

A „Rövid és tartós nehézfémkitettség hatása a talaj *Trichoderma*-populációjának diverzitására és funkciójára” című, F 034665 sz. OTKA-projekt zárójelentése

BEVEZETÉS

A 2001-ben induló, **egy fiatal kutató** munkájára épülő téma **munkahipotézise** az volt, hogy a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó szaprotróf gombák talajokban való általános előfordulásuk alapján alkalmasak lehetnek a talaj nehézfém-szennyezettségének széles körben használható bioindikációjára, amennyiben sikerül olyan populációs vagy élettani jellemzőt azonosítani, amely elegendően érzékenyen reagál a nehézfémek mennyiségére és minőségére.

Ennek megfelelően **munkatervet** az alábbi feladatok formájában terveztem megvalósítani:

1. A *Trichoderma*-populáció összetételének felmérése szabadföldön korábban beállított nehézfém-szennyezési tartamkísérlet parcelláiban.
2. A cellulózbontási és a *Pythium* növénykórokozó gomba elleni antagonisták aktivitásának felmérése.
3. A tartamkísérletből származó új és korábbi izolátumok nehézfém-érzékenységének felmérése.
4. A különböző talajtípusból származó izolátumok nehézfém-érzékenységének felmérése
5. A nehézfémfelvétel vizsgálata fluoreszcens indikátorvegyületek alkalmazásával.
6. Nehézfémek antagonistákra gyakorolt hatásának felmérése
7. Rövid távú nehézfém-kitettség (frissen végzett szennyezés) hatásának felmérése talajban
8. Az első évi szabadföldi populációs felmérés ismétlése a projekt ideje alatt végment változások regisztrálására.

A **munkaterv minden pontját sikerült megvalósítani** az 5. kivételével, melynek technikai és költségvetési okai voltak. Az adott időszakban rendelkezésre álló, közismert okok miatt csökkentett támogatásból elérhető fluoreszcens indikátorvegyületek nem voltak alkalmasak az élő gombasejtben végbemenő nehézfém-felvételi folyamatok követésére. További vegyületek kipróbálása pedig teljesíthetetlenül magas költségekkel (speciális új vegyületek gyártó általi kifejlesztésével) lehettek volna teljesíthetőek. Ezért **munkaterv-módosítást** végeztem, melynek során egy szintén kurrens technika, a telepkép számítógépes képfeldolgozó szoftverrel történő elemzését valósítottam meg, a gombák gátló anyagokra való érzékenységének felmérése területén, hazánkban elsőként.

EREDMÉNYEK

Szabadföldi nehézfémkitettség hatása a talaj *Trichoderma* populációjának összetételére

A 2001-es évben megismételtem az 1995-ben, az MTA TAKI által 1991-ben beállított nehézfém-szennyezési tartamkísérletből származó talajmintákban végzett tenyészedényes kísérletet, melyben akkor azt tapasztaltam, hogy a Cd, a Ni és Zn különböző dózisa mellett jellegzetes és stabil eltérések alakultak ki a talaj *Trichoderma*-populációjának összetételében: **megnőtt a *T. viride* aránya** más fajok, főként a *T. harzianum* rovására. Figyelemre méltó, hogy a legnagyobb dózisú Cd-kezelésben nem tudtam ki mutatni a *Trichoderma* gombákat. Az adatok feltáró jellegű matematikai elemzése során elvégzett parciális korrelációelemzéssel statisztikailag is igazolni tudtam, hogy **a *Trichoderma*-populáció közvetlenül is hatással van a mikorrhiza gomba mennyiségére**, és ezt a hatást a háromféle nehézfém különböző módon befolyásolja: a legkevésbé toxikus cink hatására felszaporodó *T. viride* hatékonyan gátolta mikorrhiza aktivitását,

vagyis a mikorrhiza gombák növényi gyökér kolonizációs képessége nagyobb mértékben függött az aktuális *Trichoderma*-populáció nagyságától és fajösszetételétől, mint az adott talaj nehézfém-szennyezettségétől. A statisztikai elemzéshez felhasznált mikorrhizáltsági adatok a dr. Biró Borbála által vezetett EU-Kp5 program keretében megvalósuló MYCOREM projektből származnak.

A 2001. év második felében **felmértem 30 db, nehézfémmel különböző módon szennyezett talajmintában a *Trichoderma*-populáció fajösszetételét.** A tíz fém (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Zn) 3 különböző szinten szennyezett mintájából származó talajszemcséket *Trichoderma*-szelektív táptalaj felszínén elhelyezve összesen 197 izolátumot nyertem, melynek 72 %-a tartozott a *T. viride* fajba, ami azt mutatja, hogy az ezen nehézfém-szennyezési tartamkísérletből származó, cinkkel, kadmiummal, nikkellel terhelt talajokban korábbi mintavételnél is tapasztalt *T. viride* dominancia más nehézfémek esetén is bekövetkezik. Ismételten megfigyelhettem, hogy a legnagyobb dózisú 90 mg/kg Cd-szennyezés igen súlyos hatással volt a *Trichoderma*-populációra: ötször ismételt kitenyésztésben sem sikerült a jelenlétüket kimutatni, míg a többi 9 nehézfém mindhárom koncentrációjánál esetében ez már az első kitenyésztésnél is eredményes volt. Ez teljesen egybeesik az 1995-ben végzett mintavételnél tapasztaltakkal. Ebből a tényből az alábbi következtetésekre jutottam: (1) a kadmiumra érzékenyebbek a trichodermák, mint a többi vizsgált nehézfémre, melyek ugyanilyen dózisban kerültek a talajba; (2) legalább 10 éven át fennmarad a talajban a kadmiumnak a trichodermák számára gátló koncentrációja; (3) a kadmiumra toleráns trichodermák természetes körülmények között nem jönnek létre, mert ennyi idő elegendő kellett volna, hogy legyen e toleráns trichodermák elszaporodására. Érdekes eredményként említhető még egy újonnan leírt, a korábbi *T. viride* Pers. ex Gray fajból elkülönített ***T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt, Nirenberg első hazai kimutatása.**

Új megközelítést alkalmaztam a *Trichoderma* gombák talajbeli nehézfém-toleranciájának tanulmányozásához. Szemben a hagyományos megközelítés szerinti izolálást követő nehézfém-érzékenységi vizsgálattal, már magát a kitenyésztést is nehézfém-tartalmú táptalajon végeztem el. Az egyes nehézfémek koncentrációsorát tartalmazó glükózos Czapek—Dox agaron elhelyezett talajszemcsékről kifejlődő telepeket izoláltam, majd normál táptalajon kifejlődő telepeik alapján azonosítottam. A vizsgálat azt mutatta, hogy a trichodermák nem voltak kimutathatóak olyan nehézfém-koncentrációnál, amelyet azonosított tiszta tenyészetben 50 % körüli telepméret-csökkenés mellett még elviseltek. Ennek valószínű magyarázata az lehet, hogy a nehézfém-terhelés mellett a trichodermák nem voltak kellően kompetitívek a talajszemcsék mikrobiótájával szemben, így nem voltak képesek kinőni a táptalaj felületére. Ezt megerősítette az, hogy amikor a kompetíció csökkentése érdekében szélesztéssel elterítettem a talajszuszpenziót a legkisebb koncentrációt (0,1 mM) tartalmazó táptalajon, akkor megjelent néhány trichoderma-telep a szelektív táptalajon végzett izolálás eredménye szerint nagyobb mennyiségű trichoderma-csírát tartalmazó nehézfém-kezeléseknél. Ebből arra következtettem, hogy **a nehézfém-szennyezéseknek a talaj trichoderma-populációjában megmutatkozó hatása nem elsősorban a csíraszám közvetlen csökkentése révén valósul meg, hanem az adott faj az „általános fitnessének” csökkenése miatt szorul háttérbe a tápanyagért való versengésben, ami egy idő után a csíraszám csökkenésében is megmutatkozik.**

A projekt harmadik évében ismételt mintavétellel ellenőriztem, hogy történt-e változás a nehézfémekkel mesterségesen szennyezett szabadföldi parcellák *Trichoderma*-populációjának fajösszetételében. Az ennek során gyűjtött 168 izolátum azonosításával kapott adatokat a korábbi vizsgálatok eredményeivel összevetve nem találtam szignifikáns eltérést. A nehézfém-kezelések közti, korábban megfigyelt különbségek ismételten és ugyanolyan tendenciával mutatkoztak meg. Az 1991-ben végzett mesterséges szennyezés hatása igen tartósnak bizonyult: 1995 és 2003 között nem változott számottevően a *Trichoderma* fajok egymáshoz való aránya. Ebből arra következtettem, hogy **a talaj *Trichoderma*-populációjának fajösszetétele jól demonstrálja a nehézfémek hosszú távú hatását, így ez a mikrobiális tényező alkalmasnak látszik a long-**

term folyamatok (pl. súlyos nehézfém-szennyezést követő lassú koncentrációcsökkenés) bioindikációjára, azonban további ismételt vizsgálatokkal lehetséges ennek megbízhatóságáról meggyőződni.

A fenti megállapításra építve a projekt megvalósításának utolsó évében merült fel az a gondolat, hogy a szennyezett talaj *Trichoderma*-populációja összetételének alakulásában nemcsak a nehézfémre való közvetlen érzékenység játszik szerepet, hanem a nehézfémnek az együtt élő trichodermák egymással való kölcsönhatására gyakorolt befolyása is. Ennek jellemzésére további módszertani fejlesztésként alkalmaztam a szakirodalom szerint eddig e célra nem használt parciális korreláció analízist annak ellenőrzésére, hogy a Cd, a Ni és a Zn befolyásolta-e a koegzisztáló *Trichoderma* fajok egymással való interakcióját. A fenti vizsgálat adatait korrelációanalízisnek és parciális korrelációanalízisnek vetettem alá, majd a kapott koefficienseket összehasonlítva **azt állapítottam meg, hogy azok között a leggyakoribb fajok esetében szignifikáns a különbség, tehát a nehézfém jelentősen módosította a kölcsönhatásukat.** Ennek pontos részletei még nem tisztáztak, de **igen fontosnak tartom, hogy a nehézfémek (és más gátló hatású anyagok) talajmikrobiotára gyakorolt hatásának értékelésekor tekintettel kell lenni a vizsgált anyag közvetett hatásaira is, amelyek akár jelentősebbek is lehetnek a közvetlennél.**

Cellulóz bontási és a *Pythium* növénykórokozó gomba elleni antagonisták aktivitás felmérése

A kapott izolátumok körében felmértem az **in vitro cellulózbontó, illetve a *Pythium* növényi kórokozó gombával szembeni antagonisták** aktivitást. Az izolátumokat négy, növekvő aktivitási csoportba soroltuk. E célra reprezentatív gyűjteményként kiválasztott 25, nehézfémrel terhelt talajból származó izolátum mellett 62 olyan izolátumot használtam fel, amelyek 23 különböző típushoz tartozó, nehézfémrel nem terhelt talajból izoláltam 1993-94-ben. Megállapítottam, hogy **a nehézfémrel terhelt talajból származó izolátumoknak az aktivitási csoportok közti megoszlása nem különbözött számottevően a nem terhelt talajból származókéktól,** vagyis a nehézfém-szennyezés nem okozott jelentős eltolódást a szennyezett talajban élő trichodermák vizsgált élettani jellemzőiben.

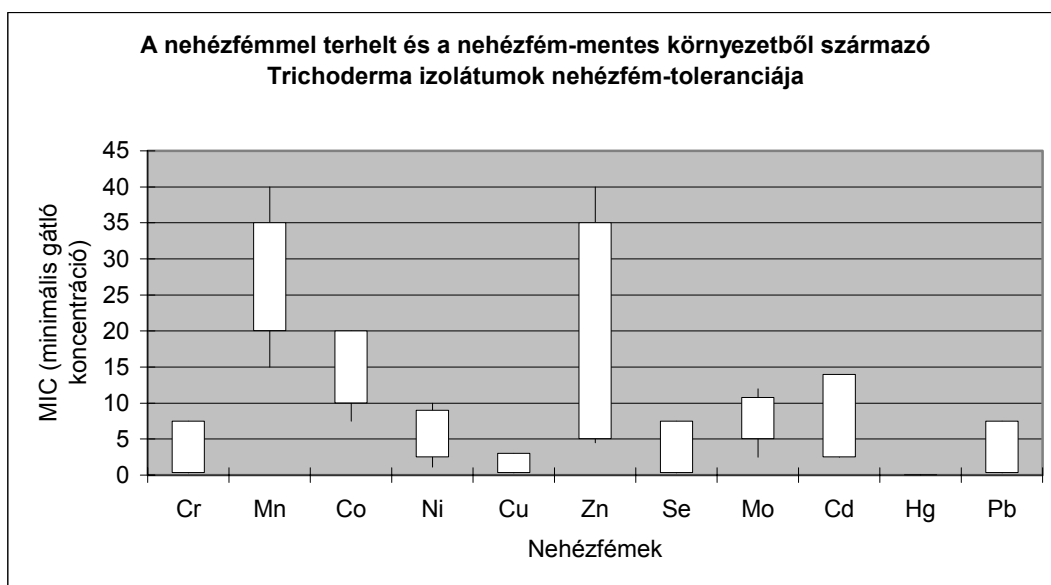
Megvizsgáltam **a trichodermák szennyezett talajokban való *Pythium* elleni antagonisták ill. a cellulózbontó aktivitását.** A kórokozóval előzetesen benövesztett (prekolonizált) agarlemezre helyeztem, a hosszú távú kísérlet fenti 10 fémrel szennyezett parcellájában frissen gyűjtött talajszemcsékből a 10 napos inkubáció alatt egyetlen esetben sem fejlődött ki trichodermára jellemző zöld sporuláció a *Pythium* micéliumán. Három nehézfém (Mo, Zn, Pb) esetében jelentős mértékű bakteriális eredetű pusztulását figyeltem meg a kórokozónak, míg a másik hét nehézfémrel szennyezett talajszemcséket minden korlátozás nélkül nőtte a be kórokozó. Ez azt jelenti, hogy **behurcolás esetén várható, hogy e nehézfémrel szennyezett talajokban gyorsan képes lesz elszaporodni ez a fitopatogén gomba.** Erre a fitoremediáció során felmerülő növényvédelmi problémára mások is felhívták a figyelmet (Ghaderian, Y. S. M., Lyon, A. J. E. and Baker, A. J. M. (2000): Seedling mortality of metal hyperaccumulator plants resulting from damping off by *Pythium* spp. New Phytol., 146, 219-224.).

A **trichodermáknak a talajbeli cellulózbontásban való jelentőségét** steril szűrőpapírkorongoknak a nehézfémrel szennyezett talajokban való elhelyezésével, majd 10 nap elteltével cellulóztartalmú táptalajon való inkubálásával és a kifejlődött telepek mikroszkópos azonosításával mértem fel. A nehézfémrel szennyezett talajokban elsősorban baktériumok végzik a cellulózbontást. Hat nemzetségbe tartozó összesen 94 gombaizolátumot sikerült elkülöníteni és azonosítani a papírkorongokból. Ezek között 6 volt *Trichoderma*: mindegyik az ólommal szennyezett talajból származott és *T. harzianum* fajhoz tartozónak bizonyult. A többi izolátum *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, és *Stachybotris* nemzetségbe tartozott. A *Trichoderma* izolátumokat tisztítás után ismételtelen cellulóz táptalajra oltottam annak ellenőrzésére, hogy milyen mértékben képesek cellulózbontásra. Mivel a korábbi vizsgálatokhoz

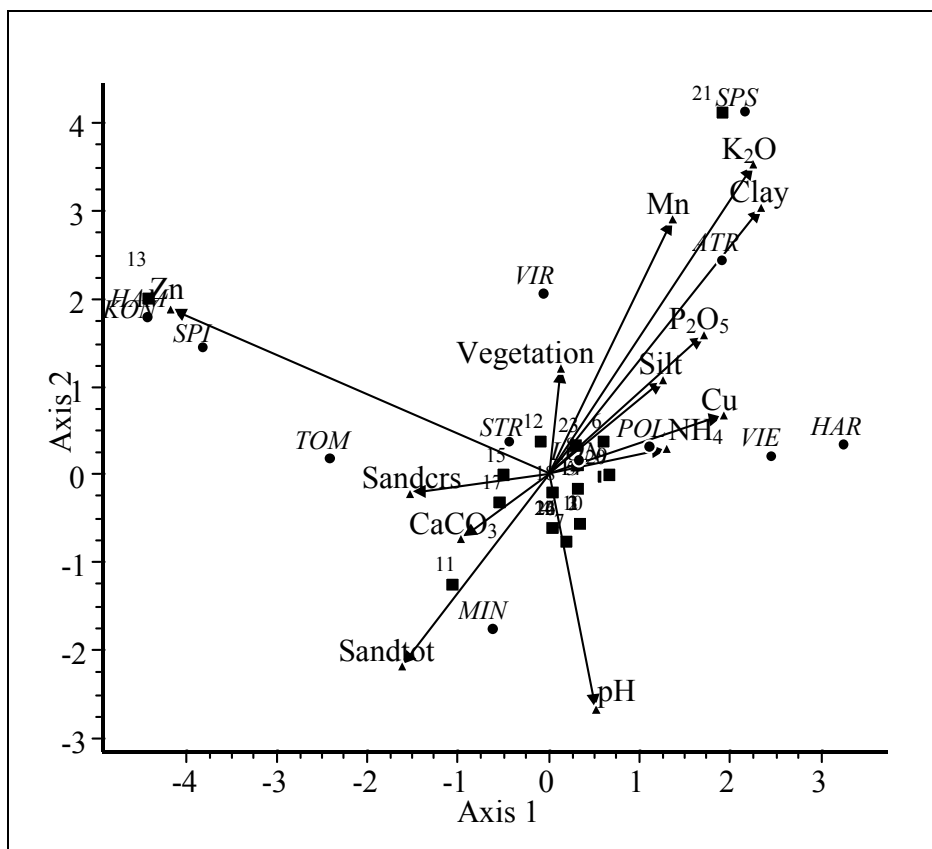
hasonlóan csekély aktivitást tapasztaltam, azt feltételeztük, hogy nem cellulózbontóként volt, jelen a papírkorongban, melyet 10-szeres steril vizes öblítéssel mentesítettem a talajszemcséktől, hanem az ugyanabból a talajból igazoltan cellulózbontóként kitenyészett *Fusarium* gomba parazitájaként. **Megállapítottam, hogy a nehézfémekkel szennyezett talajokban a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó gombák sem cellulózbontó, sem antagonisták aktivitásuk tekintetében nem tértek el a kezeletlen kontroll talajban tapasztalttól, tehát e jellemzőjük nem alkalmas bioindikáció céljára.**

Nagy számú, különböző eredetű izolátum nehézfém-érzékenységének felmérése

A nehézfémekkel szennyezett talajokból származó 25 izolátum mellett 120 más, nem terhelt talajból származó izolátumon is elvégeztem a nehézfém-érzékenység felmérését mind a tíz fémmel szemben. Az alábbi ábrán - melyen a két csoport MIC-értékeinek minimuma van feltüntetve az oszlopok alsó éléként, ill. a vonal alsó végeként, valamint maximuma az oszlopok felső éléként, ill. a vonal felső végeként – jól látható, hogy csak a mangánra és a cinkre vonatkozóan mutatkozott mintegy 14 %-kal nagyobb tolerancia-maximum a nehézfémekkel terhelt környezetből származó izolátumoknál. Vagyis **a nehézfémekkel terhelt környezetből származó *Trichoderma*-garnitúra nehézfém-toleranciája nem tér el szignifikánsan a nem terhelt környezetből származókéétól, tehát jól adaptálódtak a nehézfém-szennyezéshez, vagyis a szennyezett talajból izolált *Trichoderma* gombák nehézfém-érzékenysége nem alkalmas a szennyezés bioindikációjára.**



A fenti eredmények alapján felvetődött a kérdés, hogy befolyásolja-e a Mn vagy a Zn talajbeli koncentrációja egyes *Trichoderma* fajok előfordulását. Ennek ellenőrzésére elvégeztem az előző OTKA-projekt (F 025924) során 24 különböző talajtípusból származó *Trichoderma* gyűjteményre vonatkozóan a talajadatok soktényezős statisztikai elemzését és a fenti nehézfém-érzékenységi vizsgálatok eredményével való egybevetését. Erre a célra a redundancia analízis módszerét választottam – mikrobiális ökológiai célra tudomásom szerint elsőként Magyarországon. A korábban meghatározott 26 talajparaméter közül a 13 legnagyobb magyarázóértékkel rendelkezőt választottam ki Monte Carlo permutációs teszt révén. Az alábbi ábrán látható az elemzés eredményét mutató ordináció.



Az ordinációban a *Trichoderma* fajokat az alábbi rövidítések jelzik: ATR – *T. atroviride*, HAM – *T. hamatum*, HAR – *T. barzianum*, KON – *T. koningii*, LON – *T. longipilis*, MIN – *T. minutisporum*, POL – *T. polysporum*, SPI – *T. spirale*, SPS – *T. strictipilis*, STR – *T. strigosum*, TOM – *T. tomentosum*, VIE – *T. virens*, VIR – *T. viride*.

A modell a fajok előfordulásának varianciáját 66,19 %-ban magyarázta. **A legnagyobb hatású tényezőnek a talaj felvehető cinktartalma bizonyult, azonban az izolátumok in vitro nehézfém-toleranciája nem állt kimutatható összefüggésben az adott talajok cinktartalmával.**

Nehézfémek in vitro antagonista aktivitásra gyakorolt hatásának felmérése

Felmértem a projekt során leggyakrabban vizsgált három nehézfém, a Cd, a Ni és Zn hatását a különböző származású *Trichoderma* izolátumok (14 *T. barzianum*, 10 *T. virens* és 14 *T. viride*) *Pythium irregulare* elleni antagonista aktivitására. A kórokozó pusztulásának és az ellene való illékony antibiotikus anyagtermelésnek a minimális gátló koncentrációját határoztam meg a három fémre vonatkozóan. Ehhez nehézfém-koncentrációsorozatot tartalmazó táptalajon beállított kettős tenyészetben naponkénti méréssel követtem a *Pythium* és a trichodermák telepmeretének alakulását. Tíz nap inkubáció után micéliumos agarkorongokat vágtam ki a *Pythium* által benőtt területről, és a trichodermák szaporodását gátló benomilos táptalajon való tenyésztéssel ellenőriztem, hogy elpusztult-e a kórokozó. Megállapítottam, hogy **a *Trichoderma* törzstől függően 2-4-szer magasabb nehézfém-koncentrációt is képes volt elviselni kórokozó.** A trichodermák antagonista aktivitása már jóval a növekedést teljesen gátló koncentráció alatt megszűnt. Az illékony anyagokon keresztül megvalósuló antibiotikus aktivitás MIC értéke ugyanakkora vagy kissé nagyobb volt, mint a *Pythium* teljes pusztítását eredményező, mikroszkópos vizsgálatok alapján elsősorban parazita tevékenységé. A korábbi vizsgálatokkal összhangban volt, hogy **a növekedésben nem volt különbség a különböző mennyiségű nehézfémrel mesterségesen szennyezett habitátból és a nehézfémrel nem terhelt**

élőhelyről származó izolátumok között, viszont az utóbbi csoportba tartozó izolátumok antagonisták aktivitása általában alacsonyabb nehézfém-koncentrációnál szenvedett teljes gátlást.

Rövid távú nehézfém-kitettség (frissen végzett szennyezés) hatásának felmérése talajban

A talajszennyezések rövid távú hatásának modellezésére a nehézfémek 50 %-os in vitro gátlást adó koncentrációját Petri-csészében lévő 100 g talajban alkalmaztuk. **Általános tendenciaként** volt megfigyelhető, hogy a hetenként végzett csíraszám-ellenőrzés csak három hónap elteltével mutatott szignifikáns eltéréseket a kontrolltól. A további három hónap során pedig **a több éve tapasztalt fajösszetétel irányába mutató változásokat tapasztaltam**: megnőtt a *T. viride* aránya (a Cd-kezelésben háromszorosára), miközben a *T. harzianumé* mintegy felére csökkent, miközben a kimutathatóság határára csökkent a ritkább fajok csíraszámja. Az eredmények alapján arra következtettem, hogy ilyen **kis térfogatban is jól megbecsülhető, hogy egy konkrét nehézfém-szennyezés milyen hosszú távú hatásokkal bír**. Ehhez azonban **nem adnak jó támpontot az in vitro mért tűrési értékek, nélkülözhetetlenek a talajban végzett modellkísérletek**. Különösen fontosnak tartom ezt az eredményt a nehézfém-tolerancia növelését célzó nemesítési kísérletek tekintetében.

Nehézfémek *Trichoderma* gombák telepmorfológiájára gyakorolt hatásának képelemzési eljárással való felmérése

A *Trichoderma* gombák nehézfémekre való reakciójának felmérésére nemzetközileg is elsőként alkalmaztam a fonalak elágazási rendszerében bekövetkező változások számszerű meghatározására alkalmas telepszél fraktálmorfológia vizsgálatát. Az oomikóta *Achlya bisexualis* esetében Lundy és munkatársai (FEMS Microbiology Letters, 201: 259-263.) által megadott módszert jelentősen módosítottam. Kidolgoztam azokat a vizsgálati körülményeket, melyek mellett elhagyható az általuk a kvázi kétdimenziós telep létrehozatalára használt celofánlapos tenyésztés, mivel ez több szakmai és módszertani problémát is felvetett, továbbá nem volt alkalmas nagyszámú mikroba több nehézfém koncentrációsorozatánál való vizsgálatára. A módosított eljárással nagymértékben lehetett automatizálni a telepkép értékelését. További haszna a fejlesztésnek, hogy lehetővé vált ezzel egy munkamenetben a telep területének az általánosan használt módszernél jóval pontosabb és objektívebb meghatározása. A módszerfejlesztésről írt publikáció a Journal of Microbiological Methods folyóiratban van értékelés alatt MIMET-D-06-00070 referenciaszám alatt.

A továbbfejlesztett módszer lényege, hogy a nehézfémes táptalajon létrejött tenyészetet közönséges irodai lapolvasó segítségével digitalizáltam, majd egy államilag támogatott projekt keretében kifejlesztett, ezért ingyenesen letölthető képelemző programmal (Image-J Java alapú software, mely teljes dokumentációjával együtt ingyenesen letölthető a <http://rsb.info.nih.gov/ij/> címről) meghatároztam a telep szélének fraktáldimenzióját, azaz a D-értéket. Ez az érték csökken, amennyiben a fonalak ritkábban, nagyobb távolságokra ágaznak el a nehézfém gátló hatása következtében, illetve növekszik, ha a gátló hatás csökkenti a fonalak megnyúlását, így az elágazások egymáshoz közelebb jönnek létre. A képfeldolgozás általam kifejlesztett módon automatizáltan végbemenő lépései az alábbi ábrán láthatók.



1. ábra
Beszkennelt telepkép.

2. ábra
A telepkép
digitalizálás után.

3. ábra
A telepkép a „zaj”
kitisztítása után.

4. ábra
Az Image-J program
által számított
telepszél képe.

A celofán nélküli módszer kifejlesztése során, amikor megállapítottam, hogy a módszer a celofános tenyésztés kiváltására, **megfigyeltem, hogy a 19 különböző fajba tartozó vizsgált garnitúrában szignifikáns különbség van az egyes fajok fonalának elágazási rendszerében.**

A sorozatvizsgálatot különböző fajokhoz tartozó *Trichoderma* törzsek (13 *Trichoderma* faj összesen 23 képviselője) 11 fémsó 7 koncentrációjánál kialakuló morfológiai elváltozásait 3 ismétlésben mértem fel. Ez a különböző kontrollokkal együtt összesen több mint 6.000 tenyészet elkészítését, digitalizálását és képelemzését foglalta magában, összesen 16 GB képi információt eredményezve. A munka során meghatároztam a D-érték alakulását, valamint a telep területének változását a nehézfém-koncentráció függvényében. A képelemzéssel való adatgyűjtés nagy pontossága lehetővé tett egy további módszertani fejlesztést. Az élettani tulajdonságok bioindikációra való alkalmasságának megítéléshez nem tartottam alkalmasnak a gátló anyagok hatása jellemzésére általánosan használt EC_{50} -értéket, mely csak nagyobb dózisok alkalmazásával határozható meg. Helyette a humántoxikológiában elterjedten használt „lowest adverse effect level” (LAEL) értéket, vagyis azt a legkisebb koncentrációt határoztam meg, amely szignifikáns elváltozást okoz az élettani tulajdonságban. Ehhez meghatároztam a vizsgált koncentrációtartománynak a kontrolltól eltérő eredményt adó szakaszát leíró, lineárisra visszavezethető korrelációs függvényét, és a kiszámítottam azt a koncentrációt, mely szignifikáns eltérést ad a kontrolltól. Az alábbi táblázat (melyhez hasonló a telepméretre vonatkozóan is készült) mutatja be a telepszél fraktáldimenziójának LAEL értékét. Az adatok ilyen részletességű bemutatását az indokolja, hogy ezek az adatok a zárójelentés elkészítése időpontjában még nem nyújtottam be publikálásra, ez várhatóan március hónap folyamán történik meg, és elfogadását követően csatolom a projekt dokumentációjához.

A projekt fő célja, a különböző mikrobiológiai jellemzőknek a nehézfém-szennyezés bioindikációjára való alkalmazhatóságának felmérése szempontjából az alábbi következtetésekre jutottam e vizsgálat sorozat alapján. **A hifaelágazás minden esetben magasabb koncentrációnál mutatott szignifikáns elváltozást, mint a növekedés, tehát ez utóbbi érzékenyebb jelzője a nehézfém iránti toleranciának. A hifaelágazási rendszer érzékenységének vizsgálata viszont átfogóbb képet ad a gomba élettani állapotáról, mivel ez a tulajdonság a növekedés mellett több más élettani folyamat eredőjeként alakul ki. A 10 különböző nehézfémrel szennyezett talajból származó *T. virens* izolátumoknál tapasztaltak szerint a telepszél fraktáldimenziójának a fémionstresszre való érzékenységében meglehetősen kicsi a fajon belüli variabilitás. Mivel ebben az élettani tulajdonságban sem igazolható a habitát terheltségének a hatása, így ez sem bizonyult alkalmasnak bioindikációra.**

A telepszél fraktáldimenziójában szignifikáns elváltozást okozó legkisebb fémkoncentrációk

<i>Tricho- derma strains</i>	Cd	Co	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Se	Zn
T1	4.66 ± 0.058	1.76 ± 0.020	3.19 ± 0.014	0.51 ± 0.025	1.52 ± 0.020	1.57 ± 0.026	1.37 ± 0.041	1.98 ± 0.040	1.63 ± 0.040	3.44 ± 0.021
T2	0.57 ± 0.029	2.05 ± 0.042	3.07 ± 0.059	0.47 ± 0.061	2.38 ± 0.023	2.35 ± 0.037	1.33 ± 0.020	2.29 ± 0.028	1.11 ± 0.012	2.21 ± 0.013
T3	1.21 ± 0.017	1.68 ± 0.014	2.35 ± 0.030	0.46 ± 0.079	2.58 ± 0.010	1.19 ± 0.032	0.88 ± 0.012	1.99 ± 0.038	0.93 ± 0.018	3.39 ± 0.036
T4	0.51 ± 0.007	1.70 ± 0.015	2.60 ± 0.012	0.52 ± 0.018	0.96 ± 0.033	0.89 ± 0.065	0.80 ± 0.034	1.89 ± 0.013	1.38 ± 0.033	4.77 ± 0.077
T5	3.42 ± 0.028	1.83 ± 0.049	0.13 ± 0.013	0.28 ± 0.013	1.02 ± 0.046	2.42 ± 0.041	0.70 ± 0.012	1.43 ± 0.023	1.29 ± 0.024	1.95 ± 0.018
T6	0.53 ± 0.025	1.73 ± 0.018	0.58 ± 0.022	0.16 ± 0.051	3.90 ± 0.020	0.80 ± 0.011	1.42 ± 0.087	4.79 ± 0.028	1.41 ± 0.026	4.95 ± 0.017
T7	2.16 ± 0.057	3.08 ± 0.073	2.89 ± 0.037	0.51 ± 0.022	3.77 ± 0.046	1.92 ± 0.017	0.77 ± 0.024	1.43 ± 0.025	1.49 ± 0.009	3.37 ± 0.042
T8	0.48 ± 0.021	1.54 ± 0.027	3.17 ± 0.020	0.27 ± 0.020	1.01 ± 0.048	1.22 ± 0.015	0.74 ± 0.023	2.05 ± 0.026	0.73 ± 0.033	3.93 ± 0.023
T9	3.19 ± 0.040	1.42 ± 0.017	0.27 ± 0.022	0.40 ± 0.037	2.42 ± 0.015	2.41 ± 0.046	0.97 ± 0.031	1.81 ± 0.075	0.90 ± 0.005	2.90 ± 0.032
T10	2.38 ± 0.039	1.64 ± 0.011	3.06 ± 0.032	0.19 ± 0.054	2.18 ± 0.065	2.43 ± 0.037	0.99 ± 0.035	3.35 ± 0.017	1.67 ± 0.034	3.44 ± 0.007
T11	2.22 ± 0.026	1.51 ± 0.025	2.18 ± 0.035	0.37 ± 0.061	2.48 ± 0.004	0.96 ± 0.032	1.44 ± 0.021	1.96 ± 0.044	0.68 ± 0.016	3.93 ± 0.022
T12	0.56 ± 0.009	1.59 ± 0.031	3.46 ± 0.022	0.59 ± 0.023	4.95 ± 0.009	1.14 ± 0.053	0.69 ± 0.034	3.33 ± 0.020	1.73 ± 0.024	3.85 ± 0.049
T13	3.66 ± 0.040	1.64 ± 0.011	3.66 ± 0.031	0.53 ± 0.010	1.02 ± 0.047	2.46 ± 0.022	0.73 ± 0.021	2.07 ± 0.022	0.71 ± 0.037	2.13 ± 0.041

T. asperellum (T1), *T. atroviride* (T2), *T. aureoviride* (T3), *T. ghanense* (T4), *T. harzianum* (T5), *T. koningii* (T6), *T. longibrachiatum* (T7), *T. parceramosum* (T8), *T. piluliferum* (T9), *T. pseudokoningii* (T10), *T. reesei* (T11), *T. saturnisporum* (T12), *T. vires* (T13). További 10 *T. vires* izolátumot vizsgáltam a mesterségesen 270 mg/kg As, Cd, Cu, Co, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, ill. Zn sókkal szennyezett talajokból. Ez utóbbiak adatai nem különböztek szignifikánsan egymástól és a táblázatban szereplő T13 jelű törzstől, így azok nem szerepelnek benne.

A projekt főbb technikai eredményei

1. Létrehoztam az Európában egyedülálló mesterséges nehézfém-szennyezési tartamkísérlet különböző időszakaiból származó *Trichoderma* gombák gyűjteményét.
2. A talaj mikrobiális ökológiai kutatásokban nemzetközileg is elsőként alkalmaztam a redundancia analízist és a parciális korrelációanalízist, valamint meghatároztam a több *Trichoderma* faj morfológiai és növekedési érzékenységét jellemző LAEL (elváltozást okozó legkisebb koncentráció) értéket.
3. Jelentősen továbbfejlesztettem, és ezzel nagyszámú mikroba x környezeti tényező kombináció gombák hifaelágazási rendszerére gyakorolt hatásának széles körű vizsgálatára alkalmassá tettem a telepszél fraktálgeometriájának meghatározását szolgáló technikát.

A projekt során tett fontosabb megállapítások

1. A nehézfémek hatására módosulhat az egy habitátban élő *Trichoderma* fajok közti kölcsönhatás, ami viszont jelentősen befolyásolhatja más mikrobák, pl. a mikorrhiza gombák aktivitását. A nehézfémeknek (és más gátló anyagoknak) a talajmikrobiotára gyakorolt hatása megítélésében fokozott tekintettel kell lenni a közvetett hatásokra
2. A *Trichoderma* gombák között még jelentős mértékben szennyezett környezetben sem jelentek meg kiugró toleranciájú vagy rezisztens egyedek, a tartós környezeti stressz melletti fennmaradásuk adaptáció révén történt.
3. A szennyezett talajból származó trichodermák in vitro szaporodásának nehézfémek hatására bekövetkező csökkenése, a cellulózbontás és a *Pythium* növényi kórokozó gomba elleni antagonista aktivitás csökkenése, valamint a hifaelágazási rendszerben bekövetkező változások nem mutattak elegendően szoros összefüggést a talaj terheltségével ahhoz, hogy ezek az élettani jellemzők alkalmazhatóak legyenek a szennyezés bioindikációjára.
4. Az adott nehézfém-terhelés mellett kialakuló *Trichoderma*-populáció fajösszetétele azonban hosszú távon stabil, további megerősítő vizsgálatok után a nehézfém-stressz fennállásának monitorozására alkalmas paraméternek tekinthető.
5. A rövidtávú (néhány hónapos), kis térfogatban végzett talajszennyezési kísérlet a szabadföldön több év alatt kialakult fajösszetételt eredményezte, tehát ilyen körülmények között vizsgált modellek jó predikciós értékkel rendelkeznek.
6. A nehézfémekre a trichodermáknál jóval kevésbé érzékeny *Pythium* növényi kórokozó gomba elszaporodhat a szennyezett talajokban, ami jelentős akadályozó tényezője lehet a fitoremediációs tevékenységeknek. E kockázat további környezeti terhelés nélküli kiküszöbölését szolgálhatja a több más kutatási projektben létrehozott/szelektált nehézfém-toleráns *Trichoderma* gombák alkalmazása az e környezetben való biológiai védekezésre.