

### Különböző fajokhoz tartozó *Trichoderma* törzsek kadmium-érzékenysége

<sup>1</sup> NAÁR ZOLTÁN, <sup>2</sup> VÁRADY GYÖRGY, <sup>2</sup> KISS ZITA, <sup>2</sup> KUCSMA NÓRA  
és <sup>2</sup>KECSKÉS MIHÁLY

<sup>1</sup> Eszterházy Károly Tanárképző Főiskola, Növénytani Tanszék, Eger és  
<sup>2</sup> Agrártudományi Egyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Gödöllő

A kadmium viszonylag ritka fém, de az utóbbi két évtizedben lokálisan megnőtt a koncentrációja az emberi tevékenység (cinkérc feldolgozása, fosszilis energiahordozók elégetése, műtrágyák és szennyvíziszapok talajba való juttatása, a kadmium felhasználása szárazelemekhez stb.) következtében. E környezet-szennyezés veszélyességét ma már számos publikáció bizonyítja, amelyekről jó összefoglalást ad a HUTCHINSON & MEEMA (1987) által szerkesztett könyv. Magyarországon korábban végzett vizsgálatok során SZABÓ & HORVÁTH (1983) - elsősorban bakteriológiai adatok alapján - gyengén humuszos homoktalajban 25 mg/kg kadmiumot tartanak talajhigiénés szempontból megengedhető maximális koncentrációnak. Vizsgálataik szerint a talajbaktériumok egyes csoportjai eltérő mértékben érzékenyek: a sugárgombák, ammonifikálók, denitrifikálók és nitrifikálók közül az utóbbi bizonyult legérzékenyebbnek a talajban lévő kadmiummal szemben. Hasonló különbség minden bizonnyal fonalas gombák között is megfigyelhető, azonban róluk még kevesebb adat áll rendelkezésre.

A trichodermák világszerte - így Magyarországon is - elterjedt fajai, fontos tagjai a talajok mikroflórájának (PAPAVIZAS, 1985; VAJNA, 1987), és gyakorta tesztelik őket a toxikológiai vizsgálatok során. Kadmiummal szemben való érzékenységükről igen keveset tudunk. Nagy dózisu kadmiumnak (10 mM) egy *Trichoderma viride* izolátumra gyakorolt hatását tanulmányozva megállapították, hogy a gomba ugyan képes ezt elviselni, de jelentős degeneratív morfológiai és élettani változásokat szenved, amelyek genetikailag is rögzülnek (FRANK & TÁMOVÁ, 1993; FRANK et al., 1994). Ez a koncentráció azonban többszörösen meghaladja a mezőgazdasági talajokban előforduló értékeket (PAGE et al., 1987).

Míndezeket figyelembe véve célul tűztük ki különböző biotópokból származó és eltérő fajokhoz tartozó *Trichoderma* izolátumok in vitro kadmium-érzékenységének vizsgálatát.

## Anyag és módszer

### *Trichoderma* izolátumok

A vizsgálatok során 15 izolátumot teszteltünk. Ezek egy része korábban, 1989-1990. között gyűjtött, különböző bomló szerves anyagot tartalmazó mintákból származik: a *T. viride* TK12-t trágyából, TK14-et talajból, a TK28-at komposztból; a *T. harzianum* TK25-öt avarból; *T. longibrachiatum* TK41-et talajból; *T. koningii* TK50-et szintén talajból izoláltuk (NAÁR, 1992). A másik 9 izolátumot az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete Nagyhorcsöki Kísérleti Telepén nagy dózisú (810 kg fémion/ha) nehézfémekkel (cinkkel:  $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ , kadmiummal:  $CdSO_4 \cdot 7H_2O$  és rézzel:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) 1991-ben beállított tartamkísérletből származó talajokból tenyésztettük ki szélesztéses módszerrel. Azonosításukhoz RIFAI (1969) és BISSETT (1984) határozókulcsát használtuk fel. E szerint a kilenc közül nyolc (Cd1, Cd2, Cd3, Cu1, Cu2, Zn1, KA1, KA2) a *T. harzianum* fajhoz, a Cu3 jelű pedig a *T. koningii* fajhoz tartozónak bizonyult. Az izolátumok jelzése a nehézfémkezelésre utal; a nem szennyezett talajból származó izolátumokat KA jellel jelöltük. Az izolátumokat 2 %-os malátakivonat agaron tartottuk fenn, a vizsgálatokhoz pedig 1 %-os zabliszt agaron szaporítottuk fel őket.

### *A kadmium hatása a vegetatív fejlődésre*

A kadmiumot  $CdSO_4 \cdot 7H_2O$  formájában Czapek-Dox agarba kevertük úgy, hogy a táptalajban 0,2-1-5-25-125 mg  $Cd^{2+}/l$  koncentráció legyen. A Petri-csészékbe kiöntött kadmiumos tápagarlemezeket a *Trichoderma* izolátumok zabliszt agaron növekvő telepeinek széléről dugófúróval kivágott micéliumos agar korongokkal oltottuk be. Egy-egy korongot helyeztünk minden Petri-csésze közepére. Kontrollként kadmium nélküli Czapek-Dox agart alkalmaztunk. A tenyészeteket két napig, sötétben, 25 °C-on inkubáltuk. Ezután megmértük a kifejlesztett telepek átmérőjét, amelyekből kivontuk a korong átmérőjét. Ezt követően további egy héten át figyeltük a telepek morfológiájának alakulását, azaz jelentkezik-e jól látható eltérés a kontrolltól, vagyis kialakul-e olyan mutáció, mint FRANK & TÁMOVÁ (1993) kísérleteiben.

### *A kadmium hatása a konídiumok csírázására*

E vizsgálatnál a fenti táptalajt és kadmium-koncentrációt alkalmaztuk azzal a különbséggel, hogy elhagytuk a legkisebbet, amely egy esetben sem gyakorolt szignifikáns gátlást a trichodermák fejlődésére, és egy nagy, 250 mg  $Cd^{2+}/l$ -es koncentrációt is beállítottunk. A kadmiumos tápagarból 10 mm átmérőjű korongokat vágunk ki dugófúróval, és azokat Petri-csészékbe helyeztük át. Ezt

követően izolátumonként és kadmiumkezelésenként 3-3 korong felszínére 0,05 ml konídiumszuszpenziót cseppentettünk. A szuszpenziót kémcsőtenyészetek steril desztillált vizes lemosásával készítettük, és  $10^5$  konídium/ml sűrűségűre hígítottuk. Huszonnégy órán át inkubáltuk a beoltott korongokat  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -os termosztátban, sötétben. Ezután laktofenolos tripánkéssel festettük meg a konídiumokat, és mikroszkóp alatt 640-szeres nagyításon meghatároztuk a csírázási százalékot.

### Eredmények és következtetések

#### *A kadmium hatása a vegetatív fejlődésre*

A kadmium egyetlen alkalmazott adagja sem gátolta teljesen a trichodermák növekedését. az izolátumok egy részénél a nehézfém legnagyobb, 125 mg/l-es koncentrációja mellett is a kontroll 50 %-át meghaladó méretű telep fejlődött ki. Ide tartozott minden nehézfémmel kezelt talajból származó izolátum, illetve a korábban izoláltak közül a TK25 jelű *T. harzianum*, valamint a TK12 és a TK14 jelű *T. viride* izolátumok. A legtoleránsabbnak a Cd2 jelű *T. harzianum* bizonyult, amelynek a fejlődését még a legnagyobb Cd<sup>2+</sup>-koncentráció sem gátolta, sőt a legkisebb Cd<sup>2+</sup>-dózisok (0,2 és 1 mg/l) szignifikánsan serkentették

#### *1. táblázat*

#### Kadmium hatása a Trichoderma izolátumok vegetatív fejlődésére

Izo- látum	Faj	Kadmium-koncentráció, mg/l					
		0	0,2	1	5	25	125
Cd1	<i>T. harzianum</i>	16,7	16,3	17,7	17,0	14,7	11,7
Cd2	<i>T. harzianum</i>	16,3	17,7	20,7	18,0	19,3	18,0
Cd3	<i>T. harzianum</i>	23,3	25,0	20,7	20,3	23,7	18,0
Cu1	<i>T. harzianum</i>	21,7	22,3	24,3	24,3	23,0	14,7
Cu2	<i>T. harzianum</i>	18,0	18,3	16,7	16,3	17,0	14,3
Cu3	<i>T. koningii</i>	9,0	8,3	7,7	7,3	8,7	4,7
Zn1	<i>T. harzianum</i>	18,3	19,0	18,0	18,7	19,0	14,7
KA1	<i>T. harzianum</i>	19,7	20,0	20,7	19,7	14,3	3,7
KA2	<i>T. harzianum</i>	14,3	20,0	15,0	12,7	12,7	6,0
TK12	<i>T. viride</i>	24,0	21,3	21,7	28,0	25,0	15,3
TK14	<i>T. viride</i>	11,3	11,0	10,0	11,0	12,0	7,7
TK25	<i>T. harzianum</i>	26,0	22,3	16,3	18,7	18,7	19,0
TK28	<i>T. viride</i>	12,3	11,7	10,7	14,7	12,0	3,7
TK41	<i>T. longi- brachiatum</i>	32,0	30,0	30,3	31,0	23,7	5,7
TK50	<i>T. konigii</i>	11,3	11,7	10,7	14,0	5,7	0,3

A táblázat adatai 2 napos inkubáció után mért telepméreteket mutatják mm-ben.

SzD<sub>5%</sub> = 1,85 mm.

azt. Hasonló reakciót figyeltek meg FRANK és munkatársai (1993) 0,1 M Cd<sup>2+</sup>-koncentráció hatására egy *T. viride* izolátumnál. HIROKI (1994) azt tapasztalta, hogy az emberi tevékenység (főként ipari kibocsátás) hatására fokozatosan bekövetkező kadmiumszennyezést a fonalas gombák számottevően jobban tűrték, mint a baktériumok (1. táblázat).

A tesztelt tizenöt izolátum közül ötnek a növekedését gátolta 50 %-nál nagyobb mértékben a 125 mg/l-es koncentráció. A nehézfémkezelések kontroll-talajából származó két izolátum is ide tartozott, ami arra utal, hogy a kezelt talajokból származó izolátumok nagyobb toleranciája a mesterségesen kijuttatott nehézfém hatására alakulhatott ki. Bár ennek ellentmondani látszik, hogy az eltérő nehézfémterheléstől függetlenül, hasonlóan alakult az izolátumok érzékenysége. A tolerancia minden esetre genetikailag stabil tulajdonság volt, mivel legalább háromszor szaporítottuk fel az izolátumokat nehézfémmentes táptalajon az izolálás és a vizsgálat között. Az azonosítás során nem tapasztaltunk a FRANK & TÁMOVÁ (1993) által megfigyelt, az általunk alkalmazottnál jóval nagyobb dózis hatására bekövetkező degeneratív morfológiai változásokat.

Az izolátumok érzékenységének összehasonlítása céljából elkészítettük korrelációs mátrixukat (ezt mérete miatt nem közölhetjük). Két toleráns izolátum (Cd2 és TK25 jelű *T. harzianum*) kivételével a többi általában szignifikáns korrelációt mutatott. Ez arra utal, hogy a nehézfémrel szennyezett talajból származó izolátumok kadmium-reakciója alapvetően nem különbözik a korábban, kadmiummal nem szennyezett habitátból izoláltakétól.

#### *A kadmium hatása a konídiumok csírázására*

Egyik kadmium-koncentráció sem gátolta teljesen a konídiumok csírázását. A különböző adagok hatása izolátumonként változott (2. táblázat). E szempontból alapvetően kétféle reakciót figyeltünk meg. Négy izolátum (a Cu3 és TK50 jelű *T. koningii*, valamint a TK14 és a TK28 jelű *T. viride*) ugyanolyan kis csírázási százalékot mutatott minden egyes kadmiumdózisnál, vagyis a koncentráció növekedése szemmel láthatóan nem befolyásolta a csírázásukat, noha a kontroll táptalajon 100 %-os csírázást tapasztaltunk. A többi izolátum konídiumainak csírázása meglepő módon pozitív korrelációt mutatott a nehézfém mennyiségével. Kis dózisban erősen gátló hatású (23-93 %) volt a kadmium, majd a koncentráció növekedésével ez a gátlás fokozatosan csökkent. Olyannyira, hogy a legnagyobb, 250 mg/l-es koncentráció tizenöt izolátum közül nyolcnál már nem gátolta szignifikánsan a csírázást. A kifejlődő csíratömlők azonban a vegetatív növekedés érzékenységének megfelelően egyre rövidebbek voltak a dózis emelkedésével. Ez azt bizonyítja, hogy a csírázás élettani folyamatai - és így a kadmiumra való érzékenység is - jelentősen eltérnek a micélium folyamatos növekedésétől. Jelenleg nem tudjuk magyarázatát adni az izolátumok kadmiummal szembeni ilyen jelentős mértékben eltérő reakciójának.

2. táblázat  
Kadmium hatása a *Trichoderma* izolátumok konídiumainak csírázására

Izo- látum	Faj	Kadmium-koncentráció, mg/l				
		1	5	25	125	250
Cd1	<i>T. harzianum</i>	27,0	14,5	52,5	89,0	97,5
Cd2	<i>T. harzianum</i>	63,0	39,5	85,5	96,5	97,0
Cd3	<i>T. harzianum</i>	69,5	58,0	89,0	98,0	98,0
Cu1	<i>T. harzianum</i>	77,0	77,5	78,5	91,0	97,5
Cu2	<i>T. harzianum</i>	29,0	7,5	34,5	47,0	67,0
Cu3	<i>T. konigii</i>	16,5	17,0	16,5	19,5	14,5
Zn1	<i>T. harzianum</i>	7,0	7,0	19,5	67,0	76,5
KA1	<i>T. harzianum</i>	50,0	51,0	72,5	84,5	90,5
KA2	<i>T. harzianum</i>	14,5	16,0	31,0	71,5	92,5
TK12	<i>T. viride</i>	10,1	10,0	29,0	83,0	91,0
TK14	<i>T. viride</i>	7,0	40,	40,	3,0	2,5
TK25	<i>T. harzianum</i>	18,5	32,0	58,0	64,5	74,0
TK28	<i>T. viride</i>	13,0	12,0	5,0	11,5	14,0
TK41	<i>T. longi- brachiatum</i>	39,5	73,5	91,0	90,5	95,5
TK50	<i>T. konigii</i>	8,0	7,0	9,5	11,5	6,5

A táblázat adatai 24 órás inkubáció után meghatározott csírázási százalékot mutatják. A kontrollkezelésben 100 %-os volt a csírázás.  $SzD_{5\%} = 10,2 \%$ .

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a trichodermák kadmiummal szembeni érzékenysége izolátumonként jelentősen eltérő lehet a talajokban előforduló koncentrációtartományban. A nagy mennyiségű (810 kg/ha) nehézfémmel kezelt talajokból is izolálhatók trichodermák, tehát képesek alkalmazkodni az ott jelenlévő nagy nehézfém-koncentrációhoz. Morfológiájuk sem tér el a normálistól. Ennek ellenére szükségesnek tartjuk a továbbiakban azt tanulmányozni, hogy milyen koncentráció hatására, mennyi idő alatt és milyen tulajdonságaikban változva alkalmazkodnak a trichodermák a talajba kerülő kadmiumhoz. Vizsgálataink szerint a korábbi (SZABÓ & HORVÁTH, 1993), elsősorban bakteriológiai szempontok alapján gyengén humuszos homoktalajban elfogadható maximumnak megállapított 25 mg Cd<sup>2+</sup>/kg szennyeződés a trichodermák esetében is megfelelő határértéknek tűnik.

### Irodalom

- BISSETT, J., 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany. 62. 924-933.
- FRANK, V. & TÁMOVÁ, G., 1993. Mutagenic effect of cadmium on *Trichoderma viride*. Acta Microbiologica Hungarica. 40. 65-69.

- FRANK, V., TÁMOVÁ, G. & FARKAS, V., 1994. Characterization of a white mutant of *Trichoderma viride* obtained by cadmium treatment. *Microbiological Research*. **149**. 61-64.
- FRANK, V., TÁMOVÁ, G. & TAKÁCSOVÁ, L., 1993. Effects of cadmium and mercury on growth and differentiation of *Trichoderma viride*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. **148**. 229-232.
- HIROKI, M., 1994. Populations of Cd-tolerant microorganisms in soils polluted with heavy metals. *Soil Science And Plant Nutrition*. **40**. 515-524.
- HUTCHINSON, T. C. & MEEMA, K. M. (Eds.), 1987. Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment. *Scope 31*. John Wiley and Son, Ltd. Chichester, U. K.
- NAÁR Z., 1992. *Trichoderma* törzsek mikrobiális ökofiziológiai szelekciója. Egyetemi doktori disszertáció. Gödöllő.
- PAGE, A. L., CHANG, A. C. & EL-AMAMY, M., 1987. Cadmium levels in soils and crops in the United States. In: Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment. *Scope 31*. (Eds.: HUTCHINSON, T. C. & MEEMA, K. M.). 119-146. John Wiley and Sons Ltd. Chichester, U. K.
- PAPAVIZAS, G. C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. **23**. 23-54.
- RIFAI, M. A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. Commonwealth Mycol. Inst. Kew. Surrey, England. **116**. 1-56.
- SZABÓ Z. & HORVÁTH A., 1983. A kadmium talajhigiénés normamegállapítására vonatkozó mikrobiológiai vizsgálatok. *Agrokémia és Talajtan*. **32**. 507-510.
- VAJNA L., 1987. Növénypatogén gombák. *Mezőgazd. Kiadó*. Budapest.