

VÁLASZ

Dr. Borbély György, a biológiai tudomány doktora opponensi véleményére

Megköszönöm, hogy Opponensem „Mikroalgák biotechnológiai alkalmazása a növénytermesztésben és növényvédelemben című MTA doktori értekezésem bírálatát elvállalta és véleményében az értekezés értékeinek megemlítése mellett megfogalmazta részletes kritikai észrevételeit és kérdéseit. Az értekezéssel kapcsolatos pozitív megállapításokat hálásan köszönöm, a megjegyzésekre és a kérdésekre pedig az alábbiakban válaszolok követve az értekezés és az opponensi vélemény szerkezetét.

Az értekezés szerkesztése

Az értekezés szokatlan szerkesztési módját azért választottam, mert ez megkönnyítette a négy, egyenként is multidiszciplináris kutatási terület közérthető leírását. Fő szempont azonban az volt, hogy az olvasó az érdeklődési körének megfelelő fejezet áttanulmányozásával teljes képet kapjon az adott témaköréről anélkül, hogy az őt egyáltalán nem érdeklő fejezeteket is átolvasná. Köszönöm, hogy a szerkesztésre vonatkozó kritikai megjegyzése ellenére Opponensem nem kérdőjelezte meg a választott struktúrát.

Ez a szerkesztési mód sajnálatos módon bizonyos ismétlésekkel járt ugyan, de örülök annak, hogy értekezésem Bírálója sem tartotta ezeket igazán zavarónak.

Opponensem szerint a mellékletek táblázatait beilleszthettem volna a szövegbe, ahol egyébként is vannak táblázatok. A melléklet táblázatai részletes adatokat tartalmaznak, amelyeket összesített formában ábraként, vagy a kiemelten fontos adatokat táblázatokban bemutatok a szövegben. A mellékletek táblázatainak beillesztése a szövegbe részint átfedést jelentett volna, részint pedig elvonta volna az olvasó figyelmét a lényegről.

A fejezetek végére került „Tervek, jövőkép” című pontok szokatlanok az MTA doktori értekezésekben, ezért ezek elhagyását javasolta Opponensem. Két indokom volt ezeknek a pontoknak a megírására: (1) az egyes fejezetekben leírt kutatási témák nem tekinthetők befejezettnek, sőt az eredmények további kutatásra ösztönöznek különösen a gyakorlati alkalmazást illetően; (2) a pontokban megemlített kutatási témák közül a mikroalga biotechnológusok közössége választhat és kutathatja azt nemzetközi versenyképességünk növelése érdekében.

A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény

Kutatásainkhoz axenikus törzsek kialakítása nélkülözhetetlen volt. A mikrobiális kontamináció ellenőrzésére csupán szénforrásban gazdag táptalajt használtunk, de nem próbáltuk ki az Opponensem által javasolt, alacsony szénforrás tartalmú, agarral szilárdított táptalajt. Köszönöm a javaslatot, a jövőben használni fogjuk ezt a tesztet is.

Opponensem a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményből (MACC) származó, közleményekben megjelent törzseket publikálnak tekintette. Kifogásolta viszont azt, hogy a teljes gyűjtemény közlése nem történt meg, pedig a törzsgyűjtemények legnagyobb értékét éppen a nyilvánosság adja. Az MACC-ről természetesen van saját magunk számára készített

katalógus, ami tartalmaz minden szükséges és folyamatosan bővülő, aktualizált információt. A katalógus közzétételének elmaradását azonban idővel változó okok indokolták, nevezetesen:

1. Az MACC létrehozását a Thallia Pharmaceuticals francia gyógyszerkutató cég (időközben megszűnt) 1993-tól három éven át támogatta és elvárta a gyűjtemény bizalmas kezelését.
2. Az 1990-es évek tudományos ismereteinek szintjén, morfológiai alapon meghatározott és számokkal ellátott algatörzseket, ill. azok kivonatát a francia megbízó gyógyszeripari, intézetünk pedig mezőgazdasági célú felhasználásra tesztelte. A törzsek taxonómiai besorolásának pontosságára ehhez a munkához nem volt szükség, sőt a faji szintű meghatározásra sok esetben nem is volt lehetőség annál is inkább, mert a cianobaktériumok túlnyomó hányada laboratóriumi körülmények között nem mutatja azokat a morfológiai jegyeket, amelyek a hagyományos határozáshoz szükségesek.
3. A francia támogatás megszűnését követően az MACC fenntartási költségeinek az előteremtésére az MACC közlése és a törzsek eladása helyett inkább projektekben történő részvételt választottuk. Ez azt jelentette, hogy a gyűjteményben lévő törzseket azok számára tettük hozzáférhetővé, akik közös projektek kidolgozását tervezték.
4. A morfológiai alapon történő taxonómiai besorolás kiegészítésére az utóbbi öt évben molekuláris biológiai módszereket (polifázikus megközelítés) is használunk. Először két kutatót foglalkoztattunk a törzsek jellemzésére, jelenleg pedig 3 PhD-hallgató vizsgálja az MACC legnépesebb nemzetségeinek törzseit.

Fentiek alapján az MACC publikálása tudományos folyóiratokban kezdetben tiltott volt, később pedig tudományosan nem kellően megalapozott, gazdasági okokból pedig célszerűtlen lett volna. Utóbbi okok miatt nem került be az MACC törzseinek teljes listája az értekezésembe sem.

Az MACC törzseivel nyert eredményekről az utóbbi 20 évben az értekezés témáihoz kapcsolódó közel 50 hazai és nemzetközi előadásban mindig bemutattam a gyűjtemény legjellemzőbb adatait. Az utóbbi évtizedben számos vendégünk – értekezésem Opponense is – személyesen láthatták a gyűjteményt. A Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer tudományi Kar, Növénybiológiai Intézet honlapján különböző formákban szintén megtalálható az MACC. Két EU-FP7 és több hazai projektben való részvételünk meghívásos alapon szintén az MACC létrehozásának köszönhető. Kijelenthető tehát, hogy a mikroalga biotechnológia hazai és nemzetközi szakemberei számára közzismert az MACC létezése, elérhetőségének feltétele, jelentősége és szerepe a kutatásban. A törzsek taxonómiai besorolásának folyamatban lévő polifázikus megközelítését követően pedig megtörténhet – első lépésként – az MACC legnépesebb genusainak közlése is.

Opponensem felveti, hogy a különböző alapon kiválasztott szempontok (taxonómia, produktivitás, stb.) százalékos megoszlása nem informatív, mert újabb törzsek izolálásával ez változik. Véleményem szerint szükség van arra, hogy időnként összegzést/áttekintést készítsen a fenntartó a gyűjteményéről, adott esetben mintegy 20 évvel a létesítést követően. A százalékos megoszlás jelentősen azért nem fog változni, mert csupán különleges esetekben izolálunk újabb törzseket. A cél nem „óriásgyűjtemény” létrehozása, hanem a meglévő törzsek értékeinek felmérése, például tenyésztési és tömegtermesztési kísérletekkel, szűréssel/teszteléssel, analitikai vizsgálatokkal.

A törzsek laboratóriumi tenyésztésére vonatkozóan Opponensem több kérdést vetett fel, amelyekre a kérdések felsorolása nélkül válaszolok. A 10 mg szárazanyag L⁻¹ koncentrációt több évtizedes tapasztalat alapján választottuk ki, mert ez még áttetsző szuszpenziót jelent, víztisztának látszó sűrűség, de elegendő a gyors szaporodás biztosítására. Ezzel az induló

algakoncentrációval a tenyészetek 1-2 héten belül elérik a szaporodás stacioner szakaszát. A mikroalga biotechnológiában az algaszaporodás mérésére leggyakrabban használt mértékegység a $\text{g L}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ és a $\text{g m}^{-2} \text{ nap}^{-1}$. A sejtszámnak és sejtméretnek speciális esetekben lehet jelentősége. A mikroalga biotechnológia számára korlátozott a jelentősége annak, hogy egy gramm száraz alga biomasszában törzsenként, sőt adott törzs tenyészetében időben is eltérő a sejtszám.

A szinkron tenyészetek hígítására javasolt klorofill tartalom mérés gondolatát köszönöm, kipróbáljuk és összevetjük a szárazanyag mérés alapján végzett hígítások eredményével. Laboratóriumi tenyészetekben a szinkronitás mértékének a nyomon követésére a sejtszámlálás és a sejtméret-eloszlás meghatározása elkerülhetetlen, de erre alkalmas mikroszkóp, kamera és számítógépes program a rendelkezésünkre áll, ezért egysejtű mikroalgáknál, pl. *Chlorella* törzseknél könnyen elvégezhető. Ez sajnos nem helyettesíthető oxigénméréssel vagy egyéb mérési eljárással.

Az MACC törzseinek a szaporodását négy, gyakran használt tápoldatban összehasonlító céllal vizsgáltuk a leggyorsabban szaporodó és legnagyobb biomasszát termelő törzsek kiválasztására. Elsősorban ezeket a törzseket vontuk be a számunkra értékes anyagok kutatásába. Az Opponensem által javasolt sejtszám növekedési kísérletek alkalmasabbak lettek volna a pontos kettőződési idők, növekedési állandók és a lag fázis megállapítására, de nem ez volt a cél, sőt az MACC közel ezer törzsével és 4 tápoldattal ennek elvégzése több évet vett volna igénybe. Az általunk választott egyszerű módszer elegendő volt a kitűzött cél elérésére.

A szaporodást nem optimalizáltuk, tehát nem változtattuk a makro- és mikroelemek koncentrációját a tápoldatban, amelyek koncentrációja, sőt egymáshoz viszonyított aránya is befolyásolja a szaporodás mértékét. Erre majd az értékes törzsek tömegtermesztésénél kerül sor.

Egyetértek Opponensemmel abban, hogy a molekuláris taxonómiai jellemzésre vonatkozó előzetes eredmények bemutatását elhagyhattam volna az értekezésből. A mikroalga taxonómia polifázikus megközelítését, beleértve a molekuláris taxonómiát is elegendő lett volna az irodalom feldolgozásánál megemlítenem.

A krioprezerváció Opponensem szerint nem tartozik az értekezés témakörébe. Valóban nem tartozik, nem is foglalkozunk vele, sőt a jövőben sem tervezzük a téma kutatását. Ugyanakkor megemlítem, hogy nyomon kell követnünk a krioprezerváció irodalmát és azonnal bevezetni ezt a törzsfenntartási módszert ha minden törzsünk fenntartására alkalmas módszer majd rendelkezésre áll. A törzsgyűjtemény hosszú távú fenntartásának a biztonsága ezzel növelhető, költsége pedig jelentősen csökkenthető lenne.

A mikroalgák növényi hormontermelése

Opponensem kérdezi miért nem alkalmaztunk folyamatos megvilágítású kontrollt, amikor a hormontermelés dinamikáját vizsgáltuk *Chlorella minutissima* szinkron tenyészetekben. A fény:sötét, folyamatos sötét és folyamatos sötét+glükóz kezelések mellett a kísérlet méretének további növelése újabb kezeléssel már lehetetlenné tette volna a számos lombikból történő gyakori mintavételek végrehajtását.

A tenyészetek specifikus fehérjékkel, RNS-szintézisgátlókkal vagy energia éhezést indukáló vegyületekkel történő kezelésre vonatkozó javaslatot köszönöm. A jövőben megfontoljuk ilyen jellegű kísérletek végzését.

Egyetértek Opponensemvel abban, hogy óvatosságra van szükség a hormonkísérletek eredményeiből tett megállapításoknál. A mikroalgákban előforduló hormon konjugátumokra vonatkozóan valóban szerencsésebb lett volna csupán annyit megállapítani, hogy a mikroalgákban és a magasabbrendű növényekben az intermedier „pool” eltér egymástól. Sajnos tény, hogy a mikroalgák hormontermelésének vizsgálata messze elmarad a magasabbrendű növényekétől. A mikroalgák hormonjaira vonatkozó kezdeti megállapításoknál ezért a magasabbrendű növényeknél már igazolt ismereteket tudjuk figyelembe venni. A megállapítások igazolásához viszont azoknak az enzimeknek, fehérjéknek, géneknek, stb. a további vizsgálatára van szükség, amelyek valóban részt vesznek a mikroalgák hormonjainak a szintézisében.

Az előbbi magyarázat érvényes arra a megállapításra is, hogy a mikroalgákban a GS₆ a domináns biológiailag aktív gibberellin, mondván ez van a legnagyobb koncentrációban jelen, szemben a magasabbrendű növények GS₁ és GS₄ aktív gibberellinjével. Tulajdonképpen az eredmények alapján indokolható a megállapítás, jóllehet ezt további vizsgálatokkal még igazolni kell.

A tengeri algakivonatok készítményeinek kedvező hatását a mezőgazdasági növények növekedésére az irodalom egyértelműen a bennük lévő növényi hormonokkal (auxin és citokinin) magyarázza. A készítmények címkéjén is ezt jelölik meg hatóanyagként. Ugyanezt feltételezzük a mikroalgák vizes szuszpenziójáról/kivonatáról is, nem kizárva azt a lehetőséget, hogy a magas fehérjetartalmú alga szuszpenzióban peptidek, aminosavak és zsírsavak is jelen vannak, amelyek hozzájárulhatnak a kedvező hatás kialakulásához.

Egyetértek Opponensemvel abban, hogy célszerű lett volna a vizsgált növényi hormonok szintézisútjait bemutató ábrák beillesztése az értekezésbe.

Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra

Opponensem hiányolta a növénypatogén gombákkal szemben hatásos mikroalgákra vonatkozó EC₅₀ értékeket. A kutatás célja csupán a hatásos mikroalgák kiválasztása volt. A fungicid hatású mikroalgák EC₅₀ értékeit, valamint egyéb labor- és üvegházi vizsgálatát a szabadföldi kísérletek előtt tervezzük elvégezni támogatott projektek keretében. Ezt tettük a szőlő peronoszpóra ellen hatásos algáinkkal is egy EU-FP7 projekt keretében.

Az agar diffúziós biotest eredmények reverz módon történő ellenőrzésére javasolt eljárást – mikroalga bekeverése az agarba és lyukfúrás követően a növénypatogén gomba propagulumával történő inokulálás – köszönöm, használni fogjuk.

A mikroalga törzsek élőhelye és taxonómiai helye, valamint a hatások közötti kapcsolat kereséséhez rendelkezésre álltak a szükséges adatok. Saját MACC katalógusunkból pontosan tudjuk és az ábrákon/táblázatokban jelöltem is, hogy talajból vagy vízből izolált alga vizsgálatáról ill. algára vonatkozó eredményről van-e szó. Ezért tudtuk megállapítani, hogy vízből izolált cianobaktériumok szűrése több fungicid törzset eredményezhet, mint az eukarióta mikroalgák szűrése.

Természetesen én sem arra gondolok, hogy az algákkal történő növényvédelem „beporoztuk, megvédtük”-ből áll. Mindazonáltal a jelenlegi irodalom alapján a mikroalgákban lévő növényi hormonok biztosan befolyásolják a növény természetes védekező rendszerének beindítását, fungicid anyagaik pedig közvetlen hatással vannak a növénypatogén gombára. Egyetértek, a részletek megismerése még további kutatásokat igényel. A sztómákon bejutó apró mikroalga sejtek együttélése a növény levelével elképzelhetőnek tűnik.

Illékony szerves vegyületeket termelő MACC törzsek a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben

A cianobaktérium szuszpenzióval kezelt szűrőpapírt 20x20cm méretű műanyag tálcába helyeztük, aminek a közepére tettük a legyek táplálékforrását, a tarlórépa darabot izoláció nélkül. Az 5.2 ábrán bemutatott kromatogramon a 6,7 perces retenciós idejű komponensről csupán feltételeztük, hogy a repellens hatásért felelős. Erre utalt az, hogy a hatásos algatörzsek minden mintájában megtaláltuk ezt a csúcsot, bár eltérő nagysággal. A „mocsárszag”-hatás minden mintában érezhető volt.

Mértékének változását és annak kapcsolatát a szaghatásért „felelős” csúccsal én nem tudtam megállapítani. A liofilizálás hatását nem, de a hőkezelés hatását vizsgáltuk az illékony anyagok felszabadulására. A liofilezett mintát 50 és 80 °C-on kezeltük szárítószelektálcán 1 és 2 óráig, de a „mocsárszag” a liofilezett és hőkezelt mintából sem tűnt el. A hatásos illékony anyagot cseh kutatási partnereink analizálták és geozminnak találták.

Válasz az Opponensi kérdésekre

- 1.) Az MACC, főleg talajalgák gyűjteménye, - talált-e mikroaerofil izolátumot(okat), - a talajalgák a szűrt tenyészetekben hogyan viselkednek, vannak-e különbségek az izolátumok között?**

Nem találtunk mikroaerofil izolátumokat és különbséget sem figyeltünk meg a talajalga izolátumok között. A talajalgák többségét a talaj felszínén élő „talajvirágzást” okozó algamintákból izoláltuk.

- 2.) Mikor és hogyan kívánják publikálni a gyűjteményt (lásd fentebb)?**

A polifázikus taxonómiai megközelítéssel meghatározott MACC algatörzsek közlését közlemények formájában tervezzük várhatóan 1-2 éven belül. A teljes gyűjtemény közlésére 3-5 éven belül kerülhet csupán sor abban az esetben, ha az ehhez szükséges pénzügyi forrásokat sikerül biztosítani.

- 3.) Az értekezés megállapításain végigvonul a dicsérendő gyakorlati felhasználás gondolata. A praxisban, az algakivonatokat, akár élő, akár liofilezett, alkalmazása, a felvetett növényi hormonhatások mellett, számtalan más befolyással is bírhatnak [tápelemek, szerves metabolitok (aminosavak, cukrok, zsírsavak, lipidek, nukleinsav prekurzorok stb.) a növények növekedésére. Hogyan, milyen kísérleti megközelítéssel zárhatók ki az előbbi interferenciák?**

A mikroalgákban lévő különböző „hatóanyagok” együttes hatását tudjuk csupán mérni a kezelt mezőgazdasági növényre. A mikroalgával történő kezelés hatását növényi hormonokkal kezelt növényekre gyakorolt hatással lehetne esetleg összevetni. A feladat azonban szinte megoldhatatlan, mert sem a különböző „hatóanyagok” közötti kölcsönhatást, sem pedig a mikroalgákban lévő növényi hormonok közötti „crosstalk”-ot nem tudjuk figyelembe venni. Egyébként éppen ez az előnye a mikroalgák potenciális alkalmazásának a növényi hormonokkal szemben: a sok „biostimuláns hatóanyag” együttes hatása.

4.) Néhány növényi hormon viszonylag olcsón beszerezhető. Miért nem terjedt el a mezőgazdasági gyakorlatban, talán a kertészetet kivéve, azok tömeges alkalmazása?

Az 1980-as években volt jelentős fejlesztés a növényi hormonok gyakorlati felhasználása területén. A biztató laboratóriumi eredményeket azonban a szabadföldi kísérletek nem igazolták. Túl sok tényező befolyásolta, „pufferolta” a várt hatás kialakulását, pl. éghajlati, fajta, koncentráció. Az 1990-es évektől a növényvédő szer gyárak egyesülése, a fejlesztés jelentősen megnövekedett költségei és az egyre szigorúbb EU-szabályozás akadályozzák az ilyen irányú fejlesztést. Ha mégis lenne új molekula, akkor annak költségei nem fedeznék a fejlesztési költséget. Manapság már leginkább csupán a régen kifejlesztett és hagyományosan használt hormon készítmények használatosak, amelyek például a gyökeresedést serkentik vagy a gabonánál a szárszilárdságot fokozzák.

5.) Az algakutatások egyik központi kérdése, a biodízel termelése algákkal. A transzgénikus (génmódosított) lipidtermelésű algák manapság hozzáférhetőek, - mi a véleménye az ilyenfajta konstrukciókról annak tudatában, hogy a mezőgazdaság ab ovo elzárkózik, a génmódosított növények alkalmazásától Magyarországon?

Ha ez olyan egyszerű lenne már megoldották volna hatalmas pénzügyi támogatással működő amerikai laboratóriumok. Ha lenne ilyen GMO-algatorzs Magyarországon akkor sem lenne használható, mert 50-100 ha algafarmot nem lehet zárttá tenni. Véleményem szerint kellően sok algafaj, ezen belül pedig algatorzs áll rendelkezésre, amelyek alkalmasak lehetnek biodízel termelésére, ha megfelelő, vagyis olcsó termesztéstechnológiát dolgoznak ki a kutatók ezek tömegtermesztésére. Egyelőre azonban az algákkal történő biodízel termelés energiamérlege nem pozitív és az előállítható biodízel ára sem versenyképes a fosszilis eredetű üzemanyagokkal.

Félreértések, elírások

Köszönöm, hogy Opponensem a legapróbb részletekre kiterjedően átnézte értekezésemet és tételesen felsorolta a javításra szoruló részeket. Erre most nem lesz lehetőségem, de az értekezés részleteinek a közlésénél figyelembe veszem majd a javasolt javításokat.

Ismételten megköszönöm Dr. Borbély György, a biológiai tudomány doktora opponensi véleményét. Kérem válaszaim elfogadását és véleményének fenntartását, amely szerint támogatja értekezésem elfogadását és az MTA Doktora cím odaítélését.

Mosonmagyaróvár, 2015. augusztus 17.

Ördög Vince