

## Nehézfémek és kombinációk hatása különböző *Rhizobium leguminosarum* törzsek szaporodására

<sup>1</sup>H. A. E. F. BAYOUMI HAMUDA, <sup>2</sup>KUCSMA NÓRA, <sup>2</sup>VÁRADY GYÖRGY,  
<sup>2</sup>KISS ZITA és <sup>2</sup>KECSKÉS MIHÁLY

<sup>1</sup>Bessenyei György Tanárképző Főiskola, Nyíregyháza  
és <sup>2</sup>Agrártudományi Egyetem, Gödöllő

A fém vagy fémek toxikus hatása a talajban lévő „bennszülött” (natív) *Rhizobium* törzsekre eddig még nem teljesen tisztázott. A peszticidek szükségénél gyakoribb alkalmazásából és a szennyvíziszapok szántóföldre való kijuttatásából eredő nehézfém-szennyezettség gátló hatást gyakorol a talaj mikrobiális közösségeire (MCGRATH, 1984; MCGRATH et al., 1987; BAYOUMI HAMUDA, 1992), a ciano, a heterotróf és az endoszimbionta N<sub>2</sub>-kötő baktériumokra.

Ismeretes, hogy néhány mikroelem esszenciálisan szükséges bizonyos mikroorganizmusok szaporodásához (DIEKERT et al., 1981). Például a *Bradyrhizobium japonicum* szaporodásához Ni<sup>2+</sup> szükséges (KLUCAS et al., 1983). Legelőször STEINBERG (1938) foglalkozott a különböző mikroelemek *Rhizobium* törzsekre gyakorolt hatásával. A kísérletei során vizsgált *R. trifolii* törzsek a Mn<sup>2+</sup>-, Mo<sup>2+</sup>- vagy Fe<sup>2+</sup>-ionokat tartalmazó mesterséges táptalajon kevésbé tudtak szaporodni, mint az ezen mikroelemektől mentes táptalajon. CLARK (1936) Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> és Cu<sup>2+</sup> táptalajba történő bevitelével végzett hasonló vizsgálatokat. Napjainkig többen foglalkoztak a fémek *Rhizobium*okra gyakorolt hatásával.

LOWE & EVAN (1962) és NICHOLAS és munkatársai (1962) megállapították, hogy a Co<sup>2+</sup> jelenléte a táptalajban fontos a *Rhizobium* törzsek szaporodásához. JHA (1966) szerint a Co<sup>2+</sup> esszenciális, a Mo<sup>2+</sup> jelenléte pedig kívánatos az optimális szaporodásukhoz. LOWE és munkatársai (1960) úgy találták, hogy 0,1 µM Co<sup>2+</sup> kedvező hatású, COWLES et al. (1969) szerint a *R. meliloti* aktivitása a táptalajban levő Co<sup>2+</sup> mennyiségétől függ. KLIEWER et al. (1964) kísérletei szerint is szükséges a Co<sup>2+</sup> a *Rhizobium* törzsek számára. WILSON & REISENAUER (1970) megállapították, hogy a *R. meliloti*, *R. japonicum*, *R. phaseoli* és *Rhizobium* sp. szaporodására nézve optimális az amikor a táptalajban 10-60 µM Mn<sup>2+</sup> van, de 10-60 µM Zn<sup>2+</sup> már toxikus. Ugyanakkor kimutatták, hogy a Fe<sup>2+</sup> és a Mn<sup>2+</sup> alapvetően fontos a *Rhizobium* törzsek számára. Nélkülözhetetlen ez a két elem a baktériumok N<sub>2</sub>-kötő tevékenységéhez is, mivel az ezért felelős nitro-

genáz enzim egy csak Fe-, valamint egy Fe- és egy Mo-atomot együttesen tartalmazó fehérjéből áll.

A talaj nagy  $Mn^{2+}$ -koncentrációja gátolja a bab (DÖBEREINER, 1966) és fehérhete gyökérgümő képződését (LOWE & HOLDING, 1970). A kétértékű Mn-ion egyebek mellett szükséges a *B. japonicum* sejtfalának szintéziséhez (INON & UGALDE, 1993). HOLDING & LOWE (1971) ötven *R. meliloti* izolátumot vizsgáltak meg arra nézve, hogy az adott törzsek hogyan tudnak szaporodni nagy nehézfém- ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  és  $Cd^{2+}$ ) koncentrációk mellett. Megállapították, hogy a *R. meliloti* törzsek tolerálják a 162  $\mu g$   $Cd^{2+}$  dózist.

BABICH & STOCZKY (1980, 1982) és BABICH et al. (1982) szerint a  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  és néhány más nehézfémion igen kis mennyiségben létfontosságú a mikroorganizmusok számára, de bizonyos határon túl már gátló, illetve toxikus hatást fejtenek ki. REDDY és munkatársai (1983) tesztjei igazolták, hogy a nehézfémek ( $Hg^{2+}$ ,  $U^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) már kis mennyiségben is mérgezőek a Rhizobium törzsekre nézve.

STULTS et al. (1984, 1987) szerint a Bradyrhizobiumok felhasználják a  $Ni^{2+}$ -t, mivel az a hidrogenáz fontos alkotórésze. BAGG & NEILANDS (1987) szerint a  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  és  $Co^{2+}$  gátolja a vasszintézist szabályozó gén aktivitását, amit később DERYLO & SKOPRUSKA (1991) megfigyelt. A  $N_2$ -kötő aktivitás és a  $Mo^{2+}$ -felvétel között igen erős a korreláció (GRAHAM & MAIER, 1987).

WHELAN & ALEXANDER (1986) szerint a *R. trifolii* törzs szaporodása nagy  $Fe^{2+}$  ( $FeEDTA$ )-koncentráción intenzív, de 500  $\mu M$  koncentráció már ebben az esetben is gátló hatást gyakorolt rá, míg 100  $\mu M$   $FeSO_4$  alkalmazásakor a sejtszám négy nap alatt jelentősen megemelkedik. APPANA (1988, 1989) kimutatta, hogy a sejtfalat alkotó poliszacharid szintézise fokozódik a gümőbaktériumoknál a  $Fe^{2+}$  és az  $Al^{3+}$  táptalajban való jelenléte esetén. SAHRAWAT és munkatársai (1990) is azt állapították meg, hogy a földimogyoró Bradyrhizobium törzseinek szaporodásához és a gümőképzéséhez egyaránt szükséges a  $Fe^{2+}$  jelenléte. A *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* viszont  $Fe^{2+}$ -hiányos tápoldaton is jól szaporodik (WOLF et al., 1991). CHATTOPADHYAY & BASU 1989-ben közzétett eredményei alapján az általuk *Dalbergia sissoo*-ból izolált *Rhizobium* sp. szaporodása és IAA termelése 0,1  $\mu M$   $CoCl_2$ -koncentráció mellett volt a legjobb. Tanulmányozták a törzs reprodukivitását  $Na_2MoO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4$  és  $NiCl_2$  dózisok mellett is, de a legideálisabbnak a  $CoCl_2$  bizonyult. Hasonló eredményekről számolt be VINCENT (1974) is. MCGRATH et al. (1988) és GILLER et al. 1989-ben megjelent publikációja alapján a fémekkel szennyezett talajból Rhizobium törzsek nem izolálhatók, míg később (SMITH & GILLER, 1992) ennek ellenkezőjét állítják, miszerint *R. leguminosarum* bv. *trifolii* törzsmutánsokat izoláltak Cd, Zn, Cu, Ni és Pb által szennyezett talajból. OBBARD et al. (1990) szerint a toxicitási sorrend a Rhizobiumok esetén:  $Zn > Cu > Ni$ . Ez az eredmény a CHAUDRI et al. (1992b) cikkében találhatóval megegyezik, és ellentétben áll az általunk kapott eredményekkel. OBBARD et al. (1990) és SMITH et al. (1990) azonos álláspontja szerint a Zn és Cd a talajban korlátozza a Rhizobiumok szaporodását, míg vizsgálataink során ennek éppen

ellenkezőjét tapasztaltuk. MARTENSSON (1992) vizsgálta az agrokemikáliák és nehézfémek hatását a gyors szaporodású Rhizobiumokra és megállapította, hogy a  $Zn^{2+}$ - és  $Cu^{2+}$ -koncentráció növelésével növekedik a gátlási zóna átmérője az agar táptalajon. A legnagyobb toleranciát a  $Zn^{2+}$ -kel szemben a *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. meliloti* és *R. loti* mutatott, viszont  $Cu^{2+}$ -zel szemben ezek bizonyultak a legérzékenyebbek. Itt legellenállóbbnak a *R. meliloti* mutatkozott. Véggkövetkeztetése, hogy a  $Zn^{2+}$  toxikusabb, mint a  $Cu^{2+}$ . CHAUDRI et al. (1992a) megfigyelték, hogy a  $Cd^{2+}$ -,  $Zn^{2+}$ -,  $Cu^{2+}$ - és  $Ni^{2+}$ -tartalmú talajon a bennszülött törzsek képesek voltak a szaporodásra. XIA & XIONG (1991) a lóbab magját, *R. leguminosarum* bv. *viceae* törzsszel oltották,  $(NH_4)_2MoO_4$ -tal és  $KH_2PO_4$ -tal kombinálva. Megállapították, hogy az adott kombináció mellett a növényeken több gyökérgümő képződik és nagyobb a megkötött  $N_2$ -mennyisége is.

LEGOCZKY & VERMA (1980) és HENNECKE (1990), valamint DERYLO & SKORUPSKA (1991) a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* törzsek tanulmányozása után valamennyien azt az eredményt kapták, hogy a  $Fe^{2+}$ -tartalmú fehérjék, mint a nitrogenáz, leghemoglobin és ferredoxin aktivitásához és termeléséhez egyaránt szükséges a  $Fe^{2+}$  táptalajban való jelenléte. HAFNER et al. (1992) megemlítik, hogy a földimogyoró szimbióta  $N_2$ -kötői számára szükséges a  $Mo^{2+}$  100-200 g/ha (0,2 ng  $Mo^{2+}$ /mag) koncentrációban, mivel ebben az esetben a nitrogenáz aktivitás magasabb lesz. BHATTACHARYA & BASU (1992) vizsgálatai során, a  $NiCl_2$  0,1-0,5  $\mu g/ml$  koncentrációja gátolta a *Bradyrhizobium* sp. (*Acacia*) szaporodását, a  $CuSO_4$  ennél is erősebben gátolt, míg a  $Zn^{2+}$  0,1  $\mu g/ml$ -en még stimuláló hatású, viszont 0,5  $\mu g/ml$  feletti dózisonál már visszaesett a produktivitás a kontrollhoz képest. LEUNG & MILES (1992) a *R. leguminosarum* és *R. meliloti* fémtoleráns törzseiről számoltak be.

Vizsgálataink során tanulmányoztuk, hogy a pillangósok magoltására is használt *R. leguminosarum* törzsek milyen mértékben képesek tolerálni a különböző fémeket, valamint a nehézfémek különböző koncentrációinak együttes jelenlétét. Tudvalévő, hogy a talajok fontos alkotórészei az oxigén mellett a vas, mangán, molibdén, melyek a talajban élő endomikroszimbióta baktériumok számára is nélkülözhetetlenek. A cink, réz, kobalt, kadmium és nikkal viszont nagyobb mennyiségben toxikus elemek, de más mikroelem talajban való jelenléte ezt a tulajdonságukat részlegesen vagy teljes mértékben képes megváltoztatni.

### Anyag és módszer

Az 1. táblázatban szereplő, vizsgálatainkhoz választott törzsek a Gödöllői Agrártudományi Egyetem Mikrobiológiai Tanszékének Rhizobium-törzs-gyűjteményéből származnak, melyek a gyors szaporodású *Rhizobium* génusz különböző biovariánsait reprezentálják.

A Rhizobiumok tenyésztéséhez a vizsgálataink során YEM (Yeast Extract Mannitol) agart (KLECZKOWSKA et al., 1968), valamint YEM tápoldatot, illetve

1. táblázat  
A vizsgált *Rhizobium leguminosarum* törzsek

(1) Törzs kódja	(2) Gazdanövény	(3) Származás
Lóbab Z Bükköny 75/4 HB-3841 E 1012	a) lóbab és borsó	b) Magyarország b) Magyarország c) Líbia d) Anglia

a BAYOUMI HAMUDA által (1992-ben) módosított (kizárólag szerves alkotókat tartalmazó) YEM tápoldatot alkalmaztunk.

A fémek kiválasztását a mezőgazdasági területek iparfejlesztésből, agrokémikáliákból (pl. peszticidek, műtrágyák stb.) származó szennyezettségére való tekintettel, továbbá a mikroorganizmusok élettevékenységeiben való szerepük figyelembevételével végeztük.

Vizsgálataink célja az volt, hogy megállapítsuk mennyiben befolyásolja a nehézfémek toxikus hatását az enzímalkotó  $\text{Co}^{2+}$  vagy a szintén létfontosságú  $\text{Fe}^{2+}$  táptalajban való jelenléte.

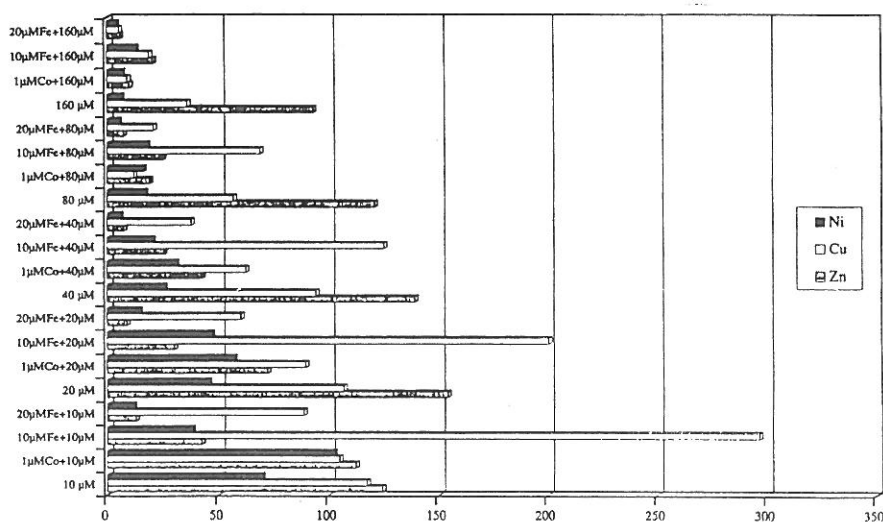
Laboratóriumi feltételek között tanulmányoztuk néhány nehézfém ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$ ) hatféle (0, 10, 20, 40, 80 és 160  $\mu\text{M}$ ) koncentrációjának négy *Rhizobium* törzsre (1. táblázat) gyakorolt hatását.

A tápoldathoz adagoltuk a különböző nehézfémek [Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> és ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O] meghatározott dózisait. Ezen tápoldat 5 cm<sup>3</sup>-ére injektáltuk a vizsgált *Rhizobium* törzsek szuszpenziójának 125  $\mu\text{l}$ -ét, melynek egy cm<sup>3</sup>-e körülbelül 10<sup>7</sup> *Rhizobium*-sejtet tartalmazott. Vizsgálataink során kontrollként a csak szerves alkotókat, valamint az állandó mennyiségű  $\text{Co}^{2+}$ -ot vagy  $\text{Fe}^{2+}$ -at tartalmazó táptalajon történő baktérium-szaporodás mértékét tekintettük. Az ilyen módon kapott tápoldathoz adtuk azon fémek különböző mennyiségét, melyeknek önmagukban kifejtett hatását korábbi vizsgálataink során, valódi YEM táptalajon már vizsgáltuk. A vizsgálatokat három ismétlésben végeztük. A törzseket rázatással 48 órán át 28 °C-on mikrofermentorban (150 ford./perc) tenyésztettük, a szaporodási rátát ezt követően spektrofotométerrel (DR-2000 típusú, USA) 550 nm hullámhosszon mértük.

## Eredmények

A hazai eredetű Lóbab Z törzs szaporodására az általunk vizsgált fémek közül a  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$  és a  $\text{Fe}^{2+}$  gyakorolta a legkisebb gátló hatást, viszont a  $\text{Cd}^{2+}$ -ra és  $\text{Cu}^{2+}$ -re volt a legérzékenyebb. A Cu legfeljebb 40  $\mu\text{M}$ -os koncentrációját

volt csak képes tolerálni. 75-100 %-ban szaporodik a  $Zn^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  160  $\mu M$ -os adagjának jelenlétében, vagyis a kísérletek során alkalmazott legnagyobb mikroelem-koncentrációt is jól tolerálta. Hasonló szaporodási intenzitás figyelhető meg a  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  80  $\mu M$ -os koncentrációjánál, valamint a  $Cu^{2+}$  és a  $Cd^{2+}$  esetén is. Egyedül a  $Cu^{2+}$  80  $\mu M$ -es jelenlétével 75-40 %-ra szorította vissza a szaporodási rátát. A többi fém só csak 160  $\mu M$ , illetve e koncentráció fölött gyakorolt gátló hatást a szaporodásra (1. ábra).



1. ábra

A L6bab Z törzs relatív szaporodása (%) különböző nehézfém kombinációk hatására. Függetlenes tengely: Nehézfém kombinációk. Vízszintes tengely: Relatív szaporodás

Önmagában, kis dózisban a  $Zn^{2+}$  is kedvező hatásúnak bizonyult a törzsre nézve. A produktivitás 20  $\mu M$   $Zn^{2+}$  jelenlétében volt a legintenzívebb, és még a 80  $\mu M$  is segítőleg hatott rá. Ezzel a hatással szemben valamennyi kombináció alul maradt, a szaporodás mértéke már 20  $\mu M$   $Zn^{2+}$ -nél 100 %-nál kisebb volt. Legnegatívabban a  $Fe^{2+}$  20  $\mu M$ -os dóziséval való kombináció hatott.

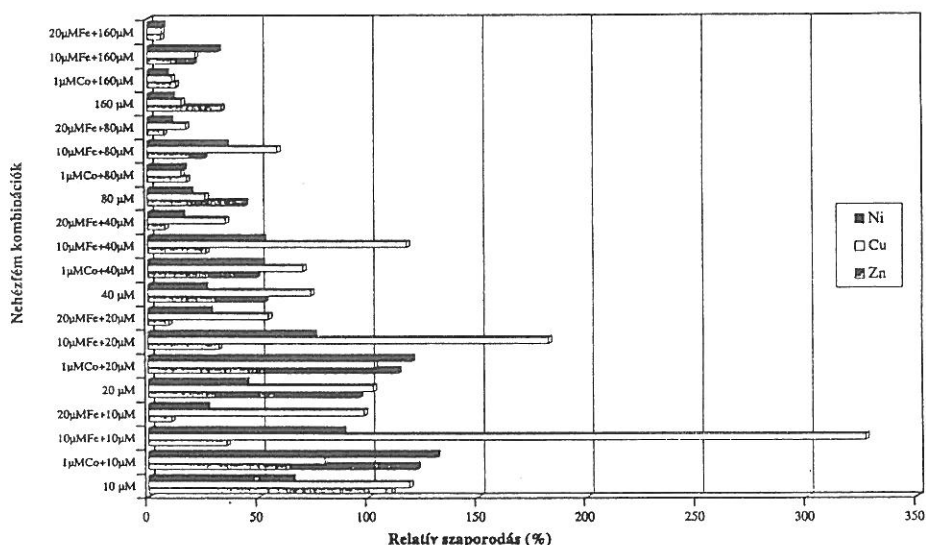
A  $Cu^{2+}$  10  $\mu M$ -os adagja még segítette a törzs szaporodását, a kontrollhoz viszonyítva 120 %, de nagyobb dózisban már gátló hatást fejtett ki. Ezt a gátló hatást az 1  $\mu M$   $Co^{2+}$  kismértékben, a 20  $\mu M$   $Fe^{2+}$  jelentősebben fokozta. Kiemelkedően felszaporodtak a baktériumok, amikor a  $Cu^{2+}$ -t 10  $\mu M$   $Fe^{2+}$ -sal kombinálva adtuk a tápoldathoz, még 40  $\mu M$   $Cu^{2+}$ -nél is 120 % körüli volt a szaporodási arány a kontrollhoz képest.

A  $\text{Ni}^{2+}$ -ről egyértelműen megállapítható, hogy negatívan hat a Rhizobiumok életjelenségeire. A vizsgálatok során alkalmazott legkisebb koncentrációjában is 70 % alá szorította vissza a sejtszámot. Ezt a  $\text{Co}^{2+}$  80  $\mu\text{M}$ -ig képes volt kompenzálni, 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ -lel kombinálva a szaporodás mértéke fölülmúlta a kontrollt is, magasabb koncentrációkon csak részben kompenzálta a  $\text{Ni}^{2+}$  hatását.

Az előzőhöz hasonlóan a hazánkban, bükköny gyökérgümőjéből izolált Bükköny 75/4 jelzésű törzs szintén jól tűri a nehézfémek kismértékű jelenlétét a táptalajban, de a Lóbab Z törzsnél érzékenyebbnek bizonyult azokkal szemben. Míg a Lóbab Z törzsnél a szaporodást leginkább segítő koncentrációk átlagosan 29 %-kal, addig itt mindössze 19 %-kal emelték a sejtszámot a kontrollhoz képest. A törzs relatív szaporodását összehasonlítva a Lóbab Z törzsével jelentős különbséget tapasztaltunk a  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Co}^{2+}$  esetén. A Bükköny 75/4 törzs a Lóbab Z-nél érzékenyebben reagált a  $\text{Co}^{2+}$  és a  $\text{Cd}^{2+}$  jelenlétére, mivel ezek a fémek már 40 illetve 80  $\mu\text{M}$ -os adagban is 40 % alá csökkentik a relatív szaporodást (2. ábra).

A  $\text{Zn}^{2+}$  az előző törzshöz viszonyítva itt erősebb gátló hatást fejtett ki. Csak 10  $\mu\text{M}$ -ja bizonyult előnyösnek a törzs számára, de a  $\text{Co}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$ -ja a  $\text{Zn}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$ -jáig képes volt kompenzálni a gátló hatást. 20  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ -koncentráció fölött azonban már valamennyi kombináció rosszabbnak bizonyult az azonos  $\text{Zn}^{2+}$ -dózishoz és a kontrollhoz képest.

$\text{Cu}^{2+}$ -zel és annak kombinációival szemben a Bükköny 75/4 a Lóbab Z törzshöz hasonlóan viselkedett. A  $\text{Cu}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$  fölötti koncentrációban már gá-



2. ábra

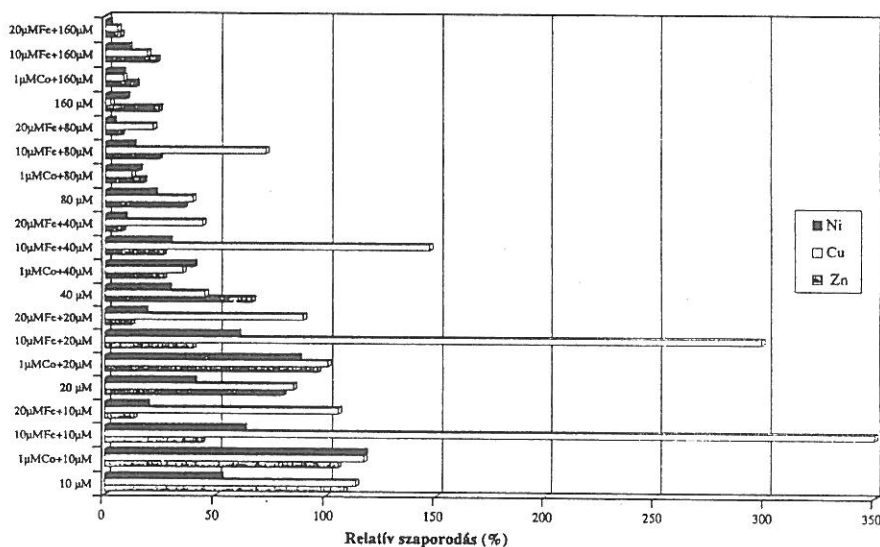
A Bükköny 75/4 törzs relatív szaporodása különböző nehézfém kombinációk hatására. Függőleges és vízszintes tengely: lásd 1. ábra

tolta a sejtosztódást, de a  $\text{Fe}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ -ja még 40  $\mu\text{M}$ -nál is teljes mértékben kompenzálta ezt a hatást, szemben a másik két vizsgált kombinációval, amelyek még negatívnak bizonyultak. Legoptimálisabbnak a 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  és 10  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  együttese mutatkozott.

Az ennél a törzsnél is károsnak bizonyuló  $\text{Ni}^{2+}$  hatását nem csak a  $\text{Co}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$ -ja, de a 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  is kompenzálta még 160  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  mellett is. A  $\text{Fe}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$ -os adagja ebben az esetben is a legkedvezőtlenebb hatást fejtette ki kombinációi formájában. Legkevésbé a  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Cu}^{2+}$  40  $\mu\text{M}$  fölötti koncentrációja 20  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ -sal való kombinációját tolerálta a törzs, mely eredmény megegyezik az előbb tárgyalt Lóbab Z törzs viselkedésével.

A Lőbából származó HB-3841 jelzésű törzs nehézfémekkel szembeni viselkedése hasonló az eddig ismertett két törzséhez. Számára a legkedvezőbb az egyes fémsók 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációja, kivéve a  $\text{Cu}^{2+}$  és a  $\text{Mo}^{2+}$  esetét, amikor 20  $\mu\text{M}$ -en, illetve a  $\text{Fe}^{2+}$ -nál 40  $\mu\text{M}$  dózis esetén tapasztaltuk a legintenzívebb (100 % fölötti) szaporodást. 75 és 100 % között volt a törzs szaporodása  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  és  $\text{Cd}^{2+}$  már 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjának jelenlétében is, míg a  $\text{Mo}^{2+}$  és  $\text{Fe}^{2+}$  csak 160  $\mu\text{M}$  koncentráció fölött gyakorolt rá ilyen hatást. Legtoxikusabbnak a  $\text{Cd}^{2+}$  bizonyult, ami már 20  $\mu\text{M}$  dózis körüli értéknél 75 % alá csökkentette a törzs relatív szaporodását.

A  $\text{Zn}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$  koncentráció fölött már toxikus volt a törzsre. Kombinálva más fémekkel megfigyeltük, hogy valamennyi vizsgált nehézfém-párosítás ká-



3. ábra

A HB-3841 törzs relatív szaporodása különböző nehézfém kombinációk hatására. Függőleges és vízszintes tengely: lásd 1. ábra

ros hatással volt a törzs szaporodására. Kizárólag a  $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$  és a  $\text{Co}^{2+}$  együttesét alkalmazva kaptunk nagyobb relatív szaporodási értékeket, mint a  $\text{Zn}^{2+}$  önmagában való alkalmazásakor, de még ez esetben sem érte el a 100 %-ot. Legkevésbé kedvezően is a  $20 \mu\text{M Fe}^{2+}$ -sal való kombináció hatott.

A  $\text{Cu}^{2+}$   $10 \mu\text{M}$ -os jelenléte még kismértékben kedvező volt a HB-3841 törzs produktivitása szempontjából, de  $40 \mu\text{M}$  alkalmazásakor a szaporodás már 50 % alá esett vissza. A  $\text{Co}^{2+}$  a  $20 \mu\text{M Cu}^{2+}$  jelenlétét kivéve és a  $20 \mu\text{M Fe}^{2+}$  egyértelműen fokozta annak gátló hatását, ezzel szemben a  $\text{Fe}^{2+}$   $10 \mu\text{M}$ -ja mindig fokozta jelenlétével a szaporodását,  $80 \mu\text{M Cu}^{2+}$  dózissig teljes mértékben kompenzálta a kifejtett negatív hatást (3. ábra).

Ennél a Rhizobium törzsnél is erősen negatív hatást gyakorolt a  $\text{Ni}^{2+}$ , már a legkisebb koncentrációban is, a relatív szaporodás mértéke valamennyi esetben 60 % alatt volt. Ezt a gátló hatást a  $\text{Fe}^{2+}$   $20 \mu\text{M}$ -je erősíti (30 % alatti szaporodási ráta). A  $10 \mu\text{M Fe}^{2+}$   $40 \mu\text{M Ni}^{2+}$  koncentrációig 30 % körüli mértékben emelte meg a sejtszámot, majd még inkább kedvezőtlené teszi a  $\text{Ni}^{2+}$  jelenlétét.

Összefoglalva az eddigieket megállapíthatjuk, hogy a HB-3841 jelzésű törzs is a faj többi képviselőjéhez hasonló szaporodási eredményeket mutatott a nehézfémek különböző kombinációinak hatására. A  $\text{Fe}^{2+}$   $20 \mu\text{M}$ -ja és a  $\text{Co}^{2+}$   $1 \mu\text{M}$ -ja  $80 \mu\text{M}$  nehézfém dózis fölött minden esetben fokozta a toxicitást.

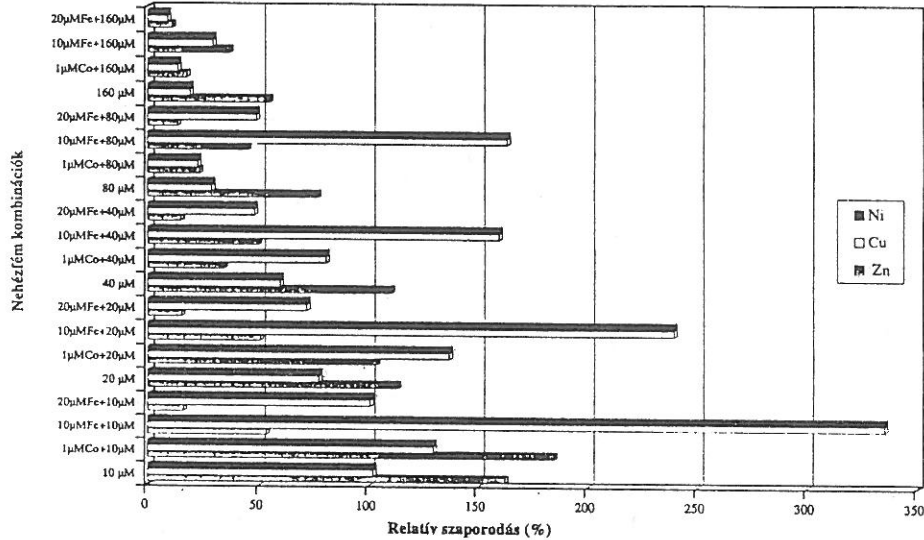
Már korábbi vizsgálataink alapján is az angliai eredetű E 1012 jelű törzs fémekkel szembeni tűrőképessége elmaradt a magyar törzseké mögött, viszont kedvezőbb volt a líbiai törzsnél. Legkevésbé a  $\text{Ni}^{2+}$ -t volt képes tolerálni, annak legkisebb adagja is negatívan hatott a szaporodásra. A többi fém esetén találtunk olyan koncentrációt (általában  $20 \mu\text{M}$ -ig), amely kedvező volt, tehát az adott fém jelenléte a tápoldatban mindenképpen szükséges a törzs optimális életkörülményeihez, a  $\text{Fe}^{2+}$  pedig még  $160 \mu\text{M}$ -ben sem okozott gátlást, csak  $160 \mu\text{M}$  dózis fölött befolyásolta negatívan a szaporodást. Kizárólag a  $\text{Co}^{2+}$  adagolásakor nem találtunk a kontrollnál fokozottabb szaporodást eredményező koncentrációt. A törzs számára legkedvezőbb tehát a  $\text{Co}^{2+}$  minél kisebb mértékű jelenléte volt. A relatív szaporodás szempontjából a legkedvezőtlenebbnek ebben az esetben is a  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Co}^{2+}$  jelenléte bizonyult. A  $\text{Mn}^{2+}$  mennyiségét növelve a tápoldatban a szaporodás mértéke egy fordított haranggörbe alakú függvényvel írható le, legkedvezőbb a törzs számára a  $40$  és  $80 \mu\text{M}$  koncentráció volt, de még  $160 \mu\text{M}$ -en sem gátolta a szaporodást (4. ábra).

A  $\text{Zn}^{2+}$  önmagában még  $40 \mu\text{M}$  koncentrációban is serkenti a törzs szaporodását, legkedvezőbb a  $10 \mu\text{M}$ -os adagjával készített tápoldat, amelyben 160 % volt a relatív szaporodás. Ezt a hatást megváltoztatták a tápoldathoz adott nehézfémek. Leginkább a  $20 \mu\text{M Fe}^{2+}$ -sal kombinálva figyelhettünk meg szignifikáns különbséget az azonos  $\text{Zn}^{2+}$ -koncentrációk hatásával szemben; ez nagymértékben gátolta a szaporodást, a sejtszám 50 %-a volt az ott megfigyeltnek. Fokozta a negatív hatást a  $\text{Fe}^{2+}$   $10 \mu\text{M}$ -ja is. A  $\text{Co}^{2+}$  még kismértékben erősí-



tette a 10  $\mu\text{M}$ -nél tapasztalt pozitív hatást, majd ennek jelenléte is károsnak minősült.

A  $\text{Cu}^{2+}$  valamennyi vizsgált dózisa toxikus volt, a koncentráció növelésével arányosan esett vissza a produktivitás. A  $\text{Co}^{2+}$  ezt a kisebb koncentrációk mellett teljes mértékben kompenzálta, sőt 40  $\mu\text{M}$ -ig 100 %-nál nagyobb sejtszámot kaptunk. Kiemelkedően erős kompenzáló hatásúnak bizonyult a  $\text{Cu}^{2+}$  toxikus hatásával szemben a 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ , melynek jelenlétében a sejtszám kétszeresére emelkedett.



4. ábra

Az E 1012 törzs relatív szaporodása különböző nehézfém kombinációk hatására. Függőleges és vízszintes tengely: lásd 1. ábra

Ennél a törzsnél is minden koncentrációban (a növelésével arányosan) legtoxikusabbnak a  $\text{Ni}^{2+}$  bizonyult, a szaporodási ráta 50 % alatti volt. Megközelítőleg ezzel azonos eredményű volt a  $\text{Ni}^{2+}$  és 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  együttes jelenléte, a 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}$  tápoldathoz adása tehát nem befolyásolta a  $\text{Ni}^{2+}$  toxicitását. Nem ezt tapasztaltuk a  $\text{Fe}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$  alkalmazásakor, ekkor ugyanis erősen fokozta a  $\text{Ni}^{2+}$  baktericid hatását, a kapott eredmények között szignifikáns különbség volt mérhető. Ennél a törzsnél a  $\text{Co}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$ -ja csak 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  toxicitását volt képes teljes mértékben kompenzálni, de nagyobb  $\text{Ni}^{2+}$  koncentrációk esetén is az ezzel való kombináció volt a legideálisabb a törzs számára.

A vizsgált nehézfém-kombinációk közül valamennyiből látható, hogy a  $\text{Fe}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ -ja igen jó eredményeket produkált, a fémek többségénél pozitív hatású volt. Legkárosabbak a  $\text{Fe}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$ -ja és a toxikusabb fémek ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) kombinációi voltak.

### Az eredmények megvitatása

Munkánk során tanulmányoztuk, hogy a különböző *R. leguminosarum* törzsek hogyan reagáltak az egyes mikroelemekre, illetve hogy a különböző mikroelemek hogyan hatnak egy-egy törzsre. Vizsgálataink során a  $\text{Cu}^{2+}$  minden egyes Rhizobium törzs számára toxikusnak bizonyult. Ezen eredményünk megegyezik CHAUDRI et al. (1992a) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* törzsre vonatkozó fémtolerancia vizsgálati eredményeivel, és ellentétben áll REDDY et al. (1983) és GILLER et al. (1989) megállapításaival, akik rézzel szennyezett talajon is azt figyelték meg, hogy a törzsek szaporodása az első két hónapban kisebb mértékű volt. CHAUDRI et al. (1992b) szerint a  $\text{Zn}^{2+}$  és a  $\text{Cd}^{2+}$  jelenléte a talajban egyaránt káros a Rhizobiumokra nézve, a  $\text{Zn}^{2+}$  legnagyobb még tolerált adagja 385  $\mu\text{g/g}$  talaj, a kadmiumé 7,1  $\mu\text{g/g}$  volt. Ezzel szemben a *R. leguminosarum* bv. *viceae* törzsek, így a Bükköny 75/4 és HB-3841 jelzésű törzs  $\text{Zn}^{2+}$  toleranciája eredményeink szerint 20  $\mu\text{M}$ , viszont az E 1012 és a Lóbab Z törzsé 20-40 és 160  $\mu\text{M}$ . A *R. leguminosarum* bv. *phaesoli* képes szaporodni 80  $\mu\text{M}$  Zn mellett is. A kadmium vizsgálatok a Bükköny 75/4, HB-3841 és E 1012 a 20  $\mu\text{M}$  dózist is tolerálta, viszont a Lóbab Z még a 40  $\mu\text{M}$  koncentrációt is képes volt elviselni. CHAUDRI et al. (1992b) publikációjában szereplő adatok alapján a  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Cd}^{2+}$  minden koncentrációban toxikusan hat a törzsekre. A fémek toxicitási sorrendje szerinte  $\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cu}$ , mely eredmény ellentmond az előzőleg nyilvánosságra hozott (1992a) cikkében szereplőnek, mely:  $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ , Ni. MCGRATH et al. (1988) megerősítették, hogy a törzsek szaporodása mesterséges táptalajon és a talajban különböző, hiszen a talajban a mikroorganizmusokra számos egyéb külső tényező is hat. SMITH et al. (1990) szerint a toxicitási sorrend az alábbi a rhizobiumok esetén:  $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Ni}$ , ez az eredmény CHAUDRI et al. (1992b) cikkében találhatóval megegyezik és ellentétben áll az általunk kapott eredménnyel. SMITH et al. (1990) azonos álláspontja szerint a Zn és Cd a talajban korlátozza a Rhizobiumok szaporodását, míg vizsgálataink során ennek éppen ellenkezőjét tapasztaltuk. Figyelemre méltó az, hogy STEINBERG (1938) eredménye megfelel az általunk kapottnak. JHA (1966) a kobaltot és a molibdént létfontosságúnak tartotta a törzsek szaporodásához. Vizsgálataink alapján 10-20  $\mu\text{M}$  koncentráció volt a legkedvezőbb, a Lóbab Z törzs számára pedig a 80  $\mu\text{M}$ . A molibdént valamennyi törzs még 160  $\mu\text{M}$  koncentrációban is tolerálta, kivéve az E 1012 jelzésű törzset, melynek toleranciája 80-160  $\mu\text{M}$ -ig terjedt. WILSON & REISENAUER (1970) szerint a Zn és Mn legkedvezőbb koncentrációja 10-60  $\mu\text{M}$ , a mi eredményeink 10-40  $\mu\text{M}$ -t mutattak legoptimálisabbnak. A Fe szintén kedvezően hatott a Rhizobium törzsekre. Vizsgálataink eredményeképpen az alábbi toxicitási sort kaptuk a mesterséges táptalajon:  $\text{Ni} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Mn} > \text{Mo} > \text{Fe}$  (2. táblázat). Mivel ezeket az eredményeket nem termőtalajon kaptuk, nem tudjuk reálisan összehasonlítani az előbbiekkal, de alapként szolgálnak további vizsgálatainkhoz.

2. táblázat

Különböző fémek eltérő koncentrációinak hatása *Rhizobium leguminosarum* törzsek relatív szaporodására (a kontroll %-ában)

(1) Törzsek	(2) Fémek	(3) Fémkoncentrációk (µM)				
		10	20	40	80	160
HB-3841	Cd	112,30	85,30	34,67 <sup>c</sup>	21,33 <sup>d</sup>	13,33 <sup>e</sup>
	Co	82,00	77,00	60,00	28,00 <sup>d</sup>	22,00 <sup>e</sup>
	Fe	119,00	109,80	116,20	106,40	105,70
	Mn	149,74 <sup>a</sup>	153,06 <sup>b</sup>	148,47 <sup>c</sup>	118,37	146,68
	Mo	139,78 <sup>a</sup>	157,42 <sup>b</sup>	137,54	112,04	84,31
	Pb	71,70 <sup>a</sup>	52,40 <sup>b</sup>	43,92 <sup>c</sup>	30,10 <sup>d</sup>	15,20 <sup>e</sup>
E 1012	Cd	117,30	84,10	40,00 <sup>c</sup>	20,60 <sup>d</sup>	6,67 <sup>e</sup>
	Co	77,50 <sup>a</sup>	56,80 <sup>b</sup>	41,00 <sup>c</sup>	17,00 <sup>d</sup>	2,00 <sup>e</sup>
	Fe	134,40 <sup>a</sup>	131,70	131,00	129,80	127,10
	Mn	122,52 <sup>a</sup>	120,59	82,24	126,90	122,65
	Mo	133,85 <sup>a</sup>	142,02 <sup>b</sup>	124,12	102,33	41,25 <sup>e</sup>
	Pb	63,80 <sup>a</sup>	49,72 <sup>b</sup>	33,43 <sup>c</sup>	17,57 <sup>d</sup>	9,36 <sup>e</sup>
Bükköny 75/4	Cd	112,00	101,30	53,30 <sup>c</sup>	29,33 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>
	Co	122,00 <sup>a</sup>	53,00 <sup>b</sup>	37,00 <sup>c</sup>	19,00 <sup>d</sup>	9,00 <sup>e</sup>
	Fe	211,30 <sup>a</sup>	204,20 <sup>b</sup>	202,20 <sup>c</sup>	200,40 <sup>d</sup>	191,00 <sup>e</sup>
	Mn	118,61	123,33	134,49	112,90	119,85
	Mo	110,00	124,77	149,32 <sup>c</sup>	105,91	106,82
	Pb	89,60	69,10	50,50 <sup>c</sup>	37,10 <sup>d</sup>	22,25 <sup>e</sup>
Lóbab Z	Cd	141,30 <sup>a</sup>	109,30	90,00	69,33	45,33 <sup>c</sup>
	Co	112,00	117,80	100,00	79,00	42,00 <sup>c</sup>
	Fe	101,10	101,90	118,30	100,80	94,10
	Mn	103,84	123,02	117,14	120,20	125,06
	Mo	104,49	116,63	106,74	102,02	96,63
	Pb	91,30	75,25	61,26	40,80 <sup>d</sup>	29,90 <sup>e</sup>

A különböző koncentrációkhoz tartozó szignifikáns eltérések P = 0,05 szinten:

a = 22,305; b = 37,225; c = 45,592; d = 48,626; e = 54,575

### Összefoglalás

Vizsgálatai eredményeink egyértelműen bebizonyították, hogy a különböző nehézfémek kombinációja és az adott fém önmagában kifejtett hatása - mint a biológiai rendszerekben általában - az egyes *Rhizobium* törzseknél is különbözhet, közöttük szignifikáns különbségek voltak kimutathatók.

A tanulmányozott fémek közül legtoxikusabb a  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ . Ezek a fémek már 20 µM-os koncentrációban is gátló hatást gyakoroltak a tesztelt törzsekre, a koncentráció növekedésével pedig ez a gátló hatás egyenes arányban fokozódott. Kis koncentrációban szaporodáserkentő hatású volt a  $\text{Zn}^{2+}$ ,

Mo<sup>2+</sup> és leginkább a Mn<sup>2+</sup>. A vas még a vizsgált legnagyobb dózisban is fokozta elsősorban a Bükköny 75/4 jelzésű törzs szaporodását a kontrollhoz képest, gátlást csak a Lóbab Z törzsnél figyelhettünk meg. Ennek ellenére megállapíthatjuk, hogy a fém sók jelenlétét leginkább a Lóbab Z törzs tolerálta, illetve sok esetben megközelítette azt a Bükköny 75/4 jelzésű törzs is.

A fémeket egymással kombinálva szignifikáns különbségeket tapasztaltunk az egyes kombinációk, illetve a kombinációk és azok alkotóinak önmagukban kifejtett hatása között.

A Zn<sup>2+</sup> kis adagjának pozitív, szaporodásra kifejtett hatását a Co<sup>2+</sup> fokozta a leginkább, de nagyobb koncentrációban ez sem volt képes kompenzálni a toxikus hatást. A Fe<sup>2+</sup> mindkét nagyobb dózisa károsan befolyásolta a Zn<sup>2+</sup> törzsekre gyakorolt hatását, ami azt bizonyítja, hogy a Fe<sup>2+</sup> elősegíti annak a Rhizobiumok általi fölvételét, így relatíve növekedik a Zn<sup>2+</sup>-koncentráció, ami már káros a törzsek számára.

A Cu<sup>2+</sup> és Ni<sup>2+</sup> toxikus hatását is leginkább a Fe<sup>2+</sup> 10 µM-os dózisa és a Co<sup>2+</sup> 1 µM-ja tudta leginkább kompenzálni, de a gátló hatás teljes kiküszöbölésére csak a Cu<sup>2+</sup> és Ni<sup>2+</sup> legfeljebb 20 µM-os dózisáig képesek.

Vizsgálataink eredményeképpen az alábbi toxicitási sort kaptuk a mesterséges táptalajon: Ni > Cu > Co > Cd > Zn > Pb > Mn > Mo > Fe. Mivel ezeket az eredményeket nem termőtalajon kaptuk, nem tudjuk reálisan összehasonlítani az előbbiekkal, de alapként szolgálnak további vizsgálatainkhoz.

### Irodalom

- APPANA, V. D., 1988. A comparative study of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium meliloti* JJ-1 exposed to aluminium and iron. *Microbios Lett.* **55.** 33-39.
- APPANA, V. D., 1989. Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium trifolii* in the presence of manganese and aluminium. *Microbios Lett.* **40.** 31-36.
- BABICH, H. & STOCZKY, G., 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *CRC Critical Rev. Microbiol.* **8.** 99-145.
- BABICH, H. & STOCZKY, G., 1982. Nickel toxicity to fungi: influence of environmental factors. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **6.** 577-589.
- BABICH, H., SCHIFFENBAUER, M. & STOCZKY, G., 1982. Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to fungi. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* **28.** 193-202.
- BAGG, A. & NEILANDS, J. B., 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.* **51.** 509-518.
- BAYOUMI HAMUDA, H. E. A. F., 1992. Factors influencing the optimization of *Rhizobium leguminosarum* and *Vicia faba* symbiosis. Candidate of Biological Sciences Dissertation, Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
- BHATTACHARYA, R. N. & BASU, P. S., 1992. Studies on the root nodules of leguminous trees: V. Production of indol acetic acid by a *Bradyrhizobium* sp. from the root nodules of a leguminous trees, *Acacia auriculiformis* A. CUNN. *J. B. Microbiol.* **32.** 219-225.

- BÍRÓ B. et al., 1993. A  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionok hatása néhány szimbiotikus és asszociatív  $\text{N}_2$ -kötő baktérium szaporodására laboratóriumi körülmények között. *Agrokémia és Talajtan*. **42**. 343-350.
- CHAUDRI, A. M., MCGRATH, S. P. & GILLER, K. E., 1992a. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from soil contaminated by past application of sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 83-88.
- CHAUDRI, A. M., MCGRATH, S. P. & GILLER, K. E., 1992b. Survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 625-632.
- CHATTOPADHYAY, K. K. & BASU, P. S., 1989. Bioproduction of indol acetic acid by the *Rhizobium* sp. from root nodules of a leguminous tree *Dalbergia sissoo* Roxb. *Acta Microbiol. Pol.* **38**. 293-305.
- CLARK, D. G., 1936. *Physiological Studies on Rhizobium Species*. New York Agric. Exp. St. Ithaca.
- COWLES, J. R., EVANS, H. J. & RUSSELL, S. A., 1969.  $\text{B}_{12}$  coenzyme-dependent ribonucleotide reductase in *Rhizobium* species and the effect of cobalt deficiency on the activity of enzyme. *J. Bacteriol.* **97**. 1460-1465.
- DERYLO, M. & SKORUPSKA, A., 1991. Biological activity of rhizobial siderophore. *Acta Microbiol. Pol.* **40**. 265-268.
- DIEKERT, G. et al., 1981. Nickel requirement and factor F430 content of methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **148**. 459-464.
- DÖBEREINER, J., 1966. Manganese toxicity effect on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in acid soils. *Plant Soil*. **24**. 153-166.
- GILLER, K. E., MCGRATH, S. P. & HIRSCH, P. R., 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown in soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to the survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* **21**. 848-848.
- GRAHAM, L. & MAIER, R. J., 1987. Variability in molybdenum uptake activity in *Bradyrhizobium japonicum* strains. *J. Bacteriol.* **169**. 2555-2560.
- HAFNER, H. et al., 1992. Effect of nitrogen, phosphorus and molybdenum application on growth and symbiotic  $\text{N}_2$ -fixation of groundnut in an acid sandy soil in Niger. *Fertil. Res.* **31**. 69-77.
- HENNECKE, H., 1990. Regulation of bacterial gene expression by metal protein complexes. *Mol. Microbiol.* **4**. 1621-1628.
- HOLDING, A. J. & LOWE, J. F., 1971. Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium leguminosarum* plant association. *Plant Soil*. Special Vol. 153-166.
- INÓN DE IANNINO, N. & UGALDE, R. A., 1993. Biosynthesis of cyclic B-(1-3), B-(1-6) glucan in *Bradyrhizobium* spp. *Arch. Microbiol.* **159**. 30-38.
- JHA, K. K., 1966. Effect of molybdenum, vanadium, tungsten and cobalt on the growth of *Rhizobium*. *Ind. J. Microbiol.* **6**. 29-34.
- KLECZKOWSKA, J. et al., 1968. The identification and classification of *Rhizobium*. In: *Identification Methods for Microbiologists*. Part B. (Eds.: GIBBS, B. W. M. & SHAPTON, D. A.) 51-65. Acad. Press, N. Y.
- KLIEWER, M. & EVANS, H. J., 1963. Cobamide coenzyme contents of soybean nodules and nitrogen fixation bacteria in relation to physiological conditions. *Plant Physiol.* **38**. 99-104.

- KLIEWER, M., LOWE, R. & EWANS, H. J., 1964. A biological assay for cobalt using *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil*. **21**. 153-162.
- KLUCAS, R. V et al., 1983. Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proc. Nat. Acad. USA*. **80**. 2253-2257.
- LEGOCZKY, R. P. & VERMA, D. P. S., 1980. Identification of nodule specific host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium-legume* symbiosis. *Cell*. **20**. 153-163.
- LEUNG, D. & MILES, R. J., 1992. Heavy metal resistant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: Isolation, characterization and root-nodule induction. *Intern. Conf. Heavy Metals in the Environment* (Ed.: FARMER, J. G.). Vol. 2. 302-305. CEP Consultants. Edinburgh.
- LOWE, R. H. & EWANS, H. J., 1962. Cobalt requirement for the growth of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **83**. 210-211.
- LOWE, J. F. & HOLDING, A. J., 1970. Influence of clover source and of nutrient manganese concentration on the *Rhizobium/white clover* association. In: *White Clover Res.* (Ed.: LOWE, J.). Occasional Symp. No. 6. Br. Grassl. Soc. 79-88. Grassl. Res. Inst. Hurley, England.
- LOWE, R. H., EVANS, H. J. & AHMED, S., 1960. The effect of cobalt and growth of *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**. 675-678.
- MARTENSSON, A. M., 1992. Effect of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.* **5**. 435-445.
- MCGRATH, S. P., 1984. Metal concentration in sludges and soils from a long-term field trial. *J. Agric. Sci.* **103**. 23-35.
- MCGRATH, S. P., BROOKES, P. C. & GILLER, K. E., 1987. Long-term studies of metals transfer following application of sewage sludge. In: *Pollutant Transport and Fate in Ecosystems.* (Eds.: COUGHTREY, P. J., MARTIN, M. H. & USWORTH, M. H.) *British Ecol. Soc. Spec. Publ. No. 6*. 301-317.
- MCGRATH, S. P., BROOKES, P. C. & GILLER, K. E., 1988. Effects of potentially toxic elements in soil derived from past application of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biol. Biochem.* **20**. 415-425.
- NICHOLAS, D. J. D., KOBAYASHI, M. & WILSON, P. W., 1962. Cobalt requirement for inorganic nitrogen fixation metabolism in microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **48**. 1537-1542.
- OBARD, J. P., SMITH, S. R. & JONES, K. C., 1990. Nitrogen fixation on sewage sludge amended soils. A review of recent studies. *Proc. EC. Cost 681 Seminar on Effects of Organics in Sewage Sludge on Soil Fertility, Plants and Animals*, 6-8 June, 1990. Forschungsanstalt Landwirtschaft (FAL) Braunschweig, Germany.
- REDDY, G. B., CHENG, C. N. & DUNN, S. J., 1983. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. *Soil Biol. Biochem.* **15**. 343-345.
- SAHRAWAT, K. L., ANJALIAH, V. & NAMBIAR, P. T. C., 1990. Effect of mineral nitrogen and Bradyrhizobium inoculation on growth and iron nutrition of groundnut. *Fertil. Res.* **24**. 47-52.
- SMITH, S. R. & GILLER, K. E., 1992. Effective *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term applications of sewage sludge of 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 Sewage Sludge Application. Water Res. Cent. Medmenham, Marlow.
- STEINBERG, R. A., 1938. Applicability of nutrient-solution purification to study of trace-element requirements of Rhizobium and Azotobacter. J. Agric. Res. 57. 461-476.
- STULTS, L. W., O'HARA, E. B. & MAIER, R. J., 1984. Nickel is a component of hydrogenase in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 159. 153-158.
- STULTS, L. W., MALLICK, S. & MAIER, R. J., 1987. Nickel uptake in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 169. 1398-1402.
- VINCENT, J. M., 1974. Root nodule symbiosis with Rhizobium. In: The Biology of Nitrogen Fixation. 265-341. (Ed.: QUISPÉL, A.) North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- WHELAN, A. M. & ALEXANDER, M., 1986. Effects of low pH and high Al, Mn and Fe levels on the survival of *Rhizobium trifolii* and the nodulation of subterranean clover. Plant Soil. 92. 363-371.
- WILSON, D. O. & REISENAUER, H. M., 1970. Effect of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium. J. Bacteriol. 102. 729-732.
- WOLFF, A. B. et al., 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. Biol. Fertil. Soils. 12. 170-176.
- XIA, M. Z. & XIONG, F. Q., 1991. Interaction of molybdenum, phosphorus and potassium on yield in *Vicia faba*. J. Agric. Sci. 177. 85-90.

Érkezett: 1995. június 20.

### Effect of Heavy Metals and Their Combinations on the Growth of Various *Rhizobium leguminosarum* Strains

<sup>1</sup> H. A. E. F. BAYOUMI HAMUDA, <sup>2</sup> N. KUČSMA, <sup>2</sup> G. VÁRADY, <sup>2</sup> Z. KISS  
and <sup>2</sup> M. KECSKÉS

<sup>1</sup> Bessenyei György Teachers Training College, Nyíregyháza and University of Agricultural Sciences, Gödöllő (Hungary)

#### Summary

The experimental results proved unequivocally that the effect of combinations of heavy metals on individual *Rhizobium* strains may differ, sometimes significantly, from that of the various heavy metals alone, as is generally observed in biological systems.

Among the metal salts tested, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> proved to be the most toxic, exerting an inhibitory effect on the tested strains even at a concentration of 20 µM, while at higher concentrations this effect increased in direct proportion. At low concentrations Zn<sup>2+</sup>, Mo<sup>2+</sup> and especially Mn<sup>2+</sup> exerted a growth-stimulating effect. Even at the highest concentration tested, iron improved the growth, particularly of the

Vetch 75/4 strain compared to the control, with inhibition only being observed for the Horsebean Z strain. Nevertheless, it was found that this strain had the greatest tolerance of the presence of metal salts, closely followed in many cases by Vetch 75/4.

When the metals were combined significant differences were recorded between the effects of the various combinations and between the combinations and the individual metals.

The positive effect on growth of small rates of  $Zn^{2+}$  was enhanced to the greatest extent by  $Co^{2+}$ , but at higher concentrations this was unable to compensate for the toxic effect. Both the higher rates of  $Fe^{2+}$  had a deleterious influence on the effect of  $Zn^{2+}$  on the strains, indicating that  $Fe^{2+}$  promotes the uptake of zinc by the rhizobia, leading to a relative increase in the  $Zn^{2+}$  concentration to a level damaging to the strains.

The toxic effect of  $Cu^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  was best compensated by a 10  $\mu M$  rate of  $Fe^{2+}$  or a 1  $\mu M$  rate of  $Co^{2+}$ , but the inhibitory effect could only be completely eliminated up to  $Cu^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  rates of 20  $\mu M$ .

As a result of the experiments the following toxicity ranking was obtained on artificial nutrient medium:  $Ni > Cu > Co > Cd > Zn > Pb > Mn > Mo > Fe$ . Although these results cannot be realistically compared with those obtained on soil, they will nevertheless serve as a basis for further studies.

*Table 1.* The *Rhizobium leguminosarum* strains tested. (1) Strain code. L6bab Z = Horsebean Z. Bükköny 75/4 = Vetch 75/4. (2) Host plant. a) Horsebean and pea. (3) Place of origin. b) Hungary, c) Lybia, d) U.K.

*Table 2.* Effect of different concentrations of various metals on the relative growth of *Rhizobium leguminosarum* strains. (1) Strains. L6bab Z = Horsebean Z, Bükköny 75/4 = Vetch 75/4. (2) Metals. (3) Metal concentrations ( $\mu M$ ). Note: Significant deviations for the various concentrations at the  $P = 0.05$  level: a = 22.305, b = 37.225, c = 45.592, d = 48.626, e = 54.575.

*Fig. 1.* Relative growth of the Horsebean Z strain as affected by various heavy metal combinations. Vertical axis: Heavy metal combinations. Horizontal axis: Relative growth, %.

*Fig. 2.* Relative growth of the Vetch 75/4 strain as affected by various heavy metal combinations. Vertical and horizontal axis: see Fig. 1.

*Fig. 3.* Relative growth of the HB-3841 strain as affected by various heavy metal combinations. Vertical and horizontal axis: see Fig. 1.

*Fig. 4.* Relative growth of the E 1012 strain as affected by various heavy metal combinations. Vertical and horizontal axis: see Fig. 1.