

### ***Rhizobium* törzsek túlélőképessége különböző vivőanyagokban**

<sup>1</sup> KÖDÖBÖCZ LÁSZLÓ, <sup>2</sup> BIRÓ BORBÁLA, <sup>3</sup> DUSHA ILONA,  
<sup>4</sup> IZSÁKI ZOLTÁNNÉ, <sup>5</sup> SÁRY LAJOS és <sup>1</sup> KECSKÉS MIHÁLY

<sup>1</sup> Szent István Egyetem „Mezőgazdasági-, Környezeti mikrobiológia és Talajbiotechnológia” Doktori Program, Gödöllő, <sup>2</sup> MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet, Budapest; <sup>3</sup> MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged,

<sup>4</sup> Mezőgazdasági Kutató–Fejlesztő Kht., Szarvas és <sup>5</sup> Bio-Gen Kft., Tapolca

A pillangós virágú növényekkel szimbiózisra képes *Rhizobium* baktériumok nitrogénkötő képessége már több mint száz éve – HILTNER (1895) munkássága óta – ismert. Hazánkban a *Rhizobium* baktériumokkal való növényoltások az 1960-as években kezdődtek el intenzíven (KERPELY, 1964; SZEGLI, 1967; MANNINGER et al., 1969). Az 1980-as években az öt legfontosabb mezőgazdasági pillangós növény (lucerna, lóbab, borsó, here, és szója) intenzív mezőgazdasági oltási gyakorlata is bevezetésre került a „BAKTOLEG” oltóanyagokkal. (VÁRALLYAY & NÉMETH, 1996). A módszer részét képezte a napjainkban prioritást élvező fenntartható mezőgazdasági rendszereknek.

A mikrobiális oltások során a mikrobakomponens életképességének megőrzése elengedhetetlenül szükséges a gyakorlati alkalmazásig és a későbbi infekció létrejöttéig (HARDARSON & ATKINS, 2003). Irodalmi adatokkal is alátámasztott tény ugyanakkor, hogy a tárolás és szállítás során az oltóanyag-törzsek életképességét számos környezeti abiotikus stressztényező képes károsítani (BAYOUMI et al., 1995; KÁTAI, 1998). A talajokba került oltóanyagok vagy az ott előforduló „bennszülött” rhizobium populáció aktivitására a talajfizikai tényezők (kötöttség, tömörödöttség) mellett a kémiai tulajdonságok, illetve elsősorban a toxikus elemek károsító hatása is bizonyított (BIRÓ et al., 2001; KÁDÁR et al., 2001). A túlélőképesség fokozására azonban – hiányuk esetén – hasznos lehet már a vivőanyagban (és különösen a tőzegben) a különböző mikroelemekkel (B, Mo, Co) való tápanyag-kiegészítés (BIRÓ et al., 1993; BALÁZSY et al., 1994).

A rhizobiumos oltóanyagok – előállítási formájukat tekintve – lehetnek nedves és por alakú készítmények. Korábban kizárólag nedves típusú oltóanyagok kerültek forgalomba, mivel a baktériumokat az agaros táptalajról mosták le (GRAHAM & VANCE, 2000). Magoltás azonban az ilyen típusú oltóanyagokkal nehezen kivitelezhető, ezért elsősorban a száraz, por alakú mikrobakészítmé-

---

*Postai cím:* Dr. BIRÓ BORBÁLA, MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15. *E-mail:* biro@rissac.hu

nyekkel való együttes vetés terjedt el. Ehhez kapcsolódóan hazánkban elsőnek vezették be a steril tőzeg vivőanyag alkalmazását (SOÓS, 1960).

A tőzeg folyamatos hozzáférhetősége napjainkra nem megoldott, a kitermelést gazdaságossági, de elsősorban környezetvédelmi szempontok egyre kisebb mértékben támasztják alá. Az alternatív megoldások keresése – a mezőgazdasági termelési módszerek technológiai fejlődését, átalakulását is figyelembe véve – különösen indokolt (BIRÓ, 2002). A mikrobiális oltóanyagok kijuttatásához szükséges vivőanyagként ugyanis a nagy szervesanyag- vagy kolloidtartalmú közegek felelnek meg, amelyek az oltóanyag törzseket a tárolás közben történő kiszáradástól megvédik (SOÓS et al., 1976; SÁRY et al., 1989). A korábbi gyakorlat szerinti tőzeges vivőanyagok ezért komposztokkal kiválthatók lehetnek. További és új tendenciaként jelentkezik az oltásra alkalmas hasznos törzsek nemesítése, a vivőanyagokkal és a művelési móddal való összegegyeztetése is (KÁRPÁTI et al., 1999; SOBERON et al., 1989).

A fenntartható mezőgazdasági termelés szemlélete (VÁRALLYAY, 1998), valamint a vonatkozó EU-szabványok (EC, 1986, 1999) a komposztált anyagok hasznos mikroszervezetekkel kombinált alkalmazását részesítik előnyben. Különösen igaz ez a szennyvíziszap-komposztok tartamjellegű alkalmazására (SÁRY et al., 1995), amelynek eredményeképpen a feldúsuló nehézfémek és/vagy a párhuzamosan lecsökkenő pH a talajok hasznos mikrobapopulációjának faji sokféleségét és működőképességét (pl. a N-kötés mértékét, enzimaktivitásokat is) csökkenthetik (BIRÓ, 1999; URI et al., 2003).

Munkánk célja volt, hogy két oltóanyag-komponens *Sinorhizobium*-törzs túlélőképességét ellenőrizzük különböző környezeti körülmények között, az oltás technológiai kivitelezhetőségének szem előtt tartásával. Összehasonlító vizsgálatokkal tanulmányoztuk a korábbi „vad típusú” törzshöz (Rm1021) képest a különböző környezeti körülmények között is nagy N<sub>2</sub>-kötő képességgel rendelkező, szelekcióval nemesített (D1399) törzs (DUSHA & KONDOROSI, 1993) túlélőképességét.

A kísérletek további aktualitását adta az alkalmazott törzseknek a korábbi hazai gyakorlattól eltérő genetikai jelölése (DUSHA et al., 1989), aminek a segítségével a túlélőképesség és a vivőanyagokkal való kompatibilitás ugyancsak nagy biztonsággal nyomon követhető.

### Anyag és módszer

Laboratóriumi módszerekkel bakteriális oltótörzsek túlélését vizsgáltuk öt-féle közegben: folyékony táptalajban, a magvak felületén, talajban, valamint sterilizált és nem sterilizált aerob és anaerob komposztkeverékben. A tesztek elvégzéséhez két antibiotikum rezisztenciával rendelkező, a lucerna oltására alkalmas *Rhizobium* (*Sinorhizobium meliloti*) törzset (Rm1021 és D1399), illet-

ve két lucernafajta (Körös-1 – *Medicago sativa* L., és Kákai legelő – *Medicago varia* Martyn) vetőmagját használtuk fel.

A 24 órás *Rhizobium*-tenyészetek 10–10 ml élesztőkivonat mannit táplevessel (YMB) (VINCENT, 1970) történő lemosása után 250 ml YMB táplevessel került beoltásra, majd 48 órai inkubáció következett rázó-termosztátban 28 °C-on. Az így nyert tenyészetek alkalmasak voltak a túlélési tesztek kivitelezésére. A felszaporodott kiindulási szuszpenziók titerét, azaz élő csíraszámát, az általunk módosított határhígításos táplemezes eljárással (ANGERER et al., 1998) ellenőriztük és  $10^9$  nagyságrendre állítottuk be. Az oltótörzsek visszatenyésztéséhez a táptalajt az előzetes antibiotikum-markerezésnek megfelelően ml-enként 200 µg kanamicinnel (Rm1021), illetve 200 µg ml<sup>-1</sup> sztreptomicin + 200 µg ml<sup>-1</sup> kanamicin keverékével (D1399) egészítettük ki.

A folyadékkultúrában való túlélés vizsgálatához a beoltott tápleveleseket ráztatás nélkül, szobahőmérsékleten tároltuk. A visszatenyésztésre – azaz az élő sejtek százalékanak a megállapítására – élesztőkivonat mannit agaron (YMA) került sor 1, 2, 4 és 6 heti inkubáció után.

A talajban való túlélés vizsgálatához szükséges talajminta a szarvasi Mezőgazdasági Kutató Fejlesztő Kht. telephelyéről származott. Mintánként 0,5 kg autoklávban parciálisan sterilizált talaj került beoltásra 50 ml baktérium szuszpenzióval. A tenyészedenyeket steril gézzel fedtük le az oltás és a megfelelő nedvességtartalom (VK: 60 %) beállítása után. A talajok így beállított nedvességtartalmát öntözéssel állandó tömegre egészítettük ki. Visszatenyésztéskor 1–1 g talaj átlagminta került feldolgozásra ismételt határhígításos szelektív táplemezes kitenyésztéssel (ANGERER et al., 1998).

A lucernamagvak 10–10 g-jának felületét 3 %-os klorogén-oldattal fertőtlenítettük, majd ötszöri steril csapvizess lemosás után 30 percig ráztuk baktérium szuszpenzióban. Ezt követően a magvakra a felesleges nedvesség kíméletesen beszárításra került, majd az inkubációs kamrában steril körülmények között hat hétig tároltuk. A megfelelő inkubációs idő után a magvak 1–1 g-jára vonatkozó túlélési arányt határoztuk meg.

A *Rhizobiumok* komposztban való túlélőképességének vizsgálatához a baktériumokat folyadékkultúrában felszaporítottuk, majd a tesztelt komposzthoz egyenletesen belekevertük, 100 ml oltóanyag/200 g komposzt arányban. A megfelelő inkubációs idő után a beoltott mikrobák visszatenyésztése YMA (élesztőkivonat mannit agar) lemezekon történt. Elvégeztük a komposztok fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságainak vizsgálatát is, melynek eredményeit az 1. táblázat mutatja be.

Az eredmények értékelését „Statgraphics plus 5” programmal végeztük. Az ábrákon az 5 %-os szignifikancia szinten nyert eredményeket tüntettük fel.

1. táblázat

Az aerob és anaerob komposztok legfontosabb fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai

(1) Komposzt- típus	(2) Szár- anyag %	(3) Szerves anyag %	pH (H <sub>2</sub> O)	(4)	K <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ca	Mg	Cu
				Összes N					
a) Aerob	38,7	44,5	7,1	1,6	4,1	1,9	1,2	0,5	54,5
b) Anaerob	42,3	43,4	7,2	1,7	1,2	0,8	4,5	0,4	42,1

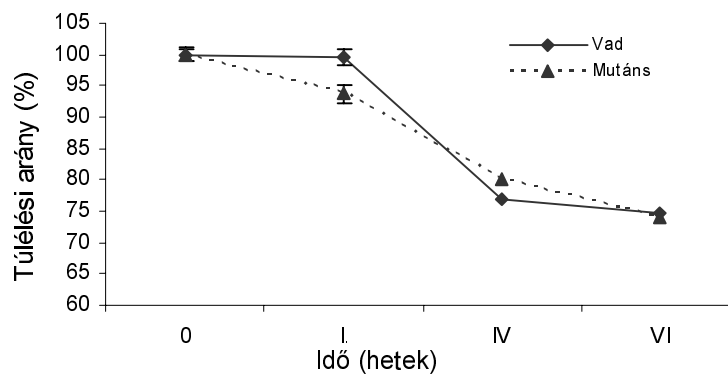
(1) Komposzt- típus	Zn	Pb	Ni	Co	Cr	Cd	Fe	Mn	(5) Összes csíra
	mg/kg								
a) Aerob	294,8	0,9	41,3	2,9	3,9	0,1	956	183,5	3,5·10 <sup>8</sup>
b) Anaerob	39,7	3,1	5,3	2,1	4,2	0,1	2148	99,3	2·10 <sup>8</sup>

### Eredmények és értékelésük

#### *Rhizobiumok túlélőképessége folyadékkultúrában*

Az 1. ábra az alkalmazott két *Rhizobium* törzs túlélőképességét mutatja be tápanyagban gazdag, C- és N-forrással dúsított folyékony táptalajban.

Megállapítottuk, hogy azonos kísérleti körülmények biztosítása esetén a *Sinorhizobium meliloti* kiindulási, – vad típusú – (Rm1021) törzsének túlélési tulajdonságai meghaladják a kedvező tulajdonságokra szelektált – mutáns – törzs (D1399) képességeit. (1. ábra). A kísérletek kezdetén mutatkozó különb-



1. ábra

A vizsgált *Rhizobium* törzsek (vad – Rm1021, mutáns – D1399) túlélési aránya (%) folyadékkultúrában, 6 hetes tenyésztés alatt

ség az első heti túlélési teszt során szignifikáns eltérést eredményezett a két törzs között. A 4. héten az eredeti (Rm1021) törzs pusztulási mutatói voltak a rosszabbak, azonban a 6. hét végére a nemesített (D1399) törzs pusztulási aránya – nem szignifikánsan ugyan – de jobb volt a másik törzshöz képest. A D1399 törzs tehát a folyadékkultúrában való túlélést jobban tűrte.

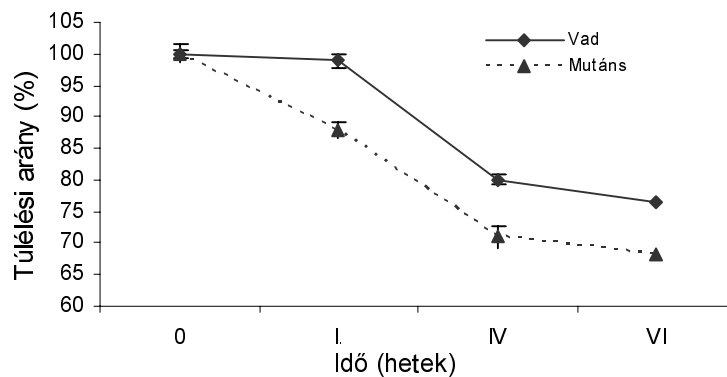
Meg kell jegyezni, hogy a 20 % mértékű pusztulás ellenére is viszonylag nagyszámú sejt maradt életben a 6 hetes tárolás után is, ami kedvező az oltóanyag-preparátumok gyakorlati alkalmazása szempontjából.

#### *Rhizobiumok túlélőképessége a vizsgált talajban*

A 2. ábra a vizsgált *Rhizobiumok* túlélőképességét mutatja be a potenciálisan lehetséges természeti területről származó talajmintában. A Szarvasról származó talaj néhány fizikai–kémiai tulajdonságát a következőkben adjuk meg: pH: 6,1;  $K_A$ : 52,5; humusz %: 2,01;  $NO_2$ – $NO_3$ -N: 14,3 mg/kg; AL- $P_2O_5$ : 112,3 mg/kg; AL- $K_2O$ : 320,8 mg/kg; Na: 229,1 mg/kg; Mg: 719,1 mg/kg; Ca: 4260,8 mg/kg.

Megállapítható, hogy a talajban való tesztelés során is adódtak különbségek a két oltótörzs pusztulási tendenciájában. A kialakult kezdeti különbségek a vizsgálat teljes időtartama alatt megmaradtak. A 6. mintázási hét végére a mutáns törzs kedvezőtlenebb túlélést ért el a vad törzshöz képest (2. ábra). Amíg azonban a folyadékkultúrában a törzsek maximális pusztulási aránya nem haladta meg a 25 %-ot, addig a talajnál ez az érték a vizsgálati periódus végére a 35 %-hoz közelített.

Figyelembe véve a talaj fizikai–kémiai tulajdonságait megállapíthatjuk, hogy a tesztelt közegben az alacsony pH és az erős kötöttség ( $K_A = 52,5$ ) gyakorol-



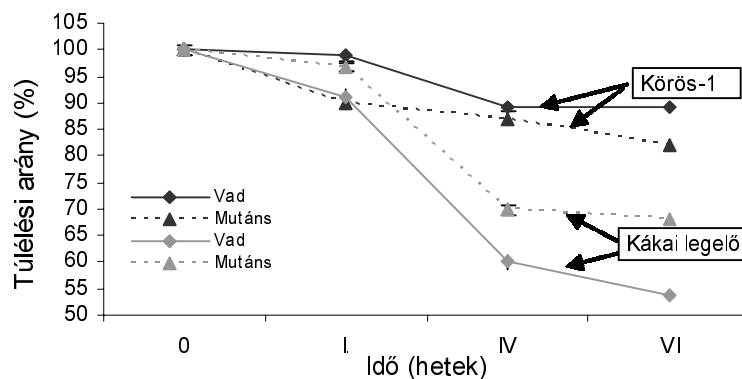
2. ábra

A *Rhizobium* törzsek (vad – Rm1021, mutáns – D1399) túlélési aránya (%) a vizsgált talajban (Szarvas), 6 hetes tenyésztés alatt

hatott kedvezőtlen befolyást a talajba juttatott oltóanyag törzsek túlélőképességére. A talajokban a növénytermesztés sikerét és így a természetes vagy az oltással bevitt talajbiota aktivitását is nagymértékben csökkentheti a talaj tápanyag-ellátottságának mértéke vagy az egyéb abiotikus stressz-körülmények, mint pl. a kiszáradás, nehézfémek, peszticidek stb. (KÁDÁR et al., 2001; SZEGI, 1967; KÁTAL, 1998).

#### *Rhizobiumok túlélőképessége magfelszínen*

Szignifikáns különbségek adódtak a vizsgált törzseknek a két lucernafajta magfelszínén való túlélését illetően is (3. ábra). Mindkét *Rhizobium* törzs mag-



3. ábra

A *Rhizobium* törzsek túlélési aránya (%) két lucernafajta („Körös-1” és „Kákai legelő”) magfelszínén 6 hetes tenyésztő alatt

oltásakor a Körös-1 fajta bizonyult a kedvezőbb alanynak, mivel az aktív sejtek pusztulási aránya a 6 hetes inkubáció alatt sem haladta meg a 15 %-os értéket.

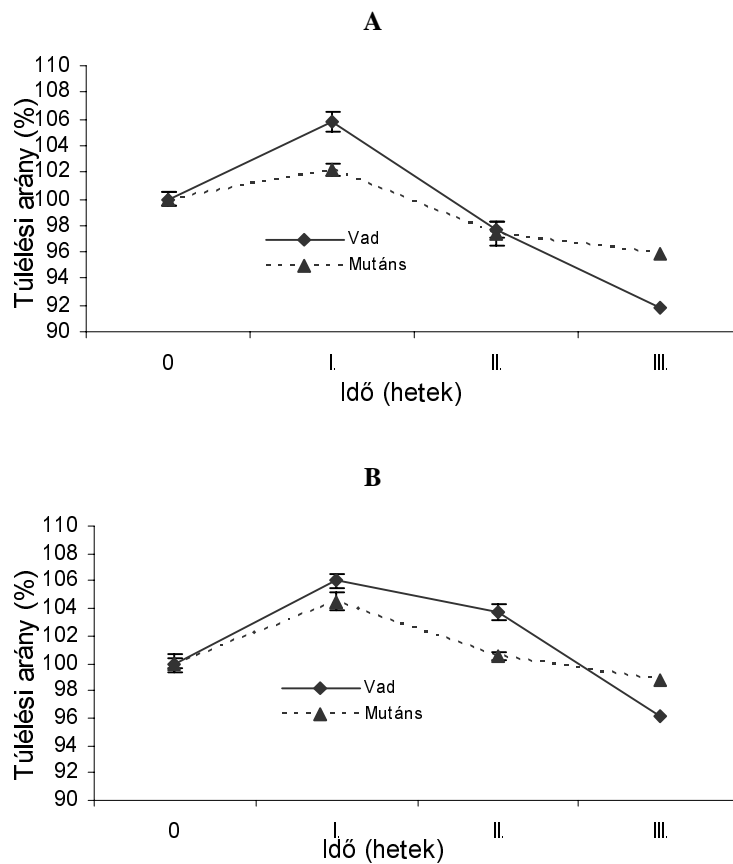
A hatodik hétre erőteljes fajta-specifikus hatást lehetett kimutatni a két alkalmazott lucernafajta között. A *Kákai legelő* fajta magfelszínén a mutáns törzs túlélése volt kedvezőbb, a *Körös-1* fajta ezzel szemben az eredeti „vad típusú” törzs túlélését stimulálta. A két törzs egymáshoz viszonyított pusztulási aránya: a Kákai legelő fajta magfelszínén meghaladta a 45 %-ot, a Körös-1-nél pedig 15 % alatt maradt.

A kétféle oltási módszert (talaj és magoltás) összehasonlítva, az adott időszakra vetítve, a rhizobium baktériumok túlélése, azaz aktivitásának megőrzése szempontjából az egyik lucernafajtánál a magoltás bizonyult eredményesebbnek. A baktériumtörzsek életképessége a Körös-1 lucernafajtán biztosabban megmaradt, mint a talajban azonos időszak alatt (3. ábra).

*Rhizobiumok túlélőképessége komposztban*

A rhizobiumok túlélése nem sterilizált komposztokban. – A N<sub>2</sub>-kötésre alkalmas vizsgált törzsek túlélőképességét kétféle úton (aerob és anaerob módon) előállított komposztban ellenőriztük. A törzsekkel szembeni kompetíciós viszonyok, azaz a biotikus tényezők hatásának vizsgálatára az eredeti, nem sterilizált komposztokat és azok sterilizált változatait is felhasználtuk.

Mind az aerob, mind pedig az anaerob komposztban az első hét végére jelentős (4–6 %) sejtszám-gyarapodás volt megfigyelhető a kiindulási állapothoz képest (4. ábra). A 2. és 3. héten mindkét komposztféleségben gyenge pusztulás ment végbe, de a kezdeti gyarapodásnak köszönhetően ez a csökkenés a 3. hét végére csak 8 %-osnak adódott (4. A ábra).

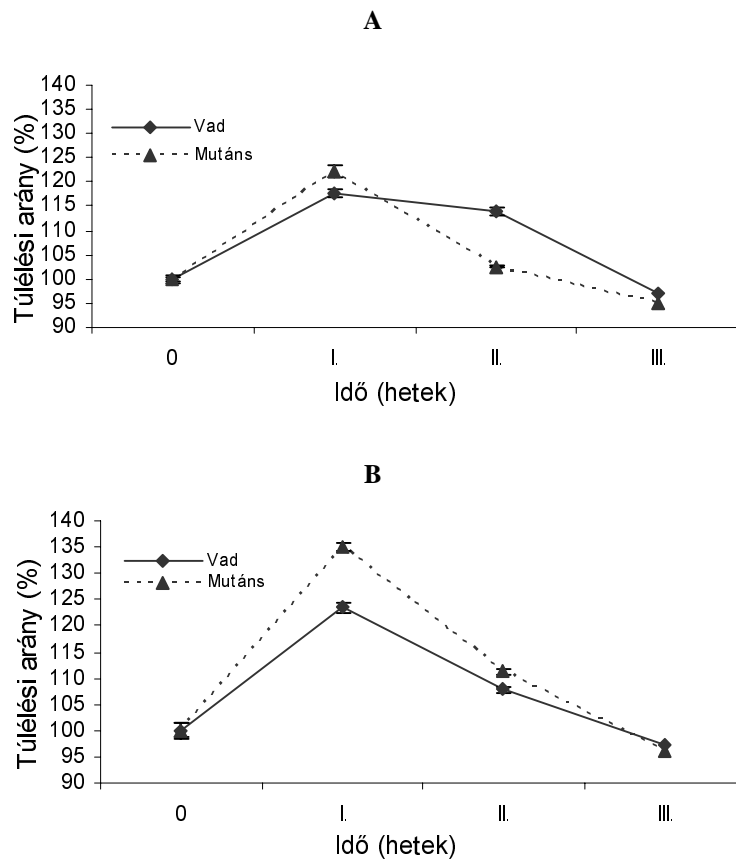


4. ábra

A két *Rhizobium* törzs sejtszámának alakulása aerob (A), ill. anaerob (B) úton előállított, nem sterilizált komposztban három hetes vizsgálati időszakban

A kapott eredmények alapján tehát elmondhatjuk, hogy a rhizobiumok túlélését (perzisztenciáját) illetően jelentős különbségek alakulhatnak ki a két komposztfajta között. Az első hetet követő sejtpusztulás intenzívebben jelentkezett az aerob komposztban, így a 2. hét végére a kiindulási állapothoz viszonyítva a sejtszám 2 %-ot csökkent (4. A ábra). Az anaerob komposztban ugyanakkor a sejtszám magasabbnak adódott, mint a kiindulási állapot (4. B ábra). A vizsgálati periódus végére az aerob komposztban a sejtszám 8 %-kal csökkent, az anaerob módon előállított komposztban pedig kevesebb, mint 4 %-kal.

*Rhizobiumok sterilizált komposztokban való túlélőképessége.* – Sterilizálás hatására az aerob és anaerob komposztokban különösen a kezdeti időszakban jelentősen nőtt a baktériumok csíraszám a kiindulási állapothoz képest. A nem sterilizált aerob komposztban az első héten ez az érték 2–6 % között mozgott,



5. ábra

A két *Rhizobium* törzs sejtszámának alakulása aerob (A), ill. anaerob (B) úton előállított, sterilizált komposztban három hétes vizsgálati időszakban



sterilizálás hatására ugyanazon időszakra 18–23 %-kal emelkedett (5. A ábra). Az anaerob komposztnál sterilizálás hatására ugyanezen időszakban 22–35 %-kal nőtt a kitenyészhető *Rhizobium* csíraszám (5. B ábra).

Az első héten nagy különbség adódott az aerob (18–23 %-os sejtgyparodás) és anaerob (24–35 %-os) komposztból kitenyészhető csíraszám között, a vizsgálati periódus végére ugyanakkor ez a különbség teljes egészében eliminálódott, és mind az aerob, mind pedig az anaerob komposztnál 5 %-os csökkenést lehetett kimutatni a kiindulási csíraszámhoz képest (5. ábra).

*A vizsgált Rhizobium törzsek pusztulási dinamikájának értékelése.* – A komposzt fajtájától, azaz az előállítási módtól és a sterilizálás hatásától függően jelentős különbségek adódtak a két *Rhizobium* törzs szaporodási–pusztulási ütemében is. Nem sterilizált komposztban minden esetben az első vizsgálati héten az eredeti „vad típusú” törzs bizonyult hatékonyabbnak. A 3. hét végére ugyanakkor a nemesített, nagy N<sub>2</sub>-kötő képességgel rendelkező mutáns törzs pusztulási üteme lelassult és szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a vad törzshöz képest (4. ábra).

Sterilizálás hatására a fenti tendencia ellenkező üteművé vált, így az első héten a mutáns törzs 16 %-kal nagyobb sejtszám-gyapodást ért el a „vad típusú” törzzsel szemben (5. ábra). A 3. hét végére ugyanakkor a két törzs közötti különbség eltűnt és a kiindulási állapothoz képest az aerob és anaerob komposztban is 5 %-os pusztulási arány alakult ki (5. ábra).

### Következtetések

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált vivőanyagok közül a tesztelt *Rhizobium* oltóanyag-törzsek túlélése a komposzt vivőanyagban bizonyult a legmegfelelőbbnek. Míg talajban a pusztulás mértéke már a 3. hét után meghaladta a 20 %-ot, a „Kákai legelő” lucernafajta magfelszínén a 30 %-ot és folyadék-kultúrában is 15 % fölé emelkedett, addig a komposztnál az adott időszakra a pusztulás 10 % alatt maradt. A sterilizáláson átesett talajban a nagyobb pusztulási arány feltételezésünk szerint a talaj kedvezőtlen fizikai–kémiai tulajdonságaival hozható összefüggésbe. Ilyen szempontból a nagy szervesanyag- és kolloidtartalmú komposztok alkalmasabb közegek lehetnek. A komposztban való kedvezőbb túlélés alátámasztja, hogy a korábban alkalmazott sterilizált tözeg kiváltható ezzel a vivőanyaggal. Az anaerob komposztban a *Rhizobium* törzsek pusztulásának üteme lassúbbnak bizonyult az aerob komposztban tapasztaltakhoz képest. Feltételezzük, hogy ennek oka az anaerob kezelési technológiából következik. A levegőtlen körülmények hatására az aerob igényű oltótörzsekkel szemben a kompetíciós, biotikus hatások kevésbé nyilvánulhatnak meg. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény is, hogy a sterilizálásnak alávetett aerob komposztban a mikrobiális konkurrenciaviszonyok eliminálása

és/vagy a sterilizálás miatti tápelem-feldúsulás miatt akár 20–25 %-os sejtszámgyarapodás is megfigyelhető. A hipotézis teljes körű bizonyítása és a lehetséges okok további tisztázása újabb vizsgálatokat igényel.

A mikrobiális oltások technikai kivitelezésénél a szerves trágya vagy a hulladékanyagokból, melléktermékekből készített komposztok számításba jöhetnek a talajművelés jelenlegi szintjén. Az ilyen biotechnológiai eljárásokkal az oltóanyagok túlélőképessége fokozható, a talajok tápanyag- és szervesanyagösszetételével környezetbarát módon optimalizálható. A technológia további pontosítása a különféle eredetű és állapotú komposztok alkalmazásával érhető el.

### Összefoglalás

A lucerna magoltására alkalmas két *Sinorhizobium meliloti* törzs túlélőképességét ellenőriztük laboratóriumi körülmények között. Az oltás szempontjait figyelembe véve a baktériumtörzsek túlélőképességét a magfelszínen, folyékony táptalajban, talajban és mezőgazdasági hulladék felhasználásával készített komposztban ellenőriztük 1–6 hetes időtartamban. A kiindulási sejtszámhoz képest a törzsek túlélőképességét (pusztulását és esetleges szaporodását) az általunk módosított, szelektív táplemezes kitenyésztéssel követtük nyomon antibiotikum marker segítségével.

Megállapítást nyert, hogy a különféle lucernamagvak felszínén a *Rhizobium* törzsek túlélőképességét a fajtatulajdonságok erősen befolyásolják. A fajták és az oltóanyagok közötti kompatibilitás-vizsgálatoknak tehát a mikrobiális oltóanyagok alkalmazásánál nagy jelentősége van.

Talajokban a *Rhizobiumok* perzisztenciáját a talajok kötöttsége, alacsony pH-ja és a tápanyag-szegény körülmények is gátolhatják.

Az alkalmazott törzsek vivőanyagának a nagy szerves- és tápanyagtartalmú komposztok a legmegfelelőbbek. Az anaerob módon előállított komposzt a vizsgált törzsek túlélőképességéhez kedvezőbb körülményeket biztosít. Ennek oka feltételezésünk szerint a biotikus tényezők kedvezőbb alakulása, azaz az anaerob körülményekhez adaptálódott konkurens mikrobák kisebb fokú versenyképessége lehet. Feltételezéseinket a sterilizált komposztban kimutatott nagyobb mértékű túlélőképesség támasztja alá.

A megfelelő komposztok ilyen irányú felhasználásával kiváltható a tőzegek alkalmazása, az oltóanyag-előállítási technológia gazdaságosabbá tehető.

A kutatások az OTKA (T 030941), az NKFP (4/015/2001) és a COST Action 8.30 „*Mikrobiális oltóanyagok a mezőgazdaságban és a környezetvédelemben*” című projektek támogatásával folytak.

**Kulcsszavak:** komposztálási technológiák, nitrogénkötők, oltóanyagok, vivőanyagok, túlélőképesség, fenntartható mezőgazdaság

## 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. Bessenyei Kiadó. Nyíregyháza.
- BAYOUMI, H. E. A. F., BIRÓ, B. & KECSKÉS, M., 1995. Some environmental factors influencing the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Acta Biol. Hung.* **46**. 17–30.
- BIRÓ B., 1999. További tudnivalók a kommunális szennyvíziszapok mezőgazdasági elhelyezéséről. *Talajbiológiai következmények. Gyakorlati Agrofórum*. **10**. (9) 4–6.
- BIRÓ B., 2002. Talaj és rhizobiológiai eszközökkel a fenntartható növénytermesztés és környezetminőség szolgálatában. *Acta Agron. Hung.* **50**. 77–85.
- BIRÓ, B., TIRICZ, H. & MORVAI, B., 2001. Investigations on the vitality, resistance and diversity of metal-adapted and non-adapted *Rhizobium* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hu.* **48**. 156–157.
- BIRÓ, B. et al., 1993. Effect of fertilizer on spontaneous *Rhizobium* infection in Hungarian soils. *Agrokémia és Talajtan*. **42**. 207–212.
- DUSHA, I. & KONDOROSI, A., 1993. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **240**. 435–444.
- DUSHA, I. et al., 1989. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* **219**. 89–96.
- EC, 1986. Council Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is being used for agriculture. *Official Journal of the European Communities*. L 181, 4/7/1999.
- EC, 1999. Council Directive 1999/31/EC of 26 April 1999 on the landfill of waste. *Official Journal of the European Communities*. L 182/1, 16/7/1999.
- HARDARSON, G. & ATKINS, C., 2003. Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems. *Plant and Soil*. **252**. 41–54.
- HILTNER, A., 1895. Zur Frage der Stickstoffernahrung in Pflanzen. *Landw. Vers. Stat.* **51**. 196.
- GRAHAM, P. H. & VANCE, P., 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*. **65**. 93–106.
- KÁDÁR, I. et al., 2001. Mikroelem-terhelés hatása a borsóra karbonátos csernozjom talajon II. Elemfelvétel, minőség és gyökérszimbiózis. *Agrokémia és Talajtan*. **50**. 83–101.
- KÁTAL, J., 1998. The effect of herbicides on the amount and activity of microbes in the soil. In: *Soil Pollution* (Ed.: FILEP, Gy), 159–168. DATE. Debrecen.
- KÁRPÁTI, É. et al., 1999. Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **181**. 3949–3955.
- KERPELY A., 1964. A pillangós virágú növények rhizobium oltásáról. *Magyar Mezőgazdaság*. **19**. 10–11.

- MANNINGER E., BAKONDI Z. É. & SOÓS T., 1969. A hazai *Rhizobium* kutatások néhány gyakorlati eredménye és problémája. Agrártud. Közlem. **28**. 229–245.
- SÁRY L., DER Z. & KÜSZ L., 1995. Kommunális szennyvíziszapok degradációja direkt komposztálással. In: 9. Környezetvédelmi Konferencia, Siófok. Előadások összefoglalói. 29.
- SÁRY, L. et al., 1989. Microbiological starter cultures for directed composting. In: Abstracts, 5<sup>th</sup> Intern. Symp. Composting, Athens. 45.
- SOBERON, M. et al., 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. **171**. 465–472.
- SOÓS T., 1960. A Rhizonit oltóanyag előállítása és termésmnövelő hatásának vizsgálata. Egyetemi doktori értekezés. Gödöllő.
- SOÓS T., MANNINGER E. & BAKONDI Z. É., 1976. A rhizobiumos oltóanyag előállításához használatos tőzeg vivőanyag, valamint a tőzeghez adott ammonium-molibdenát és bórsav hatása a lucernára tenyészedény- és szabadföldi kísérletben. Növénytermelés. **25**. 17–22.
- SZEGI J., 1967. Nitrogénkötő mikroorganizmusok jelentősége a talaj termékenysége szempontjából. Agrokémia és Talajtan. **16**. 477–486.
- URI Zs., SIMON L. & KOVÁCS B., 2003. Szudánifű nehézfém-akkumulációjának vizsgálata szennyvíziszapokkal kezelt talajból. In: Mikroelemek a táplálékláncban. (Szerk.: SIMON L. & SZILÁGYI S.) Bessenyei Kiadó. Nyíregyháza. (Megjelenés alatt)
- VÁRALLYAY, GY., 1998. Multifunctional soil management for sustainable development in Hungary. Agrokémia és Talajtan. **47**. 7–22.
- VÁRALLYAY GY. & NÉMETH T., 1996. A fenntartható mezőgazdaság talajtani–agrokémiai alapjai. In: MTA Agrártudományok Osztálya Tájékoztatója, 1995. 80–82. Akadémia Kiadó. Budapest.
- VINCENT, J. M., 1970. A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. Blackwell. Oxford.

Érkezett: 2003. október 10.

## Survival of *Rhizobium* Strains in Various Carriers

<sup>1</sup>L. KÖDÖBÖCZ, <sup>2</sup>B. BIRÓ, <sup>3</sup>I. DUSHA, <sup>4</sup>MRS Z. IZSÁKI,  
<sup>5</sup>L. SÁRY and <sup>1</sup>M. KECSKÉS

<sup>1</sup>Szent István University, PhD School of Agricultural, Environmental microbiology and Soil Biotechnology, Gödöllő; <sup>2</sup>Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest; <sup>3</sup>Biological Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged; <sup>4</sup>Agricultural Research and Development Co. Ltd., Szarvas and <sup>5</sup>Bio-Gen Co. Ltd., Tapolca (Hungary)

### Summary

The survival of bacterial strains which could be potential candidates for the inoculation of alfalfa (*Medicago* sp.) was examined using laboratory methods over 1–6 weeks in five types of media: in liquid nutrient broth, on the surface of seeds, in the soil, and in sterile and non-sterile aerobic and anaerobic compost mixtures.

The major physical, chemical and biological properties of the composts are given in Table 1. The soil, which originated from Szarvas, had the following properties: pH: 6.1; K<sub>A</sub>: 52.5; humus %: 2.01; NO<sub>2</sub>–NO<sub>3</sub>-N: 14.3 mg/kg; AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 112.3 mg/kg; AL-K<sub>2</sub>O: 320.8 mg/kg; Na: 229.1 mg/kg; Mg: 719.1 mg/kg; Ca: 4260.8 mg/kg.

Two *Rhizobium* (*Sinorhizobium meliloti*) strains (Rm1021 and D1399) and seed of two alfalfa varieties (Körös-1 – *Medicago sativa* L. and Kákai Legelő – *M. varia* Martyn) were used in the tests. The strain of D1399 was modified genetically to have a better nitrogen-fixing capacity in comparison with the Rm 1021 wild-type representative. Compared with the initial cell number, the survival ability of the strains (mortality or possibly multiplication) was assessed using a modified plate counting method with the aid of antibiotic markers (kanamycin and streptomycin).

It was found that variety characteristics had a great influence on the survival of the *Rhizobium* strains on the surface of various alfalfa seeds. Compatibility tests on the varieties and inoculants are thus of great importance when using microbial inoculants.

The persistence of *Rhizobium* strains in the soil was inhibited by soil compaction, low pH and nutrient deficiency.

Composts with high contents of organic matter and nutrients are the best carriers for the tested strains. Anaerobically produced compost provided the most satisfactory conditions for strain survival. This may have been due to the more favourable biotic factors, i.e. to the poorer competitiveness of rival microbes adapted to anaerobic conditions. This was confirmed by the increased survival rate recorded in sterilized compost.

The use of suitable composts for this purpose could replace that of peats, making the inoculant production technology more economical.

*Table 1.* Major physical, chemical and biological properties of aerobic and anaerobic composts. (1) Compost type. a) aerobic; b) anaerobic. (2) Dry matter, %. (3) Organic matter, %. (4) Total N, mg/kg. (5) Total germ number.

*Fig. 1.* Survival rate (%) of the tested *Rhizobium* strains (wild-type – Rm1021, mutant – D1399) in liquid culture over a 6-week culture period. Vertical axis: survival rate (%). Horizontal axis: Time (weeks).

*Fig. 2.* Survival rate (%) of the *Rhizobium* strains (wild-type – Rm1021, mutant – D1399) in the tested soil (Szarvas) over a 6-week culture period. For vertical and horizontal axis: See Fig. 1.

*Fig. 3.* Survival rate (%) of the *Rhizobium* strains on the surface of seeds of two alfalfa varieties (Kőrös-1 and Kákai Legelő) over a 6-week culture period. For vertical and horizontal axis: See Fig. 1.

*Fig. 4.* Abundance of *Rhizobium* strains in aerob (A) and anaerob (B), non-sterilized compost over a 3-week period. For vertical and horizontal axis: See Fig. 1.

*Fig. 5.* Abundance of *Rhizobium* strains in aerob (A) and anaerob (B), sterilized compost over a 3-week period. For vertical and horizontal axis: See Fig. 1.