



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
ÖKOTOXIKOLÓGUS MSC, NAPPALI

RÉZ ÉS KADMIUM HATÁSA TALAJOK GOMBAKÖZÖSSÉGEIRE
MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETBEN

Készítette:

Kaszap Adrien

Belső témavezető:

Sebők Flóra

tanszéki mérnök

Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

Gödöllő

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	4
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1	A gombák helye és szerepe az ökoszisztémában.....	5
2.2	Fonalas gombák, illetve anyagcseretermékeik alkalmazhatósága és jelentősége	9
2.3	Mikroorganizmusok lehetséges válaszai talajt érintő stresszhatásokra	11
2.4	Fonalas gombák általános jellemzése.....	13
2.5	Leggyakrabban előforduló fajok általános jellemzése	14
2.5.1	<i>Penicillium</i> fajok általános jellemzése	14
2.5.2	<i>Trichoderma</i> fajok általános jellemzése.....	17
2.5.3	<i>Mucor</i> fajok általános jellemzése.....	19
2.6	Nehézfémek	21
2.6.1	Réz.....	23
2.6.1.1	Réz hatása különböző szervezetekre korábbi tanulmányok alapján.....	24
2.6.2	Kadmium.....	25
2.6.2.1	Kadmium hatása különböző szervezetekre korábbi tanulmányok alapján	26
3	ANYAG ÉS MÓDSZER:.....	27
3.1	Mintavétel az előkísérlethez, illetve a végleges kísérlethez	27
3.2	Előkísérletek	28
3.2.1	Alkalmazott táptalajok rövid jellemzése, összetétele.....	29
3.3	Kísérlet beállítása	30
3.3.1	Réz.....	30
3.3.2	Kadmium.....	32
3.4	Sejthomogenizálás.....	32
3.5	Izolátumok mikroszkópos, illetve makroszkópos beazonosítása sajátos bélyegek alapján	33
3.6	Fajok szekvenálása	33
3.6.1	DNS-kivonás	33
3.6.2	PCR-termék elkészítése, illetve a kívánt szakasz amplifikálása	34
3.6.3	PCR termék ellenőrzése	35
3.6.4	PCR termék tisztítása	36
3.6.5	Szekvenálás és nukleotidsorrend elemzés.....	37
3.7	Az eredmények megállapításához, illetve értékeléséhez szükséges számítások	37

3.7.1	Diverzitás index meghatározása.....	37
3.7.2	Statisztikai elemzés	38
4	EREDMÉNYEK.....	39
4.1	Gombaközösségek a Cu ²⁺ ionokkal terhelt talajokban.....	39
4.1.1	Gombaközösségek mennyiségi viszonyai.....	39
4.1.2	Gombaközösségek rendszertani diverzitása.....	41
4.2	Gombaközösségek a Cd ²⁺ ionokkal terhelt talajokban.....	42
4.2.1	Gombaközösségek mennyiségi viszonyai.....	42
4.2.2	Gombaközösségek rendszertani diverzitása.....	45
5	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	47
6	ÖSSZEFOGLALÁS.....	49
7	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	51
8	IRODALOMJEGYZÉK.....	52
9	MELLÉKLETEK	58

1 BEVEZETÉS

A bioszféra egyensúlyát biztosító geokémiai folyamatok túlnyomó többsége a talajban, a biomaszsa aktív közreműködése által zajlik. A talajbiomasszát károsító bármely tényező a bioszféra ökológiai egyensúlyát veszélyezteti. Mivel a talajbiomasszának 35-40%-át az ott élő gombák hifatömege alkotja, a talajvédelem egyik legfontosabb szempontja annak ismerete, hogy a talajba egyre gyakrabban és egyre nagyobb mennyiségben bejutó toxikus vegyületek milyen mértékben károsítják a talajmikroorganizmusok, és köztük a gombák tevékenységét. A téma fontosságából következően a kérdést az utóbbi években több irányból is próbálták megközelíteni. A toxikus vegyületeknek bármely gombatörzs növekedésére gyakorolt hatása egzakt módszerekkel vizsgálható, és ilyen jellegű eredmény viszonylag nagy számban található a szakirodalomban. Utóbbi eredmények – tudományos értékük mellett – hasznos információt hordoznak az illető gombatörzsek technológiai vagy például ökotoxikológiai alkalmazásához.

Saját vizsgálataink fő célja viszont a toxikus vegyületeknek a talajgombák közösségeire gyakorolt hatásának feltárása volt. Ennek keretében vizsgálni szándékoztunk a gombaközösségek legfontosabb jellemzőit, így elsősorban méreteiket, rendszertani diverzitásukat és fajösszetételük egyéb vonatkozásait. A külső fizikai, kémiai és biológiai hatások minimalizálása érdekében vizsgálatainkat mikrokozmosz kísérletekkel szándékoztunk kivitelezni. Toxikus vegyületnek két olyan nehézfémot, a rezet és a kadmiumot választottuk, amelyek általános toxikusság, és ebből következően a rájuk előírt talajszennyezettségi határérték szempontjából eltértek egymástól. Meg akartuk tudni, hogy a két – jelen kísérletekben modellként alkalmazott – nehézfém ionnak a talajszennyezettségi határértékhez közeli koncentrációi a talajgomba közösségekre milyen mértékű hatást fejtenek ki.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

„A környezet védelme szempontjából nemcsak a magasabb rendű növények és állatok oltalma a fontos, a mikrobák ugyanúgy védelemre szorulnak. Ha kiírtjuk őket a bioszféra egyensúlya felborul, a talajok kimerülnek, mert nincs ami mineralizálja a növényi hulladékokat.” (Kevei et al. 1999a).

A mikrobák tevékenységeinek sokszínűsége igen széles körre terjed, mely magába foglalja többek közt a tápanyagtranszformációt, különböző anyagok lebontását és a talaj fizikai folyamatainak módosítását. Képesek a növények növekedésének serkentésére, illetve támogatására, de előfordulnak olyan esetek is, amikor hatásuk ennek ellenkezőjét váltja ki. (Giller et al. 1997, Wardle et al. 1999).

2.1 A gombák helye és szerepe az ökoszisztémában

Az ökoszisztéma nem más, mint növények, állatok és mikrobák együttese, valamint azok fizikai és kémiai környezete. Ebben a komplex rendszerben lévő anyagok biológiai körforgásának fenntartásáról a termelő (producens), fogyasztó (konzumens) és a lebontó (reducens) szervezetek gondoskodnak (Husar 1994). A termelők szerepét a fotoszintetizáló növények töltik be, melynek során szervesetlen molekulákból oxigént, illetve szerves alapvegyületeket (cukrokat) állítanak elő. A szerves anyagok különböző formáit az állatvilág tagjai veszik fel tápanyagként, így ők az ún. fogyasztók (Vetter 2010a), melyeknek három csoportját különböztethetjük meg. Elsődleges fogyasztók (primer konzumens) a növényevők (fitofágok, herbivorok), melyek lehetnek fitoepiziták, vagy fitoparaziták. Ezeket fogyasztják a szekunder konzumensek, melyek lehetnek ragadozók, élősködők, vagy parazitoidok. Azokat pedig, amelyek növényevőket és ragadozókat egyaránt fogyasztanak terciér konzumensnek, vagyis csúcsragadozóknak nevezzük (Urák 2007). A gombákra úgy tekinthetünk, mint a fent említett két nagy csoport (termelők és fogyasztók) összekötője, amelyek a túlzott szervesanyag felhalmozódást megakadályozzák adott területen, illetve az anyagforgalmi ciklusok zavartalan működését is biztosítják (Vetter 2010a).

A gombavilág fő tápanyagait a szén- és nitrogénforrások képezik. Életközösségekben heterotróf szervezetekként vannak jelen, ebből adódóan enzimatikus tevékenységeik révén a növények által előállított komplex szerves vegyületeket, valamint elsődleges, illetve másodlagos fogyasztókat és azok anyagcseretermékeit, szerves anyagait kisebb vegyületekké tudják bontani, ezáltal más élőlények, illetve saját maguk számára is újra felvehetővé képesek alakítani. Más szervezetek számára maguk is táplálékul szolgálnak (Jakucs 1999, Jakucs & Vajna 2003). Tápanyagfelvételük kilotróf típusú, vagyis tápanyagaikat oldott formában képesek felvenni, így a nagyobb molekulákat a sejten kívül emésztik meg és szívják fel szabad, vagy sejthez kötött exocelluláris enzimeik segítségével (Jakucs 1999).

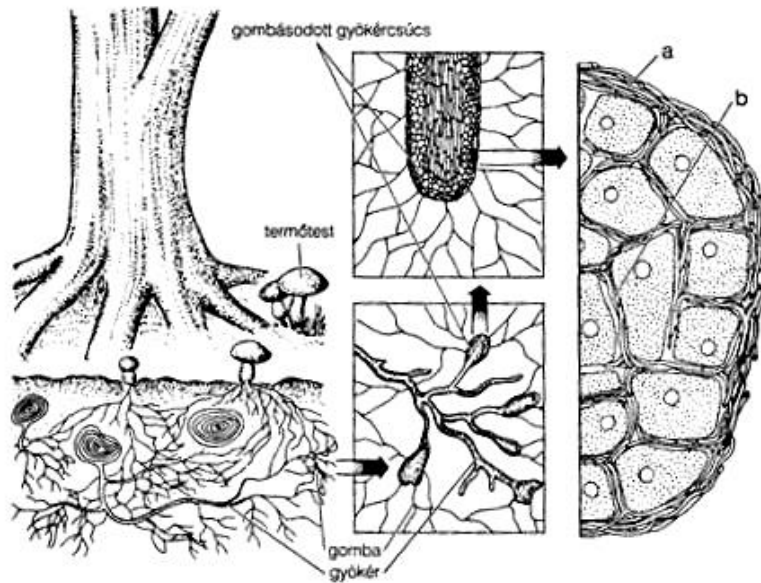
Természetesen a biopolimerek (pl.: xilán, pektin, cellulóz, lignin) esetében is a fenti mechanizmus figyelhető meg, így ahhoz, hogy citoplazmájukba felvehessék oligomerekre, illetve monomerekre bontják azokat (Kevei et al. 1999a). A legnagyobb mennyiségben jelen lévő szerves anyag a növények sejtfalában található cellulóz, melyet a gombák celluláz enzimük segítségével alakítanak át. Főként a *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* génusz fajai termelik (Takó, 2011). A cellulázzal rendelkező mikrobák nagy része egyébként szinte egyöntetűen rendelkezik amilázzal, xilanázzal és pektinázzal is. Második leggyakoribb biopolimerként a lignint tartják számon a természetben, amely lebontására csak nagyon kevés mikroba képes a gombákon kívül. Lignin átalakítását lignináz oxidatív exoenzim segítségével végzik, melynek működése H_2O_2 igényes. Bontása során protokatechusav keletkezik, mely tovább alakítva coenzim A-val reagálva borostyánkősavra, illetve acetil CoA-ra hasad, melyek a citrátkörbe lépnek be. A folyamat során keletkezett közti termékek aminosavakkal humusz anyagokká polimerizálódnak a talajban, melyek fontos szerepet töltenek be annak tápanyag és vízgazdálkodásában (Kevei et al. 1999a).

A növények sejtfalát főként cellulóz és lignin alkotja. Köztudott, hogy a fotoszintézis során nagy mennyiségű szén-dioxid megkötésére képesek, így az említett két biopolimer bontása következtében a gombák ezt képesek átalakítani az élőlények számára felvehető formává, mely kilégzésük által ismét a légkör részévé válik ugyan úgy, mint az elhalt növényi maradványokból „felszabadított” szén, onnan pedig újra felvehetővé válik növények számára is. Mindez alátámasztja a gombák elsődleges szerepét a szén biogeokémiai ciklusának fenntartásában (Jakucs 1999).

A fentiekből adódóan szinte minden élőhelyen megtalálhatóak, ahol elérhető számukra szerves szénforrás: kövek felületén, talajban, tengerben és friss vizekben, szélsőségesen magas és alacsony hőmérsékleti körülmények között, hulladékban, növények és állatok maradványaiban, trágyában, illetve élő növényi és állati szervezetekben. Növényekben gyakran tünetmentes endofiták, de lehetnek biotróf vagy nekrotróf paraziták, néhány tagjuk pedig oligotróf szervezatként van jelen (Dix & Webster 1995). A növényi betegségeket okozó parazita életmódot folytató gombáknak több alfaja is létezik. Fakultatívnak nevezzük azokat, melyek nem teljes mértékig kötődnek az élő szervezethez, tehát később szaprotróf életmódot folytatva képesek elválni attól. Általánosan ismert tüneteik közé sorolható a nekrózis, mely az apoptózissal ellentétben véletlen sejthalálnak tekinthető. Obligát paraziták azok a gombák, melyek teljes életciklusuk során élő szövetekhez kötöttek, ebből adódóan mesterséges tenyészeteket nem lehet létrehozni belőlük. Az obligát paraziták csoportját tovább bonthatjuk epifitonokra és endofitonokra. Az előbbi csoportba azok a fajok tartoznak, melyek a növény felületén fejlődnek, utóbbiba pedig amelyek tallusza teljes egészében a gazda testben található (Jakucs & Vajna 2003).

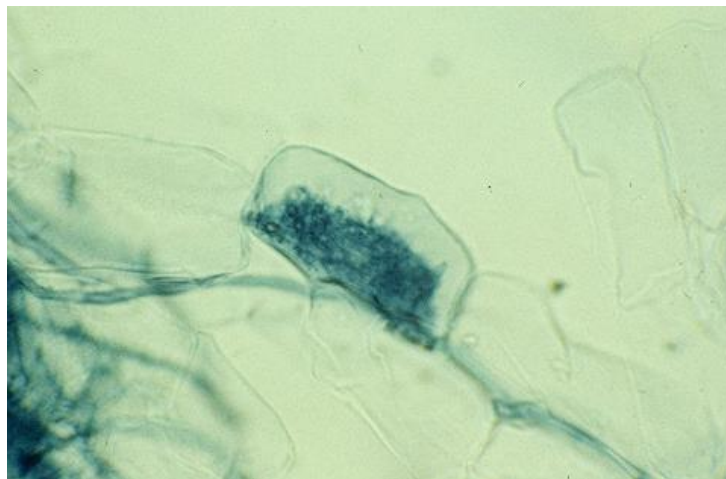
Hawksworth (2001) becslései alapján kb. 1,5 millió gombafaj van, melyek közül sokat még nem sikerült azonosítani. Életmódjuk és egyéb tényezők alapján nagy különbség adódik morfológiájukban, reprodukcióban, életciklusukban és elterjedési módjaikban. A talajlakó gombák előfordulhatnak önállóan, illetve növények gyökereivel alkotott szimbiózisban, de léteznek állatokkal kialakított kapcsolatok is, melynek során pl.: vitaminokkal látják el a partnert, vagy esetleg annak emésztésében töltenek be szerepet (Vetter 2010b).

Vetter (2010b) szerint a gomba-növény kapcsolat egyfajta törvényszerűségnek tekinthető és az számít különösnek, ha ez a kölcsönhatás hiányzik. Megkülönböztethetünk ektomikorrhiza kapcsolatot, melynek során a gomba hifarendszere a növény gyökérrendszerébe, sejtközzötti járataiba hatol, illetve egy úgynevezett hifákból álló gombaköpenyt alakít ki a gyökér rhizodermiszén, melynek következtében a növényt több ásványi elemmel, illetve vízzel látja el. Ennek hatására növekedése, gyarapodása jelentősen megindul a gomba pedig cserébe szerves vegyületeket és egyes megfigyelések alapján más, kisebb mennyiségű anyagot (pl.: hormonális anyagok) is kaphat (1. ábra). Ez a kapcsolat egyébként főként fás nyitva- és zárvatermőkkel alakul ki.



1. ábra: Ektomikorrhiza kialakulása fagyökéren: a, micéliumköpeny; b, gombahifák a kéregsejtek intercellulárisában (Jakucs, 1999)

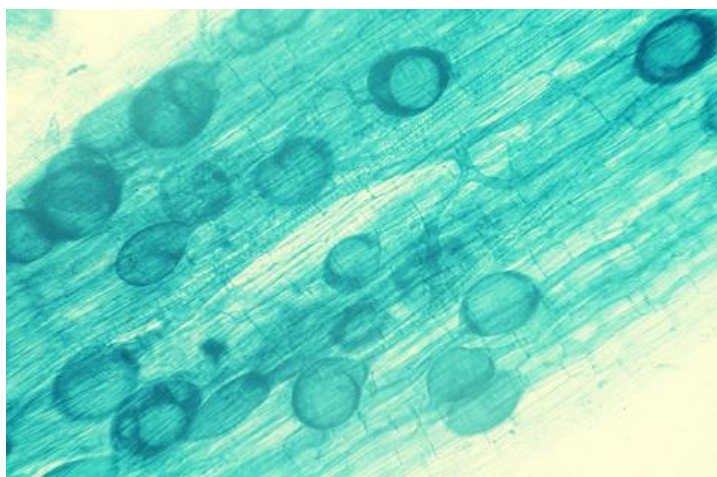
Másik csoport az endomikorrhiza-kapcsolat, mely a gombaköpeny kialakulásának hiányában tér el az előbbitől. Ebben az esetben is behatolnak a hifák a növény gyökereibe, viszont itt egyenesen a gyökér sejtjeibe, ezáltal intenzívebbé teszik az anyagáramlást (Vetter 2010b). Több típusa van, melyek közül a 2. ábrán látható úgynevezett arbuszkuláris mikorrhiza a legáltalánosabb, mely nevét az arbuszkulumról kapta, ami egy két partner által létrehozott speciális tápanyagátadó képlet (http 5).



2. ábra: Arbuszkuláris mikorrhiza apró szulák (*Convolvulus arvensis*, *Convolvulaceae*) gyökerében. (Dobolyi Csaba felvétele)

Kizárólag a *Glomaceae* család fajai alakítanak ki kapcsolatot zárvatermő növények nagy részével. Meghatározásuk igen nehézkes, mivel ivartalanul szaporodnak, így természetesen nem képeznek ivaros szaporító képleteket sem. Elkülönítésükre az akár mm-es átmérőjűre is megnövő óriás spóráik alkalmasak (Jakucs 1999).

Arbuszkulumon kívül megfigyelhetünk még ún. vezikulumokat is, melyek raktározó struktúrákként funkcionálnak, melyet a 3. ábra szemléltet.



3. ábra: Vezikuláris mikorrhiza lucerna (*Medicago sativa*, *Fabaceae*) gyökerében. (Dobolyi Csaba felvétele)

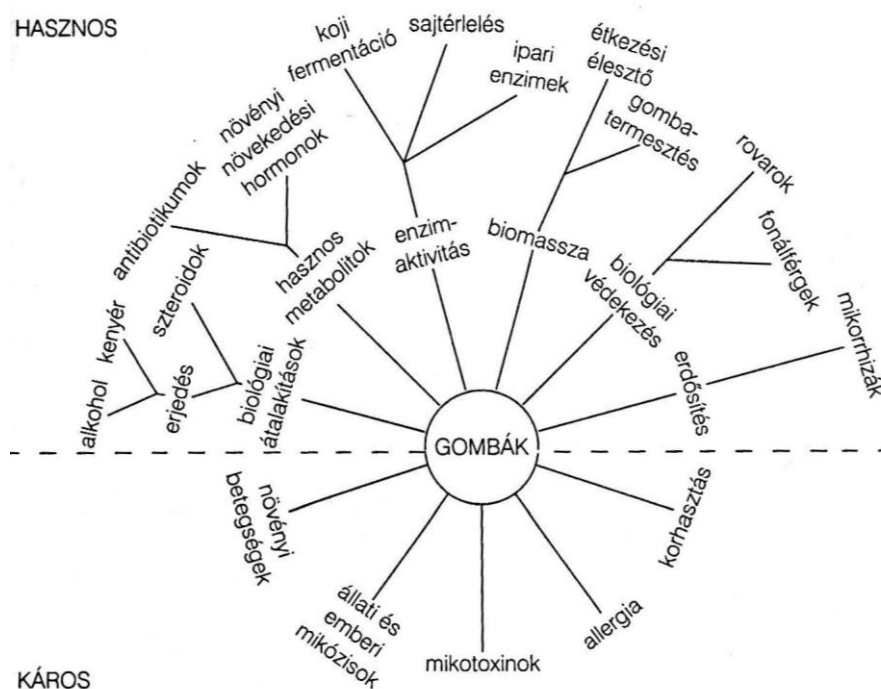
Mivel korábban általánosan jellemzőnek találták mindkét képlet jelenlétét, ezért vezikuláris-arbuszkuláris mikorrhizáknak (VAM) nevezték őket, ám későbbi kutatások során megfigyeltek több olyan esetet is, amikor vezikulumok nem alakultak ki a gomba-növény szimbiózis során, így helyesebbnek találták az AM kifejezés alkalmazását.

2.2 Fon alas gombák, illetve anyagcseretermékeik alkalmazhatósága és jelentősége

A fon alas gombák csoportja számos biológiailag releváns szervegetet magába foglal, melyek közül jelentős mennyiségű faj hasznos anyagcseretermékeket termel (pl. pigmentek, vitaminok, antibiotikumok), viszont akadnak olyanok is, amelyek emberre, állatra és növényekre nézve veszélyt jelenthetnek, fertőzést válthatnak ki és betegségeket okozhatnak (4. ábra). A fentiekből adódóan széles körben tanulmányozott csoportról beszélhetünk, amely nem csak az általuk okozott betegségek megértésén alapul, hanem olyan új antibiotikumok,

illetve releváns metabolitok felfedezésén, valamint megismerésén is, melyek később akár ipari célra is felhasználhatók lehetnek. Számos gombafajt alkalmaznak modell organizmusként különböző biológiai folyamatok megértésére (Schoberle et al 2013). Van der Klei & Veenhuis (2006) szerint mivel a gombák közelebb állnak az állatokhoz, mint a növényekhez, ezért akár az emberi sejtek modellezésére szempontjából is értékes szervezatként tekinthetünk rájuk. Gyakran alkalmaznak genetikailag manipulált törzseket (pl.: deléciók előidézése, túlexpresszálas) fehérje funkciók és/vagy virulencia faktorok vizsgálatakor (Schoberle et al 2013).

Biológiai folyamatok megértésére irányuló kutatásokon kívül nagy jelentőséggel bírnak az élelmiszeriparban, vegyiparban, illetve gyógyszeriparban is, de alkalmazhatóak a szennyvíztisztítás területén is különböző szerves anyagok hasítása által. Eltekintve biotechnológiai és/vagy gyógyászati jelentőségüktől, amint azt korábban is megemlítettem, számos fonalas gomba patogén növényekre, állatokra és emberre nézve is (Fisher et al. 2012).



4. ábra: Gombák haszna, illetve kára az élővilág képviselőinek szempontjából. (Jakucs 1999)

A paraziták, illetve kórokozók általában életciklusuk szaprofita fázisában, vagy különböző kitartóspórák formájában tartják fenn magukat. Ezek a szervezetek megtámadhatnak élő állatokat és növényi szervezeteket is, valamint kultúrnövényeket,

melynek következtében azokat elfogyasztva zavarokat idézhetnek elő az emberi és állati szervezetben, illetve jelentős gazdasági károkat is okozhatnak (Fassatiová 1984). A humánkórokozó gombák száma, illetve jelentősége is jóval alacsonyabb, mint a bakteriális kórokozóké. Ettől függetlenül hosszantartó, nehezen kezelhető, kellemetlen tünetekkel járó mikózisokat idézhetnek elő. Az általuk okozott betegségek csak ritkán súlyos kimenetelűek (Kevei & Kucsera 1998). A szaprofiták alapvetően a talajok mineralizációjában vesznek részt, de közöttük is vannak olyanok, amelyek zavarokat képesek okozni pl. különféle termékek fehérje természetű komponenseinek enzimatisz uton történő hasításával, vagy vitamintartalom csökkentése révén. Penészek (és fonalasok) mindig újabb szubsztrátumokon képesek megtelepedni, mivel igen nagy alkalmazkodóképességgel bírnak, ebből adódóan az ember környezetének minden területén fellelhetőek (Fassatiová 1984).

Nagyon fontos kérdéskör a fonalas gombák toxicitása, amelyre elsőként 1960 környékén figyeltek fel, amikor is penészes földmogyoró liszttel takarmányozott csirkék tömeges pusztulása jelentkezett Angliában. Ezt az *Aspergillus flavus* nevű aflatoxin termelő faj idézte elő. A mikotoxin termelő gombák jelentős része az *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* nemzetség tagjai, melyek csak bizonyos szubsztrátumokon és speciális körülmények között termelnek toxinokat. Főként élelmiszer és takarmányozás terén okoznak problémát. Észrevehetőségüket megnehezíti, hogy anélkül hatolnak be különböző termékekbe, hogy az külsőleg látható nyomokat, elváltozásokat okozna. Mivel nagyrészt termostabilak, nagyon fontos szempont a megfelelő hőmérséklet megválasztása különféle gyártási folyamatok során (Fassatiová 1984).

2.3 Mikroorganizmusok lehetséges válaszl talajt érintő stresszhatásokra

Több adat utal arra, hogy a mikroorganizmusok érzékenyebbek a szennyezésekre, mint azok az állatok és növények, melyek azonos talajokban élnek (Cao et al. 2008), ebből adódóan a talaj mikrobiális közössége korai és szenzitív indikátor a stresszel szemben (Brookes 1995). A mikrobák fokozott érzékenysége nagyobb felület-térfogatl arányuk következménye, mivel így intenzívebb információcserét képesek kialakítani környezetükkel.

A mikroorganizmusok, illetve a mikrobák indikátorként való alkalmazása igen hasznosnak tekinthető abban az esetben is, amikor a fizikai és kémiai mérések, valamint magasabb rendű szervezetek általi elemzés nem kivitelezhető. Előfordulhat az is, hogy egy

adott anyag hatására a mikrobák közösségében bekövetkező változások már korábban észlelhetők, mint ahogy azok a növény- és állatközösségekben kimutathatóak lennének, így biztosítható pl. a talajminőség romlásának korai előrejelzése is (Pankhurst et al. 1995, Winding et al. 2005).

A szennyezés a mikrobiális diverzitás fajösszetételének átrendeződéséhez vezethet. A biológiai sokféleség csökkenhet olyan fajok kihalása miatt, amelyek nem rendelkeztek elegendő toleranciával az adott szennyező hatásaival szemben (Atlas 1984). A toleráns mikroorganizmusok gyakorisága fokozódhat növekvő toxikus fém szintekkel (Kunito et al. 1997), ez pedig szintén diverzitáscsökkenéshez vezethet, melynek következtében eltolódás figyelhető meg a mikrobióta összetételében (Pennanen et al. 1996). Az adott élőhelyhez nem adaptálódott gombáknak esélyük sincs a túlélésre, tehát mesterséges talajba juttatásuk esetén, - pl. növényvédelmi célból - fontos a megfelelő fajok, valamint azok ökotípusainak helyes megválasztása (Jakucs & Vajna 2003). A biológiai diverzitás jobb ellenálló képességet szolgáltat a stresszel, illetve zavarral szemben, így ennek sérülése és redukálódása csökkent toleranciához vezet (Giller et al. 1997).

A mikroorganizmusok fémekkel szembeni tolerancia mechanizmusai közé tartozik a fémek megkötése sejtfal, vagy fehérjék, illetve extracelluláris polimerek által, oldhatatlan fém-szulfidok képzésével, párologtatással és a sejtekből való fokozott kiválasztással (Hughes & Poole 1989).

A fenti folyamatok nagymértékben függhetnek a tápanyagokkal való ellátottságtól, mivel befolyásolhatják a sejtfal szerkezeti elemeinek szintézisét, a pigmenteket és az energiafüggő rezisztencia mechanizmusok kifejezését. Ezen kívül pedig azokat a metabolitokat is, amelyek öncélúan hatást gyakorolhatnak a fémek biológiai elérhetőségére, illetve az organizmus válaszára (Ramsay et al. 1999).

A toxikus elemek a talajokon át biogeokémiai ciklusokat járnak végig, melynek során a vegyületek kevésbé toxikussá alakulnak. Ezt a folyamatot detoxifikációnak nevezzük. Ellenkező esetben a vegyület még mérgezőbbé válik, bár ez a hatás általában átmeneti (Szabó 1986). A bakteriális, illetve a gombákkal kapcsolatos tevékenységek eltérő módon befolyásolják egy anyag toxikusságát, melynek során, ha a gombák kerülnek túlsúlyba az megnövekedett szerves anyag lebontáshoz és mineralizált N csökkent asszimilációjához vezethet (Khan & Scullion 2002).

Fontos megjegyezni, hogy a különböző kemikáliák mikroorganizmusokra kifejtett hatása viszonylag nehezen értékelhető, mivel a mikroorganizmusok eltérő fokú érzékenységgel rendelkeznek, különbözhet a populációdinamikai összetettség, a fajok sokasága és a toxicitási vizsgálatok körülményei. Azonos nemzetségekbe tartozó fajokon belül, de akár azonos fajok egy törzsön belül is eltérhetnek a fémekkel kapcsolatos érzékenységükben (Vig et al. 2003).

2.4 Fon alas gombák általános jellemzése

Megkülönböztethetünk egysejtű és többsejtű fon alas gombákat. A többsejtűek esetében minden hifában található sejt aktív anyagcserét folytat (Jakucs & Vajna 2003).

A hifák polarizált, csúcsi növekedésűek, mely a fon alasgomba-telepek kialakulásában különleges jelentőséggel bír. Itt történik meg szeptált micéliumú gombák esetében a sejtosztódás (új harántfalak kialakulása), más gombáknál pedig ez a terület a sejtmagosztódás színtere (Kevei & Kucsera 1998). A sokmagvú, szeptált hifák esetében a mitózis során a csúcstól meghatározott távolságra egy szeptum alakul ki a sejtmagok irányított osztódását követően. A koordinált sejtmagosztódás során először a csúcshoz közel eső mag osztódik, ez a folyamat pedig továbbítódik az összes sejtmagon. Ezt követi a második sejtbe került, újonnan osztódott sejtmagok elkülönítése további harántfalak segítségével (Jakucs & Vajna 2003).

A szeptált gombák hifái nem egyformán szervezettek, mivel a szeptumok pórusainak szerkezete eltér egymástól. Aszkuszos gombák esetében egyszerűbb, bazídiumosokéban pedig komplex, összetettebb hifákról beszélhetünk. Ezen gombák esetében a szeptumok nyitottak, kivéve, ha sérülés éri a hifacsúcsot. Ekkor az ehhez legközelebb eső szeptumok egyfajta védekező mechanizmusként bezáródnak (Kevei & Kucsera 1998). A harántfalak pórusos szerkezete lehetővé teszi a magmigrációt, valamint a már nem osztódó sejtek magszáma is változhat. A fon alas tömlősgomba fajok sejtmagszáma egyébként változó a micéliáris sejtek pedig egy-vagy többmagvúak. Egy adott fajon belül ez függ az egyes sejtek fejlődési állapotától és helyzetétől. Egy nagyságrenddel kevesebb sejtmagot hordoznak az idősebb teleprészek sejtjei, melyek osztódásra nem képesek (Jakucs & Vajna 2003).

„A hifák által létrehozott telep a micélium. A telepes szerveződés alacsony fokán álló hifatömörüléseket, melyekben felismerhetők a hifafonalak, prozenhimának, míg a tömörebb szövedékeket, amelyekben a sejtek izodiametrikusak, pszeudoparenchimának nevezik (Kevei et al. 1999b).”

A fonalasgombák konídiumai vegetatív, ivartalan szaporító képletek, melyek széllel, vagy állati vektorokkal terjednek és általában a gomba test szintje felett helyezkednek el (Kevei & Kucsera 1998). Az öregedő gombák konídiumaiba, egyes csoportoknál pedig akár a miceiláris sejtek falába is jelentős melanin beépülés, illetve lerakódás figyelhető meg (Jakucs & Vajna 2003). A konídiumokhoz hasonló képződmény a piknídium, mely felépítése alapján a szexuális spórákhoz hasonlít és csoportokban rendezetten fordul elő, valamint az acervulus.

Fontos megemlíteni még a szkleróciumokat, melyek az emberek számára fontos szekunder metabolitok hordozói, valamint kitartóképletként is funkcionálhat. Speciálisan módosult hifák együttese, melyek hosszabb tenyészidő után tojásdad, gömbszerű képletekként jelennek meg a telepeken (Kevei et al. 1999b)

2.5 Leggyakrabban előforduló fajok általános jellemzése

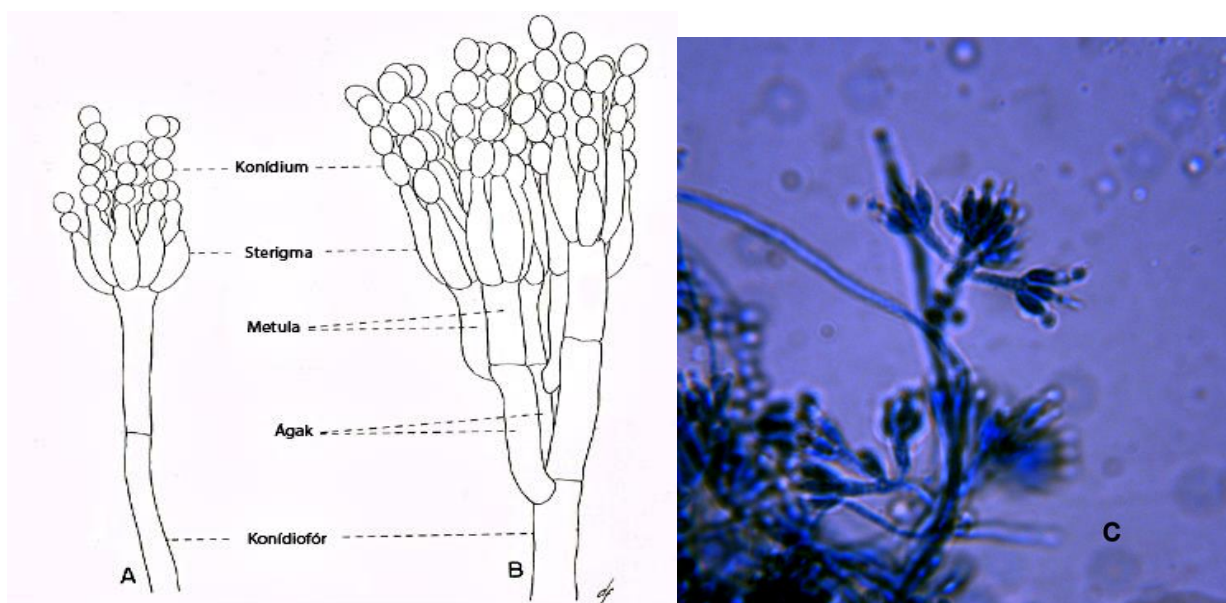
A mikrobiológiai gyakorlatban penészeknek nevezzük a valódi gombák közül a *Mucor* jellegűeket (*Mucorales* rend), melyek közül legismertebb a fejespenész (*Mucor*), az imperfekt gombák közül (*Deuteromycetes*) a fonalasgombákat, melyek leggyakoribb képviselője az ecsetpenész, vagyis a *Penicillium*, valamint az imperfekt gombák közül a spórák nélküli *Mycelia sterilia*. A penészek olyan mikroszkopikus szervezetek, amelyek a szubsztrátumokon finom fonalas bevonatot képeznek (Fassatiová 1984)

2.5.1 *Penicillium* fajok általános jellemzése

A gombák országának *Eurotiales* rendjébe, azon belül pedig a *Trichocomaceae* családba tartozik filogenetikailag a *Penicillium* nemzetség, mely több mint 250 ismert fajt foglal magába (Houbraken & Samson 2011).

Általában gyors növekedés és szeptált hifa jellemzi a fajokat. A telepszín igen változatos lehet, mely többek közt függ a tenyésztési időszak során alkalmazott táptalajtól, illetve a gombák életkorától is. Leggyakoribbak a fehér, szürke, sárgás és zöld telepek, de előfordulhatnak pirosas és narancsszínűek is. Néhány faj képes az adott táptalajt megfesteni és olyanok is előfordulnak, melyek jól látható, különböző színű folyadékcseppeket termelnek (Raper & Thom 1949)

A konídiumtartók fala lehet sima vagy változóan érdes. A nemzetségre a konidiofór ecetszerű felépítése a jellemző, melyet az 5. ábra szemléltet.



5. ábra: A. Monoverticillata ecset (*P. frequentans* Westling); B. Tipikus aszimmetrikus ecset (*P. expansum* Link). (Raper & Thom 1949); C. *Penicillium spinulosum* mikofotó (saját fotó).

- „- Monoverticillata: A konídiumtartó egyetlen fialidövben (sterigma) végződik.
- Biverticillata Symmetrica: A metulák örvéi tengelyhosszra szimmetrikusan helyezkednek el és azok mindegyikén 1-1 fialidörv található.
- Biverticillata Asymmetrica: Tengelyhosszra aszimmetrikusan elhajló ágakban, vagy metulákban végződő konidiofórum.
- Polyverticillata: Örvösen elrendezett elemek két, vagy három emeletéből összetevődő ecsetben végződik a konídiumtartó” (Fassatióvá 1984).

A konídiumok alakja igen fontos szempont fénymikroszkópos beazonosítás során. Raper & Thom (1949) elmélete alapján kezdetben minden konídium henger alakú, s ebből

alakul ki fajra jellemzően a későbbi végleges forma. Vannak olyan fajok, melyek végig megtartják ezt az alakot (pl.: *P. bacillosporium* Swift), míg mások konídiumai jelentős ideig hengeresek, majd fokozatosan elliptikussá alakulnak (pl.: *P. italicum* Wehmer). Egyes fajoknál az eredeti szegmens csak egy kicsivel hosszabb, mint átmérője, így nagyon könnyen gömb alakúvá, vagy gömbszerűvé válhat, másoknál pedig pont ennek ellenkezője tapasztalható, amikor is a konídiumok orsó formát öltenek.

Számtalan faj esetében jellegzetes szkleróciumokat figyelhetünk meg. Taxonómiai azonosítás során ettől függetlenül nincs olyan mértékű jelentősége, mint pl. *Aspergillus* fajok esetében, ahol korábban magát a szklerócium termelést is fontos bélyegnek tartották. Jellegzetes lehet például, hogy a Monoverticillataak vastag sejtfalú képleteket képeznek, melyek alakja elliptikustól a gömbig terjed. Ettől eltérően a Biverticillata-Symmetrica csoport egyes tagjai hosszúkás, sötét színű, vastag falú sejtek tömegét termelik (Raper & Thom 1949).

Igen fontos gomba csoportnak számít mikotoxin termelés szempontjából. Ilyen például egy poliketid eredetű mikotoxin a patulin, amely akut, illetve krónikus toxicitással rendelkezik, mely elsősorban geno-, cito- és immunotoxicitásban, valamint mutagenitásban nyilvánul meg (Puel et al. 2010). Legveszélyeztetettebb csoportot a gyermekek képviselik. Jelenleg az egyike azon kevés mikotoxinoknak, melynek élelmiszerekben fellelhető mennyiségét világszerte számos országban szabályozzák (Brandon et al. 2012). Elsősorban az almaféléken rothadást okozó *Penicillium expansum* fajok termelik (Frisvad et al. 2004).

A *Penicillium nordicum* fontos és állandó termelője többek közt az ochratoxin A-nak (OTA), amely egy hőálló mikotoxin és sokféle élelmiszer szennyezőjeként tartják számon. Több tanulmány is kimutatta ezen molekula számos toxikológiai hatását, melyek alapján többek között vesekárosító, neurotoxikus, májkárosító, teratogén és immunotoxikus. Felmerül a gyanú, hogy az egyik legfontosabb tényezője lehet a Balkáni endémikus nefropátiának, illetve az urogenitális taktusokban kialakuló tumorok előfordulásának ([http 1](http://1)).

Ezen kívül számos faj jó lipáztermelőnek számít. A lipázok a triacilglicerolt (TAG) glicerinné és szabad zsírsavvá alakítják, valamint katalizálják az észterizálást átészterezéssel és ammonolízissel nem vizes közegben. Széles körben alkalmazzák az élelmiszer, tisztítószer és gyógyszeriparban is (Sharma et al. 2001, Jaeger & Eggert 2002).

Élelmiszeripar területén bizonyos *Penicillium* fajokat pl. egyes sajtfélék készítésekor alkalmazzák. Gyógyszeriparban a penicillin felfedezése óta elsődleges szerepet tölt be az

antibiotikumok gyártása során. Bár több faj is termel penicillint, gyógyszeripari felhasználásra csak a *P. chrysogenum* és a *P. notatum* a megfelelő, mivel nagy részük mérgezőek lehetnek (Fassatiová 1984).

2.5.2 *Trichoderma* fajok általános jellemzése

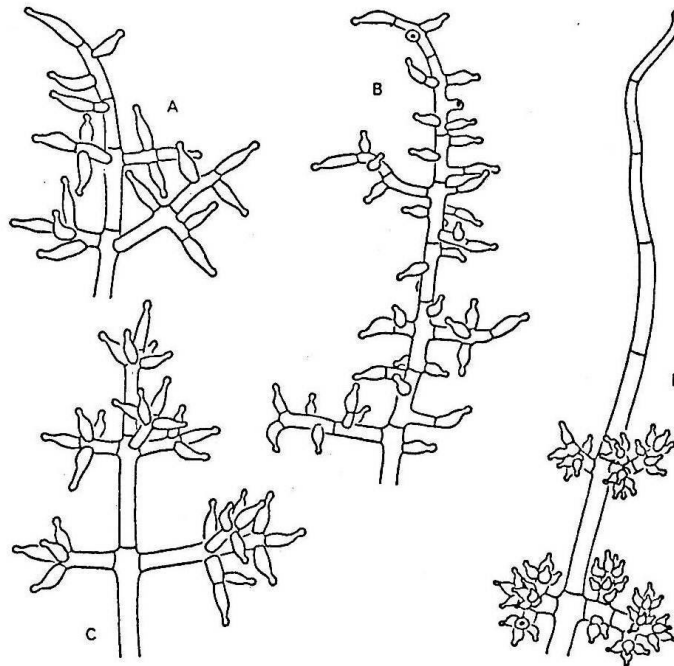
„A *Trichoderma* fajok imperfekt, talajlakó fonalasgombák, ivaros alakjaik a *Hypocera* nemzetségbe (*Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Sordariomycetes*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*) tartoznak” (Kredics et al. 2011).

Tenyészetben a telepeik kezdetben simák, majd lazán pelyhesek, vagy tömören csomósak. E két véglet között még számos típus létezik, valamint mindkettő előfordulhat ugyanabban a kolóniában is. Valószínűleg a telepek tömörsége a légmicéliumokkal és a képződő konídiumtartókkal függ össze. Színük általában zöld, fehér, vagy halványbarna. Ez nagyrészt a fialokonídiumok pigmentációjától függ. Előfordulhatnak azonban olyan fajok is, melyeknél akár más gombák jelenléte is színváltozást idézhet elő. Ilyen például a *T. viride*, mely általában sötétzöld, de az előbb említett jelenség hatására világoszölddé, vagy akár sárgává is alakulhat (Rifai 1969, Vajna 1987).

A fajokat szeptált, sima falú, szintelen, erősen elágazó hifák jellemzik. Klamidospóráik gömbölyű, ellipszoid és hengeres alakokban fordulnak elő, sima falúak és terminálisak, vagy interkalárisak. A konídiumtartók a tenyészet teljes felületén koncentrikus gyűrűkbe, csomókba tömörülve, vagy pedig elszórtan képződnek. A fő ágon egyesével, vagy hármas csoportokban képződő rövidebb oldalágak találhatóak, melyekről másodrendű oldalágak képződnek. Elágazásai fialidban végződnek, vagy pedig gyakran hosszú steril hifanyúlvánnyal zárul a főág csúcsa (Vajna 1987, von Arx 1987).

A *Trichoderma* fajok fialidjai többnyire lombik vagy palack alakúak eseteként görbült csúccsal. Ezek széles szögben ágaznak el az őket tartó képletekhez viszonyítva, így oldalnézetből néha szarv formájúnak tűnnek. Ez alól kivételt képeznek azok, amelyek a konídiumtartók ágainak végén helyezkednek el. Ebben az esetben legfeljebb 5 fialid szabálytalan örv formában helyezkedik az ágak utolsó előtti sejtjeinek vége körül, vagy esetleg az ágak mentén egyedül, vagy párba rendeződve. A legtöbb esetben a terminális

fialidok kissé hosszabbak, mint azok, amelyek alattuk vannak (Rifai 1969). A 6. ábrán a fialidok lehetséges elhelyezkedése közül látható 4 formáció.



6. ábra: Négy féle elágazási rendszer és fialid elrendezés. A. *vidire*-típus; B. *longibrachiatum*-típus; C. *kingii*-típus; D. *hamatum*-típus. (Rifai 1969)

Az egysejtű konídiumok kerek, vagy elliptikus formájúak sima, vagy szemölcszerű felületűek. A fialidok csúcsán csoportokat alakítanak ki. A *Trichoderma viride* nagy mennyiségben termel zöld, sárgászöld, vagy átlátszó konídiumot, de csak abban az esetben, ha tenyésztés közben fény éri. Amennyiben ez nem történik meg egyáltalán nem képződik (Kevei et al. 1999a).

A *Trichoderma* nemzetség tagjai a legtöbb talajtípusban fellelhetők, ebből adódóan a legelterjedtebb kitenyészthető gombaként tartják őket számon. Ez a tény, illetve ökológiai plaszticitásuk összefüggésben áll azzal, hogy lizáló enzimek, illetve lebontó szubsztrátok széles körét termelik, emellett magas ellenálló képességgel rendelkeznek a mikrobiális inhibitorokkal szemben. Számos gombatörzs antagonizáló képessége miatt - mely több fitopatogén gomba, baktérium és oomyces ellen irányul - biokontroll ágensként alkalmazható. Antagonizmus mechanizmus jöhet létre tápanyagért, illetve területért való versengés során, antibiotikumok termelése révén, valamint növények szisztematikus ellenálló képességének fokozásával. Ezen túlmenően a *Trichoderma* fajok serkentik a növény növekedését és fejlődését ezeket elősegítő molekulák termelésével (Monifil & Casas-Flores 2014).

Jó anyagcsere szabályozással rendelkeznek, így a környezeti változásokra, tápanyag, illetve oxigénkorlátozásokra megbízható választ képesek adni. Enzimek sorát termelik homopoliszacharidok és heteropoliszacharidok lebontására. A *Trichoderma* génusz gomba törzsei antibiotikus aktivitással bíró másodlagos anyagcseretermékeket állítanak elő, ezek szintén fontos szabályozói a fitopatogéneknek (Silva et al. 2014). A fentiekből adódóan számos fajt felhasználnak a mezőgazdaságban pl. növények növekedésserkentésére, növénykórokozó gombák elleni biológiai védekezésben, biokontroll, illetve biológiai megfigyelések céljára (Hermosa et al. 2012). Ilyen faj például a *Trichoderma harzianum*, mely a növénypatogén talajgombákat elnyomja a tápanyagért folytatott versenyben. Ezen kívül gombák micéliumain is fellelhető, mint élősködő, valamint ezen gombák ellen olyan anyagokat is termel, mely pusztulásukat idézi elő. Kultúrnövények és szabadon termő növények rizoszférájában is előfordul. Több kereskedelmileg előállított készítmény alkotójaként használják biológiai növényvédelem során (Rod et al. 2005).

Az iparban elsősorban kiváló cellulózbontó képességük miatt alkalmazzák őket. A cellulolitikus enzimek ipari termelését egyértelműen a *Trichoderma reesei* gombák uralják (http2).

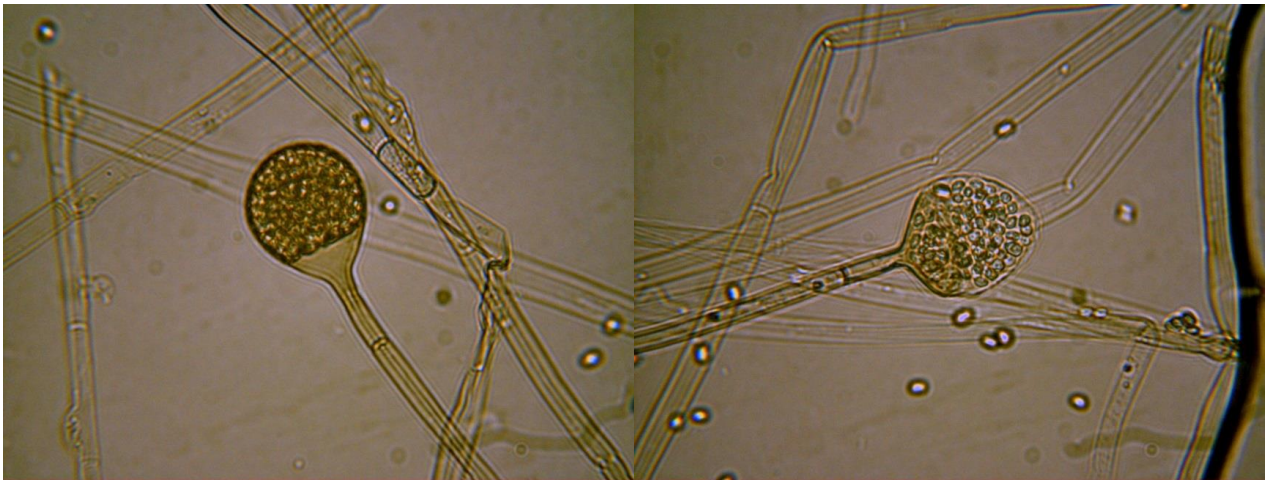
2.5.3 *Mucor* fajok általános jellemzése

A *Mucorok* többnyire növényi és állati maradványokon szaprofiták, ritkábban más *Mucorok* vagy magasabb növényi és állati szervezetek parazitái (Gäumann 1949).

A legismertebb általánosan penésznek tekintett szervezetek, melyek laza vatta, vagy nemezszerű telepet képeznek, melyeket túlnyomórészt cönocitikus légmicéliumok alkotják. Ezek légmicéliumai dús, nagyrészt világos színűek, de lehetnek sötétszürke, vagy barna pigmentáltságúak is. Nagyon gyors növekedésűek, többek között ezért is érdemes gátolni őket különböző primokultúrákban, tenyészetekben a tápagarhoz hozzáadott anyagokkal, mivel könnyen rátelepedhetnek más fajokra is, illetve csak utánuk kezdenek el növekedni az imperfekt, illetve tömlős gombák (Fassatióvá 1984). A sporangiumtartók egyszerűek, vagy elágazóak a sporangiumok pedig gömbölyűek, körte formájúak vagy lapítottak kolumellával, néha apofízissal (Zycha & Siepmann 1969).

A *Mucorales* rend tagjai ivaros szaporodásra is képesek, ekkor két hifa egy része zigótává olvad össze, melynek során zigospóra keletkezik. Ez csíratömlő segítségével kicsírázik, melyből egy újabb micélium alakul ki, vagy pedig egy ivartalan szaporítószerv a sporangium (http 6). Az ivaros szaporodáshoz szükséges haploid sejtek sejtmagjai csak olyan formában tudnak egyesülni, ha képesek egymásra találni. Ebből a célból már egyszerűbb gombák esetében is megfigyelhetünk olyan biokémiai-élettani folyamatokat, mely az előbbieknél eleget tesz. A gametangiumképzést és konjugációt gyakran ivari csalogatóanyagok (feromonok) szabályozzák. Többek között a *Mucor* nemzetségben is kimutattak egy olyan hormonhatású anyagot, mely gametangiumok kialakulását segíti elő. Ez a vegyület a trisporánsav (Jakucs 1999).

A *Mucorales* rend tagjai változatos megjelenésű vegetatív szaporodási formát alakítanak ki. Egyik módja, amikor a fejlődő spórák a közöttük lévő anyagot megduzzasztják, melynek hatására felszakad a sporangium fala, így a kiáramló spórák alkalmas közeget találva kicsírázhatnak. Másik forma, amikor az egész sporangium a csíratömlő segítségével csírázik ki. A sporangiospórák az ivartalan szaporítósejtek, melyek a sporangiumon belül találhatóak. A sporangiumot a sporangiumtartótól elválasztó a sporangiumba betüremkedő harántválaszfal a kolumella, mely a *Mucor* nemzetségben jellemzően körte alakú. A sporangiumtartó, sporangium, sporangiospórák és kolumella elhelyezkedését a 7. ábra szemlélteti. Taxonómiaiilag fontos bélyeg a sporangiofőr morfológiája. A sporangium lehet száraz, vagy folyadék tartalmú, illetve tartalmazhat néhány, vagy több ezernyi spórát. Vegetatív szaporítóképletek közé sorolható még a sporangiolum, merosporangium, illetve a sporokládium, melyek főként spóraszámukkal és azok elrendeződésével különböznek egymástól (Kevei et al. 1999b).



7. ábra: *Mucor hiemalis* sporangiumtartó, sporangium és sporangiospóra kolumellával (saját felvétel)

Az idegrendszerben, illetve a tüdőben súlyos elváltozásokat okozhatnak, melyek általában halálos kimenetelűek, bár aránylag ritkán fordulnak elő. Fakultatív patogének, azaz a legyengült szervezetet támadják meg, bár kialakulhatnak erősen patogén törzsek is (Jakucs 1999). Állati és növényi eredetű anyagokon elszaporodva vastag penészszerűet hoznak létre. Gyümölcsök és zöldségek rothadását okozzák. Mivel toleranciájuk nagy a különböző környezeti viszonyokhoz, így konzervált készítményekben is elszaporodhatnak (Maráz 2001).

2.6 Nehézfémek

A fémek természetes módon is előfordulnak a környezetben, de azok magasabb környezeti koncentrációi miatt különféle antropogén tevékenységek tehetők felelőssé. Ebben nagy szerepet játszanak az ipari és mezőgazdasági tevékenységek, beleértve a bányászatot, kohászat folyamatait, a szennyvízzel való öntözést és a műtrágyahasználatot is, melyek hatására az utóbbi években a környezetre ható nehézfémek által okozott veszélyek megnövekedtek (Alloway & Steinnes 1997).

Az egyébként esszenciális fémek is, mint például réz, kadmium, cink, kobalt, mangán és vas is toxikussá válhatnak, ha az optimális mennyiséget meghaladják. Az élő szervezet által felvett nehézfémek nem fejtenek ki azonnali hatást. Felhalmozódva különböző koncentrációnál válnak mérgezővé. A talaj folyadék fázisában is jelen lehetnek oldható szerves és szervetlen komplexek formájában, hidratált ionként, valamint kolloidok

alkotórészeként, szilárd fázisban pedig szerves és szervetlen kolloidok felületén kicserélhető formában, szilikátok kristályrácsában, valamint oldhatatlan csapadékokban (<http> 9).

A nehézfémek diszpergálhatnak a felszín alatti üledékekben és a talajvízben, ebből adódóan igen széles körben elterjedhetnek nagy kárt okozva ezzel az ökoszisztémában, valamint a táplálékláncon keresztül az emberekben is (Zeng et al. 2010). Természetesen nem csak ezen a módon kerülhetnek be a fent említett rendszerekbe. Egy másik lehetséges út a mikroorganizmusokban, talajlakó állatokban és növényben történő akkumulálódás, melynek következtében az őket fogyasztó állatok és emberek szervezetébe is bekerülhet. A talajból nemcsak élő egyedek képesek akkumulálni a nehézfémeket, hanem kioldódás, kimosódás következtében a víz, illetve a levegő is, így ismét felvehetővé válhat az ökoszisztéma többi szereplője számára.

A fémek toxicitási fokának egyik legfontosabb meghatározó tényezője a talajban annak biológiai hozzáférhetősége, amely az intersticiális vízben, vagy talaj részecskéiben a szennyező anyagoknak az a része, mely rendelkezésre áll egy adott organizmus számára, tehát fel tudja azt venni belégzés, emésztés, vagy közvetlen kontaktus által (Naidu et al. 2000). Természetesen ezen kívül befolyásolhatja még a fémek fizikai-illetve kémiai tulajdonságai, a környezetbe kerülő koncentráció, illetve az általa okozott terhelés időtartalma és gyakorisága, talajtulajdonságok, illetve az adott szervezetbe való bejutás módja, annak kora és állapota.

Fémszorpció útján a talaj agyag- és szervesanyag tartalma mérsékli a toxicitást. A talajban ugyanis mikrobiális tevékenység következtében olyan szerves vegyületek is termelődnek, amelyek oldható kelátokat képeznek fémionokkal (Csathó 1994b). Az így kialakuló komplexek eközben le is bomlanak, ebből adódóan a kelatizáló szerves anyagok szintézisének és lebontásának aránya határozza meg az aktuális oldható-fémkoncentrációt.

Gombákban a nehézfémionok ciszteintartalmú fehérjék tiol csoportjaival képesek reakcióba lépni, így fungicid hatást kifejteni. Ennek következménye az élő sejt energiatermelő folyamatainak gátlása, mivel számos enzim működéséhez nélkülözhetetlen a fehérje tiolcsoportjainak jelenléte (Josepovits 1987). Toxikus fémek növekedésgátlást, spóra „csírázás” gátlást okozhatnak, valamint befolyásolják a reprodukciót, metabolikus aktivitást (Gadd 1993, Amir & Pineau 1998), illetve csökkentik a mikorrhizás gombák kolonizációs képességét növények gyökerein (Mozafar et al. 2002). Ezen kívül a gombák morfológiája is

megváltozhat, ami gyakran a micéliumok sűrűségében mutatkozik meg (Ramsay et al. 1999, Fomina et al. 2005).

A gombák egyébként jó fémfelvételi rendszerekkel rendelkeznek anyagcserétől-független bioszorpcióval. A fémion felhalmozódás elsődleges helyét a hifa falának tulajdonítják. Zafar (2007) kutatásai alapján a *Rhizopus sp.* és *Aspergillus sp.* a kadmiumnak és krómnak tökéletes bioszorberei lehetnek.

2.6.1 Réz

A talajokban a réz főként érc formájában fordul elő (Pelikan 1981). Az elemi réz nem tekinthető mérgezőnek, csak annak vegyületei. Lehel & Laczay (2011) írása alapján a Cu kis mennyiségben esszenciális a mikroorganizmusok és egyéb szervezetek számára, viszont nagy koncentrációban többek közt az anyagcserét is károsan befolyásolja (Petersen et al. 2003), holott normál esetben számos anyagcsere-folyamat enzimatis kofaktoraként ismeretes (Santorufó et al. 2012). Esszenciális elemként szerepük van a vérképzésben, redoxfolyamatokban és az enzimrendszerek normál működésében (Lehel & Laczay 2011).

Az elmúlt években a réz bányászat, az adalékanyagok, gombaölő szerek, növényvédő szerek és a szerves trágya széles körben elterjedt használata, valamint öntözés és a városi szennyvíziszap komposzt felhasználása súlyosbította a talajok réz terhelését (Wang et al. 2012). A mezőgazdaságban növényi tápanyagként, algicidként, baktericidként és fungicidként, az állatgyógyászatban pedig növekedés-serkentő, takarmány-kiegészítő és betegségmegelőző hatása miatt alkalmazzák (Adriano 1986).

Fungicidek tekintetében 2 féle hatásmechanizmusú szerről beszélhetünk. Az egyik az úgynevezett aspecifikus hatású készítmények csoportja, melyek a gombák több életfontosságú bioszintetikus folyamatát is gátolhatják. A másik csoport képviselői a specifikus hatású szerek, melyek célzott hatással bírnak, ennek következménye viszont a toleranciára való készség megnövekedése (Székács 2006). A különféle réz készítmények az első csoportba sorolhatók, tehát aspecifikus hatású gombaölő szerként viselkednek. Az elmúlt években számos fungicid hatóanyag felhasználási engedélyét visszavonták, mivel többségük ökotoxikológiai szempontból kedvezőtlen tulajdonságokkal rendelkeztek. A réz használata

továbbra is megengedett, viszont mivel felhalmozódik a talajokban, valamint minden élő szervezet érzékenységet mutat vele szemben, így felhasználhatóságának lehetősége egyre szűkül. Kijuttatható mennyisége is korlátozott, többek között az ökológiai növényvédelemben is (http 3), ahol betiltását már régóta tervezik, sőt számos országban már nem is alkalmazható.

„A rézvegyületek általános sejtmérgeknek tekinthetők. A gombaszervezetben kelátképzők és rossz vízdoldhatóságúak. A rézvegyületek stabilak, mely a rossz vízdoldhatósággal párosulva igen tartós hatásúvá teszi ezeket a képződményeket. Egyszerre kis mennyiség oldódik, ez felszívódik a megjelenő spórákban, majd kioldódik, ezáltal akumulálódik a spórákban” (Székács 2006). A felhalmozódás következményekén a spórákon belül a Cu^{2+} -ionok olyan kémiai csoportokhoz kapcsolódhatnak, melyek számos enzim fehérjében jelen vannak, így megzavarják a normális sejttevékenységet.

2.6.1.1 Réz hatása különböző szervezetekre korábbi tanulmányok alapján

Kandeler et al. (1992) kohóból származó réz szennyezés hatását vizsgálta amőbán, melynek során mind a fajok számában, mind pedig mennyiségükben változást figyelt meg. Ezzel szemben Boon et al. (1998) egysejtűekre vonatkozóan nem észlelt hatás rézzel erősen szennyezett talajokon. Ekelund et al. (2003) mikrokozmosz kísérlete során talajhoz adott Cu^{2+} -ion hatására változást figyelt meg baktériumokkal, illetve protozoákkal kapcsolatos tevékenységekben, ezek fiziológiájában, illetve a diverzitásban. Relatív csekély módosulásokkal találkozott a teljes mikrobiális, illetve mikro-fauna mennyiségében és aktivitásában is még magas rézzel kezelt koncentrációkban esetén is. Ezt a mikrobiális közösség gyors kompenzálásának tulajdonította különböző taxonok veszteségének funkcionális helyettesítésére.

Chu et al (2010) korábbi tanulmányában a réz nem volt hatással a *Trichoderma*, illetve *Fusarium* sokaságára, de jelentősen befolyásolta a közösségek szerkezetét. Növekvő mennyiségek mellett fajok kicserélődése, illetve egyes fajok felváltása volt megfigyelhető. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy ez az átrendeződés egy igen fontos alappillére a közösségek növekvő réz-mennyiségekhez való alkalmazkodásának.

2.6.2 Kadmium

A kadmium legnagyobb mennyiségben szennyvíziszapok és hulladékok kihelyezésével kerül a környezetbe. Ennek mennyisége nagyobb, mint a szén elégetése, vas és acél gyártása a foszfor műtrágyák gyártása és használata, illetve a cinkgyártás révén környezetbe jutó Cd összessége. A természetben lévő kadmium mennyiségéhez a vulkáni tevékenység is hozzájárul (Csathó 1994a).

Lindsay (1979) szerint a kadmium egy potenciálisan toxikus fém, mely nem ismert biológiai funkciókkal rendelkezik. Kloridokkal, hidroxillal, szulfhidrid és tiol csoportokkal társulva oldható komplexeket képez és ezek a komplexek nagymértékben szabályozzák a Cd biológiai aktivitását (Vig et al. 2003). Mivel a jelenleg ismert enzimek közül egyetlen egynek sem képezi szerkezeti alkotórészét, ezért már alacsony koncentrációban is nagyon toxikus lehet.

Magas koncentrációban a talajokban mind a környezet, mind pedig az emberi egészség számára veszélyt jelenthet. A Cd a talajokban könnyen mozog, így képes a növények gyökerein keresztül abszorbeálódni, majd felhalmozódni a szövetekben. Mivel nem minden esetben alakulnak ki látható elváltozások a növényen, észrevétlen maradhat a fogyasztók számára, így könnyen eljuthat a táplálékláncban keresztül akár az emberi szervezetbe is.

Növényeknél zavarokat okozhat a növekedésben, illetve a termékenységben. Közismerten negatívan befolyásolja a talaj biótát, valamint a talaj biológiai és biokémiai tulajdonságait, mint például a mikrobiális biomassza szén-tartalmát (MBC), enzim aktivitást és légzést (Aghababaei 2014).

Reaktív oxigéngyökök képzésével oxidatív stresszt idéz elő az élő sejtekben, amely hatással van számos sejtkomponensre, például DNS-re, lipidekre és fehérjékre. Ez a folyamat apoptózishoz, vagyis programozott sejthalálhoz vezethet. A Cd^{2+} gátolja a nitrát reduktáz aktivitást, amelyet *Aspergillus niger* gombafajon is megfigyeltek (Chakraborty et al. 2014).

A citoplazmába könnyen bekerülhet, mivel szerkezetileg hasonlít a nem toxikus fémekre, így azok transzport rendszerein keresztül képes szállítódni. Károsítja a sejteket a

fehérjék szulfhidril csoportjához való erős affinitása, valamint a Zn^{2+} és Fe^{2+} ionok fehérjék kötőhelyeiről való kiszorítása miatt is. Szulfhidril csoportok nehézfém kationokkal történő komplexképzése csökkenti az érzékeny enzimek aktivitását (Zeng 2013).

2.6.2.1 Kadmium hatása különböző szervezetekre korábbi tanulmányok alapján

Stremtomycetes platensis cianobaktériumon végzett kadmiumszorpciós kísérletek során nagyobb kadmium koncentráció hatására baktériumsejtek pusztulását figyelték meg, kisebb mennyiségeknél pedig egy enyhe szaporodásgátló hatást (http 4). Szabó & Horváth (1983) különböző szennyvizek és iszapok mezőgazdasági hasznosítása során talajba kerülő nehézfémek, azon belül pedig kadmium mikroorganizmusokra gyakorolt hatását vizsgálták meg laboratóriumi körülmények között. A *Bacillus megaterium* szaporodását 50 mg/l kadmium gátolta teljes mértékben, míg a *Bacillus cereus*-ét 500 mg/l. Az összcsíraszámot 1,5 és 10 mg Cd/kg talaj nem csökkentette, de 50 mg Cd/kg talaj már gátolta.

Takács et al. (2000) kadmium, nikkel és cink arbuszkuláris mikorrhiza gombák diverzitására gyakorolt hatását vizsgálták mészlepedékes csernozjom talajokon. A három nehézfém közül a kadmiummal szennyezett talajokon vélték felfedezni a legalacsonyabb diverzitást. Feltételezésük alapján olyan fémtoleráns gombafajok szelektálódtak ki, amelyek képesek elviselni magas nehézfém koncentrációk jelenlétét is.

3 ANYAG ÉS MÓDSZER:

3.1 Mintavétel az előkísérlethez, illetve a végleges kísérlethez

Talajmintáink a gödöllői 103B jelű erdőből származnak a 8. ábrán látható talajszelvény melletti területről 10 cm-es mélységből. Az erdőterületen uralkodó talajtípus a Ramann-féle barna erdőtalaj, vagy más néven barnaföld, melynek szelvényét egyenletesen agyagos szerkezet, kedvező összetételű humuszanyagok, illetve gyengén savanyú kémhatás jellemzi. A talajtípus A-szintje – ahonnan mintáink is származnak – 20-30 cm-es vastagságú, szerkezete morzsás, vagy szemcsés gyengén savanyú, vagy semleges kémhatással. Humusztartalma kb. 6-8 %-ra tehető ([http7](http://7)).



8. ábra: Talajmintavételi szelvény és a mintavétel helye. (saját felvétel)

Mintavétel során előre sterilizett, majd a helyszínen 70 %-os etanollal fertőtlenített mintavételi eszközöket alkalmaztunk az infekció elkerülése céljából. Rézzel történő kezelés esetében 2014. márciusában a kadmios kísérlethez pedig júniusban vettünk mintákat.

3.2 Előkísérletek

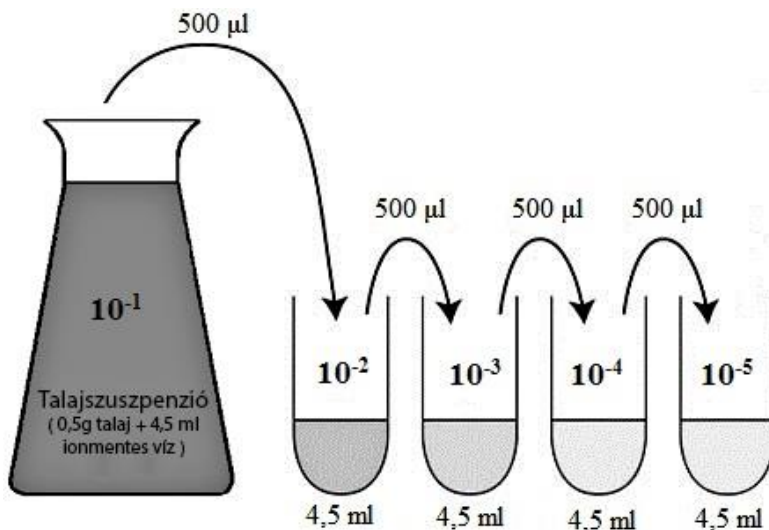
A végleges kísérlet beállítását megelőzően a megfelelő táptalaj, inkubációs hőmérséklet, illetve a talajminták hígítási fokának megállapítása céljából elővizsgálatokat végeztünk.

A talajmintákból vizes szuszpenziót és tízszeres hígítási sort készítettünk. Ennek során 0,5 g talajt 4,5 ml steril ionmentes vízhez (diszpergáló oldat) adtunk, majd 5



9. ábra: Minták az ultrahangos vízfürdőben. (saját fotó)

percen keresztül ELMA Elmasonic E30H típusú ultrahangos vízfürdőbe helyeztünk (9. ábra). Az így elkészült szuszpenzióból pipetta segítségével 500 μ l-t 4,5 ml ionmentes vízhez adtunk, melynek során 10^{-2} hígítási fokot értük el. Vortex-szel történő homogenizálást követően ebből szintén az előbb leírt mennyiséget helyeztük át újabb 4,5 ml vízhez, majd a 10. ábrán látható módon ismételtük meg a műveletet egészen az 5. hígítási fokig.



10. ábra: Tízszeres hígítási sor elkészítésének módja talajszuszpenzióból. (saját ábra)

Mindez azért szükséges, mert a talajban grammonként gombák milliói találhatóak. Ha hígítás nélkül tenyésztettük volna ki a mintáinkat, akkor a nagy egyedszám miatt szinte lehetetlen lett volna megszámolni, illetve izolálni a fajokat.

Az így előállított elegyekből 100 µl mennyiséget szélesztettünk a Petri-csészékben alkalmazott 3 féle tápagar felszínére, majd 7 napig inkubáltuk 26, illetve 37°C-on. A 2x-es (10^{-2}) hígítás igen töménynek bizonyult. A gyorsan nöövő fejespenészek (pl.: *Mucor* spp.) nagyszámú megjelenése, illetve a magas telepszám ellehetetlenítette volna a fajok számának meghatározását, illetve azok izolálását. Legmegfelelőbbnek a 3x-os hígítást találtuk így ezt is alkalmaztuk a későbbiekben is a leoltásoknál, valamint a CFU (Colony Forming Unit), vagyis a telepképző egység kiszámításának esetében. Táptalajok szempontjából a burgonya-glükóz agart (PDA) választottuk, mivel ez volt a leghatékonyabb a fejespenészekkel szemben és látszólag ez volt a legmegfelelőbb a különböző fonalas gombák számára. 37°C-os inkubálást követően egy hét alatt sem igen nőttek ki telepek még a legtöményebb hígításban sem. Ezzel szemben 26°C-on megfelelő mennyiségű telepszámot detektáltunk, így ezen a hőfokon inkubáltuk mintáinkat a kísérlet folyamán.

3.2.1 Alkalmazott táptalajok rövid jellemzése, összetétele

Martin féle agar (1950): A szén- és nitrogénforrást optimális mennyiségben tartalmazó tápagar. A baktériumok növekedését 200 mg/l penicillin hozzáadásával a fejespenészek gátlását pedig 0,035 g/l bengálrózsa hozzáadásával biztosítottuk.

Összetevő	Mennyiség
Szacharóz	10,0 g
Pepton	5,0 g
KH₂PO₄	1,0 g
MgSO₄*7H₂O	0,5 g
Élesztőkivonat	0,5 g
Bengálrózsa	0,035 g
Agar-agar	15,0 g
Desztillált víz	1000 ml
+ antibiotikum	

Sabouraud dextróz agar (1910): Alacsony pH tartalma miatt gátolja a legtöbb baktérium elszaporodását. A növekedéshez szükséges energiát, illetve megfelelő nitrogénforrást biztosítja. A tökéletesebb védelem érdekében szintén 200 mg/l penicillint adtunk a még meg nem szilárdult táptalajhoz.

Összetevő	Mennyiség
Glükóz	40 g
Pepton	10 g
Desztillált víz	1000 ml
Agar-agar	15 g
+antibiotikum	

Burgonya-glükóz kivonat agar (PDA, Scharlau): A PDA egy általános gomba táptalaj, melyet nagy cukortartalom és savas pH jellemez.

Összetevő	Mennyiség
Burgonyakivonat	230 g
Glükóz	20 g
Agar	20 g
Desztillált víz	770 ml
+ antibiotikum	

3.3 Kísérlet beállítása

3.3.1 Réz

A frissen vett mintákból 100 g nedves talajt mértünk be analitikai mérlegen, 1 napon át szárítószekrényben tároltuk, majd megállapítottuk annak szárazanyag tartalmát. Ehhez igazodva számoltuk ki az adott talaj mennyiségéhez szükséges réz hatóanyag mennyiségét.



11. ábra: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ törzsoldat, valamint a hígítással előállított 4 koncentráció (saját fotó)

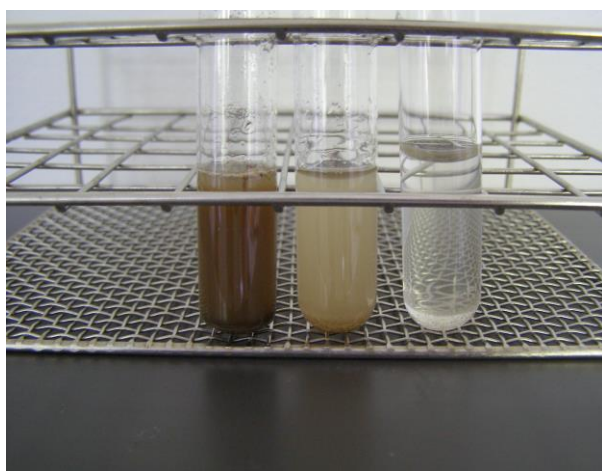
A 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet 1. melléklete alapján a réz földtani közegre vonatkozó szennyezettségi határértéke 75 mg/kg, így ehhez igazodva állítottuk be a kísérlet során használt koncentrációkat.

Analitikai mérlegen kimért 5 x 25 g mennyiségű talajt zárható fedelű sterilizett üvegekbe helyeztünk. Kristályos szerkezetű

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -ból törzsoldatot állítottunk elő, melyből tízszeres hígítási sort készítettünk (11. ábra). A hígítási sor tagjaiból 2,5 ml-t pipetázva a 25 g nedves (20,665 g száraz) talajhoz az alábbi végkoncentrációkat (μg réz / 1 g száraz talaj) kaptuk:

- 7,5 $\mu\text{g/g}$
- **75 $\mu\text{g/g}$**
- 750 $\mu\text{g/g}$
- 7500 $\mu\text{g/g}$
- + Kontroll

Természetesen a kontrollnak szánt 25 g talajhoz réz hatóanyagot nem tartalmazó 2,5 ml steril vizet adtunk.



12. ábra: Nehézfémekkel terhelte talajokból elkészített 3 tagú hígítási sorozat (balról jobbra: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (saját fotó)

2 hét 26°C-on történő inkubációt követően minden koncentrációból és a kontrollból 0,5 g mennyiséget mértünk be egy kémcsőbe, melyhez 4,5 ml desztillált vizet adtunk és az előző fejezetben ismertetett módon hígítási sort készítettünk, majd a 3x-os hígításból 100 μl mennyiséget szélesztettünk PDA tápagar felületére 3 ismétlésben (12. ábra).

1 hét elteltével detektáltuk a primokultúrákat és minden különbözőnek vélt fajt 1 pontban leoltottunk PDA táptalajra, valamint feljegyeztük azok darabszámát. A fajok izolálását oltókaccsal, illetve tűvel végeztük. Minden egyes műveletet megelőzően Bunsen égő lángjába tartva fertőtlenítettük az eszközöket az esetleges befertőződés elkerülése céljából. A beazonosításig naponta detektáltuk a telepeket és az öregedő, illetve befertőződött izolátumokat új táptalajra oltottuk át.

3.3.2 Kadmium

Az eljárás lényegében ugyan az volt, mint réz esetében, így a folyamat leírását ebben a fejezetben nem ismételtem meg. A koncentrációkat szintén a 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet 1. mellékletéhez igazítottuk, melyben a kadmium földtani közegre vonatkozó szennyezettségi határértéke 1 mg/kg.

Kristályos szerkezetű $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -ból törzsoldatot állítottunk elő, melyből tízszeres hígítási sort készítettünk. A hígítási sor tagjaiból 2,5 ml-t pipetázva a 25 g nedves (20,585 g száraz) talajhoz az alábbi végkoncentrációkat (μg kadmium / 1 g száraz talaj) kaptuk (10. ábra):

- 0,1 $\mu\text{g/g}$
- 1 $\mu\text{g/g}$
- 10 $\mu\text{g/g}$
- 100 $\mu\text{g/g}$
- + Kontroll

3.4 Sejthomogenizálás

A tiszta tenyészetekből Potter-Elvehjem típusú sejthomogenizálóval aszeptikus körülmények között sejtszuspenziót készítettünk 20%-os glicerinnel való hozzáadásával. A sejthomogenizáló eszköz tulajdonképpen egy csőből és egy ahhoz szorosan illeszkedő dugattyúból áll. A gomba egy részét, illetve a glicerint az üvegcsőbe helyeztük, majd ezt követően a dugattyú mozgatásával egy homogén szuszpenziót kaptunk. Ebből 1,5 ml-t Eppendorf-csőbe pipetáztunk, melyet további vizsgálatok céljából -80°C -on tároltuk.

3.5 Izolátumok mikroszkópos, illetve makroszkópos beazonosítása sajátos bélyegek alapján

A makroszkópikus vizsgálat nem más, mint a gomba szabad szemmel látható tulajdonságainak megfigyelése. Fontos meghatározó jelleg volt a telep színe, felülete, barázdáltsága és állaga, valamint alakja és annak széle, az esetleges folyadékcseppek jelenléte, táptalaj megfestése a telepek hátoldala, valamint sok esetben a gomba illata.

Ezt követte a mikroszkópikus vizsgálat, melyet fénymikroszkóp segítségével végeztünk. Megtisztított tárgylemez felületére megfelelő mennyiségű folyadékcseppet helyeztünk, majd leégetett oltókacs segítségével a gomba tenyészetből egy kis darabot lemetszettünk, melyet a cseppbe helyeztünk, majd fedőlemezrel buborékmentesen lefedtük. A mikroszkóp tárgyasztalán történő rögzítést követően a kívánt felbontásban kereshettünk a preparátumban sajátos faji bélyegeket, melyek alapján be lehetett azonosítani őket. A beazonosítás során több faj gombahatározója is segítségünkre volt (pl.: Fassatióvá, O. (1984): Penészek és fonalasgombák az alkalmazott mikrobiológiában).

Természetesen akadtak olyan fajok is, amelyek beazonosítására nem találtunk egyértelmű faji sajátosságokat, így ezeket szekvenálással határoztuk meg.

3.6 Fajok szekvenálása

3.6.1 DNS-kivonás

A -80°C-on tárolt törzsgyűjteményből kiválasztott gombákat 3 ponton PDA táptalajra oltottuk ki, majd 1-1,5 nap elteltével kémcsövekbe kiöntött 2 ml (2% glükózt, 1% peptont, 0,5% élesztőt tartalmazó) táplevesre oltottuk át. 3 ml 1%-os $MgCl_2$ oldatot adtunk a mintákhoz, majd vortexeltünk. Ezt követően a telepeket Eppendorf csőbe helyeztük és az alábbiakban látható részletes leírás alapján végeztük el a gombák DNS-ének kivonását Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification készlet segítségével.

300 μ l Yeast Cell Lysis Solution oldatot adtunk mintáinkhoz, majd vortex-szel történő homogenizálást követően 10.000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. Ezt 20 perces 75°C-os vízfürdő, majd 5 perc hűtés követte. 150 μ l MPC Protein Precipitation Reagents hozzáadása

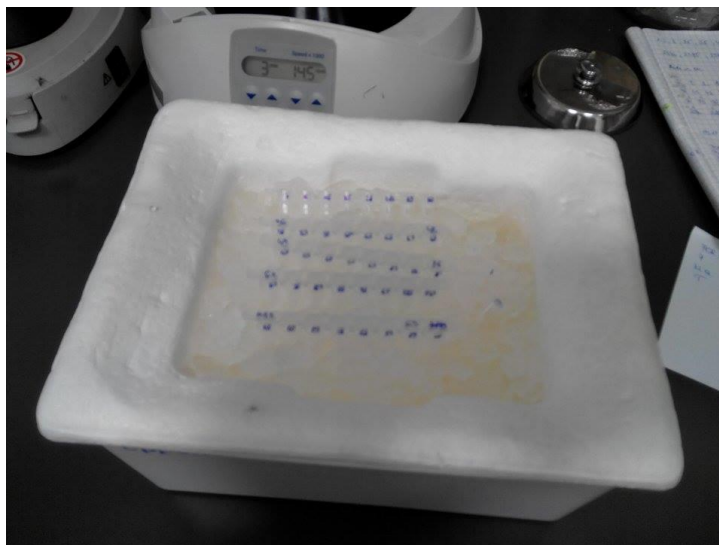
után 10 mp-ig vortexeltük, majd 10 percig 10.000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk a mintákat, melyekből 2 x 150 µl mennyiségű oldatot pipettáztunk át új Eppendorf csőbe.

Ehhez -20°C-on tártolt 410 µl izopropanolt adtunk hozzá, 10 percen keresztül összerázás segítségével homogenizáltunk, 10.000 rpm fordulatszámon centrifugáltunk, majd egy erőteljes mozdulattal az izopropanolt leöntöttük. 410 µl 70%-os etanol hozzáadását követően ismét 10 perc centrifugálás következett, majd a felesleg erőteljes mozdulattal történő leöntése. Ismét 70%-os etanolt adagoltunk mintáinkhoz 410 µl mennyiségben, ám ebben az esetben csak 5 percig centrifugáltunk, majd a felesleget erőteljes mozdulattal leöntöttük.

10-20 percen keresztül állni hagytuk mintáinkat beszárítás céljából. Ennek elteltével pipetta segítségével szuszpendálást végeztünk 30 µl bidesztvízzel majd a mintákat a további felhasználásig 4°C-on tároltuk.

3.6.2 PCR-termék elkészítése, illetve a kívánt szakasz amplifikálása

Ahhoz, hogy egy adott DNS szakaszt PCR berendezés segítségével felszorzozzunk a kívánt mintánkhöz többféle komponenst is hozzá kellett adnunk. Ezek össze pipettázása során szükséges volt a PCR-csövek jéggel teli tálcában való tartására a reakció beindulásának elkerülése céljából (13. ábra),



13. ábra: Mintáink jéggel teli tálcában a PCR-termék összerakása közben. (saját fotó)

A reakcióhoz szükséges komponensek (25 µl végtérfogatra számolva):

- ITS1/ITS4 gomba specifikus primerek	0,25-0,25 µl
- DNS templát	2 µl
- PCR Master Mix	12,5 µl
- MQ-víz	10 µl

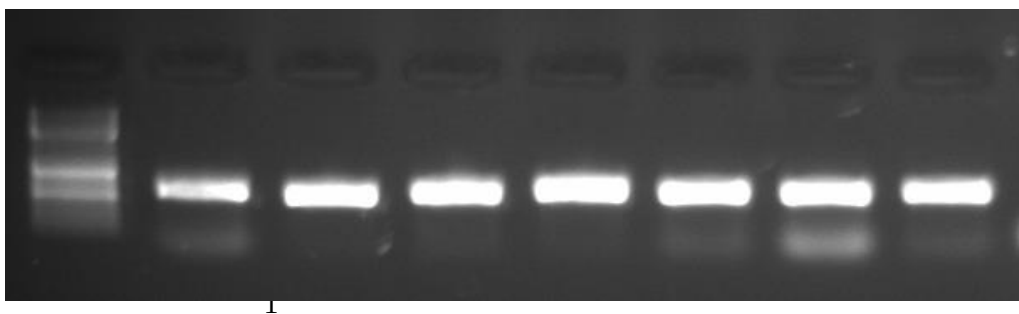
Az általunk alkalmazott hőmérsékleti program a következő volt:

- 1. Elődenaturáció:	95 °C	5:00	
- 2. Denaturáció	95 °C	0:30	} 35x
- 3. Annealing	54 °C	0:45	
- 4. DNS szintézis	72 °C	0:60	
- 5. Ismétlés (2-4. lépés)	72 °C	7:00	
- 6. Hűtés	4°C		

3.6.3 PCR termék ellenőrzése

A kapott amplikonokat 1%-os agaróz gélben futtattuk meg abból a célból, hogy leellenőrizzük a kapott PCR-termék minőségét, tisztaságát. Az agaróz gélelektroforézis a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térben való mozgásán alapul. Az adott töltésű molekulák ebben a térben az ellentétes töltésű elektróda felé haladnak.

A gél elkészítéséhez agarózt, TBE puffert, valamint etídium bromidot használtunk, mivel ez hozzákötődik a DNS-hez, így UV-fényben láthatóvá teszi azt. A mintáinkhoz jelzőfestéket pipettáztunk, majd a gélben fésűk segítségével előállított zsebekbe töltöttük be. A jelzőfesték segítségével leellenőrizhető a futás sebessége, illetve állapota. Az első zsebbe az ún. létra került, ami a későbbiekben segítségül szolgált a DNS hosszának megállapításához. Futtatás után UV-fény alá helyeztük a mintákat, melynek során a 14. ábrán látható eredményt kaptuk. Mivel az ethídium-bromid mutagén és karcinogén anyag, ezért végig kötelező volt nitriles kesztyű használata.



14. ábra: PCR termék ellenőrzése során kapott gélkép (saját fotó)

A gél összeállításához szükséges anyagok: 80 ml 1%-os TBE- (TRIS, bórsav, EDTA) puffer, 0,8 g agaróz por és 4 µl ethidium-bromid. A termék futtatását 110 mV feszültség alatt 20 percen keresztül Cleaver MultiSub típusú futtatókádban végeztük.

3.6.4 PCR termék tisztítása

A tisztítás lényege, hogy csak maga az ampikon kerüljön szekvenáló reakcióba, tehát a nem kívánatos alkotók (pl. maradék dNTP) eltávolítása a cél, melyet NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up készlettel végeztünk (15. ábra).

A rendelkezésünkre álló PCR terméket kétszeres térfogatú NT pufferben vettük fel, majd a DNS megkötése érdekében szilika-membránra vittük. A membránt gyűjtőcsőbe helyeztük, majd 30 mp-ig centrifugáltuk 11.000 rpm fordulatszámon. A membrán átmosása céljából 700 µl NT3 puffert pipettáztunk rá, fél percig centrifugáltuk 11.000 rpm fordulatszámon. Ezt követően megismételtük a folyamatot, ám ebben az esetben 1 percig történt a centrifugálás, majd tiszta Eppendorf-csövet helyeztünk a gyűjtőcső helyére. 30 µl NE-puffert adtunk a mintánkhoz, majd 1 perc szobahőmérsékleten való inkubációt követően 11.000-es fordulaton centrifugáltuk 1 percig. Az így kapott terméket agaróz-gélelektroforézissel leellenőriztük, majd felhasználásig - 20°C-on tároltuk.



15. ábra: PCR termék tisztításának lépései (http 8)

3.6.5 Szekvenálás és nukleotidsorrend elemzés

A szekvencia analízist a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) segítségével végeztük.

A szekvenáló reakcióhoz szükséges komponensek (10 µl végtérfogatra számolva):

- BigDye 1 µl
- BigDye puffer 1,5 µl
- ITS1-F primer 0,5 µl
- Tisztított PCR termék 2 µl
- MQ víz 5 µl

Az alkalmazott hőmérsékleti program a következő volt:

- 1. Denaturáció 96 °C 0:10
 - 2. Annealing 50 °C 0:05
 - 3. DNS szintézis 60 °C 4:00
 - 4 °C $\rightarrow \infty$
- } 28x

A nukleotid sorrendet az ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) készülékkel határoztuk meg. A kapott szekvenciákat NCBI adatbázis (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) segítségével azonosítottuk.

3.7 Az eredmények megállapításához, illetve értékeléséhez szükséges számítások

3.7.1 Diverzitás index meghatározása

Shannon - Weaver diverzitás indexet alkalmaztunk az egyes koncentrációk, illetve a kontroll csoport diverzitásának meghatározására. A számítás során alkalmazott képlet a következő volt:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i * \ln p_i$$

,ahol:

- S a fajsza
- p_i az i faj el

A Shannon-index egybknt természetes rendszerekben általában 1,5 és 4,5 k

3.7.2 Statisztikai elemz

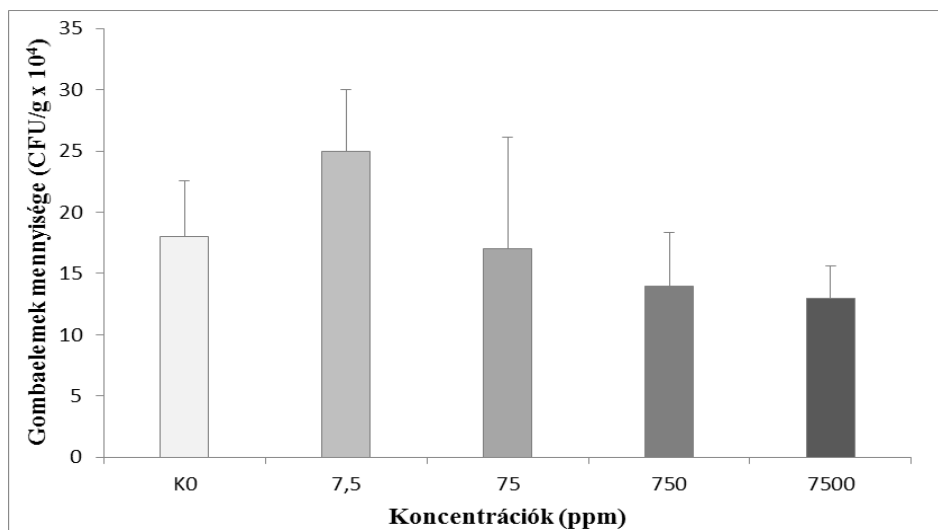
Statisztikai elemz soran az R nev

4 EREDMÉNYEK

4.1 Gombaközösségek a Cu^{2+} ionokkal terhelt talajokban

4.1.1 Gombaközösségek mennyiségi viszonyai

Ramann-féle barna erdőtalajban mikrokozmosz kísérletben a $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ formájában bevitt Cu^{2+} ionnal végzett terhelés különböző dózisa esetén, 14 napos inkubáció után a tenyésztethető összes gombapropagulum mennyisége kisebb volt, mint a kezeletlen kontroll talaj mikrobiótája, kivéve a 7,5 ppm-es koncentrációt. A talajokra előírt környezetvédelmi határérték 10%-ának megfelelő bevitt értéknél (7,5 ppm) az összes tenyésztethető gombaelem száma ($25,0 \times 10^4$) 38,9 %-kal meghaladta a kontroll talajból tenyésztett értéket. A 75 ppm és 750 ppm réz-ionnal terhelt mikrokozmoszokban azonban már 17×10^4 CFU/g értékre, illetve 14×10^4 CFU/g értékre csökkent a tenyésztethető gombaelemek száma. A talajokra megadott határérték 100-szorosa esetében pedig már csak 13×10^4 CFU/g gombaelem mennyiséget találtunk (16. ábra).



16. ábra: Gombaközösségek mennyiségi viszonyai kadmiummal terhelt talajban (Ramann-féle barna erdőtalaj, mikrokozmosz kísérlet)

A viszonylag alacsony hozzáadott koncentrációjú (7,5 ppm) réz hatására történt gombaelemszámbeli növekedés magyarázható azzal, hogy a talajrészecskékhez kötött rézzel egyensúlyt tartó, a gombák számára aktív réz-ion hányad még éppen a hormézis hatás kiváltásának koncentráció-intervallumába esett. A talajszennyezettségi határértéket képviselő

bemért dózis, a 75 ppm esetében már a gombaelemek számának a kontrollhoz képest való csökkenését tapasztaltuk, bár nem szignifikáns mértékben. A határérték 10-szeresét képviselő 750 ppm bemért koncentrációnál a gombaelemek mennyisége, 14×10^4 CFU/g értékre mérséklődött, ami a kontroll értékhez képest 22 %-os csökkenést jelent. A 7500 ppm-es óriásdózis hatására a gombaelemek száma 13×10^4 CFU/g szintre csökkent (28 %-os csökkenés). Mivel a Cu^{2+} ion közismerten erős fungicid hatású (Székács 2006), utóbbi két koncentrációt tartalmazó mikrokozmoszok viszonylag jól mérhető gombaelem túlélése felvetheti a réznek a talajkolloidokhoz való kötődéséből származó inaktíválódását.

Statisztikai elemzések során a következő eredményeket kaptuk.

```
> AnovaModel.3 <- aov(telepszam ~ kezeles, data=Cu)
> summary(AnovaModel.3)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
kezeles	4	267.6	66.9	2.144	0.15
Residuals	10	312.0	31.2		

17. ábra: Egyszempontos variancia analízis (ANOVA) eredménye a kezelések együttes hatására

Az 17. ábrán a rézzel történő kezelések együttes hatása látható a telepszámok tekintetében. Elmondható, hogy 95%-os konfidencia intervallumon a kezelések statisztikailag nem voltak hatással a telepek számára ($p=0,15$).

Tukey - próbával végzett további vizsgálataink eredménye alapján – melynek során minden csoport értéke összehasonlíthatóvá vált a többivel - a különböző koncentrációk egyike sem volt szignifikáns hatással a gombaközösségek mennyiségeire a kontrollhoz, illetve más kezelésekhez viszonyítva sem (18. ábra).

```
Linear Hypotheses:
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
7,5 - K0 == 0	7.000	4.561	1.535	0.565
75 - K0 == 0	-1.000	4.561	-0.219	0.999
750 - K0 == 0	-4.000	4.561	-0.877	0.899
7500 - K0 == 0	-5.000	4.561	-1.096	0.805
75 - 7,5 == 0	-8.000	4.561	-1.754	0.447
750 - 7,5 == 0	-11.000	4.561	-2.412	0.189
7500 - 7,5 == 0	-12.000	4.561	-2.631	0.137
750 - 75 == 0	-3.000	4.561	-0.658	0.961
7500 - 75 == 0	-4.000	4.561	-0.877	0.899
7500 - 750 == 0	-1.000	4.561	-0.219	0.999

(Adjusted p values reported -- single-step method)

18. ábra: Tukey-teszt eredménye a gombaközösségek koncentrációnkénti mennyiségeinek összehasonlításában.

A növekvő Cu^{2+} ion mennyiség nem hozta az elvárt telepszám csökkenést az általunk beállított koncentrációkban. A 7,5 ppm-es dózis serkentő hatást mutat a gombaelemszámra. A talajszennyezettségi határérték alapján a talajban 75 ppm-es koncentráció a megengedett határérték, ezzel szemben a kísérletben alkalmazott 7500 ppm-es, azaz 100-szoros dózis sem befolyásolta szignifikáns mértékben a spórákból képződő telepeket. Legnagyobb különbséget a 7,5 és 7500 ppm-es kezelés között figyelhetünk meg, legkisebb eltérést pedig a kontroll és a 75 ppm-es, valamint a 750 és 7500 ppm-es dózisok között.

4.1.2 Gombaközösségek rendszertani diverzitása

A Cu^{2+} ionokkal végzett talajterhelési kísérletek eredményeiben a gombaközösségeknek a fajok szerinti megoszlását a 7,5 ppm koncentráció esetében 10 a 75 ppm koncentráció esetében 9 a 750 ppm koncentráció esetében 3 a 7500 ppm koncentráció esetében szintén 9 faj gyakoriságával jellemezzük (1. táblázat). 7,5 ppm szintű réz terhelésnél a *Penicillium spinulosum*, 75 ppm-nél a *Mucor hiemalis* és a *Penicillium variabile*, 750 és 7500 ppm-nél a *Trichoderma viride* bizonyult a leggyakoribb fajnak, míg a kezeletlen kontroll mikrokozmoszban a *Penicillium notatum* volt a listavezető.

1. táblázat: Gombaközösségek gyakorisága Cu^{2+} különböző koncentrációival szennyezett talajban mikrokozmosz kísérletben.

Faj	K	7,5 ppm	75 ppm	750 ppm	7500 ppm
<i>Acremonium strictum</i>		16,0 %			
<i>Fusarium proliferatum</i>					7,7 %
<i>Fusarium sp.</i>			5,9 %		
<i>Gymnoascus reesei</i>					7,7 %
<i>Humicola greisen</i>	5,6 %	4,0 %	5,9 %		
<i>Melanospora fallax</i>		8,0 %			
<i>Metarhizium anisopliae</i>					7,7 %
<i>Mucor hiemalis</i>	27,8 %		17,6 %	21,4 %	
<i>Oidiodendron sp.</i>	5,6 %				
<i>Paecilomyces variatii</i>		4,0 %	11,8 %		7,7 %
<i>Penicillium frequentans</i>	5,6 %				7,7 %
<i>Penicillium lapidosum</i>		4,0 %			
<i>Penicillium notatum</i>	44,4 %		11,8 %	28,6 %	15,4 %
<i>Penicillium spinulosum</i>	5,6 %	28,0 %			7,7 %
<i>Penicillium variabile</i>		12,0 %	17,6 %		
<i>Trichoderma harzianum</i>	5,6 %				
<i>Trichoderma koningii</i>			5,9 %		7,7 %
<i>Trichoderma lactea</i>		4,0 %			
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>			5,9 %		
<i>Trichoderma sp.</i>		16,0 %			
<i>Trichoderma viride</i>			17,6 %	50,1 %	30,8 %
<i>Verticillium nigrescens</i>		4,0 %			
Telepszám (CFU/g x 10 ⁴)	18	25	17	14	13

A Cu^{2+} ionok különböző koncentrációit tartalmazó mikrokozmoszok gombaközösségeinek rendszertani diverzitásai meglepő módon csak kis mértékben tértek el egymástól (2. táblázat). 7,5 ppm szintű réz terhelésnél 10 faj mellett a Shannon- Weaver féle diverzitás indexet 2,04 -nek, 75 ppm-nél 9 faj mellett 2,08-nak, 750 ppm-nél 3 faj mellett 1,03-nak, 7500 ppm-nél 9 faj mellett 2,03-nak, míg a kezeletlen kontroll mikrokozmosz talajában 7 faj mellett 1,52-nek számítottuk.

2. táblázat: Cu^{2+} ionnal terhelt talaj gombaközösségeinek rendszertani diverzitása mikrokozmosz kísérletben.

	K	7,5 ppm	75 ppm	750 ppm	7500 ppm
Shannon-Weaver diverzitás index	1,52	2,04	2,08	1,03	2,03
Gombaelemek száma (CFU/g)	18×10^4	25×10^4	17×10^4	14×10^4	13×10^4
Fajok száma	7	10	9	3	9

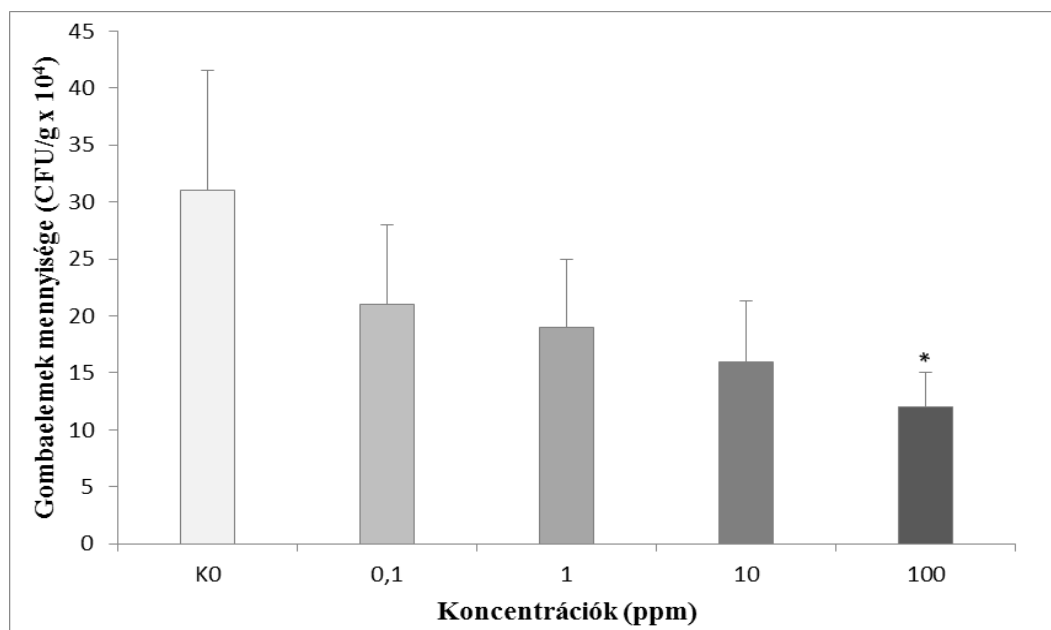
4.2 Gombaközösségek a Cd^{2+} ionokkal terhelt talajokban

4.2.1 Gombaközösségek mennyiségi viszonyai

Mikrokozmosz kísérletben az alkalmazott Ramann-féle barna erdőtalajba $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ formájában bevitt Cd^{2+} ionok különböző dózisainak hatására, 26°C hőmérsékleten 14 napig folytatott inkubáció során a tenyésztethető gombapropagulumok mennyisége valamennyi esetben kisebb volt, mint a kezeletlen kontroll mikrokozmosz mikrobiótája (31×10^4 CFU/g). A rendeletben rögzített, kadmium tartalomra vonatkozó talajszennyezettségi határérték 10%-nak megfelelő értéknél (0,1 ppm) a tenyésztethető gombaelemek számát (21×10^4 CFU/g) 32 %-kal alacsonyabbnak találtuk a kezeletlen kontroll talaj megfelelő értékénél. Az 1 ppm, illetve a 10 ppm Cd^{2+} ionnal terhelt mikrokozmoszokban a gombaelemek mennyisége a kontroll gombaelem mennyiségének még a 61,2 %-a (19×10^4 CFU/g), illetve 51,6 %-a (16×10^4 CFU/g) értékekre állt be. A talajokra megadott szennyezettségi határérték 100-szorosa koncentrációt tartalmazó mikrokozmoszokban pedig már csak 12×10^4 CFU/g gombamennyiséget találtunk.

Vizsgálataink eredménye, vagyis hogy az erősen toxikus kadmium viszonylag magas koncentrációkban, így például a szakmailag megalapozott, és rendeletben rögzített szennyezettségi határértéket képviselő 1 ppm dózisban is csak 39%-kal csökkentette a talaj

élő, azaz mikrobiológiai módszerekkel tenyésztethető gombapropagulum mennyiségét, csak számos tényező hatásának figyelembe vételével értelmezhető. Feltételezhető, hogy az oldattal bevitt kadmium ionok a talaj kolloidjaihoz szorosan kötődnek, és a gombasejtek – a többi élőlényhez hasonlóan – csupán egy, a megkötöttel egyensúlyt tartó, alacsonyabb koncentrációjú kadmium oldattal érintkeznek közvetlenül. Megjegyzendő továbbá, hogy a gombák igen aktív, intracelluláris fém-megkötő fehérjéik az úgynevezett metallothioneinek segítségével csökkenteni tudják a toxikus fémek károsító hatásait (Hughes & Poole 1989). Figyelembe lehet venni azt a tényt is, hogy egy olyan, rendkívül különböző ökológiai igényű fajokat magában foglaló élőlénycsoport, mint a talajgombák mennyisége, egyetlen toxikus vegyület jelenlétében is több tényező befolyása alatt áll. Viszonylag egyszerű feltételezés például, hogy egy primer toxikus hatás eredményeképpen elpusztuló biomassza táplálékforrásul szolgál, következésképpen a rezisztens fajok, illetve egyedek elszaporodását lehetővé teszi.



19. ábra: Gombaközösségek mennyiségi viszonyai kadmiummal terhelt talajban (Ramann féle barna erdőtalaj, mikrokozmosz kísérlet)

A 19. ábrán látható oszlopdiagramokon a telepszámokat ábrázoltuk a koncentrációk függvényében. A koncentráció növekedésével látható a telepek számának csökkenése, mely a statisztikai elemzés szerint csak a 100 ppm-es koncentrációnál éri el a szignifikáns különbséget.

Statisztikai elemzéseink során a következő eredményeket kaptuk:

```
> AnovaModel.1 <- aov(telepszam ~ kezeles, data=cd)

> summary(AnovaModel.1)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
kezeles         4  608.4    152.1    3.264 0.0498 *
Residuals      10  466.0     46.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

20. ábra: Egyszempontos variancia analízis (ANOVA) eredménye a kezelések együttes hatásának tekintetében

Az 20. ábrán a kezeléseink együttes hatását láthatjuk. Statisztikai elemzés során azt az eredményt kaptuk, hogy a kezelések szignifikáns hatással bírtak a telepek számára (95%-os megbízhatósági szinten). Ezt a megállapítást a p-érték támasztja alá, amely 0,0498 lett.

További elemzéseket végeztünk Tukey-próba segítségével, melynek alapján a következő megállapítások tehetők (21. ábra).

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
0,1 - K0 == 0    -10.000     5.574  -1.794  0.4267
 1 - K0 == 0     -12.000     5.574  -2.153  0.2712
10 - K0 == 0     -15.000     5.574  -2.691  0.1254
100 - K0 == 0    -19.000     5.574  -3.409  0.0417 *
 1 - 0,1 == 0     -2.000     5.574  -0.359  0.9959
10 - 0,1 == 0     -5.000     5.574  -0.897  0.8916
100 - 0,1 == 0    -9.000     5.574  -1.615  0.5209
 10 - 1 == 0      -3.000     5.574  -0.538  0.9810
100 - 1 == 0      -7.000     5.574  -1.256  0.7216
100 - 10 == 0     -4.000     5.574  -0.718  0.9476
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

21. ábra: Tukey-teszt eredménye a gombaközösségek koncentrációnkénti mennyiségeinek összehasonlításában.

A kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva a várt tendenciát mutatva a 0,1 ppm-es koncentráció tér el a legkevésbé. A növekvő kadmium koncentrációk fokozatosan csökkenő tendenciát mutatnak a telepszámokat illetően, de szignifikáns különbség csak a kontroll és a 100 ppm-es koncentrációnál figyelhető meg ($p = 0,0417$). Ezen kívül a különböző

koncentrációkban fellelhető telepszámok mennyiségei szignifikánsan nem különböznek egymástól.

4.2.2 Gombaközösségek rendszertani diverzitása

A Cd^{2+} ionokkal végzett talajterhelési kísérletek eredményeiben a gombaközösségeknek a fajok szerinti megoszlását a 0,1 ppm koncentráció esetében 8, az 1 ppm koncentráció esetén 7, a 10 ppm koncentráció esetében 10, a 100 ppm koncentráció esetében 6 faj gyakoriságával jellemezzük, míg a kontroll talajban 12 fajt találtunk (3. táblázat). 0,1 ppm szintű kadmium terhelésnél a *Penicillium albidum*, 1 ppm-nél a *Penicillium brevi-compactum*, 10 és 100 ppm-nél a *Penicillium multicolor* bizonyult a leggyakoribb fajnak.

3. táblázat: Gombaközösségek gyakorisága Cd^{2+} különböző koncentrációival szennyezett talajban mikrokozmosz kísérletben.

Faj	K	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
<i>Acremonium furcatum</i>				6,3 %	
<i>Acremonium inflatum</i>		9,5 %			
<i>Ascorrhizoctonia sp.</i>				6,3 %	
<i>Aspergillus terreus</i>	3,2 %				
<i>Basidiomycota</i>				6,3 %	8,3 %
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3,2 %				
<i>Fusarium solani</i>	3,2 %				
<i>Gliomastix sp.</i>	3,2 %				
<i>Isaria sp.</i>	9,7 %		5,3 %		
<i>Oidiodendron sp.</i>				12,5 %	
<i>Paecilomyces variotii</i>		4,8 %			
<i>Papulaspora sp.</i>	3,2 %	4,8 %	10,5 %		
<i>Penicillium albidum</i>	16,1 %	28,6 %	5,3 %		25,0 %
<i>Penicillium brevi-compactum</i>		14,3 %	42,1 %	6,3 %	8,3 %
<i>Penicillium canescens</i>					8,3 %
<i>Penicillium cyclopium</i>	3,2 %			6,3 %	
<i>Penicillium multicolor</i>	38,7 %	19,0 %	15,8 %	31,3 %	41,7 %
<i>Penicillium nigricans</i>	9,7 %	9,5 %			
<i>Penicillium paraherquei</i>				6,3 %	
<i>Penicillium spinulosum</i>			15,8 %	12,5 %	8,3 %
<i>Rhizopus microsporus</i>		9,5 %	5,3 %		
<i>Sclerotium sp.</i>	3,2 %				
<i>Trichoderma sp.</i>				6,3 %	
<i>Verticillium catenulatum</i>	3,2 %				
Telepszám (CFU/g x 10⁴)	31	21	19	16	12

A Cd^{2+} ionok különböző koncentrációit tartalmazó mikrokozmosz gombaközösségeinek rendszertani diverzitásai meglepő módon csak kis mértékben tértek el egymástól (4. táblázat). 0,1 ppm szintű kadmium terhelésnél 8 faj mellett a Shannon-Weaver féle diverzitás indexet 1,91-nek, 1 ppm –nél 7 faj mellett 1,65-nek, 10 ppm-nél 10 faj mellett

2,10-nek, 100 ppm-nél 6 faj mellett 1,54-nek, míg a kezeletlen kontroll mikrokozmosz talajában 12 faj mellett 2,00-nak számítottuk.

4. táblázat: Cd^{2+} ionnal terhelt talaj gombaközösségeinek rendszertani diverzitása mikrokozmosz kísérletben.

	K	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Shannon-Weaver diverzitás index	2	1,91	1,65	2,1	1,54
Gombaelemek száma (CFU/g)	31×10^4	21×10^4	19×10^4	16×10^4	12×10^4
Fajok száma	12	8	7	10	6

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Mikrokozmosz kísérletben mind a Cu^{2+} ionoknak, mind a Cd^{2+} ionoknak a talajszennyezettségi határértékhez reálisan viszonyítható koncentrációi a talaj gombaközösségeire – valamely kémiai, vagy biológiai tényező hatására – csak tompított mértékben hatnak. Utóbbi fékezett hatás egyaránt jelentkezett a gombapropagulumok számában és a közösség rendszertani diverzitásában is.

Az eredmények értékeléséhez közvetlenül kapcsolódó javaslataink:

- A toxikus vegyületek hatására a talajok gombaközösségeiben bekövetkező változások vizsgálata során a fajszám kívánatos növelése érdekében meg kell emelni az egyedszámot (a tenyésztési lépésben a párhuzamosok számát) a diverzitás változásának pontosításáért.
- A gombaközösségek toxikus vegyületek hatására bekövetkező változásának dinamikáját a jelenségek hátterét adekvátabb módon jelző közösségi DNS-t vizsgáló technikák valamelyikével, pl.: T-RFLP-vel is követni kellene, illetve meg kellene erősíteni.
- A mikrokozmoszok talajainak biológiai, jelen esetben tenyésztési mikrobiológiai vizsgálatát folyamatosan, de legalább a kísérlet végén, ki kellene egészíteni a talaj vizes kivonatának kémiai analitikai vizsgálatával annak érdekében, hogy a toxikus vegyületeknek a gombasejtekkel közvetlenül érintkező koncentrációiról releváns információval rendelkezessünk.
- Szelektív tenyésztéssel, mérgezett agar alkalmazásával kellene megerősíteni azt a feltételezést, hogy a gombapropagulumok számának a toxikus vegyületek hatására is gyakran elmaradó növekedése mögött a rezisztens törzsek, illetve fajok felszaporodásának jelensége áll.

- Utóbbi javaslathoz kapcsolódik az a plusz feladat, hogy – toxikus szerves vegyületek esetében – meg kell győződni, hogy nem biodegradáció áll-e a gombafaj, vagy törzs rezisztenciájának hátterében.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A bioszféra egyensúlyához nagymértékben hozzájáruló talajbiomassza a toxikus vegyületeknek a talajba kerülésével igen súlyosan károsodik. A talajbiomassza 35-40%-át alkotó gombaközösségek a talajban zajló anyag és energiaforgalomhoz a talajélethez nélkülözhetetlen hifális lebontó tevékenységükkel a tömegarányuknál is nagyobb mértékben járulnak hozzá. Azáltal, hogy nitrogénforrásként elsősorban szervesetlen vegyületeket használnak a talajból induló tápláléklánc legnagyobb arányú primer fehérjeforrását képezik. A talajgombáknak toxikus vegyületekkel szembeni érzékenysége a talajvédelmi vizsgálatok egyik legfontosabb szempontja kell, hogy legyen. Az ismeretek jelentős köre kisparcellás szabadföldi kísérletekből származik, ahol a növényvel való kapcsolatból adódóan az eredmények életszerű termesztési következtetéseket is lehetővé tesznek. Az ismeretek másik köre abból származik, hogy a toxikus vegyületeknek bármely gombatörzs növekedésére gyakorolt in vitro hatása egzakt módszerekkel vizsgálható, és ilyen jellegű eredmény viszonylag nagy számban található a szakirodalomban.

Saját, mikorkozmosz kísérletekkel kivitelezett vizsgálatainkban toxikus vegyületeknek a talajgombák közösségeire gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Modellként két, egymástól eltérő toxicitási fokkal rendelkező nehézfém iont alkalmaztunk, mindkettőt a talajszennyezettségi határértékhez jól viszonyítható dózisokban. A gombaközösségek mennyiségi paramétereit kvantitatív tenyésztéssel nyertük, a taxonómiai diverzitásokhoz szükséges fajszintű identifikálásukat az izolátumok fenotípusos tulajdonságai és genomjaiknak szerkezete alapján végeztük.

A Cu^{2+} ionok legalacsonyabb dózisa hormézist, legnagyobb, 7500 ppm koncentrációja pedig a gombapropagulumok 28%-os csökkenését okozta. A Cu^{2+} ionok koncentrációit tartalmazó mikrokozmoszok gombaközösségeinek rendszertani diverzitásai csak kis mértékben tértek el egymástól, így például 75 ppm-nél a Shannon-Weaver féle diverzitás indexet 9 faj mellett 2,08-nak, 7500 ppm-nél, szintén 9 faj mellett 2,03-nak számítottuk,

Az alkalmazott Ramann-féle barna erdőtalajba bevitt Cd^{2+} ionok különböző dózisainak hatására a tenyészhető gombapropagulumok mennyisége valamennyi esetben kisebb volt, mint a kezeletlen kontroll mikrokozmosz talajában. Ugyanakkor a talajközegben a mikrobióta

bizonyos mértékű túlélését is tapasztalhattuk. A Cd^{2+} ionok különböző koncentrációit tartalmazó mikrokozmosz gombaközösségeinek rendszertani diverzitásai szintén csak kis mértékben tértek el egymástól, így például 1 ppm-nél a Shannon - Weaver féle diverzitás indexet 7 faj mellett 1,65-nek, 100 ppm-nél pedig 6 faj mellett 1,54-nek tudtuk számítani.

Feltételezhető, hogy az oldattal bevitt nehézfém ionok a talaj kolloidjaihoz szorosan kötődnek, és a gombasejtek – a többi élőlényhez hasonlóan – csupán egy, a megkötöttel egyensúlyt tartó, alacsonyabb koncentrációjú nehézfém oldattal érintkeznek közvetlenül. A jelenséghez hozzájárulhat továbbá, hogy a gombák igen aktív, intracelluláris fém-megkötő fehérjéik az úgynevezett metallothioneinek segítségével csökkenteni tudják a toxikus fémek károsító hatásait.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Sebők Flórának, aki folyamatos és lelkiismeretes támogatásával, segítőkészségével, valamint a vizsgálatokban nyújtott segítségével hozzájárult ahhoz, hogy ez a diplomadolgozat elkészülhessen. Mindvégig rendkívüli türelemmel és számtalan útmutató tanáccsal támogatta munkám létrejöttét.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani dr. Dobolyi Csabának, aki fontos észrevételeivel, tanácsaival és meglátásaival szintén előrelendítette dolgozatom elkészülését. Külön köszönöm a fajok azonosítása során nyújtott fáradhatatlan segítségét.

Köszönöm továbbá Edőcs Brigittának, aki nagy segítséget nyújtott a diplomadolgozatommal kapcsolatos labormunkákban. Rengeteg hasznos fortélyt tanulhattam el, melyeket a későbbiekben is hasznosítani tudok.

Nem utolsó sorban pedig szeretném megköszönni csoporttársamnak, Kérész Györgynek a labormunkákban, valamint a dolgozatban nyújtott nagyfokú segítségét és hasznos észrevételeit. Külön köszönöm a statisztikában nyújtott tanácsait, illetve segítségét.

8 IRODALOMJEGYZÉK:

ADRIANO, D.C. (1986): Trace elements in the terrestrial environment. Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg-Tokyo, 533 p.

AGHABABAEI, F., RAIESI, F., HOSSEINPUR, A. (2014): The combined effect of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on microbial biomass and enzyme activities in a calcareous soil spiked with cadmium. *Applied Soil Ecology* 75: 33

ALLOWAY, B.J., STEINNES, E. (1997): Anthropogenic additions of cadmium to soil: a review. In: Iskandar, I.K., Hardy, S.E., Chang, A.C., Pierzynski, G.M. (Eds.), *Proceedings of Extended Abstracts from the Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Clark Kerr Camps, Berkeley, pp. 663–664.

AMIR, H., PINEAU, R. (1998): Effects of metals on the germination and growth of fungal isolates from New Caledonian ultramafic soils, *Soil Biology and Biochemistry* 30: 2043–2054.

ATLAS, R.M. (1984): Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: Klug, M.J., Reddy, C.A. (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society for Microbiology, Washington, pp. 540–545.

BOON, G.T., BOUWMAN, L.A., BLOEM, J., ROMKENS, P.F.A.M. (1998): Effects of a copper tolerant grass (*Agrostis capillaris*) on the ecosystem of a copper-contaminated arable soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1964–1971.

BRANDON, E. F. A., BAARS, A. J., TE BIESEBEEK, J. D., OOMEN, A. G., BAKKER, M. I., DE HEER, C. (2012): Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children, *World Mycotoxin* 5: p. 391

BROOKES, P.C. (1995): The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals, *Biology and fertility of Soils* 19: 269–279.

CAO, L., SHEN, G., LU, Y. (2008): Combined effects of heavy metal and polycyclic aromatic hydrocarbon on soil microorganism communities. *Environmental Geology* 54: 1531–1536.

CHAKRABORTY, S., MUKHERJEE, A., KHUDA-BUKHSH, A. R., DAS, T. K. (2014): Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistance *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106: 46 p.

CHU, G., STEVEN, A., WAKELIN, S. A., CONDROND, L., STEWART, A. (2010): Effect of soil copper on the response of soil fungal communities to the addition of plant residues, *Pedobiologia* 53: 353

CSATHÓ P. (1994A): A környezet nehézfém szennyezettsége és az agrártermelés, *Tematikus szakirodalmi szemle, MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest*, 153-154

CSATHÓ P. (1994B): Nehézfém- és egyéb toxikus elem-forgalom a talaj-növény rendszerben. *Agrokémiai és Talajtani* 43: 371-398 in Uri Zs. E.(2007): Települési szennyvíziszapok természetű növényekre és talajra gyakorolt hatásának vizsgálata. Doktori (ph.D) értekezés, DE-MÉK, Debrecen, 25.

DIX, N.J., WEBSTER, J. (1995): Fungal ecology, Chapman & Hall, London, in Preface.

EKELUND, F., OLSSON, S., JOHANSEN, A. (2003): Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations, *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1514

FASSATIOVÁ, O. (1984): Penészek és fonalgombák az alkalmazott mikrobiológiában, Mezőgazdasági kiadó, Budapest; 7,9-11,36

FISHER, M. C., HENK, D. A., BRIGGS, C. J., BROWNSTEIN, J. S., MADOFF, L. C., MCCRAW, S. L., GURR, S. J. (2012): emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health, *Nature* 484: pp 186-194

FOMINA, M., BURFORD, E.P., GAD, G.M. (2005): Toxic metals and fungal communities. In: Dighton, J., White, J. F., Oudemans, P. (eds), *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 733–758.

FRISVAD, J. C., SMEDSGRAAD, J., LARSEN, T. O., SAMSON, R. A. (2004): Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*, *Studies in Mycology* 49: pp. 201-242

GADD, G.M. (1993): Interactions of fungi with toxic metals, *New Phytologist* 124: 25–60.

GÄUMANN, E. (1949): Die Pilze: Grundzüge Ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie, Verlag Birkhäuser, Basel, 67

GILLER, K.E., BEARE, M.H., LAVELLE, P., IZAC, A.-M.N., SWIFT, M.J. (1997): Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function, *Applied Soil Ecology* 6: 3–16.

HAWKSWORTH, D. L. (2001): The magnitude of fungal diversity: 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422 pp.

HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I., MONTE, E. (2012): Plant-benefical effect of *Trichoderma* and of its genes, *Microbiology-SGM*, 158: pp.17-25

HOUBRAKEN, J., SAMSON, R. A. (2011): Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichodermaceae* into three families, *Studies in Mycology* 70: p.1

HUGHES, M.N., POOLE, R.K. (1989): Metals and Microorganisms. Chapman and Hall Inc, New York., 1-412 p

HUSAR, R. B. (1994): Ecosystem and the biosphere: Metaphors for Human-Induced MAterial Flows, Chapter in Ayres, R.U., Simonis, U. E.. *Industrial Metabolism: Restructuring for Sustainable Development*, (eds.), United Nations University Press., 2 p.

JAEGER, K. E., EGGERT, T. (2002): Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13: pp.390-397

JAKUCS E. (1999): A mikológia alapjai, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 13-14, 157, 162-164, 189, 190, 197, 199

JAKUCS E.,VAJNA L. (2003): Mikológia, Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest,41, 43, 44, 45, 64, 240, 241, 244, 245

JOSEPOVITS GY. (1987): Fungitoxikus anyagok és hatásmódjuk in: Vajna L. (1987): Növénypatogén gombák. Mezőgazdasági kiadó, Budapest, 104 p.

KANDELER, E., LÜFTENEGGER, G., SCHWARZ, S. (1992): Soil microbial processes and testacea (Protozoa) as indicators of heavy-metal pollution. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 155, 319–322.

KEVEI F., KUCSERA J., MANCZINGER L., VÁGVÖLGYI CS. (1999A): Mikrobiológia II. Jate, Szeged, 53, 56-61.

KEVEI F., KUCSERA J., VARGA J., VÁGVÖLGYI CS. (1999B): Fejezetek a mikológiából. JATE Press, Szeged, 26, 33, 87-88 p

KEVEI F., KUCSERA J. (1998): Mikrobiológia 1., Jatepress, Szeged, 204, 223-236

KHAN, M., SCULLION, J. (2002): Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities, *Applied Soil Ecology* 20: 145–155.

KREDICS L., CZIFRA D., URBÁN P., MANCZINGER L., VÁGVÖLGYI CS., HATVANI L. (2011): A termesztett csiperke zöldpenészes fertőzése, *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 50(2):199

KUNITO, T., SENOO, K., NAGAOKA, K., OYAIZU, H., MATSUMOTO, S. (1997): Distribution of Cu-resistant and non-resistant bacteria in several Cu-contaminated soils in Japan: usefulness of the tolerance level as an index of Cu contamination in soil. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61: 1190–1193.

LEHEL J., LACZAY P. (2011): Toxikológia (Az ökotoxikológus Msc szak hallgatói számára), Szent István Egyetemi Kiadó, Budapest, 268p.

LINDSAY, W.L. (1979): Chemical equilibria in soils. Wiley Interscience Publications, New York in Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., Naidu, R. (2003): Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review, *Advances in Environmental Research* 8: p. 121

MARÁZ A. (2001): Eukarióta mikroorganizmusok in Biró S., Hornok L., Kevei F., Kucsera J., Maráz A., Pesti M., Szűcs Gy., Vágvölgyi Cs., (eds.): Általános Mikrobiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs 147. p.

MONIFIL, V. O., CASAS-FLORES, S. (2014): Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications on agriculture (Chapter 32), *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, p. 429

MOZAFAR, A., RUH, R., KLINGEL, P., GAMPER, H., EGLI, S., FROSSARD, E. (2002): Effect of heavy metal contaminated shooting range soils on mycorrhizal colonization of roots and metal uptake by leek, *Environmental Monitoring and Assessment* 79: 177.

NAIDU, R., MEGHARAJ, M., KRISHNAMURTI, G.S.R., VIG, K., KOOKANA, R.S. (2000): Bioavailability, definition and analytical techniques for assessment and remediation of contaminated (inorganic and organic) soils. In: Johnston, C.D., (Ed.), *Contaminated site remediation: From Source Zones to Ecosystems. Proceedings of the 2000 Contaminated Site Remediation Conference*, Melbourne, Australia, 283–290.

PANKHURST, C.E., HAWKE, B.G., McDONALD, H.J., KIRKBY, C.A., BUCKERFIELD, J.C., MICHELSEN, P., O'BRIEN, K.A., GUPTA, V.V.S.R., DOUBE, B.M. (1995): Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental agricultura* 35(7), 1015–1028.

PELIKAN, W. (1981): Sieben Metalle, Verlag am Goetheanum, 107-108

- PENNANEN, T., FROSTEGARD, A., FRITZE, H., BAATH, E. (1996):** Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests, *Applied and Environmental Microbiology* 62: 420–428.
- PETERSEN, A.T., LESER, T.D., MARSH, T.L., NYBROE, O. (2003):** Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soils analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbial Ecology* 46: 53–62
- PUEL, O., GALTIER, P., OSWALD, I. P. (2010):** Biosynthesis and toxicological effect of patulin, *Toxins* 2: pp. 613-614
- RAMSAY, L.M., SAYER, J.A., GADD, M.D. (1999):** Stress responses of fungal colonies towards metals. In: Gow, N.A.R., Robson, G.D., Gadd, G.M.(eds), *The Fungal Colony*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 178–181.
- RAPER, K. B., THOM, C. (1949):** A manual of the Penicillia. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 27-19,42, 48-65
- RIFAI, M. A. (1969):** A revision of the genus *Trichoderma*, *Mycological Papers* 116: 8, 10-11
- ROD, J., HLUCHY, M., ZAVADIL, K., PRÁŠIL, J., SOMSSICH, I., ZACHARDA, M. (2005):** A zöldségfélék betegségei és kártevői. *Biocont Laboratory Kft., Brno*. 380. p.
- SANTORUFO, L., VAN GESTEL, C. A. M., MAISTO, G. (2012):** Ecotoxicological assessment of metal-polluted urban soils using bioassays with three soil invertebrates, *Chemosphere* 88: pp. 418–425
- SCHOBERLE, T.J., NGUYEN-COLEMAN, C. K., MAY, G. S. (2013):** Plasmids for increased efficiency of vector construction and genetic engineering in filamentous fungi, *Fungal Genetics and Biology*. 58: 1p.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. (2001):** Production, purification, characterization and applications of lipase, *Biotechnology Advances*, 19: pp.627
- SILVA, R. N., STEINDORFF, A. S., MONTEIRO, V. N. (2014):** Metabolic diversity of *Trichoderma* (Chapter 27), *biotechnology and Biology of trichoderma*, 363 p
- SZABÓ I. M. (1986):** Az általános talajtan biológiai alapjai, *Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*, 92
- SZABÓ Z. – HORVÁTH A. (1983):** A kadmium talajhigiénés normamegállapítására vonatkozó mikrobiológiai vizsgálatok, *Agrokémia és talajtan* Tom. 32. No. 3-4.: 507-508
- SZÉKÁCS A. (2006):** A növényvédő szerek felosztása és hatásmechanizmusa in Darvas B., Székács A. (eds): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*, l'Harmattan, Budapest, 82,83
- TAKÁCS T., BIRÓ B., VÖRÖS I. (2000):** Kadmium, nikkel és cink hatása az arbuszkuláris mikorrhiza gombák faji diverzitására, *Agrokémia és talajtan* Tom. 49. No. 3-4: 467, 473
- TAKÓ M. (2011):** Járomspórás gombák béta-glükózidáz enzimeinek vizsgálata: Az enzim tisztítása és jellemzése, a kódoló gének molekuláris és funkcionális elemzése, *Doktori (Ph.D) értekezés, SZTE-TTIK, Szeged*. 19,59
- URÁK I. (2007):** Általános ökológia, Egyetemi jegyzet, Kolozsvár, 58 p.
- VAJNA L. (1987):** Növénypatogén gombák. *Mezőgazdasági kiadó, Budapest*, 250-251 p.

VAN DER KLEI, I.J., VEENHUIS M. (2006): Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 1364 p.

VETTER J. (2010A): A gombákról általában- helyük a természetben in Györfi J. (Eds.) *Gombabiológia, gombatermesztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 16-17.

VETTER J. (2010B): A gombák biológiája in Györfi J. (Eds.) *Gombabiológia, gombatermesztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest 45-47

VIG, K., MEGHARAJ, M., SETHUNATHAN, N., NAIDU, R. (2003): Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review, *Advances in Environmental Research* 8: p. 122, 130

VON ARX, J. A. (1987): *Plant Pathogenic Fungi*, Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 231

WANG, X. D., HUA, L., MA, Y. B. (2012): A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for barley (*Hordeum vulgare*): influence of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH, *Chemosphere* 89: pp. 89–95

WARDLE, D.A., GILLER, K.E., BARKER, G.M. (1999): The regulation and functional significance of soil biodiversity in agro-ecosystems. In: Wood, D., Lenne, J.M. (Eds.). *Agrobiodiversity: Characterisation, Utilisation and Management*. CABI, London, pp. 87–121

WINDING, A., HUND-RINKE, K., RUTGERS, M. (2005): The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 231

ZAFAR, S., AQIL, F., AHMAD, I. (2007): Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil [J]. *Bioresource Technology*, 98 (9): 2557–2561.

ZENG, X. X., TAGN, J. X., JIANG, P., LIU, H. W., DAI, Z. M., LIU, X. D. (2010): Isolation, characterization, and extraction of mer gene of Hg²⁺ resisting strain D2. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 20 (3): 507–512.

ZENG, X-X., CHAI, L-Y., TANG, J-X., LIU X-D., YANG, Z-H. (2013): Taxonomy characterization and cadmium biosorption of fungus strain. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 23: 2759 p

ZYCHA, H., SIEPMANN, R. (1969): *MUCORALES. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe*, D-3301 Lehre Verlag von J. Cramer. Germany. 3p

Internetes hivatkozások

http1 (2014.07.29): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153212/>

http2 (2014.08.21): <http://www.pubfacts.com/detail/25093270/Morphology-and-enzyme-production-of-Trichoderma-reesei-Rut-C-30-are-affected-by-the-physical-and-str>

http3 (2014.07.29):

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_08_Novenyvedelem/ch05s02.html

http 4 (2014.08.10):

http://www.omikk.bme.hu/collections/mgi_fulltext/kornyezet/2003/02/0204.pdf

http 5 (2014.07.10):

<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/novenyianyagcsere/ch12s02.html>

http 6 (2014.08.10): <http://fokusz.info/index.php?cid=1409458913&sid=1192104271>

http 7 (2014.09.28): <http://www.kti.szie.hu/termeszetvedelem/centeri/doksik/ktm879K.pdf>

http 8 (2014.09.30): <http://www.qiagen.com>

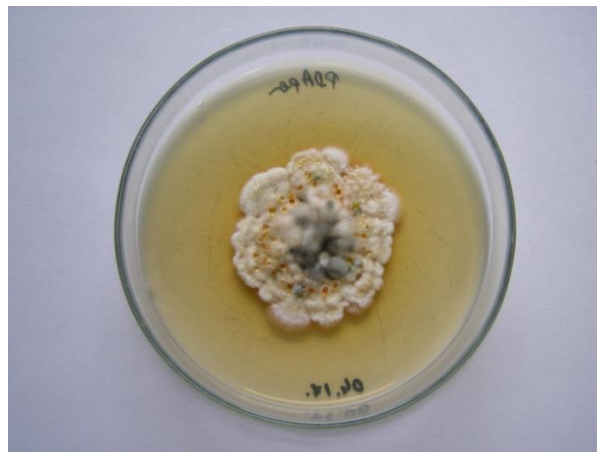
http 9 (2014.09.10.): <http://ecology.science.unideb.hu/files/02-Nehezfemek.pdf>

9 MELLÉKLETEK

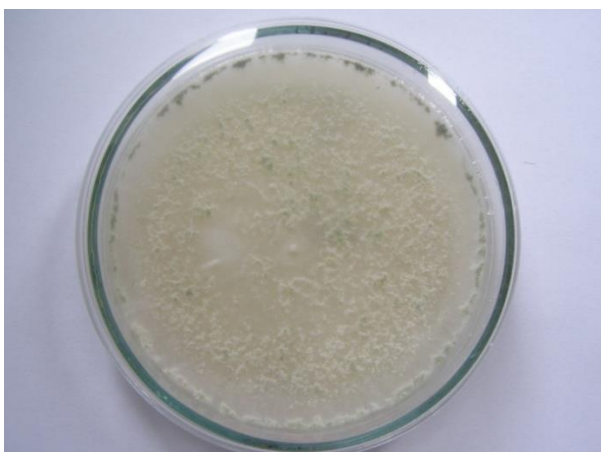
1. melléklet: A vizsgálat során általunk izolált néhány gombafaj fotója (saját felvételek)



Mucor hiemalis



Penicillium variabile



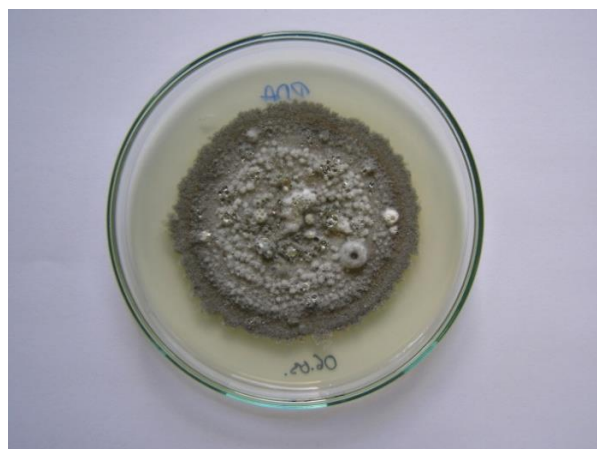
Sclerotinia sp.



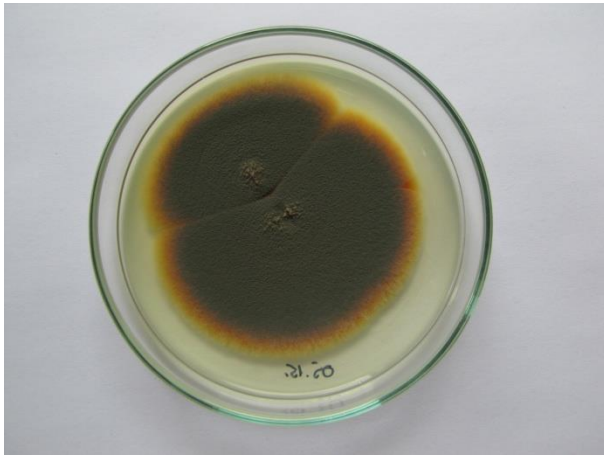
Penicillium notatum



Paecilomyces sp.



Penicillium spinulosum



Penicillium frequentans



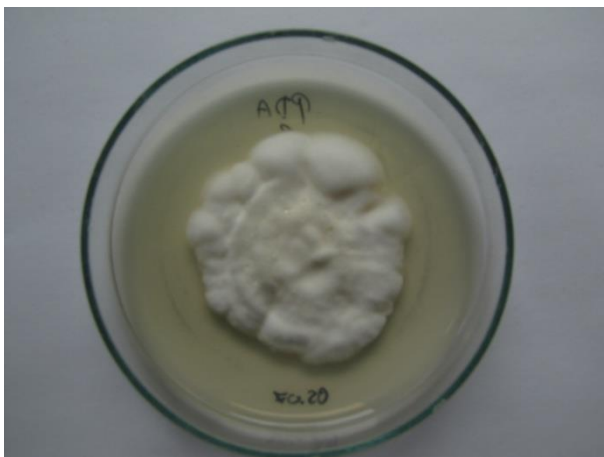
Trichoderma harzianum



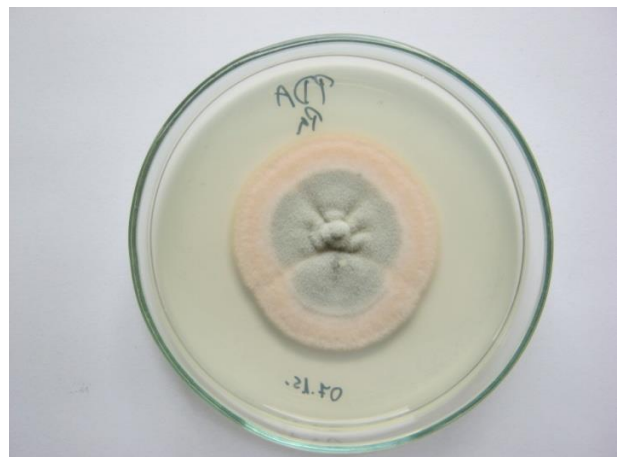
Trichoderma viride



Trichoderma viride



Fusarium sp.



Acremonium strictum



Verticillium nigrescens



Melanospora fallax



Penicillium lapidosum



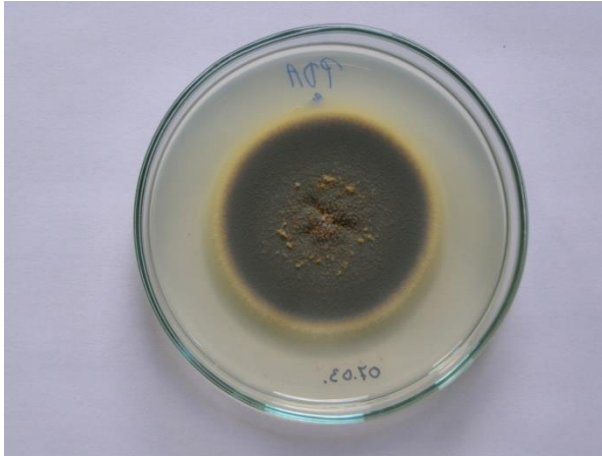
Penicillium spinulosum



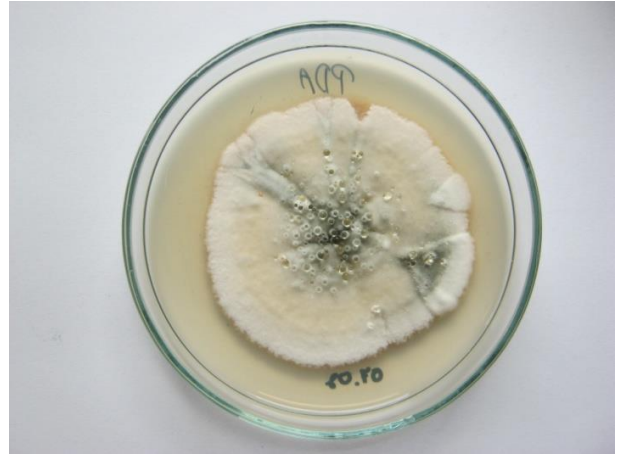
Penicillium cyclopium



Ascohrizoctonia sp.



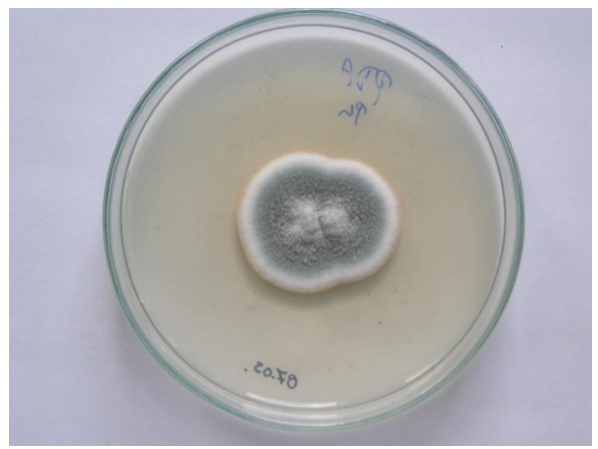
Penicillium canescens



Penicillium multicolor



Penicillium brevi-compactum



Paecilomyces variotii



Penicillium brevi-compactum



Acremonium furcatum



Isaria sp.



Penicillium nigricans



Gliomastix sp.



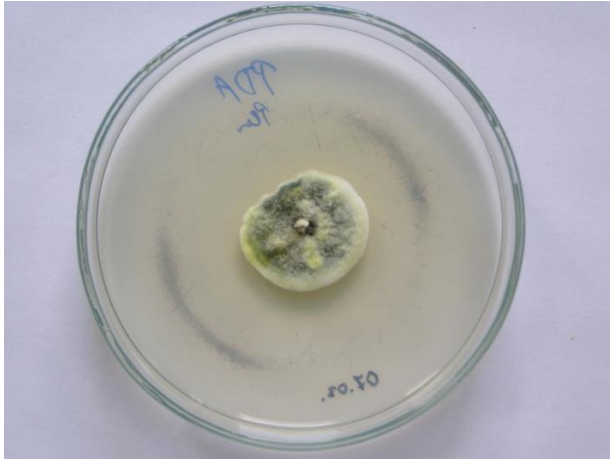
Verticillium catenulatum



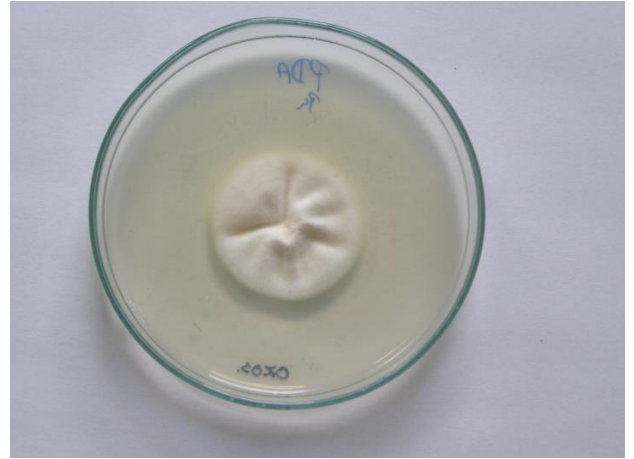
Penicillium nigricans



Penicillium albidum



Penicillium paraherquei



Fusarium solani



Penicillium cyclopium

NYILATKOZAT

Alulírott Kaszap Adrien, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Ökotoxikológus MSc. nappali tagozatos végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a diplomadolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet / Szak honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott diplomadolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásban, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A szakdolgozat/diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 201hó.....nap

.....
hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom/nem javaslom.

A diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 201hó.....nap

.....
témavezető aláírása