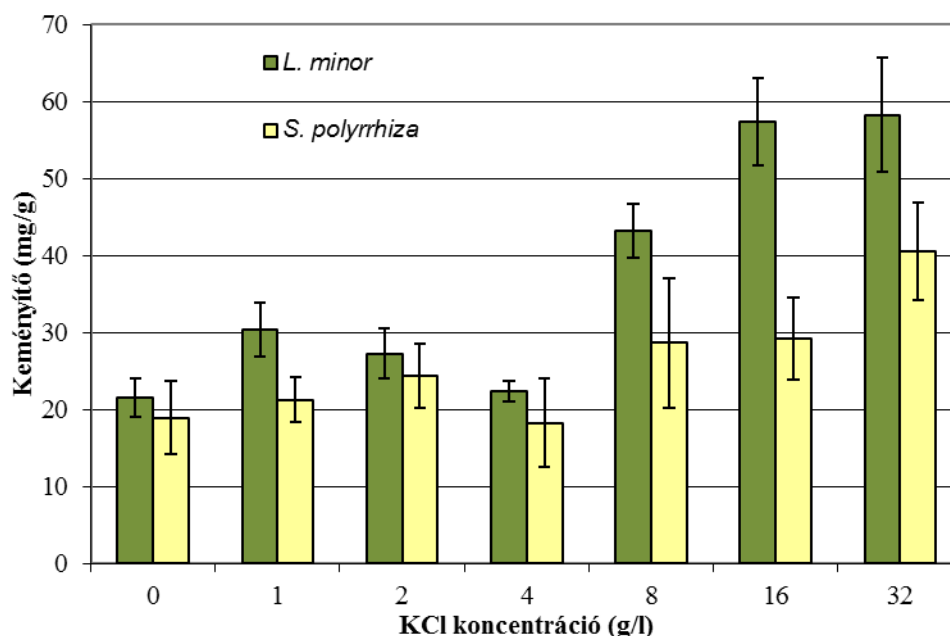


6. ábra A szárazanyagtartalom változása a két vizsgált békalencse-faj tenyészetekben háromnapos KCl-kezelés hatására (átlag±szórás, n=3)

## 5.2. A biomassa keményítőtartalmának változása

A két békalencse-faj kontroll tenyészetek közül a *L. minor* kissé magasabb, száraztömegre vonatkoztatott keményítőtartalommal rendelkezett ( $21,54 \pm 2,52 \text{ mg g}^{-1}$ ), mint a *S. polyrrhiza* ( $18,92 \pm 4,81 \text{ mg g}^{-1}$ ) (7. ábra), de a különbség nem volt szignifikáns.

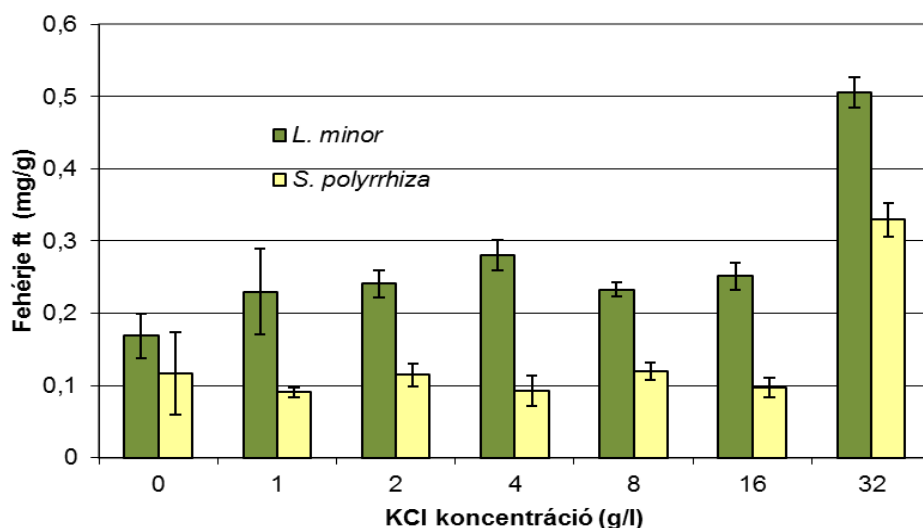
KCl-stressz hatására mindkét békalencse-fajnál a keményítőtartalom emelkedése figyelhető meg, az emelkedés mértéke és koncentrációfüggése azonban a két faj esetében eltérő volt (7. ábra). A keményítőtartalomban  $8 \text{ g l}^{-1}$  KCl koncentrációig egyik fajnál sem mértünk jelentős változást (*Lemna minor*-nál  $1, 2$  és  $4 \text{ g l}^{-1}$  KCl hatására  $30,41 \pm 3,53 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $27,28 \pm 3,22 \text{ mg g}^{-1}$  és  $22,36 \pm 1,34 \text{ mg g}^{-1}$ , *S. polyrrhiza* tenyészetekben pedig,  $21,26 \pm 2,89 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $24,37 \pm 4,19 \text{ mg g}^{-1}$  és  $18,27 \pm 5,8 \text{ mg g}^{-1}$ ). E koncentráció fölött azonban mind a két faj esetében emelkedést tapasztaltunk (*L. minor*-ban  $8, 16$  és  $32 \text{ g l}^{-1}$  KCl esetén  $43,21 \pm 3,48$  (201%),  $57,38 \pm 5,59$  (266%) illetve  $58,28 \pm 7,46 \text{ mg g}^{-1}$  (271%), míg a *S. polyrrhiza* esetében  $28,65 \pm 8,45$  (151%),  $29,21 \pm 5,34$  (154%), illetve  $40,58 \pm 6,34 \text{ mg g}^{-1}$  (214%), bár a *S. polyrrhiza*-nál csak  $32 \text{ g l}^{-1}$  KCl koncentrációnál volt szignifikáns a különbség, míg *L. minor* esetében már  $8 \text{ g l}^{-1}$ -nél is (7. ábra).



7. ábra A két vizsgált békalencse faj tenyészetének szárazanyagra vonatkoztatott keményítőtartalma a KCl-kezelések 3. napján. (átlag±szórás, n=3)

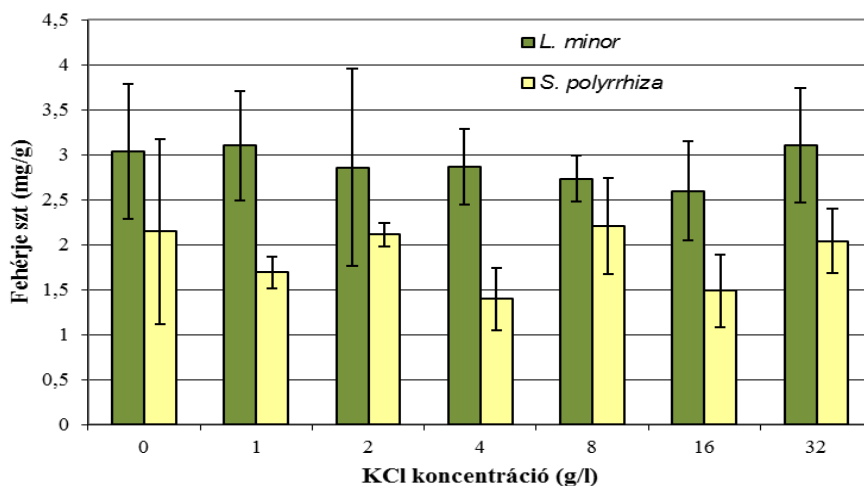
### 5.3. A biomassa fehérjetartalmának változása

Friss tömegre vonatkoztatva a két békalencse-faj kontroll tenyészetek között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést, bár a különbség közel 150%-os volt (a *L. minor*-nak  $0,168 \pm 0,031 \text{ mg g}^{-1}$  volt a fehérjetartalma, míg a *S. polyrrhiza*-nál  $0,116 \pm 0,057 \text{ mg g}^{-1}$ ). A kontroll adatokkal szemben a KCl kezelések hatására minden esetben a *L. minor* tenyészetekben mértünk szignifikánsan magasabb, frisstömegre vonatkoztatott fehérjetartalmat. A biomassa fehérjetartalma 0-16 g l<sup>-1</sup> KCl esetében nem változott jelentősen egyik faj esetében sem, bár a *L. minor*-nál kismértékű (136-166%-os) emelkedést tapasztaltunk. 32 g l<sup>-1</sup> KCl koncentrációnál nagymértékű növekedés volt mérhető mindkét faj biomasszájának fehérjetartalmában. A *L. minor* esetében ez 300%-os volt ( $0,505 \pm 0,021 \text{ mg g}^{-1}$ ), míg a *Spirodela polyrrhiza* esetében 283%-os ( $0,329 \pm 0,023 \text{ mg g}^{-1}$ ) (8. ábra).



8. ábra A két békalencse-faj biomasszájának frisstömegre vonatkoztatott fehérjetartalma, háromnapos KCl-kezelés után (átlag±szórás, n=3)

A száraz biomasszára vonatkoztatott fehérjetartalom a kontroll tenyészetek esetében szintén a *L. minor* esetében mértünk magasabb értékeket, de szignifikáns különbséget a két faj között csak 1, 4 és 16 g l<sup>-1</sup> KCl hatására tapasztaltunk. A két faj közötti különbség azonban elsősorban a szórások függvényében volt szignifikáns, vagy nem-szignifikáns, az eredményeink alapján a száraztömegre vonatkoztatott fehérjetartalom körülbelül azonos maradt, az alkalmazott KCl koncentrációtól függetlenül (9. ábra).



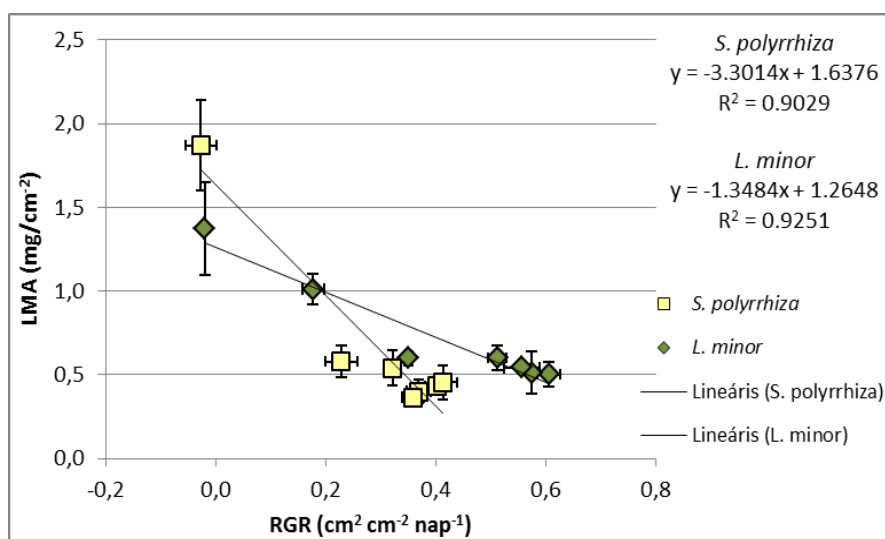
9. ábra A két békalencse-faj biomasszájának száraztömegre vonatkoztatott fehérjetartalma, háromnapos KCl-kezelés után (átlag±szórás, n=3)

## 6. Eredmények értékelése

### 6.1. A növekedési ráta és a biomassza jellemzőinek változása

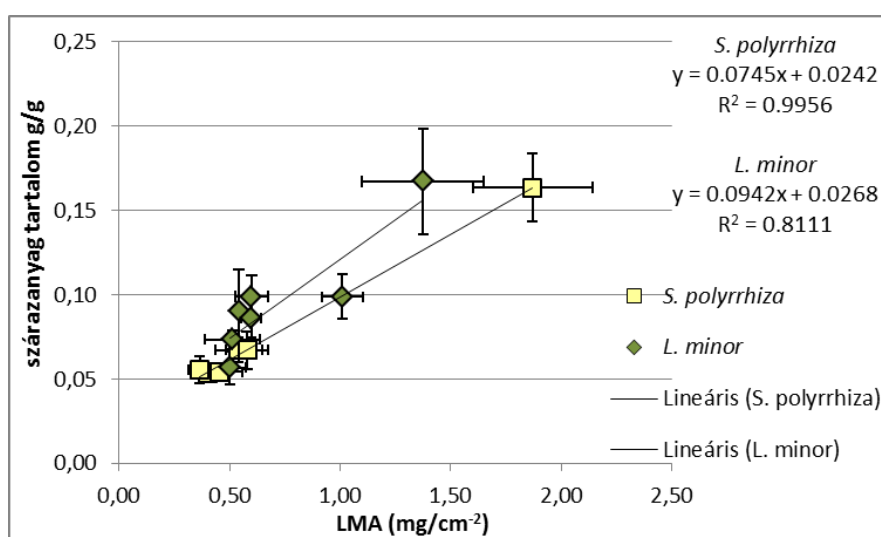
Az eredményeink alapján a két békalencse-faj kontroll tenyészetei eltérő növekedési sebességet mutattak a tesztek során alkalmazott körülmények között. Az alkalmazott tesztfeltételek mellett a *L. minor* magasabb növekedési potenciállal jellemezhető, amelytől a *S. polyrrhiza* közel 20%-kal elmarad.

A kémiai stressz indukálásához használt KCl növekedésgátló hatása már a háromnapos kezelések végén is megmutatkozott, és bár az alacsonyabb KCl koncentrációknál még a *S. polyrrhiza* kisebb visszaesést mutatott, az 50%-os gátláshoz szükséges KCl koncentráció közel megegyezett a két faj esetében. Noha az általunk számolt 14-15 g l<sup>-1</sup> EC50 érték magasabb, mint az irodalmi adatok (Environment Canada 2007), az ott közölt eredmények hétnapos növekedésgátlásra vonatkoznak, szemben az általunk végzett háromnapos kezelésekkel, ami alatt a mérgező hatás még nem fejlődött ki teljesen. A hosszabb kezelések vélhetően a növekedés megállását, illetve a kísérleti tenyészetek pusztulását okozták volna nemcsak a 32 g l<sup>-1</sup>-es koncentrációnál, de még 16 g l<sup>-1</sup> KCl esetében is.



10. ábra A békalencse-tenyészetek egységnyi asszimiláló felületre eső biomasszája (LMA) és relatív növekedési rátája (RGR) közötti kapcsolat háromnapos KCl-kezelés hatására (átlag±szórás, n=3)

Stressz hatására az egységnyi asszimiláló felületre eső biomassza (LMA), illetve a biomassza szárazanyagtartalma mindkét fajnál a növekedésgátlással arányos emelkedést mutatott (10. ábra), már három nap alatt is, hasonlóan többek közt Tkalec és mtsai (1998) vagy Dirilgen (1998) eredményeihez, amelyet a szerzők a keményítőszemcsék fokozott felhalmozódásának tulajdonítottak. A változások azonban csupán a magasabb koncentrációknál jelentkeztek, ami valószínűsíthetően a rövid kezelési időnek tulajdonítható. Ezt támasztja alá az is, hogy az egységnyi asszimiláló felületre eső biomassza, illetve a szárazanyagtartalom és a növekedési ráta között már a háromnapos kezelések után is jól látható kapcsolat volt (11. ábra).



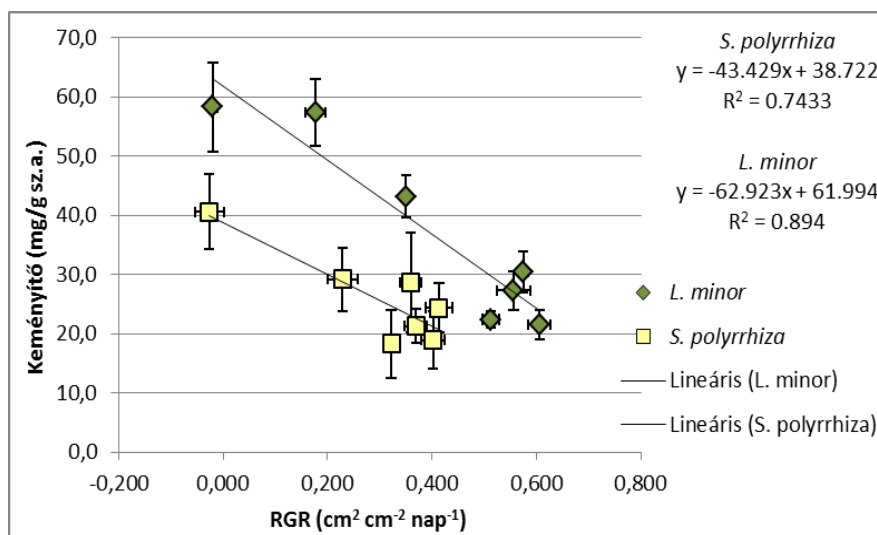
11. ábra A békalencse-tenyészetek szárazanyagtartalma és egységnyi asszimiláló felületre eső biomasszája (LMA) közti kapcsolat háromnapos KCl-kezelés hatására (átlag±szórás, n=3)

## 6.2. A keményítőtartalom változása

A kapott eredmények alapján a vizsgált békalencse-fajok tenyészteti „optimális” nevelési körülmények közt is kimutatható mennyiségű keményítőt tartalmaztak (~19-21 mg g<sup>-1</sup> sz.a., azaz 1,9-2,1 %, fajtól függően), jóllehet kedvező feltételek között nem a tápanyag raktározás az asszimilált szén elsődleges célpontja. A keményítőnek az exponenciális növekedési fázisban is zajló felhalmozása azt jelzi, hogy a békalencse-növények a keményítő- illetve bioetanol-előállítás potenciális „haszonnövényeinek” tekinthetők, hasonlóan Xu és mtsai (2010), Cheng és Stomp (2009) illetve Landolt és Kandeler (1987) eredményeihez.

Az eredmények alapján a keményítő-felhalmozás indukálása már rövidtávon (néhány nap alatt) is lehetséges a kémiai stressz előidézésével (12. ábra). A mérhető változás kiváltása

azonban olyan mértékű növekedésgátlást idéz elő a békalencse-tenyészetekben (12. ábra), hogy valós körülmények között az alkalmazása csak a Xu és mtsai (2010) által bemutatott kétszakaszos eljárással képzelhető el, azaz első lépésként a biomassza előállítás kell, hogy megtörténjen, és a kémiai stresszt, illetve a keményítő-felhalmozását csak ezután, a learatott növények utólagos kezelésével célszerű kiváltani.



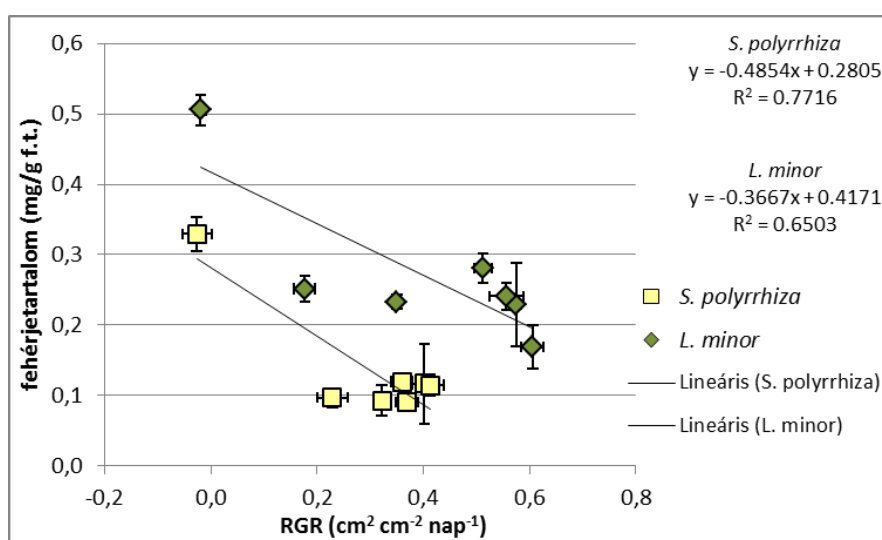
12. ábra A békalencse-tenyészetek relatív növekedési rátája (RGR) és keményítőtartalma közti kapcsolat háromnapos KCl-kezelés hatására (átlag±szórás, n=3)

Az általunk tapasztalt értékek jelentősen elmaradnak a Xu és mtsai (2011) által tapasztalt 20-30 sz.a. %-os keményítőtartalmaktól, aminek lehetséges oka, hogy ők a vizsgálataikat szabadföldi körülmények között, szennyvízen tartott növényekkel végezték, ahol a környezeti stressztényezők (kompetíció, mikroorganizmusok, fényintenzitás, tápelemösszetétel, pH, stb.) hatására jelentős keményítőtartalom volt várható. További eltérés az, hogy vizsgálatok a vegetációs periódus végén, októberben, hűvös, rövidnappalos körülmények között zajlottak, amikor a növények által asszimilált szén már valószínűleg inkább a tartaléktápanyagokra fordítódik.

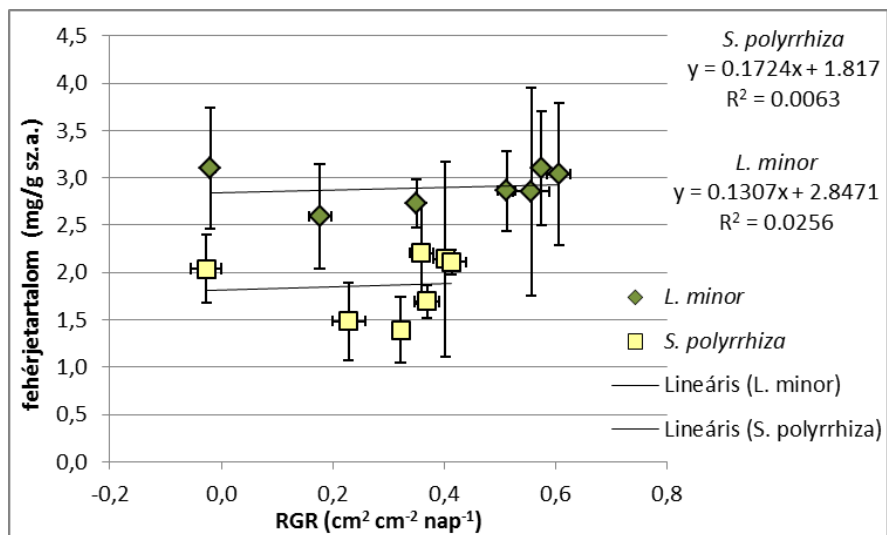
A *S. polyrrhiza*-nak a *L. minor*-nál alacsonyabb keményítőtartalma KCl-indukált stressz alatt valószínűsíthetően annak az eredménye, hogy a *S. polyrrhiza* az asszimilált szén jelentős részét nem tartaléktápanyagok felhalmozására, hanem antociánok szintézisére fordítja. Mivel a *S. polyrrhiza* antociántartalma is jelentősen emelkedik stressz hatására (Oláh és mtsai 2008) (jól látható piros elszíneződés a szártagok alsó felszínén, a 4. képen a levelek felső felszínén is áttűnik a barnás-lilás szín), a keményítő-felhalmozás relatíve kisebb hatékonyságú lehet.

### 6.3. A fehérjetartalom változása

Mivel a békalencse-biomassza sok helyen hagyományosan is használt állati takarmány, illetve magas nitrogéntartalmú zöldtrágya (FAO, 1999), Xu és mtsai (2011) felvetették az etanol-fermentáció után visszamaradó magas fehérjetartalmú anyag takarmányozási vagy trágyázási célú továbbhasználását is. A vizsgálataikban *S. polyrrhiza* növények tíznapos NaCl-kezelése során a fehérjetartalom kismértékű (~22%) csökkenését tapasztalták. Az általunk kapott eredmények alapján a fehérjetartalom nem változott jelentősen a háromnapos KCl-kezelések során, egyik vizsgált fajnál sem. Bár a frisstömegre (nedves biomasszára) vonatkoztatott fehérjetartalom mindkét faj esetében jelentősen emelkedett 32 g l<sup>-1</sup> KCl-nál (8. és 13. ábrák), a szárított biomasszára vonatkoztatott eredmények alapján ez a szárazanyagtartalom növekedéséből következett (9. és 14. ábrák). Ezek alapján a mesterségesen megnövelt keményítőtartalmú biomassza fehérjetartalma nem változott jelentősen a kezelési idő alatt, így továbbra is alkalmas ilyen célokra.



13. ábra A békalencse-tenyészetek frisstömegre vonatkoztatott fehérjetartalmának változása a relatív növekedési ráta (RGR) függvényében háromnapos KCl-kezelés hatására (átlag±szórás, n=3)



14.ábra A békalencse-tenyészetek száraztömegre vonatkoztatott fehérjetartalmának változása a relatív növekedési ráta (RGR) függvényében háromnapos KCl-kezelés hatására (átlag±szórás, n=3)

## 7. Összefoglalás

A békalencse-félék (*Lemnaceae*, *Araceae*) az egész világon elterjedt, vízfelszínen lebegő, redukált felépítésű, egyszikű növények. Számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek miatt környezetvédelmi, ipari és mezőgazdasági alkalmazásuk előtérbe került. Az utóbbi időben az ökotoxikológiai és ökofiziológiai kutatások népszerű objektumai, de emellett a gyakorlati felhasználásuk is fontos a remediáció, a szennyvíztisztítás és egyes alapanyagok előállítása területén.

Jellemző rájuk, hogy viszonylag magas keményítő-, és fehérjetartalommal rendelkeznek, és kedvezőtlen fiziológiai körülmények, környezeti stressz hatására a felhalmozott keményítő mennyisége tovább emelkedik. Mivel a békalencse-növényekből kivonható keményítő potenciálisan alkalmas lehet az ipari etanol-fermentáció alapanyagának, és a visszamaradó anyag takarmánnyként is használható, kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy akut kémiai stressz hatására, hogyan változik a békalencse-biomassza keményítő- és fehérjetartalma, illetve, hogy milyen fajfüggő különbségek várhatók.

Kísérletünkben két, hazai vizekben is elterjedt békalencse-faj, az apró békalencse (*Lemna minor* L.) és a bojtos békalencse (*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden) axenikus tenyészetait használtuk. A kémiai stressz indukálásához KCl-ot, egy, szabványos békalencse-tesztekhez is ajánlott „referencia-mérget” alkalmaztunk.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a különböző békalencse fajok axenikus, exponenciális növekedési fázisban levő tenyészetei is mérhető keményítőtartalommal (~1,9-2 sz.a. %) rendelkeznek, annak ellenére is, hogy a kedvező körülmények között nem a tápanyagraktározás az asszimilált szén elsődleges célpontja.

Az eredmények alapján akut kémiai stressz (KCl) hatására az asszimiláló levélfelület növekedése jelentősen lelassul, illetve megáll, ami azonban nem jelenti a szénasszimiláció ezzel párhuzamos, teljes leállítását is. Ennek eredményeként mind a szártagok vastagsága és/vagy tömörsége (LMA), mind pedig a biomassza szárazanyagtartalma megnövekszik. A szárazanyagtartalom emelkedése a kapott eredmények alapján részben a keményítő-felhalmozásának is köszönhető, míg a fehérjeszintézis nem mutatott kapcsolatot a növekedés gátlásával.

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a különböző békalencse-fajok eltérő mértékben képesek a keményítőt felhalmozni.

A *L. minor* magasabb, biomasszára vonatkoztatott keményítő-felhalmozást mutatott, mint a *S. polyrrhiza*, ami valószínűleg annak az eredménye, hogy a *S. polyrrhiza* az asszimilált szén egy jelentős részét antociánok szintézisére fordítja. A növények fehérjetartalmát ezzel szemben a KCl-kezelés nem befolyásolta érdemben a vizsgált időtávon, így az továbbra is alkalmas marad takarmányozási vagy zöldtrágyázási célokra.

A különböző békalencse-fajok növekedési rátájában, illetve keményítő- és fehérjetartalmában tapasztalt különbségek felhívják a figyelmet arra, hogy a gyakorlati alkalmazás során mennyire fontos az adott körülményeknek és célnak leginkább megfelelő faj/változat kiválasztása, illetve az optimális nevelési körülmények beállítása, megtartása.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Dr. Mészáros Ilona tanszékvezető egyetemi docensnek és Dr. Oláh Viktor egyetemi adjunktusnak a szakirodalom és az eredmények feldolgozása, értékelése során adott tanácsaikért, segítségükért, Szöllősi Erzsébetnek és Szabó Katalinnak a mintafeldolgozásban, Mikóné Dr. Hamvas Mártának és Barabás Évának a mikroszkópos képek elkészítésében nyújtott segítségükért. Szeretném megköszönni továbbá a DE TTK Növénytani Tanszék minden dolgozójának és szakdolgozójának laboratóriumi munka során tanúsított segítségüket és megértésüket.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024., Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeit támogató pályázat segítségével készült.

## 9. Irodalomjegyzék

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., Ram, S. J., 2004:** "Image Processing with ImageJ". Biophotonics International, 11: 36-42.
- Ahmad, Z., 1990:** Effect of duckweed (*Lemna-minor*) as complement to fertilizer nitrogen on the growth and yield of rice. International Journal of Tropical Agriculture, 8: 72-79.
- Bergmann, B. A., Cheng, J., Classen, J., Stomp, A. M., 2000:** Nutrient removal from swine lagoon effluent by duckweed. Transactions of the ASAE, 43: 263-269.
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D., Chen, C., 2007:** Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 142: 276-290.
- Cheng, J., Landesman, L., Bergmann, B. A., Classen, J. J., Howard, J. W., Yamamoto, Y., 2002:** Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. Transactions of the ASAE, 45: 1003-1010.
- Cheng, J. J., Stomp, A.-M., 2009:** Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. CLEAN-Soil, Air, Water, 37: 17-26.
- Chow, P. S., Landhäusser, S. M., 2004:** A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. Tree Physiology, 24: 1129-1136.
- Crawford, D., J., Landolt, E., 1993:** Alloenzym studies in *Spirodela* (Lemnaceae): Variation among conspecific clones and divergence among the species. Systematic Botany, 18: 389-394.
- Cui, W., Xu, J., Cheng, J. J., Stomp, A.-M., 2010:** Growing duckweed for bioethanol production. In 2010 ASABE Annual Meeting Paper No. 1009440.
- Dickinson, M. B., Miller, T. E., 1998:** Competition among small, free-floating, aquatic plants. American Midland Naturalist, 140: 55-67.
- Dirilgen, N., 1998:** Effects of pH and chelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor*. Chemosphere, 37: 771-783.
- Driever, S. M., van Nes, E. H., Roijackers R. M. M., 2005:** Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. Aquatic Botany, 81: 245-251.
- Drinovec, L., Drobne, D., Jerman, I., Zrimec, A., 2004:** Delayed fluorescence of *Lemna minor*: A biomarker of the effects of Copper, Cadmium, and Zinc. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 72: 896-902.

- Environment Canada, 2007:** EPS 1/RM/37. Biological Test Method: Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor*. Second Edition.
- FAO, 1999:** Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. FAO Publications, Rome (Italy).  
<http://www.fao.org/ag/againfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>
- Felföldy, L., 1990:** Hínárhatórozó. Vízügyi Hidrobiol., 18. Vízdok., Budapest.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2001:** PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, p9  
 Available at: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Islam, M. S., Kabir, M. S., Khan, S. I., Ekramullah, M., Nair, G. B., Sack, R. B., Sack, D. A., 2004:** Wastewater-grown duckweed may be safely used as fish feed. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 51-56.
- J.A. Casala, b, J.E. Vermaata, F. Wiegmana, 2000:** A test of two methods for plant protein determination using duckweed. *Aquatic Botany*. Volume 67, Issue 1, May 2000, Pages 61–67
- Jiele Xu, Genxiang Shen, 2011:** Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresource Technology* Volume 102, Issue 2, January 2011, Pages 848–853
- Kruatrachue, M., Jarupan Chitramvong, W. Y. P., Pokethitiyook, P., Upatham, E. S., Parkpoomkamol, K., 2002:** Combined effects of lead and humic acid on growth and lead uptake of duckweed, *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69: 655-661.
- Landolt, E., Kandeler, R., 1987:** The family of Lemnaceaea monographic study. In: *Phytochemistry, physiology; application; bibliography*, vol. 2.. Zurich, Switzerland: Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rubel. Pp: 1-566.
- Les, D.H., Crawford, D.J., Landolt, E., Gabel, J.D. and R.T. Kimball., 2002:** "Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family." *Systematic Botany* 27: 221-240.
- Ley, S., Dölger, K., Appenroth, K. J., 1997:** Carbohydrate metabolism as a possible physiological modulator of dormancy in turions of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. *Plant Science* 129: 1-7.
- OECD, 1998:** Draft OECD test guideline 221 – *Lemna* growth inhibition test
- Oláh, V., Lakatos, Gy., Bertók, Cs., Kanalas, P., Szöllösi, E., Kis, J., Mészáros, I., 2010:** Short-term chromium (VI) stress induces different photosynthetic responses in two duckweed species, *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. *Photosynthetica*, 48: 513-520.

- Oláh V., Tóth Gy. D., Szöllősi E., Kiss T., 2008:** Comparative study on sensitivity of different physiological properties of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden to Cr (VI) treatments. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 181-182.
- Pimentel, D., 2003:** Ethanol fuel: energy balance, economics, and environmental impacts are negative. *Natural Resources Research*, 12: 127-134.
- Rathert, G., 1983:** Effects of high salinity stress on mineral and carbohydrate metabolism of two cotton varieties. *Plant and Soil*, 73, 247-256.
- Reid, M. S., Bialeski, R. L., 1970:** Response of *Spirodela oligorrhiza*-M to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* (Rockville), 46: 609-613.
- Rodrigo A., Mohedanoa Rejane H.R. Costaa, Flávia A. Tavaresb, Paulo Belli Filhoa, 2012:** High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. *Bioresource Technology* Volume 112, May 2012, Pages 98–104
- Smith, M.D. and Moelyowati, I., 2001:** Duckweed based wastewater treatment (DWWT): design guidelines for hot climates. *Water Sci. & Tech.* 43: 291-299.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002:** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- Tkalec, M., Vidaković –Cifrek, Z., Regula, I., 1998:** The effect of oil industry "high density brines" on duckweed *Lemna minor* L. *Chemosphere*, 37: 2703-2715.
- Xu, J., Shen, G., 2010:** Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresource Technology* 102: 848-853.
- Xu, J., Cui, W., Cheng, J. J., Stomp, A.-M., 2011:** Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems Engineering*, 110: 67-72.
- Xumeng Gea, Ningning Zhanga, Gregory C. Phillipsb, Jianfeng Xu, 2012:** Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresource Technology* Volume 124, November 2012, Pages 485–488
- Yemm, E. W., Willis, A. J., 1954:** The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57: 508-514.
- Yin, Y.-G., Kobayashi, Y., Sanuki, A., Kondo, S., Fukuda, N., Ezura, H., et al., 2010:** Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany*, 61: 563-574.