

**MAGYAR TUDOMÁNYOS  
AKADÉMIA  
TALAJTANI ÉS AGROKÉMIAI  
KUTATÓ INTÉZETE**  
1027 Budapest, II. Herman Ottó út 15.  
Telefon: 212-1850.  
Levél cím: 1525 Budapest, Postafiók 35.

---

## **Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok (NKFP) – 2001**

# **KOMPLEX ÉS HATÉKONY BIOREMEDIÁCIÓS TECHNOLÓGIÁK KIFEJLESZTÉSE SZENNYEZETT TALAJOK KÁRMENTESÍTÉSÉRE**

#3/002/2001

### **A projekt szakmai vezetője:**

Prof. Dr. Szejtli József, ügyvezető igazgató, Cyclolab R&D Lab. Ltd.

## ***V. SZAKMAI RÉSZJELENTÉS***

### ***9/2. RÉSZFELADAT***

### **Témavezető az MTA TAKI részéről:**

Dr. Anton Attila, általános igazgatóhelyettes és  
Dr. Murányi Attila, tudományos főmunkatárs.

### **A 9. feladat témavezetője és a kutatási részjelentést összeállította:**

Dr. Murányi Attila, tudományos főmunkatárs.

### **A 9. feladat kutatásaiban részt vettek:**

Dr. Árvay Gyula, Dr. Murányi Attila, Oldal Bálint, Polgár Zoltán,  
Dr. Szécsi Árpád.  
Fehér Mária, Koncz József, Mózes Zoltánné.

Budapest, 2004. június 15.

## 1. A FELADAT MEGNEVEZÉSE

### 9/2. számú részfeladat

A természetes remediáció hatékonyságának növelése oltóanyag alkalmazása révén.

## 2. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

**Kutatásaink célja:** a természetes remediáció hatékonyságának növelése egy mezőgazdaságban engedélyezett oltóanyag alkalmazása révén.

### 1. Az oltóanyagok érvényesülését befolyásoló talajökológiai tényezők értékelése.

Elemeztük a mikroorganizmusok térfoglalásának elvi szempontjait és arra a következtetésre jutottunk, hogy a revitalizáció során célszerű nagy faji diverzitású pionír közösséget alkalmazni. A mikrobiológiai funkció és a mikrobiológiai összetétel együttes értékelése alapján kiválasztottuk a Magyarországon mezőgazdasági felhasználásra engedélyezett mikrobiológiai készítmények közül a legalkalmasabb oltóanyagot.

### 2. Az oltóanyag felszaporításának vizsgálata.

**A fermentáció technológiai tényezői.** A fermentáció optimalizálása során akkor értük el a legjobb eredményeket, ha a fermentációt anaerob körülmények között végeztük, valamint 3% cukornádmelasz és 3% oltóanyag koncentrációt alkalmaztunk.

**A biológiai folyamatok jellemzése.** A mikroorganizmusok számát elemezve megállapítottuk, hogy a kiválasztott oltóanyagban lévő baktériumok, mikrogombák és fonalas gombák egymás mellett tudtak felszaporodni, egymás melletti fejlődésük és létezésük harmonikusnak bizonyult. Az optimalizált fermentáció során a különböző mikroorganizmus csoportok kiemelkedően magas sejtszámokat tudtak elérni.

Sokoldalúan vizsgáltuk a biológiai aktivitás változásait. Az oltóanyag felszaporítása együtt járt a dehidrogenáz enzimaktivitás és a szubsztrátindukált respiráció növekedésével. A mikroorganizmusok számával összhangban a biológiai aktivitás nagysága sem változott jelentős mértékben a 3. napot követően. Megállapítottuk, hogy a kezdeti respiráció sebességéből számított biomasza tömeg és az alkalmazott oltóanyag mennyiség között igen szoros lineáris összefüggés áll fenn.

**A biológiai folyamatok által indukált kémiai változások jellemzése.** A szaporodó sejtek jelentős mértékű változásokat idéztek elő környezetükben. Az oltóanyag felszaporítása során a pH érték jelentősen csökkent a keletkezett szerves savak hatására. Az oldatfázis foszforkoncentrációja jó indikátornak bizonyult a sejtszaporodás jellemzésére.

### 3. Az oltóanyag hatása csíranövények fejlődésére.

**Az oltóanyag hatása a csírázásra.** Az oltóanyag egyértelműen pozitív hatást gyakorolt a vetőmagok csírázására, amit a hajtáshosszak növekedése bizonyított.

**Az oltóanyag érvényesülése különböző talajokban.** Az oltóanyag kezelés serkentette a csíranövények fejlődését, de túl nagy dózisok alkalmazásakor a pozitív hatás mértéke csökkent, amit a bevitt mikroorganizmusok és a csíranövények közötti konkurencia okozhatott. A csíranövények fejlődése – a vizsgált talaj ökológiai adottságaitól függően – általában az 1 - 10 l/ha dózis tartományban érte el az optimumot.

## TARTALOM

RÉSZLETES SZAKMAI BESZÁMOLÓ	3.
1. Az oltóanyagok érvényesülését befolyásoló talajökológiai tényezők értékelése	3.
2. Az oltóanyag felszaporításának vizsgálata	4.
2.1. A fermentáció technológiai tényezőinek vizsgálata	4.
2.2. A fermentáció kinetikai vizsgálata, biológiai és kémiai követése	4.
3. Az oltóanyag hatása csíranövények fejlődésére	6.
3.1. Az oltóanyag hatása a csírázásra	6.
3.2. Az oltóanyag érvényesülése különböző talajokban	6.
MELLÉKLETEK	8.
1. melléklet.	
Az oltóanyagok érvényesülését befolyásoló talajökológiai tényezők értékelése	9.
2. melléklet.	
Az oltóanyag felszaporításának vizsgálata	16.
3. melléklet.	
Az oltóanyag hatása csíranövények fejlődésére	26.
Felhasznált irodalom	33.

## RÉSZLETES SZAKMAI BESZÁMOLÓ

**9/2. számú részfeladat:** A természetes remediáció hatékonyságának növelése oltóanyag alkalmazása révén.

**Kutatásaink célja:** a természetes remediáció hatékonyságának növelése egy mezőgazdaságban engedélyezett oltóanyag alkalmazása révén.

### A kutatási feladat indoklása

A szennyezett talajok remediációját követően a talaj vitalitása rendszerint alacsony (különösen a fizikai és kémiai technológiák alkalmazása után), azaz a már megtisztított, kármentesített területek mikrobiológiai diverzitása és aktivitása kicsi. Ez indokolja a remediáció befejező szakaszaként a már nem szennyezett, illetve csak kevésbé szennyezett talajok revitalizációját. A revitalizáció hasznos mikroorganizmusok alkalmazásával érhető el.

A nem szennyezett talajokban a mikroorganizmusok egyedszáma átlagos körülmények között 0,1 – 1,0 %-a, míg a mikroorganizmusok élőtömege 10 – 20 %-a az optimális körülményekre jellemző értékeknek (Mellékletek, 1. táblázat). Ezen adatok alapján egyértelműen levonható az a következtetés, hogy a talajélet optimalizálására, a talaj vitalitásának növelésére igen tág tartományban nyílik lehetőség. Fokozottan így van ez a szennyezett talajok remediációját követően, amikor a talaj mikrobiológiai jellemzői még a nem szennyezett talajok átlagos értékeit sem érik el. Ez is azt bizonyítja, hogy mennyire fontos a remediáció befejező szakaszában a talaj revitalizációja. A revitalizáció eredményeként a talaj minőségének javulását, valamint a szóban forgó terület hasznosítási lehetőségeinek kiszélesedését érhetjük el.

### 1. Az oltóanyagok érvényesülését befolyásoló talajökológiai tényezők értékelése

#### Az öko-mérnöki szemlélet és a revitalizáció

A mikroorganizmusok játsszák a központi szerepet a biotechnológiai, ezen belül a bioremediációs illetve revitalizációs folyamatokban. A revitalizáció biotechnológiai optimalizálását az öko-mérnöki szemléleten alapuló tervezés és kivitelezés biztosíthatja. Az öko-mérnöki szemlélet egyesíti magában az ökológiai tényezők figyelembevételét és a biomérnöki tervezhetőséget. A revitalizációval összefüggő kutatásaink során az öko-mérnöki szemlélet érvényesítésére törekedtünk.

#### A mikroorganizmusok térfoglalásának elvi szempontjai

A mikroorganizmusok térfoglalásának elvi szempontjait elemezve megállapítottuk, hogy a nagy faji diverzitás (ami jelentős génkészletet is reprezentál) mindig a közösség komplex és sokrétű működését jellemzi. Ebből levontuk azt a következtetést, hogy a revitalizáció során célszerű nagy faji diverzitású pionír közösséget alkalmazni a térfoglalás megvalósítására.

## **Az oltóanyag kiválasztása**

A talaj mikrobiológiai viselkedésének alapja a talajban eredetileg jelenlevő mikrobaközösség nagysága és összetétele. Az oltóanyag talajba vitele során ezt a kapacitív jellegű alap tulajdonságot változtatjuk meg. Az oltóanyagok minősítése és rangsorolása során döntő tényező tehát az oltóanyagban levő mikroorganizmusok összetétele és koncentrációja (1. melléklet 2. táblázat).

A mikrobiológiai funkció és a mikrobiológiai összetétel együttes értékelése alapján kiválasztottuk a Magyarországon mezőgazdasági felhasználásra engedélyezett mikrobiológiai készítmények közül a legalkalmasabb oltóanyagot revitalizációs kutatásainkhoz.

## **Az oltóanyag érvényesülését befolyásoló tényezők**

Az oltóanyag kiválasztását követően részletesen elemeztük az oltóanyag érvényesülését befolyásoló legfontosabb tényezőket (1. melléklet 1. ábra). A biotechnológus feladata, hogy elősegítse a kiválasztott oltóanyag hatékony működését a befolyásoló tényezők figyelembe vétele és megfelelő beállítása révén.

A talajtényezők, amelyek az oltóanyag túlélését és sikerességét befolyásolják, nem függetlenek egymástól. Még az öko-mérnöki szemlélettel felvértezett biotechnológusnak is komoly szakmai kihívást jelent az igen sokféle befolyásoló tényező elemzése és megfelelő figyelembevétele.

## **2. Az oltóanyag felszaporításának vizsgálata**

A baktériumokat, sugárgombákat, mikrogombákat egyaránt tartalmazó oltóanyag körültekintő kiválasztását követően megkezdtük az oltóanyag részletes vizsgálatát. Kutatásaink során nagy hangsúlyt fektettünk az oltóanyag felszaporításának vizsgálatára, mert a revitalizációs folyamatokban központi szerepet játszó mikroorganizmusok mennyisége és minősége kulcskérdés a bioremediáció befejező szakaszának sikeres megtervezésében és kivitelezésében.

Az oltóanyag felszaporításával összefüggő kutatásaink első szakaszában elvégeztük a fermentáció legfontosabb technológiai tényezőinek vizsgálatát, majd részletesen tanulmányoztuk a fermentáció kinetikáját a biológiai és kémiai folyamatok egyidejű elemzése révén. E kutatások az oltóanyag felszaporításának optimalizálására szolgáltak.

### **2.1. A fermentáció technológiai tényezőinek vizsgálata**

A fermentáció technológiai tényezői közül a levegőztetés, a táptalaj minősége, a táptalaj és oltóanyag koncentráció hatását tanulmányoztuk (2. melléklet 3. táblázat).

A fermentációt befolyásoló legfontosabb technológiai tényezőket elemezve megállapítottuk, hogy a fermentáció során akkor érhetők el optimális eredmények, ha a fermentációt anaerob körülmények között végezzük, valamint 3% cukornádmelasz és 3% oltóanyag koncentrációt alkalmazunk.

### **2.2. A fermentáció kinetikai vizsgálata, biológiai és kémiai követése**

A fermentáció kinetikájának tanulmányozása során nemcsak a különböző mikroorganizmusok számát határoztuk meg, hanem az oltóanyag biológiai aktivitását is jellemeztük. Az

oltóanyag biológiai jellemzése mellett tanulmányoztuk az oltóanyag által indukált kémiai változásokat is. A kémiai és biológiai folyamatok egyidejű vizsgálata révén az oltóanyag felszaporítás folyamatának mélyebb megértésére törekedtünk.

## **A biológiai folyamatok jellemzése**

### ***A mikroorganizmusok száma***

A felszaporítás során az összcsíraszámok (baktériumszámok) és a mikrogombaszámok több mint 5 nagyságrendet, a sugárgombaszámok több mint 3 nagyságrendet öleltek át (2. melléklet 2. ábra). Ezek a nagyságrendek egyértelműen bizonyították, hogy a fermentációt sikeresen optimalizáltuk, mert a mikroorganizmusok felszaporodása nagyon jelentős mértékű volt.

A nagyságrendeket tekintve mind a mikrogombák száma, mind az összcsíraszám (baktériumszám) elérte a  $10^9$  nagyságrendet. Ez különösen a mikrogombák esetében igen kedvező érték, figyelembe véve a talajban élő gombák igen nagyfokú érzékenységét a környezeti tényezőkkel szemben.

Az oltóanyag felszaporítási kísérlet során mért mikrobaszámok lefutása azt jelezte, hogy a különböző mikroorganizmus csoportok (baktériumok, sugárgombák, mikrogombák) viselkedése is hasonló volt. Ez azt jelenti, hogy a különböző mikroorganizmusok egymás mellett tudtak felszaporodni, majd elérték egy koncentrációsintet, ahol már egymással nem konkurálva, egymás mellett tudtak létezni.

A fermentáció kinetikai vizsgálat igen lényeges eredménye, hogy a felszaporított különböző mikroorganizmusok száma a 3. naptól kezdve nem változott lényegesen a kísérlet befejezéséig, a 15. napig. Ez az oltóanyag ökológiai stabilitását bizonyítja.

A mikroorganizmusok számát elemezve megállapítottuk, hogy a kiválasztott oltóanyagban lévő baktériumok, mikrogombák és fonalas gombák egymás mellett tudtak felszaporodni, egymás melletti fejlődésük és létezésük harmonikusnak bizonyult. Az optimalizált fermentáció során a különböző mikroorganizmus csoportok kiemelkedően magas sejtszámokat tudtak elérni.

### ***A mikrobiológiai aktivitás jellemzése***

Az oltóanyag felszaporítása során nemcsak a mikrobaszámok alakulása, hanem a felszaporított oltóanyag biológiai aktivitása is fontos mikrobiológiai jellemző. Ennek érdekében határoztuk meg az oltóanyag dehidrogenáz enzimaktivitását (2. melléklet 3. ábra), foszfataz enzimaktivitását (2. melléklet 4. ábra) és szubsztrátindukált respirációját (2. melléklet 5. és 6. ábra). A biológiai aktivitás mérése során nem az egyes mikrobacsoportok, hanem az összes mikroorganizmus együttes aktivitását tudtuk jellemezni.

Sokoldalúan vizsgáltuk az oltóanyag felszaporítása során bekövetkező aktivitásváltozásokat. A kapott eredmények azt bizonyították, hogy az oltóanyag felszaporítása együtt járt a dehidrogenáz enzimaktivitás és a szubsztrátindukált respiráció növekedésével. A mikroorganizmusok számával összhangban a 3. napot követően a biológiai aktivitás nagysága sem változott jelentős mértékben. Megállapítottuk, hogy a kezdeti respiráció sebességéből számított biomassa tömege és az alkalmazott oltóanyag mennyisége között igen szoros lineáris összefüggés áll fenn (2. melléklet 7. ábra).

### **A biológiai folyamatok által indukált kémiai változások jellemzése**

Az oltóanyag felszaporításakor lejátszódó anyagcsere folyamatok a környezettel kölcsönhatásban játszódnak le. Az oltóanyagban lévő mikroorganizmusok szaporodása változásokat indukál a tápoldatban. A biológiai és a kémiai folyamatok egyidejű jellemzése érdekében megvizsgáltuk, hogy milyen kémiai változások következnek be a fermentáció alatt (2. melléklet 8. ábra, 9. ábra, 4. táblázat).

A fermentációs folyamatok által indukált kémiai folyamatok elemzése során megállapítottuk, hogy a szaporodó sejtek jelentős mértékű változásokat idéztek elő környezetükben. Az oltóanyag felszaporítása során a pH érték jelentősen csökkent a keletkezett szerves savak hatására. Az oldatfázis foszforkoncentrációja jól hasznosítható a sejt szaporodás indikátoraként.

### **3. Az oltóanyag hatása csíranövények fejlődésére**

Az oltóanyag revitalizációra gyakorolt hatását a biológiai indikáció hasznosítása révén a legcélszerűbb tanulmányozni, ami lehetővé teszi az oltóanyag által indukált biológiai változások jellemzését. Bioindikátorként alkalmazhatunk mikrobiológiai vagy növényi paramétereket. Kutatásaink során a növényi paraméterek vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt, mert a remediált területeken igen sok esetben előnyös a növények megtelepedésének elősegítése (pl. fitostabilizációnál), amit a talaj revitalizációja megkönnyíthet. Bioindikátor teszt növénynek a magyar szabványban is előírt fehér mustárt (*Sinapis alba*) választottuk.

#### **3.1. Az oltóanyag hatása a csírázásra**

Csírázási kísérletben vizsgáltuk az oltóanyagnak a vetőmagra gyakorolt vitalizációs hatását (3. melléklet 10. ábra). Az oltóanyag egyértelműen pozitív hatást gyakorolt a vetőmagok csírázására, a vetőmag vitalitásának növekedését a hajtáshossz növekedése bizonyította.

#### **3.2. Az oltóanyag érvényesülése különböző talajokban**

Részletesen jellemeztük az oltóanyag növényekre gyakorolt vitalizációs hatását különböző talajokban. E kísérletek során az oltóanyagban található mikroorganizmusok a természetes talajok bennszülött mikroorganizmusaival együtt fejtik ki hatásukat a növények fejlődésére. Mivel a mezőgazdaságilag művelt talajok természetes talajflórája sokkal gazdagabb és sokszínűbb, mint a remediált talajoké, ezért nem szennyezett talajokban célszerű az oltóanyag érvényesülésének vizsgálata. Ha az oltóanyag természetes körülmények között is képes pozitív hatást gyakorolni a növények fejlődésére, akkor a remediált talajokban az oltóanyag hatása még fokozottabban érvényesülhet.

#### **A csíranövények fejlődése**

A kísérletek során az alkalmazott oltóanyag dózis, a teszt növény és a kísérleti körülmények azonosak voltak. Ez lehetőséget adott az egyes talajokra gyakorolt hatások összehasonlítására.

A talajminták kiválasztásakor arra törekedtünk, hogy a legfontosabb talajdegradációs formákat jellemző talajokat is vizsgáljunk. A kísérletekbe ezért három, különböző talajdegradációs folyamatot reprezentáló talajt is bevontunk. A karcagi réti csernozjom talaj a talajsavanyodást és szerkezet leromlást, a karcagpusztai réti szolonyec talaj a szikese-

dést és talajtömörödést, a kisújszállási réti talaj a talajtömörödést és felszíni kérgesedést jellemzi. A bugyi talaj egy mezőgazdasági művelés alatt álló karbonátos öntéstalaj, míg a Florasca B egy savanyú kémhatású virágföld. Ez az öt talajminta a talajtulajdonságok széles tartományát reprezentálja.

A **csíranövények száma** a talaj - növény rendszer biológiai aktivitását jellemzi. Nagy növényszám a talaj - növény rendszer harmonikus voltát, vitalitását jelzi. Kicsi növényszám valamilyen diszharmóniára, egyes talajökológiai tényezők korlátozó voltára utal. Ilyen esetekben a biotechnológus feladata a talajökológiai korlátok azonosítása és megfelelő értékének beállítása.

A kísérlet végén a csíranövények száma az egyes talajokban igen eltérő (3. melléklet 11. ábra). A csírázási százalék a karcagpusztai és a bugyi talajban igen jó, a karcagi és a kisújszállási talajban közepes és a Florasca B talajban gyenge volt. A karcagi, a karcagpusztai és a kisújszállási talaj esetében a növények száma egy maximumot mutatott. A maximum értéke az 1 – 10 l/ha oltóanyag dózisonál jelentkezett, ami azt jelzi, hogy az optimális oltóanyag dózis talajonként eltérő. Az optimumnál kisebb dózis esetén az oltóanyag még nem tudja maximálisan kifejteni a hatását. Az optimumnál nagyobb dózis esetében az oltóanyaggal bevitt mikroorganizmusok pozitív, de csökkenő mértékű hatást tudnak kifejteni, mert már a növényekkel konkurálnak.

A **csíranövények** átlagos **hajtáshossza** is jól jellemzi az oltóanyag érvényesülését a különböző talajokban (3. melléklet 12. ábra). A legnagyobb hajtáshosszakat a Florasca B virágföldben mértük, ahol szintén maximum görbét kaptunk az oltóanyag dózis függvényében. A hajtáshossz maximum ebben a talajban a 10 l/ha dózisonál található. A 10 l/ha dózis alatt az oltóanyag még nem tudta kifejteni maximális hatását, e felett pedig határozottan pozitív, de csökkenő mértékű hajtáshossz növekedést tapasztaltunk. A többi talaj esetében is hasonló, maximumot adó görbét kaptunk. Ez azt jelezte, hogy a talajok vetéssel egyidejű oltása mindig pozitív, serkentő hatást idézett elő és ez a hatás egy optimum görbével jellemezhető. A hajtáshosszak alapján a legkevesbé fejlett csíranövények a kisújszállási talajban fejlődtek. Itt valószínűleg a talaj nagy agyagtartalma miatti kis hasznosítható víztartalom korlátozta a csíranövények fejlődését. A bugyi talajban a Florasca B virágföldhöz hasonlóan szépen fejlődtek a növények. A karcagi és a karcagpusztai talajokban mért átlagos hajtáshossz közepes volt.

A **csíranövények friss hajtás és gyökértömege** is meghatározásra került (3. melléklet 5. táblázat). A hajtástömegek is maximumon áthaladó görbét eredményeztek az 1,0 – 10,0 l/ha oltóanyag dózis tartományban. A kontrollhoz képest a maximális hajtástömeg a karcagi talajban 11%-kal, a karcagpusztai talajban 57%-kal, a Florasca B virágföldnél 28%-kal, a kisújszállási talajban 86%-kal, a bugyi talajban 18%-kal volt nagyobb. A hajtástömeg növekedés egyértelműen bizonyította az oltóanyagoknak a növényfejlődésre gyakorolt pozitív, serkentő hatását. A friss gyökér tömeg elemzésekor szembe tűnő, hogy a legkisebb gyökértömeget (a hajtáshosszhoz hasonlóan) a kisújszállási talajban mértük, ami azt jelezte, hogy a gyökérfejlődés valószínűleg a nagy agyagtartalom miatt gátolt volt. A gátolt gyökérfejlődés viszont gyenge hajtásfejlődést eredményezett. A gyökérfejlődés a bugyi talajban a legerőteljesebb, ami a könnyű mechanikai összetétellel függött össze. A gyökök a karcagi csernozjom talajban szintén jól fejlődtek.

Összességében megállapítottuk, hogy az oltóanyag kezelés serkentette a csíranövények fejlődését, de túl nagy dózisok alkalmazásakor a pozitív hatás mértéke csökken, amit a bevitt mikroorganizmusok és a csíranövények közötti konkurencia okoz. A csíranövények fejlődése - az adott talaj ökológiai adottságaitól függően - általában az 1 - 10 l/ha dózis tartományban érte el az optimumot.



## MELLÉKLETEK

### 1. melléklet

*1. táblázat.* A talaj mikroorganizmusok egyedszáma és élőtömege a mérsékelt égöv talajai-ban.

<b>Mikroflóra</b>	<b>egyedszám</b>	<b>egyedszám</b>	<b>egyedszám</b>	<b>élőtömeg</b>	<b>élőtömeg</b>	<b>élőtömeg</b>
	<b>átlagos</b>	<b>optimális</b>	<b>átlagos /</b>	<b>átlagos</b>	<b>optimális</b>	<b>átlagos /</b>
	<b>körülmenvek</b>	<b>körülmenvek</b>	<b>optimális</b>	<b>körülmenvek</b>	<b>körülmenvek</b>	<b>optimális</b>
	<b>db/m<sup>2</sup></b>	<b>db/m<sup>2</sup></b>	<b>%</b>	<b>g/m<sup>2</sup></b>	<b>g/m<sup>2</sup></b>	<b>%</b>
<b>baktériumok</b>	1.00E+14	1.00E+16	1.0	100	700	14
<b>aktinomiceták</b>	1.00E+13	1.00E+15	1.0	100	500	20
<b>gombák</b>	1.00E+11	1.00E+14	0.1	100	1000	10
<b>algák</b>	1.00E+08	1.00E+11	0.1	20	150	13
<b>összesen</b>	1.10E+14	1.11E+16	1.0	320	2350	14

## AZ OLTÓANYAGOK ÉRVÉNYESÜLÉSÉT BEFOLYÁSOLÓ TALAJÖKOLÓGIAI TÉNYEZŐK ÉRTÉKELÉSE

### Az öko-mérnöki szemlélet és a revitalizáció

A mikroorganizmusok játsszák a központi szerepet a biotechnológiai, ezen belül a bioremediációs illetve revitalizációs folyamatokban. A revitalizáció biotechnológiai optimalizálását az öko-mérnöki szemléleten alapuló tervezés és kivitelezés biztosíthatja. Az öko-mérnöki szemlélet egyesíti magában az ökológiai tényezők figyelembevételét és a biomérnöki tervezhetőséget.

A revitalizáció optimalizálása során az ökológiai tényezők szerepe leginkább két területen kiemelt jelentőségű:

1. A revitalizáció tervezésekor. A revitalizáció tervezése során igen körültekintő módon kell kiválasztanunk az alkalmazandó mikrobiológiai oltóanyagot. Tágabb biológiai értelemben ide sorolhatjuk a telepítendő növényfaj kiválasztását is.
2. A revitalizáció kivitelezésekor. Elemeznünk kell a revitalizálandó terület ökológiai jellemzőit, majd a tervezett revitalizációs technológiát a konkrét terület ökológiai sajátosságaihoz kell igazítanunk. Ennek keretében a konkrét helyszínre optimalizáljuk az általunk befolyásolható paramétereket (pH, oxigén és tápanyag ellátottság, nedvességtartalom, stb.).

A revitalizációval összefüggő kutatásaink során az öko-mérnöki szemlélet érvényesítésére törekedtünk.

### A mikroorganizmusok térfoglalásának elvi szempontjai

Egy adott élőhelyet benépesítő és közvetlenül illetve közvetve együttműködő szervezetek összessége a közösség (*community*). Ez lényegében a közösséget alkotó fajok populációinak együttese. A közösséget gyakran totális populációnak (*microbial population*) is jelölik. A populáció kifejezést az ökológusok nagyon különböző szervezetek és szervezetcsoportok individuumai együttesének megjelölésére használják.

A közösségekre különböző fokú faji diverzitás jellemző. Az együttműködő fajok száma lehet nagy, közepes vagy kevés. A sok fajból álló komplex közösségek bonyolult energia kanalizációt valósítanak meg. *A nagy faji diverzitás mindig a közösség komplex és sokrétű működésének jellemzője, amelyben a diverzitás növekedésével az anyagtranszformációs folyamatok biológiai kontrollja nő.*

A közösségek nem rendszertani kategóriák illetve egységek, mivel igen komplexek lehetnek és felépítésükben, illetve működésükben szimultán vesznek részt baktériumok, gombák, élesztők, protozoonok, stb. Interspecifikus társulások ezek, melyek tagjait az együttműködés folyamata átmenetileg hosszabb - rövidebb időre összekapcsolja.

### A pionír közösségek és a térfoglalás

A degradálható szerves szubsztrátokat, steril felületeket elsőnek az úttörőközösségek (*pioneer communities*) tagjai népesítik be. A térfoglalásra potenciálisan a foto- vagy kemo-

autotróf szervezetek esélyesek, ha a kolonizálható felület illetve közeg szerves anyagot nem tartalmaz.

A térfoglaló mikrobáknak le kell győzniük a környezet ellenállását, ami talajok esetében extrém só-koncentrációk, helyileg felhalmozott gátlóanyagok, alacsony vízpotenciál, szerves és szervesetlen toxinok stb. jelenlétére vezethető vissza.

Ha viszont a pionír közösség egyszer már megvetette a lábát és szaporodásnak indult, akkor éppen ez a tény lesz, legalábbis egy ideig, a folyamatosan továbbra is érkező jövevények érvényesülésének és letelepedésének legfőbb és leghatékonyabb biológiai akadály.

#### A közösség autogén és allogén szukcessziói

Mint ahogy a mikrobák közösségei környezetüket is megváltoztatják, és ez egy idő után számukra már nem biztosít optimális életfeltételeket, a pionír közösségeket szukcesszió-szerűen más társulások váltják fel. Az úgynevezett autogén szukcesszió keretében a populációs változások azért következnek be, mert a működő közösség környezetét úgy változtatja meg, hogy az már más fajok számára válik alkalmasabb tereppé. Az allogén szukcesszió során viszont az egyik társulás leváltása a másikkal a környezetet ért, nem biológiai hatások folytán következik be.

#### A közösségi anyagcsere

A mikrobák közösséggé szerveződésének alapját a közösségi anyagcsere képezi. Minden közösségben a részt vevő fajok meghatározott biokémiai - élettani képességekkel vannak felruházva. E képességek teszik lehetővé beilleszkedésüket az interspecifikus anyag- és energiaforgalomba.

Minden faj tevékenységéhez energiaforrásra van szükség. Ez lehet napfény, hidrogéngáz, ammónium, nitrit, valamilyen anorganikus kénvegyület, ferrovas, energiagazdag szerves vegyület, stb.

Ezen kívül még szénforrást (szerves vagy széndioxid), alkalmas terminális elektronakceptor (molekuláris oxigén, nitrát, szulfát, széndioxid vagy egyszerű szerves molekulák), nitrogén-, foszfor- és kénforrásokat, továbbá számos makro- és mikrotápelemet igényelnek, általában anorganikus formában. Sok deficiens mikroba még növekedési faktorokra is rászorul. A mikroorganizmus táp- és energiaforrásait környezetéből szerzi be, ahol ezt számára gyakran más fajok tevékenysége biztosítja.

#### A környezeti tényezők hatása

A mikroorganizmusok környezetében található energiaforrások és a létfontosságú elemek a mikrobaközösségek összetételét alapvetően meghatározzák. Ugyanakkor a faj előfordulását, populációinak denzitását az úgynevezett korlátozó faktorok (*limiting factors*) lényegesen befolyásolják. Az abiotikus korlátozó faktorok között különösen fontosak a pH, a hőmérséklet, az ozmotikus illetve hidrosztatikus nyomás, a páratartalom, a fényintenzitás és a sótartalom. A talajszennyezések is a korlátozó tényezők közé tartoznak, hiszen mind a nehézfémek, mind a szerves szennyezők a talaj biológiai sokszínűségét és aktivitását erősen korlátozzák. Pontosan ez indokolja, hogy a revitalizáció során a fajgazdagságot valamint a talaj biológiai aktivitását kívánjuk helyreállítani.

A mikroorganizmusok térfoglalásának elvi szempontjait elemezve megállapítható, hogy a nagy faji diverzitás (ami jelentős génkészletet is reprezentál) mindig a közösség komplex és sokrétű működését jellemzi. Ebből levonható az a következtetés, hogy a revitalizáció során célszerű nagy faji diverzitású pionír közösséget alkalmaznunk a térfoglalás megvalósítására.

## Az oltóanyag kiválasztása

A talaj mikrobiológiai viselkedésének alapja a talajban eredetileg jelenlevő mikrobaközösség nagysága és összetétele. Az oltóanyag talajba vitele során ezt a kapacitív jellegű alaptulajdonságot változtatjuk meg. Az oltóanyagok minősítése és rangsorolása során döntő tényező tehát az oltóanyagban levő mikroorganizmusok összetétele és koncentrációja.

A talajok biológiai aktivitásának növelése érdekében számos oltóanyagot forgalmaznak mind külföldön, mind belföldön. Emiatt áttekintettük az engedélyezett és forgalomban lévő mezőgazdasági oltóanyagokat, melyek közül a revitalizáció céljára kiválasztható a számunkra legmegfelelőbb. Tekintettel arra, hogy jelen kutatásunk a talajban lejátszódó természetes folyamatok elősegítését célozza, ezért a kiválasztás során az ökológiai mezőgazdaság felhalmozott tapasztalataira is támaszkodtunk.

A **2. táblázat** alapján megállapítható, hogy Magyarországon 2004-ben összesen 23 mikrobiológiai készítmény használható fel a mezőgazdaságban.

A mikrobiológiai készítményeket megkülönböztethetjük meghatározó **mikrobiológiai funkció**juk szerint. A baktériumtrágyák – a szerves és szervetlen trágyáktól eltérően – nem a talaj tápanyaggal történő ellátását biztosítják, hanem a talaj mikrobiológiai tevékenységét javítják, és ez által segítik elő, közvetlenül vagy közvetve, a növények fejlődését. A szervesanyag bontó készítmények a növényi és állati maradványok lebontását gyorsítják meg. A fitostimulátor készítmények – kísérletileg igazoltan – serkentik a növény fejlődését. Funkció szerint csoportosítva a készítményeket 14 db baktériumtrágya, 4 db szervesanyag bontó és 3 db fitostimulátor forgalmazható jelenleg Magyarországon. A bioremediáció befejező szakaszát jelentő revitalizáció esetében elsősorban a fitostimulátor készítmények (Bioplasma algatrágya, Bioplasma algás levéltrágya, EM-1 oltóanyag) jöhetnek szóba, mivel ezek a talajélet aktiválása mellett a növények megtelepedését is elősegítik. Ez pedig különösen a növénytakaró nélküli területeken (meddőhányók, feltöltött területek, stb.) előnyös.

A mikrobiológiai készítményeket rangsorolhatjuk **mikrobiológiai összetettségük** szerint is. A revitalizáció során ugyanis célszerű nagy faji diverzitású pionír közösséget alkalmazni. Magyarországon a készítmények összetételét az összcsíraszám (baktériumszámmal), a sugárgombaszámmal és a mikrogombaszámmal jellemzik. A 23 forgalmazott készítmény között mindössze 3 olyan készítmény van, amelyikben mind a három mikrobacsoport megtalálható. E három készítmény közül a Terra-Vita R. komposzt aktivátor egy szervesanyag bontó készítmény. Ez a revitalizáció esetében nem jöhet szóba, mert a revitalizáció során a szervesanyag szintézis elősegítése, nem pedig a meglévő szervesanyag lebontása a cél. A fennmaradó két készítményt összehasonlítva megállapítható, hogy az EM-1 oltóanyag sokkal több mikroorganizmust tartalmaz, mint a Bio-Bact trágya. Az EM-1 oltóanyagban a baktériumszámot jellemző összcsíraszám három, a sugárgombák száma három, a mikrogombák száma egy nagyságrenddel nagyobb, mint a Bio-Bact trágyában. A készítmények mikrobiológiai összetétele alapján tehát az EM-1 oltóanyag alkalmazása javasolható a revitalizációhoz.

Összefoglalva levonható az a következtetés, hogy a Magyarországon mezőgazdasági felhasználásra engedélyezett mikrobiológiai készítmények közül a mikrobiológiai funkció és a mikrobiológiai összetétel együttes értékelése alapján az EM-1 oltóanyagot célszerű a revitalizáció során alkalmazni.

2. táblázat. Magyarországon felhasználási engedéllyel rendelkező mikrobiológiai készítmények.

Kereskedelmi név	Mikrobiológiai összetétel (baktérium, sugárgomba, mikrogomba)	Funkció	Koncentráció
Azoter 2000 baktériumtrágya	Azotobacter agile, Azospirillum brasiliense, Bacillus megaterium	baktériumtrágya	összcsofíraszám 1,5-2,0*10 <sup>9</sup> db/ml
Bactofil A	Azospirillum brasiliense, Azotobacter vinelandii, Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa, Pseudomonas fluorescens, Streptomyces albus	baktériumtrágya	összcsofíraszám 3,0*10 <sup>8</sup> db/ml
Bactofil A10	Azospirillum brasiliense, Azotobacter vinelandii, Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa, Pseudomonas fluorescens, Streptomyces albus	baktériumtrágya	összcsofíraszám 4,3*10 <sup>9</sup> db/ml
Bactofil B	Azospirillum lipoferum, Azotobacter vinelandii, Bacillus circulans, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Micrococcus roseus, Pseudomonas fluorescens	baktériumtrágya	összcsofíraszám 3,2*10 <sup>8</sup> db/ml
Bactofil B10	Azospirillum lipoferum, Azotobacter vinelandii, Bacillus circulans, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Micrococcus roseus, Pseudomonas fluorescens	baktériumtrágya	összcsofíraszám 5,2*10 <sup>9</sup> db/ml
Bactofil gyöngy A	Azospirillum brasiliense, Azotobacter vinelandii, Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa, Pseudomonas fluorescens, Streptomyces albus	baktériumtrágya	összcsofíraszám 3,5*10 <sup>8</sup> db/g
Bactofil gyöngy B	Azospirillum lipoferum, Azotobacter vinelandii, Bacillus circulans, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Micrococcus roseus, Pseudomonas fluorescens	baktériumtrágya	összcsofíraszám 4,1*10 <sup>8</sup> db/g
Baktomix UN	Azotobacter chroococcum, Bacillus megaterium, Cellulomonas	baktériumtrágya	összcsofíraszám 2,6*10 <sup>7</sup> db/ml
Bio-Bact trágya	Titkos, törzsletében van	-	baktériumok 1*10 <sup>4</sup> db/ml, sugárgombák 1*10 <sup>3</sup> db/ml, mikrogombák 5*10 <sup>3</sup> db/ml
Bioplasma algatrágya	Chlorella alga sűrítmény	fitostimulátor	összcsofíraszám 2-3*10 <sup>7</sup> db/ml
Bioplasma algás levéltrágya	Chlorella alga sűrítmény	fitostimulátor	összcsofíraszám 2-3*10 <sup>5</sup> db/ml
EM-1 oltóanyag	fotoszintetizáló baktériumok, tejsavbaktériumok, élesztőgombák	fitostimulátor	összcsofíraszám 1,29*10 <sup>7</sup> db/ml, sugárgombaszám 9,7*10 <sup>5</sup> db/ml, mikrogombaszám 3,5*10 <sup>4</sup> db/ml
E-2001 nitrogénkötő talajoltó koncentrátum	Azotobacter vinelandii, Clostridium pasteurianum	baktériumtrágya	összcsofíraszám 6,5*10 <sup>7</sup> db/ml

2. táblázat. Magyarországon felhasználási engedéllyel rendelkező mikrobiológiai készítmények.

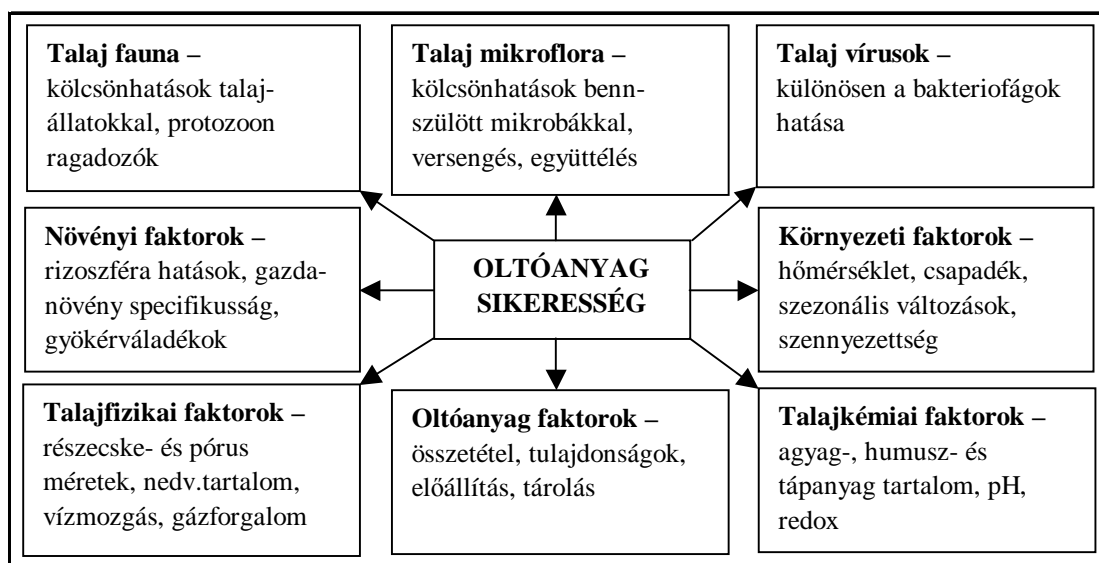
Kereskedelmi név	Mikrobiológiai összetétel (baktérium, sugárgomba, mikrogomba)	Funkció	Koncentráció
Mikro-Vital baktériumtrágya	Titkos, törzsletében van	-	összcsíraszám $5-12 \cdot 10^8$ db/ml
Phomobil mikrobiológiai készítmény	Bacillus megaterium, Pseudomonas fluorescens	baktériumtrágya	összcsíraszám $6,7 \cdot 10^8$ db/ml
Phylazonit	Azotobacter chroococcum, Rhizobium sp.	baktériumtrágya	Azotobacter chroococcum $1-2 \cdot 10^9$ db/ml, Rhizobium spp. $1-2 \cdot 10^9$ db/ml
Phylazonit M	Azotobacter chroococcum, Bacillus megaterium	baktériumtrágya	Azotobacter chroococcum $1-2 \cdot 10^9$ db/ml, Bacillus megaterium $1-2 \cdot 10^8$ db/ml
Phylazonit MC	Azotobacter chroococcum, Bacillus megaterium	baktériumtrágya	Azotobacter chroococcum $1-2 \cdot 10^9$ db/ml, Bacillus megaterium $1-2 \cdot 10^8$ db/ml
Sannitree bioenzim granulátum	Bacillus licheniformis, Bacillus polymyxa, Bacillus subtilis, Bacteroides succinogenes, Ruminococcus albus	szervesanyag bontó	összcsíraszám $3,3 \cdot 10^7$ db/g
Sannitree Sannigro	Aerobacter sp., Bacillus megaterium, Cellulomonas sp., Streptococcus bovis	szervesanyag bontó	összcsíraszám $1 \cdot 10^8$ db/g
Sannitree Sannisty	Aerobacter sp., Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Cellulomonas sp., Nitrobacter sp., Nitrosomonas sp.	szervesanyag bontó	összcsíraszám $1,1 \cdot 10^8$ db/g
Symbion mikrobiológiai készítmény	Azotobacter sp., Azospirillum sp., Bacillus sp., Clostridium pasteurianum, Herbaspirillum sp., Spirillum sp., Pseudomonas sp., Xanthobacter sp.	baktériumtrágya	összcsíraszám $6,6 \cdot 10^8$ db/ml
Terra-Vita R. komposzt aktivátor	Titkos, törzsletében van	starter sz. a. bontó	baktériumok $1,7 \cdot 10^8$ db/g, sugárgombák $1,6 \cdot 10^7$ db/g, mikrogombák $4,0 \cdot 10^4$ db/g, aerob cellulózbontók $1,8 \cdot 10^7$ db/g, szabadonélő nitrogénkötők $4,7 \cdot 10^5$ db/g

### Az oltóanyag érvényesülését befolyásoló tényezők

Az oltóanyag kiválasztását követően elemezni kell az oltóanyag érvényesülését befolyásoló legfontosabb tényezőket. A biotechnológus feladata, hogy elősegítse a kiválasztott oltóanyag hatékony működését a befolyásoló tényezők figyelembe vétele és megfelelő beállítása révén. Az **1. ábra** összefoglalja azokat a legfontosabb tényezőket, amelyek befolyásolják az oltóanyag érvényesülését a talajban.

Az oltás sikerét befolyásoló tényezők elemzése magába foglalja az oltóanyaggal összefüggő paraméterek, valamint a talaj fizikai, kémiai és biológiai tényezőinek, továbbá a növényi és környezeti faktoroknak a vizsgálatát.

1. ábra. A mikrobiológiai oltóanyagok sikerességét befolyásoló legfontosabb tényezők.



Jelen esetben az oltóanyaggal összefüggő kérdéseket már az előzőekben értékeltük. Amennyiben azonban az oltóanyag előállítása is feladatunkat képezi, akkor nagy figyelmet kell fordítanunk a törzs kiválasztására, a törzs felszaporítására, a vivőanyag készítésére, összekeverésükre, az érlelésre, a tárolásra, a szállításra és az alkalmazási technológiára.

A talajfizikai faktorok között a legfontosabbak a vizet és levegőt tartalmazó talajpórusok. A *Rhizobium* oltás esetében például kulcsparaméter az a nedvességtartalom, amelynél a sejtek fennmaradnak. Ez különösen a trópusi talajokban fontos, ahol a sejtek kiszáradását el kell kerülni, amíg a pillangós növény gyökérgolonizációja megtörténik. A *Rhizobium* fajoknak ugyanis – a legtöbb talajbaktériummal ellentétben – alacsony/közepes a víz okozta stresszel szembeni toleranciája. Amennyiben tőzeget vagy agyagot használunk *Rhizobium* hordozóként, akkor a vetést megelőzően a vivőanyagokat be kell nedvesíteni. A vetést követően pedig már a talaj vízpotenciálja az a tényező, amelyik meghatározza az oltóanyag sikerességét. A biotechnológus feladata, hogy törekedjen a lejátszódó biológiai folyamatok számára megfelelő nedvesség-, illetve levegőtartalom biztosítására.

A talajkémiai faktorok között a pH érték az egyik legfontosabb tényező. Sok talajban ugyanis a savanyúság fontos szerepet játszik az oltóanyag túlélésében és sikerességében. Savanyú talajokban általában az alumínium toxicitás okozza a legnagyobb problémát a talajbiota számára. Például a pH 4,3 érték a rizoszférában élő *Rhizobium trifolii* populáció pusztulását okozhatja, de nem befolyásolja a fehérhere (*Trifolium repens*) gyökérfejlődését illetve gyökérszőr képződését. E miatt a savanyú talajokban sok pillangós gümőképződését nem lehet *Rhizobium* oltással elősegíteni a *Rhizobium* fajoknak az alumíniummal szemben mutatott nagyfokú érzékenysége miatt. A revitalizáció sikeressége érdekében tehát be kell állítanunk a megfelelő pH értéket a talajban.

A talajkémiai (agrokémiai) faktorok közé sorolható a tápanyag ellátottság is. A pillangósok sikeres oltását például nem szabad veszélyeztetni gyenge növénytáplálással, mert a pillangósok gyökérrendszere gyenge tápanyag mobilizáló. Ez különösen igaz a foszforra, ami a legtöbb trópusi talajban kevés. A remediált területeken gyakran előforduló tápanyaghiányt a revitalizáció sikeressége érdekében tápanyag utánpótlással kell kiküszöbölnünk.

További fontos tényezők, amelyek meghatározzák az oltóanyag sikerességét a talajhőmérséklet (környezeti faktor), pillangósokból és/vagy más növényekből kidiffundáló anyagok

(növényi faktor), a mikroba antagonizmusok (talaj mikroflora), a bakteriofág aktivitás (talaj vírusok), protozoaszákmányolás (talaj fauna).

Az oltóanyag túlélését és sikerességét befolyásoló talajtényezők nem függetlenek egymástól. Erős kölcsönhatás van például a talajnedvesség és a talajhőmérséklet között és e kölcsönhatás erősségét a talaj agyagtartalma is befolyásolja.

Még az öko-mérnöki szemlélettel felvértezett biotechnológusnak is komoly szakmai kihívást jelent az igen sokféle befolyásoló tényező elemzése és megfelelő figyelembevétele.



## AZ OLTÓANYAG FELSZAPORÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A baktériumokat, sugárgombákat, mikrogombákat egyaránt tartalmazó EM-1 oltóanyag (a továbbiakban: oltóanyag) körültekintő kiválasztását követően megkezdhettük az oltóanyag részletes vizsgálatát. Kutatásaink során nagy hangsúlyt fektettünk az oltóanyag felszaporításának vizsgálatára, mert a revitalizációs folyamatokban központi szerepet játszó mikroorganizmusok mennyisége és minősége kulcskérdés a bioremediáció befejező szakaszának sikeres megtervezésében és kivitelezésében.

Az oltóanyag felszaporításával összefüggő kutatásaink első szakaszában elvégeztük a fermentáció legfontosabb technológiai tényezőinek vizsgálatát. Ezt követően részletesen tanulmányoztuk a fermentáció kinetikáját a biológiai és kémiai folyamatok egyidejű elemzése révén. E kutatások az oltóanyag felszaporításának optimalizálására szolgáltak.

### 2.1. A fermentáció technológiai tényezőinek vizsgálata

A fermentáció technológiai tényezői közül a levegőztetés, a táptalaj minősége, a táptalaj és oltóanyag koncentráció hatását tanulmányoztuk.

#### Kísérleti körülmények

Fermentációs kísérleteinket 500 ml-es lombikokban, 24 °C-on végeztük. A fermentáció időtartama 24 óra volt. A levegőztetés hatását anaerob és aerob körülmények között vizsgáltuk. Az aerob kísérletekben a fermentáció első 12 órájában levegőztettük a rendszert. Táptalajként cukornádmelaszt, cukorrépa melaszt (42% cukortartalom) és izocukrot (71% cukortartalom) használtunk. Az alkalmazott táptalaj és oltóanyag koncentráció 3%, 2% és 1% volt. A fermentáció technológiai kísérleteket követően a felszaporított oltóanyagban meghatároztuk a sejtszámok nagyságát és megbecsültük a baktériumok és élesztőgombák arányát.

#### Kísérleti eredmények

Kísérleti eredményeinket a **3. táblázat** foglalja össze. A fermentációs kísérletek során mért legnagyobb sejtszám  $5,0 \cdot 10^9$  (1. kísérlet), míg a legkisebb sejtszám  $1,0 \cdot 10^7$  (10. kísérlet) volt. A több mint két nagyságrendű (pontosabban 500-szoros) különbség azt jelzi, hogy a technológiai tényezők igen jelentős mértékben meghatározzák a felszaporított sejtek számát.

A levegőztetés hatását elemezve azt tapasztaltuk, hogy a 8 párhuzamos (anaerob illetve aerob) kísérletsorozatból 6 esetben kaptunk magasabb sejtszámokat a nem levegőztetett és 2 esetben kaptunk magasabb csíraszámokat a levegőztetett fermentáció során. A magasabb csíraszámokat eredményező levegőztetett esetekben viszont a mikroszkópikus kép alapján becsült baktérium/élesztő arány eltolódott a baktériumok irányába, azaz az 50%/50% arány helyett 60%/40% -t (7. kísérlet) illetve 70%/30% -t (14. kísérlet) kaptunk. Az **1. táblázat** adatai viszont azt bizonyítják, hogy a talajok mikroflórájában a gombák egyedszáma és

élőtömege a legérzékenyebb a körülmények változására. Ezt figyelembe véve a levegőztetés hatására bekövetkező baktérium/élesztő arány eltolódása a baktériumok irányába nem tekinthető kedvezőnek a revitalizáció szempontjából. Mindezek alapján levonható az a következtetés, hogy az anaerob körülmények között végrehajtott fermentáció kedvezőbben hat az oltóanyag felszaporítására, mert magasabb sejtszámokat eredményezett miközben a baktérium/élesztő aránya kedvező (50%/50%) maradt. A fermentációt célszerű tehát anaerob körülmények között végrehajtani.

### 3. táblázat. Fermentáció technológiai tényezők vizsgálata.

kísérlet sorozat	levegőztetve első 12 órát	táptalaj			oltóanyag koncentráció	mikroszkópikus kép		sejtszám db/ml
		nádmelasz	répacukor	izocukor		baktérium	élesztő	
1	nem	3%			3%	50%	50%	5.0E+09
5	igen	3%			3%	60%	40%	2.1E+09
3	nem	3%			2%	50%	50%	1.3E+09
7	igen	3%			2%	60%	40%	4.5E+09
13	nem	3%			1%	50%	50%	4.5E+08
14	igen	3%			1%	70%	30%	4.0E+09
2	nem	2%			3%	50%	50%	1.5E+09
6	igen	2%			3%	60%	40%	1.3E+09
4	nem	2%			2%	50%	50%	1.0E+09
8	igen	2%			2%	60%	40%	6.0E+08
11	nem		3%		3%	ritka	ritka	1.1E+08
12	igen		3%		3%	ritka	ritka	2.0E+07
9	nem		1%	2%	3%	ritka	ritka	2.0E+08
10	igen		1%	2%	3%	ritka	ritka	1.0E+07
15	nem		1%	2%	2%	ritka	ritka	3.0E+08
16	nem		1%	2%	2%	50%	50%	1.4E+08

A táptalaj minőségének hatását vizsgálva látható, hogy a cukornádmelasz alkalmazása esetén, a fermentáció során kapott sejtszámok a  $4,5 \cdot 10^8 - 5,0 \cdot 10^9$  tartományt ölelik át, míg a cukorrépacukor illetve cukorrépacukor - izocukor kombinációk esetében a mért sejtszámok az  $1,0 \cdot 10^7 - 3,0 \cdot 10^8$  tartományba esnek. Ez alapján egyértelműen levonható az a következtetés, hogy a cukornádmelasz alkalmazása a fermentációhoz több mint egy nagyságrenddel nagyobb sejtszámokat eredményez, mint a cukorrépacukor illetve a cukorrépacukor - izocukor kombinációk alkalmazása. Az oltóanyag felszaporításához cukornádmelaszt célszerű használni táptalajként.

A táptalaj és az oltóanyag koncentráció hatását a fermentáció során kapott sejtszámokra (az előzőek figyelembe vételével) az anaerob körülmények között végrehajtott és cukornádmelaszt alkalmazó kísérletek alapján értékeljük. A legmagasabb sejtszámot a 3% cukornádmelasz és 3% oltóanyag koncentráció (1. kísérlet) esetében kaptuk ( $5,0 \cdot 10^9$ ). A 3% cukornádmelasz mellett az oltóanyag koncentrációt 2%-ra (3. kísérlet) illetve 1%-ra (13. kísérlet) csökkentve a kapott sejtszámok is csökkentek, viszont a baktérium/élesztő arány 50%/50% maradt. Az oltóanyag koncentráció csökkentése következtében csökkentek az elérhető sejtszámok is. A 2%-os cukornádmelasz koncentráció és a 3%-os illetve 2%-os oltóanyag koncentráció alkalmazásakor is kisebb sejtszámokat értünk el, mint az 1. kísérlet esetében. A cukornádmelasz koncentrációjának csökkentése is csökkentette az elérhető sejtszámokat. Mindezek alapján levontuk azt a következtetést, hogy a fermentációhoz 3% cukornádmelasz és 3% oltóanyag koncentrációt alkalmazva érhető el a legmagasabb sejtszám koncentráció.

A fermentációt befolyásoló legfontosabb technológiai tényezőket elemeztük. Megállapítottuk, hogy a fermentáció során akkor érhetőek el optimális eredmények, ha a fermentációt anaerob körülmények között végezzük valamint 3% cukornádmelasz és 3% oltóanyag koncentrációt alkalmazunk.

## **2.2. A fermentáció kinetikai vizsgálata, biológiai és kémiai követése**

A fermentáció kinetikájának tanulmányozása során nemcsak a különböző mikroorganizmusok számát határoztuk meg, hanem az oltóanyag biológiai aktivitását is jellemeztük. Az oltóanyag biológiai jellemzése mellett tanulmányoztuk az oltóanyag által indukált kémiai változásokat is. A kémiai és biológiai folyamatok egyidejű vizsgálata révén az oltóanyag felszaporítás folyamatának mélyebb megértésére törekedtünk.

### **Kísérleti körülmények**

A kísérlet indításakor összeállítottuk a felszaporítandó oltóanyag szuszpenziót. 30 ml cukornádmelaszt (= 45 g) 750 ml desztillált vízben feloldottunk, hozzáadtunk 30 ml oltóanyagot, majd a mérőlombikot desztillált vízzel feltöltöttük 1000 ml-re. A kész oldattal színültig töltöttünk egy lombikot, amelyet az anaerob körülmények biztosítása érdekében légmentesen lezártunk. Az edényt 28 °C hőmérsékletű termosztátba tettük, ahol anaerob módon hagytuk fermentálódni. A fermentálódó oldatból időnként mintát vettünk az analízisekhez. Mintavételi időpontok: 0. óra, 6. óra, 24. óra, 48. óra, 72. óra, 96. óra, 168. óra, 216. óra, 264. óra, 360. óra.

### Vizsgálati módszerek

A mintákból elvégzett biológiai vizsgálatok: összcsíraszám (baktériumszám), sugárgombaszám, mikrogombaszám meghatározása, valamint enzimaktivitások (dehidrogenáz- és foszfatáz enzimaktivitás) és szubsztrátindukált respiráció mérése.

Összcsíraszám meghatározás: nutrient agartáptalajon lemezöntéses módszerrel (MSZ 21470/77-1988, MSZ 21978-53). Mikrogombaszám meghatározás: módosított Martin-agartáptalajon lemezöntéses módszerrel (MSZ 21470/77-1988. Sugárgombaszám meghatározás: Jensen-féle kazein - glükóz agaron lemezöntéses módszerrel (Szegei, 1979).

Dehidrogenáz enzimaktivitás mérés. A talajkezelés parcellamérete: 11 cm átmérőjű Petri csésze (100 cm<sup>2</sup> talajfelület). Teszt-talaj: mészlepedékes csernozjom. Kivétel: a teszt-talajt (130 g) az oldatok hozzáadása után dörzsmozgásban homogenizáltuk. A mintavétel a méréshez a kezelés utáni 24 órában történt. A talajhoz adott 17 cm<sup>3</sup> folyadék mennyiség az adott talaj Arany féle kötöttségének 40%-a. A dehidrogenáz enzimaktivitás mérése a magyar szabvány szerinti módszerrel történt.

Foszfatáz enzimaktivitás mérés: a talajkezelés módja megegyezett a dehidrogenáz enzimaktivitásnál leírt talajkezeléssel. A foszfatáz enzimaktivitás mérése a Tabatabai - Bremner féle módszerrel történt. Szubsztrátindukált respiráció: a talajkezelés módja megegyezett a dehidrogenáz enzimaktivitásnál leírt talajkezeléssel. A szubsztrátindukált respirációt LE-203/1 típusú infraanalizátorral, szabvány szerint mértük.

A mérések becsült bizonytalansága: összcsíraszám: ± 20 rel.%; dehidrogenáz enzimaktivitás: ± 20 rel.%; respiráció: ± 15 rel.%.

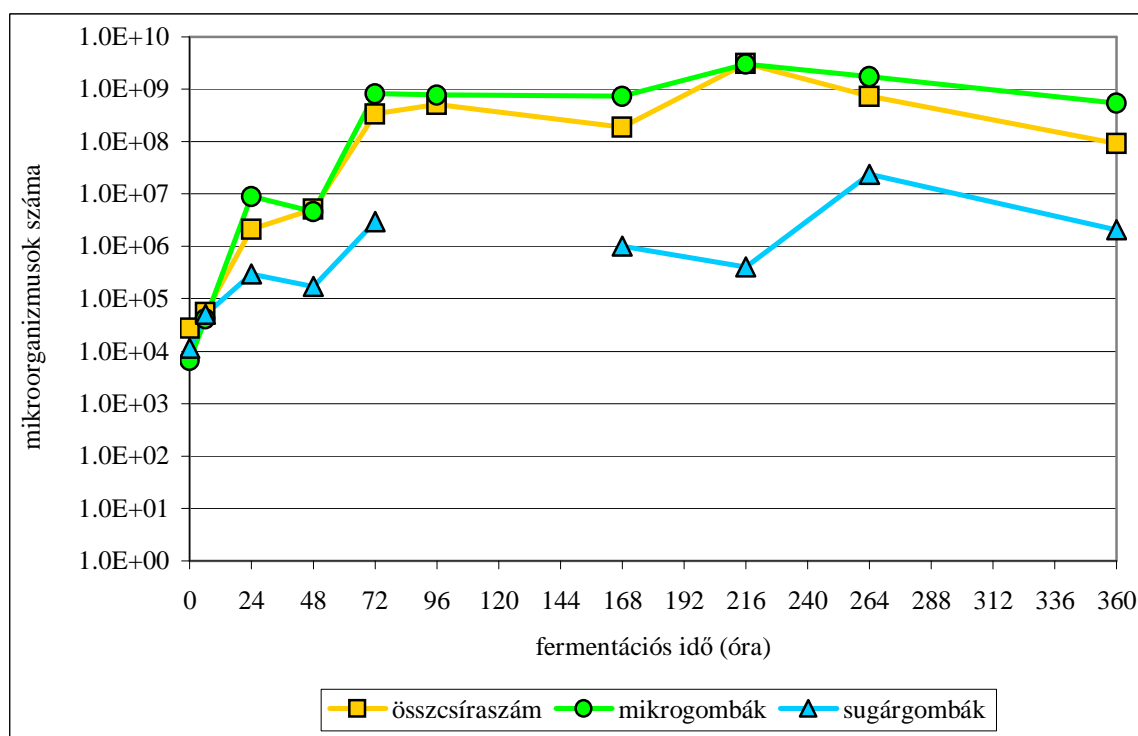
## A biológiai folyamatok jellemzése

### A mikroorganizmusok száma

A mikrobák számszerű meghatározása során az összcsíraszámmal a baktériumszámot, a mikrogombaszámmal a mikroszkópikus gombák számát, a sugárgombaszámmal a fonalas gombák (aktinomiceták) számát jellemeztük. Az összcsíraszám meghatározása nutrient agartáptalajon történt. A különböző nutrient táptalajok a nemzetközi szakirodalomban elfogadott, nem szelektív táptalajok a baktériumok izolációjára, azonosítására és tenyésztésére (Merck, 2001).

A **2. ábra** a mikroorganizmusok számát mutatja be a fermentációs idő függvényében. A felszaporítás során az összcsíraszámok (baktériumszámok) és a mikrogombaszámok több mint 5 nagyságrendet, a sugárgombaszámok több mint 3 nagyságrendet ölelnek át. Ezek a nagyságrendek egyértelműen bizonyítják, hogy a fermentációt sikeresen optimalizáltuk, mert a mikroorganizmusok felszaporodása nagyon jelentős mértékű volt. Az eredmények világosan jelzik, hogy helyesen terveztük meg a fermentáció technológiai tényezőit.

**2. ábra.** A mikroorganizmusok számának változása az oltóanyag felszaporítása során.



A nagyságrendeket tekintve mind a mikrogombák száma, mind az összcsíraszám (baktériumszám) elérte a 10<sup>9</sup> nagyságrendet. Ez különösen a mikrogombák esetében igen kedvező érték, figyelembe véve a talajban élő gombák igen nagyfokú érzékenységét a környezeti tényezőkkel szemben (lásd **1. táblázat**).

Az oltóanyag felszaporítási kísérlet során mért mikrobaszámok lefutása igen fontos következtetés levonására ad lehetőséget. A görbék lefutásának hasonló trendje ugyanis azt jelzi, hogy a különböző mikroorganizmus csoportok (baktériumok, sugárgombák, mikrogombák) viselkedése is hasonló tendenciát mutat. Más szavakkal megfogalmazva ez

azt jelenti, hogy a különböző mikroorganizmusok egymás mellett tudtak felszaporodni, majd elérték egy koncentrációsíntet, ahol már egymással nem konkurálva, egymás mellett tudtak létezni.

A fermentáció kinetikai vizsgálat igen lényeges eredménye, hogy a felszaporított különböző mikroorganizmusok száma a 3. naptól kezdve nem változott lényegesen a kísérlet befejezéséig, a 15. napig. Ez az oltóanyag ökológiai stabilitását bizonyítja.

A mikroorganizmusok számát elemezve megállapítható, hogy a kiválasztott oltóanyagban lévő baktériumok, mikrogombák és fonalas gombák egymás mellett tudtak felszaporodni, egymás melletti fejlődésük és létezésük harmonikusnak bizonyult. Az optimalizált fermentáció során a különböző mikroorganizmus csoportok kiemelkedően magas sejtszámokat tudtak elérni.

### **A mikrobiológiai aktivitás jellemzése**

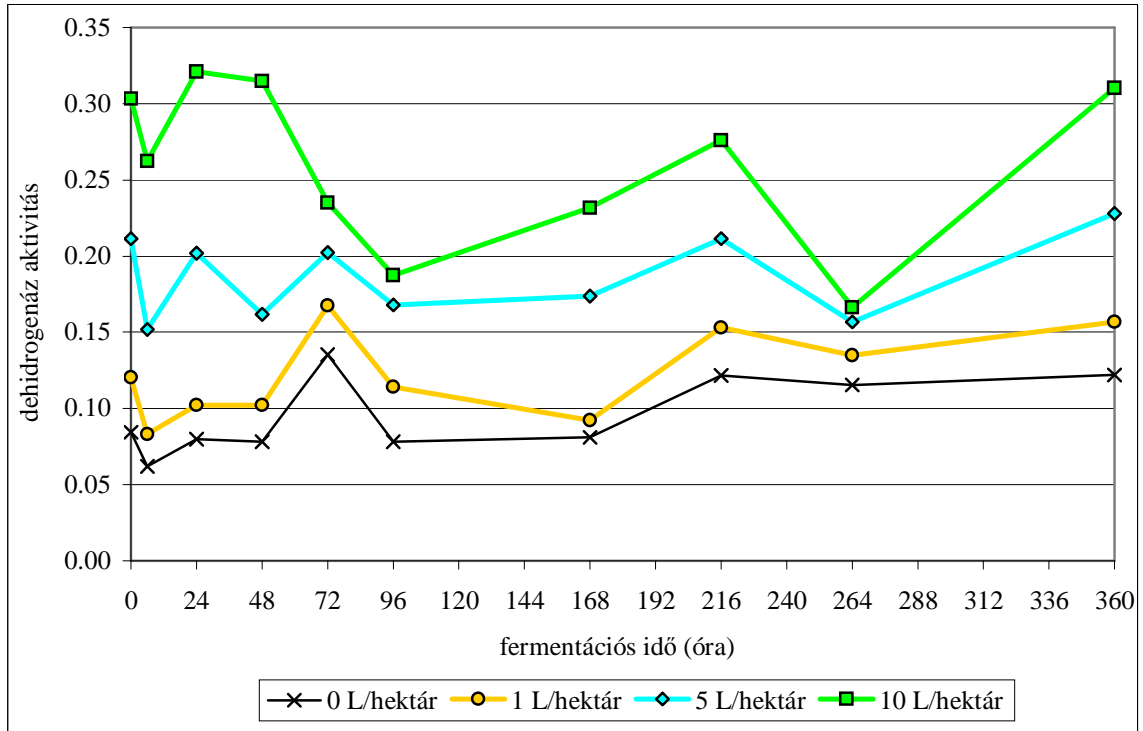
Az oltóanyag felszaporítása során nemcsak a mikrobaszámok alakulása, hanem a felszaporított oltóanyag biológiai aktivitása is fontos mikrobiológiai jellemző. Ennek érdekében határoztuk meg az oltóanyag dehidrogenáz enzimaktivitását, foszfatáz enzimaktivitását és szubsztrátindukált respirációját. A biológiai aktivitás mérése során nem az egyes mikroba-csoportok, hanem az összes mikroorganizmus együttes aktivitását tudtuk jellemezni.

A dehidrogenáz enzimaktivitás nagysága határozott összefüggést mutatott az oltóanyag koncentrációjával (**3. ábra**). Minél nagyobb oltóanyag koncentrációt alkalmaztunk a teszt-talajban, annál nagyobb dehidrogenáz enzimaktivitást mértünk a fermentáció folyamán. A görbe lefutása azt jelzi, hogy a 3. naptól kezdve az oltóanyag dehidrogenáz enzimaktivitása (a mérés hibahatárait figyelembe véve) viszonylag stabil, a mérések szórása a nagyobb koncentrációk esetében nagyobb volt. A 264. órában igen eltérő enzimaktivitást mértünk a két legnagyobb oltóanyag koncentráció esetében.

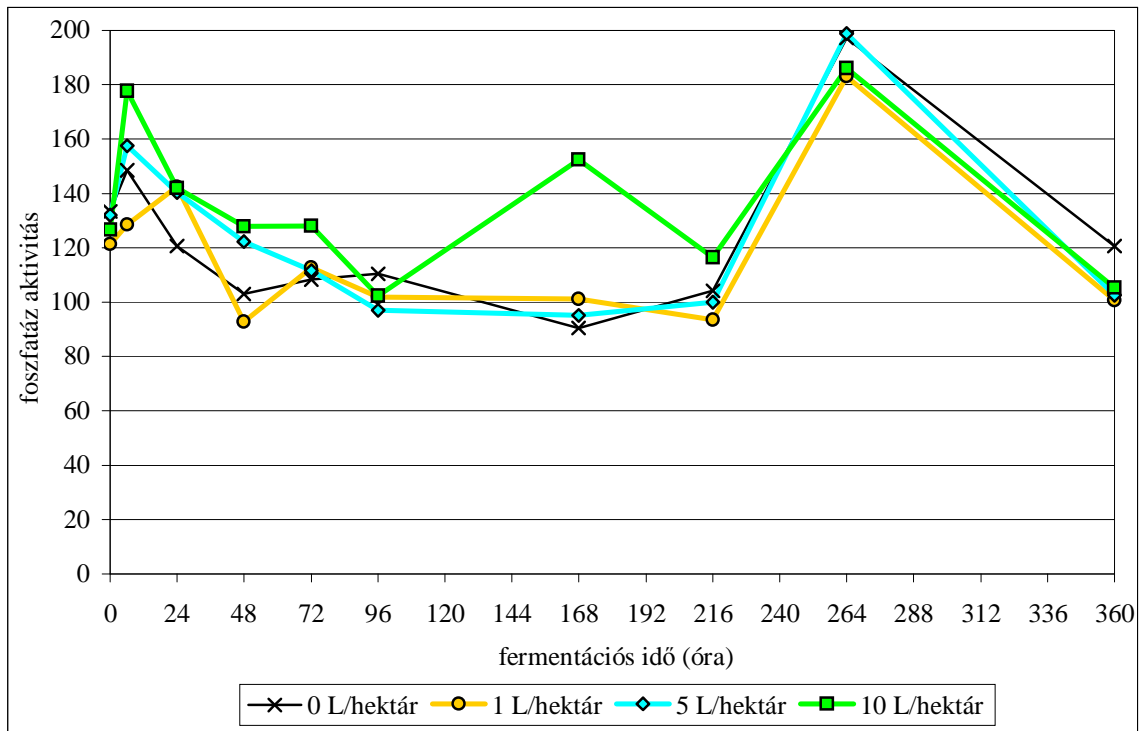
A foszfatáz enzimaktivitás értékeit elemezve nem találtunk összefüggést a mért értékek és az oltóanyag koncentráció nagysága között (**4. ábra**). Az oltóanyag koncentrációtól függetlenül a foszfatáz enzimaktivitások igen szűk tartományt fognak át. Ez valószínűleg azt jelzi, hogy az alkalmazott tápanyag (azaz a cukornádmelasz) hozzáférhető foszfortartalma határozta meg a foszfatáz enzimaktivitást. A foszfatáz enzimaktivitás esetében is kiugró értékeket kaptunk a 264. órában.

A szubsztrátindukált respiráció révén a mikroorganizmus közösség vitalitását jellemezhetjük. Tekintettel arra, hogy csak az ép mikroorganizmusok képesek respirációra, ezért a CO<sub>2</sub> produkció sebességének mérésével az aktív biotomassa mennyisége is becsülhető. Az **5. ábra** mutatja be a D-glükóz hozzáadását követően 8 – 10 órán keresztül mért CO<sub>2</sub> produkció értékeit a fermentációs idő függvényében. A különböző oltóanyag dózisokhoz tartozó értékek ugyan megkülönböztethetők egymástól, de a könnyebb áttekinthetőség érdekében kiszámítottuk az egyes (8 – 10 órás) méréssorozatokhoz tartozó CO<sub>2</sub> produkciók átlagát (**6. ábra**). Az ábra már világosan szemlélteti az alkalmazott oltóanyag dózis hatását. A kezeltlen kontroll talaj respirációja 1 - 2 mg CO<sub>2</sub>/100 g talaj/óra értékek között változik. Az oltóanyag kezelése hatására a szubsztrátindukált CO<sub>2</sub> produkció sokszorosára nő meg. A respiráció nagymértékű változása a talaj vitalitásának jelentős növekedését, azaz a revitalizáció sikerességét jelzi.

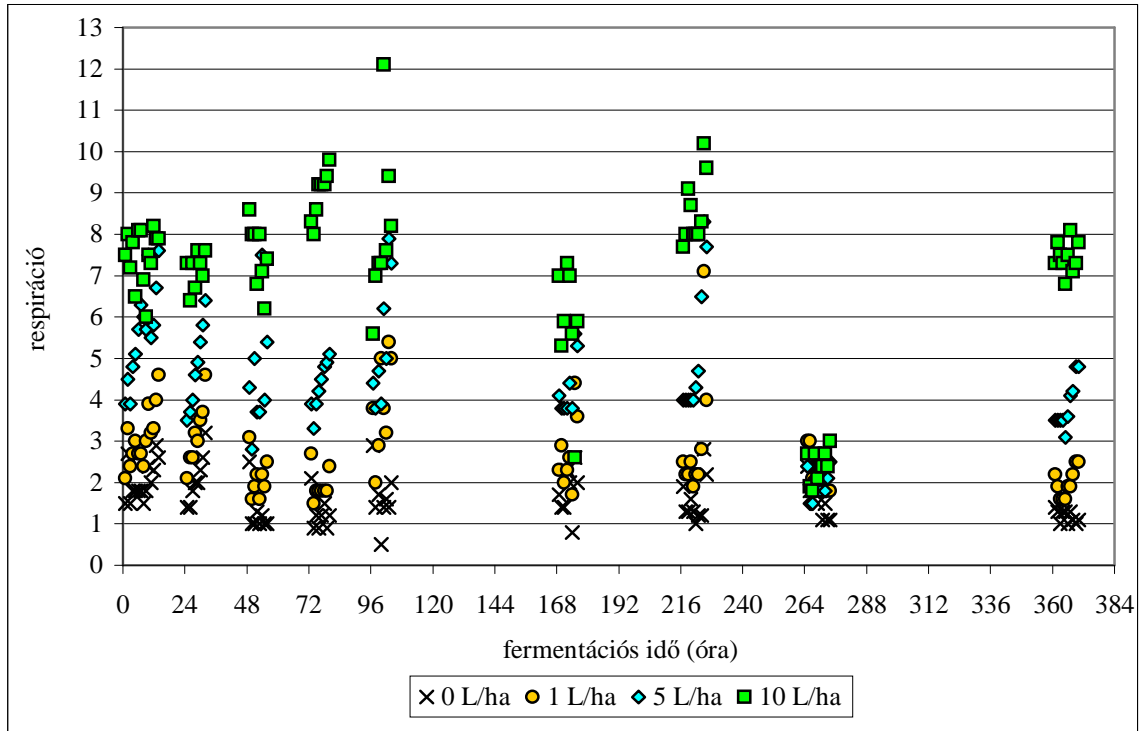
**3. ábra.** A dehidrogenáz enzimaktivitás változása az oltóanyag felszaporítása során, különböző oltóanyag koncentrációk esetén. A dehidrogenáz aktivitás mértékegysége: mg formazán / 1 g talaj / 1 nap.



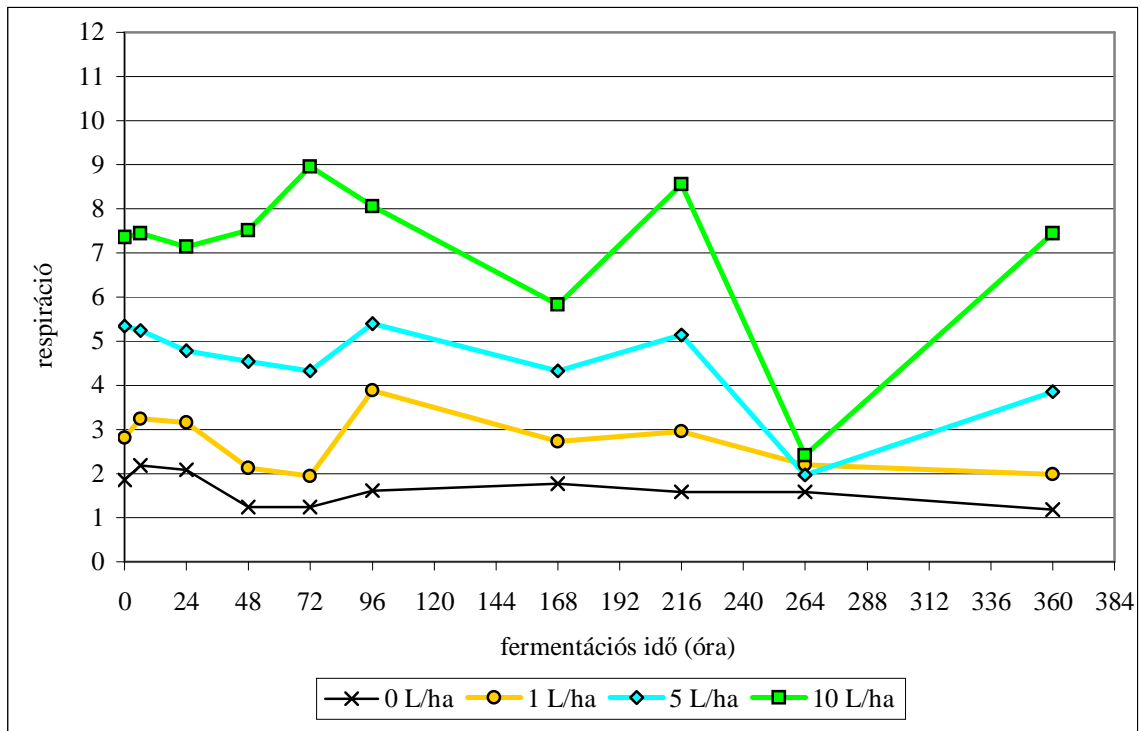
**4. ábra.** A foszfátáz enzimaktivitás változása az oltóanyag felszaporítása során, különböző oltóanyag koncentrációk esetén. A foszfátáz enzimaktivitás mértékegysége:  $\mu\text{g}$  p-nitro-fenol / 1 g talaj / 1 óra.



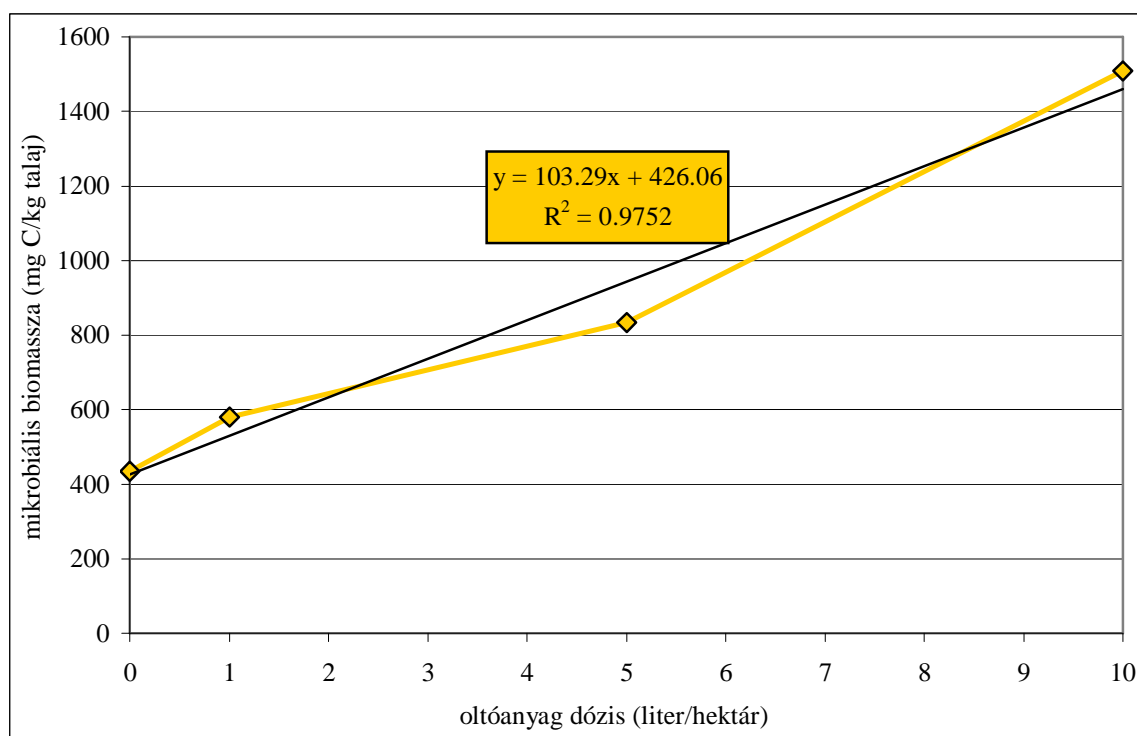
**5. ábra.** A szubsztrát-indukált CO<sub>2</sub> produkció változása az oltóanyag felszaporítása során, különböző oltóanyag koncentrációk esetén. A CO<sub>2</sub> produkció mértékegysége: mg CO<sub>2</sub> / 100 g talaj / 1 óra.



**6. ábra.** A szubsztrát-indukált CO<sub>2</sub> produkciók átlaga az oltóanyag felszaporítása során, különböző oltóanyag koncentrációk esetén. A CO<sub>2</sub> produkció mértékegysége: mg CO<sub>2</sub> / 100 g talaj / 1 óra.



7. *ábra*. Az oltóanyag dózisa és a mikrobiális biomassza tömege közötti összefüggés.



Az első órában mért  $\text{CO}_2$  produkciók alapján megbecsültük az aktív biomassza mennyiségét is (7. *ábra*). Az ábra egyértelműen bizonyítja, hogy igen szoros ( $R^2 = 0,9752$ ) lineáris összefüggés van az alkalmazott oltóanyag dózis és a mikrobiális biomassza tömege között. A talaj eredeti biomassza tömege 1 liter/hektár oltóanyag hatására mintegy 100 mg mikrobiális széntartalom növekedést eredményez egy kilogramm tesztalajban. Ez az összefüggés jelentős mértékben elősegíti a biotechnológus munkáját a talaj revitalizáció tervezése során.

Sokoldalúan vizsgáltuk az oltóanyag felszaporítása során bekövetkező aktivitás változásokat. A kapott eredmények azt bizonyították, hogy az oltóanyag felszaporítása együtt jár a dehidrogenáz enzimaktivitás és a szubsztrátindukált respiráció növekedésével. A mikroorganizmusok számával összhangban a 3. napot követően a biológiai aktivitás sem változik jelentős mértékben, csak a hibahatáron belül. Megállapítottuk, hogy a kezdeti respiráció sebességéből számított biomassza tömeg és az alkalmazott oltóanyag mennyiség között igen szoros lineáris összefüggés áll fenn.

### A biológiai folyamatok által indukált kémiai változások jellemzése

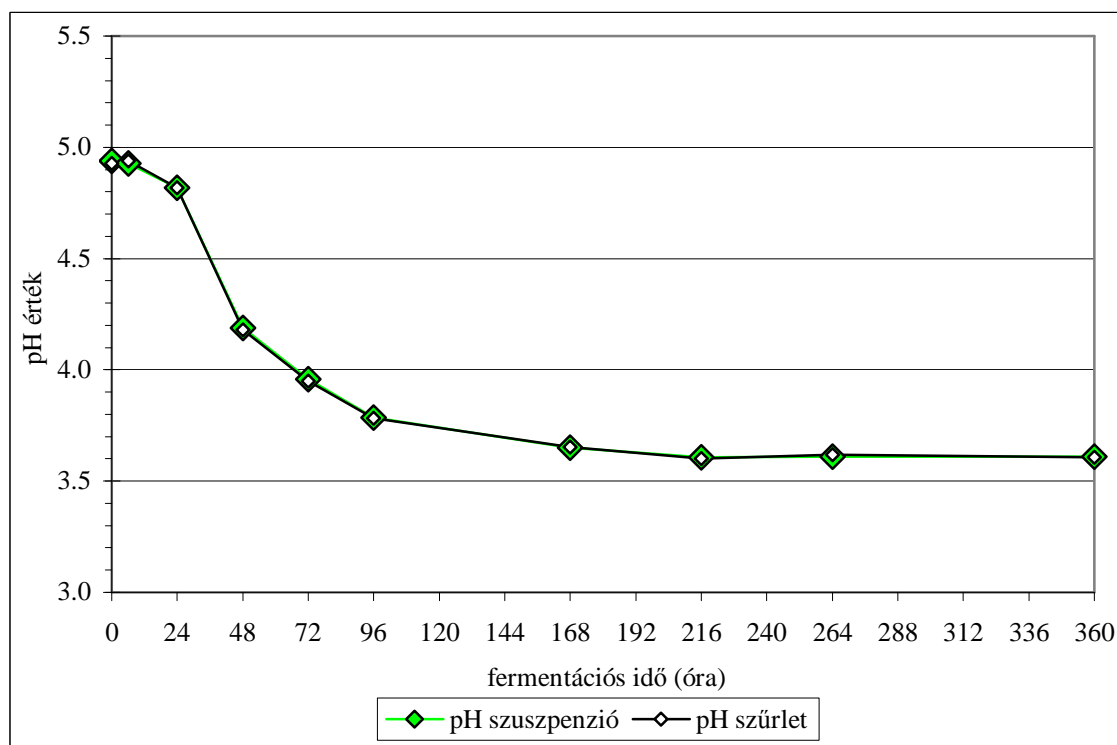
Az oltóanyag felszaporításakor lejátszódó anyagcsere folyamatok a környezettel kölcsönhatásban játszódnak le. Az oltóanyagban lévő mikroorganizmusok szaporodása változásokat indukál a tápoldatban. A biológiai és a kémiai folyamatok egyidejű jellemzése érdekében megvizsgáltuk, hogy milyen kémiai változások következnek be a fermentáció alatt.

A pH érték kulcsfontosságú a környezetben lejátszódó folyamatok jellemzésekor. Emiatt megvizsgáltuk, hogy a fermentáció lejátszódása során hogyan változik meg a sejtszuszpenzió pH értéke. A 8. *ábra* szemlélteti a kapott eredményeket. A fermentáció során jelen-



tős mértékű pH csökkenést tapasztaltunk. A pH érték a kezdeti 4,9-ről lecsökkent 3,6-ra. A pH csökkenést mind a sejtszuszpenzióban, mind annak szűrletében meghatároztuk. A sejtszuszpenziót lecentrifugálva, majd a felülúszó oldatfázist 0,2 µm-es membránszűrőn keresztül leszűrve állítottuk elő a szűrletet. A sejtmentes szűrlet és a szuszpenzió pH értékei a fermentáció folyamán teljesen megegyeztek. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a pH csökkenést kiváltó tényező a szuszpenzió oldatfázisában, oldott formában van jelen.

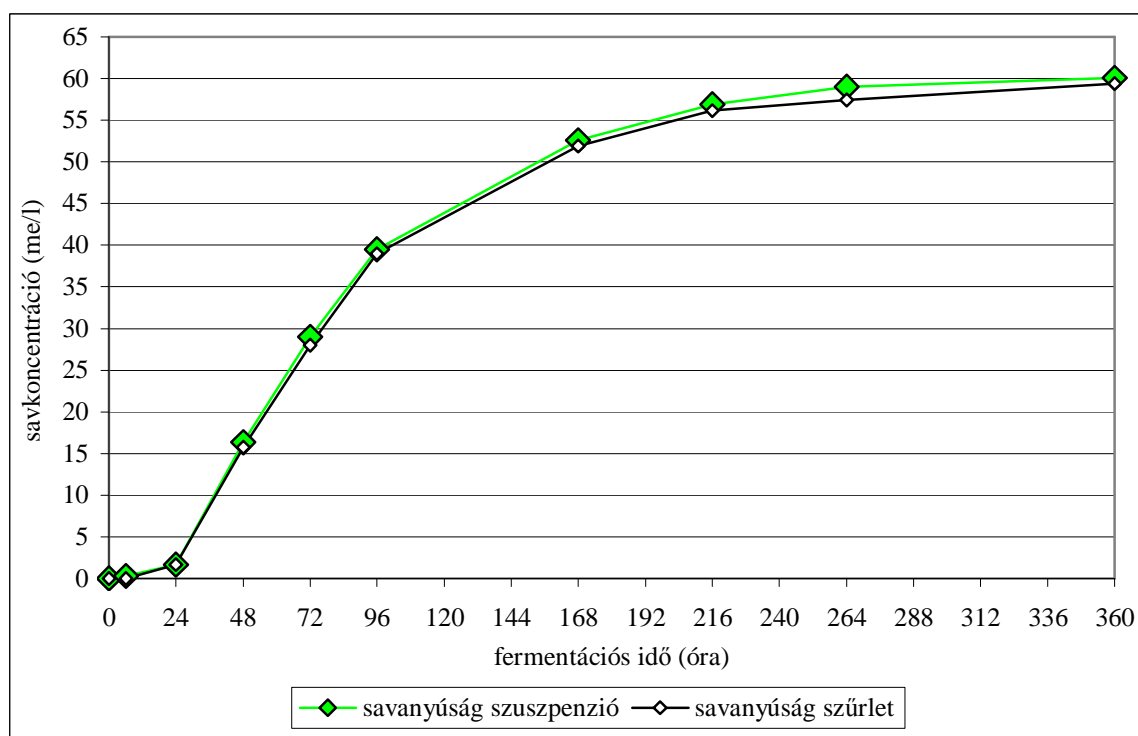
8. ábra. A pH érték változása a fermentáció során.



A pH érték egy intenzitási tulajdonság, amelyik jellemzi a környezet állapotát. Egy kapacitív tulajdonság meghatározása szükséges ahhoz, hogy mennyiségileg is jellemeznünk tudjuk a környezet állapotát. Ennek érdekében meghatároztuk a keletkezett sav mennyiségét is, a sejtszuszpenzió kiindulási pH értékére történő visszatitrálás segítségével. A keletkezett sav mennyiségét mutatja be a 9. ábra. A szuszpenzióban és a szűrletben mért savkoncentrációk – a pH értékekhez hasonlóan – megegyeztek egymással. Ez megerősíti azt a következtetést, hogy a keletkezett sav az oldatfázisban, oldott állapotban van jelen. A keletkezett sav mennyisége a fermentáció végén jelentős, eléri a 0,060 mol/l koncentrációt. A keletkezett sav minőségére közvetve következtethetünk. Amennyiben a keletkezett sav erős sav lenne, akkor a hozzá tartozó pH érték 1,2 lenne. A mért pH érték azonban 3,6, ami azt jelzi, hogy a fermentáció során gyenge szerves savak keletkeztek.

A sejtszaporodás által indukált kémiai változásokat a szűrlet analízise révén is jellemeztük. Az ICP mérés által meghatározott legfontosabb elemek koncentrációit a fermentációs idő függvényében a 4. táblázat mutatja be. A nagy mennyiségben jelenlevő makroelemek (K, Ca, Mg, Na) koncentrációiban nem figyelhető meg határozott tendencia. Ezzel szemben az oldatfázisban jelenlevő foszfor koncentrációja 34 mg/l értékről 17 mg/l -re csökkent le, majd ismét enyhe növekedésnek indult. A foszforkoncentráció csökkenése a szaporodó

9. ábra. A keletkezett sav mennyisége a fermentáció során.



sejtek foszforfelhasználását jelzi. Az oldatfázis foszforkoncentrációja alkalmas indikátornak bizonyult a sejt szaporodás jellemzésére. Az oldatfázis mangán koncentrációja is határozott csökkenést mutatott. A mangánkoncentráció a kezdeti érték hetedére csökkent le a 4. napon, majd ismét emelkedésnek indult. Ugyancsak koncentrációcsökkenést tapasztaltunk a réztartalom esetében. A foszforral és a mangánnal ellentétben viszont a rézkoncentráció folyamatos csökkenést mutatott, amit a szaporodó sejtek rézigénye magyarázhat.

4. táblázat. Az oldatfázis kémiai összetételének változása a fermentáció során.

idő	K	Ca	Mg	Na	P	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Co
óra	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
0	2195	370	183	57	34	10.3	2.7	0.8	0.14	0.11	0.08
6	2210	383	186	62	34	10.4	2.7	1.2	0.27	0.13	0.08
24	2076	389	171	57	33	10.7	2.6	0.8	0.18	0.12	0.09
48	2184	381	185	53	23	10.6	1.0	0.8	0.18	0.08	0.08
72	2127	355	156	54	20	9.7	0.5	0.8	0.23	0.05	0.08
96	2351	382	188	61	19	9.3	0.4	1.0	0.24	0.08	0.09
168	2234	380	184	58	17	10.4	0.5	0.8	0.32	0.04	0.08
264	2238	377	185	58	20	10.4	1.2	0.9	0.33	0.03	0.08
312	2251	426	189	58	23	10.5	1.9	0.9	0.32	0.05	0.09
360	2244	410	196	58	25	10.8	2.2	0.8	0.28	0.03	0.09

A fermentációs folyamatok által indukált folyamatok elemzése során megállapítható, hogy a szaporodó sejtek jelentős mértékű változásokat idéztek elő környezetükben. Az oltóanyag felszaporítása során a pH érték jelentősen csökkent a keletkezett szerves savak hatására. Az oldatfázis foszforkoncentrációja jól hasznosítható a sejt szaporodás indikátoraként.

## AZ OLTÓANYAG HATÁSA CSÍRANÖVÉNYEK FEJLŐDÉSÉRE

Az oltóanyag revitalizációra gyakorolt hatását a biológiai indikáció hasznosítása révén a legcélszerűbb tanulmányozni, ami lehetővé teszi az oltóanyag által indukált biológiai változások jellemzését. Bioindikátorként alkalmazhatunk mikrobiológiai vagy növényi paramétereket. Kutatásaink során a növényi paraméterek vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt, mert a remediált területeken igen sok esetben előnyös a növények megtelepedésének elősegítése (pl. fitostabilizációnál), amit a talaj revitalizációja elősegíthet. Bioindikátor teszt-növénynek a magyar szabványban is előírt fehér mustárt (*Sinapis alba*) választottuk.

### 3.1. Az oltóanyag hatása a csírázásra

Csírázási kísérletben vizsgáltuk az oltóanyagnak a vetőmagra gyakorolt vitalizációs hatását. A vetőmagokat aktivált oltóanyaggal csáváztuk 30 percig, majd 25 - 25 db kontroll illetve csávázott vetőmagot Petri csészében, nedves szűrőpapíron csíráztattunk. Mindkét kezelés esetén 5 párhuzamossal dolgoztunk. A csírázást a 4. napon értékeltük ki. Megmértük a kicsírázott vetőmagok hajtáshosszát és gyökérhosszát.

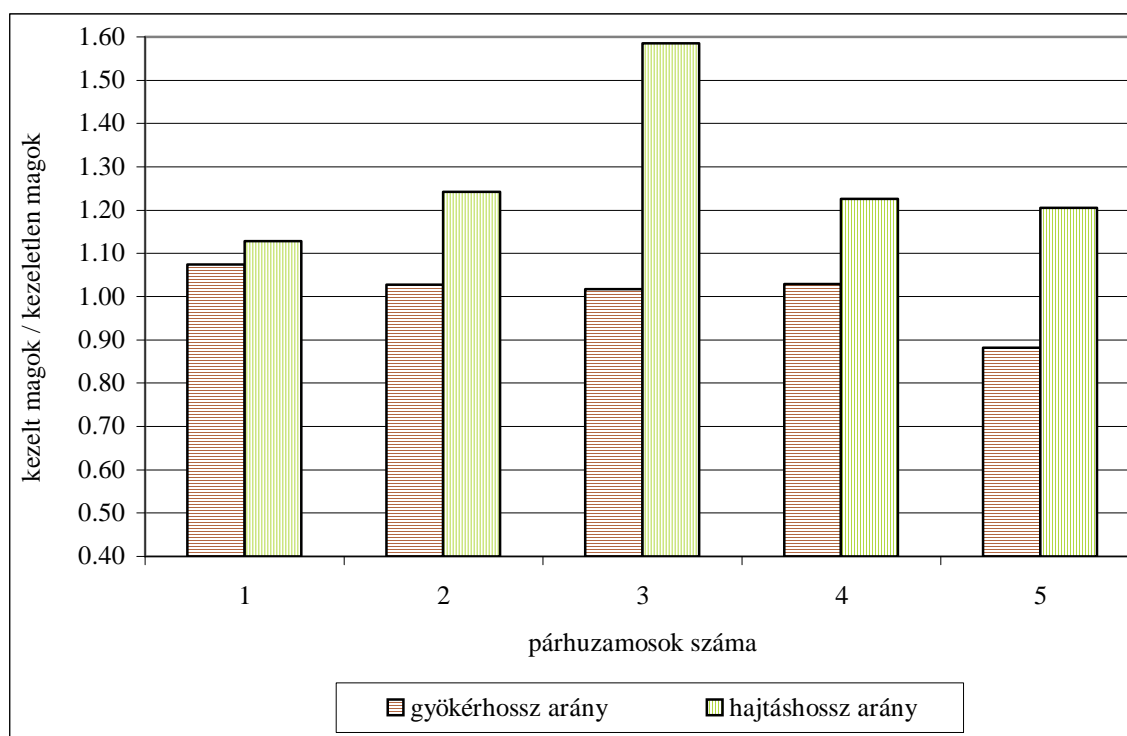
A csávázás hatását a csávázott és a kontroll értékek arányának kiszámításával jellemeztük. Az 5 párhuzamos vizsgálat során kapott eredményeket a **10. ábra** szemlélteti. Az eredmények azt jelzik, hogy az oltóanyag kezelés a gyökerek fejlődését nem befolyásolta, a gyökérhossz arány az egyes párhuzamosokban 0,88 - 1,07 volt. Az oltóanyag kezelés a vetőmag vitalitását nagymértékben megnövelte, mivel a hajtáshosszak jelentős mértékben megnöttek a csávázás hatására, a hajtáshossz arányok az 1,13 - 1,59 tartományt ölelték át. Kiszámítottuk az összes mérés átlagát és a gyökérhossz arány 0,99-nek, a hajtáshossz arány pedig 1,25-nek adódott.

Az oltóanyag egyértelműen pozitív hatást gyakorolt a vetőmagok csírázására, a vetőmag vitalitásának növekedését a hajtáshossz növekedése bizonyította.

### 3.2. Az oltóanyag érvényesülése különböző talajokban

Részletesen jellemeztük az oltóanyag növényekre gyakorolt vitalizációs hatását különböző talajokban. E kísérletek során az oltóanyagban található mikroorganizmusok a természetes talajok bennszülött mikroorganizmusával együtt fejtik ki hatásukat a növények fejlődésére. Mivel a mezőgazdaságilag művelt talajok természetes talajflórája sokkal gazdagabb és sokszínűbb, mint a remediált talajoké, ezért nem szennyezett talajokban célszerű az oltóanyag érvényesülésének vizsgálata. Ha az oltóanyag természetes körülmények között is képes pozitív hatást gyakorolni a növények fejlődésére, akkor a remediált talajokban az oltóanyag hatása még fokozottabban érvényesülhet.

**10. ábra.** Az oltóanyag hatása a fehér mustármag csírázására.



### A kísérletek kivitelezése

A termesztő közegek (tözegek, szerves trágyák, komposztok, földkeverékek és tápközegként alkalmazott anyagok) csírázásgátló hatásának vizsgálatát az MSZ-08-0012/4-79 szabvány módosítása szerint végeztük.

Tesztnövény: fehér mustár (*Sinapis alba*). Ismétlésszám: 4. Magszám: 25 db/edény (100 mag/kezelés). Talajtérfogat: 120 cm<sup>3</sup>/edény. Az alkalmazott oltóanyag dózisosok: 0,0 l/ha (kontrollkezelés), 1,0 l/ha, 3,333 L/ha, 10,0 l/ha, 33,33 l/ha, 100,0 l/ha. Talajok: 5 különböző talajt vizsgáltunk.

A vizsgálandó 150 g talajt 120 cm<sup>3</sup>-es tenyészedénybe helyeztük. A talajminták nedveségtartalmát 30 ml – az oltóanyagot is tartalmazó – oldattal állítottuk be. A 20 tömegszázalék oldatmennyiség 25 térfogat százaléknak felel meg. A beöntözött talaj tetejére edényenként 25 db. fehér mustármagot helyeztünk, majd ezt követően átlátszó fóliával az egészet betakartuk a párolgás megakadályozása érdekében. A fóliát akkor távolítottuk el, amikor a növények azt elérték, kb. a 3. - 4. napon. A kicsírázott növényeket klímakamrába tettük és a 14. napig neveltük. A 16 órás nappali hőmérséklet 25 °C, a 8 órás éjszakai hőmérséklet 20 °C volt. Az edényeket naponta súlyra öntöztük.

A teljes értékű csírázott (kikelt) növények számát 24 óra elteltével, vagyis az első napon, valamint az első héten naponta, majd a második héten minden második napon megszámoltuk. Az utolsó, a 14. napon megmértük az összes növény magasságát és kismostuk a talajból a gyökereket. Megmértük a friss hajtások és a friss gyökerek tömegét.

### A csíranövények fejlődése

A kísérletek során az alkalmazott oltóanyag dózis, a tesztnövény és a kísérleti körülmények azonosak voltak. Ez lehetőséget adott az egyes talajokra gyakorolt hatások összeha-

sonlítására.

A talajminták kiválasztásakor arra törekedtünk, hogy a legfontosabb talajdegradációs formákat jellemző talajokat is vizsgáljunk. A kísérletekbe ezért három, különböző talajdegradációs folyamatot reprezentáló talajt is bevontunk. A karcagi réti csernozjom talaj a talajsavanyodást és szerkezet leromlást, a karcagpusztai réti szolonyec talaj a szikesedést és talajtömörödést, a kisújszállási réti talaj a talajtömörödést és felszíni kérgesedést jellemzi. A bugyi talaj egy mezőgazdasági művelés alatt álló karbonátos öntéstalaj, míg a Florasca B egy savanyú kémhatású virágföld. Ez az öt talajminta a talajtulajdonságok széles tartományát reprezentálja.

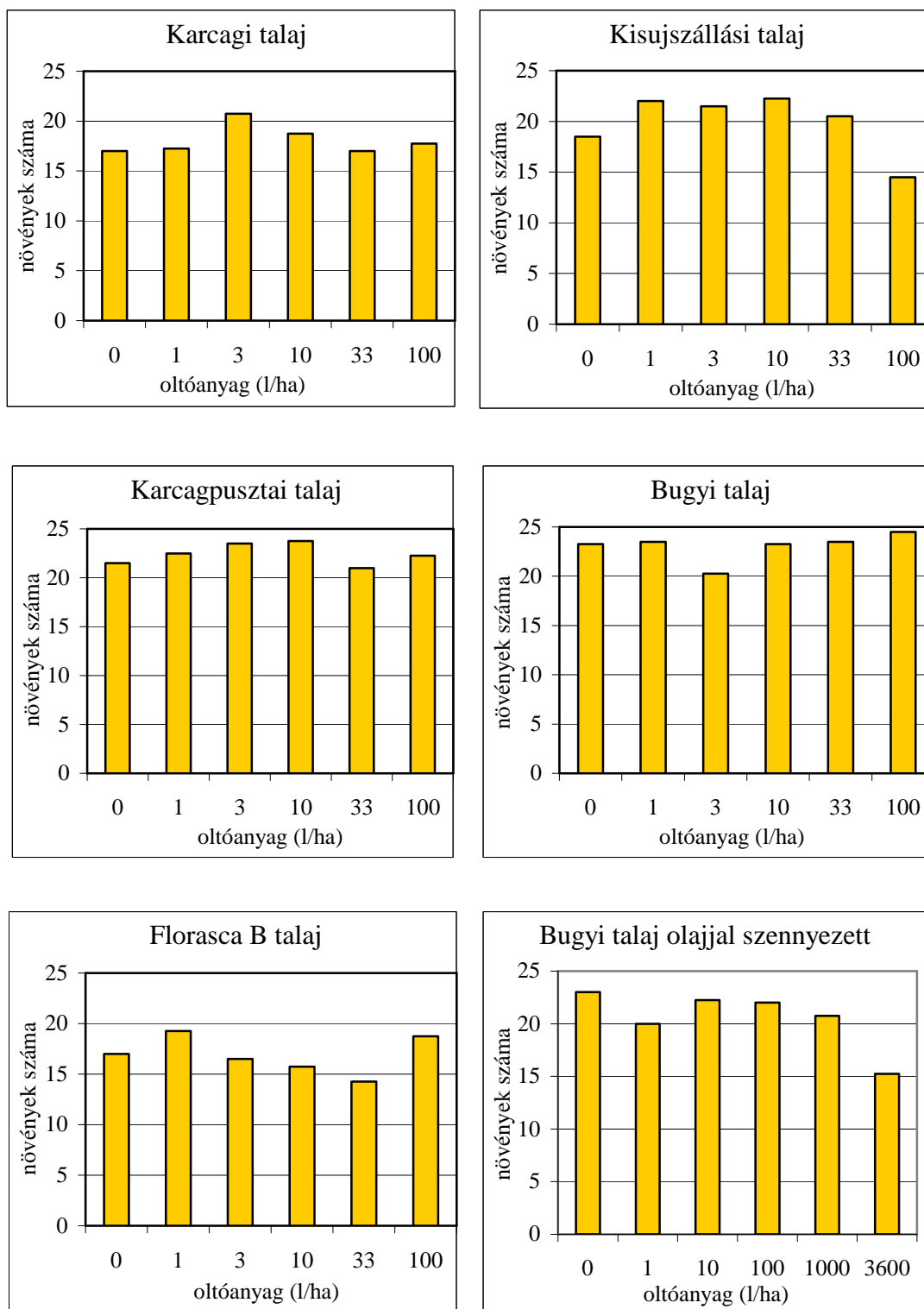
A **csíranövények száma** a talaj - növény rendszer biológiai aktivitását jellemzi. Nagy növényesség a talaj - növény rendszer harmonikus voltát, vitalitását jelzi. Kicsi növényesség valamilyen diszharmóniára, egyes talajökológiai tényezők korlátozó volta utal. Ilyen esetekben a biotechnológus feladata a talajökológiai korlátok azonosítása és megfelelő értékének beállítása. A csíranövények számát (négy párhuzamos mérés átlagát a 14. napon) a **11. ábra** mutatja be.

A kísérlet végén a csíranövények száma az egyes talajokban igen eltérő. A csírázási százalék a karcagpusztai és a bugyi talajban igen jó, a karcagi és a kisújszállási talajban közepes és a Florasca B talajban gyenge. A Florasca B talajban tapasztalt gyenge csírázás valamilyen gátló hatás jelenlétére utal, amelynek azonosítása a biotechnológus feladata. A bugyi talaj egy könnyű szerkezetű homokos vályog talaj (jó levegő és vízgazdálkodási tulajdonságokkal), ami a csírázás számára kedvező körülményeket biztosít. A karcagi, a karcagpusztai és a kisújszállási talaj esetében a növények száma egy maximumot mutat. A maximum értéke az 1 – 10 l/ha oltóanyag dózisonál jelentkezik, ami azt jelzi, hogy az optimális oltóanyag dózis talajonként eltérő. Az optimumnál kisebb dózis esetében az oltóanyag még nem tudja maximálisan kifejteni a hatását. Az optimumnál nagyobb dózis esetében az oltóanyaggal bevitt mikroorganizmusok pozitív, de csökkenő mértékű hatást tudnak kifejteni, mert már a növényekkel konkurálnak.

A **csíranövények** átlagos **hajtáshossza** pontosabb képet ad az oltóanyag érvényesüléséről a különböző talajokban (**12. ábra**). A legnagyobb hajtáshosszakat a Florasca B virágföldben mértük, ahol szintén maximum görbét kaptunk az oltóanyag dózis függvényében. A hajtáshossz maximuma ebben a talajban a 10 l/ha dózisonál található. A 10 l/ha dózis alatt az oltóanyag még nem tudja kifejteni maximális hatását, e felett pedig határozottan pozitív, de csökkenő mértékű hajtáshossz növekedést tapasztaltunk. A többi talaj esetében is hasonló, maximumot adó görbéket kaptunk. Ez azt jelzi, hogy a talajok vetéssel egyidejű oltása mindig pozitív, serkentő hatást idéz elő, de a hatás egy optimum görbével jellemezhető. A hajtáshosszak alapján a legkevésbé fejlett csíranövények a kisújszállási talajban fejlődtek. Itt valószínűleg a talaj nagy agyagtartalma miatti kis hasznosítható víztartalom korlátozta a csíranövények fejlődését. A bugyi talajban a Florasca B virágföldhöz hasonlóan szépen fejlődtek a növények. A karcagi és a karcagpusztai talajokban mért átlagos hajtáshossz közepes, mintegy 35 - 40 mm volt.

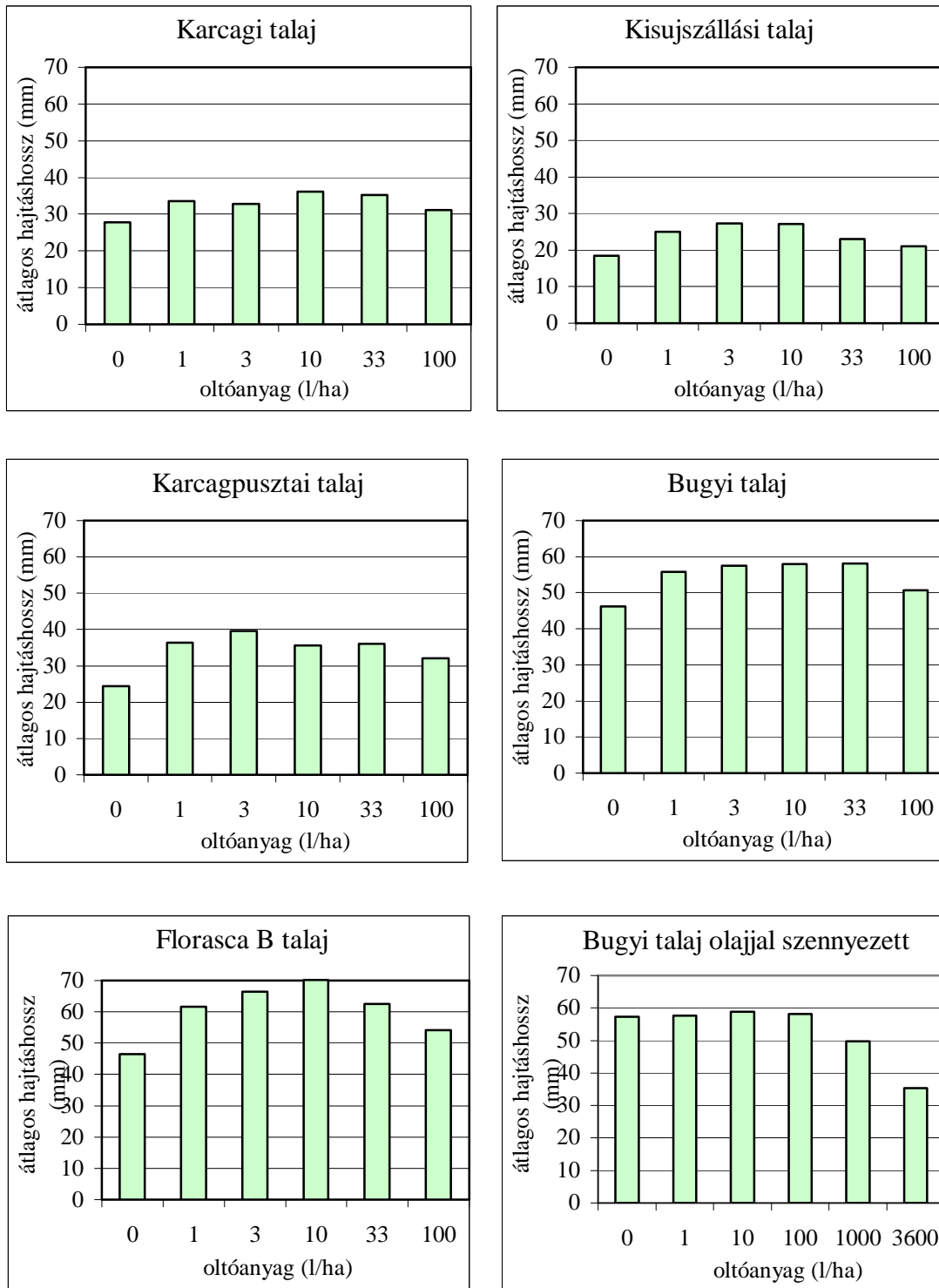
A **csíranövények friss hajtás és gyökértömegét** is meghatároztuk (**5. táblázat**). A hajtástömegek is maximumon áthaladó görbéket eredményeztek az 1,0 – 10,0 l/ha oltóanyag dózis tartományban. A kontrollhoz képest a maximális hajtástömeg a karcagi talajban 11%-kal, a karcagpusztai talajban 57%-kal, a Florasca B virágföldnél 28%-kal, a kisújszállási talajban 86%-kal, a bugyi talajban 18%-kal volt nagyobb. A hajtástömeg növekedés egyértelműen bizonyítja az oltóanyagnak a növényfejlődésre gyakorolt pozitív, serkentő hatását. A friss gyökér tömeg elemzésekor szembetűnő, hogy a legkisebb gyökértömeget (a hajtáshosszhoz hasonlóan) a kisújszállási talajban mértük. Ez azt jelzi, hogy

11. ábra. Az oltóanyag hatása a csíranövények számára különböző talajokban.



a gyökérfejlődés valószínűleg a nagy agyagtartalom miatt gátolt volt. A gátolt gyökérfejlődés pedig gyenge hajtásfejlődést eredményezett. A gyökérfejlődés a bugyi talajban a leg-erőteljesebb, ami a könnyű mechanikai összetétellel függ össze. A karcagi csernozjom talajban a gyökerek jól fejlődtek.

**12. ábra.** Az oltóanyag hatása a csíranövények átlagos hajtáshosszára különböző talajokban.



5. táblázat. Az oltóanyag hatása a hajtás és a gyökér tömegére különböző talajokban.

oltóanyag	friss hajtás	friss gyökér	friss hajtás	friss gyökér
l/ha	g	g	g/db	g/db
<b>Karcag</b>				
0.0	1.48	0.53	0.089	0.032
1.0	1.49	0.34	0.086	0.020
3.3	1.65	0.53	0.080	0.026
10.0	1.37	0.62	0.077	0.032
33.3	1.47	0.54	0.089	0.033
100.0	1.51	0.51	0.092	0.036
<b>Karcagpuszta</b>				
0.0	1.87	0.10	0.088	0.005
1.0	2.57	0.11	0.114	0.005
3.3	2.94	0.13	0.125	0.005
10.0	2.86	0.12	0.120	0.005
33.3	2.65	0.12	0.128	0.006
100.0	2.48	0.14	0.111	0.006
<b>Florasca B</b>				
0.0	4.89	0.12	0.298	0.007
1.0	6.24	0.11	0.324	0.006
3.3	4.45	0.10	0.264	0.006
10.0	5.78	0.12	0.371	0.008
33.3	3.98	0.13	0.275	0.009
100.0	4.41	0.14	0.245	0.007
<b>Kisujszállás</b>				
0.0	0.70	0.04	0.038	0.002
1.0	1.25	0.08	0.057	0.003
3.3	1.30	0.09	0.060	0.004
10.0	1.31	0.03	0.059	0.001
33.3	0.94	0.02	0.046	0.001
100.0	0.74	0.03	0.052	0.002
<b>Bugyi</b>				
0.0	3.03	0.94	0.130	0.040
1.0	3.25	0.61	0.138	0.026
3.3	2.99	0.56	0.147	0.026
10.0	3.58	0.53	0.154	0.023
33.3	3.36	0.85	0.143	0.036
100.0	3.05	1.03	0.124	0.042
<b>Bugyi olajos</b>				
0	2.37		0.103	
1	2.30		0.115	
10	2.62		0.118	
100	2.47		0.112	
1000	2.10		0.101	
3600	1.30		0.085	

Összességében megállapítható, hogy az oltóanyag kezelés serkenti a csíranövények fejlődését, de túl nagy dózisok alkalmazásakor a pozitív hatás mértéke csökken, amit a bevitt mikroorganizmusok és a csíranövények közötti konkurencia számlájára írhatunk. A csíranövények fejlődése – a talaj ökológiai adottságaitól függően – általában az 1 - 10 l/ha oltóanyag dózis tartományban éri el az optimumot.



A *szennyezett talaj* revitalizációját a mesterségesen szennyezett bugyi talajban vizsgáltuk (5000 mg fáradt motorolajt adtunk 1 kg talajhoz). Ezeket az eredményeket is a **11. ábra**, a **12. ábra**, valamint az **5. táblázat** mutatja be. Szélesebb oltóanyag dózis tartományt alkalmaztunk a szennyezett talajban az esetlegesen fellépő aktivitáscsökkenés miatt. Ennek következtében a szennyezett és a nem szennyezett talaj viselkedését csak a 0 - 100 l/ha oltóanyag dózis tartományban hasonlíthatjuk össze közvetlenül.

A növények számát tekintve nem tapasztaltunk számottevő különbségeket. A növények száma mind a szennyezetlen, mind a szennyezett talajban 20 – 25 közé esett és valamivel kevesebb növényt kaptunk az olajjal szennyezett talajban. A hajtáshosszakat összehasonlítva megállapítható, hogy a hajtáshosszak egyenletesen nagyok voltak az olajjal szennyezett talajokban (57 - 59 mm) és nagyságuk megegyezett az oltóanyaggal kezelt nem szennyezett talajokban mért legnagyobb értékekkel (56 - 58 mm). A oltóanyag nélküli kontroll talajban az olaj jelenléte viszont nagyobb hajtásokat eredményezett.

A szennyezett és a nem szennyezett talaj között érdemi különbségeket a frissen mért hajtástömegek esetében kaptunk. Az olajjal szennyezett talajban mintegy 20 - 30%-kal kevesebb hajtástömeget mértünk, amit az olajszennyezés rovására írhatunk. A motorolaj gátolta a növényi asszimilációt, s emiatt kisebb növénytömeg tudott képződni a 14 nap alatt. Az oltóanyag dózis függvényében mind a szennyezett, mind a nem szennyezett talajban hajtástömeg maximum figyelhető meg és a maximumértékhez tartozó oltóanyag dózis független az olajszennyezés jelenlététől. Ez az eredmény megerősíti a revitalizáció során következetesen alkalmazott talajökológiai szemléletünk jogosságát. A 10 l/ha oltóanyag dózis optimum azonossága ugyanis azt jelzi, hogy a bevitt oltóanyag érvényesülése (a hajtástömeg képződése) abszolút értékben függ a vizsgált talaj ökológiai adottságaitól. Az oltóanyag által indukált relatív változások (az optimális dózis nagysága) viszont független a talaj ökológiai tulajdonságaitól, mert azt csak az oltóanyag tulajdonságai határozzák meg. Az optimális dózis (10 l/ha) alatt az oltóanyag nem tudja a maximális hatást kifejteni, sem a szennyezetlen, sem a szennyezett talajban. A 10 l/ha optimális oltóanyag dózis a nem szennyezett talajban 18%-os, a szennyezett talajban csak 11%-os hajtástömeg növekedést idézett elő. Az olajszennyezés hatására kisebb mértékű relatív növekedést tapasztaltunk. Az optimális dózis felett pedig már a növényfejlődés gátjává válhatnak az oltóanyaggal bevitt mikroorganizmusok. Ez a depresszió különösen szembetűnő a szennyezett talajban az 1000 l/ha és 3600 l/ha oltóanyag dózis alkalmazásakor.

A motorolajjal szennyezett talajban a csíranövények száma és hajtáshossza nem tért el lényegesen a nem szennyezett talajban mért értékektől. A csíranövények hajtástömege viszont érzékenyen reagált a motorolaj jelenlétére, amit a jelentősen kisebb hajtástömeg-produkció indikált. Mind a szennyezett, mind a nem szennyezett talajban a 10 l/ha oltóanyag dózis esetében kaptuk a legnagyobb növényi produkciókat, az oltóanyag relatív hatása függetlennek bizonyult a szennyezés jelenlététől. Ez azt jelzi, hogy az oltóanyag érvényesülését abszolút értékben a külső tényezők (a talaj ökológiai adottságai, pl. szennyezettség), relatív értékben pedig a belső tényezők (az oltóanyag tulajdonságai) szabják meg.

## Felhasznált irodalom

- Dunger W. 1983. Tiere im Boden, A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt (in German).
- Glinski J. & Stepniewski W. 1985. Soil aeration and its role for plants. CRC Press. Boca Raton.
- Killham K. 1994. Soil ecology. Cambridge University Press. Cambridge.
- MERCK. 2001. Mikrobiológiai kézikönyv 2001. Merck. Budapest.
- MSZ-08 0012/4-79. 1979. Tőzegek és tőzegkészítmények fizikai, kémiai és biológiai vizsgálata. Gyomosító és csírázásgátló hatás vizsgálata. Mezőgazdasági és Élelmezésügyi Ágazati Szabvány. Magyar Szabványügyi Hivatal. Budapest.
- MSZ 21978/8-85. 1985. Veszélyes hulladékok vizsgálata. Csíranövényteszt. Országos Szabvány. Magyar Szabványügyi Hivatal. Budapest.
- MSZ-08-1721/3-86. 1986. Szennyvízzel, szennyvíziszappal kezelt mezőgazdaságilag hasznosított területek talajvizsgálata. Talajbiológiai aktivitás vizsgálat dehidrogenáz enzimaktivitási módszerrel. Mezőgazdasági és Élelmezésügyi Ágazati Szabvány. Magyar Szabványügyi Hivatal. Budapest.
- MSZ 21470/77-1988. 1988. Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mikrobiológiai vizsgálatok. Országos Szabvány. Magyar Szabványügyi Hivatal. Budapest.
- MSZ 21978-53:1994. 1994. Veszélyes hulladékok vizsgálata. Mikrobiológiai vizsgálatok. Magyar Szabvány. Magyar Szabványügyi Hivatal. Budapest.
- MSZ ISO 14240-1:2003. 2003. Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész. Szubsztrátindukált respirációs módszer. Magyar Szabvány. Magyar Szabványügyi Testület. Budapest.
- MSZ ISO 14240-2:2003. 2003. Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész. Gőzextrakciós módszer. Magyar Szabvány. Magyar Szabványügyi Testület. Budapest.
- MSZ ISO 11269-1:2003. 2003. Talajminőség. A szennyező anyagok talajflórára gyakorolt hatásának meghatározása. 1. rész. A gyökérnövekedés-gátlás mérési módszere. Magyar Szabvány. Magyar Szabványügyi Testület. Budapest.
- MSZ ISO 11269-2:2003. 2003. Talajminőség. A szennyező anyagok talajflórára gyakorolt hatásának meghatározása. 2. rész. Vegyi anyagok hatása a magasabb rendű növények kikelésére és növekedésére. Magyar Szabvány. Magyar Szabványügyi Testület. Budapest.
- Murányi, A. 1999. The extent of pollution and its ecotoxicological effects, in A. Kettrup and K.-W. Schramm (eds.) Proc. SECOTOX 99 Fifth Eu. Conf. on Ecotoxicology and Environmental Safety, GSF Inst. Ökologische Chemie, Munich, Germany.
- Murányi, A. 2000. Quality and contamination of agricultural soils in Hungary as indicated by environmental monitoring and risk assessment. In: Wilson, M. J. & Maliszewska-Kordybach, B. (eds.) Soil Quality, Sustainable Agriculture and Environmental Security in Central and Eastern Europe. 61-77. Kluwer Academic Publishers.
- Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E. and Margesin R. (eds.) 1996. Methods in Soil Biology. Springer. Berlin.
- Szabó I. M. 1986. Az általános talajtan biológiai alapjai. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- Szabó I. M. 1989. A bioszféra mikrobiológiája. II. Akadémiai Kiadó. Budapest.
- Szegi J. 1979. Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.

**1. fotó.** Az oltóanyag hatása a csírázásra, kisujszállási talaj, 7. nap.  
Oltóanyag dózis balról jobbra: 0 – 1 – 3,3 – 10 – 33 – 100 l/ha. Alulról felfelé: 4 ismétlés.  
A talaj nagy agyagtartalma kedvezőtlen, de az oltóanyag hatása pozitív.



**2. fotó.** Az oltóanyag hatása a csírázásra, bugyi talaj, 7. nap.  
A homokos vályog talaj kedvez a csírázásnak. Az oltóanyag hatása pozitív.





**3. fotó.** Az oltóanyag hatása a csírázásra, Florasca B virágföld, 8. nap.  
Az oltóanyag hatása a jó minőségű virágföldben is pozitív.



**4. fotó.** Az oltóanyag hatása a csírázásra, karcagpusztai talaj, 10. nap.  
Az oltóanyag hatása a szikes talajban is pozitív.



**5. fotó.** Az oltóanyag hatása a csírázásra, karcagi talaj, 14. nap.  
Az oltóanyag hatása még a csernozjom talajban is pozitív.

