

dc_881_14

**MIKROALGÁK BIOTECHNOLÓGIAI ALKALMAZÁSA A
NÖVÉNYTERMESZTÉSBEN ÉS NÖVÉNYVÉDELEMBEN**

Tézisek

Az „MTA Doktora” cím elnyeréséért benyújtott értekezéshez

**Ördög Vince
egyetemi tanár**

**Nyugat-magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Növénybiológiai Intézet**

Mosonmagyaróvár, 2014

dc_881_14

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉSEK	7
2.1. A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC)	7
2.2. Mikroalgák növényi hormontermelése	7
2.3. Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra.....	8
2.4. Illékony szerves vegyületeket termelő MACC-törzsek a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben.....	8
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	9
3.1. Talajminta gyűjtés mikroalgák izolálásához	9
3.2. Mikroalgák izolálása és fenntartása	9
3.3. Mikroalgák taxonómiai meghatározása	10
3.4. Az MACC törzsek laboratóriumi tenyésztése.....	10
3.5. <i>Chlorella</i> szinkrontenyésztés	11
3.6. Mikroalga minta előkészítés vizsgálatokhoz és kísérletekhez	11
3.7. Növényi hormon vizsgálatok mikroalga mintákból.....	12
3.8. Vizsgált mikroalgák és növénypatogén gombák.....	12
3.9. Bioteszt eljárások fungicid és fungisztatikus hatás kimutatására.....	13
3.10. Káposzta gyökérlégy bioteszt	14
3.11. Mikroalgák AVOC anyagainak vizsgálata.....	14
4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	15
4.1. Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény létrehozása.....	15
4.2. Mikroalgák növényi hormontermelése	16
4.3. Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra.....	18
4.4. Cianobaktériumok a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben	19
5. KUTATÁSI JÖVŐKÉP.....	20
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	22
7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	23

1. BEVEZETÉS

Az algológusok negyed évszázaddal ezelőtt még klorofill-*a*-t tartalmazó, telepes, valódi gyökérre, szárra és levélre nem tagolódó növényeknek tekintették az algákat. A megfogalmazásba beleértették a cianobaktériumokat is. Ma a cianobaktériumokat a prokariótákhoz soroljuk, amelyek sejtmagot, Golgi apparátust, endoplazmatikus retikulumot, mitokondriumot és szintesteket nem tartalmazó élőlények, míg az eukarióták mindezen sejtalkotókat tartalmaznak. Az eukarióta algák polifiletikus eredetűek, több, egymástól független fejlődési irányt követnek. Alakjuk, méretük, szerveződési szintjük, életmódjuk és anyagcseréjük nagy változatosságot mutat. Méretük a planktonikus egysejtűektől (kb. 1 μm -tól) a makroszkópikus óriás algákig (akár 60 m) terjed. Az alkalmazott algológia által használt mikroalga fogalom magában foglalja a mikroszkópikus méretű eukarióta algák különböző divízióit és az oxigéntermelő, fotoszintetikus baktériumokat, vagyis a cianobaktériumokat is. Az értekezésben a mikroalga kifejezést ilyen értelemben használom. A mikroalgák többnyire vízben élnek, de különböző talajtípusok felszínén is megtalálhatók. Talajalgaként említem a talaj bizonyos rétegéből vagy a talaj felszínéről gyűjtött, „talajvirágzást” okozó, zöld-sárga-kék-fekete színű foltokból izolált mikroalgákat. A talajalgák a vízi mikroalgákhoz viszonyítva sokkal szélsőségesebb és gyorsan változó fizikai, kémiai és biológiai környezetben élnek. A szinte állandó stresszhelyzetre alkalmazkodó anyagcseréjükkel, vagy éppen bioaktív anyagok termelésével válaszolnak, tehát a biotechnológia számára értékesebbek, mint a vízi mikroalgák.

Az alkalmazott algológia, vagyis a mikroalga biotechnológia kezdetét 1890-től számítjuk, amikor Beijerinck az akkor használatos mikrobiológiai módszerekkel létrehozta az első baktériummentes (axénikus) *Chlorella* tenyészetet. A mikroalga biotechnológia az izolált mikroalgák tenyészetét törzstenyészetnek, ill. mikroalga törzsnek nevezi. Törzsek tömeges izolálását és fenntartását algagyűjteményekben Pringsheim az 1910-es években kezdte meg. Több gyűjteményben helyezte el az izolált mikroalga törzseket, pl. Halle/Saale-ban, Berlinben, Prágában, Cambridge-ben és Göttingenben. Az Európában fellelhető algagyűjtemények többsége vízből izolált mikroalga törzsekből áll. A

Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC) létrehozásakor az „értékesebb” talajalgák izolálása volt a fő cél.

Mikroalgák, nevezetesen kovamoszatok tömegtermesztése a második világháború idején Németországban kezdődött biohajtóanyag előállítására. A sikertelen próbálkozásról alig áll rendelkezésre írásos közlemény. A világháborút követő élelmiszerhiány vezetett az „egysejt” fehérje termeléshez. A laboratóriumi körülmények között gyorsan szaporodó és mintegy 50% fehérjét tartalmazó *Chlorella* és *Scenedesmus* törzsek tömegtermesztése 1942-ben Németországban kezdődött, 1948-tól pedig az Egyesült Államokban, Japánban, Izraelben, Olaszországban és más országokban folytatódott. Magyarországon, Budapesten Tangl Harald, Tihanyban Felföldy Lajos, Mosonmagyaróváron pedig Márton Géza és munkatársaik végeztek mikroalga tömegtermesztési kísérleteket az 1950-es években. A mikroalga tömegtermesztés első nemzetközi eredményeit Burlew 1953-ban szerkesztette kötetbe. A túlbecsült terméseredmények elmaradása, a biomasszában lévő fehérje korlátozott emészthetősége és a magas termelési költségek egy időre a tömegtermesztés végéhez vezettek. A mikroalga biotechnológiának új lendületet az 1980-as években az értékes anyagok előállításának gondolata és zárt algatermesztő berendezések kifejlesztése adott. A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), poliszacharidok, antioxidánsok, természetes színyanyagok, biológiailag aktív anyagok, valamint kozmetikai, élelmiszeripari és gyógyszeripari alapanyagok magas ára tette kifizetődővé a mikroalgákkal történő értékes anyagok termelését még a magas beruházási és üzemelési költségek mellett is.

Az üvegházhatású gázok fokozott kibocsátása által okozott globális felmelegedés és a fosszilis üzemanyag ellátás bizonytalan jövője az utóbbi évtizedben új kutatási területet adott a mikroalga biotechnológusoknak. A hektáronkénti 50 tonnához közeli éves szárazanyag termelés mintegy 100 tonna széndioxid felvételével jár. A termelt biomasszából kinyerhető 10-15 tonna bioüzemanyag és a 20-30% fehérjetartalmú biomassza maradék felhasználása nagy reményeket keltett. A mikroalgák az olajos növényekkel szemben számos előnyt mutatnak: (1) nem versenyeznek az emberi fogyasztásra vagy állati takarmányozásra használható növényekkel a földterületért; (2) nagyobb a biomassza termelésük; (3) kevesebb a vízigényük, mert szennyvízen is

szaporíthatók; (4) más célra nem alkalmas területeken is termesztethők, (5) csökkentik a CO₂-kibocsátást; stb. A kutatók és a vállalkozók már-már 100-200 hektáros algaüzemek kialakítását vízionálták. A bioüzemanyag termelésnek azonban van két kritikus pontja, a negatív energetikai mérleg és a túl magas költségek. Ma még több energiával állítunk elő bioüzemanyagot, mint amennyi energiát maga a bioüzemanyag képvisel. Az előállítási költség sem versenyképes a fosszilis energiaforrások árával. A két kihívás olcsóbb és olcsóbban működtethető algatermesztő berendezések kifejlesztésére ösztönözte a biotechnológusokat. Ennek eredményeként a korábbi 10-50 € helyett ma már 3-5 Euróra csökkent a mikroalgák száraz biomasszájának a kilogrammonkénti termelési költsége, ami lehetővé teszi a mezőgazdaság számára is piacképes mikroalga termékek előállítását.

A N₂-kötő cianobaktériumok mezőgazdasági alkalmazásának a jelentőségét De már 1939-ben felismerte. A rizsföldek oltása cianobaktériumokkal, az ún. algalizálás 1951-ben kezdődött Japánban. A hektáronként megkötött legfeljebb 30 kg nitrogén azonban nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ezért ma már csupán műtrágyát nem, vagy alig használó országokban, pl. Indiában és Mianmarban oltják cianobaktériumokkal a rizsföldeket. Magyarországon nitrogénkötési céllal nincs gyakorlati jelentősége a talajok algalizálásának.

A mikroalgák, általában a szaporodás lassuló szakaszában másodlagos anyagszere termékeket termelnek, amelyek az emberiség számára fontos biotechnológiai termékek. Ide tartoznak egyebek között szerves savak, szénhidrátok, aminosavak és peptidek, vitaminok, növekedést szabályozó anyagok, antibiotikumok, enzimek és toxikus vegyületek. Az algák bioaktív anyagai már több mint fél évszázada állnak az érdeklődés középpontjában. Manapság leginkább a gyógyszeripar és a mezőgazdaság potenciális alapanyagai lehetnek. A szintetikus peszticidek és gyógyszerek társadalmi elfogadottságának a csökkenése az utóbbi időben lökést adott a természetes eredetű hatóanyagok kutatásának, amit az Európai Unió is támogat. Az algák elsősorban növényi növekedést szabályozó és növényvédő hatású anyagaik miatt értékesek a mezőgazdaság számára.

Az elmúlt közel 25 évben Mosonmagyaróváron, nemzetközi együttműködés keretében a mezőgazdasági hasznosíthatóság érdekében vizsgáljuk a

mikroalgák: (1) növényi hormontermelését; (2) növénypatogén gombák elleni hatásosságát; és (3) illékony szerves vegyületeit. Értekezésemben a két évtizedes munka tudományos eredményeit és azok gyakorlati vonatkozásait foglalom össze a tézisek célkitűzéseinek megfelelően külön fejezetekben. A tézisek a célkitűzéseken kívül csupán a módszerek vázlatos leírását, az új eredmények összefoglalását és az értekezés témakörében megjelent közleményeim listáját tartalmazza, de nem tér ki más szerzőknek az értekezésben tárgyalt közleményeire.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC)

A fejezet célkitűzéseit az értekezés bevezetőjében megfogalmazottaknál részletesebben az alábbiakban foglalom össze:

- Európai szinten is jelentős számú törzsből álló unikális, egyedi mikroalga gyűjtemény létrehozása, amely az alábbiakkal jellemezhető törzsekből áll:
 - o Brazíliában a talajok felszínén színes foltként látható talajvirágzásból származnak, a természetben jól szaporodnak,
 - o Magyarországon művelt és műveletlen területek talajmintáiból izolált törzsek,
 - o laboratóriumi körülmények között, ezért feltehetően tömegtermesztés során is jól szaporodnak,
- törzsek molekuláris biológiai módszerekkel támogatott taxonómiai meghatározása,
- a gyűjtemény mikroalga törzseinek felhasználása hazai és nemzetközi kutatási és fejlesztési együttműködésekre.

2.2. Mikroalgák növényi hormontermelése

A mikroalgák növényi hormonjainak az ismerete alapkutatási és gyakorlati szempontból egyaránt fontos. Tenyészetben serkenthetjük a mikroalgák szaporodását és javíthatjuk válaszukat a külső tényezőkre. Mikroalgák tömegtermesztésekor elérhetjük, hogy szüreteléskor az értékes anyagok, például a növényi hormonok koncentrációja és azok biológiai hatása nagy

legyen és ezzel alkalmasabbak legyenek mezőgazdasági célokra, növénykezelésekre. Ennek érdekében a részletesebb célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- cianobaktériumok és eukarióta algák biotesztelése a növényi hormonszerű (auxin és citokinin) hatást mutató fajok/törzsek kiválasztására további vizsgálatokhoz,
- a kiválasztott mikroalgákban lévő hormonok minőségi és mennyiségi kimutatása műszeres analitikai módszerekkel,
- a sejtciklus és a növényi hormonok közötti kapcsolat tanulmányozása és megismerése mikroalgákban.

2.3. Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra

Az MACC jól szaporodó mikroalga törzseinek gazdaságilag jelentős növénypatogén gombákkal szembeni hatásosságának megismerésekor célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- kilenc növénypatogén gomba közül legalább egy ellen hatásos mikroalga törzs kiválasztása, aminek ismeretében majd pályázati anyagok készíthetők a biológiailag hatásos anyagok ideális termelési feltételeinek a meghatározásához, végül pedig mikroalga termék előállításához,
- mikroalga törzsek eredeti élőhelye (talaj, víz), rendszertani helye (cianobaktérium, eukarióta alga) és biológiai hatásossága közötti összefüggés feltárása, a jövőbeni biotesztelésnél nagyobb találati arány eléréséhez, valamint az MACC bővítésére legmegfelelőbb élőhelyek kiválasztása új törzsek izolálásához,
- növénypatogén gombákkal szemben hatásos mikroalgák gyakoriságának a becslése annak előrejelzésére, hogy milyen esélyünk van új növénypatogén gombával szemben hatásos mikroalga kiválasztására.

2.4. Illékony szerves vegyületeket termelő MACC-törzsek a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben

Tekintve a szaganyagok fontos szerepét a rovarok életében és a cianobaktériumok illékony szerves vegyületeinek (AVOC) termeléséről és ökológiai szerepéről rendelkezésre álló ismereteket feltételeztük, hogy a káposzta gyökérlégy ellen AVOC anyagokat termelő cianobaktériumok

lehetnek hatásosak. A munkahipotézis alapján célkitűzéseink a következők voltak:

- a Nostocales, Oscillatoriales és Pseudanabaenales rendbe tartozó, potenciálisan AVOC anyagokat (geosmin, vagy MIB) termelő cianobaktériumok kiválasztása az MACC-ből,
- annak igazolása, hogy a cianobaktériumok AVOC anyagai okozzák a káposzta gyökérlégy tojásrakásának a gátlását,
- a káposzta gyökérlégy tojásrakását hatásosan gátló cianobaktérium törzsek kiválasztása üvegházban beállított biotesztekkel.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Talajminta gyűjtés mikroalgák izolálásához

Brazília: a talajvirágzásokból származó 260 mintát Brazília több államában: Rio de Janeiro, Sao Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso és Goias államokban gyűjtöttem leginkább műveletlen területeken, parkokban, halgazdaságok területén, erdők szélén, utak mentén stb. A talaj felszínén látható színes mikroalga foltokból 10 cm³-es steril centrifuga csövekbe gyűjtöttem mintákat.

Magyarország: a Növénybiológiai Intézet PhD-hallgatója (Lepossa Anita) a Balaton-felvidéki Nemzeti Parkban három talajtípuson, összesen 24 talajmintát gyűjtött. Művelt és műveletlen területeken a felszíni 1 cm-es rétegből steril spatulával, az 1-10 cm-es rétegből pedig 3,6 × 10 cm méretű alumínium hengerrel nejlonzacskókba gyűjtött mintákat.

Szerbia: a talajmintákat Zorica Svircev a Novi Sad-i Egyetem Biológia Intézetének tanára és hallgatói gyűjtötték cianobaktériumok izolálására.

3.2. Mikroalgák izolálása és fenntartása

Izolálás: a brazil talajmintákat dúsító tenyészetben szaporítottuk, majd hígítottuk és Petri csészében agarral szilárdított táptalaj felszínén szélesztettük. Az egyes mikroalga sejtekből/sejtfonalakból kifejlődött telepeket oltókacccsal ferde agarra oltottuk át. Az így létrejött klóntenyészeteket tápoldatba oltottuk és egy hét elteltével mikroszkópban vizsgáltuk, szükség esetén tovább tisztítottuk.

A cianobaktériumok izolálásához Petri csészébe töltött N-mentes BG-11 táptalaj felszínére 3-4 kisebb nedvesített talajszemcse került, amelyekből 1-2 hét alatt kinőttek a cianobaktérium fonalak. Ezeknek a cianobaktériumoknak az átoltásával és további szélesztéses tisztításával készültek a cianobaktérium törzstenyészetek.

Fenntartás: a törzstenyészeteket 100cm³-es Erlenmeyer lombikokban, az izoláláshoz használt tápoldatban vagy leginkább agarral szilárdított tápoldatban tartjuk fenn, a tenyészeteket pedig törzstenyésztő szobában (**1. ábra**) 15±2 °C hőmérsékleten, napi 12 órás megvilágítás mellett, 25-50 μmol foton m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson.

3.3. Mikroalgák taxonómiai meghatározása

Az izolált mikroalga törzsek morfológiai alapon történő, mikroszkópos taxonómiai meghatározásában Vörös Lajos (Magyar Tudományos Akadémia, Ökológiai Kutatóközpont, Balatoni Limnológiai Intézet, Tihany) van segítségünkre az interneten megtalálható és állandóan frissített AlgaeBase (www.algaebase.org) adatbázis alapján. A taxonómiai munka kiegészítését molekuláris biológiai módszerekkel három PhD-hallgatónk: Horváth Nándor és Katona Szabina Mosonmagyaróváron, Makra Nóra pedig Martonvásáron végzi, akik egy TÁMOP projekt (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0003: „Mikroalga biotechnológia a fenntartható mezőgazdaságban”) keretében és pénzügyi támogatásával dolgoznak. A munkához szükséges szekvenálásban Maróti Gergely (Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Szeged) segíti munkájukat.

3.4. Az MACC törzsek laboratóriumi tenyésztése

A törzseket mikroalga tenyésztő laboratóriumban (**1. ábra**), ellenőrzött körülmények között, a korábban leírt saját tenyésztő berendezésben szaporítottuk. A helyiség hőmérsékletét klímaberendezéssel 25±2 °C-on tartottuk. A napi megvilágítást 14 órára állítottuk be, a látható fény intenzitást pedig a tenyészetek szintjén 130 μmol foton m⁻² s⁻¹ értékre. Az 500 cm³-es lombikokban lévő 250 cm³ tenyészeteket óránként 20 L levegővel buborékolattuk át a mikroalga sejtek lebegésben tartásához, amit a megvilágítás idején palackról adagolva 1,5% széndioxiddal dúsítottunk. A

mindig 10 mg L^{-1} mikroalga koncentrációval indított tenyészeteket 4-14 napig inkubáltuk, majd mértük szárazanyag tartalmukat, szükség szerint számoltuk sejtszámukat és mértük sejtméretüket.



1. ábra: Törzsfenntartó (balra) és tenyésztő szoba (jobbra).

3.5. *Chlorella* szinkrontenyésztés

A tenyészetek szinkronizálását a megvilágítás hosszának a szabályozásával és a tenyészet hígításával értük el. A törzstenyészetet az egyszeri algatenyésztési eljáráshoz hasonlóan 250 cm^3 Tamiya tápoldatba oltottuk 10 mg L^{-1} induló szárazanyag tartalommal. Egyhetes szaporítást követően a tenyészetet továbboltottuk ismét 10 mg L^{-1} induló szárazanyag tartalommal. A következő napon reggel a tenyészetet tízszeresére hígítottuk, amit a rákövetkező napon reggel megismételtünk. Az utóbbi tenyészet estére csupán nagy sejtekből álló szinkrontenyészet lett. Az esti tenyészetrel, egy sötét szakasszal kezdtük a 48-órás szinkronizációs kísérleteket. A mintázást a kísérletek céljának megfelelően néhány óránként végeztük. Mértük a sejtek méret-eloszlását és sejtszámát, továbbá mintát gyűjtöttünk az egyéb vizsgálatokhoz.

3.6. Mikroalga minta előkészítés vizsgálatokhoz és kísérletekhez

A mikroalgák növényi hormontartalmának analitikai vizsgálatához a tenyészetekből kétszer 80 cm^3 mintát -80°C -on fagyasztottunk a vizsgálatok megkezdéséig. A biotesztekhez és az illékony szerves vegyületek (AVOC) vizsgálatához a mintákat fagyasztva szárítottuk. A kísérletek céljának

megfelelően a különböző korú tenyészeteket mindig ugyanabban az időben, 14 és 15 óra között centrifugálással szüreteltük. A kiülepedett mikroalga biomasszáat liofilizáltuk A fagyasztva szárított mintát zárt műanyag edényben - 20 °C-on tároltuk. A bioteszt vizsgálatok előtt a fagyasztva szárított mintákból desztillált vízzel 10 g L⁻¹ koncentrációjú szuszpenziót készítettünk, amit ultrahangos sejtroncsolóval 2 percig kezeltünk. Az antimikrobiális és rovar repellens hatás vizsgálatához a 10 g L⁻¹-es szuszpenziót használtuk, a növényi hormonhatás tesztelésére a szuszpenziót 2 g L⁻¹-re hígítottuk. A biotesztekhez mindig frissen készített mikroalga szuszpenziót használtunk fel.

3.7. Növényi hormon vizsgálatok mikroalga mintákból

A liofilezett mikroalga törzsek citokininszerű hatásának a kimutatására az uborka sziklevel megnyúlási tesztet használtuk. Az auxinszerű hatást az uborka sziklevel gyökérfejlődési teszttel értékeltük, amit kiegészítettünk a mungóbab adventív gyökérfejlődési teszttel. A fagyasztva tárolt és a vizsgálatok előtt kiolvasztott algatenyészetek mintáiból a hormontartalom műszeres analitikai vizsgálata a Palacky University Növekedésszabályozó Anyagok Laboratóriumában (Olomouc, Cseh Köztársaság) történt, közös kutatási együttműködés keretében.

3.8. Vizsgált mikroalgák és növénypatogén gombák

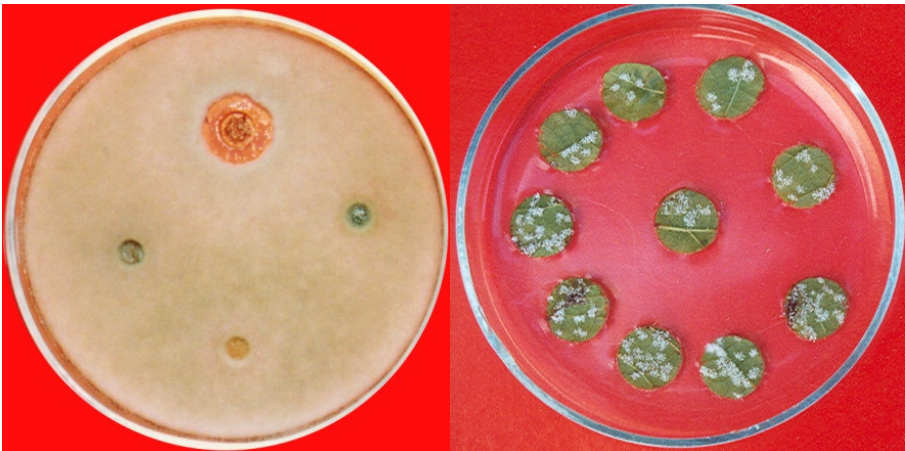
Mikroalgák: a növénypatogén gombák elleni biotesztekhez kiválasztott 280 darab MACC törzs többsége eukarióta alga, kétharmada talajalga, egyharmada pedig vízből izolált mikroalga törzs volt. A cianobaktériumok a Nostocales és Oscillatoriales rendbe tartozó fonalas cianobaktériumok voltak. Az eukarióta algák csaknem kizárólag a Chlorophyceae és Trebouxiophyceae osztályba tartoztak. A kiválasztott törzsek gyorsabban szaporodtak és nagyobb biomasszáat termeltek, mint az MACC más törzsei.

Növénypatogén gombák: a gazdaságilag jelentős növénypatogén gombák ellen összesen kilenc törzset vontunk be a tesztelésbe: *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Phaeoromularia capsicicola*, *Botryotinia fuckeliana*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans*.

3.9. Bioteszt eljárások fungicid és fungisztatikus hatás kimutatására

Agar géldiffúziós módszer (2. ábra): a tesztelt kórokozókat burgonya-dextróz agaron tartottuk fenn, kivéve a *Phytophthora infestans*-t, amelynek fenntartásához borsóagar táptalajt használtunk. A tenyészeteket szobahőmérsékleten tartottuk. A vizsgálatokhoz 10-12 napos kultúrákról lemosott, micélium- és/vagy konídium-szuszpenziót használtunk. A mikroalgák micéliumnövekedésre gyakorolt hatását *in vitro*, fertőzött agarban végzett géldiffúziós tesztben vizsgáltuk. A megszilárdult gélbe vájt 9 mm-es lyukakba 150 μL (10 mg SzA cm^{-3} koncentrációjú) alga szuszpenziót pipettáztunk. A teljes gátlási zóna átmérőjét mértük. Feljegyeztük a gombák növekedését gátló (fungisztatikus, fungicid), illetve serkentő hatást.

Szőlőperonoszpóra bioteszt (2. ábra): Nedves szűrőpapírra helyeztük, Kékfrankos szőlőfajta fás dugványairól származó fogékony levelek és levélkorongok fonák oldalát 10 mg SzA cm^{-3} koncentrációjú mikroalga kivonatokkal permeteztük le. Száradás után a kezelt levélfelületet a *Plasmopara viticola* 10^4 zoosporangium cm^{-3} koncentrációjú szuszpenziójával inokuláltuk. A Petri csészéket laborkörülmények között inkubáltuk. A hetedik napon a fertőzött levélkorong/levélfelület méretét a kontroll százalékában értékeltük.



2. ábra: Agar géldiffúziós módszer (balra) és szőlőperonoszpóra bioteszt (jobbra).

3.10. Káposzta gyökérlégy bioteszt

Potenciális AVOC termelésük alapján 60 MACC cianobaktérium törzset választottunk ki a vizsgálatokhoz. A biotesztekhez szükséges legyeket allizotiocianátot tartalmazó, magyar szabadalom alapján készült „VARL-típusú Csalomon®” rovarcsapdával gyűjtöttük. Az élő legyeket a csapdák kihelyezését követő nap kora reggelén vittük az üvegházba a biotesztek beállításához. A nőivarú legyek aránya a gyűjtések során 27 és 39% között változott. A bioteszteket fából készült, 50 x 50 x 50 cm méretű ketrecekben végeztük (**3. ábra**). A ketrecek két oldalán áttetsző műanyag ablakok voltak, a tetején és az elején pedig tüllháló. A ketrecekbe szűrőpapírt tartalmazó 4 műanyag tálcát helyeztünk (**3. ábra**). Három tálcában a szűrőpapírt 3 különböző cianobaktérium szuszpenzióval ($10 \text{ mg SzA cm}^{-3}$) kezeltük, a negyedik tálcát pedig desztillált vízzel kezelt kontrollként használtuk. A bioteszt kezdetén 50-100 legyet engedtünk be egy-egy ketrecre, vegyesen hím- és nő-ivarút. A tojásrakást két alkalommal, 4 és 8 nap múlva ellenőriztük.



3. ábra: A káposzta gyökérlégy biotesztekhez használt fa ketrecek (balra) és a tojásrakáshoz a ketrecekbe helyezett műanyag tálcák (jobbra).

3.11. Mikroalgák AVOC anyagainak vizsgálata

A kémiai vizsgálatok az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetében történtek. A kibocsájtott AVOC anyagok gyűjtését, a feromon

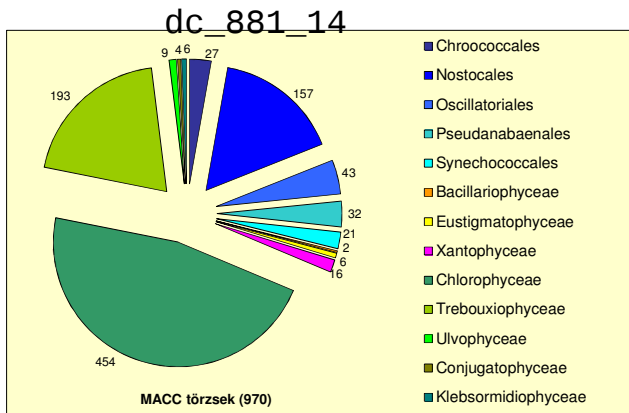
vizsgálatokban rutinszerűen használt, teljesen üvegből és teflonból készült, zárt rendszerű eszközzel végezték. A cianobaktériumok liofilizált mintáit (200 mg) 200 cm³ térfogatú üvegedénybe helyezték. Az AVOC anyagokat szén szűrőn gyűjtötték 24 órán keresztül. A szűrőkről az AVOC anyagokat 20 µL diklórmétánnal oldották le a gázkromatográfiás vizsgálatokhoz.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

4.1. Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény létrehozása

Létrehoztuk a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményt (MACC), ami Európa 13. legnagyobb, a talajalgákat tekintve pedig a 3. legnagyobb mikroalga gyűjteménye. Az MACC 970 törzsből ezen belül 588 talajalgából áll. A saját izolálású 307 brazil és a 78 magyar talajalga törzsek közül 50 cianobaktérium és 385 eukarióta alga. Megkezdjük a törzsek rendszertani besorolásának a pontosítását molekuláris biológiai módszerekkel. A gyűjtemény felét (509 törzs) a mikroalga biotechnológia számára fontos 6 nemzetség adja: a cianobaktériumok közül az *Anabaena* (82) és *Nostoc* (57), a zöldalgák közül pedig a *Chlorella* (122), *Scenedesmus* (106), *Chlorococcum* (72) és *Chlamydomonas* (70) törzsek. Jellemeztük az MACC törzsek szaporodását. Megállapítottuk, hogy a cianobaktériumok 60%-a BG-11, 20%-a a Zehnder-8 és 10%-a a Tamiya tápoldatban szaporítható. Az eukarióta mikroalgák 60%-a a Tamiya, 15-15%-a pedig a Bristol és BG-11 tápoldatban szaporodik a legjobban. A Tamiya tápoldatban szaporodó cianobaktériumok és eukarióta algák napi szárazanyag termelése hasonló (0,17-0,18 g L⁻¹ nap⁻¹) és lényegesen nagyobb, mint a másik három tápoldat bármelyikében szaporodó törzseké (0,1-0,12 g L⁻¹ nap⁻¹). A maximálisan elérhető biomassa a cianobaktériumoknál kisebb (0,75-1,75 g L⁻¹) mint az eukarióta algáknál (1-3 g L⁻¹).

A gyűjtemény mikroalga törzseit az elmúlt 20 évben számos hazai és nemzetközi projekt céljaira használtuk a mikroalgák növényi hormontermelésének, antimikrobiális hatásának és illékony szerves vegyületeinek a tanulmányozására a mezőgazdasági hasznosítást szem előtt tartva, míg a mikroalgák lipidtermelését megújuló energiaforrásként tanulmányoztuk.



4. ábra: Az MACC cianobaktérium törzseinek rendek és eukarióta törzseinek osztályok szerinti megoszlása.

4.2. Mikroalgák növényi hormontermelése

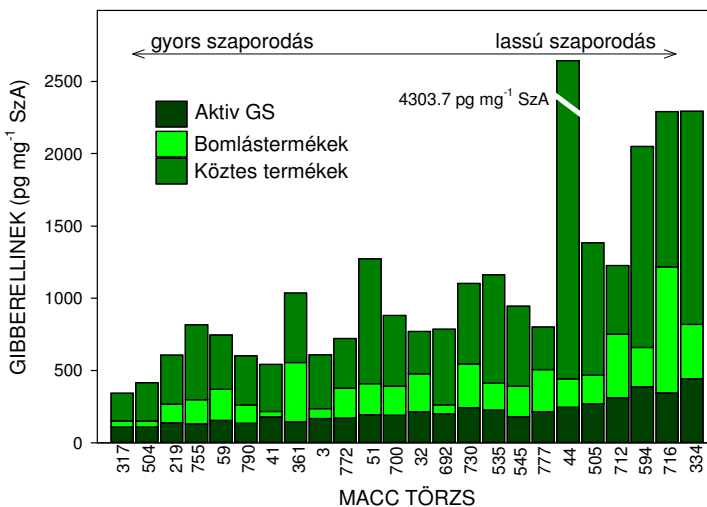
Elsőként közöltük endogén gibberellinek (GS) jelenlétét és összetételét mikroalgákban. Megállapítottuk, hogy a lassabban szaporodó algtörzsek több, a gyorsabban szaporodók kevesebb gibberellint tartalmaznak. A mikroalgákban kimutatott gibberellinek alapján feltételezzük, hogy a mikroalgákban a gibberellinek bioszintézise a következő úton megy végbe: $GS_{12} \rightarrow GS_{53} \rightarrow GS_{44} \rightarrow GS_{19} \rightarrow GS_{20} \rightarrow GS_5 \rightarrow GS_6$. A mikroalgákban a GS_6 a domináns biológiailag aktív gibberellin.

Másodikként közöltük a mikroalgákban a brasszinoszteroidokat, köztük a brassinolid (BL) és a kaszaszteron (CS) jelenlétét 24 vizsgált zöldalgában és három brasszinoszteroid jelenlétét (kataszteron (CT), 6-oxo-kampesztanol (6-oxoCN) és 6deoxo-*epi*CS) a *Chlorella minutissima* zöldalga szinkron tenyészetében.

Az egyes hormonok termelése és a sejtciklus között nem sikerült meggyőző összefüggést találni, csupán néhány megállapítást tenni: (1) a sejtosztódásban szerepet játszó auxinok és citokininek koncentrációja növekedett a szinkrontenyészetekben a 48-órás kísérleti időszak alatt; (2) a gibberellineké, a mikroalgákban feltehetően szintén stresszhormonként működő abszcizinsavé és a sejtosztódásban közvetlenül részt nem vevő brasszinoszteroidoké viszont csökkent; (3) az *Arthronema africanum*

cianobaktérium aszinkron tenyésztésével végzett biotesztek szerint nem a sejtciklustól, hanem a fénytől függően nőtt a tenyészet citokinin-szerű hatása.

Huszonöt zöldalga hormontartalmának és hormonösszetételének műszeres analitikai eredményei alapján valószínűsítjük, hogy minden zöldalga képes növényi hormonok termelésére, ezért a mikroalgák, a tengeri algakivonatokhoz hasonlóan alkalmasak lehetnek a termesztett növények növekedésének és fejlődésének a kedvező befolyásolására. Pótlólagos előnyük a tengeri algakivonatokkal szemben, hogy közülük célorientáltan specifikus hormonösszetételű algák használhatók, amelyek iparszerűen termesztethetők és még növényvédő hatásuk is lehet. Mindazonáltal a növénykezelési célokra termesztett mikroalga biomasszában, a növényi hormonok kimutatása műszeres analitikai módszerekkel nem elegendő. A felhasználás előtt a hormonok együttes biológiai hatásának a vizsgálata bioteszt módszerekkel feltétlenül szükséges.



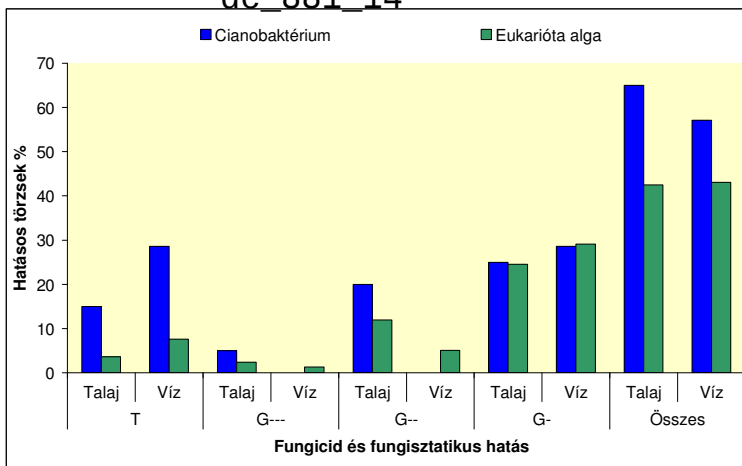
5. ábra: Huszonnégy eukarióta MACC algatörzs gibberellin tartalma.

4.3. Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra

Agar géldiffúziós biotesztekkel a Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény 280 mikroalga törzsét vizsgáltuk 9 növénypatogén gombával szemben. Minden patogénre legalább egy, összesen 19 fungicid hatású mikroalgát találtunk. A legtöbb fungicid mikroalgát a *Phaeoramularia capsicicola* (11), a *Pythium ultimum* (5), a *Botrytis cynerea* (4) és az *Alternaria alternata* (4) ellen találtunk. A *Plasmopara viticola* ellen 3 erősen gátló hatású zöldalgát találtunk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek 45%-a legalább gyengén fungisztatikus hatást mutatott legalább egy patogénnel szemben, ezért feltételezhető, hogy a mikroalgák többsége, ha nem minden mikroalga képes antimikrobiális anyagok termelésére valamilyen mikroszervezettel szemben. Fungicid hatású volt:

- a vizsgált cianobaktériumok 20%-a és az eukarióta algák 5%-a,
- a cianobaktériumok közül a talajalgák 15%-a és a vízből izolált algák 28%-a,
- az eukarióta algák közül a talajalgák 3,6%-a és a vízből izolált algáknak a 7,6%-a.

Az eredmények alapján vízből izolált cianobaktériumoktól várható a nagyobb antifungális hatás, ezért az MACC bővítése ebben az irányban célszerű. A fungicid biotesztek aránya az összes elvégzett bioteszten belül 1,2%, vagyis átlagosan mintegy 85 biotesztet kell elvégezni ahhoz, hogy egy fungicid eredményt kapjunk. A cianobaktériumok hátránya az eukarióta algákkal szemben a lassúbb szaporodás és a többnyire nem homogén szuszpenzió (lásd *Nostoc* és *Tolypothrix* törzsek), ami a fungicid cianobaktériumok gyakorlati felhasználását megnehezíti. Az eukarióta algák felhasználása mellett szól gyors szaporodásuk és esetenként specifikus hatásuk, például a *Plasmopara viticola* ellen.



6. ábra: A kilenc növénypatogén gomba közül legalább patogénre ható alगतörzs (=126).

4.4. *Cianobaktériumok a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben*

Norvég kutatók kísérleti eredményei és a cianobaktériumok szaganyag termeléséről rendelkezésre álló irodalom alapján kiválasztottunk 60, a Nostocales, Oscillatoriales és Pseudanabaenales rendbe tartozó MACC-törzset, amelyek közül legalább néhány, szaganyag termelésével befolyásolta a káposzta gyökérlégy tojásrakását. A kísérleti eredmények alapján a törzsek mintegy harmada repellens hatású volt a káposzta gyökérlégy tojásrakására, másik harmada pedig serkentette azt. A 20 repellens cianobaktérium törzs közül 14 érzékelhető szaganyagot termelt, amit gázkromatogramon azonosítani tudtunk. A 19 tojásrakást serkentő törzs közül csupán 4 szaganyag termelését érzékeltük. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a cianobaktériumok szaganyagai alkalmasak a káposzta gyökérlégy tojásrakásának a befolyásolására.

A tojásrakásra repellens törzseket a leggyakrabban két nemzetségben találtunk: három vizsgált *Pseudanabaena* törzsből 2 és négy vizsgált *Leptolyngbya* törzsből 3 volt repellens hatású. A tojásrakást serkentő törzsek a leggyakrabban a *Calothrix* nemzetségben fordultak elő, öt vizsgált törzsből négy.

A Mosonmagyaróvári Algagyűjteményt a különböző projektekben elért és az értekezésben összefoglalt eredmények alapján bővítjük. A mikroalgákon belül növeljük a talajból és vízből izolált cianobaktériumok arányát. A gyűjtemény felhasználásával továbbra is a mikroalgák mezőgazdaságban és a megújuló energiatermelésben való alkalmazhatóságát kutatjuk hazai és nemzetközi együttműködések keretében.

Nagyobb hangsúlyt szánunk a hormonok mikroalgákban betöltött szerepének a kutatására. Exogén hormonok hatását vizsgáljuk laboratóriumi tenyészetekre és üvegházban elhelyezett félüzemi tömegtermesztő berendezésekben szaporodó mikroalgákra. Gyakorlati célunk a tömegtermesztés során a mikroalgák szaporodásának gyorsítása, továbbá annak a vizsgálata, hogy a környezeti feltételek (pl. alacsony fényintenzitás és hőmérséklet) kedvezőtlen hatása csökkenthető-e specifikus hormonok adagolásával. Biotesztekkel értékeljük eltérő módon termesztett és/vagy különböző mikroalga törzsek hormonszerű hatását, különös tekintettel az auxinszerű és citokininszerű hatásra. PhD-hallgatók és növénytermesztők bevonásával vizsgáljuk ezeknek a „bevizsgált” biomassza mintáknak a hatását termesztett növények növekedésére és fejlődésére, valamint növények szövettenyészeire.

Az MACC cianobaktérium törzseinek hatását vizsgáljuk növénypatogén gombákra. Korábbi tapasztalataink és nemzetközi kapcsolataink segítségével a gyakorlatban használható alga termékek előállítására törekszünk.

A mikroalgák, ezen belül a cianobaktériumok szaganyag termelésének vizsgálata nem csupán a vízi ökoszisztémában betöltött ökológiai szerepük miatt fontos, hanem egy egészen más kutatási terület, a rovarok és az ellenük való védekezés szempontjából is hasznos. Nem csupán a repellens hanem a serkentő hatású szaganyagoknak is komoly gyakorlati jelentősége lehet. A „push and pull” technológia alkalmazásával bizonyos rovarok elriaszthatók egy adott területről, egy másikra pedig oda csalogathatók és elpusztíthatók. A mikroalgák szaganyagainak rovarokra gyakorolt repellens vagy csalogató hatásának megismerése kiszélesíti a mikroalgák biotechnológiai

alkalmazásának spektrumát. Ha ismerjük a szaganyag hatását, akkor olyan mikroalgákat kell keresnünk, amelyek termelik ezt a szaganyagot és még jól is szaporodnak. Ezzel a megközelítéssel megnövelhetjük merítési lehetőségünket a mikroalga nemzetségek és fajok között feltéve, hogy ugyanazt a szaganyagot számos mikroalga képes termelni és ez szinte biztosra vehető. A jövőben ezt a megközelítést követjük, amikor rovarokra ható mikroalga szaganyagokat keresünk.

A mikroalgák biotechnológiai alkalmazásának kutatása a mezőgazdaságban csupán több tudományterület képviselőinek az együttműködésével lehet sikeres. Az elmúlt 25 évben ennek tudatában törekedtem hazai és nemzetközi kapcsolatok kiépítésére a Növénybiológiai Intézet munkáját kiegészítő kutatással foglalkozó szakemberekkel. A közös munka eredménye számos sikeres kutatási pályázat végrehajtása és jelen értekezés megírása, amiért köszönettel tartozom, a következő tudósoknak, kutatóknak, kollégáknak:

Dr. Johannes van Staden akadémikus, Univ. of KwaZulu-Natal, PMB, SA

Dr. Mirsolav Strand professzor, Palacky University, Olomouc, CZ

Dr. Wendy Ann Stirk kutató, Univ. of KwaZulu-Natal, PMB, SA

A mikroalgák növényi hormonkutatásához nyújtott segítségükért.

Dr. Németh Lajos egyetemi adjunktus, NymE-MÉK, Mosonmagyaróvár

A mikroalgák növényi gombabetegségek elleni teszteléséért.

Dr. Tóth Miklós akadémikus, MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Budapest

Dr. Benedek Pál professzor, NymE-MÉK, Mosonmagyaróvár

A káposzta gyökérlégy elleni védekezésre kiválasztott cianobaktériumok teszteléséért és kémiai vizsgálatáért.

Dr. Vörös Lajos kutató professzor, MTA Ökológiai Kutatóközpont, Tihany,

Az MACC folyamatos taxonómiai vizsgálatáért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak a kutatás mindennapjaiban nyújtott sokoldalú segítségükért:

Dr. Molnár Zoltán egyetemi docens, **Bálint Péter** intézeti mérnök, **Lelkes**

Péter intézeti mérnök, **Lobik Ildikó** laboráns, **Milkovics Judit** intézeti

mérnök, **Takács Georgina** intézeti mérnök és **Takács Péterné** intézeti

ügymintázó.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm mindazok segítségét, akik véleményükkel, biztatásukkal és barátságukkal hozzájárultak ahhoz, hogy nyugodt kutató munkát végezhessek és az eredményekből elkészülhessen értekezésem.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Ördög V** (1982): Apparatus for laboratory algal bioassay. Int. Revue der gesamten Hydrobiol. 67(1):127-136. (ISSN: 0020-9309)
2. **Ördög V** (1984): Beiträge zur Erhaltung von Algenstammkulturen. Acta hydrochim.hydrobiol. 12(4):425-429. DOI:10.1002/aheh.19840120415, (ISSN: 0323-4320)
3. **Ördög V & Molnár Z** (1995): Cytokinin-like activity of eight *Anabaena* strains estimated by bioassays. Acta Agronomica Óváriensis 37(2):137-144. (ISSN: 1416-647X)
4. **Ördög V & Pulz, O** (1996): Diurnal changes of cytokinin-like activity in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria), determined by bioassay. Algological Studies 82:57-67. (ISSN: 0342-1120)
5. Stirk, WA; **Ördög V** & van Staden, J (1999): Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria).- Journal of Phycology 35(1):89-92. DOI:10.1046/j.1529-8817.1999.3510089.x, (ISSN: 0022-3646)
6. Lepossa A & **Ördög V** (2000): Operation of semi-continuous culture of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria) grown in pig manure. Acta Agronomica Óváriensis 42(1):3-11. (ISSN: 1416-647X)
7. Stirk, WA; **Ördög V**; van Staden, J & Jäger K (2002): Cytokinin- and auxin-like activity in cyanophyta and microalgae. J. Appl.Phycol. 14(3):215-221. DOI:10.1023/A:1019928425569, (ISSN: 0921-8971)
8. **Ördög V**; Stirk, WA; Strnad, M & van Staden, J (2004): Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta. J. Phycology 40(1): 88-95. DOI:10.1046/j.1529-8817.2004.03046.x, (ISSN: 0022-3646)
9. **Ördög V**; Stirk, WA; Lenobel, R; Bancirova, M; Strnad, M; van Staden, J; Szigeti J & Németh L (2004): Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. Journal of Applied Phycology 16(4):309-314. DOI:10.1023/B:JAPH.0000047789.34883.aa, (ISSN: 0921-8971)

- 10.** Jäger K; **Ördög V** & Barnabás B (2005): Effect of cyanobacterial and microalgal biomass on anther culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Agronomica Hungarica 53:99-107. (ISSN: 0238-0161)
- 11.** Lepossa A & **Ördög V** (2006): Quantitative analysis of soil algae in the Balaton Uppland National Park (Hungary).- Agrokémia és Talajtan 55:271-278. (ISSN: 0002-1873)
- 12.** Gergely I; **Ördög V**; Pocsai K & Petróczki F (2007): A cukorrépa káros levélváltás elkerülésének lehetőségei. Acta Agronomica Óváriensis 49(2/2):427-432. (ISSN: 1416-647X)
- 13.** Jäger K.; Bartók T; **Ördög V** & Barnabás B (2010): Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. South African Journal of Botany 76(3):511-516. DOI:10.1016/j.sajb.2010.03.009, (ISSN: 0254-6299)
- 14.** Stirk, WA; van Staden, J; Novak, O; Dolezal, K.; Dobrev, PI; Sipos Gy; **Ördög V** & Bálint P (2011): Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (*Chlorophyceae*) in relation to light and the cell cycle. Journal of Phycology 47(2):291-301. DOI:10.1111/j.1529-8817.2010.00952.x, (ISSN: 0022-3646)
- 15.** Virág E; Molnár Z & **Ördög V** (2011): Application of algal biomass for enhanced acclimatization of orchids. Acta Biologica Szegediensis 55(1):179-182. (ISSN: 1588-385X)
- 16.** Molnár Z; Virág E & **Ördög V** (2011): Natural substances in tissue culture media of higher plants. Acta Biologica Szegediensis 55(1):123-128. (ISSN: 1588-385X)
- 17.** **Ördög V**; Stirk, WA; Bálint P; van Staden, J & Lovász Cs (2012): Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen stressed *Chlorella minutissima* cultures. Journal of Applied Phycology 24(4):907-914. DOI:10.1007/s10811-011-9711-2, (ISSN: 0921-8971)
- 18.** **Ördög V**; Stirk, WA; Bálint P; Lovász Cs; Pulz, O & van Staden, J (2013): Lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella* and *Scenedesmus* strains grown in nitrogen-stressed conditions. Journal of Applied Phycology 25(1):233-243. DOI: 10.1007/s10811-012-9857-6, (ISSN: 0921-8971)

- 19.** Stirk, WA; Bálint P; Tarkowská, D; Novak, O; Strnad, M; **Ördög V** & van Staden,, J (2013): Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiol. and Biochem.* 70:348-353. (ISSN: 0981-9428)
- 20.** Rice, LJ; Soós V; Ascough, GD; Balázs E; **Ördög V**; Whitehead, CS; Finnie, JF & van Staden, J (2013): Ethylene-and dark-induced flower abscission in potted *Plectranthus*: Sensitivity, prevention by 1-MCP, and expression of ethylene biosynthetic genes. *South African Journal of Botany.* 87: 39-47.
- 21.** Stirk, WA; **Ördög V**; Novak, O; Rolčík J; Strnad M; Bálint P & van Staden J. (2013): Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J. Phycol.* 49: 459-467. DOI: 10.1111/jpy.12061, (ISSN: 0022-3646)
- 22.** Aremu, AO; Masondo, NA; Stirk, WA; **Ördög V** & van Staden, J (2014): Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. *Journal of Applied Phycology.* 26(1): 407-415. DOI 10.1007/s10811-013-0144-y, (ISSN 0921-8971)
- 23.** Stirk, WA; Bálint P; Tarkowská, D; Novak, O; Maróti G; Ljung, K; Turecková, V; Strnad, M; **Ördög V** & van Staden, J (2014): Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology et Biochemistry.* 79: 66-76. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.03.005, (ISSN 0981-9428)