

## A $\text{Cu}^{2+}$ és $\text{Zn}^{2+}$ ionok hatása néhány szimbiotikus és asszociatív $\text{N}_2$ -kötő baktérium szaporodására laboratóriumi körülmények között

<sup>1</sup>BÍRÓ BORBÁLA, <sup>2</sup>BAYOUMI E. A. F. HOSAM, <sup>3</sup>BALÁZSY SÁNDOR, <sup>2</sup>TÍMÁRI SÁNDOR  
és <sup>2</sup>KECSKÉS MIHÁLY

<sup>1</sup> MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest; <sup>2</sup> Agrártudományi Egyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Gödöllő, és <sup>3</sup> Bessenyei György Tanárképző Főiskola, Nyíregyháza

A nehézfém tartalmú szennyvíziszapok mezőgazdasági területekre való kihelyezése, valamint egyéb környezetszennyeződések (pl. közlekedés) miatt napjainkban egyre inkább számolni kell a talajéletre kifejtett speciális káros hatások általánossá válásával.

A különféle növényvédő szerek, antibiotikumok, műtrágyák, detergensok és kémiai vivőanyagok rhizobiumok és pszeudomonaszok esetében észlelt szaporodás-gátlását illetően számos irodalmi hivatkozás ismert (BAYOUMI et al., 1988a,b; BAYOUMI & KECSKÉS, 1991; BÍRÓ et al., 1983; BÍRÓ & KECSKÉS, 1984; BÍRÓ, 1988). Több vizsgálati adat található a nehézfémek hasznos talajmikroszervezetekre gyakorolt kedvezőtlen hatásáról is (CHAUDRI et al., 1992; MARTENSSON, 1992; MCGRATH et al., 1988; REDDY et al., 1983; SMITH et al., 1990).

A  $\text{N}_2$ -kötésnek, mint az egyik legfontosabb mikrobiológiai kulcsfolyamatnak a nehézfémekkel szembeni érzékenységét COPPOLA és szerzőtársai (1988) említik, a szimbiota rhizobiumokra való kedvezőtlen változásokról pedig EL-AZIZ és szerzőtársai (1991) számolnak be. GILLER és szerzőtársai (1989) megemlézték ugyan, hogy a szimbiotikus kapcsolatban levő rhizobiumok védve vannak a gyökérgümőben a talaj fémszennyezettségétől, de a natív mikroba-populáció és/vagy a gazdanövény annál inkább érintett. A vizsgálatok során azt is kimutatták, hogy a gyorsan szaporodó rhizobiumok a nehézfémekkel szemben érzékenyebbeknek bizonyultak, mint a lassú szaporodású bradyrhizobiumok fajrepresentánsai (COWLES et al., 1969).

Tekintve, hogy a  $\text{N}_2$ -kötő mikrobák tevékenysége nagyban hozzájárul a talajtermékenység javulásához, ezért pontos és extrapolálható vizsgálati módszerek szükségesek a gátló tényezők megállapításához (SKUIJINS et al., 1986). Mindezeket figyelembe véve összehasonlító vizsgálatokat végeztünk gyöké-

gümmő baktériumok és néhány fontos rizoszféra-rizoplán baktérium mikroelemekkel, elsősorban a kommunális szennyvíziszapban leggyakrabban előforduló  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionokkal, szembeni érzékenységére vonatkozóan az OTKA 2537/1991. számú pályázata keretében.

### Anyag és módszer

Babról, lóheréről és lóbabról származó *Rhizobium*, nyírségi fehérvirágú csilagfütről izolált *Bradyrhizobium*, búza, kukorica és *Digitaria decumbens* rizoszférájából nyert hazai izolálású és törzsgyűjteményből származó  $\text{N}_2$ -kötő *Azospirillum*, és néhány biológiai  $\text{N}_2$ -kötésre nem képes *Pseudomonas* törzs nehézfém-tűrő képességét vizsgáltuk laboratóriumi körülmények között (1. táblázat).

A mérések 25, 50, 100, 200 és 400  $\mu\text{M}$  koncentrációban  $\text{CuSO}_4$  és  $\text{ZnSO}_4$  vegyületeket tartalmazó folyékony, élesztőkivonat-mannit (YEM) (VINCENT, 1981), illetve nitrogénmentes almasav (Nfb) (DÖBEREINER & DAY, 1975), táptalajban - a szervesen alkotórészek elhagyásával - történtek. Az említett divalens kationok sóit, valamint az enélküli 5  $\text{cm}^3$  tápfolyadékot 0,1  $\text{cm}^3$ , megközelítőleg  $10^8/\text{cm}^3$  baktériumot tartalmazó szuszpenzióval oltottuk és 48 órás 28 °C-os mikrofermentoros rázatással tenyésztettük.

#### 1. táblázat

#### A nehézfém-tűrési vizsgálatokban tesztelt baktérium törzsek és eredetük

(1) Baktérium neve	(2) Lab. jelzés	(3) Gazdanövény
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	HB-3841	<i>Vicia faba</i>
	Lóbab Z	<i>Vicia faba</i>
	Bükköny 75/4	<i>Vicia faba</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ( <i>Lupinus</i> )	Br 8	<i>Lupinus albus</i>
	Br 14	<i>Lupinus albus</i>
	Br 31	<i>Lupinus albus</i>
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp 7 (ATCC 29145)	<i>Digitaria decumbens</i>
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Sp 59 (ATCC 29707)	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Azospirillum</i> sp.	Km 5	<i>Zea mays</i>
	Be 7	<i>Triticum aestivum</i>
	Km 8	<i>Zea mays</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ke 1	<i>Zea mays</i>

Inkubálás után az 560 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (DR-2000 típusú) kapott extinkciós értékeket a kontroll %-ában adtuk meg. Az adatokat variancia-analízissel elemeztük (SVÁB, 1981).

### Vizsgálati eredmények

A 2. táblázat alapján bemutatjuk a  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$ - tartalmú vegyületek hatását a vizsgált baktérium törzsekre.

A gyors szaporodású rhizobiumok közül a "Lóbab Z" jelű *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* törzs bizonyult a legellenállóbbnak, mert az alkalmazott

2. táblázat  
A  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionok hatása rizoszférából izolált baktériumok szaporodására  
(a kontroll %-ában)

(1) Baktérium törzsek	$\text{CuSO}_4$	$\text{ZnSO}_4$
<i>Rhizobium</i>		
HB-3841	40,6	42,2
Lóbab Z	41,9	83,7
Bükköny 74/4	22,3	58,9
a) Átlag	33,0	60,5
<i>Bradyrhizobium</i>		
Br 8	59,2	66,4
Br 14	70,3	72,2
Br 31	74,1	74,4
a) Átlag	67,8	71,2
<i>Azospirillum</i>		
Sp 7	64,2	38,1
Sp 59	51,6	33,4
Km 5	63,7	50,8
Be 7	55,3	36,5
a) Átlag	58,7	39,7
<i>Pseudomonas</i>		
Km 8	79,5	49,2
Ke 1	69,5	47,3
a) Átlag	74,5	48,2

$\text{SzD}_{5\%} = 13,6$

nehézfémek különböző koncentrációinak összesített hatását illetően nem volt szignifikáns szaporodásgátlás.

A  $\text{CuSO}_4$ -tartalmú táptalajok toxikusabbnak bizonyultak a *R. leguminosarum* bv. *viceae* esetében.

A lassú szaporodású *Bradyrhizobium* törzseket a fehérvirágú csillagfürt (*Lupinus albus* L.) gyökérgümőiből izoláltuk, nyírségi gyengén savanyú homoktalajból, és a gümőkötőképesség, valamint egyéb tulajdonságok ellenőrzése után - mint oltóanyag készítésére alkalmas törzseket - szelektáltuk.

A bradyrhizobiumok esetében megállapítottuk, hogy ellentétben a gyors szaporodású rhizobiumokkal, nincs különbség a  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionoknak a szaporodásukra gyakorolt hatásait illetően. A biotikus és abiotikus tényezőkkel szembeni tűrőképesség alapján oltóanyaggyártásra kiválasztott szimbionta  $\text{N}_2$ -kötő baktérium törzsek közül a *Bradyrhizobium* törzsek egyöntetűbben viselkedtek, mint a *Rhizobium* törzsek.

A fűfélék és az egyszikű mezőgazdasági növények rizoplánjában és gyökérszövegeiben (hisztoszférájában) élő *Azospirillum* törzsekre is jelentős gátló hatást fejtettek ki a  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionok szulfát ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) vegyületei. A gátlóhatás mértéke hasonlóképpen alakult, mint a *Rhizobium* baktériumoknál, de ez esetben a  $\text{Zn}^{2+}$  ionok bizonyultak szignifikánsan toxikusabbnak. A két *Azospirillum* faj, az *A. lipoferum* és az *A. brasilense* autentikus reprezentánsai (Sp 7, Sp 59), valamint a hazai izolátumok (Km 5, Be 7) között statisztikailag igazolható különbség összesített hatásban nem adódott. A koncentrációk hatását külön-külön figyelembe véve azonban a Km 5 jelű kukoricáról izolált hazai törzs a  $\text{Zn}^{2+}$ -ionnal szemben szignifikánsan erősebb toleranciával rendelkezett.

Az azospirillumokhoz hasonlóan viselkedő és azonos módszerekkel izolálható, de ugyanakkor biológiai  $\text{N}_2$ -kötésre nem képes, *Pseudomonas* fajokhoz tartozó törzsek viszont kevésbé voltak érzékenyek a tanulmányozott nehézfémekkel szemben, bár a  $\text{Zn}^{2+}$  ionok ez esetben is erősebb gátlást okoztak.

A 3. táblázatból a  $\text{Zn}^{2+}$  ionok depresszív hatása szintén kitűnik a különböző vizsgált koncentrációk függvényében is. Megállapítható, hogy amíg a  $\text{CuSO}_4$

### 3. táblázat

A  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  nehézfémek koncentrációinak hatása *Azospirillum* törzsek szaporodására (a kontroll %-ában)

(1) Nehézfém	(2) Koncentrációk ( $\mu\text{M}$ )				
	25	50	100	200	400
$\text{Cu}^{2+}$	97,6	91,2	84,9	37,6	8,9
$\text{Zn}^{2+}$	73,6	61,8	30,4	17,2	9,9

$\text{SzD}_{5\%} = 13,6$

100  $\mu\text{M}$  határértékgig nem okozott szignifikáns szaporodás-csökkenést, addig a  $\text{ZnSO}_4$  már 25  $\mu\text{M}$  értéknél jelentős sejtszámcsökkentő hatást gyakorolt a búza és kukorica rizoplánjából izolált *Azospirillum* baktériumokra.

### Az eredmények megvitatása

A különböző talajökológiai feltételek hatással lehetnek a talaj- és rizoszféramikróbák szaporodására, így a nehézfém-tartalmú szennyvíziszapok egyre erőteljesebb felhasználásának talajéletre kifejtett káros hatásával is mindinkább számolnunk kell. CHAUDRI és szerzőtársai (1992), valamint SMITH és GILLER (1992) a kommunális szennyvíziszap átlagos évi, nehézfémekhez tartozó kationtartalmát illetően a következő csökkenő sorrendet állapították meg: Zn, Cu, Pb, Cr, Ni és Cd. Ilyen megfontolásból elsősorban a  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Cu}^{2+}$  ionok hatását ellenőriztük a különféle mikrobák szaporodására.

MARTENSSON (1992) szerint a  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionok hatásmódja erősen függ az alkalmazott vizsgálati módszertől is, így például az agaros táptalaj erősen adszorbeálhatja azokat és kiegyenlíti, tompítja hatásukat. Megállapítását figyelembe véve és kivitelezhetősége miatt a folyékony, mikrofermentoros módszert alkalmaztuk.

Bár a laboratóriumi eredmények szabadföldi viszonyokra való extrapolálásával óvatosan kell eljárunk, mégis szükséges ismereteket gyűjteni a határkoncentrációkat illetően, és reális szükséglet a gyakorlatban oltásra felhasználható toleráns törzsek felkutatása, "előállítás" is. GILLER és szerzőtársai (1989) megemlítették ugyanis, hogy két hónappal a tőzeges talajoltás után nem találtak túlélő *R. leguminosarum* *bv. trifolii* törzset a talajban, mivel az oltóanyag-gyártásra felhasznált törzseket előzetesen nem szelektálták laboratóriumi körülmények között nehézfém-tűrő képesség alapján. Az oltás pedig iparilag erősen szennyezett technogén területen történt. SKUIJNS és szerzőtársai (1986) is a rhizobiumok nagyfokú nehézfémekkel szembeni érzékenységéről tájékoztatnak. COWLES és szerzőtársai (1969) ugyanakkor a gyors szaporodású rhizobiumok erősebb tűrőképességéről adnak hírt, a lassú szaporodású bradyrhizobiumokhoz képest, de a vizsgálati eredményeinkből erre nem következtethetünk.

Összegzésképpen megállapíthatjuk, hogy bár káros hatásokat észleltünk, a megfelelő szelekciós technikák alkalmazásával ellenállóbb törzsekhez is juthatunk. A biotikus és abiotikus tényezők hatásának ellenőrzése és kevésbé érzékeny, oltóanyaggyártásra is alkalmas törzsek keresése mind ökológiai mind gazdaságossági szempontból is, rendkívül fontos.

## Összefoglalás

Szerzők néhány potenciálisan növényoltásra felhasználható, biológiai N<sub>2</sub>-kötésre képes baktérium nehézfém-tűrő képességét tanulmányozták laboratóriumi körülmények között. A Cu<sup>2+</sup> és a Zn<sup>2+</sup> ionok hatását ellenőrizték szimbiotikus, és asszociatív N<sub>2</sub>-kötő baktériumok (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Azospirillum*), valamint a rizoszférából izolált, két nitrogénkötésre nem képes, fluoreszcens típusú *Pseudomonas* törzs szaporodására.

A mérések 48 órás, mikrofermentoros, 25, 50, 100, 200 és 400 µM koncentrációjú Cu<sup>2+</sup> és Zn<sup>2+</sup> ionokat tartalmazó, folyékony, nitrogénmentes almasav (Nfb), illetve élesztőkivonat-mannit (YEM) táptalajban való tenyésztés után spektrofotométerrel (DR-2000 típusú) történtek. A kapott extinkciós értékeket a kontroll %-ában adták meg.

Megállapították, hogy a vizsgálatba vont Cu<sup>2+</sup> és a Zn<sup>2+</sup> ionok valamennyi baktérium törzs szaporodását gátolták.

A rhizobiumok szaporodására a Cu<sup>2+</sup>, az asszociatív baktériumok esetében pedig a Zn<sup>2+</sup> ion volt erősebben gátló hatású a vizsgált koncentrációkban. A csillagfürt gyökérgümőjéből izolált *Bradyrhizobium* törzsek szaporodása között nem volt kimutatható jelentős különbség a nehézfémre vonatkoztatva (32-, ill. 29 %-os sejtszámcsökkenés). Az eredményekből levont következtetések ismételtén a törzsszelekció fontosságára hívják fel a figyelmet.

## Irodalom

- BAYOUMI, H. E. A. F. & KECSKÉS, M. (1991): Xenobiotic effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* with *Vicia faba*. Proc. Int. 10th "Humus et Planta". 92. Prague, Czechoslovakia.
- BAYOUMI, H. E. A. F., NAGY, T. & KECSKÉS, M., 1988a. Antibiotic sensitivity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains. Acta Microbiol. Hung. 35. 158.
- BAYOUMI, H. E. A. F., TIMÁRI, S. & KECSKÉS, M., 1988b. Side-effect of different pesticides on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains. Acta Microbiol. Hung. 35. 161.
- BÍRÓ, B. (1988): Coronilla Rhizobiumok és *Pseudomonas* rizobaktériumok közötti kölcsönhatások. Kandidátusi értekezés és tézisei. Agrártud. Egyetem. Gödöllő.
- BÍRÓ, B. et al., 1983. Coronilla Rhizobium-törzsek fungicidérzékenysége. Agrokémia és Talajtan. 32. 592-597.
- BÍRÓ, B. & KECSKÉS, M., 1984. Herbicide sensitivity of Coronilla Rhizobium and *Pseudomonas* rhizobacterium strains. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 31. 302-303.
- CHAUDRI, A., MCGRATH, S. P. & GILLER, K. E., 1992. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from soil contaminated by past applications of sewage sludge. Soil Biol. Biochem. 24. 83-88.

- COPPOLA, S. et al., 1988. Effect of cadmium-bearing sewage sludge on crop plants and microorganisms in two different soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* **20**. 181-194.
- COWLES, J. R., EVANS, H. J. & RUSSELL, S. A., 1969. B<sub>12</sub> coenzyme dependent ribonucleotide reductase in *Rhizobium* species and the effect of cobalt deficiency on the activity of the enzyme. *J. Bacteriol.* **97**. 1460-1465.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J. M., 1975. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. *Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen Fixation. Vol. 2.* 518-538. Pull., Washington.
- EL-AZIZ, R., ANGLE, J. S. & CHANEY, R. L., 1991. Metal tolerance of *Rhizobium meliloti* isolated from heavy metal contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* **23**. 795-798.
- GILLER, K. E., MCGRATH, S. P. & HIRSCH, P. R., 1989. Absence of nitrogen fixation in clover growth on soil subject to long term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* **21**. 841-848.
- MARTENSSON, A. M., 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 435-445.
- MCGRATH, S. P., BROOKES, P. C. & GILLER, K. E., 1988. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biol. Biochem.* **20**. 415-424.
- REDDY, G. B., CHENG, C. N. & DUNN, S. J., 1983. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. *Soil Biol. Biochem.* **15**. 343-345.
- SKUIJINS, J., NAHRSTEDT, H. O. & OCTEN, S., 1986. Development of a sensitive biological method for the determination of low level toxic contamination in soils. *Swed. J. Agric. Sci.* **16**. 113-118.
- SMITH, S. R. & GILLER, K. E., 1992. Effective *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term applications of sewage sludge or metal mine spoil. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 781-788.
- SMITH, S. R. et al., 1990. Symbiotic N<sub>2</sub>-fixation and microbial activity in soils contaminated with heavy metals resulting from long term soil sewage-sludge application. *Water Res. Cent. Res. Rep. FR 0128. Medmenham, Marlow.*
- SVÁB J., 1981. *Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
- VINCENT, J. M., 1981. The Prokaryotes. In: *A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria.* (Eds.: M. P. Syars, M P. et al.) 818-841. Springer-Verlag, Berlin.

*Érkezett: 1993. augusztus 28.*

## In Vitro Effect of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Ions on the Growth of Some Symbiotic and Associative N<sub>2</sub>-Fixing Bacteria

<sup>1</sup>B. BÍRÓ, <sup>2</sup>H. E. A. F. BAYOUMI, <sup>3</sup>S. BALÁZSY <sup>2</sup>S. TÍMÁRI and <sup>2</sup>M. KECSKÉS

<sup>1</sup> Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, <sup>2</sup> Department of Microbiology, University of Agricultural Sciences, Gödöllő, and <sup>3</sup> Bessenyei György Teacher's Training College, Nyíregyháza

### Summary

*In vitro* experiments were carried out to establish the heavy metal sensitivity of different bacteria being as potential inocula-components for certain agricultural plants. Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions in the sulphate forms proved to be the most harmful for the growth of *Rhizobium leguminosarum* strains. The effect of 25, 50, 100, 200 and 400 µM CuSO<sub>4</sub> and ZnSO<sub>4</sub> salts was tested in yeast extract mannitol (YEM) liquid or nitrogen-free maleic (Nfb). 5 cm<sup>3</sup> media was inoculated with 100 µl of bacterial suspension (approximately 10<sup>8</sup> CFU/cm<sup>3</sup>). The growth extinction of the strains was measured after 48 hours of incubation using the microfermentor technique at 560 nm (Spectrophotometer DR-2000 type). Data are shown as a percentage of the control and LSD<sub>5%</sub> is also calculated. The growth potential of a number of nitrogen-fixing *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and scavenger fluorescent-type *Pseudomonas* strains was tested.

*In Bradyrhizobium* strains isolated from the root-nodules of white lupin, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions had deleterious effects of the same order (the cell number decreased by 32 and 29%, respectively). On the other hand, Cu<sup>2+</sup> was more harmful to *Rhizobium leguminosarum* than Zn<sup>2+</sup>, whereas the opposite was found in the case of associative N<sub>2</sub>-fixing and scavenger bacteria. It is important that the tolerance of the strains to harmful and polluted soil metal should be measured before using the strains for plant inoculation.

*Table 1.* Names of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial strains. (1) Species name of tested bacteria. (2) Laboratory codes. (3) Host plant.

*Table 2.* Effect of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on the growth of some rhizosphere bacteria (1) Bacterial strains. a) Mean. LSD<sub>5%</sub> = 13.6

*Table 3.* Effect of different Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> concentrations on the growth of *Azospirillum* strains, as a percentage of the control. (1) Heavy metal, (2) Concentrations (µM). LSD<sub>5%</sub> = 13.6