

## KÖRNYEZETI ÁRTALMAK ÉS A BIODIVERZITÁS

A. Biodegradálható szerves szennyezőanyag hatása a talajmikroflórára.....	3
1. A mikroflóra katabolikus kapacitásának és mikrobiális aktivitásának vizsgálata hagyományos módszerekkel szénhidrogénekkal szennyezett talajok .....	3
1.1. Laboratóriumi kísérletek mesterségesen szennyezett talajokkal.....	4
1.1.1. Anyagok és módszerek.....	4
1.1.2. A közösség válasza biodegradálható szennyezőanyag jelenlétére .....	5
B: Mikrobiológiai populációk jellemzői toxikus fémekkel szennyezett talajban .....	7
2. Toxikus fém rezisztencia Gyöngyösorsoszi szennyezett talajainak mikroorganizmusaiban ..	7
3. Mikrobiológiai populációk biokémiai jellemzői toxikus fémekkel szennyezett talajban ....	10
3.1. A használt metódika: fiziológiai profil a szénhidrát-hasznosítás alapján .....	10
3.2. Eredmények.....	11
4. Fém-tűrő mikrogomba izolálása és fémakkumulációjának vizsgálata .....	14
4.1. Anyagok és módszerek.....	16
4.2. A fémakkumulációs vizsgálatok eredménye.....	17
5. Talajbaktériumok közösségének jellemzése géntechnikai módszerekkel: fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.1. Anyagok és módszerek.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2. A fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció módszere.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.1. Rögzítési módszerek .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.2. A hibridizációs próba penetrációját elősegítő permeabilizáció....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.3. A hibridizáció folyamata és a nem hibridizált próbahányad eltávolítása mosással .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.4. Az alkalmazott hibridizációs próba.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.3. Összes élő és élettelen sejt számának meghatározása DAPI festéssel	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.4. Eredmények.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.4.2. Talajszemcse-mikroorganizmus elválasztása centrifugálással és a permeabilizáció hatásának vizsgálata .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

A biodiverzitás és az evolúció alappillére a genetikai diverzitás. A genetikai diverzitásban fellépő veszteségek nagyon gyakran atropogén stressz hatására következnek be: ezt a jelenséget „genetikai erózióknak” is nevezi a modern szakirodalom.

A környezetszennyezéseknek a genetikai diverzitásra gyakorolt káros hatása minden kétséget kizáróan bebizonyosodott, de a várható károsodás, a kockázat mértékének megadására ma még nincs megfelelő módszerünk és objektív mérőszámunk.

A genetikai diverzitást jellemző mutatók, „indexek” általában nem objektív, kvantitatív mérőszámok, hanem relatív jellemzők.

Egységes és minden szempontból megfelelő metodika sem létezik a genetikai diverzitás kvantitatív mérésére, emiatt az Európában egységesen alkalmazott környezeti kockázatfelmérési metodikába sem illeszthetőek a diverzitásra kapott eredmények.

Mindezek ellenére nagy léptekkel halad ez a tudományág a megoldás felé, hiszen a modern géntechnikák kifejlődése újabb lökést adott és a hagyományos morfológiai, biokémiai és fiziológiai vizsgálatok mellé felsorakoztak a molekuláris-, elsősorban a DNS-technikák, melyek ismertetését és rendszerezését a 2. részjelentésben megadtuk.

A BME-MGKT környezeti mikrobiológia csoportjában is megindult a hagyományos mikrobiológiai módszerek mellett a modern géntechnikai módszerek fejlesztése és alkalmazása, utóbbi elsősorban a FISH technikára építve, melynek fizikai alapjait is megteremtettük egy fluoreszcens mikroszkóp, értékelő szoftver és a megfelelő eszközök és vegyszerek beszerzésével.

A projektben szereplő mindkét témakört támogatjuk a molekuláris genetikai alapok tisztázásával.

- A.) A biodegradálható szerves szennyezőanyagokkal szennyezett talajok esetében elsősorban a biodegradálható szennyezőanyaghoz, mint energiaforrásul szolgáló szubsztráchoz való alkalmazkodást vizsgáljuk hagyományos mikrobiológiai, biokémiai és modern géntechnikai módszerekkel.
- B.) A toxikus fémekkel szennyezett terület talajában a nehézfémekhez adaptálódott baktérium- és gombasejtek illetve közösségek egyes fiziológiai, biokémiai és genetikai jellemzőit vizsgáljuk.

A vegyi anyagok genetikai erózió hatásának számszerűsítése az ökotoxikológia egyik célja. Ez a mikrobiológiai, ökotoxikológia és molekuláris biológiai módszerek együttes alkalmazását kívánja meg. Ebbe az irányba tettünk néhány kezdő lépést az új bioremediációs technológiák alapjait kutató projekt keretében.

## **A. BIODEGRADÁLHATÓ SZERVES SZENNYEZŐANYAG HATÁSA A TALAJ- MIKROFLÓRÁRA**

A szubsztráthoz való alkalmazkodást, a közösség szaporodását, energiatermelését (légzését) és specifikus bontóképességét vizsgálhatjuk a talajban hagyományos mikrobiológiai, biokémiai és fiziológiai eljárásokkal és modern géntechnikákkal.

### **1. A MIKROFLÓRA KATABOLIKUS KAPACITÁSÁNAK ÉS MIKROBIÁLIS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA HAGYOMÁNYOS MÓDSZEREKKEL SZÉNHYDROGÉNEKKEL SZENNYEZETT TALAJOK**

A talajba került szennyezőanyagok lebontásában egymással kölcsönhatásban álló talajmikroorganizmusok, mikroorganizmus-közösségek vesznek részt. A mikrobiális közösség szerkezete a környezeti körülmények változásával párhuzamosan alakul, ezáltal lehetővé téve a szennyezőanyag folyamatos lebontását. A szennyezőanyagok degradációjának ökológiai jellemzéséhez, egy szennyezett terület öntisztuló képességének becsléséhez, a folyamatok megértéséhez és optimális bioremediációs technológiák tervezéséhez elengedhetetlen és elsődlegesen fontos feladat a lebontásban szerepet vállaló mikroorganizmus-populációk jellemzése, a mikrobák izolálása és identifikálása, tiszta kultúrák tenyésztése és vizsgálata. Ezen módszerek korlátja viszont, hogy csak a laboratóriumi körülmények között, táptalajon tenyészthető mikroorganizmusok vizsgálhatók. Ezen mikrobák a talaj mikrobapopulációjának mindössze 0,01–10% -át teszik ki. Ennek oka elsősorban az, hogy egyes fajok metabolikus előnyük révén túlnövik a lassabban szaporodó fajokat, így azok nem lesznek detektálhatóak, másodsorban pedig az, hogy az általános táptalaj is szelektálja a mikroorganizmusokat. Ugyanakkor az actinomyceták és a gombák élöcsíraszámára lemezöntéssel könnyen túlbecsülhető, mert a talajban spóráként jelenlevő mikroorganizmusok a környezeti körülmények megváltozására válaszul telepet képeznek. A hagyományos laboratóriumi módszereket egészítik ki a mikroorganizmusok és mikroba-közösségek *in situ* aktivitásának és kölcsönhatásainak vizsgálatára alkalmas molekuláris biológiai és mikrobiális ökológiai módszerek. Ezen technikák által lehetővé válik a szennyezőanyag hatására a mikrobapopulációban bekövetkező változás, mint pl. fajeloszlás, egyedsűrűség megváltozásának detektálása.

A szénhidrogének környezetre káros hatása kémiai összetételüktől függően toxicitásukkal, mutagén és karcinogén tulajdonságukkal, ezenfelül kismértékű biológiai hozzáférhetőségükkel és biodegradálhatóságukkal jellemezhetőek.

Könnyen biodegradálható vegyületek környezetbe kerülése esetén röviddel a szennyezést követően megkezdődik a mikroorganizmusok adaptációja, a degradáció folyamatában résztvevő, indukálható enzimek termelése. Ugyanakkor a nehezen biodegradálható szennyezőanyagok bontásának gyakori előfeltétele a mikroorganizmusok genetikai állományának módosulása. (Van der Meer *et al.* 1992)

A szénhidrogének közül az alkánok lebontására számos talajban élő mikroorganizmus képes, mint pl. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* és egyes gombafajok.

A talajmikroflórában közvetlenül a szennyezést követően lejátszódó folyamatok a következők: fajeloszlásban bekövetkező változások, a szennyezőanyag lebontásában résztvevő enzimek indukciója, mutáció, szelekció, horizontális géntranszfer.

Ebben a fejezetben a biodegradációt, jelen esetben talajszennyező szénhidrogéneket bontó talajmikroorganizmusokat vizsgáljuk, mint egy aktív közösséget, a közösség által végzett

bontás és a bontáshoz szükséges légzés mérésén keresztül. A kísérletek teljesen kontrollált mikrokozmoszokban, mesterséges szennyezés alkalmazása mellett folytak.

## **1.1. Laboratóriumi kísérletek mesterségesen szennyezett talajokkal**

Laboratóriumi méretű kísérletekben hagyományos módszerekkel vizsgáltuk szénhidrogénekkal mesterségesen szennyezett talajok mikroflórájának katabolikus kapacitását és mikrobiális aktivitását. Jelen kutatás célja a hagyományos mikrobiológiai és biokémiai tesztek kiegészítése molekuláris biológiai módszerekkel, a szennyezőanyagok talajba kerülését követően a mikroorganizmusok adaptációjának jellemzése, a mikrobaközösség szerkezetében bekövetkező változások detektálása, a szennyezőanyagot bontani képes mikroorganizmusok elszaporodásának vizsgálata, azok mennyiségi és minőségi meghatározása.

### **1.1.1. Anyagok és módszerek**

#### **A talajminták extraktum tartalmának meghatározása**

A légszáraz, eldörzsöléssel homogenizált talajmintákból 5-5 g-ot mértünk Erlenmeyer-lombikba. Az extrakciót két lépésben végeztük a szénhidrogének minél nagyobb hatásfokú kinyerése érdekében. A talajhoz 10 cm<sup>3</sup> n-hexán:aceton 2:1 elegyet adtunk és lezártuk a lombikot. Az így előkészített mintákat 10 percig ultrahangos fürdőben extraháltuk, majd a felső letisztult oldószeres fázist szűrőpapíron leszűrtük és újabb 10 cm<sup>3</sup> oldószerrel 10 percig extraháltuk. Az extraktumot szűréssel elkülönítettük a talajrészecskéktől. A maradék extraktum bepárlása után a lombikban levő maradékot mennyiségileg, tömegméréssel mértük.

#### **Aerob heterotróf sejtek koncentrációjának meghatározása a talajban hígítással**

Az eljárás alapelve, hogy a vizsgálandó anyagból előállított alapsuszpenzióból hígítási sort készítenek, majd az előzetesen becsült élőcsíraszám alapján a várható sejtszámnak megfelelő hígításokból leoltanak. Tenyésztés után a kifejlődött telepeket megszámlálják, majd a hígítás és bemérés ismeretében az élőcsíraszámot a vizsgált anyag egységnyi mennyiségére vonatkoztatva adják meg.

##### Táptalaj:

Húslé-agar:	3 g húskivonat	0.5 g NaCl
	5 g glükóz	5 g pepton
	17 g agar	
	1000 cm <sup>3</sup> víz	
	pH~7.0	

##### A vizsgálat menete:

A szilárd talajokat alapos keveréssel, az iszap állagú talajokat rázógéppel homogenizáltuk. 1 gramm talaj bemérése után 9 ml vízzel alapsuszpenziót készítettünk, melyet a homogenitás elérése érdekében fél órán át rázógépen homogenizáltunk. Ez fontos azért is, mivel a talaj mikropapillárisaiban élő mikroorganizmusok a talszemcsékhez kötöttek, és így csak kis részük kerül a talajoldatba. Az így nyert alapsuszpenzióból készítettünk hígítási sort.

Ezután az előzetesen becsült élőcsíraszám alapján a várható sejtszámnak megfelelő hígításokból sterilizált Petri-csészébe, húslé-agar táptalajra leoltottunk. Minden Petri-csészébe 100 µl szuszpenziót juttattunk, majd a körülbelül 10 ml 50-60°C-os húslé agarban egyenletesen eloszlattuk. A kihűlt, megszilárdult homogén elegyet tartalmazó csészét

megfordított helyzetben (a víz kondenzálása miatt) termosztátba helyeztük, és a mikroorganizmusokat 30 °C-on 48 órán át tenyésztettük. Tenyésztés után a kifejlődött telepeket megszámláltuk, majd a hígítás és bemérés ismeretében az élőcsíraszámot a vizsgált anyag egységnyi mennyiségére vonatkoztatva adtuk meg (db sejt/g talaj). A húslé-agar tápközeg átlátszó, így a kifejlődött telepek jól felismerhetőek. A módszer jogosultságának feltétele, hogy egy sejtből csak egy telep nő ki és minden sejtből alakul ki telep.

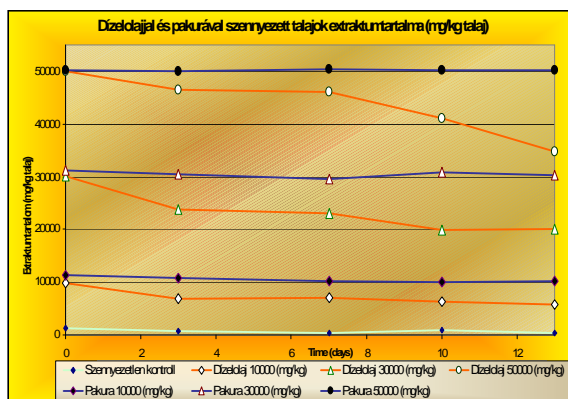
### Dehidrogenáz enzimaktivitás meghatározása a termelődött trifenil formazán koncentrációjának mérésével (Thalman, 1968)

A talajok mikrobiális aktivitásának meghatározására alkalmas módszer, a trifeniltetrazolium klorid (TTC) trifenil formazánná (TPF) redukálódásának mérésén alapul.

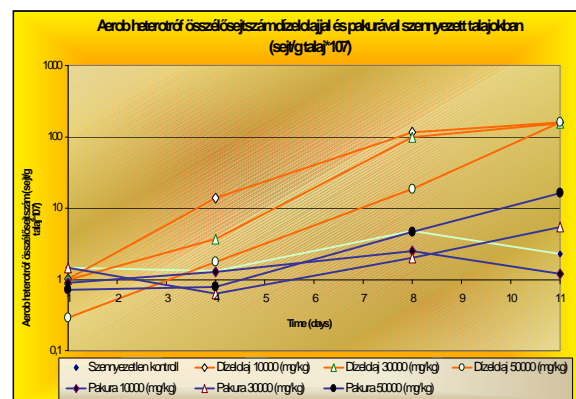
5 g nedves talajmintához 5 ml 0,01 g/ml TTC adtunk. A homogenizálást követően 24 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk a talajszuszpenziót. A kontroll minta esetében 5 ml Tris/HCL (100 mM) pufferhez adtuk az 5 ml 0,01 g/ml TTC oldatot. Az inkubáció után 40 ml acetont adtunk a mintához, és alapos homogenizálás után újabb 2 órán át sötétben inkubáltuk a talajszuszpenziót. Ezt követően szűrővel távolítottuk el a fotométert zavaró talajszemcséket, majd 546 nm hullámhosszon mértük a tiszta felülúszó optikai denzitását. A TPF koncentrációját TPF standard oldatokkal készített kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

#### 1.1.2. A közösség válasza biodegradálható szennyezőanyag jelenlétére

A dízelolaj és nehezen biodegradálható pakura aerob biodegradációját mesterségesen szennyezett talajokban integrált fizikai-kémiai-biológiai módszeregyüttessel mértük.

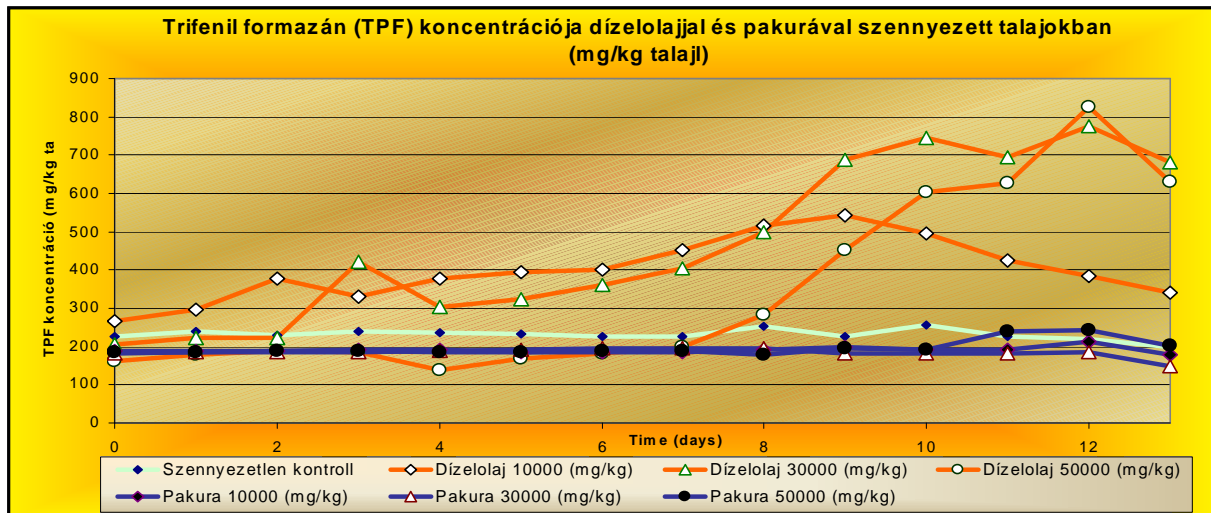


1.1. ábra. Dízelolajjal és pakurával szennyezett talajok extraktumtartalma (mg/kg talaj)



1.2. ábra. Aerob heterotróf összélősejtszám dízelolajjal és pakurával szennyezett talajokban (sejt/g talaj \* 10<sup>7</sup>)

Az eredmények igazolták, hogy az adaptáció a könnyen bontható szennyezőanyag jelenlétében rövid idő alatt végbement. (10 000 ppm dízelolaj szennyezésnél 3 nappal a szennyezést követően 30%-kal nőtt a mikrobiális aktivitás, az aerob heterotróf élősejtek száma hétszeresére nőtt, miközben az extraktumtartalom 32%-kal csökkent. 30 000 ppm dízelolaj-tartalom esetén 3 nap elteltével 100 %-kal nőtt a mikrobiális aktivitás, az élősejtek száma a szennyeztelen kontroll talajbeli érték négyszeresére változott, az extraktumtartalom 21%-kal csökkent. Az 50 000 ppm dízelolajjal szennyezett talajokban 7 napos lag fázist tapasztaltunk, amely feltételezhetően a nagy koncentrációban jelenlevő szennyezőanyag toxikus hatása miatt következett be. A pakurával szennyezett talajokban két hét adaptáció nem volt elég arra, hogy a pakuratartalom csökkenjen, a mikrobaközösségben végbemenő mennyiségi változások viszont megindultak, az aerob heterotróf sejtszám növekedésnek indult (1. és 2. ábra).



1.3. ábra. Dehidrogenáz enzimaktivitás meghatározása dízelolajjal és pakurával szennyezett talajokban trifenil formazán koncentrációjának mérésével

A szénhidrogénbontó közösség légzéssel arányos jele (3. ábra) a könnyen bontható dízelolaj szubsztrát esetében a szennyezőanyag koncentrációjától függően 10 000 ppm-nél azonnal, 30 000 ppm-nél 2 nap elteltével, 50 000 ppm-nél egy hét múltán indult meg. A maximális légzés érték a kis koncentráció esetén a 9. napon, a közepesnél a 12. napon, a legnagyobbán valószínűleg még később. A maximális légzésérték a szennyezőanyag-koncentrációval arányosan nő, egy bizonyos határig, amint azt már korábbi (2. és 3. részjelentés) kísérleti eredményeink is mutatták. A nehezen bontható pakura szennyezőanyaghoz való alkalmazkodás lassabb, kevesebb a biodegradálható komponensek száma, mint a dízelolaj esetében, ezért a légzés intenzitása sem nő meg jelentősen az első 12 napban, a 10. nap környékén mérhető némi dehidrogenáz-aktivitás növekedés a kontrollhoz viszonyítva.

Láthattuk tehát, hogy a talajban élő közösség bizonyos idő elteltével alkalmazkodik az új helyzethez, a szennyezett állapothoz, a szennyezőanyagot, mint szubsztrátot hasznosítja.

E mögött a folyamat mögött egy sor genetikai történés húzódik:

1. Megindul az addig nem működő, amúgy ki- és bekapcsolható gének működése, un. adaptív enzimek termelődnek az új szubsztrát, a szennyezőanyag hatására.
2. Önreplikációra képes genetikai elemeken (plazmidok, ugráló gének, fágok, stb.) hordozott gének megsokszorozódnak a szennyezőanyag jelenléte, mint szelekciós nyomás hatására.
3. Horizontális géntranszfer: a megsokszorozódott gének a mozgékony genetikai elemek segítségével elterjednek a közösség tagjaiban, átadódnak a közösség felvételre nyitott tagjaiba és ott működésbe lépnek.
4. A szennyezőanyag, mint mutagén ágens hatására mutációk indukálódnak a talajlakó mikroorganizmus-közösség tagjaiban, amelyek olyan mutánsok létrejöttéhez vezetnek, melyek képesek részt venni a szennyezőanyag bontásában. A mutációkat követő szelekció a közösség összetételének megváltozásához és tökéletesebb alkalmazkodásához vezet.

## **B: MIKROBIOLÓGIAI POPULÁCIÓK JELLEMZŐI TOXIKUS FÉMEKKEL SZENNYEZETT TALAJBAN**

A talaj, mint láttuk, igen bonyolult élőhely, a komplex szerves és szervesen mátrixhoz kapcsolódnak a talajmikroorganizmusok, a tápanyagok és a szennyezőanyagok is. A kölcsönhatások nagy száma miatt előre megjósolhatatlan történésekre kell számítanunk.

A talajban élő és működő mikroorganizmus-közösséget hagyományos, izolálással és tenyésztéssel kombinált mikrobiológiai módszerekkel nem is lehet megfelelően vizsgálni, hiszen az élő sejtek nagy része nem nyerhető ki a szilárd mátrixból, más részük pedig csak *in vivo* életképes, a lombikban nem.

Ebben a fejezetben vizsgáljuk a Gyöngyösorszi szennyezett talaj hatását az ott élő mikroorganizmus-közösség mennyiségi és minőségi jellemzőire. A rezisztens sejtek koncentrációjának nagymértékű megnövekedése, a diverzitás megváltozása, főként a fajok számának és metabolikus aktivitásának csökkenése extrém fémtűrő mikroorganizmus fajok megjelenése a a toxikus fémekkel összefüggő ártalmak előrehaladott állapotát jelzik (genetikai erózió) annak ellenére, hogy a terület vizuálisan nem hat károsodottnak. Ezeknek a hagyományos és modern mikrobiológiai és biokémiai módszerekkel is kimutatható eltéréseknek az egész közösséget érintő genetikai alapjait is keressük, hogy elsődleges bizonyítékot nyerjünk a környezeti kockázat meglétére és nagyságára, hogy ebből egy korai figyelmeztető rendszer legyen kifejleszthető.

## **2. TOXIKUS FÉM REZISZTENCIA GYÖNGYÖSOROSZI SZENNYEZETT TALAJAINAK MIKROORGANIZMUSAIBAN**

A fémtűrő mikroorganizmusokat a Gyöngyösorszi flotációs meddőhányóról gyűjtött talajmintákban vizsgáltuk, tehát ugyanonnan, ahonnan a közösség fiziológiai diverzitásának vizsgálatához vett minták származnak.

A talajmintákból készült hígított talajszuszpenziókból végeztük a sejtszám-meghatározásokat.

**Az aerob heterotróf sejtek számát** telepkepződés alapján határozzuk meg. Az eljárás alapelve az, hogy a mikroorganizmusokat különböző koncentrációban tartalmazó sejtsuszpenziókból a baktériumokat a számukra megfelelő tápanyagokat tartalmazó közegbe visszük, majd kedvező hőmérsékleti körülmények közt termosztálva hagyjuk, hogy minden sejtől telep fejlődjen. Ezeket megszámlálva nyerhetünk információt a mikroorganizmusok mennyiségi eloszlásáról a vizsgált talajban. A helyes eredmény feltétele, hogy minden élő sejtől egy telep fejlődjen. Ezt a helyes eljárás biztosítja (hígítás, homogenizálás, szaporodási feltételek biztosítása, stb.).

A módszer feltételezi azt, hogy a különböző hígításokból kivett leoltandó térfogatok jól reprezentálják magát a hígítást. Három egymást követő hígításból számlálunk telepeket. Ezeket átlagoljuk. A húslé-agar tápközeg átlátszó, így belsejében a kifejlődött telepek jól felismerhetők. A telepek megszámlálásával az aerob heterotróf sejtek számára kapunk tájékoztató értéket. Az eredményt db telepkepző sejt/gramm talaj mértékegységben adjuk meg.

**A fémtűrő baktériumok és gombák számának meghatározása** szintén lemezöntéses módszerrel történt.

Az eljárás alapelve és menete megegyezik az aerob heterotróf sejtek számának meghatározásával. Az aerob heterotróf sejtek közül a fémtűrő mikrobák kiválasztásához szelekciós nyomást kell alkalmazni. A szelekciós nyomást az alapsuszpenzióval együtt a

táptalajba kevert adott összetételű nehézfém oldat adja. A Petri-csészékben éppen a talajokra vonatkozó B-szennyezettségi határértéket állítottuk be minden toxikus fémből.

Alapvető különbség a baktériumok és a gombák szelekciójakor alkalmazott eltérő táptalaj. Baktériumok esetében húslé-agart, míg gombák esetében maláta-agart kell alkalmazni.

A kinőtt telepek megszámlálásával a fémtűrő mikrobák számát kaptam meg db telepkepző sejt/gramm nedves talaj mértékegységben.

A baktérium és gombaszám, mind az aerob heterotróf összes sejt, mind a fémtűrő sejtek számát értve alatta nem korrelál a kémiai és ökotoxikológiai eredményekkel. Ennek oka az, hogy régi szennyeződés lévén, a talaj mikroflórája már adaptálódott a nagy nehézfémterheléshez. Az eredmények az 1. táblázatban láthatóak.

A tómederben (10, 11, 13, 15 számú minta) mérhető a legkisebb mikrobaszám, ennél 1-2 nagyságrenddel nagyobb sejtszám mérhető az út mentén (1, 6, 7, 23, 24, 26), valamint az út és a tó közötti területen (8, 17, 18, 20, 22).

Megállapítható tehát, hogy a tenyésztéssel kapott sejtszámok nem jellemzik kvantitatíve a szennyezett talajt, számuk nem arányos a szennyezettség illetve a toxicitás mértékével. Viszont a fémtartalmú tápagon kinőtt sejtek nagy száma egyértelműen mutatja, hogy a meddőhányó talajának mikroorganizmusai már alkalmazkodtak a körülményekhez, a talaj nagy fémkoncentrációjához.

2.1. táblázat: A talajok jellemzése kémiai, biológiai és ökotoxikológiai vizsgálatokkal: az eredmények összefoglalása

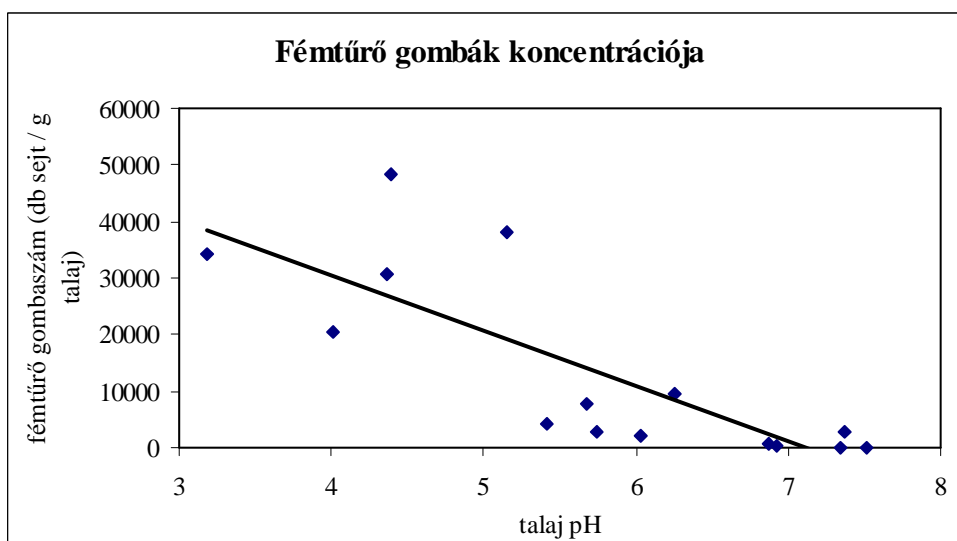
Minta	pH	Σ RQ	Élősejtszám (db sejt/g talaj)	Fémtűrő bakt.szám (db sejt/g talaj)	Fémtűrő gombaszám (db sejt/g t)	Toxicitás <i>Vibrio fisheri</i> - vel mérve	Toxicitás <i>Azotobacter chroococcum</i> -mal mérve
1	6,87	44,45	1 670 000	100	570	toxikus	toxikus
6	3,19	14,40	503 000	13 500	34 100	toxikus	toxikus
7	6,03	25,75	310 000	1 000	2 150	toxikus	nagyon toxikus
23	6,25	101,96	345 000	500	9 450	toxikus	nagyon toxikus
24	4,01	19,55	61 000	1 250	24 000	toxikus	nagyon toxikus
26	4,39	21,08	389 000	44 500	48 400	nagyon toxikus	nagyon toxikus
10	6,96	827,11	10 000	0	300	nagyon toxikus	nagyon toxikus
11	7,51	771,95	10 000	0	0	nagyon toxikus	nagyon toxikus
13	7,34	231,08	210 000	300	100	toxikus	nagyon toxikus
15	7,37	205,37	50 000	0	2 950	toxikus	nagyon toxikus
8	4,36	12,24	176 000	61 500	30 700	nagyon toxikus	nagyon toxikus
17	5,15	11,45	738 000	47 000	38 100	toxikus	nagyon toxikus
18	5,74	14,74	484 000	950	2 650	toxikus	nagyon toxikus
20	5,41	20,07	450 000	1 500	4 100	toxikus	nagyon toxikus
22	5,68	13,40	371 000	1 150	7 930	toxikus	nagyon toxikus

RQ azt adja meg, ahogy a talajban kémiai analízissel meghatározott fémkoncentráció hányszorosa a szennyezettségi határértéknek. Az As, Cd, Cu, Zn és Pb fémekre kapott törtek összege a Σ RQ.



Az extrém nagy fémtartalmú talajok nagyon kisszámú élő sejtet tartalmaznak, ezekben a fémtűrő sejtek száma is kicsi. A 10-20-szoros határérték túllépéssel jellemezhető minták legtöbbször vannak fémtűrő sejtek, némelyikben jelentős mennyiségben. Az aerob heterotróf sejtek száma általában viszonylag kis érték, jó minőségű talajhoz viszonyítva 2–3 nagyságrenddel kisebb. Egyértelmű az eredményekből, hogy a vizsgált talajmintákban a helyi viszonyokhoz adaptálódott mikroflóra él, a mikrobaszámok egy bizonyos határon belül kevés összefüggést mutatnak a fémtartalmakból adódó kockázattal. Ennek veszélye az, hogy a fémmel szennyezett talaj fémtűrő élővilága a talaj toxikus anyagtartalmát nagy intenzitással továbbjuttatja a táplálékláncban.

A fémtűrő gombák koncentrációja egyértelműen csökken a talaj pH növekedésével (2.1. ábra). Ennek az a magyarázata, hogy a gombák számára a savanyú kémhatás a kedvezőbb. Elmondható továbbá, hogy a talajok nagy részében több volt a fémtűrő gomba, mint a fémtűrő baktérium.



2.1. ábra: A fémtűrő gombák koncentrációja a talaj kémhatásának függvényében

### **3. MIKROBIOLÓGIAI POPULÁCIÓK BIOKÉMIAI JELLEMZŐI TOXIKUS FÉMEKKEL SZENNYEZETT TALAJBAN**

A modern biokémiai és géntechnikai módszerek lehetővé teszik a talajban élő mikrobaközösség időbeni és térbeni változásainak követését. Az egyik ilyen, a közösség szintjén is információt szolgáltató módszer az egyszerű szénforrások hasznosításának mintázatán alapul. Az eljárás lényege, hogy a talajban élő mikrobapopuláció válaszát együttesen vizsgáljuk. A feltett kérdés, hogy ez a közösség aerob körülmények között egyszerű szénforrások (cukrok, zsírok, aminosavak, egyéb biológiai eredetű makromolekulák) melyikét képes szénforrásként hasznosítani. A szénforrás-hasznosítási mintázat alapján teszünk különbséget a szennyezetlen referenciaterületen és a szennyezett, feltehetően genetikailag eródált területen működő mikrobiológiai közösségek között (Garland, 1996; Engelen, et al, 1998; Knight et al, 1997, Kelly and Tate, 1998, Dobler et al, 2000). A méréstechnikai aspektusokat és a metodika alkalmazhatóságát Zak és munkatársai, (1994), Haack és mtsai (1995), valamint Smalla és mtsai (1998) dolgozták ki részleteiben.

A talaj fémszennyezettsége mélyreható változásokat okoz a talajmikroflóra mennyiségi és minőségi viszonyaiban (Gauch, 1982; Cervantes és Vasa, 1991; Cervantes, 1995; Bossio és Bader és mtsai, 1999). Szennyezett területekkel összefüggésben Roane és Kellog (1996), magyarországi viszonylatban Horváth és Gruiz (1996) végeztek ilyen jellegű vizsgálatokat.

A fiziológiai profil vizsgálatában nyújtott segítséget és együttműködést ezúton is köszönjük a Zürichi Egyetemnek.

#### **3.1. A használt metodika: fiziológiai profil a szénhidrát-hasznosítás alapján**

Az egyszerű szénforrás-hasznosítás közösség szintű vizsgálatához a tiszta tenyészetek vizsgálatára kidolgozott BIOLOG rendszert módosítottuk, illetve adaptáltuk.

95 különböző szénforrásból a talajban élő közösségek reprodukálható és helyszínspecifikus szénforrásbontó-mintázatot adnak. A többváltozós statisztikai értékelés adja meg az összefüggést jelen esetben a szennyezettség és a szénforrás-hasznosítás között. De hasonlóképpen lehetne vizsgálni az összefüggést a klíma, az évszakok eredményezte vagy bármilyen más környezeti paraméter és a fiziológiai profil, vagyis a szénforrás-hasznosítás között.

A Gyöngyösorosziból származó szennyezett talajok aktivitását, fiziológiai profilját a fémtartalom és a pH függvényében vizsgáltuk. A nagy heterogenitás miatt három párhuzamos BIOLOG GN illetve ECO lemezt alkalmaztunk minden egyes mintára. Az ECO-lemez esetében a vizsgálandó szubsztrátok száma csökkentett (31) a környezetben élő mikroorganizmusok igényeinek megfelelően.

A komplex vizsgálat céljai:

1. A Gyöngyösoroszi bányaterületről származó talaj és meddőanyag mintákban talált mikrobiológiai-fiziológiai eltérések vizsgálata a közösség szénforrás-hasznosításán keresztül.
2. az eltérések összefüggése a talajminta eredetével, tulajdonságaival,
3. a csökkent mikrobiológiai aktivitás összefüggése a szennyezettséggel.

A vizsgálathoz begyűjtött talajminták jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

3.1. táblázat: A fiziológiai profil vizsgálatához használt talajminták

Jalzás	Eredet	pH	Cu mg/kg	Pb mg/kg	Zn mg/kg
TD-1	Meddőhányó, vörös meddőanyag a kiszáradt tározóból	6.6	1959	4928	27428
TD-2	Meddőhányó, szürke flotációs meddőanyag	6.9	649	778	1677
TD-3	Meddőhányó, sárga takaró réteg, sziklás, kopasz	3.1	213	580	734
TD-4	Meddőhányó, algával borított üledék a tóból	3.0	45	138	333
TD-5	Meddőhányó, sárga takaró réteg, mállott, dúsan füves	3.2	38	64	125
TD-6	Meddőhányó, sárga takaró réteg, gyér növényzet	2.1	13	54	24
Gyo-1	Gy.oroszi, elárasztott kert, felső barna réteg, Tokától 2 m	5.3	423	631	2249
Gyo-2	Gy.oroszi, elárasztott kert, felső, sárgás réteg, Tokától 2 m	4.4	500	1910	911
Gyo-3	Gy.oroszi, elárasztott kert, alsó sárgás réteg, 2 m	4.3	460	nd	605
Gyo-4	Gy.oroszi, elárasztott kert, felső réteg, Tokától 10 m	6.5	172	388	1318
Zu-1	Kontroll talaj	6.5	45	73	171
Magyar határérték			100	100	250

A pH-t 5:1-es vizes szuszpenzióból határoztuk meg az MSZ 21470/2-81 szabvány szerint, a teljes fémtartalmat, teflon bombában történő királyvíz+hidrogénfluoridos emésztés után atomemissziós spektrofotometriával (AES).

A talajbaktériumok szubsztráthasznosítását hígított talajszuszpenzióból vizsgáltuk BIOLOG Gram-negatív (GN) (95 szubsztrát) és ECO lemezeken (31 szubsztrát). A vizsgálatokat a Zürichi Egyetem Növénybiológiai Tanszékén folytattuk. A szénhidráthasznosítás kiértékelése inkubálás után a hozzáadott tetrazólium-vegyülettel adott színreakció alapján történt. A BIOLOG lemezeket egy speciális olvasóba helyezve (Reader, 2001, Anthos Labtech Instruments) történt az értékelés. A leolvasott értéket AWCD értékben (Average Well Color Development) adtuk meg.

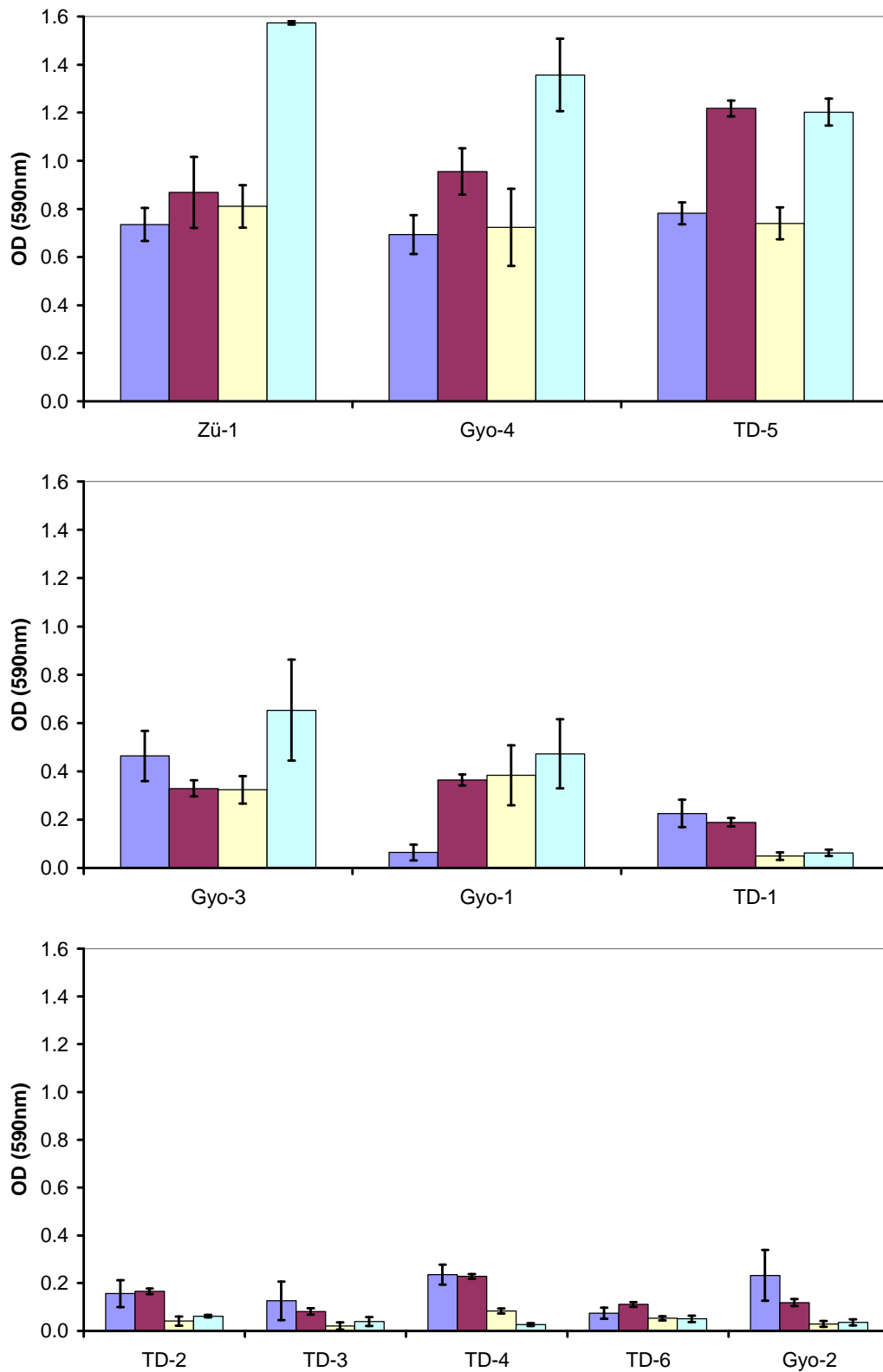
A statisztikai értékelés során az AWCD értékek statisztikailag elfogadható eltéréseit kerestük. Garland és Mills (1991) ajánlása szerint az AWCD értékeket a szénforrások szerint 4 csoportba soroltuk: polimerek, szénhidrátok, karbonsavak és aminosavak. Bevezettük a szubsztrát-gazdagság (S = substrate-reachness) fogalmát, amely a hasznosított szubsztrátok számát adja meg a háttérrel korrigálva.

A PCA (Principal Component Analysis) többváltozós statisztikai értékelés a DataMost (1994) szoftver segítségével történt.

## 3.2. Eredmények

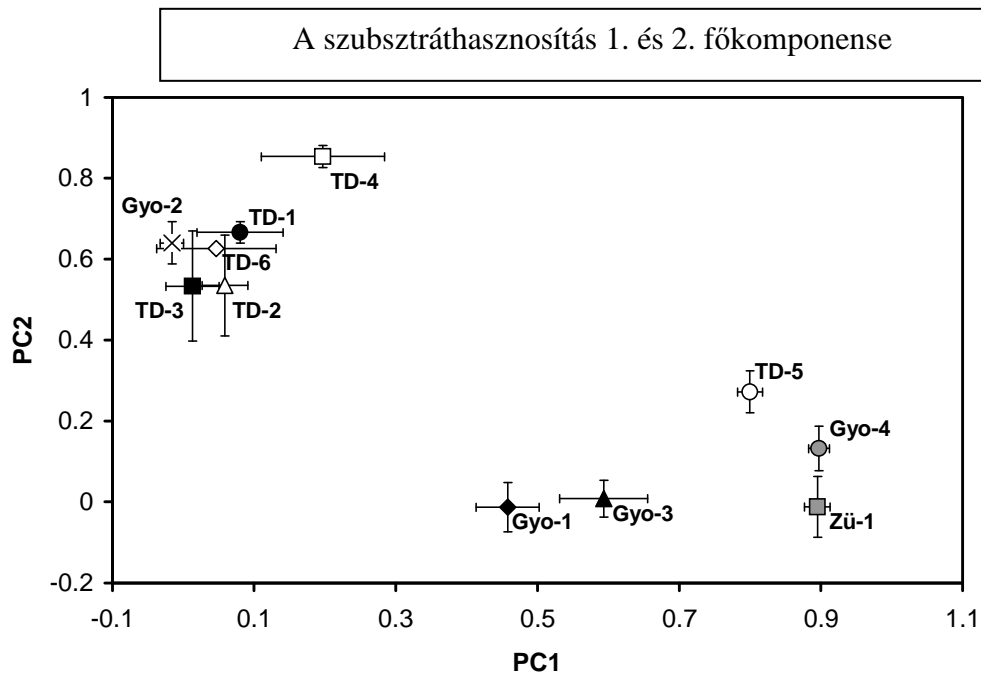
Az AWCD értékek normalizálás után szignifikáns eltérést mutattak a minta származásának és leírásának megfelelően. A meddőhányóról vett fűvel benőtt és a kiskertből a pataktól 10 méterre vett talajminták mikrobaközösségének szubsztráthasznosítása igen közel állt a referencia talajéhoz, viszont a többi, az elárasztott sávból vett kiskert talaj és a meddőhányó vegetáció nélküli talaja és a morfológiailag is inkább hulladék, mint talaj képet mutató mintáké viszont nagymértékben eltért. Az 3.1. ábrán megkülönböztethetjük a

4 szubsztrátcsoportra kapott eredményt: kék oszlop: polimerek; lila oszlop: szénhidrátok; rózsaszín: karbonsavak; zöld oszlop: aminosavak



3.1. ábra: GyöngyöSOROSZI talajminták szubsztráthasznosítása AWCD értékben, Kék: polimerek; Lila: szénhidrátok; Rózsaszín: karbonsavak; Zöld: aminosavak

A főkomponens analízissel az első két főkomponens alapján számított hasonlóságok illetve különbözőségek a 3.2. ábrán láthatóak. A referenciához közel áll a pataktól távoli kiskert minta és a fűvel benőtt takaróréteg a meddőhányóról. Még viszonylagos közelségben van a Gyöngyösorszi kiskert két, talajkinézetű talajmintája, de nagyon eltér a morfológiailag is eltérő, idegen, nem talajjellegű, extra nagy ólomtartalmú sárgás réteg (Gyo-2) és a meddőhányóról származó valemennyi réteg, kivéve a fűvel dúsán benőtt mállott takaróréteget.

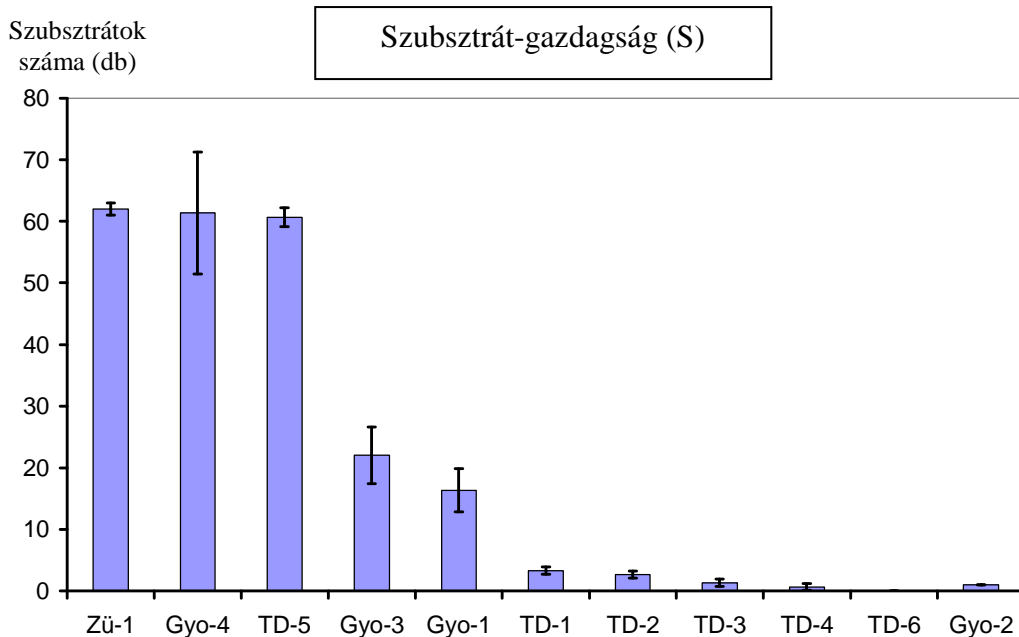


3.2. ábra: A talajminták hasonlósága a főkomponens analízis alapján

A további komponensek kevésbé tesznek különbséget a minták között, de a referencia itt is messze esik a többitől. Az eltérés kvantitatív jellemzésekor egyértelművé vált, hogy az aktivitások csökkentek a szennyezés által érintett területeken, tehát a genetikai erózió Gyöngyösorszi talajaiban tettenérhető (3.3. ábra).

A szennyezőanyagok globálisan növekvő koncentrációja a talajban (és a vizekben) mélyreható genetikai változásokat eredményez a talajban. A genetikai erózió fogalma nem teljesen definiált: nem csak fajok kipusztulásáról és a változékonyság csökkenéséről van szó, hanem természetesen a túlélést biztosító gének elterjedéséről és számuk növekedéséről is. Ugyanakkor ezeknek a szükséges plusz géneknek a működtetése „gazdaságilag” komoly terhet ró az ökoszisztéma-tagokra a közösségek egyes fajaira.

A szennyezett területek talajában vagy talaj-remediáció során bekövetkező változások nagyban befolyásolják a talaj élő közösségének genetikai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Ezen folyamatok és trendek ismerete igen fontos a szennyezett területeken lezajló folyamatok megismerése szempontjából, a helyes döntések meghozatala érdekében.



ábra: A hasznosuló szubsztrátok szennyezettséggel párhuzamosan csökkenő száma

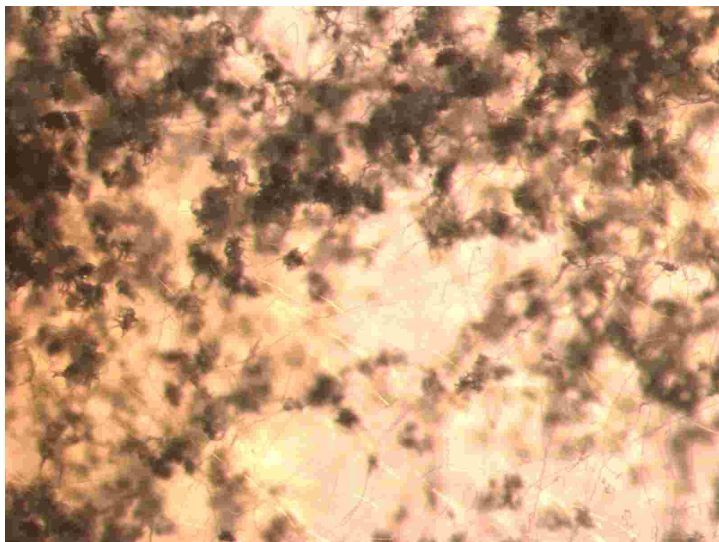
A fenti példában bemutatott funkcionális diverzitás eltérései illetve változékonysága jól jellemzi a talaj teljes közösségét melyet úgy vizsgáltunk, hogy nem izoláltuk – mi több nem is szabad elválasztani egymástól – a közösség egyes tagjait, hanem mint egészet tekintettük és vizsgáltuk, ahogy ez a valóságban is van. Hozzá kell tennünk, hogy ez a módszer is, mint valamennyi szaporításon alapuló mikrobiológiai módszer a közösség funkcionális potenciálját tükrözi, nem az *in situ* potenciált és nem is a teljes genetikai potenciált, hiszen a mért válaszokat csakis az aerob mikroorganizmusok adták és olyan szubsztrátokon, melyek a környezetben alkalmasint nem is fordulnak elő. Bebizonyosodott (Haak et al, 1995), hogy a szubsztráthasználtság reprodukálható és nem azonos a közösség tagjainak egyenként mérhető szubsztráthasználtságának összegével, hanem csakis a közösséget és a közösség működését jellemzi.

#### 4. FÉMTŰRŐ MIKROGOMBA IZOLÁLÁSA ÉS FÉMAKKUMULÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

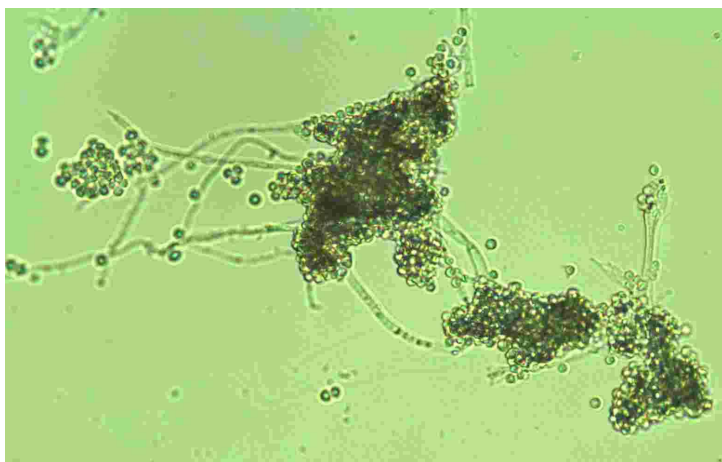
A Gyöngyösoroszi flotációs meddőhányó fémmel szennyezett takarórétegéből több fémtűrő mikroorganizmust izoláltunk. Az egyik fémtűrő gomba előzetes vizsgálatunk szerint extrém nagy fémkoncentrációkat képes magába gyűjteni. A fonalas gombával izolálás után fémaakkumulációs kísérleteket végeztünk.



4.1. ábra: A fémtűrő fonalas gomba telepének sztereomikroszkópos képe



4.2. ábra. A fémtűrő gomba fonalai és spórái fém jelenlétében szaporítva



4.3. ábra. Fémtűrő fonalas gomba micéliuma és spórái: felületi tenyésztés, fénymikroszkópos fényképfelvétel



4.4. ábra. Fémtűrő fonalas gomba felületi tenyészetben nőtt micéliuma és spórái: fénymikroszkópos fényképfelvétel

#### 4.1. Anyagok és módszerek

A gomba akkumuláló hajlamát első lépésként vízben oldott fémekkel igyekeztünk bizonyítani. A gomba szaporítása és fémfelvételének vizsgálata laboratóriumi mikrokozmoszokban történt. A fémtartalmat tökéletes roncsolás után ICP-MS analitikai eljárással határoztuk meg az USA 6020 szabvány (USA EPA) szerint

Táppoldat: 10 g malátakivonat  
 pH 6,5-7 0,5 g pepton  
 2,5 g glükóz  
 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 0,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
 0,07 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
 0,25 g NaCl  
 0,065 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,0005 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 0,25 g  $\text{KNO}_3$   
 0,5 cm<sup>3</sup> Pfennig féle  
 nyomelem oldat (1965)  
 1000 cm<sup>3</sup> desztillált víz

Pfennig féle elemoldat:

1 g  $\text{AlCl}_3$   
 0,5 g KI  
 0,5 g KBr  
 0,5 g LiCl  
 7 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   
 11 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 1 g  $\text{CuCl}_2$   
 5 g  $\text{CoCl}_2$   
 0,5 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
 0,1 g  $\text{NaVO}_3$   
 0,5 g szelénsó  
 0,5 g  $\text{BaCl}_2$   
 0,05 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 1 g  $\text{ZnCl}_2$   
 1 g  $\text{NiCl}_2$   
 3600 cm<sup>3</sup> desztillált víz

Inokulum készítés és a szennyezőanyag hozzáadása: 30 cm<sup>3</sup> táppoldatot beoltunk két kacsnyi R010 fonalas gombával és 72 órán át levegőztetjük, rázatással. 5-5 cm<sup>3</sup> inokulumot oltunk 200 cm<sup>3</sup> táppoldatba, amelyhez a **talajszennyezettségi határérték (B érték)** 5 illetve 10 szeresét adjuk a következő toxikus fémekből: As, Cd, Cu, Pb és Zn. A negatív kontrollba csak táppoldatot és inokulumot teszünk, fémet nem. Az **5B MIX**-ben az As, Cd, Pb és Zn koncentrációja 5B, a réz 3 B, a **10B MIX**-ben a réz mennyisége 6B.

A hozzáadott fémmennyiség tehát 5B esetében: As: 75 mg/liter, Cd: 5 mg/liter, Cu: 225, Pb: 500, Zn: 1000 mg/liter. Ebből 200m<sup>3</sup>-ben As: 15 mg, Cd: 1,0 mg, Cu: 45 mg, Pb: 100 mg, Zn: 200 mg fém van. 10B esetén ennek kétszerese.



## 4.2. A fémakkumulációs vizsgálatok eredménye

A talajból izolált gomba extrém fémtartalmának mérésekor felmerült, hogy a gombafonalak mechanikusan szennyeződnek fémtartalmú talajszemcsékkel és ez meghamisítja az eredményt, ezért a fémfelvétel vizsgálatát oldott formájú fémekkel végeztük. A legszennyezettebb talajok a valóságban is gyakran vannak vízborítás alatt a gyakori áradások és lefolyás nélküli tavak esetében.

A szokásosnál kisebb tápanyagtartalmú tápoldathoz oldott só formájában adtuk a toxikus fémeket. A gombával történő beoltás a toxikus fémek hozzáadása után történt. A kísérleti edényeket egy héten át rázatva levegőztettük. A felszaporodott gombamicéliumot az egy hét elteltével szűrőpapíron leszűrtük, szűrőnuccs segítségével,  $4 \cdot 100 \text{ cm}^3$  desztillált vízzel mostuk, majd szobahőmérsékleten szárítottuk. Egyes, nagy fémkoncentrációkat tartalmazó kísérleti edényekben csapadékkiválás volt megfigyelhető, amely a gomba növekedésével összefüggésben jelentkezett. A kisebb koncentrációkat tartalmazó oldatokban (5B) és csak egyetlen fémet tartalmazó edényekben csapadék kiválása nem volt megfigyelhető.

4.1. táblázat: Az R010 gomba sejtömege fémtartalmú tápoldaton szaporítva

Minta jele	Nedves tömeg (g)	Légszáraz tömeg (g)
Kontroll 5B-hez*	6,240	0,701
As 5B	5,177	0,673
Cd 5B	7,010	0,713
Cu 5B	5,550	0,815
Pb 5B	6,815	0,880
Zn 5B	5,259	0,708
5B MIX	6,031	0,843
Kontroll 10B-hez*	5,110	0,521
As 10B	6,258	0,631
Cd 10B	4,370	0,618
Cu 10B	5,500	0,563
Pb 10B	6,030	0,900
Zn 10B	4,840	0,585
10B MIX	4,244	0,885

\*A két sorozat eltérő időpontban készült, ez az oka a gomba eltérő szaporodásának.

A gomba által termelt sejtömeg meglepő eredményt hozott. A fémek jelenléte szinte egyáltalán nem gátolja a gomba szaporodását, egyes fémek jelenlétében még a kontrollnál is nagyobb mennyiségű sejtömeg keletkezett. Nem ismerjük a R010 gomba fémszisztenciájának mechanizmusát, de az nagyon hatékonynak tűnik, és valamennyi vizsgált fém esetében jelentkezik.

Mivel ólom jelenlétében szignifikáns növekedést lehet mérni és a gomba jelenlétében csapadékkiválás is megfigyelhető volt, feltételezhető, 1. hogy a sejtömeg ólomtartalmú csapadékkal keveredett, 2. hogy a rezisztencia-mechanizmus kialakításában extracelluláris, a tápoldatba kiválasztott vagy a sejt külső felületéhez kötődő fehérjék vagy más, a fémet oldhatatlanná tévő vegyületek játszanak szerepet. A mechanizmus kiderítése további kutatásokat igényel.

4.2. táblázat: Az R010 gomba fémtartalma toxikus fémek keverékének jelenlétében (EPA6020 szabvány szerint ICP-MS eljárással mérve)

Minta jele		Kontroll 5B	5B Mix	Kontroll 10B	10B Mix
<b>Fém</b>					
Ag	mg/kg	0,03	0,38	<0,01	0,55
As	mg/kg	4,59	<b>8 440</b>	5,74	<b>17 400</b>
Ba	mg/kg	2,33	319	16,10	615
Cd	mg/kg	0,09	<b>93,5</b>	0,16	<b>117</b>
Co	mg/kg	2,50	1,19	4,99	1,18
Cr	mg/kg	2,13	1,73	2,18	1,34
Cu	mg/kg	6,39	<b>1190</b>	12,2	<b>1610</b>
Mo	mg/kg	13,20	2,79	1,89	3,85
Ni	mg/kg	6,95	0,63	2,67	0,61
Pb	mg/kg	10,90	<b>35 300</b>	11,1	<b>38 000</b>
Se	mg/kg	11,70	5,54	11,8	3,69
Sn	mg/kg	9,93	7,94	12,3	6,85
Zn	mg/kg	81,90	<b>1730</b>	169,0	<b>577</b>

A 4.2. táblázatban az 5B és 10B MIX azt jelenti, hogy az 5 kiválasztott fém keverékét alkalmaztuk. Érdekes jelenség, hogy egyes nem cél-fémek (amelyeket nem akkumuláció céljából, hanem a mikroelemoldat formájában tettünk a tenyészetbe) akkumulációja is megnőtt (Ag, Ba). A hozzáadott fémek koncentrációi igen nagyok a gombamicéliumokban, As és Pb esetében a hozzáadott mennyiség 30–50%-át is eléri. Ez a tény megerősítette a gyanúkat, hogy fémkicsapódás történt és ez a csapadék kívülről kötődött a gombamicéliumokra, illetve bezáródik a gyakran gyöngyszerű pellett formájában növekvő gombatenyészetbe. Emiatt a fémkicsapódást egyenként adagolt fémekkel is vizsgáltuk, ebben az esetben vizuálisan nem volt fémkiválás megfigyelhető. Az eredményeket a 4.3. táblázat mutatja.

4.3. táblázat: Az R010 gomba fémtartalma fémenként szennyezett közegben (EPA6020 szabvány szerint ICP-MS eljárással mérve)

Minta jele	Kontroll gomba	Gomba As-nal	Gomba Cd-mal	Gomba Cu-zel	Gomba Pb-mal	Gomba Zn-vel
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
As 5B	4,59	21,9				
Cd 5B	0,09		74,6			
Cu 5B	6,39			1 040		
Pb 5B	10,90				26 900	
Zn 5B	81,90					1 450
As 10B	5,74	29,0				
Cd 10B	0,16		2 550			
Cu 10B	12,2			3 520		
Pb 10B	11,1				33 300	
Zn 10B	169					31 100

A 4.3. táblázatban bemutatott eredményeket összehasonlítva a 4.2. táblázat adataival érdekes különbségeket láthatunk. A Cd és Zn, a két legmozgékonyabb, leginkább oldható és felvehető

fém felvett mennyisége lényegesen nagyobb, ha egyenként alkalmazzuk a fémeket, tehát a többi csapadékképzésre hajlamos fém (As, Pb) gátolja ezek sejtbe jutását. Az As egymagában csak kismértékben akkumulálódik a micéliumban, a Cu minkét esetben többé-kevésbé koncentráció-arányosan viselkedik. Az extrém nagy fémkoncentrációk megjelenése a gombában, elsősorban Pb jelenlétében, megerősítik azt a feltételezést, hogy a fémcsapadék mechanikusan (is) kötődik a gombafonalak felületére. Bár ez a mechanikusnak mondott kötődés is történhet a gombák által a micélium felületére kiválasztott olyan anyagok hatására, melyek a gomba külső membránján immobilizálják a fémeket pontosan azért, hogy a sejtek belső miliójét mentesítsék a toxikus fémek okozta káros hatásoktól.

Az eredmények tükrében több párhuzamosan működő mechanizmust feltételezünk, ez a kiugró rezisztenciával rendelkező gombafaj minden bizonnyal többlépcsős védekezéssel rendelkezik: egy extracelluláris vagy a sejtfa külső oldalához kötődő kicsapórendszerrel és egy belső, akkumulációs rendszerrel, amelyek a fém fajtájától, koncentrációjától és a fémek közötti kölcsönhatástól is függ.

A fémkicsapódásnak két alapvető oka lehet: 1. Kémiai oka: túltelítettség, a levegőztetés miatti (kémiai) oxidáció, a fémek kölcsönhatása, 2. Biológiai oka: a gomba által termelt és a kibocsátott oldhatóságcsökkentő termékek (fehérjék, nyálkaanyagok, stb.), pH változás. További kísérleteket végeztünk a fémcsapadék kiküszöbölésére. Igyekeztünk a kémiai eredetű kicsapódásoktól megszabadulni, hogy a sejtömeg végállapotának vizsgálati eredményei lehetőleg a biológiai hatásokat tükrözzék. A tápoldatokat a fémek hozzáadása és néhány óra levegőztetés után sűrű műanyaghálon szűrjük, hogy az esetlegesen kivált fémvegyületek a szűrletben maradjanak. A szaporítás végén a sejtömeget igen alaposan többszöri desztillált vizes mosás után 35 °C-on szárítottuk tömegállandóságig. Teljes feltárás utáni IPC-MS analízis eredményeit mutatja a 4.4. és 4.5. táblázat.

4.4. táblázat: Az R010 gomba által akkumulált toxikus fémek mennyisége kiinduláskor csapadékmentes fémoldat alkalmazásakor (EPA6020 szabvány szerint ICP-MS eljárással mérve)

Minta jele		Kontroll	5B Mix	10B Mix
<b>Fém</b>	konc			
Ag	mg/kg	0,04	0,71	0,54
As	mg/kg	<0,01	<b>12 700</b>	<b>14 200</b>
Ba	mg/kg	3,54	731	1 030
Cd	mg/kg	0,42	<b>42,6</b>	<b>74,7</b>
Co	mg/kg	5,27	1,95	5,63
Cr	mg/kg	1,35	1,79	10,8
Cu	mg/kg	7,21	<b>2 240</b>	<b>3 800</b>
Mo	mg/kg	4,63	4,17	8,48
Ni	mg/kg	2,33	0,76	1,33
Pb	mg/kg	5,73	<b>41 700</b>	<b>252 000</b>
Se	mg/kg	2,75	2,16	5,74
Sn	mg/kg	8,83	5,58	15,8
Zn	mg/kg	98,60	<b>2 490</b>	<b>5 410</b>

A kémiai csapadékképződés kiküszöbölése után is hasonló akkumulációt mértünk, mint az első kísérletben, tehát feltételezhetjük, hogy a folyamatok nagy része biológiai hatásra megy végbe. A rezisztencia mechanizmus természetesen további kutatásokat igényel, de ez az

extrém gomba is jól mutatja a szennyezettség hatására a területen végbement genetikai változásokat melyek következményeit a laboratóriumi kísérletek eredményei alapján megbecsülhetjük.

4.5. táblázat: Az R010 gomba által akkumulált toxikus fémek mennyisége egyes fémek oldataival vizsgálva (EPA6020 szabvány szerint ICP-MS eljárással mérve)

Minta jele	kontroll	As	Cd	Cu	Pb	Zn
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
As 5B	<0,01	333				
Cd 5B	0,42		237			
Cu 5B	7,21			3 760		
Pb 5B	5,73				28 900	
Zn 5B	98,60					13 200
As 10B	0,01	266				
Cd 10B	0,42		399			
Cu 10B	7,21			8 940		
Pb 10B	5,73				26 600	
Zn 10B	98,60					5 900

Az eredmények alapján feltételezzük, hogy a fémfelvételt, a sejtekben kialakult fémkoncentrációkat nem csak a fém felvehetősége, esetleges biológiai immobilizálás vagy kémiai kicsapás, hanem az egyes fémek kölcsönhatásai is befolyásolják. Érdekes és konzekvensen előforduló jelenség, hogy kisebb koncentrációjú Zn jobban akkumulálódik, mint a nagy koncentrációjú.

A gomba fémfelvételét a biokoncentrációs faktorial jellemezhetjük, amely  $C_{\text{gomba}}/C_{\text{közeg}}$  törteként fejezhető ki és azt adja meg, hogy a gomba a környezethez képest hányszoros értékre képes koncentrálni a toxikus fémet. A gomba átlagos biokoncentrációs faktorai As: 3, Cu: 15, Zn: 15, Cd: 50, Pb: 50. Ezekből az eredményekből is nyilvánvaló, hogy többféle, fémtől és koncentrációtól függő mechanizmussal van dolgunk. A koncentrációfüggés könnyen kimérhető, de ezen kívül komplex mechanizmus-vizsgálatra van szükség. Az extrém akkumulációs képességgel rendelkező gomba további fiziológiai, biokémiai és genetikai vizsgálatára a közeljövőben szeretnénk sort keríteni.