

## Rhizobaktérium törzsek szaporodásának és vasmegkötő képességének nehézfém-érzékenysége

<sup>1</sup>VÁRADY GYÖRGY, <sup>1,2</sup>BIRÓ BORBÁLA, <sup>1</sup>KUCSMA NÓRA,  
<sup>3</sup>BAYOUMI, H. E. A. F. és <sup>1,3</sup>KECSKÉS MIHÁLY

<sup>1</sup>Szent István Egyetem „Mezőgazdasági-, Környezeti mikrobiológia és Talajbiotechnológia” doktori program, Gödöllő, <sup>2</sup>MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézete, Budapest és <sup>3</sup>Környezetvédelmi Mikrobiológiai Tanszéki Kutatócsoport, Budapest

A növény–talaj rendszerekben élő, növénynövekedést serkentő (PGPR–plant growth promoting), rhizobaktériumok kedvező hatást fejthetnek ki a magasabb rendű növények növekedésére. Az általuk termelt szideroforok olyan vaskelátképző anyagok, amelyekkel a mikrobák kompetíciós előnyökhöz juthatnak más mikrobákkal szemben a tápanyagokért folytatott küzdelemben. Az így kialakult előny eredményeképpen a gyökérrendszer aktívabb kolonizációjával, a nagyobb tömeg miatt jelentős hormonszerű (PGR–plant growth regulating) anyagok termelésével és az ún. talajeredetű patogének távoltartásával fejtik ki kedvező hatásukat. Ezen okok miatt már az irányított biotechnológiai alkalmazásukhoz is vannak korábbi eredmények (BALÁZSY et al., 1994; BIRÓ et al., 1998). Az ún. „fluoreszcens-putida” típusú PGPR *Pseudomonas* baktériumok a növényi gyökérrendszer, a rizoszféra általánosan, legnagyobb tömegben előforduló élőlényei. A sziderofor-termelő tulajdonság következtében a csoport képviselői, azaz a *P. fluorescens*, *P. putida* és *P. fulva* fajok sárgászöld színű, ultraibolya fényben fluoreszkáló pyoverdin vagy pszeudobaktin típusú, extracelluláris színyanyagokat bocsátanak ki a környezetükbe. Néhány fluoreszkáló *Pseudomonas* törzs ezek mellett pyochelint és szalicilsavat is termelhet. A *P. aeruginosa* törzsek festékanyaga, annak a fluoreszcens típusútól eltérő összetétele miatt nem sárgászöld, hanem kékeszöld színű.

A különböző színű és típusú szideroforok közös tulajdonsága ugyanakkor a  $Fe^{3+}$ -ionokhoz való erős kötődési képességük, amellyel biostatikus hatást fejtenek ki, azaz megakadályozzák, hogy a gyökérrendszer más képviselői a vashoz hozzájussanak (KLOEPPER et al., 1980).

A rizoszférában a vas központi jelentőséggel bír az obligát aerob és fakultatív aerob mikroszervezetek anyagcseréjében. Természetes körülmények között ezzel szemben a szabad vasionok hozzáférhetősége erősen korlátozott. A vas a legtöbb talajban ugyan nagy mennyiségben jelen van, döntő többsége mégis

oldhatatlan, oxidált ferri-oxi-hidroxid polimer formában található. A  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  oldhatósági együtthatója semleges kémhatás mellett  $10^{-38,7}$ , ebből következően a szabad vasion-koncentráció normális esetben igen alacsony. Ez az érték jóval a mikroorganizmusok és növények szükséglete ( $10^{-8}$ – $10^{-6}$ M) alatt van (GUERINOT & YI, 1994).

A legtöbb talajlakó mikroba ezért különböző stratégiákat fejlesztett ki a vas-hoz való jutásért. Az egyik ilyen mechanizmus a kelátképzés, azaz sziderofor-termelés, amely a leginkább elterjedt. Bizonyos hidroxamát (HS) típusú szideroforok egyaránt képesek savanyú és lúgos talajokban is kelátot képezni a  $\text{Fe}^{3+}$ -nal. Az ebben a folyamatban befolyásoló egyéb fémionok (Mn, Zn, Mg, Al, Cu és Ca) szideroforokhoz való kötődése és hatása ugyanakkor kevésbé tanulmányozott (KOZDROJ, 1996) annak ellenére, hogy a desferrikróm jelenlétében például a  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -ból felvehető vas szignifikáns csökkenését lehetett kimutatni (REID et al., 1984).

A fluoreszcens *Pseudomonas*oknak – sziderofor-termelésüknek köszönhetően – igen nagy jelentőségük lehet a talajban élő patogénekkal szembeni védekezésben, így többek között felhasználhatók a *Pythium*, a *Rhizoctonia*, az *Erwinia carotovora* és a *Fusarium oxysporum* okozta fertőzésekkel szemben is (HOWELL & STIPANOVIC, 1979, 1980; KLOEPPER, 1983; SCHER & BAKER, 1980). Ebben a vonatkozásban lényeges lehet annak az ismerete, hogy a különböző mikro- és toxikus elemek milyen befolyást gyakorolhatnak a szaporodási képesség mellett a PGPR *Pseudomonas*ok sziderofor-termelésére is.

### Anyag és módszer

Magyarország különböző mezőgazdasági művelés alatt álló területeiről talajmintákat gyűjtöttünk. A mintakiválasztás elsődleges szempontja az volt, hogy azok reprezentálják az országban előforduló legfontosabb talajtípusokat és főbb altípusokat.

A begyűjtött talajokból – határhígítási eljárással (ANGERER et al., 1998) –, ill. tenyészedény-kísérlet beállítása után különböző pillangós virágú növények (borsó, lencse, lóbab, lucerna) rizoszférájából, rhizoplánjából TEPPER (1945) módszere szerint fluoreszkáló *Pseudomonas* törzseket izoláltunk.

A King B táptalajon 1–2 napig 26–28 °C-on végzett inkubációt követően a sárgászöld, ultraibolya fényben fluoreszkáló színanyagot termelő telepeket izoláltuk, majd szélesztéssel tiszta törzseket állítottunk elő.

Az ily módon nyert *Pseudomonas* izolátumok faji szintű meghatározása klasszikus telepmorfológiai és tenyésztési módszerekkel, valamint a modern technikát és számítógépes adatbázist is alkalmazó, a törzsek szén- és nitrogénforrás-hasznosító képességén alapuló BIOLOG gyorsteszt segítségével történt. Ennek eredményeit az 1. táblázat mutatja be.

A 11 kiválasztott, hat fajt képviselő *Pseudomonas* törzs sziderofor-termelését a SCHWYN és NEILANDS (1987) által kidolgozott – a *Pseudomonas*ok

## 1. táblázat

A kísérletbe vont *Pseudomonas* törzsek eredete, jelölésük és a klasszikus, valamint BIOLOG gyorstesztel végezett faji besorolási eredmények

(1) Laboratóriumi jelzés	(2) Faj szerinti besorolás	(3) Származási hely	(4) Izolálási hely
<i>A. Fluoreszcens-putida csoportba sorolt Pseudomonas törzsek</i>			
CHA0	<i>P. fluorescens</i>	<i>Törzsgyűjteményből*</i>	
2-79	<i>P. fluorescens</i>	<i>Törzsgyűjteményből*</i>	
PFU5	<i>P. fulva</i>	Nagyhőrcsök	Borsó rizoszféra
PFU7	<i>P. fulva</i>	Nagyigmánd	Borsó rizoszféra
PPU3	<i>P. putida</i>	Nyíregyháza	Talaj
PPU4	<i>P. putida</i>	Lenti	Borsó rizoszféra
<i>B. Egyéb Pseudomonas törzsek</i>			
PAE1	<i>P. aeruginosa</i>	Budapest	Levegőből
PCO1	<i>P. corrugata</i>	Nyíregyháza	Talaj
PCO2	<i>P. corrugata</i>	Érd	Borsó rizoszféra
PTO1	<i>P. tolaasii</i>	Kondó	Borsó rizoszféra
PTO2	<i>P. tolaasii</i>	Szászberek	Borsó rizoszféra

\* MTA Környezetvédelmi Mikrobiológiai Kutatócsoport törzsgyűjteménye (VOISARD et al., 1994)

megbízható teszteléséhez is alkalmassá tett, általunk módosított – krómazurolos King B táptalajon vizsgáltuk. A módosítás abból állt, hogy a törzsek 100 µl-es szuszpenzióit nem egyenletesen kevertük a tápközegbe, hanem az agarlemezre azonos sejtszám-titerű telepeket képeztünk, hogy a színváltozási gyűrű mérhető legyen (VÁRADY, 2002).

A felhasznált fémvegyületeket ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 10, 40, 160 és 640 µM koncentrációkban alkalmaztuk. A sejtszaporodás értékelésénél a 10 cm<sup>3</sup> King B tápoldatot tartalmazó csöveket 100–100 µl 24 órás *Pseudomonas* szuszpenzióval oltottuk be és 24 órás, 28 °C-on végzett rázógépes inkubálás után (percenkénti fordulatszám: 140) 550 nm-en mért abszorbancia alapján spektrofotométerrel értékeltük ki.

A sziderofor-termelés kimutatásához a folyékony King B kultúrában nevelt, 24 órásnál nem idősebb törzsek Bürker kamrával „azonos” induló sejtszámra (kb.  $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) kalibrált 5–5 µl-es mennyiségeit foltokban hatosával, egymástól egyenlő távolságra agarlemezekre oltottuk. A 48 órás 27 °C-on végzett inkubáció után az eredetileg kék táptalajon a telepek körül megjelenő sárgás–narancsos színű gyűrűk átmérőjének mérésével a sziderofor-termelő képességet törzsenként és az alkalmazott fémek különböző koncentrációi szerint értékeltük.

A kapott adatok matematikai–statisztikai analízise után a kezeléslagok és a  $P = 0,05$  % szinten szignifikáns eltérések kerülnek bemutatásra.

## Eredmények

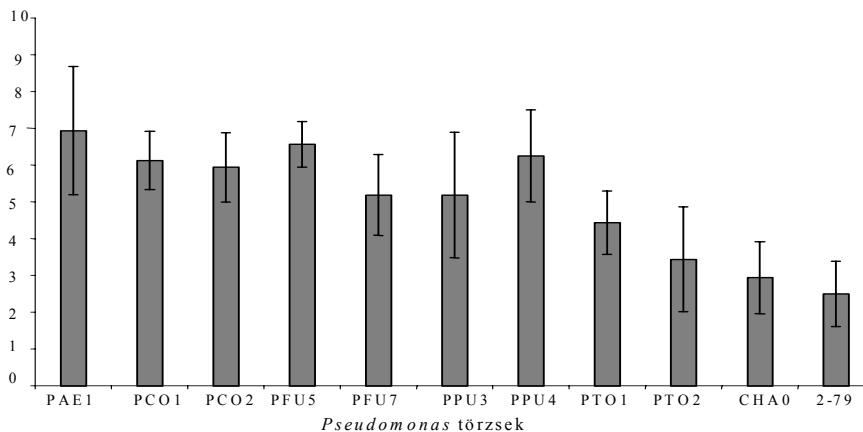
### *A fluoreszcens Pseudomonasok csoportosítása*

Az 1. táblázat adataiból látható, hogy a különböző izolátumokat a klasszikus és a korszerű taxonómiai módszerek alkalmazásával a *Pseudomonas* genus hat fajcsoportjába tartozónak sikerült azonosítani. Ezek közül három faj (a *P. fluorescens*, *P. putida* és *P. fulva*) a növénynövekedést serkentő, PGPR hatásúnak ismert „fluoreszcens-putida” típusú baktériumokhoz sorolhatók. A *P. aeruginosa* fajcsoport képviselői elsősorban klinikai mintákból ismertek, ezáltal került levegőből való kontamináció után a jelen tanulmány azonosított törzsei közé is. A *P. corrugata* és a *P. tolaasii* fajok fluoreszcens fajcsoportba való sorolása irodalmi adatokkal nem bizonyított.

### *A sziderofor-termelés összehasonlító értékelése*

A törzsek sziderofor termelését, azaz a krómazurolos King B táptalaj színváltozásait (a gátlási gyűrűk méretét) az 1. ábra mutatja be.

Megállapítható, hogy a legtöbb sziderofor jellegű vegyületet az általunk izolált *P. aeruginosa* (PAE1) és *P. fulva* (PFU5) törzsek termelték, míg a legkevésbé a két referencia törzs, azaz a CHA0 és a 2-79. Azonos diffúziós viszonyokat feltételezve tehát a legjobb sziderofor-termelő törzsek 6–8-szor több sziderofort termeltek a leggyengébb törzsekhez képest. A klasszikus adatok szerinti fluoreszcens fajcsoportba tartozó törzsek vaskelát-exudátuma a saját izolátumokhoz képest nem bizonyult kiemelkedőnek.

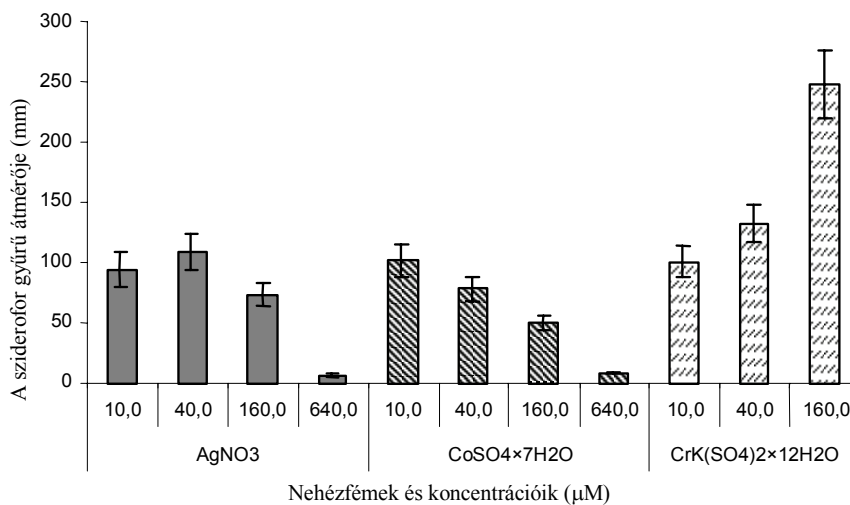


1. ábra

A *Pseudomonas* törzsek sziderofor-termelő képességének összehasonlító értékelése krómazurolos King B táptalajon ( $P = 0,05\%$ ). Függőleges tengely: A sziderofor gyűrűk átlagos mérete (mm). A törzsek faj szerinti besorolása az 1. táblázatban látható

*A toxikus elemek hatása a siderofor-termelő képességre*

Ha az alkalmazott fémvegyületek különböző koncentrációinak az átlagos hatásait vesszük figyelembe, akkor az alkalmazott fém sóknak megfelelően különböző tendenciákat fedezhetünk fel a 2. ábrán látható módon. Legtoxikusabbnak a  $\text{Co}^{2+}$  bizonyult, míg az ezüst-nitrát 40  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban a siderofor-termelés kismértékű növekedését, stimulálását okozta. Az elem nitrátsójának további koncentrációi (160–640  $\mu\text{M}$ ) ugyanakkor fokozatos gátlást idéztek elő (2. ábra).



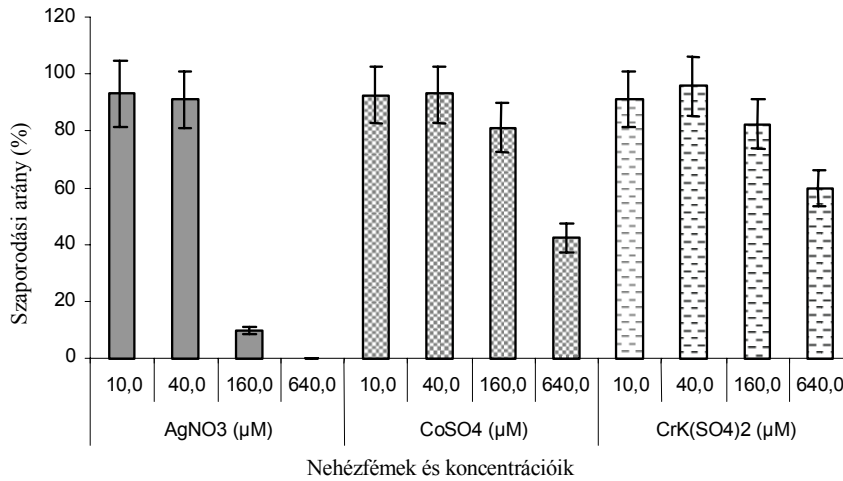
2. ábra

Az alkalmazott fémvegyületek különböző koncentrációinak hatása a 11 *Pseudomonas* törzs átlagos siderofor-termelő képességére King B táptalajon 24 órás inkubáció után

Az ezüstionokra a sideroforok termelődését illetően legkevésbé érzékeny törzs a *P. putida* (PPU4) és a *P. corrugata* (PCO1) volt, amelyek még a 640  $\mu\text{M}$ -os ezüsttartalmú táptalajon is termeltek sideroforokat. A legérzékenyebb (PAE1 és PTO2) törzsek ugyanakkor már 160  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál sem termeltek kelátképző vegyületeket.

A kobalt szulfátsójánál is fokozatos gátlás következett be a siderofor anyagok termelődésében, de már a legkisebb alkalmazott koncentráció (10  $\mu\text{M ml}^{-1}$ ) is szignifikáns negatív hatást fejtett ki. Legérzékenyebbeknek a PCO1 és a PCO2 törzsek bizonyultak, amelyek már 160  $\mu\text{M}$ -nál alig érzékelhető módon termelték a vaskelát anyagokat. A legtoleránsabb PFU7 és PPU3 törzsek ugyanakkor még 640  $\mu\text{M}$ -os kobalttartalmú táptalajon is siderofor exudálásra voltak képesek (3. ábra).

A  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$  növekvő koncentrációi a siderofor-kibocsátás fokozatos növekedését eredményezték. Az alkalmazott legnagyobb dózis, a 640  $\mu\text{M ml}^{-1}$ ,



3. ábra

Az alkalmazott fémvegyületek különböző koncentrációinak hatása a 11 *Pseudomonas* törzs átlagos szaporodására rázatott kultúrában, King B táptalajjal, 24 órás inkubáció után (a fémmentes kontrolhoz viszonyított %-os, relatív értékek)

a krómazurolos táptalaj színváltozása mellett olyan mértékben változtatta meg a sziderofor-gyűrű méretét, hogy azok egymásba növése miatt a kiértékelést nem lehetett teljes pontossággal elvégezni (2. ábra). A króm alkalmazott koncentrációi tehát egyik törzsnél sem okoztak csökkenést a vaskelátképző anyagok termelésében. A két autentikus referens törzs ezt alátámasztva a sziderofor-termelés növekedésével reagált a króm legnagyobb mennyiségeire.

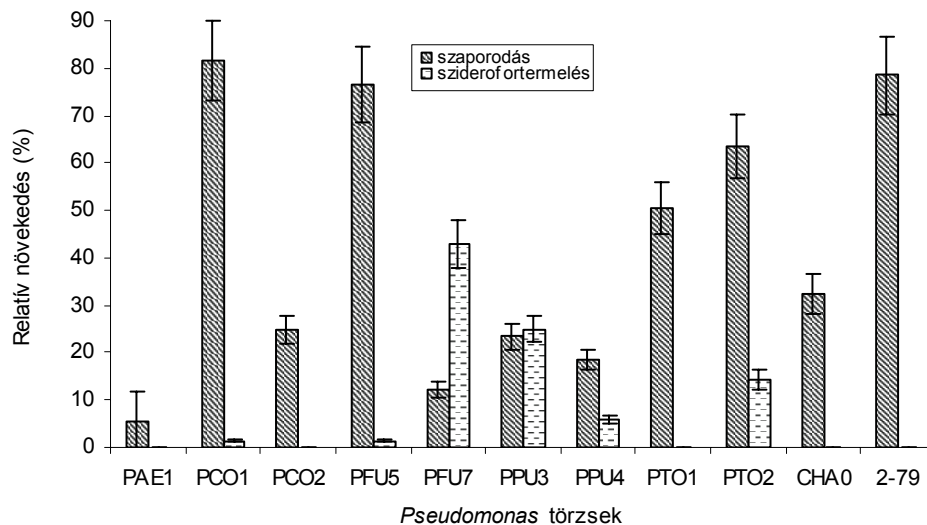
#### *A fémvegyületek hatása a törzsek szaporodására*

Az alkalmazott fémvegyületeknek a törzsek szaporodására gyakorolt átlagos hatását a 3. ábra mutatja be. Megállapítható, hogy a koncentráció függvényében mindegyik fémsó szignifikáns szaporodásgátlást okozott az alkalmazott tápközegben. Legtoxikusabbnak az ezüst-nitrát bizonyult, ahol a 160 µM koncentráció megközelítőleg 80 %-os sejtszámcsökkenést idézett elő. Ugyanennél a koncentrációnál a Cr<sup>2+</sup> csak 18 %-kal csökkentette a telepképző egységek számát. A Co-szulfát szignifikáns szaporodásgátlást a 640 µM koncentrációnál idézett elő a King B folyékony tápközegben.

Az átlagos hatásokon túlmenően jelentős eltérések lehetnek a különböző *Pseudomonas* törzsek érzékenységében is. Az ezüstionok 160 µM-os koncentrációnál ily módon csak a PCO2 törzs mutatott szaporodási képességet. A Co-ionok ezzel szemben egyetlen esetben sem okoztak teljes szaporodásbeli gátlást, még a két legérzékenyebb törzsre, a PAE1 és PFU7-re vonatkoztatva sem (4. ábra). A krómionok szaporodás-serkentése néhány törzsnél (PAE1 és PPU3) még 160 µM koncentrációnál is megnyilvánult.

*A szaporodás és sziderofor-termelés összehasonlító értékelése*

A 4. ábra a vizsgált törzsek szaporodási és sziderofor-termelő képességét mutatja be a 640  $\mu\text{M}$ -os Co-szulfát hatására. Megállapítható, hogy az elsődleges anyagcsere eredményeképpen fellépő szaporodás és a másodlagos anyagcsere következtében jelentkező sziderofor-termelő képesség között nem lehet pozitív összefüggést kimutatni



4. ábra

A Co-szulfát 640  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjának hatása a vizsgált *Pseudomonas* törzsek szaporodására és sziderofor-termelő képességére rázatott kultúrában, King B táptalajon 24 órás inkubáció után

A törzsek különböző élettani funkciói tehát a toxikus elemekre nem azonos módon reagálnak. Így lehetséges az, hogy a 640  $\mu\text{M}$ -os Co-szulfát sónál is intenzív szaporodást produkáló törzsek a vaskelát anyagok előállítására nem voltak képesek (pl. PCO1, PFU5, CHA0 és 2-79).

Kiemelendő a PFU7 és PPU3 törzsek toleranciája, mivel a Co legmagasabb dózisánál mind a szaporodás, mind a sziderofor-termelés egyaránt viszonyítottnan magas szintűnek adódott.

**Az eredmények megvitatása**

A fémvegyületek folyadékkultúrák vizsgálatával kimutatható volt az alkalmazott nehézfémek szerepe a különböző élettani folyamatokban. A fémek és toxikus elemek hatása a folyékony táptalajok alkalmazásával közvetlenebbül érvényesül, ily módon általában károsabbak is a táplemezes eljárásához képest. Az agart tar-

talmazó tápközegek ugyanakkor a szerves komplex jelenléte miatt ismeretlen, illetve nehezen megállapítható mértékben a fémek megkötésére képesek, azok hatásának az összehasonlító értékelése ezért nem lehetséges.

Az eljárás nem javasolt azért sem, mivel a bakteriológiai agarkomponensek minősége a kereskedelemben meglehetősen változó, így a különböző irodalmi hivatkozások adatai nehezen hasonlíthatók össze. A korábbi eredményeknek (BIRÓ et al., 1993; BAYOUMI et al., 1994) megfelelően ezért a folyékony módszert részesítettük előnyben azzal a módosítással, hogy az egyéb szerves, precipitációt okozó adalékanyagokat a közegből elhagytuk. Az így módosított eljárás alkalmas a törzsek laboratóriumi vizsgálatára és a fémek oldatban lévő koncentrációinak függvényében a szaporodásra, vagy a sziderofor-termelésre okozott hatások kimutatására.

A Co-ionoknak a sziderofor-termelésre vonatkozó erős toxikusságát a fém só tulajdonságaival magyarázhatjuk. A Co, a vashoz hasonló kémiai adottságai miatt ugyanis a vas mikroelemmel kompetitív módon viselkedhet. Ezen okok miatt már kis dózisban is megnyilvánultak a sziderofor-termelésre kifejtett gátló hatások a KOZDROJ (1996) által közöltekhez hasonlóan, annak ellenére, hogy a szaporodási képesség gátlása csak a legnagyobb koncentrációknál jelentkezett.

Mindegyik vizsgált toxikus elemre vonatkoztatva ki lehetett mutatni érzékenyebb és rezisztensebb törzseket, amelyek a fém só típusától és koncentrációjától függően változatos mintázatot adtak. A sziderofor-termelés intenzitásában is jelentkező lényeges különbségek megteremtik az alapot a különböző fém-szenyezettségénél alkalmazható toleráns és biológiai kontrolltörzsek kiválasztásához. Ennek megfelelően például az ezüstről a PCO1, a kobaltól a PPU3, a krómól pedig a CHA0 törzsek lehetnek potenciálisan biotechnológiai alkalmazásokra a legígéretesebbek.

Az irodalmi adatok által elvártakhoz képest nemcsak a fluoreszcens típusú, hanem az egyéb *Pseudomonas* fajreprezentánsok is mutattak sziderofor-termelő képességet. A két csoport nehézfém-érzékenysége és szaporodási képessége között szignifikáns különbség nem jelentkezett annak ellenére sem, hogy az irodalmi adatok szerint a szideroforok típusa minőségileg eltérő. A klinikai kimutatások szerint általában a levegővel terjedő kórokozó *Pseudomonas aeruginosa* törzs erős sziderofor-termelő képessége alátámasztja erős patogenitásukat.

A fluoreszcens-putida fajcsoportra jellemző autentikus CHA0 és 2-79 jelű törzsek nem bizonyultak sem a sziderofor-termelő képességre, sem a szaporodási érzékenységre jobbaknak az általunk izolált törzsekhez képest az irodalmi hivatkozás szerinti sikeres alkalmazásuk ellenére sem (VOISARD et al., 1994). Az eredmények így módon a nehézfémek és toxikus elemek által befolyásolt, adott növény-talaj rendszer specifikusságát sugallják. A törzsek érzékenységének nagyfokú variabilitása, diverzitása biztosítja a rendszer funkcióinak (pl. biológiai kontroll) a toxikus fémek hatására való fenntartását is, azok típusától, hatóidejétől és koncentrációjától függően.



## Összefoglalás

A növények oltására is felhasználható *Pseudomonasok*, azaz a PGPR (növényi növekedést serkentő) rhizobaktériumok sziderofor- (vaskelát) képző tulajdonságuk miatt, a talajeredetű kórokozók távoltartásával, a növénytermesztésben is hasznosuló tevékenységet fejthetnek ki. A szideroforok képződésére ható tényezők ily módon hatással vannak a törzsek antagonista jellegének a kialakulására, és ezáltal az irányított biológiai védekezés hatásosságára is.

Laboratóriumi körülmények között ezért hazai talajokban nőtt különböző mezőgazdasági növények rizoszférájából származó, BIOLOG gyorsteszttel azonosított 11 *Pseudomonas* rhizobaktérium törzs nehézfém-érzékenységét tanulmányoztuk. A szaporodási képesség mellett a PGPR hatásban szerepet játszó sziderofor-termelő képesség ellenőrzése is megtörtént  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  és  $\text{CrK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  vegyületek 10, 40, 160 és 640  $\mu\text{M}$  mennyiségeinek a hatására folyékony és táplemezes eljárásokkal.

Megállapítást nyert, hogy az alkalmazott nehézfémek nemcsak a törzsek szaporodási képességét, hanem a kórokozók távoltartásában fontos sziderofor-termelő képességet is befolyásolták. Ezek mértéke és tendenciája ugyanakkor különbözőképpen nyilvánult meg a fémek típusától és az alkalmazott dózisoktól függően. A növekvő koncentrációk fokozatos toxikussága mellett a fém-szennyezettségnek serkentő, szinergista módon kedvező tulajdonságai is előfordultak. A vizsgált, különböző élettani funkciók, azaz a *Pseudomonasok* szaporodása és vaskelátképző tulajdonságai a nehézfémekkel szemben eltérő érzékenységet mutattak. Az alkalmazott laboratóriumi technikák a rhizobiológiai monitoring alkalmas eszközeinek bizonyultak a nehézfémek károsító hatásainak megfelelő szintű detektálására is.

A kutatásokat az OTKA (T 030941 projekt), valamint az Európai Unió 5. Keretprogramja (OLK-00097/1999) támogatta.

**Kulcsszavak:** rizoszféra, szideroforok, *Pseudomonas*, növénynövekedés, *in vitro* technikák

## Irodalom

- ANGERER, I. P. et al., 1998. Indicator microbes of chlorsulfuron addition detected by a simplified soil dilution method. *Agrokémia és Talajtan.* **47.** 297–305.
- BALÁZSY, S. et al., 1994. Productivity of *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* strains. In: *Environmental Microbiology.* (Eds.: BALÁZSY, S. & REISINGER, O.) 163–167. Besseney Gy. Publ. House. Nyíregyháza
- BAYOUMI, H. E. A. F, BIRÓ, B. & KECSKÉS, M., 1994. *In vitro* metal-tolerance of some symbiotic beneficial bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **42.** 243–244.

- BIRÓ B et al., 1993. Cu<sup>2+</sup> és Zn<sup>2+</sup> ionok hatása szimbiotikus és asszociatív baktériumok szaporodására laboratóriumi körülmények között. *Agrokémia és Talajtan*. **42**. 343–350.
- BIRÓ, B. et al., 1998. Specific replant disease reduced by PGPR rhizobacterium on apple seedlings. *Acta Horticult.* **477**. 75–81.
- GUERINOT, M. L. & YI, Y., 1994. Iron nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* **104**. 815–820.
- HOWELL, C. R. & STIPANOVIC, R. D., 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol.* **69**. 480–482.
- HOWELL, C. R. & STIPANOVIC, R. D., 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathol.* **70**. 712–715.
- KLOEPPER, J. W., 1983. Effect of seed piece inoculation with PGPR on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phytopathol.* **73**. 217–219.
- KLOEPPER, J. W. et al., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*. **286**. 885–886.
- KOZDROJ, J., 1996. Siderophores production, microbial activity and physiological state of bacteria in soil contaminated by Cu. *Pol. J. Environ. Stud.* **5**. 19–22.
- REID, C. P. P. et al., 1984. Utilization of iron by oat when applied as ferrated synthetic chelate or as ferrated hydroxamate siderophore. *J. Plant Nutr.* **7**. 437–447.
- SCHER, F. M. & BAKER, K., 1980. Mechanisms of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathol.* **70**. 412–417.
- SCHWYN, B. & NEILANDS, J. B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**. 47–56.
- TEPPER, E. Z., 1945. Metodika ucseta tipicsnüh bakterij rizoszféri szelszko-hozjajsztvénüh rasztenij. *TSZHA dokladü, vüp.* **2**. 131.
- VÁRADY Gy., 2002. Környezeti stressztényezőkkel szemben toleráns *Pseudomonas* törzsek ökofiziológiai szelekciója. Doktori értekezés, Gödöllő.
- VOISARD, C. et al., 1994. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Current concepts and experimental approaches. In: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMO's*. (Eds.: O'GARA, F., DOWLING, D. N. & BOESTEN, B.) 67–89. VCH. Weinheim.

Érkezett: 2002. augusztus 26.

## Heavy Metal Sensitivity of Growth and Siderophore Production of *Pseudomonas Rhizobacterium* Strains

<sup>1</sup>GY. VÁRADY, <sup>1,2</sup>B. BIRÓ, <sup>1</sup>N. KUCSMA, <sup>3</sup>H. E. A. F. BAYOUMI and <sup>1,3</sup>M. KECSKÉS

<sup>1</sup> Ph.D. School, Szent István University, Gödöllő, <sup>2</sup> Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry (RISSAC) of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest and

<sup>3</sup> Environmental Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

### Summary

*Pseudomonas rhizobacterium* strains of the *fluorescens putida* type have a plant growth-promoting (PGPR) effect due to siderophore (iron chelate) production in the rhizosphere, which can be beneficially utilized in crop production to protect crops from soil-borne plant pathogens. Factors affecting siderophore production thus have an influence on the development of the antagonistic ability of the strains and on the success of biological control.

The heavy metal sensitivity of 11 *Pseudomonas rhizobacterium* strains, originating from the rhizospheres of various agricultural crops grown on major Hungarian soils and identified using the BIOLOG rapid test, was thus studied by recording the growth and siderophore production of strains grown in liquid medium and on nutrient plates containing 10, 40, 160 and 640  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ .

The results showed that the heavy metals investigated had a negative effect not only on the growth of the strains, but also on the siderophore production required for protection against pathogens. This effect was highly dependent on the type of metal and the dose applied. In addition to the increasing toxicity of higher concentrations, metal contamination was also found to have a stimulating synergistic effect. The various physiological functions examined, i.e. the growth and iron chelate-forming properties of the *Pseudomonas* isolates, exhibited different degrees of sensitivity to heavy metals. The methods presented in the study could be useful tools for monitoring the damaging effect of various heavy metals. The *in vitro* applicability, however, of these findings needs further investigation.

*Table 1.* Origin and taxonomical (BIOLOG) characterization of the *fluorescens putida* type *Pseudomonads* investigated. (1) Laboratory designation. (2) Taxonomical classification. (3) Site of origin. (4) Site of isolation. A. *Pseudomonads* classified in the *Fluorescens putida* group. B. Other *Pseudomonad* species. *Note:* Strain collection belonging to the Environmental Protection Microbiological Research Team of the Hungarian Academy of Sciences.

*Fig. 1.* Comparative evaluation of the siderophore production of 11 *Pseudomonas* strains grown on King B plates ( $P = 0.05\%$ ). For taxonomical classification of the strains, see Table 1. Horizontal axis: The average size of the siderophore rings (mm).

*Fig. 2.* Effect of different concentrations of  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{2+}$  heavy metal salts on the siderophore-producing ability of 11 *Pseudomonas* strains after 24 hours' incubation.

*Fig. 3.* Effect of the heavy metal salts on the growth of the investigated *Pseudomonas* strains in liquid King B medium (incubated for 24 hours at  $28^\circ\text{C}$  in a rotary shaker).

Growth was assessed as optical density at  $\lambda=550$  nm using a spectrophotometer and expressed as a percentage of the metal-free control.

*Fig. 4.* Comparison of the growth and siderophore production of 11 *Pseudomonas* strains after 24 hours' incubation in a rotary shaker on King B medium containing 640  $\mu$ M cobalt sulphate.