



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

**TERMOFIL GOMBÁK RÉZZEL, KADMIUMMAL ÉS GLIFOZÁTTAL SZEMBENI
ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA**

Készítette:
Kérész György Sándor

Belső témavezető:
Sebők Flóra

tanszéki mérnök

Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

Gödöllő
2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. Általánosan a gombákról	4
2.1.1. Fonalas gombák növekedése szilárd tápközegen	4
2.2. Termofil gombák	4
2.2.1. A termofil gombák rendszertani és ökológiai áttekintése	4
2.2.2. <i>Thermomyces lanuginosus</i> Tsiklinsky	7
2.2.3. <i>Scytalidium thermophilum</i> (Cooney & R. Emers.) Austwick	9
2.2.4. <i>Rasamsonia emersonii</i> (Stolk) Houbraken & Frisvad, Antonie van Leeuwenhoek (2011).....	10
2.2.5. <i>Myceliophthora thermophila</i> (Apinis) Oorschot.....	11
2.3. A réz hatása az élő környezetre	13
2.4. A kadmium hatása az élő környezetre	13
2.5. Glifozát hatása az élő szervezetre	14
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	16
3.1. Előkísérletekhez használt gombafajok és táptalajok.....	16
3.2. Kiválasztott gombafajok	16
3.3. Az alkalmazott táptalaj	17
3.4. Táptalaj mesterséges szennyezése	18
3.4.1. Réz.....	18
3.4.2. Kadmium.....	18
3.4.3. Glifozát.....	18
3.5. Gomba kioltása tápközegre.....	19
3.6. Mérések.....	19
3.6.1. Standard mérés	19
3.6.2. Scanneléses módszer	20
3.7. Számolás	20
3.7.1. Statisztikai elemzés	21
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	22
4.1. Táptalaj és gombafaj kiválasztás eredménye	22
4.2. Réz hatása termofil gombák növekedésére.....	22
4.3. Kadmium hatása termofil gombák növekedésére	28

4.4.	Glifozát hatása termofil gombák növekedésére	35
5.	KÖVETKEZTETÉSEK	42
5.1.	Törzsek kiválasztása érzékenységi screening vizsgálathoz	42
5.2.	Termofil gombák érzékenysége Cu^{2+} ionokkal szemben	43
5.3.	Termofil gombák érzékenysége Cd^{2+} ionokkal szemben	44
5.4.	Termofil gombák érzékenysége glifozáttal szemben.....	45
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	46
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	48
8.	IRODALOMJEGYZÉK:.....	49

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A nehézfémekből (leggyakoribban: higany, kadmium, ólom) a Földön végzett ipari tevékenységek során a természetes folyamatok általi mennyiségnél jóval több mobilizálódik az antropogén hatásokra, amelyek környezetünket szennyezik.

Sokféle mikroorganizmusról kiderült, hogy le tudja győzni a kihívásokat. A termofilek, az úgynevezett hőkedvelő organizmusok, eltűrik a magas hőmérsékleti viszonyokat és általában igénylik a magasabb hőmérsékletű környezetet a növekedésükhöz és túlélésükhöz. A termofil gombák többnyire olyan területeken találhatók meg, ahol önhevülés következik be a szerves anyag bomlása, bontása során. Napjainkban rengeteg vegyület, szennyezőanyag jut ki a környezetbe, melyeknek csak egy része kerül vizsgálat alá forgalomba kerülése előtt, esetleg környezetbe jutása során. Számos tesztszervezetet használunk az engedélyeztetési eljárások során, és a szennyezett területek feltárásakor egyaránt. A jó tesztszervezet megválasztása rengeteg kihívást jelent a kutatók számára. Fontos, hogy etikailag elfogadott legyen, gyorsasága és pontossága (érzékenysége) miatt időt, energiát spóroljon meg az adott intézménynek, kutatócsoportnak. Alacsonyabb rendű szervezetek, mint tesztalanyok használatakor az anyagi ráfordítások is csökkenhetnek, ugyanis a gyorsaságuk miatt könnyen ismételhetőek, egyszerű a kezelhetőségük, olcsó a fenntartásuk. Kiértékelhetőség tekintetében olyan mérhető tulajdonságokkal kell rendelkezniük, melyekből könnyen számíthatók effektív koncentrációk és gátlási értékek, vagy egyéb más érték mellyel egy adott környezetet, anyagot, vegyületet, talaj, komposzt, hulladék szennyezettségére lehet utalni, rámutatni, kimutatni.

Meg kívántuk vizsgálni a termofil gombák toxikus vegyületekre való érzékenységük szempontjából való heterogenitását. Szervetlen és szerves toxikus vegyületek vonatkozásában van-e köztük telepnövekedési eltérés, milyen az érzékenységük szintje ismert toxikus vegyületekkel szemben. Az EC_{50} értékük hogyan viszonyul a rendeletben szabályozott talajszennyezettségi határértékekhez, esetleg alkalmazható-e valamelyik faj telepnövekedése hulladékok veszélyességének tesztelésére, növelhető-e az illető törzs érzékenysége módszertani változtatásokkal. A vizsgálatainkat ezekre a célokra irányítva végeztük.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Általánosan a gombákról

A gombák eukarióta sejtekből álló, egy- vagy többsejtű, általában telepes felépítésű, fotoszintetizáló pigmenteket nem tartalmazó, kitintartalmú sejtfallal rendelkező élőlények, melyek az élővilág egy önálló országát alkotják. A gombák a szárazföldi körülményekhez alkalmazkodtak. Táplálkozásuk szerint szaprofiták (azaz korhadékokat, az elpusztult élőlények maradványait fogyasztják), mikorrhizások (gyökérkolonizálóak, azaz a gyökerén keresztül szimbiózisban élnek egy gazdanövénnyel), vagy pedig az élő gazdaszervezetet lebontandó szerves anyagként hasznosító paraziták. Szaporodásuk rendszerint a széllel szállítódó spórákkal történik (Jakucs és Vajna 2003). Jelenleg kb. 100 000 fajukat ismerjük, de becslések szerint akár 1,5 millió eddig ismeretlen gombafaj is létezhet (Hawksworth 1991).

2.1.1. Fonalas gombák növekedése szilárd tápközegen

A teleptestüket hosszú gombafonalak (hifák) alkotják, melyeknek szövedékéből jön létre a micélium. A fonalgombák hifájának növekedése az esetek túlnyomó részében egy irányba történik. A hifa csúcsában fokozott a biokémiai, fizikaológiai, és genetikai aktivitás, míg az öregebb hifa részek aktivitása lecsökkenhet, vakuolizálódás után elhalnak (Hornok, 2001). Szilárd tápközeg felületén a fonalas gombatelep meghatározott időn belül lineáris növekedést mutat. Egy időegység alatt, azonos mértékű a gombatelep átmérőjének változása. Ezért a sajátágos növekedés miatt kerek telep alakul ki. A különböző környezeti tényezők gátló és fokozó hatásának vizsgálatára kitűnő alapul szolgálnak ezek a gombák (Jakucs és Vajna 2003).

2.2. Termofil gombák

2.2.1. A termofil gombák rendszertani és ökológiai áttekintése

A hőmérséklet döntő szerepet játszik a mikroorganizmusok növekedésében, szaporodásában és a mikrobaközösségek diverzitásának alakulásában. A gombák egészen

szélsőséges körülmények között (obligát termofiltól a termotoleránson át a pszichrofilig) is képesek életben maradni. Az ismert gombafajok többsége mezofil, a fejlődési optimumuk 5 és 37°C között van; a pszichrofilek pedig ez alatt a hőmérsékleti intervallum alatt növekednek (Dix és Webster, 1995).

A termofil és a termotoleráns gombáknak számos meghatározása született (Apinis 1963; Cooney és Emerson 1964; Craveri és mtsai 1964; Evans 1971; Crisan 1973), melyek mindegyike vagy egyedül a növekedési minimum és maximum hőmérsékleten alapultak, vagy pedig még ezen túl az optimális növekedési feltételeket is figyelembe vették.

A legáltalánosabban elfogadott meghatározását Cooney és Emerson írta le 1964-ben. Az ő definíciójuk szerint termofilnak tekintendő az a faj, melynek növekedési maximuma 50°C-on vagy fölötté, minimuma pedig legalább 20°C-on található, míg a termotoleráns fajok 20°C alatti hőmérsékleten is képesek növekedni.

A gombák magas hőmérsékleten történő tudományos vizsgálatának fejlődése 1899-ig nyúlik vissza. P. Tsiklinsky (1899) kerti talajból burgonyára termofil hifomicétát tenyésztett ki. A gombát a későbbiekben kenyéren tenyésztették 52-53°C-on, amely termofil körülménynek minősül. Tsiklinsky ezt a hifomicétát *Thermomyces lanuginosus*-nak nevezte el. Ezt követően ez a faj egymás után többször került más nemzetségekbe úgymint *Acremoniella*, *Humicola*, *Monotospora* és *Sepedonium* mielőtt véglegesen a *Thermomyces* nemzetségbe sorolták volna. Hasonló jelenség játszódott le a többi termofil gomba leírása során is az 1900-as évek első évtizedeiben. Ugyanennek a folyamatnak az eredménye a szakirodalomban megjelent rendszertanilag nem kellően egyértelmű besorolása ezen csoport néhány tagjának (Cooney és Emerson, 1964).

Annak ellenére, hogy Lindt leírta 1886-ban a *Rhizomucor pusillust* (vagy más nevén *Mucor pusillus*) általánosan egyetértés övezi a tényt, hogy Tsiklinsky (1899) volt az első, aki felhívta a figyelmet a gombák termofil tulajdonságára. A széna öngyulladásának komoly vizsgálata során Miehe 1905-ben végezte el az első széleskörű vizsgálatot egyes gombák termofil tulajdonságával kapcsolatban. A szerző izolált és tanulmányozott a termofil tartományba tartozó gombákat, úgymint a *Thermoascus aurantiacus*-t és a *Malbranchea cinnamomea*-t. Miehe (1907) Ezután 1911-ben Griffon és Maublanc fedezte fel az első *Penicillium* nemzetségbe tartozó fajt a *P. dupontii*-t, a mai nevén *Talaromyces thermophilus*-t. Ez csupán néhány évtizeddel az előtt történt, hogy Latouche 1950-ben leírta az újonnan felfedezett *Chaetomium thermophile*-t. Hasonló felfedezések hatására növekedett meg az érdeklődés ezen gombák iránt, melyet az új aszkomicéta cellulóz bontó természete okozott.

Számos elsőként megjelenő kiadás követte a gombák viselkedésének vizsgálatát mérsékelt éghajlaton (Apinis, 1963; Eggins és Malik, 1969) a trópusi vidékeken (Hedger, 1974; Gochenaur, 1975) és a száraz területeken található talajokban (Mouchacca, 1995). Tansey és Brock 1978-ban újratanulmányozta ezt a területet, adatokat gyűjtött a tárgyhoz kapcsolódó irodalomból, valamint kiterjedten vizsgálta a termofil gombák szerves anyagban gazdag előfordulási helyeit. Szintén ők készítettek tanulmányokat olyan előfordulási helyekről, melyek kevésbé széleskörűen vizsgáltak, valamint olyan területeket, amelyeket érdemesnek tartottak jövőbeni kutatás céljára.

Az első modern taxonómiai, biológiai és ökonómiai szempontból széleskörű ismertetése a termofil gombáknak 1964-ben jelent meg Cooney és Emerson tollából. Ebben tizenegy faj került bemutatásra. Azóta a termofil taxonok száma gyorsan növekszik. 1973-ban Crisan elkészítette a magas hőmérsékleten élő gombák 55 névből álló listáját, mely magába foglalta a termofil és termotoleráns fajokat; Cooney és Emerson ennek csupán a felét értelmezte termofilnak. Crisan újraértelmezte a termofil mikroorganizmusok fogalmát; hangsúlyozta, hogy a tudásunk a magas hőmérsékleten növekedő gombák fiziológiai tulajdonságairól igencsak korlátozott. Később Samson és Tansey (1977-ben) útmutatót készített azokhoz a fajokhoz, amelyek 45°C-on képesek növekedni és spórát képezni; ezen lista nyolc mucorfélét, húsz-húsz aszkomicétát és hifomicétát, illetve két bazidiomicétát tartalmazott. Ezt követően a Tansey és Brock által 1978-ban elkészített lista már 67 fajt foglalt magába melyek 50°C-on vagy afölött növekednek; ezen gombák jó része azonban, nem lett azonosítva faji szinten. A termofil gombák listájának orosz összeállítását Bilay és Zakharchenko készítette el 1987-ben, melyben a leírásokat illusztrációkkal bővítették ki; 38 fajt tartalmazott, de ezek közül néhány nem volt kizárólagosan termofil. Végül Abdullah és Al-Bader (1990) nyomán a mai napig körülbelül 70 olyan fajt írtak le, amely termofilnek vagy termotoleránsnak minősül.

Cooney és Emerson mutatta be az új termofil taxont a monográfiájában. Habár jó néhány taxonómiai besorolásukról, amelyeket másoktól vettek át, gyorsan bebizonyosodott, hogy megtévesztő lehet, de a leírásaik ezekről a csoportokról, nagyrészt helytállóak. A rendszertani besorolásaik elévülése egymást követő tanulmányok készítését váltotta ki. Számos érdekes feljegyzés született az 1960-as években a függőben lévő problémákról, amíg a csoportot ki nem bővítették. Apinis és Chesters 1964-ben írta le a *Dactylomyces crustaceus*-t. Pugh és munkatársai 1964-ben újra létrehozta a *Thermomyces* nemzetséget. Stolk 1965-ben rendezte a *Penicillium dupontii* és a *Thermoascus aurantiacus* rendszertani

helyzetét. A korábbi együttműködés ellenére nem az összes fennálló probléma kapott figyelmet. 1993-ban Straatsma és Samson a Cooney és Emerson által *Humicola*-nak nevezett nemzetségre figyelt fel.

Az összes témához kapcsolódó anyagot összegyűjtötték valamint előadást tartottak az 1993-ban Egham-ban (UK) megtartott Mikrobiális Diverzitás és Ökoszisztéma Funkció kiállítás és vásáron. Az előadás a sivatagi homokban található termofil gombákra összpontosított, mintegy példaként az elhagyott, extrém körülményekre (Mouchacca, 1995). A második előadást az IMC V-n tartották ebben a témában; ennek a címe „Termofil és termotoleráns gombák a Közel Keleten: Biodiverzitás és Rendszertani Újrafelemelkedés” (Mouchacca, 1994); habár az ehhez kapcsolódó jegyzet kiadása késett. Ugyanebben az időben az első vázlata a ma ismert kiadásnak az indiai szubkontinensen megjelent könyvnek a részét képezi. Ezután döntés született a szöveg naprakésszé tételéről, majd az elfogadott utolsó verzió kiadásáról. Jelen dokumentum célja, hogy hangot adjon a nevezéktan és néhány esetben az ismert termofil fajok taxonómiai állapotáról. Először a legnagyobb feladat, hogy túljussunk azon a nehézségen, amellyel akkor találkozhatunk, ha a megjelent adatokat ismertetjük ebben az ökológiai csoportban (Jangid és munkatársai, 2008). Másodszor pedig, hangsúlyozni kell a rendszerezési munka fontosságát és végül felhívni a figyelmet ezen élőlények gazdasági hasznosíthatóságára is (Mouchacca, 1997).

A termofil gombák növekvő gyakorlati jelentősége és a természetes ökoszisztémákban játszott szerepük felismerése, továbbá új izolálási technikák bevezetése taxonómiai ismeretük fejlődését is magával vonta (Mouchacca, 2000; Anastasi és munkatársai, 2005). A *Zygomycetes* termofil fajai vonatkozásában például a Schipper (1978) által a *Rhizomucor* nemzetségbe helyezett *R. tauricus* fajról a genomi tulajdonságok alapján kiderült (Vágvölgyi és munkatársai, 1999), hogy a *R. pusillus* fajba tartozik.

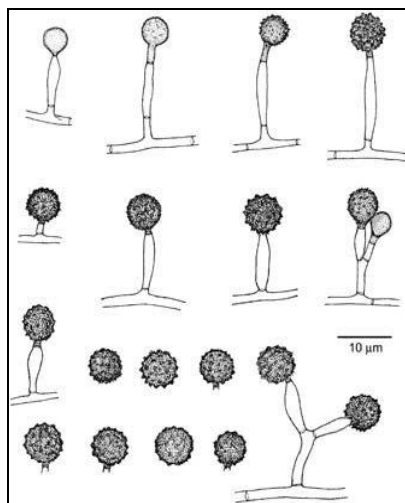
2.2.2. *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky

A *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky optimális növekedési hőmérséklete 45-50°C között van, 30°C alatt és 60°C fok felett nem növekszik. Telepe a legtöbb mikológiai táptalajon gyorsan növekszik, nemezes felszínű, színe kezdetben fehér, később szürkévé, zöldesszürkévé, végül pedig lilás barnává válik és ezzel egy időben az agar szubsztrátuma foltokban sötét rózsaszín vagy bor színű lesz, mivel a diffuzibilis anyagokat választ ki a gomba. Az érett telep homályos sötétbarna vagy fekete.



**1. ábra: *Thermomyces lanuginosus* KM 2449 3 napos telepe Sabouraud agaron
(saját fotó)**

A fiatal telepet mikroszkóp alatt vizsgálva finom, színtelen, 1,5-4 μm átmérőjű hifák tömegeit láthatjuk, melyeken aleuriosporák alakulnak ki. A meglehetősen rövid (10-15 μm) aleuriofóra általában nem elágazók és derékszögben emelkednek ki a gombafonálból. Az aleuriosporák az aleuriofórák csúcsán helyezkednek el. Az éretlen spórák színtelenek és sima falúak, de az érés folyamán sötét barnákká és vastag, exospóra jellemzően ráncossá válnak. Az érett spórák gömb alakúak, szabálytalanok, 6-10 mikron átmérőjűek. Mind az érett és éretlen spórák könnyen elválnak az aleuriofórától (Cooney, Emerson 1964).



2. ábra: *Thermomyces lanuginosus* aleuriokonídium képződése (http1)

2.2.3. *Scytalidium thermophilum* (Cooney & R. Emers.) Austwick

Scytalidium thermophilum szélesebb hőmérsékleti határok között képes növekedni, mint a legtöbb termofil gomba, az alsó érték 23°C, a felső pedig 58°C. Optimális növekedési hőmérséklete 40°C környékén van (Cooney és Emerson 1964). Telepe gyorsan növekszik, kezdetben fehér, vékony szeptált hifákat növeszt, majd az érési folyamat végére számos sötét spórát fejleszt. Ebben a fázisában a telepnek szürke színe van, de hamarosan koromfekete lesz, ahogy a spórák érése végbemegy. Végül az egész micélium átalakul egy sötétbarna, majd fekete spóramasszává, amely úgy tűnik mintha a telepet korom borítaná.



**3. ábra: *Scytalidium thermophilum* KM2490 3 napos telepe Sabouraud agaron
(saját fotó)**

A gomba tipikus érett spórája 8-12,5 µm átmérőjű, gömbölyű, sötét barna, simafelszínű, és gyöngyszerű láncokban állnak össze. Atipikus ovális vagy orsó alakúak is találhatók elszórtan a láncokon a gömb alakú spórák között. Immerziós olajon áteresztett fényen keresztül nézve megfigyelhető az érett spóra a kettős kontúrja meglehetősen vastag fala.



**4. ábra: *Scytalidium thermophilum* spóráképzése, 10x
(saját fotó)**

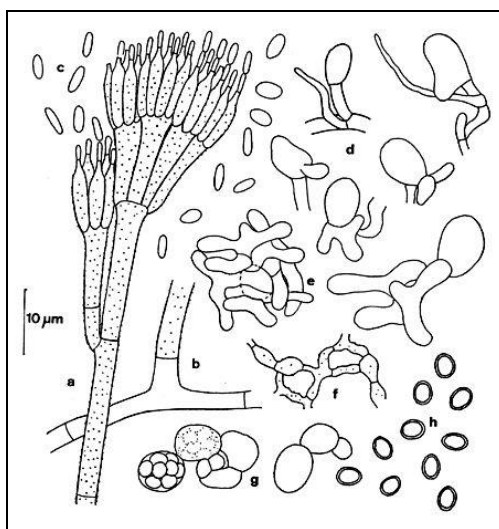
2.2.4. *Rasamsonia emersonii* (Stolk) Houbraken & Frisvad, Antonie van Leeuwenhoek (2011)

A *Rasamsonia emersonii* optimális növekedési hőmérséklete 40-45°C, 26°C alatt és 55°C felett nem növekszik. Maláta-kivonat agaron a fiatal telep bársonyosan pelyhes, fehér, majd sárgás-barna, később, idősebb állapotban drapp színű és a keletkezett konídiumok miatt poros felszínű.



**5. ábra: *Rasamsonia emersonii* KM2443 3 napos telepe Sabouraud agaron
(saját fotó)**

Az aszkusz színe vörösestől a narancs-barnáig terjedhet, alakja gömbölyded, 300 µm átmérőjű. Az aszkuszok 8 darab sima felületű, gömbölyded vagy elliptikus (8-10,5 x 6,5-8 µm), vastag falú aszkospórát tartalmaznak. A konídiofórok közvetlenül az agarból emelkednek ki, rendszeresen elágazóak, 50-150 µm hosszúak és 2,0-3,5 µm szélesek. A konídiumok simák, henger alakúak (3,5-4,5 x 1,5-3,0 µm) (Stolk és mtsai 1972).



6. ábra: *Rasamsonia emersonii* konidiális szerkezete és aszkuszai (<http2>)

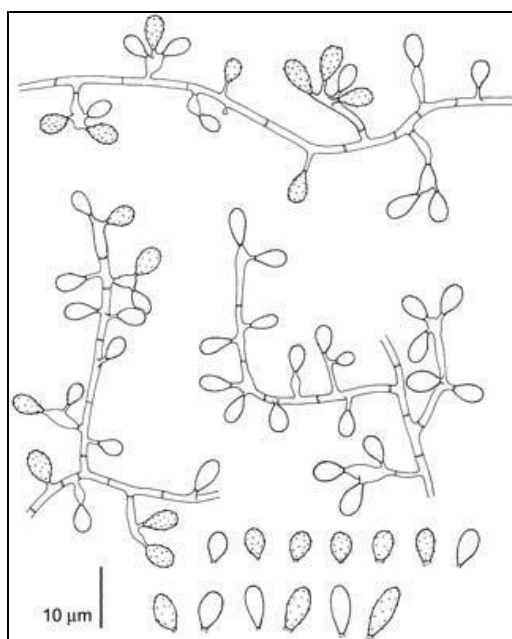
2.2.5. *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot

A *Myceliophthora thermophila* optimális növekedési hőmérséklete 40-50°C között van, 26°C alatt és 55°C fok felett nem növekszik. Telepe burgonyakivonat-glükóz agaron fehér, majd halvány sárgásbarna színű, laza nemezes felszínű, 3 napos kortól igen jól spórázik. Mikroszkópiusan a konídiofórok differenciálatlanok, átlátszóak, sima falúak.



**7. ábra: *Myceliophthora thermophila* KM2300 3 napos telepe Sabouraud agaron
(saját fotó)**

A faj vegetatív hifái szeptáltak, színtelenek, 3,2-4,6 μm átmérőjűek. A konídiumképző rendszer elágazó, hialin hifákból áll, az oldalágakon laterálisan és terminálisan, egyesével képződnek az aleuriokonídiumok. Ezek széles körte alakúak, hialinok, kezdetben durva falúak, majd ahogy öregszenek, a faluk kisimul és megvastagszik. Átmérőjük 4-8 x 2-4 μm (Hessen 1957).



8. ábra: *Myceliophthora thermophila* aleuriokonídium képzése (<http3>)

2.3. A réz hatása az élő környezetre

A réz, mint sok más fém fontos transzportkation. Sejtbe jutása kelátoló vegyületek révén lehetséges. A réz legnagyobb affinitással a nitrogénhez, oxigénhez, foszforhoz, kénhez, mint ligandumokhoz kötődik. A sejten belül ezek koordinációs komplexet alkotnak, oxidációs-redukciós reakciókat katalizál (Szabó 1989). A réz az élő környezetben is aktív résztvevője a redoxireakciói és biológiai oxidációban betöltött szerepe miatt (Greenwood és Earnshaw 1999). A réz kisebb mennyiségben életfontosságú elem, mely részt vesz a hemoglobinképzésben és enzimszisztemek működésében. Dózisa emelkedésével a fiziológiai mennyiség fölött mérgezést idézhet elő. A rézsók egyszeri felvétel során nagyobb mennyiségben viszonylag ritkán alakul ki heveny mérgezés (Lehel és Laczay 2011). A rézsók ismert káros hatása az élő szervezetre, hogy bizonyos esetekben immunmodulánsak lehetnek. A különböző rézsókat a növényvédelem, mint gombaölő szert használja, ezért nagyon elterjedt a felhasználása. A rézvegyületek rossz vízzoldhatósága miatt hatékonyak a növényvédelmi alkalmazásban, ugyanis a növény felületén komplexet képeznek, perzisztensek, a gombaszervezetbe behatolnak és kelátokkomplexekeket hoznak létre. A kioldódó vegyületek akkumulálódnak a spóráképletekben is (Darvas és Székács 2006).

2.4. A kadmium hatása az élő környezetre

A kadmium a természetben cinktartalmú ércekben fordul elő. Környezetben való mozgását a kadmiumsók oldódása nagy mértékben befolyásolja. Körforgalmát főként a mikrobák határozzák meg, hiszen amit a mikrobák nem képesek lebontani, azt általában a magasabb rendű szervezetek sem tudják. Azonban egyes toxikus vegyületek negatív hatását a mikrobák fokozhatják is transzformáció útján (Szabó 1989). A mezőgazdaságilag művelt talajokba a kadmiummal szennyezett foszforműtrágya használatával kerülhet, de a különböző fémfeldolgozók (galvanizáló-, ötvöztöüzemek, akkumulátorgyárak) szennyvizeiből is nagy mennyiségű kadmium juthat a természetbe, mely növényekre és állatokra egyaránt veszélyes lehet. Növényekben inkább a gyökér közeli részekben akkumulálódik, míg az állatokban a májban és a vesében, károsítva ezeket a szerveket. A vese kéregállományában halmozódik fel,

és a metallotionein fehérje szintézisét indukálja, ugyanis ez a cink szervezeten belüli transzportjában játszik szerepet, a kadmium pedig cinkantagonista a hasonló fizikai és kémiai tulajdonságai miatt. Tehát a cinktartalmú enzimek működésében is zavarokat okozhat (Lehel és Laczay 2011). Egy tanulmányban talajba kevert kadmium *Eisenia fetida* gilisztafajra kifejtett hatását vizsgálták és kimutatták, hogy a kadmium ugyan károsította a giliszta DNS-ét, de pusztulást nem okozott a vizsgált tesztkörnyezetben (Wang és mtsai 2012). Alacsonyabb rendű szervezetekben, mint például az ektomikorrhiza-gombáknál kimutatták, hogy az egyik legmérgezőbb a nehézfémek közül (McCreight és Schroeder 1982; Tam 1995). Ezen gombafajok között is megkülönböztethető nagyságú érzékenységet mutatnak a kadmiumra nézve és ez az ellenállóság bizonyos szintű rezisztenciához segíti a gazdanövényeket, melyek a szennyezett talajban élnek (Jongbloed és Borst-Pauwels 1990). Massaccesi és munkatársai (2002) kadmium-szennyezett talajokból különböző fonalas gombákat (*Aspergillus terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Talaromyces helicus*) izoláltak, melyek magas kadmium rezisztenciával rendelkeztek.

2.5. Glifozát hatása az élő szervezetre

A glifozát, vagyis az N-(foszfo-metil)-glicin hatóanyag, a növények széles körét pusztítja. A levélre kijuttatva gyorsan átkerül a növény többi részébe is, ellenálló évelő növények gyökerébe is (Patkós 2007). Az egyszikű gyomok ellen leggyakrabban alkalmazott szerek közé tartozik (Darvas és Székács 2006). A glifozátot világszerte használják a mezőgazdaságban és erdészetben, valamint élővizekben növénysszabályozásra (WHO 2005). Azonban a glifozát alkalmazása fontos ökotoxikológiai kérdéseket vet fel magas vízszennyező képessége miatt. Az aromás aminosavak bioszintézisének egyik gátlószere. A növényekben transzlokálódik, herbicid tulajdonsága miatt elterjedt a mezőgazdaságban. A glifozát az esszenciális aromás aminosav a fenil-alanin bioszintézisét gátolja, így kihat a fehérje és nukleinsav szintézisre. Ezen hatása miatt totális és szisztémikus herbicid (Darvas és Székács 2006). Bizonyos növényeket genetikailag módosítják, ezzel rezisztenssé téve a glifozáttal szemben. Az Agrobaktériumból származó EPSPS enzim génjét ültetik be a növényi génállományba, így lepermetezés után nem tesz kárt a módosított növényben. Leggyakrabban szójánál alkalmazzák ezt a technológiát Észak-Amerikában (Patkós 2007). A glifozát kezelés utáni szermaradéka a növényi részekben át a talajba juthat, ahol nem kerül felvételre más egyéb

növény által. A mikrobiális biodegradációja végbemegy a talajban, vízben és üledékben. Félideje változó, néhány naptól hónapokig változhat a különböző mérések szerint (WHO 2005). A herbicidek nagy része nem veszélyes a földigilisztákra, de a glifozát szokásosan kijuttatott dózisa erősen toxikusnak bizonyult labor körülmények között. Közvetetten a növényeket fogyasztó, azok szerves maradékával táplálkozó élőlények jelentős mennyiségű szermaradékot akkumulálnak. Kétféleképpen mutagén, EED (environmental endocrine disruptor), azaz környezetből származó anyag hormonális moduláló hatása feltehető (Darvas és Székács 2006).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Előkísérletekhez használt gombafajok és táptalajok

A komposztokban előforduló leggyakoribb 8 termofil gombafaj telepnövekedését vizsgáltuk 5 különböző összetételű tápagon (burgonya kivonat-glükóz-PDA, malátakivonat agar – MA, Sabouraud agar – S1A, élesztőkivonat-foszfát agar – PMY). 72 óra inkubálás után valamennyi faj a telepnövekedés exponenciális fázisában tartott, ezért az eredmények összehasonlíthatósága érdekében az eredmények értékeléséhez ezt az inkubációs időt választottuk/alkalmaztuk. A tesztelt fajok növekedési sebessége nagymértékben különbözött, az eltérés feltételezhetően az eltérő fiziológiai és biokémiai igényeikkel magyarázható, hiszen egymástól rendszertanilag távoli fajokat teszteltünk.

Az előkísérletben alkalmazott gombafajok az akábbiak voltak:

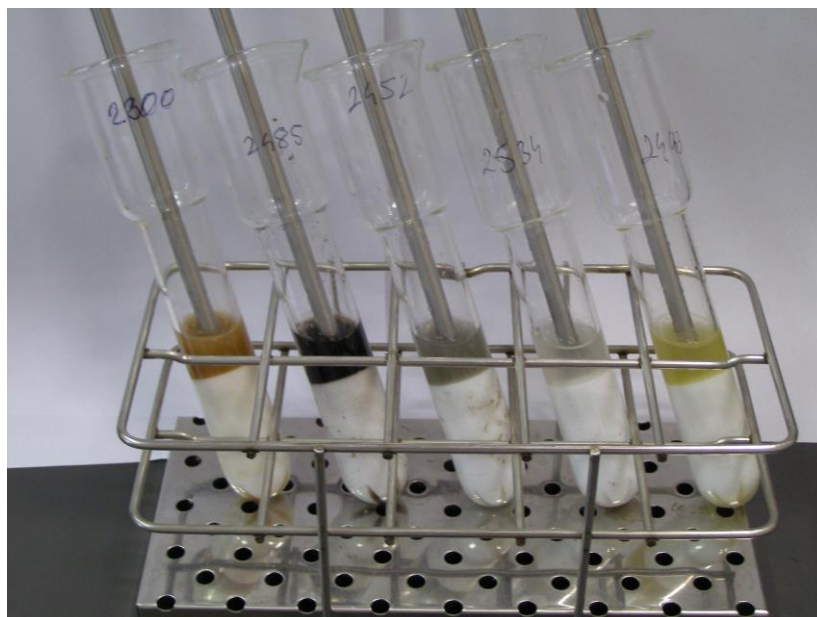
- *Malbranchea cinnamomea* KM2533
- *Myceliophthora thermophila* KM2300
- *Rasamsonia emersonii* KM2443
- *Rasamsonia thermophila* KM2534
- *Rhizomucor pusillus* KM2452
- *Scytalidium thermophilum* KM2490
- *Thermoascus aurantiacus* KM2498
- *Thermomyces lanuginosus* KM2449

3.2. Kiválasztott gombafajok

A választásunk növekedési készség, tápközegen való viselkedés és érzékenység szerint az alábbi a négy fajra esett:

- *Scytalidium thermophilum*
- *Myceliophthora thermophila*
- *Rasamsonia emersonii*
- *Thermomyces lanuginosus*

Az indokok közül néhányat az Eredmények c. fejezetén belüli értékek alapján határoztuk meg.



9. ábra: Spóraszuszpenziók a potterban (Saját fotó)

3.3. Az alkalmazott táptalaj

A főkísérletben alkalmazott tápközeg a Saboraud 1. agar (S1A) volt. Többféle táptalaj összehasonlítása után az általunk kiválasztott négy gombafaj ezen a talajon bizonyult a legjobban növekedőnek és a vizsgált vegyületre megfelelően érzékenyen reagáltak ezen a táptalajon. A mérésekhez 92 mm belső átmérőjű üveg Petri-csészét használtam.

A Saboraud 1.táptalaj receptje:

Hozzávalók	Mennyiség
Glükóz	20 g
Pepton (Lactamin)	5 g
Élesztőkivonat	2 g
CaCO ₃	1 g
Agar-agar	20 g
Desztillált víz	1000 ml

A tápközeget 121°C-on, 1,21 bar nyomáson 15 percig sterilizáltuk.

3.4. Táptalaj mesterséges szennyezése

3.4.1. Réz

A táptalajok rézzel való szennyezéséhez $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t használtunk. A szilárd anyagot steril desztillált vízben oldottuk fel a törzsoldathoz. Megelőző tesztek után az alábbi koncentrációkat alkalmaztuk a további méréseinkhez: 10, 25, 50, 75, 100 ppm.



10. ábra: Törzsoldatból hígítási sor rézzel (Saját fotó)

3.4.2. Kadmium

A kadmiummal szennyezett táptalajokhoz $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -t használtunk. Krisztályos formáját steril desztillált vízben oldottuk fel a törzsoldatunk elkészítéséhez. Az alábbi koncentrációkat alkalmaztuk: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 ppm.

3.4.3. Glifozát

Az általunk használt glifozát 360g/L (486 g/L izopropil-amin só) mennyiségű hatóanyagot tartalmazott. Az alábbi koncentrációkat alkalmaztuk a táptalajok szennyezésére. Alkalmazott koncentrációk: 10, 100, 250, 500, 1000, 2500 ppm.

3.5. Gomba kioltása tápközegre

Az alkalmazott gombatörzseink egy -80°C -on tárolt törzsgyűjteményből származnak. Oltás előtt ezek kiolvasztásra kerültek, majd steril táptalajra oltottam oltókacs segítségével. Ezek után S1A talajon növekedtek Petri-csészében. Spórás állapotban a gombát a táptalaj felületéről steril üveglappal lekapartuk. Potter (11.ábra) segítségével 4,5 ml steril vízben homogén sejtszuszpenziót hoztunk létre.



11. ábra: Homogenizáló potter (<http4>)

Ebből a szuszpenzióból steril boxban 3 μl mennyiséget pipettáztunk a méréshez használandó Petri-csészék közepébe. A fedelük visszakerülése után 46°C -ra kerültek a termosztátba. Minden pipetázás előtt vortexszel összekevertük a szuszpenziót, hogy homogén legyen a pipetázott folyadék.

3.6. Mérések

3.6.1. Standard mérés

A méréseket minden nap ugyanabban az időpontban végeztük. A mérés menetét tekintve a következőképpen történt:

Petri-csészék kivétele a termosztátból.

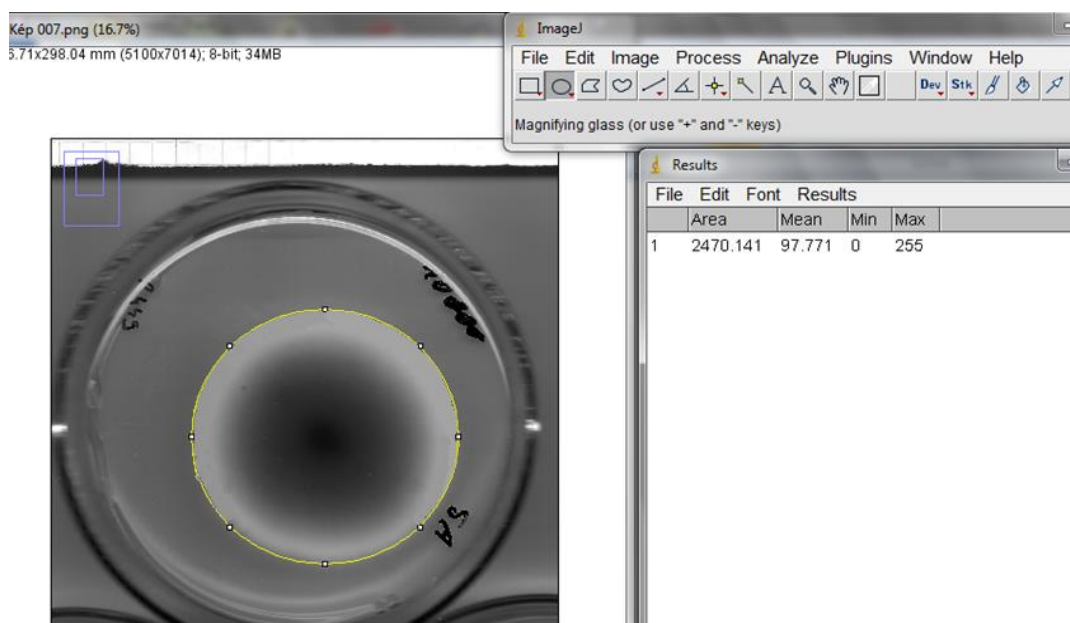
Vonalzó segítségével a csésze alján gomba átmérők mérése.

Kapott értéket mm-ben feljegyeztük.

A mérési időszak végén a gombák sterilizálásra kerültek.

3.6.2. Scanneléses módszer

A vonalzóval végzett mérések után a Petri-csészéket bescanneltük. A képeket ImageJ nevű ingyenes képszerkesztő, és képkezelő szoftver segítségével vizsgáltuk tovább. A program képes arra, hogy egy a képen megadott valós hossz mérték alapján a képpontok alapján hossz és területmérésre alkalmas legyen. Ezt kihasználva a gombatelepekre is alkalmaztuk. Méréseink alapján kiderült, hogy átlag maximum $15\text{-}20\text{mm}^2$ az eltérés a területek tekintetében a standard vonalzos méréshez képest, ezért ezt csak az amorf telepek mérésére használtuk, mivel ott csak megbecsülni lehetett volna a standard módszerrel. A kapott értékeket az ImageJ egy táblázatban összesíti, melyet később .xls formátumban lehet exportálni belőle, így alkalmazva további számításokhoz. Ez a módszer egy későbbi vizsgálati témául szolgálhat a jövőben.



12. ábra: ImageJ bemutatása mérés közben (saját felvétel)

3.7. Számolás

A számításainkhoz alapul a harmadik napot vettük figyelembe (72óra), kivéve a *Scytalidium thermophilum*-nál, ugyanis itt a 48órás értéket. Ez gomba gyorsabban nő a másik három vizsgált fajhoz képest. A kapott átmérőkből területet számoltunk. Ezekből gátlási százalékot számoltunk a kontroll csoporthoz képest. Ezután meghatároztuk az Effektív

Koncentrációt (EC), mely a vizsgált gombák 50%-ra hatott a vizsgálati körülmények között. További elemzést statisztikai programmal végeztünk.

3.7.1. Statisztikai elemzés

Statisztikai elemzéshez az R nevű (version 3.1.1) ingyenes statisztikai programot használtuk. Normalitást a Shapiro-Wilk normalitási teszttel ellenőriztem. Az elemzéshez Egytényezős (One-Way) Anova-t használtunk, azon belül az átlagos telepterületeket Dunnett-próbával értékeltük, melynél egy kiválasztott csoporthoz (jelen helyzetben a kontroll) akarjuk hasonlítani az összes többi csoportot, azaz a kezelésben részesült szennyezett csoportokat. A nullhipotézise a modellnek, hogy a csoportok között nincs különbség. Ellenhipotézisünk, hogy van. Az elsőfajú hiba valószínűsége $\alpha = 0,05$, annak a valószínűsége, hogy egyetlen pozitív eredményt is kapjunk. Ha a kapott p-értékünk ennél kisebb, akkor esetünkben elvetjük a nullhipotézist és az ellenhipotézis válik igazgá. Ha p-értékünk kisebb, mint 0,05, a különbség szignifikáns.

További elemzést, Többtényezős (Multi-Way) Anova segítségével úgy végeztük, hogy gombafajonként csoportosítva a kezelésnek, a fajnak van-e hatása a telepterület méretére. Közöttük van-e interakció. Az eredmények részben kerül tárgyalásra a pontos eredmény.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Táptalaj és gombafaj kiválasztás eredménye

A leggyorsabb növekedést a *Rhizomucor pusillus* mutatta MA és PMY táptalajokon ($6644,2 \text{ mm}^2$). Gyors növekedésűnek bizonyult továbbá a *Scytalidium thermophilum*, valamint a *Thermoascus aurantiacus* törzs S1A táplemezen. Előzőektől némileg elmaradt a *Myceliophthora thermophila* és a *Thermomyces lanuginosus* növekedési sebessége, utóbbiak valamennyi táptalajon kisebb területű telepeket fejlesztettek. A legkisebb telep méretet tapasztaltuk a *Rasamsonia emersonii* és a *Malbranchea cinnamomea* törzs esetében, ráadásul utóbbi csak S1A és MA táptalajon is csak 357 és 439 mm^2 -re nőtt.

4.2. Réz hatása termofil gombák növekedésére

A Cu^{2+} ionok különböző koncentrációit tartalmazó Saboraud-glükóz agaron a növekedésgátlási screening-kísérletekben a vizsgált törzsek telepei a kontrollhoz képest különböző mértékű növekedés gátlódást mutattak. A növekedés lag-fázisainak hossza és a növekedés sebessége a vizsgált törzseknél eltért egymástól, emiatt összehasonlításra leginkább a 72 órás inkubációs idő után volt lehetőség.

A viszonylag korlátozott méretű ($1808,6 \text{ mm}^2$) telepet növesztő *Rasamsonia emersonii* a réztartalomra nézve talajszennyezettségi B határértékként előírt 75 ppm-nél még 1476 mm^2 nagyságú telepet növesztett, és még 100 ppm-nél is tudott növekedni ($32,2 \text{ mm}^2$). A kontroll tápagaron $3027,5 \text{ mm}^2$ területű *Thermomyces lanuginosus* 75 ppm-nél még 1543 mm^2 és – előbbi fajhoz hasonlóan – 100 ppm-nél még számottevő, $1047,58 \text{ mm}^2$ területű telepet fejlesztett. A *Myceliophthora thermophila* telep mérete 10 ppm-nél ($4740,6 \text{ mm}^2$) megegyezett a kontrolléval. A 25, 50 és 75 ppm-es koncentrációnál lassan fokozódó gátlást tapasztaltunk, viszont még 100 ppm-nél is $1017,9 \text{ mm}^2$ (a kontroll 54,5%-a) lett a telep mérete. A kontroll tápagaron leggyorsabban növekedő ($2736,2 \text{ mm}^2$) *Scytalidium thermophilum* KM2490-es jelű törzsre a 10 ppm réztartalom serkentő hatást gyakorolt ($2826,5 \text{ mm}^2$). A 25 ppm-es

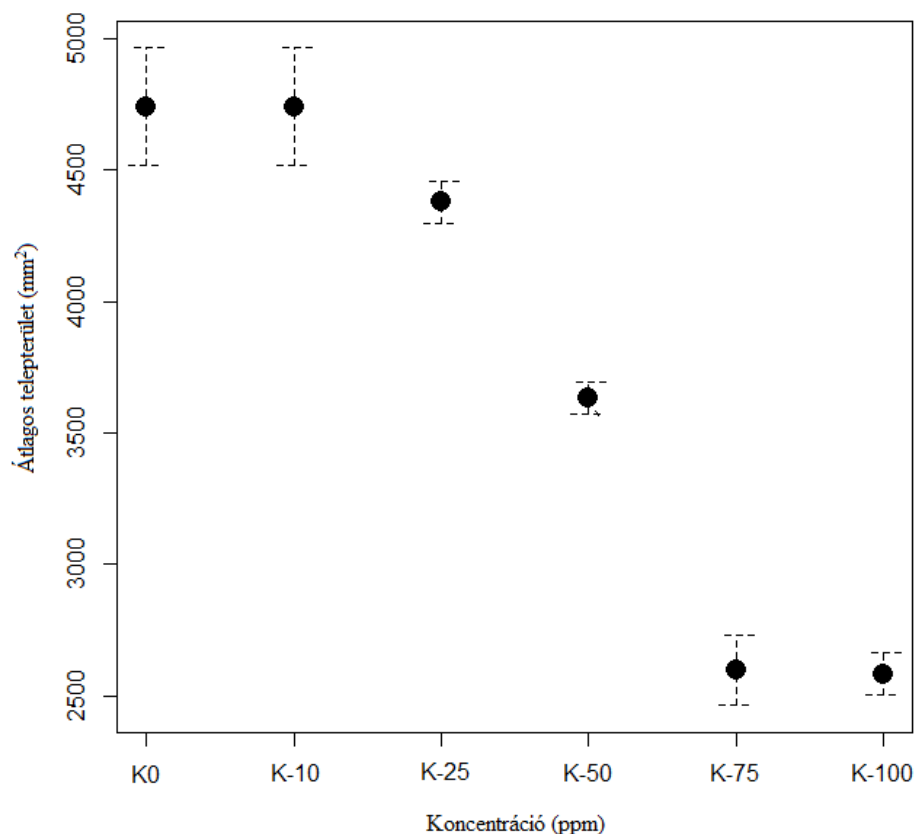
koncentrációnál viszont már jelentkezett gátló hatás (1814,9 mm²), amely 50 ppm-nél jelentős mértékűvé vált (506,1 mm²). 75 ppm-nél ez a törzs már alig növekedett (133,2 mm²), és 100 ppm réztartalomnál az oltás helyén 3 nap után is csak iniciális hifák fejlődtek (3. ábra).

A statisztikai elemzés során kiderült, hogy a réz a *Myceliophthora thermophila*-ra az alábbi ábra szerint hat.

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10  - K0 == 0  1.060e-12  2.112e+02  0.000    1.00
K25   - K0 == 0 -3.635e+02  2.112e+02 -1.721    0.35
K50   - K0 == 0 -1.110e+03  2.112e+02 -5.256 <0.001 ***
K75   - K0 == 0 -2.143e+03  2.361e+02 -9.077 <0.001 ***
K100  - K0 == 0 -2.159e+03  2.112e+02 -10.222 <0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

13. ábra: Dunnett-próba eredménye *Myceliophthora thermopila*-ra réz hatására

A kisebb koncentrációnak nincs szignifikáns hatása a fajra, nagyjából megegyezik a kontroll értékeivel. Szignifikáns különbség csak 50 ppm-es koncentráció felett jelentkezik. A 0, 75, 100 ppm-es koncentrációhoz tartozó p-érték a legerősebb megbízhatósági szintet jelzi.



14. ábra: *Myceliophthora thermopila* átlagos telepterületei koncentrációnként

A *Rasamsonia emersonii* KM2443-as jelű törzsre a statisztika a következőképpen alakult:

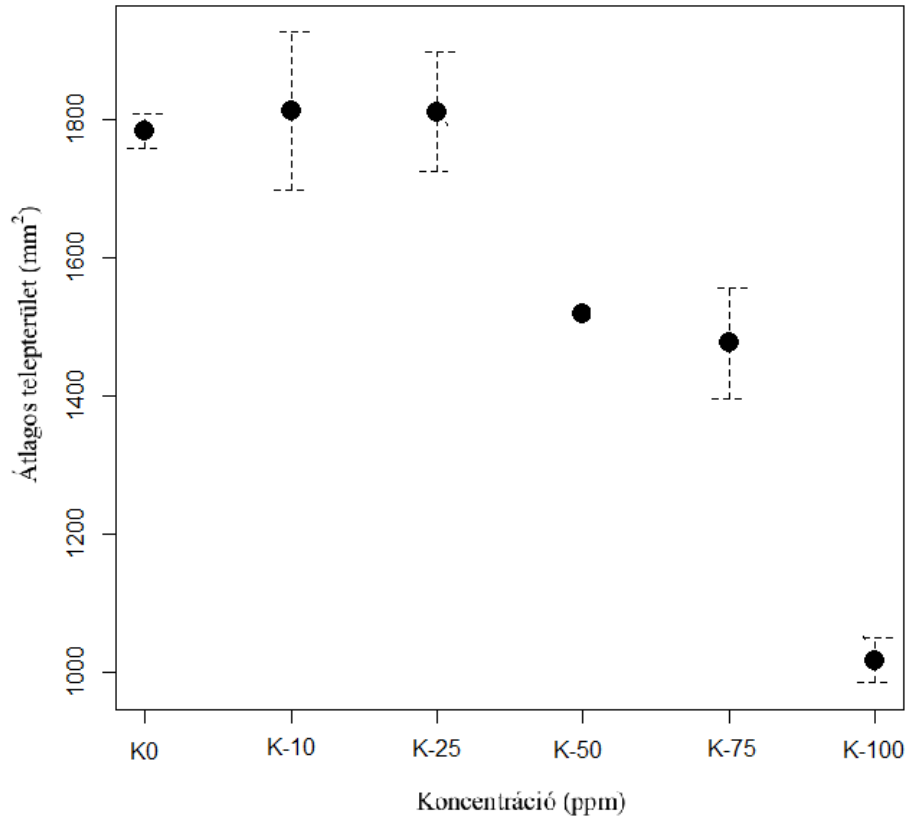
```

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10 - K0 == 0    28.52      97.82    0.292  0.9982
K25 - K0 == 0    26.95      97.82    0.276  0.9986
K50 - K0 == 0  -264.02      97.82   -2.699  0.0710 .
K75 - K0 == 0  -307.46      97.82   -3.143  0.0328 *
K100 - K0 == 0 -765.90      97.82   -7.830 <0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

15. ábra: Dunnett-próba eredménye *Rasamsonia emersonii*-ra réz hatására

A kontroll mintákhoz képest csak a 75 ppm-es és 100 ppm-es koncentráció mutat szignifikáns eltérést, utóbbi magasabb megbízhatósági szinten, a többi koncentráció statisztikailag nem különbözik a telepterület méretében. Mely a 16. ábrán jól látható.



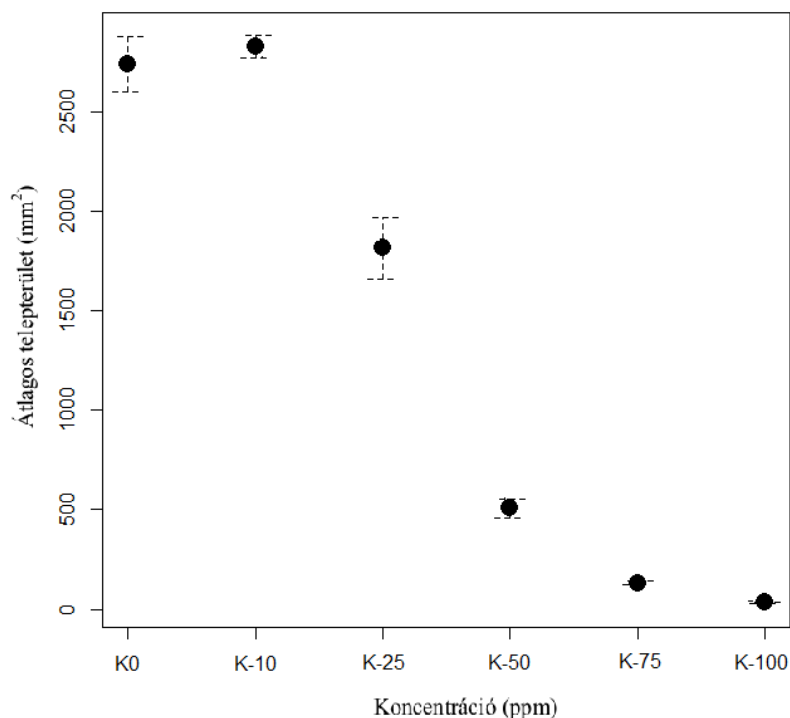
16. ábra: *Rasamsonia emersonii* átlagos telepterületei koncentrációnként

A *Scytalidium thermophilum* a rézkoncentrációk hatása tekintetében szignifikáns eltéréseket mutat.

```
Linear Hypotheses:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10 - K0 == 0    90.28    127.28  0.709  0.924
K25 - K0 == 0 -921.33    127.28 -7.238 <1e-04 ***
K50 - K0 == 0 -2230.18    127.28 -17.522 <1e-04 ***
K75 - K0 == 0 -2603.06    127.28 -20.451 <1e-04 ***
K100 - K0 == 0 -2704.06    127.28 -21.245 <1e-04 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

17. ábra: Dunnett-próba eredménye *Scytalidium thermophilum*-ra réz hatására

A 10 ppm-es koncentráció némi hormézisz hatást mutat (+90,28 mm²), gátlás helyett némi serkentés mutatkozik, de nem olyan mértékben, hogy az eltérés szignifikánsnak tekinthető legyen. A további koncentrációk a kontrollhoz képest bizonyíthatóan (p érték) eltérnek és telepméret csökkenés a koncentráció emelkedésével arányos. Az alábbi ábrán (18.) látható, hogy az átlagos telepterületek, hogyan alakulnak koncentrációnként.



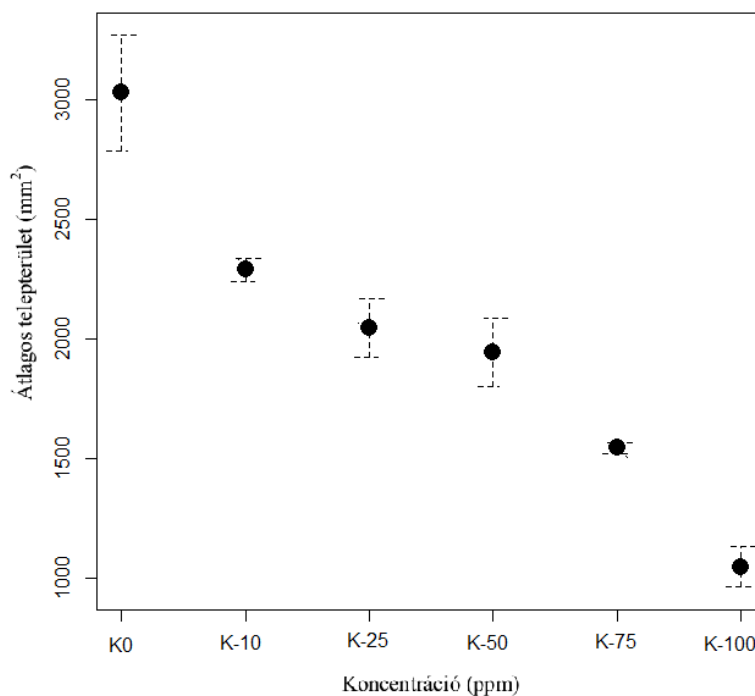
18. ábra: *Scytalidium thermophilum* átlagos telepterületei koncentrációnként

A *Thermomyces lanuginosus* statisztikai elemzése során az értékek az alábbiak szerint alakultak:

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10 - K0 == 0    -737.9      189.5   -3.894  0.01014 *
K25 - K0 == 0    -982.0      189.5   -5.183  0.00128 **
K50 - K0 == 0   -1085.7      189.5   -5.730 < 0.001 ***
K75 - K0 == 0   -1484.4      189.5   -7.834 < 0.001 ***
K100 - K0 == 0  -1979.9      211.8   -9.346 < 0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

19. ábra: Dunnett-próba eredménye *Thermomyces lanuginosus*-ra réz hatására

Már a legkisebb koncentráció is szignifikánsan eltér a kontroll értékekhez mérve. A telepterületek átlagai a koncentráció növekedésével csökkentek. Az összefüggés a koncentráció és a területcsökkenés között meggyőző interakciót mutat. A 20. ábra a telepterület csökkenést hivatott bemutatni.



20. ábra: *Thermomyces lanuginosus* átlagos telepterületei koncentrációnként

További elemzés után kimutatható, hogy a fajnak és a koncentrációnak egyenként is szignifikáns hatása van a telepterületre. Együttes hatásuk között erős interakció mutatható ki.

```

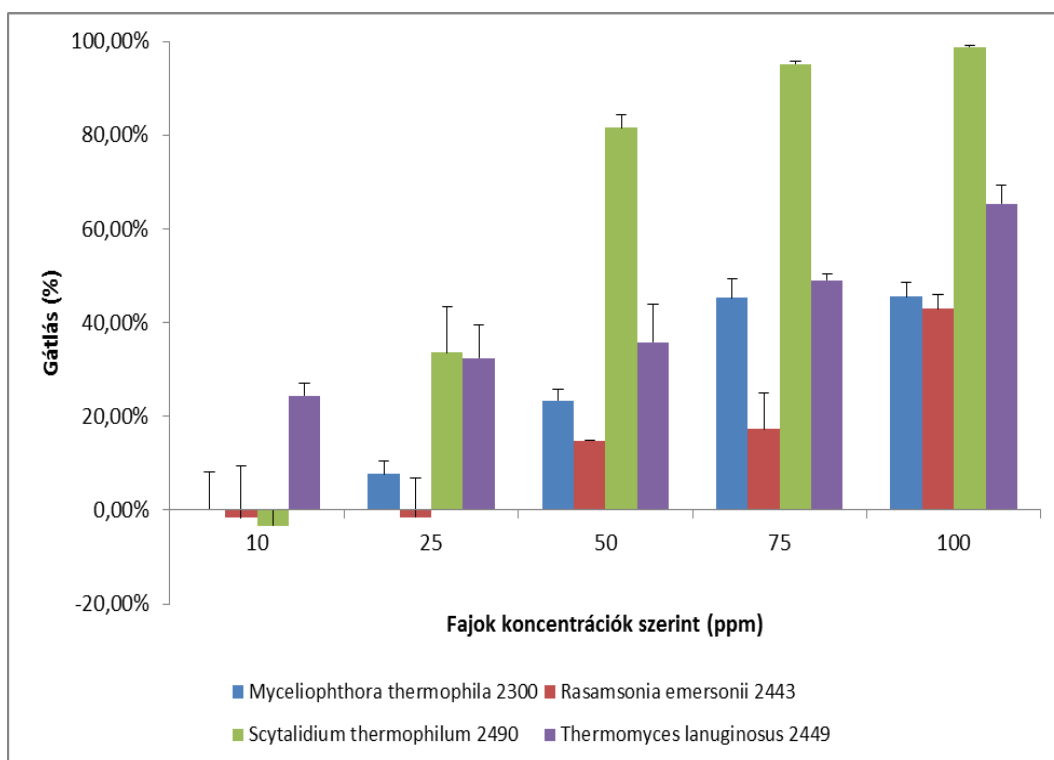
Response: terület

          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
faj          64755628  3 553.970 < 2.2e-16 ***
koncentracio 35026425  5 179.786 < 2.2e-16 ***
faj:koncentracio 10705052 15 18.316 1.526e-14 ***
Residuals      1792370 46
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

21. ábra: Többtenyezős- (Multi-Way) Anova eredménye

A réz gátló hatását az alábbi diagramon ábrázoltam, melyen jól látható, hogy a *Scytalidium thermophilum* már kisebb koncentrációknál is gátoltabb a növekedésben, a vizsgált négy törzs közül a legérzékenyebbnek bizonyul a rézzel szemben. 100 ppm-es koncentrációnál már 100%-ban gátolt a növekedése, ezzel szemben a másik három törzs 40-60%-ban gátolt a növekedésében.



22. ábra: Gombafajok gátlási % megoszlása koncentrációnként réz hatására

Az effektív koncentrációk tekintetében is a *Scytalidium thermophilum* mutatkozott a legérzékenyebbnek, melynek EC₅₀ értéke 31,85 ppm volt. Ezzel szemben a *T. lanuginosus*

75,76 ppm, a *M. thermophila* 102,04, a *R. emersonii* a legmagasabb 151,52 ppm-es EC₅₀ értékkel rendelkezett a vizsgálataink során.

4.3. Kadmium hatása termofil gombák növekedésére

A Cd²⁺ ionok különböző koncentrációit tartalmazó S1A agaron növekedés-gátlási screening kísérletekben a vizsgált törzsek telepei a Cd²⁺ mentes kontrollhoz képest különböző mértékű növekedésgátlódást mutattak. A növekedés lag fázisainak hossza és a növekedés sebessége eltért egymástól, a fajok közötti összehasonlításra legalkalmasabbnak a 72 órás inkubációs idő bizonyult. (A vizsgált *S. thermophilum* törzs érzékenysége a 48 órás telepméretek alapján jobban kifejezhető volt.)

A korlátozottabb méretű telepet (1759mm²) növesztő *R. emersonii* – a kadmium tartalomra talajszennyezettségi B határértékként előírt – 1 ppm-nél kisebb terhelésekre (0,5 ppm és 0,75 ppm) alig reagált. A határértéknek megfelelő szintű mérgezés kétszeresénél a telepek mérete még mindig 1277 mm² volt, és még 3 ppm, 4 ppm és 4,5 ppm terhelésnél is rendre 1320,1, 1341, és 1094,8 mm² nagyságú telepeket mérhettünk. 5 ppm volt az a kadmium koncentráció, amelynél a *R. emersonii* 2443 jelű törzs már egyáltalán nem volt képes növekedni.

A kontroll tápagaron 2985,4 mm² méretű *T. lanuginosus* telepeinek területe a kadmium koncentráció növekedésével már 0,5 ppm-től fokozatosan csökkent, így például a határérték kétszeresénél, 2 ppm-nél csupán 1543,6 mm², 4 ppm-nél 661,8 mm² telepméretet regisztráltunk, és – előző fajhoz hasonlóan – a *T. lanuginosus* számára is az 5 ppm volt az, általunk alkalmazott Cd²⁺ koncentráció, ahol az oltás helyén már semmilyen telepnövekedés nem történt.

A *M. thermophila* növekedését (kontroll: 5853,2 mm²) a Cd²⁺ ionok alacsonyabb koncentrációi (0,5-2,5 ppm) alig befolyásolták. 3 ppm és 4,5 ppm között a telepnövekedés fokozatosan és kissé csökkent, 4,5 ppm-nél még 4107,4 mm² lett a mérete. Az 5 ppm Cd²⁺ koncentráció már ennek a fajnak is a minimálisra (107,6 mm²) csökkentette a növekedését.

Az igen gyors növekedésű (kontrollban 3183,2 mm² 2 nap alatt) *S. thermophilum* telepmérete a Cd²⁺ ionok növekedő koncentrációjának sorrendjében – a *T. lanuginosus*hoz hasonlóan – 2,5 ppm-nél kezdett csökkenést mutatni (478,6 mm²).

A *M. thermophila* a kadmium hatására a gomba az alábbiak szerint reagált a kadmiumra:

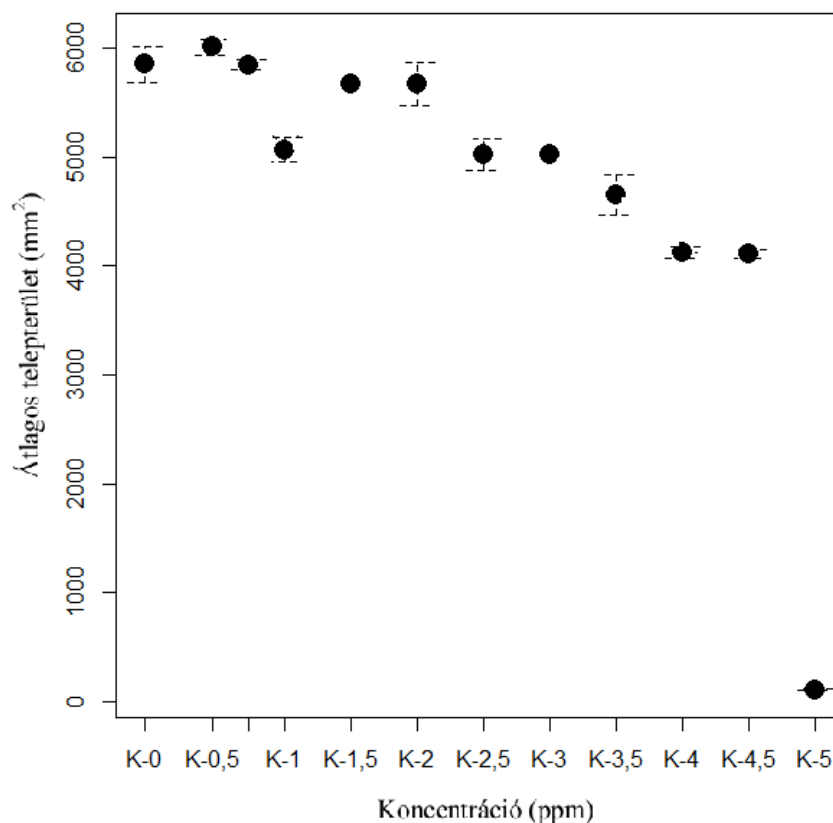
Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
K-0,5 - K-0 == 0	157.131	192.289	0.817	0.98255
K-0,75 - K-0 == 0	-2.093	171.989	-0.012	1.00000
K-1 - K-0 == 0	-786.047	171.989	-4.570	0.00196 **
K-1,5 - K-0 == 0	-181.597	243.229	-0.747	0.99070
K-2 - K-0 == 0	-177.933	171.989	-1.035	0.92787
K-2,5 - K-0 == 0	-827.128	171.989	-4.809	0.00118 **
K-3 - K-0 == 0	-829.222	192.289	-4.312	0.00337 **
K-3,5 - K-0 == 0	-1195.293	171.989	-6.950	< 0.001 ***
K-4 - K-0 == 0	-1726.869	192.289	-8.981	< 0.001 ***
K-4,5 - K-0 == 0	-1745.840	171.989	-10.151	< 0.001 ***
K-5 - K-0 == 0	-5745.677	171.989	-33.407	< 0.001 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

23. ábra: Dunnett-próba eredménye *Myceliphthora thermophila*-ra kadmium hatására

A kisebb koncentrációknál (0,5-2 ppm) csak az 1 ppm-es koncentráció az, amely szignifikánsan eltér a kontroll koncentrációtól. A 2,5 ppm-es koncentrációtól kezdve az összes vizsgált koncentráció szignifikáns eltérést mutat az átlag telepterület tekintetében. A koncentrációk szerinti telepterületek a 24. ábrán láthatóak.



24. ábra: *Myceliphthora thermophila* átlagos telepterületei kadmium koncentrációk hatására

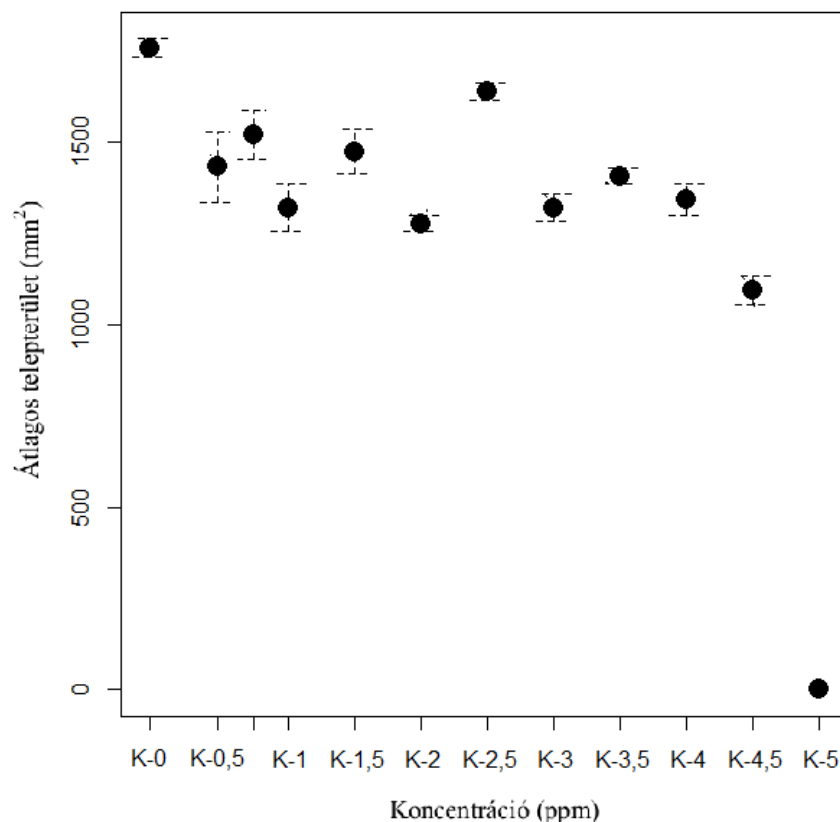
A 0,5 ppm-es mennyiség serkentő hatással rendelkezik, mely nem szignifikáns a kontrollhoz képest. Kiugró értéket mutat az 1 ppm-es koncentráció. 4,5 ppm koncentrációig lassú telepterület csökkenés figyelhető meg, mely folytonos. 4,5-5 ppm-es koncentráció között a hatás nagymértékű, 0,5 ppm koncentráció alatt több mint 3000 mm² a telepterület csökkenés.

A *R. emersonii* is hasonló tendenciát mutat a csökkenés arányában:

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K-0,5 - K-0 == 0   -694.20      64.51 -10.762 <1e-06 ***
K-0,75 - K-0 == 0   -862.71      72.12 -11.962 <1e-06 ***
K-075 - K-0 == 0    -862.71      91.23  -9.457 <1e-06 ***
K-1 - K-0 == 0     -1664.98      72.12 -23.086 <1e-06 ***
K-1,5 - K-0 == 0    -1419.02      64.51 -21.998 <1e-06 ***
K-2 - K-0 == 0     -1441.78      64.51 -22.351 <1e-06 ***
K-2,5 - K-0 == 0    -1790.85      64.51 -27.762 <1e-06 ***
K-3 - K-0 == 0     -2077.37      64.51 -32.203 <1e-06 ***
K-3,5 - K-0 == 0    -2076.32      64.51 -32.187 <1e-06 ***
K-4 - K-0 == 0     -2323.60      64.51 -36.021 <1e-06 ***
K-4,5 - K-0 == 0    -2480.34      64.51 -38.450 <1e-06 ***
K-5 - K-0 == 0     -2985.35      64.51 -46.279 <1e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

25. ábra: Dunnett-próba eredménye *Rasamonia emersonii*-ra kadmium hatására

Már a 0,5 ppm-es koncentrációban szignifikáns eltérés mutatkozik a 0 ppm-es kontrollhoz képest. 3 ppm-es koncentrációig az értékek váltakozva mutatják a csökkenést. A legnagyobb területcsökkenést az 5 ppm-es mintánál észleltem. Bár nem olyan nagymértékű a csökkenés 4,5-5 ppm között, de nem elhanyagolható a majdnem 500 mm²-es változás. Az értékek csökkenését 26. ábrán található diagram ábrázolja.



26. ábra: *Rasamsonia emersonii* átlagos telepterületei kadmium koncentrációk hatására

A *Scytalidium thermophilum* értékei:

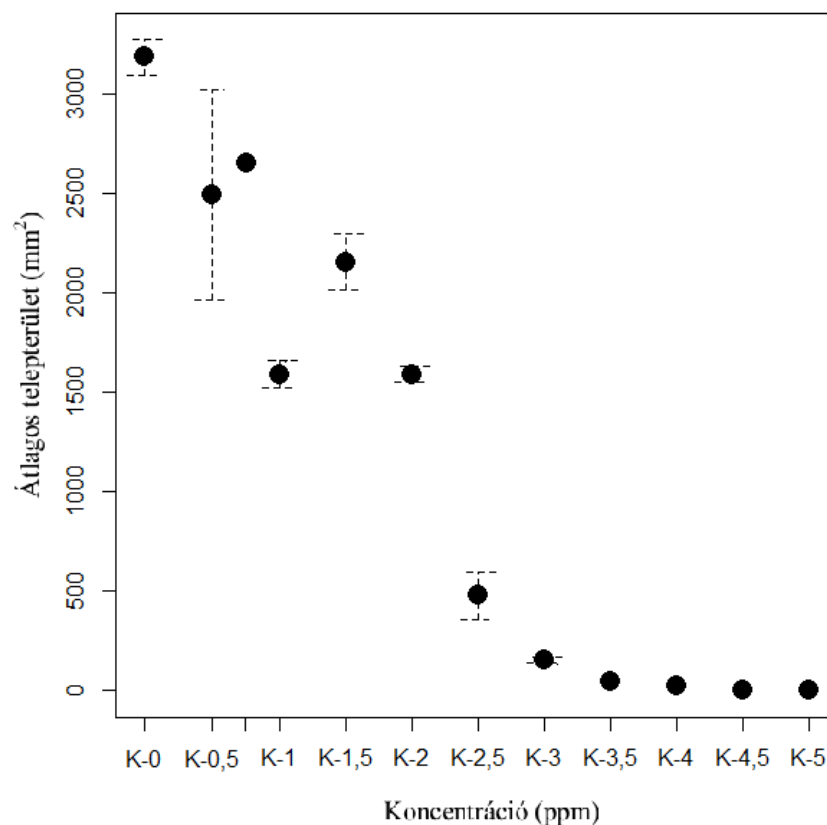
```

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K-0,5 - K-0 == 0    -693.2      196.1   -3.535   0.0196 *
K-0,75 - K-0 == 0   -542.4      196.1   -2.766   0.0924 .
K-1 - K-0 == 0      -1592.8     196.1   -8.123   <0.001 ***
K-1,5 - K-0 == 0    -1028.3     175.4   -5.863   <0.001 ***
K-2 - K-0 == 0      -1593.0     175.4   -9.083   <0.001 ***
K-2,5 - K-0 == 0    -2704.6     175.4  -15.420   <0.001 ***
K-3 - K-0 == 0      -3028.8     175.4  -17.269   <0.001 ***
K-3,5 - K-0 == 0    -3132.9     196.1  -15.977   <0.001 ***
K-4 - K-0 == 0      -3154.9     196.1  -16.089   <0.001 ***
K-4,5 - K-0 == 0    -3183.2     175.4  -18.149   <0.001 ***
K-5 - K-0 == 0      -3183.2     196.1  -16.233   <0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

27. ábra: Dunnett-próba eredménye *Scytalidium thermophilum*-ra kadmium hatására

A koncentrációk a kontrollhoz képest szignifikánsan eltérnek, kivéve a 0,75 ppm-es koncentráció is erős eltérést mutat de p-értéke miatt nem éri el a szignifikancia szintjét.



28. ábra: *Scytalidium thermophilum* átlagos telepterületei kadmium koncentrációk hatására

Az előző két törzshöz képest egy nagyirányú csökkenés mutatkozik 0,5 ppm és 3 ppm között. A csökkenés 3,5 ppm felett nagyjából kiegyenlítődik, a telepméretük minimálisra csökkennek. 4-5 ppm között szinte teljesen gátolt a növekedése.

A *T. lanuginosus* szinte lineáris csökkenést mutat a telepterület tekintetében. Kiugró értéket az 1 ppm-es koncentrációnál figyelhetünk meg. Statisztikai elemzését alább ismertetem:

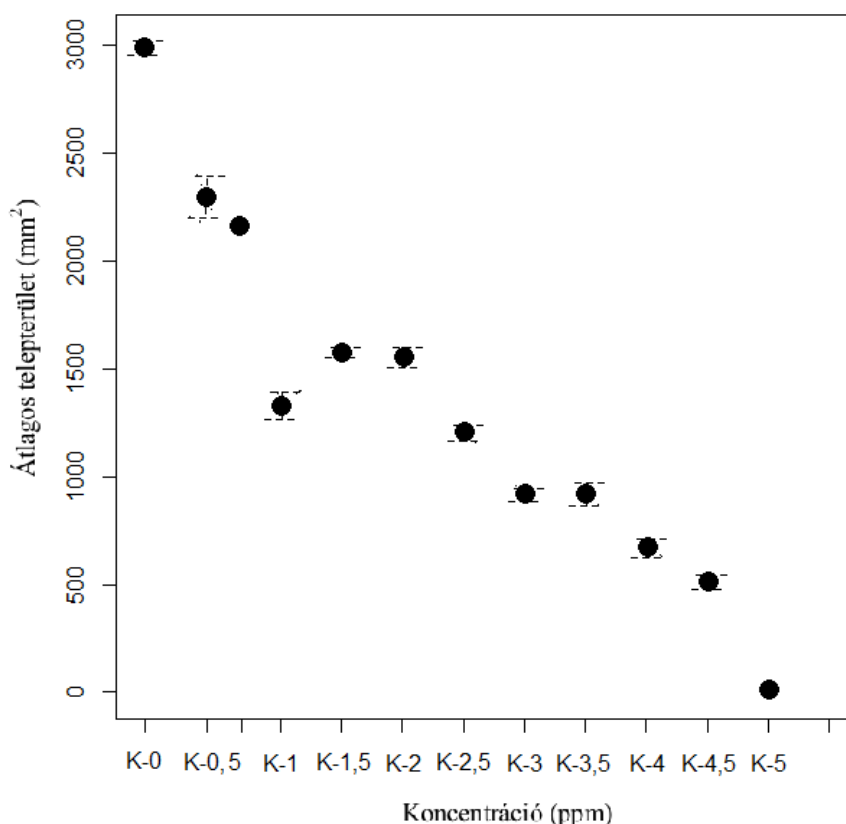
```

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K-0,5 - K-0 == 0    -694.20      64.51  -10.762  <1e-07 ***
K-0,75 - K-0 == 0   -862.71      72.12  -11.962  <1e-07 ***
K-075 - K-0 == 0    -862.71      91.23   -9.457  <1e-07 ***
K-1 - K-0 == 0     -1664.98      72.12  -23.086  <1e-07 ***
K-1,5 - K-0 == 0   -1419.02      64.51  -21.998  <1e-07 ***
K-2 - K-0 == 0     -1441.78      64.51  -22.351  <1e-07 ***
K-2,5 - K-0 == 0   -1790.85      64.51  -27.762  <1e-07 ***
K-3 - K-0 == 0     -2077.37      64.51  -32.203  <1e-07 ***
K-3,5 - K-0 == 0   -2076.32      64.51  -32.187  <1e-07 ***
K-4 - K-0 == 0     -2323.60      64.51  -36.021  <1e-07 ***
K-4,5 - K-0 == 0   -2480.34      64.51  -38.450  <1e-07 ***
K-5 - K-0 == 0     -2985.35      64.51  -46.279  <1e-07 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

29. ábra: Dunnett-próba *Thermomyces lanuginosus*-ra kadmium hatására

Az összes koncentráció p-értéke meggyőző szignifikáns különbségre utal a kontroll egyedekhez képest. Ezzel szemben egyes koncentrációk egymástól nem, vagy minimális különbséggel rendelkeznek. Az átlagos telepterületek értékei diagramon való elhelyezkedése a 30. ábrán látható:



30. ábra: A *Thermomyces lanuginosus* átlagos telepterületei kadmium koncentrációk hatására

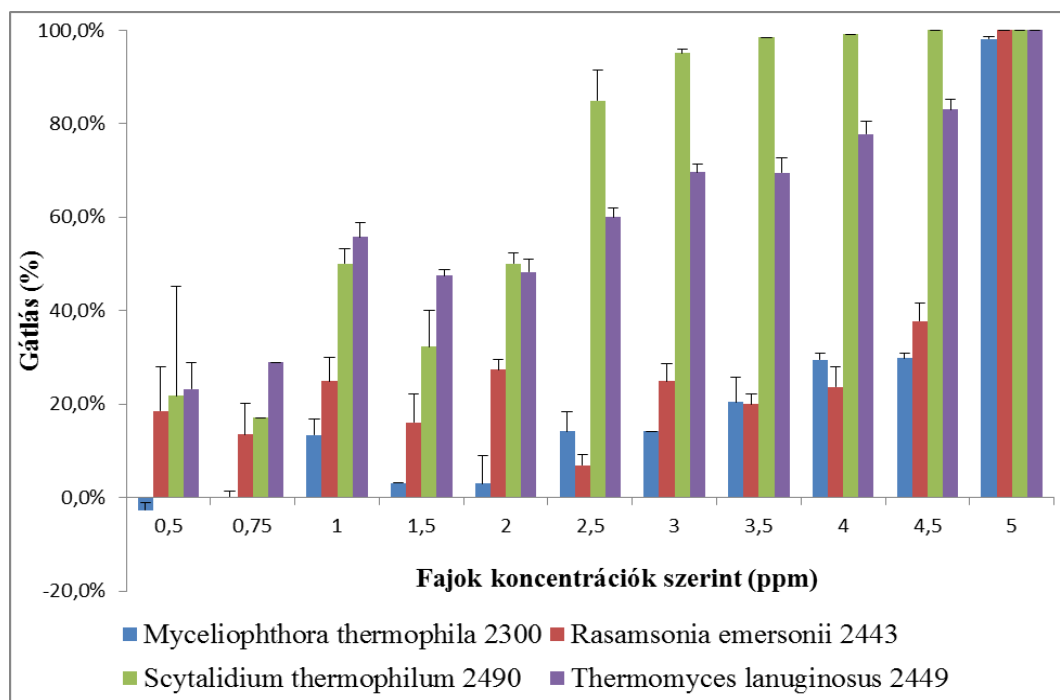
További elemzés után kiderült, hogy a vizsgálataink során a kadmium koncentrációi és a fajok külön-külön is szignifikánsan hatnak a kapott értékekre.

```
Response: terület
              Sum Sq Df F value    Pr(>F)
faj           273913630  3 3807.564 < 2.2e-16 ***
koncentracio  104490552 12  363.120 < 2.2e-16 ***
faj:koncentracio 46311865 33   58.524 < 2.2e-16 ***
Residuals      1966342 82
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

31. ábra: Többtenyezős- (Multi-way) Anova eredménye R-ben

A telepterület függvényében továbbá az együttes hatás is erős köteléket mutat, interakcióként értékelhető.

A kadmium gátló hatás tekintetében a rézhez hasonlóan a *Scytalidium thermophilumra* volt a legnagyobb gátló hatással. Ez már a kisebb koncentrációkban jelentkezett és 3 ppm-es koncentrációnál nagyobb csoportokban már 100%-ban gátolva volt a gomba növekedése. A második legérzékenyebb fajnak a *Thermomyces lanuginosum* bizonyult, melynek szintén 3 ppm-felett emelkedő tendenciát mutat, igaz a 100%-os gátlást, csak a legnagyobb, 5 ppm-es koncentrációban tapasztaltam. A *M. thermophila* és *R. emersonii* toleránsnak bizonyult a glifozát koncentrációival szemben a másik két fajhoz képest, de ezzel szemben az 5 ppm-es koncentráció közel és 100%-os gátló hatást fejtett ki a gombákra.



32. ábra: Gombafajok gátlási % megoszlása koncentrációnként kadmium hatására

Effektív koncentráció tekintetében a *M. thermophila* a legmagasabb 4,74 ppm-es EC_{50} értékkel rendelkezik. Az utána következő toleránsabb faj a *R. emersonii*, melynek EC_{50} értéke 4,61 ppm. A *T. lanuginosus*-nak 2,4 ppm, ezzel szemben a legérzékenyebb 2,01 ppm-es EC_{50} -es értékkel rendelkezett.

4.4. Glifozát hatása termofil gombák növekedésére

A glifozát különböző koncentrációit tartalmazó Saboraud-glükóz agaron a növekedésgátlási kísérletekben a vizsgált törzsek telepei a kontrollhoz képest különböző mértékű növekedés gátlódást mutattak. A növekedés lag-fázisainak hossza és a növekedés sebessége a vizsgált törzseknél eltért egymástól, emiatt összehasonlításra szintén a 72 órás inkubációs idő után volt lehetőség (A vizsgált *S. thermophilum* törzs érzékenysége a 48 órás telep méretek alapján jobban kifejezhető volt.)

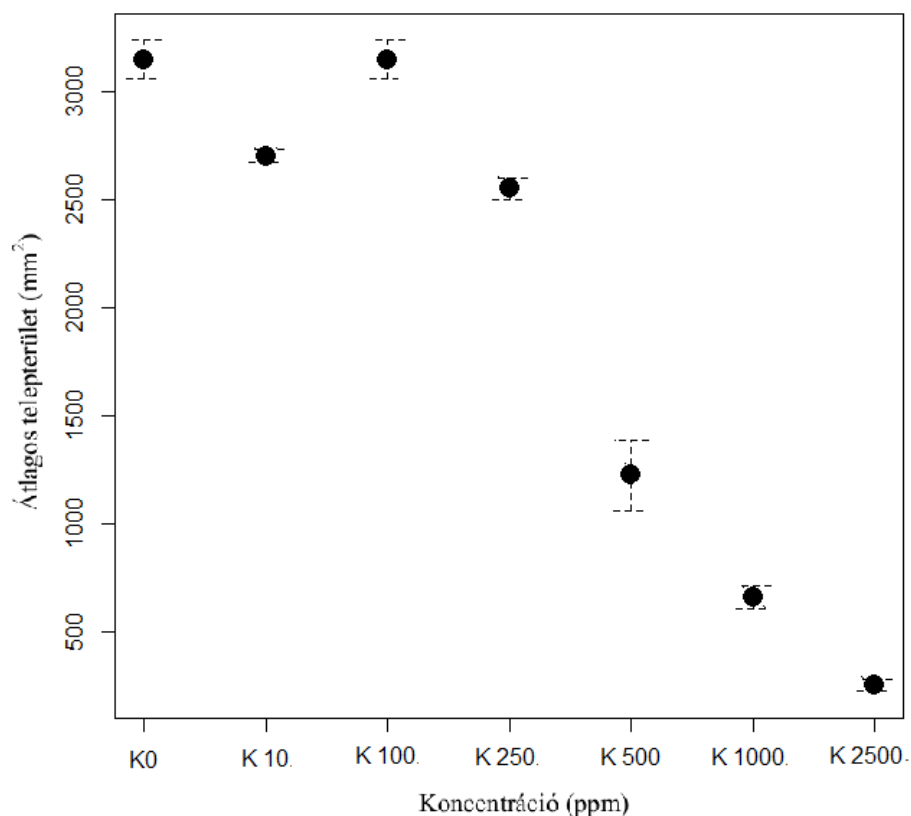
A telepterületek tekintetében a vizsgált kontroll csoportban a *M. thermophila* és *S. thermophilum* esetében nagyjából megegyeztek a vizsgált összehasonlítási időpontokban. Előbbi 3149,9 mm², utóbbi 3184,2 mm² átlag telepterülettel rendelkezett. A *S. thermophilum*-nál mutatkozott a legkisebb 10 ppm-es koncentrációban telepnövekedésre serkentő hatás, a többi faj közül a *M. thermopila* 100 ppm-es koncentrációja mutatott azonosságot a kontroll csoporthoz képest. A következő diagramokon, majd a koncentrációkat K0, K10,...K2500 jelölést kapnak, rendre a koncentrációknak megfelelően melyek: 0, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500 ppm. E jelrendszer bevezetésére azért volt szükség, hogy az ábrák áttekinthetőbbek legyenek. Az X tengelyen ábrázolt adatok nem növekvő skála szerint vannak ábrázolva, hanem csoportosítva.

A *M. thermophila* statisztikai elemzése során az alábbi eredményeket kaptuk:

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K1 - K0 == 0 -4.480e+02  1.190e+02  -3.765    0.010 **
K2 - K0 == 0  3.549e-14  1.190e+02   0.000    1.000
K3 - K0 == 0 -5.990e+02  1.190e+02  -5.034    0.001 **
K4 - K0 == 0 -1.924e+03  1.190e+02 -16.168 <0.001 ***
K5 - K0 == 0 -2.488e+03  1.190e+02 -20.907 <0.001 ***
K6 - K0 == 0 -2.894e+03  1.190e+02 -24.322 <0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

33. ábra: Dunnett-próba eredménye *Myceliophthora thermophila*-ra glifozát hatására

A kezelt csoportok rendre szignifikáns eltérést mutatnak kontroll csoporthoz képest, melyet magas megbízhatósággal állíthatunk, kivéve a K2-es azaz a 100 ppm-es koncentráció, mely század pontossággal megegyezik a kontroll csoport telepterületével.



34. ábra: A *Myceliophthora thermophila* átlagos telepterületei glifozát koncentrációk hatására

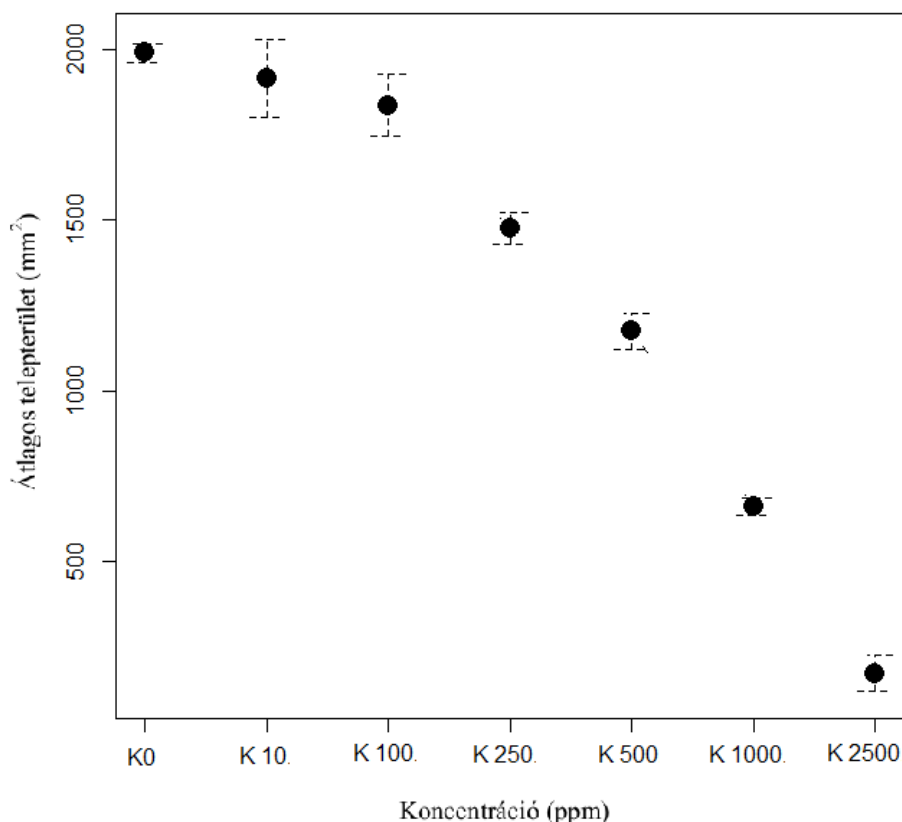
A telepterületek tekintetében csökkenő tendencia mutatkozik. A kiugró érték a 100 ppm-es koncentráció, de ezt leszámítva csökkenő telepterületek jönnek létre a glifozát növekvő koncentrációjának hatására.

A *R. emersonii* statisztikája egyértelmű tendenciát mutat:

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10  - K0 == 0    -75.10      92.84  -0.809   0.913
K100  - K0 == 0   -152.81     92.84  -1.646   0.411
K250  - K0 == 0   -514.18     92.84  -5.538 <0.001 ***
K500  - K0 == 0   -814.05     92.84  -8.768 <0.001 ***
K1000 - K0 == 0  -1328.22     92.84 -14.307 <0.001 ***
K2500 - K0 == 0  -1816.49     92.84 -19.566 <0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

35. ábra: Dunnett-próba eredménye *Rasamsonia emersonii*-ra glifozát hatására

Szignifikáns különbség a kezelt koncentrációk és a kontroll között csak 250 ppm- felett mutatkozik, de a 100 ppm-es koncentrációnál már mutatkozik csökkenés a telepterületre vonatkozóan.



36. ábra: A *Rasamsonia emersonii* átlagos telepterületei glifozát koncentrációk hatására

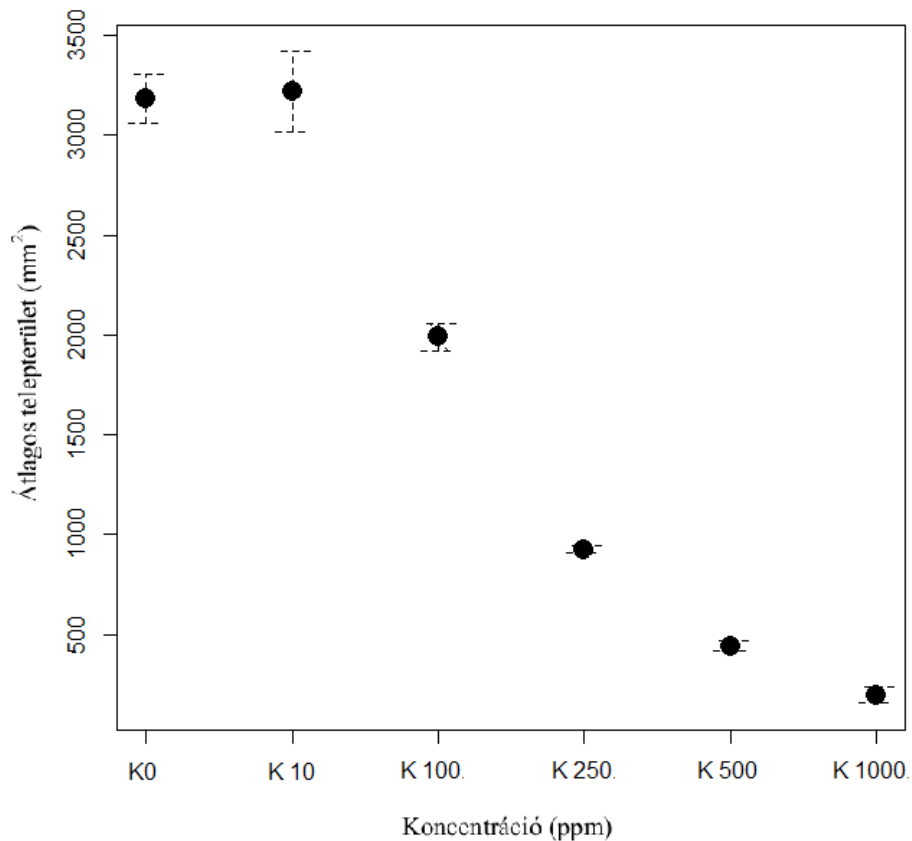
A telepterületek a mérete nagymértékben csökken a glifozát hatására ennél a fajnál is a koncentráció növekedésére.

A *Scytalidium thermophilum* némi serkentő, de nem szignifikáns hatást mutat a gombakoloníára 10 ppm-es koncentrációban, melyet a réznél és a kadmiumnál is tapasztaltam.

```
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10  - K0 == 0      34.28      127.62  0.269    0.999
K100 - K0 == 0    -1194.25     114.14 -10.463 <1e-05 ***
K250 - K0 == 0    -2258.71     114.14 -19.788 <1e-05 ***
K500 - K0 == 0    -2743.84     114.14 -24.038 <1e-05 ***
K1000 - K0 == 0   -2986.14     114.14 -26.161 <1e-05 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

37. ábra: Dunnett-próba eredménye *Scytalidium thermophilum*-ra glifozát hatására

A 100 ppm-es koncentrációtól már szignifikáns a különbség adódik a kontroll csoporthoz képest mérve.



38. ábra: A *Scytalidium thermophilum* átlagos telepterületei glifozát koncentrációk hatására

A telepterületek 10 ppm koncentráció feletti csoportokban meggyőző különbségekkel csökkennek a glifozát hatására, 2500 ppm-es koncentrációban a gomba a vizsgálati körülményeink között nem is növekedett, 1000 ppm-es koncentrációban pedig szinte 100%-os gátlás mutatkozik.

A *T. lanuginosus*-nál nem tapasztalható szignifikáns különbség a kontroll és a 10 ppm-es koncentráció között.

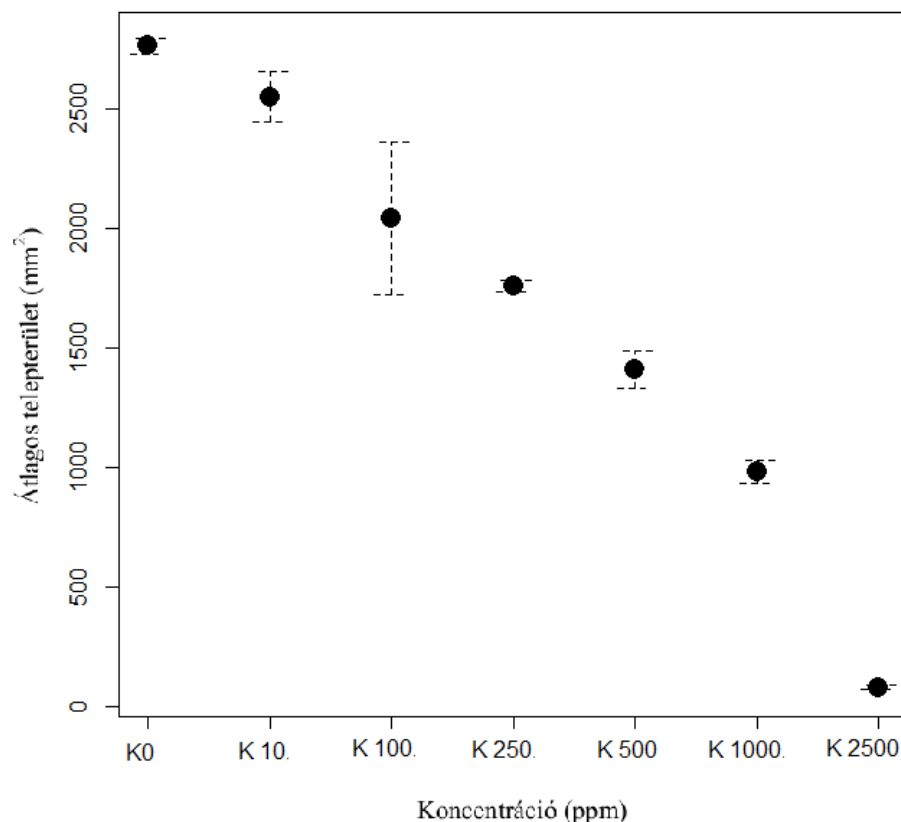
```

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
K10  - K0 == 0    -211.2      187.7   -1.125  0.74095
K100  - K0 == 0    -722.2      187.7   -3.848  0.00852 **
K250  - K0 == 0   -1004.8      187.7   -5.353 < 0.001 ***
K500  - K0 == 0   -1354.6      187.7   -7.217 < 0.001 ***
K1000 - K0 == 0   -1782.5      187.7   -9.496 < 0.001 ***
K2500 - K0 == 0   -2684.7      187.7  -14.303 < 0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

39. ábra: Dunnett-próba eredménye *Thermomyces lanuginosus*-ra glifozát hatására

A 100 ppm-es csoporttól kezdve, egészen a legmagasabb- 2500 ppm-es koncentrációig, minden egyes csoport erős szignifikanciát mutat a kezeletlen csoporthoz képest.



40. ábra: A *Thermomyces lanuginosus* átlagos telepterületei glifozát koncentrációk hatására

A csökkenése a kolóniáknak folyamatos, de még 2500 ppm-es koncentrációbaan sem éri el a glifozát a 100%-os gátló hatást, mely a gomba toleranciáját mutathatja.

További statisztikai elemzés során a glifozát gombákra hatását vizsgáltuk.

```

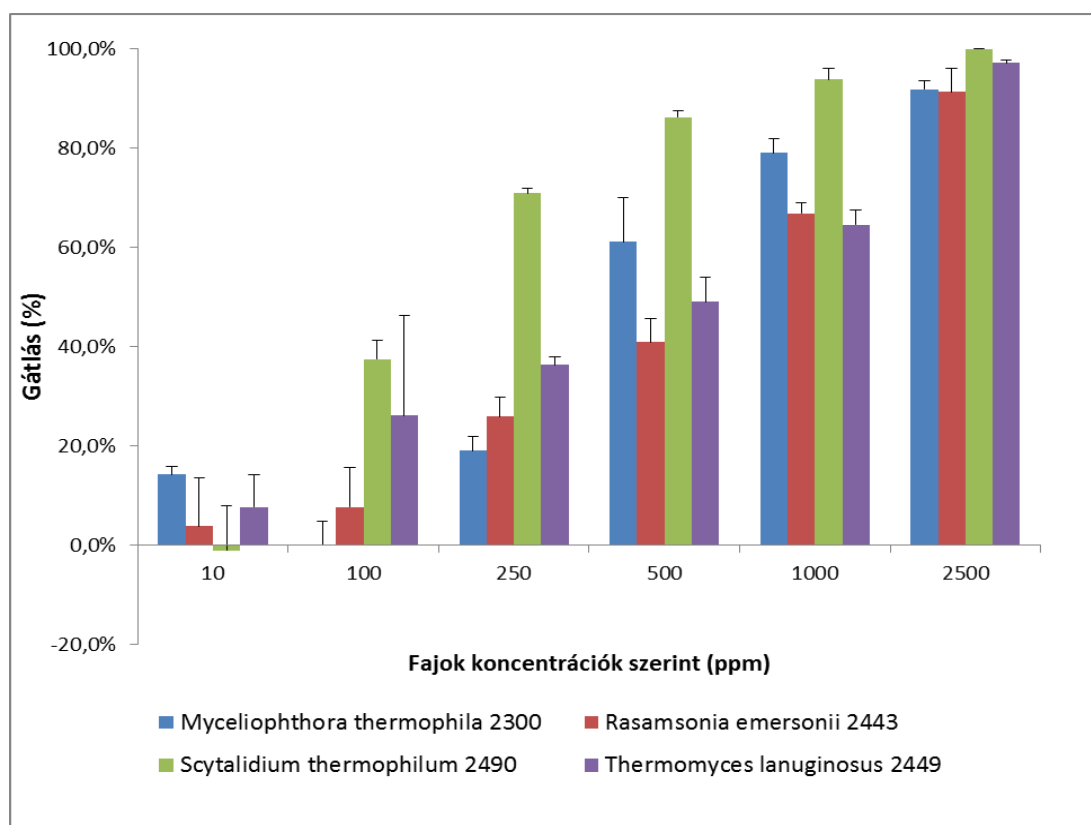
Response: terület
          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
faj          5305000   3  65.393 < 2.2e-16 ***
koncentracio 65568351   6 404.120 < 2.2e-16 ***
faj:koncentracio 9676638 17  21.049 < 2.2e-16 ***
Residuals    1433207 53
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

41. ábra: Többtenyezős-(Multi-way) Anova eredménye

Szignifikáns hatással van a faj és a koncentráció egymástól függetlenül, és együttes hatásuk is, mely interakciót enged felfedezni.

A glifozát területméretre való gátlását a 43. ábrán ismertenénk:



42. ábra: 43. ábra: Gombafajok gátlási % megoszlása koncentrációnként glifozát hatására

A legérzékenyebb fajnak a *Scytalidium thermophilum* mutatkozik a gátlási % alapján, mely már 2500 ppm-es koncentrációnál is 100%-os gátlást mutat. A további három faj még ebben a csoportban sem éri el a maximális gátlást. Kevésbé érzékeny a glifozátra a *T. lanuginosus* és a *R. emersonii*.

Effektív koncentrációk tekintetében a *S. thermophilum* a rézhez és a kadmiumhoz hasonlóan a négy faj közül a legérzékenyebb, 166,7 ppm-es glifozát koncentrációval. A *T. lanuginosus* és *R. emersonii* azonos 714,3 ppm-es, amíg a *M. thermophila* 454,5 ppm-es EC_{50} értékkel rendelkezett.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Törzsek kiválasztása érzékenységi screening vizsgálatához

A komposztokban leggyakrabban előforduló fajok közül érzékenységi screening-vizsgálat céljára a kiválasztás több szempont alapján történt. Legfontosabb szempontnak a telepek növekedési sebességét és elérhető átmérőjét tekintettük, ugyanis egy kiépítendő növekedési teszt használatának legfontosabb előnyei közé tartozik az alkalmazásával kapható gyors eredmény, valamint az hogy a kontrollhoz képest elért telepterületből a számított hatás mértéke széles skálán kifejezhető legyen. Az előkísérletekben leggyorsabb növekedésűnek bizonyult három faj (*Rhizomucor pusillus*, *Scytalidium thermophilum*, *Thermoascus aurantiacus*) közül a gátlási screening-vizsgálatokra a *Scytalidium thermophilum*-ot tartjuk legalkalmasabbnak, ugyanis telepe nagy arányban táptalajmicéliumból áll, emiatt hifáinak többsége fizikailag érintkezik a hatóanyaggal. Sötét színű telepének széle kontúros, átmérője ezáltal könnyen és egyértelműen mérhető. A másik két fajról ugyanez nem mondható el, hiszen telepük túlnyomó többségben világos légmicéliumból tevődik ki, telepük széle lobos és nem elég kontúros.

A telepnövekedési előkísérletekben még viszonylag nagy telepeket képező *Myceliophthora thermophila* és *Thermomyces lanuginosus* fajokat, elsősorban telepük szabályos kör alakja miatt a toxikus vegyületekkel szembeni screening-vizsgálatokra szintén előnyösnek tartottuk. A *Rasamsonia emersonii* vizsgált törzse ugyan az átlagosnál kisebb telepet képzett, azonban, mivel ez a faj evolúciós szempontból és a konídiumképzés módját tekintve a többi vizsgált fajhoz képest külön típust képvisel, a toxikus vegyületekkel szembeni érzékenység tekintetében is várható volt eltérés azokhoz képest.

5.2. Termofil gombák érzékenysége Cu^{2+} ionokkal szemben

A vizsgált termofil gombafajok a telepmorfológiai tulajdonságok és növekedési sebesség tekintetében nagymértékben eltértek egymástól.

A vizsgált termofil gombatörzseknek Cu^{2+} ionnal szembeni érzékenységét szemléletesen kifejezhetjük a különböző Cu^{2+} koncentrációjú S1A tápagon nőtt telepek méretének a kontroll tápagon nőtt telepek méretéhez viszonyított arányával, amit %-ban fejeztünk ki (19. ábra). A réz hormézisz hatása a *Rasamsonia emersonii*-ra 10 ppm, sőt 25 ppm koncentrációnál is megmutatkozott, és még a talajszennyezettségi B határértéket jelentő 75 ppm-nél sem érte el a gátlódás 20%-os mértékét. Ennek a fajnak a nagyfokú réztoleranciát igazolja, hogy növekedése még 100 ppm-nél sem esett 50%-os gátlás fölé.

Annak alapján, hogy a *Thermomyces lanuginosus* és a *Myceliophthora thermophila* vizsgált törzsei 10 ppm és 50 ppm közötti rézkoncentrációjú tápagarakon különböző mértékű, de jól mérhető telepnövekedést mutattak, és még a talajszennyezettségi határértékként előírt 75 ppm koncentrációnál is 51%-os, illetve 44,8%-os telepnövekedést értek el, ezt a két fajt rézzel szemben közepesen érzékenynek nyilvánítjuk.

A *Scytalidium thermophilum* 2490 jelű törzs Cu^{2+} ionokkal szembeni érzékenysége viszont jelentős mértékben eltért a többi faj vizsgált törzseinek érzékenységétől. 10 ppm-nél ugyan még jól kifejezett hormézisz hatás jelentkezett, 25 ppm-nél azonban már több, mint 30%-os, 50 ppm-nél pedig több, mint 80%-os gátlódást észleltünk. A talajszennyezettségi határértékként előírt 75 ppm-nél a *S. thermophilum* 2490-es törzs telepeinek mérete a kontrollénak csak 4,9%-át érte el, rézzel szemben tehát lényegesen érzékenyebbnek bizonyult ($\text{EC}_{50} = 31,85$ ppm), a másik három faj vizsgált törzsénél. Érzékenység szempontjából a további sorrend: *M. thermophila* ($\text{EC}_{50} = 102,04$ ppm), *T. lanuginosus* ($\text{EC}_{50} = 75,75$ ppm), *R. emersonii* ($\text{EC}_{50} > 151$ ppm). Gyors növekedéséből adódóan a *S. thermophilum*-nak a viszonyítási alapul szolgáló kontroll telepmérete 72 óra alatt eléri a Petri-csésze által adott maximális értéket, ezért ennél a fajnál a 48 órás inkubációs idő nem csak lehetséges előny, hanem szükséges megoldás is. Mivel EC_{50} értéke (31,85 ppm) az előírt határértéknek a fele alatt van, a *S. thermophilum* telepnövekedése, mint biológiai eszköz, alkalmasnak látszik arra, hogy segítségével réztartalmú szennyeződést detektáljanak.

5.3. Termofil gombák érzékenysége Cd^{2+} ionokkal szemben

A vizsgált négy faj Cd^{2+} ionokkal szembeni érzékenysége nagymértékben különbözött egymástól, de mégis egyes koncentrációknál két faj hasonló tendenciát mutatott, de eltérő szinteken. Ezek a *Thermomyces lanuginosus* és *Scytalidium thermophilum*.

A Cd^{2+} ionok a *M. thermophila*-t leszámítva már az általunk vizsgált legkisebb, 0,5 ppm-es koncentrációban a Cd^{2+} hatására némi növekedésre jótékony hatást mutat. 0,75 ppm-es koncentrációban megegyezett a kontroll telepterületekkel. A talajszennyezettségi B határértékben előírt 1 ppm-es koncentráció felett a *S. thermophilum* és *T. lanuginosus* már több mint 50%-os gátlást mutatott a kontroll értékhez képest. Ehhez képest a másik két faj, a *R. emersonii* és a *M. thermophila* csak a határérték négyszeres értéke (4,5 ppm) felett kezd 50%-os érték közelében gátlódni. A 29.ábrán látható, hogy az 5 ppm-es koncentráció három fajt 100%-ban gátol, a *M. thermophila*-ra 98%-os gátlással hat. Az EC_{50} értékek tekintetében, a rézzel kezelt csoportokhoz hasonlóan a *S. thermophilum* mutatkozott szintén a legérzékenyebb fajnak. Az EC_{50} értéke 2,01 ppm, második legérzékenyebbnek a *T. lanuginosus* mutatkozott 2,4 ppm-es EC_{50} értékkel, viszont a *S. thermophilum* már 2,5 ppm-es koncentráció felett csak 20%-át érte a kezeletlen csoport telepterületének. A másik két faj a *M. thermophila* és a *R. emersonii* szinte megegyező értékeket mutattak, 4,75 és 4,6 ppm-es koncentrációt, mely 50%-ban gátolja őket. Ebben a tekintetben is a két-két faj párba állítható, bár érzékenységre az utóbbi kettő egyezik meg leginkább. Mivel mindegyik faj számított EC_{50} értéke az 1 ppm-es határérték felett található, ezért kijelenthetnénk, hogy a kadmium szennyezettség vizsgálatára alkalmatlanok a törzseink, de némi bizonytalanságra ad okot, hogy kiugró érték jelentkezik 1 ppm-es koncentrációnál, melynél a két érzékenyebb fajunk eléri az 50% közeli gátlást.

5.4. Termofil gombák érzékenysége glifozáttal szemben

A glifozát hatása a termofil gombákra már a 10 ppm-es általunk vizsgált legkisebb koncentrációban is megmutatkozott. A rézre és kadmiumra legérzékenyebb *S. thermophilum* ebben a koncentrációban kis mértékben serkentett növekedést mutat. A 100 ppm-es koncentrációban, viszont már közel 40%-os gátlást. A 100 ppm-es koncentrációban a *M. thermophila* azonos értéket mutat a kontroll telepek területével. Az általunk másik két szennyezőanyaggal szemben legérzékenyebbnek értékelt *S. thermophilum* a 250 ppm-es koncentrációtól kezdve már több, mint 50%-ban gátolt a növekedésben, ezért a glifozáttal szemben a gátlási százalékok alapján is a legérzékenyebbnek tekinthető a négy faj közül. Gátlás tekintetében a közepesen érzékeny a *M. thermophila*. Kevésbé érzékeny a *T. lanuginosus* és a *Rasamsonia emersonii*. Effektív koncentráció tekintetében a *R. emersonii* és a *T. lanuginosus* teljesen megegyezik, 714,29 ppm-es EC_{50} értékükkel. A *M. thermophila* közepes érzékenységgel rendelkezik 454,5 ppm-es koncentrációval a kevésbé érzékeny fajok és a legérzékenyebb között, pont középen helyezkedik el. A legérzékenyebbnek a *S. thermophilum* bizonyult, melynek 166,67 ppm-es EC_{50} koncentrációja negyede az érzéketlen fajokénak.

Ezek alapján kijelenthető, hogy a négy vizsgált faj és az általunk beállított koncentrációk alapján a *Scytalidium thermophilum* talajszennyező herbicidekre vonatkozóan a glifozát szennyezettség mérésére szintén alkalmas a réz mellett.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A termofil gombák a 45-55°C közötti növekedési optimummal jellemezhető, mint egy hatvan gombafajt magába foglaló élettani csoport. Tagjai általában betöltik a fenti hőmérséklettel jellemezhető nicheket. Az idetartozó fajok az Ascomycota divízió különböző csoportjaiba tartoznak, egymással csak távoli rokonságban vannak. Ebből következően feltételezhető volt, hogy toxikus vegyületekkel szembeni érzékenységük is nagymértékben eltér egymástól. Az egyes fajok érzékenységének ismerete technológiai és tudományos szempontból egyaránt fontos.

Mivel a termofil gombák valamennyi faja micéliumosan növekedik, ezért érzékenységük vizsgálatához módszerként telepeik úgynevezett mérgezett agaron való növekedésének mérését választottuk. Azáltal, hogy telepnövekedésük a többség mezofil fajokhoz képest nagyobb sebességű, segítségükkel várhatóan lehetőség nyílik a hulladékminősítésben is használható, eukarióta mikroorganizmus alkalmazásán alapuló tesztrendszer kidolgozására.

Az általunk vizsgált három anyag tekintetében pozitívnak mondható, hogy volt mérhető hatásuk, és ez az elvárt tendenciát követte. A screen-tesztek során 8 faj közül választottuk ki, a tovább vizsgált 4 fajunkat. Ezek kezelhetősége, és az általunk megvizsgált táptalajok közül kiválasztott Saboraud tápagar bizonyult a legmegfelelőbbnek. Négy, különböző biológiai tulajdonságú termofil gombafaj egy-egy törzse mind a rézzel és a kadmiummal, mind pedig a glifozáttal szemben eltérő telepnövekedésbeli érzékenységet mutatott. Ezen a tápközegen mind a négy gombának megfelelően pigmentált és sajátos morfológiájú telepe növekedett, melyet jól el lehetett különíteni a közegtől, ezáltal a mérése is egyszerűbbé vált. Micéliumuk megfelelően szőtte be a tápközeget, mely által biztosak lehettünk benne, hogy a bekevert toxikus vegyület adekvát koncentrációjával a gombák hifája érintkezésbe került.

Rézzel szemben a *R. emersonii*, a *T. lanuginosus*, a *M. thermophila* és a *S. thermophilum* telepnövekedési EC_{50} értéke pedig >100 ppm, 71,2 ppm, 66,7 ppm és 38,3 ppm volt. A kadmiummal szemben ugyanezen törzsek érzékenyebbek és egymáshoz viszonyított érzékenységüket is eltérőnek találtuk (EC_{50} : 5,37 ppm, 5,29 ppm, 2,10 ppm, 0,22 ppm). Glifozáttal szemben a tesztelt törzsek kevésbé voltak érzékenyek (EC_{50} : 767 ppm, 360 ppm, 220 ppm, 141 ppm), de az egymás közötti általános érzékenységi sorrend nem változott.

A legérzékenyebbnek valamennyi célunk vonatkozásában a *S. thermophilum* bizonyult: telepnövekedésének EC_{50} értéke ismert szennyezők esetében 50-80%-kal alacsonyabb az előírt talajszennyezettségi határértékeknél. A *S. thermophilum* a kisebb koncentráció különbségekre is látható telepnövekedésbeli különbségekkel reagált, így utóbbi faj alkalmazásával az érzékenységi számításokhoz pontosabb értékeket kaphattunk.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék mindazoknak köszönetet mondani, akik nélkül ez a diplomadolgozat és a hozzátartozó kísérlet nem jöhetett volna létre.

Elsősorban a konzulensemnek Sebők Flórának, a rengeteg fáradozást, odaadó munkáját, szakmai és gyakorlati segítséget és mérhetetlen türelmét, melyet a kísérlet és diplomamunka írása alatt végig kaptam tőle.

Dobolyi Csabának a sok és fáradhatatlan munkát, segítőkészségét és a rengeteg észrevételét a dolgozattal kapcsolatban.

Köszönöm Kaszap Adriennek a sok segítséget a méréseknél, és a dolgozat során; Szabó Rubinának pedig a diplomamunka statisztikájához hozzáadott tudásáért. Külön köszönet továbbá Edőcs Brigittának a labormunka háttérének biztosításáért.

8. IRODALOMJEGYZÉK:

- Abdullah, S. K., Al-Bader, S. M. (1990): On the thermophilic and the thermotolerant mycoflora of Iraq. *Sydowia*, 42, 1-7.
- Anastasi, A., Varese, G. C., Marchisio, V. F. (2005): Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*, 97, 33-44.
- Apinis, A. E. (1963): Occurrence of thermophilous microfungi in certain alluvial soils near Nottingham. *Nova Hedwigia*, 5, 57-78.
- Apinis, A. E., Chesters, C. G. C. (1964): Ascomycetes of some salt marshes and sand dunes. *Transactions of the british mycological society*, 47, 419-435.
- Awao T, Mitsugi K (1973) *Trans Mycol Soc Jpn* 14:145-160 In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y.(szerk.) (2013): *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p34
- Bilay, V. T., Zakharchenko, B. A. (1987): *Opredelitel' termofil'nykh gribov*. Kholodny Institute of Botany, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev, p. 112.
- Cooney DG, Emerson R, (1964). *Thermophilic Fungi: an account of their biology, activities and classification*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, London.
- Craveri, R., Manachini, P. L., Craveri, A. (1964): Eumiceti termofili presenti nel suoli. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, 14, 13-26.
- Crisan, E. V. (1973): Current concepts in thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia*, 65, 1171-1198.
- Darvas B., Székács A.(2006): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*, L'Harmattan kiadó, p14,182
- Dix, N. J., Webster, J. (1995): *Fungal ecology*. Chapman & Hall, London, p. 549.
- Eggins, H. O. W., Malik, K. A. (1969): The occurrence of thermophilic cellulolytic fungi in a pasture land soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 35, 178-184.
- Evans, H. C. (1971): Thermophilous fungi of coal spoil tips. *Transactions of the british mycological society*, 57, 241-266.
- Gochenaour, S. E. (1975): Distributional patterns of mesophilous and thermophilous microfungi in two Bahamian soils. *Mycopathologia mycologia applicata*, 57, p. 155-167.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A. (1999): *Az elemek kémiája*, Nemzeti tankönyvkiadó p1605-
- Griffon, E., Maublanc, A. (1911): Deux moisissures thermophiles. *Bulletin de la société mycologique de France*, 27, 68-74.
- Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hedger, J. H. (1974): The ecology of thermophilic fungi in Indonesia. In Kilbertus, G., Reisinger, O., Mourey, A., Cancela da Fonsera, J. A. (eds.), *Biodegradation et Humification I*, Pierron Editeur, Sarreguemines, 59-65.
- Hoog, G.S. de. 2000. *Atlas of clinical fungi*. :1-1126 p769,938
- Hornok L. (2001): *Általános mikrobiológia*, Dialóg Campus Kiadó, Budapest- Pécs: p141-143

- Jakucs E., Vajna L. (2003): Mikológia, Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. p56,180
- Jangid, K., Williams, M. A., Franzluebbers, A. J., Sanderlin, J. S., Reeves, J. H., Jenkins, M. B., Endale, D. M., Coleman, D. C., Whitman, W. B. (2008): Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2843-2853.
- Jongbloed RH, Borst-Pauwels GWFH (1990) : Differential response of some ectomycorrhizal fungi to cadmium in vitro. *Acta BotNeerl* 39:241–246 in C.-G. Kim · S. A. Power · J. N. B. Bell Effects of cadmium on growth and glucose utilisation of ectomycorrhizal fungi in vitro in *Mycorrhiza* (2003) 13:223–226
- Latouche, C. J. (1950): On a thermophile species of *Chaetomium*. *Transactions of the british mycological society*, 33, 94-104.
- Lehel J., Laczay P. (2011): *Toxikológia*, Budapest p99
- Lindt, W. (1886): Mittheilungen über einige neue pathogene Schimmelpilze. *Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 21: 269–298.
- Massaccesi G., Romero, M. C., Cazau, M.C., and Bucsinszky , A.M.(2002) : Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina) in *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18:817-820, 2002
- McCreight JD, Schroeder DB (1982) Inhibition of growth of nine ectomycorrhizal fungi by cadmium, lead, and nickel in vitro. *Environ Exp Bot* 22:1–7 in C.-G. Kim • S. A. Power • J. N. B. Bell Effects of cadmium on growth and glucose utilisation of ectomycorrhizal fungi in vitro in *Mycorrhiza* (2003) 13:223–226
- Miehe, H. (1905): Über die Selbsterhitzung der Heues. *Arbeiten der deutschen Landwirtschaftsgesellschaft*, 111, 76-91.
- Miehe, H. (1907): Die Selbsterhitzung der Heues. Eine Biologische Studie. G. Fisher, Jena, p. 127.
- Minoura K, Yokoe M, Kizima T, Nehira T (1973) *Trans Mycol Soc Japan* 14:352–361. In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y.(szerk.) (2013): *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p18 p34
- Mouchacca, J. (1994): Thermophilic and thermotolerant fungi in the Middle East: Biodiversity and taxonomic reappraisal. *Vth International Mycological Congress, Vancouver, University of British Columbia, Lecture Abstract*, p. 150.
- Mouchacca, J. (1995): Thermophilic fung: Biodiversity and taxonomic status
- Mouchacca, J. (1995): Thermophilic fungi in desert soils, a neglected extreme environment. In „Microbial diversity and ecosystem function” (Allsopp et al., eds.). CAB International and Royal Holloway, University of London, 265-288.
- Mouchacca, J. (1997): Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie Mycol*, 18, 19-67.
- Mouchacca, J. (2000): Thermophilic fungi and applied research: a synopsis of name changes and synonymies. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 881-888.
- Opden Camp HJM, Stumm CK, Straatsma G, Derikx PJJ, Van Griensve LJLD (1990) *Microb Ecol* 19:303–309 In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y.(szerk.) (2013): *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p152
- Patkós A. (2007): *Biológiai kislexikon*, Typotex Elektronikus Kiadó Kft.

- Pugh, G. J. F., Blakeman, J. P., Morgan-Jones, G. (1964): *Thermomyces verrucosus* sp. nov. and *T. lanuginosus*. Transactions of the british mycological society, 47, 115-124.
- Samson, R. A., Tansey, M. R. (1977): Guide to thermophilic and thermotolerant fungi. Abstracts, Second International Mycological Congress, Tampa, Florida, p. 5.
- Schipper, M. A. A. (1978): On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. Studies in mycology, 17, 53-71.
- Stchigel, A. M., Guarro, J. (2007): A reassessment of cleistothecia as a taxonomic character. Mycological Research, 111, 1100-1115.
- Stolk, A. C. (1965): Thermophilic species of *Talaromyces* Benjamin and *Thermoascus* Miehe. Antonie van Leeuwenhoek, 31, 262-276.
- Stolk, A.C.; Samson, R.A. 1972. The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera II. Studies in Mycology. 2:1-65 p48
- Straatsma G, Gerrits JPG, Augustijn MPAM, OpDenCamp HJM, Vogels GD, Van Griensven LJLD (1989) J Gen Microbiol 135:751–789 In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kowarabayasi, Y.(szerk.) (2013): Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p151
- Straatsma, G., Samson, R. A. (1993): Taxonomy of *Scytalidium Thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. Mycological Research, 97, 321-328.
- Szabó I. M. (1989) A bioszféra mikrobiológiája, Akadémiai Kiadó, Budapest p1685-1696
- Taber RA, Pettit RE (1975) Mycologia 67:157–161 In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kowarabayasi, Y.(szerk.) (2013): Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p34
- Tansey, M. R., Brock, T. D. (1978): Microbial life at high temperatures: ecological aspects. In Kushner, D. J. (ed.) Microbial life in extreme environments. Academic Press, London, 159-216.
- Tewari P (2000) Thermophilic microorganisms from mushroom compost and their polysaccharolytic activities. M.Sc. Thesis, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, 99 p . In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kowarabayasi, Y.(szerk.) (2013): Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p152
- Tsiklinsky, P. (1899): Sur les mucédinées thermophiles. Annales de l'Institut Pasteur, Paris, 13, 500-505.
- Vágvölgyi Cs., Vastag M., Ács K., Papp T. (1999): *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. Mycological Research, 103, p. 1318-1322.
- Wang, J-H., Zhu, L-S., Meng, Y., Wang, J., Xie, H. and Zhang, Q-M.(2012) :The combined stress effects of atrazine and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida*- Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 31.
- Ward JE, Cowley GT (1972) Mycologia 64:200–205 In: Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kowarabayasi, Y.(szerk.) (2013): Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, Second edition. p34
- WHO Guidelines for Drinking-water Quality- Glyphosate and AMPA in Drinking-water-
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/glyphosateampa290605.pdf

http1:http://www.mycobank.org/TempFiles/20141017/n2posrn4saafvlvzq5svg0hve/TempF4007_Record__4007.jpg 2014.október 14.

http2:http://www.mycobank.org/TempFiles/20141017/n2posrn4saafvlvzq5svg0hve/TempF1832_Record__1832.jpg 2014.október 14.

http3:http://www.mycobank.org/TempFiles/20141017/n2posrn4saafvlvzq5svg0hve/TempF3877_Record__3877.jpg 2014.október 14.

http4:<http://www.krackeler.comgraphics0001jpg7725T-sm.jpg> 2014.október 14.

Szoftverek:

R statistics: <http://www.r-project.org/>

ImageJ: <http://imagej.nih.gov/ij/>

NYILATKOZAT

Alulírott **Kérész György Sándor** a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar **Ökotoxikológus MSc.** szak nappali tagozat 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, 2014.....hó.....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, 2014.....hó.....nap

.....
témavezető aláírása