

**Nehézfém toleráns baktériumok hatása
a növények növekedésére és a fémfelvételére**

Szerzők:

Salamon Pál

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszereda, Műszaki és Társadalomtudományi
Kar, Ipari biotechnológia szak, alapképzés, III. év

Vincze Boglárka

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszereda, Műszaki és Társadalomtudományi
Kar, Ipari biotechnológia szak, alapképzés, III. év

Témavezetők:

dr. Mara Gyöngyvér egyetemi docens,

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszereda, Műszaki és Társadalomtudományi
Kar, Biomérnöki Tanszék

dr. Salamon Rozália Veronika egyetemi docens,

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszereda, Műszaki és Társadalomtudományi
Kar, Élelmiszertudományi Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezető.....	4
1.2. A növények tápelemfelvétele	4
1.2. A nehézfémek és növényekre gyakorolt hatásuk	5
1.3. A PGPR baktériumok és a növények kapcsolata.....	8
1.4. A növény mikroba kölcsönhatás és a fémek akkumulációja.....	9
2. A kutatás célkitűzése.....	12
3. Anyag és módszer	12
3.1. Alkalmazott baktériumtörzsek.....	12
3.2. Baktériumok nehézfém-tűrő képességének vizsgálata	13
3.3. Növényi kísérletek.....	14
3.4. Nehézfémek hatásának kimutatása	17
3.5. Nehézfémionok bioakkumulációs mértékének meghatározása atomabszorpciós spektrofotométerrel.....	17
3.6. Statisztikai analízis	18
4. Eredmények és kiértékelése	18
4.2. A nehézfémek hatása a növényi növekedésre	18
5. Következtetések	32
Irodalomjegyzék.....	34

Kivonat

Az ipar gyors fejlődésének következtében a talajok nehézfém szennyezése egy fontos környezetvédelmi probléma. A fémekkel szennyezett talajok esetében egy igen ígéretes és környezetbarát technológia a fitoextrakció, amely során a növények gyökere és szára abszorbeálja és akkumulálja a nehézfémeket. A fitoextrakció javítására a növény-baktérium kapcsolat előnyeinek a kombinálása egy lehetőség a fitoextrakció eredményességének növelésére. Több baktériumtörzsnél is megfigyelték, hogy a növekedés serkentés mellett a nehézfém felvételt is elősegítették különböző növények esetében. Kutatásunk célja olyan növényi növekedést serkentő baktérium (PGPR) asszociációk felderítése volt, amelyek alkalmazhatóak a fitoextrakciós eljárás javítására. A baktériumtörzsek Cd és Zn toleranciáját vizsgáltuk és szelektáltuk azokat a törzseket, amelyek tolerálták a két választott nehézfémrel való terhelést. A növényi magvakat steril talajba helyeztük, majd az egyformán fejlődött növényeket szétültettük, baktérium szuszpenzióval kezeltük és kontrollált körülmények között növénynevelő kamrában (Sanyo MLR-351) neveltük, különböző koncentrációjú nehézfém jelenlétében. A növények kifejlődését követően a növények gyökerének és szárának méretét és biomasszáját rögzítettük. A nehézfém akkumulációjának meghatározására atomabszorpciós spektrofotométert használtunk (Varian Spektra AA 110), hamvasztással előkészített mintákból. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a baktérium asszociációk hatására szignifikánsan nőtt a bab nehézfém felvétele, mind a Cd mind a Zn esetében.

1. Bevezető

1.2. A növények tápelemfelvétele

Tápelemnek tekintjük azokat az elemeket, amelyeket egy szervezet a metabolikus folyamatai során felhasznál vagy beépít a szervezetébe. A növényi szervezetek, a többi élő szervezethez hasonlóan specifikus tápelem igényel rendelkeznek. A növények életfolyamataira gyakorolt hatásuk tekintetében a környezetből felvett kémiai elemek lehetnek esszenciális tápelemek. Esszenciális tápelemeknek tekintjük azok az elemeket amelyekre a növénynek szüksége van, hogy képes legyen virágozni és magot hozni, azaz a reprodukív ciklusát lezárni. Az esszenciális elemekre tehát minden növénynek állandó jelleggel szüksége van, nélkülük működési zavarok, fejlődési rendellenességek illetve hiánybetegségek lépnek fel (Brooker és mtsai, 2011).

A növények életműködési folyamataihoz szükséges elemek sokféle szerepet töltenek be a növények életfolyamataiban, gyakran enzimek kofaktoraiként nélkülözhetetlenek a növények számára (1. táblázat). Azokat az elemeket, amelyek több mint 1g/kg növényi szárazanyagánál nagyobb mennyiségben szükségesek a növények számára makroelemeknek nevezzük, míg azokat amelyek 0,1g/kg növényi szárazanyagánál kisebb mennyiségben szükségesek mikroelemeknek vagy nyomelemeknek nevezzük.

1.táblázat. A növények számára szükséges elemek és azok szerepe (Brooker és mtsai, 2011 alapján)

Elem	% előfordulása a növényben	Forrás	Növény általi felvétel	Elem szerepe
Makroelemek				
C	45	Levegő	CO ₂	Szerves molekula
O	45	Levegő, talaj, víz	CO ₂ , O ₂ , H ₂ O	Szerves molekula
H	6	Víz	H ₂ O	Szerves molekula, H ⁺ az ozmózisban játszik szerepet
N	1,5	Talaj	NO ³⁻ , NH ⁴⁺	Fehérje, nukleinsav, klorofill, alkaloidák
K	1	Talaj	K ⁺	Sejt iontartalma
Ca	0,5	Talaj	Ca ²⁺	Sejt közötti kommunikáció, sejtfal

Mg	0,2	Talaj	Mg ²⁺	Klorofill, enzim aktiválás
S	0,1	Talaj	SO ₄ ²⁻	Fehérje, koenzim, alkaloida
Cl	0,01	Talaj	Cl ⁻	A víz bomlása a fotoszintézis során
Fe	0,01	Talaj	Fe ³⁺ , Fe ²⁺	Enzim kofaktor
Mikroelemek				
Mn	0,005	Talaj	Mn ²⁺	Enzim kofaktor
B	0,002	Talaj	B(OH) ₃	Enzim kofaktor, sejtfal alkotója
Zn	0,002	Talaj	Zn ²⁺	Enzim kofaktor
Na	0,001	Talaj	Na ⁺	A C4 és CAM növények PEP generálásában
Cu	0,0006	Talaj	Cu ⁺ , Cu ²⁺	Enzim kofaktor
Mo	0,00001	Talaj	MoO ₄ ²⁻	Enzim kofaktor
Ni	0,000005	Talaj	Ni ²⁺	Enzim kofaktor

Növényi életműködés szempontjából mérgező elemekként tartják számon az As, Pb, Hg, Cd, Cr, amelyeknek nincs ismert élettani funkciójuk. Ezek a toxikus elemek bekötődhetnek a fehérjék szerkezetébe az őket alkotó aminosavak oldalláncaihoz és a fehérjék funkciójának gátlását okozhatják (Brooker és mtsai, 2011).

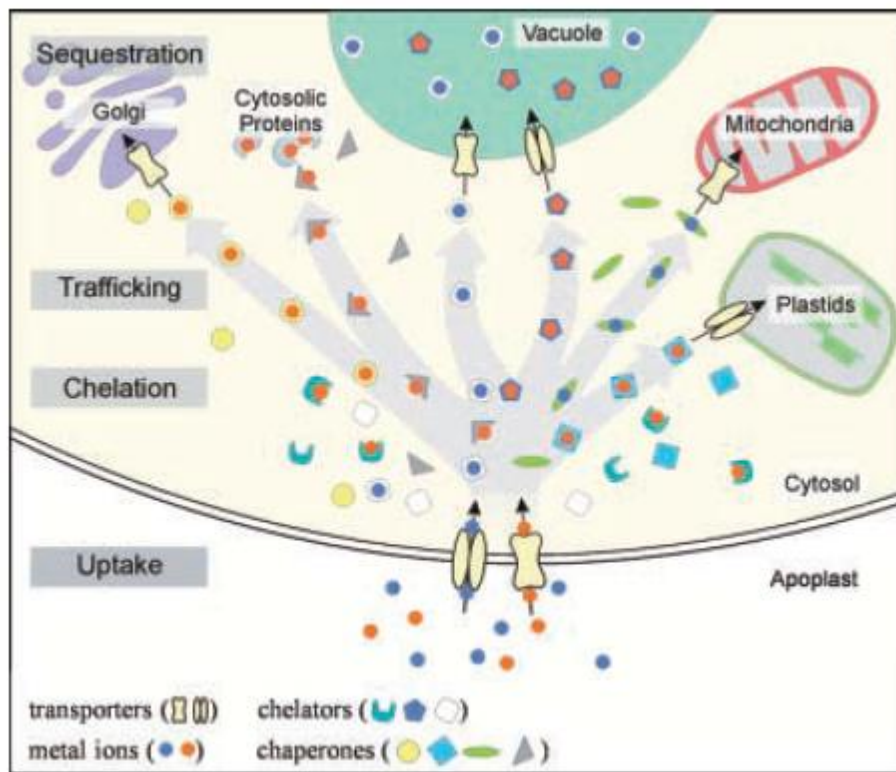
1.2. A nehézfémek és növényekre gyakorolt hatásuk

Az ipari tevékenységek, többek között a bányászat, a fosszilis tüzelőanyag használata a különböző fémek felhalmozódását okozza a talajban, a vízben és a levegőben.

Egyes fémek, mint például a Cu sok élettani folyamatban esszenciális, de ennek ellenére nagy mennyiségben toxikus is lehet a növényekre nézve. Más fémek, mint például a Hg nem esszenciális fém és nagy toxicitással bír. A növények, minden más élő szervezethez hasonlóan homeosztatisz mechanizmusainak révén képesek fenntartani a különböző sejtszervecskében az esszenciális fémionok mennyiségét, és csökkenteni a nem esszenciális fémionok által okozott elváltozásokat (Clemens, 2001).

A fém homeosztázis fő elemeit a sejten belüli szállítás, kelátképzés és a tárolás képezi (1.ábra). Ezen mechanizmusok biztosítják a fémionok eljutását és megfelelő eloszlását a sejten és a sejt szervecskéken belül, és ugyanezeknek a mechanizmusoknak köszönhető a fémtolerancia is. Ezeknek a képességeknek az elvesztése hiperérzékenységet okoz. Például a fitokelatin-szintézis deficiens *Arabidopsis* mutáns sokkal érzékenyebb a Cd-ra mint a vad típusú.

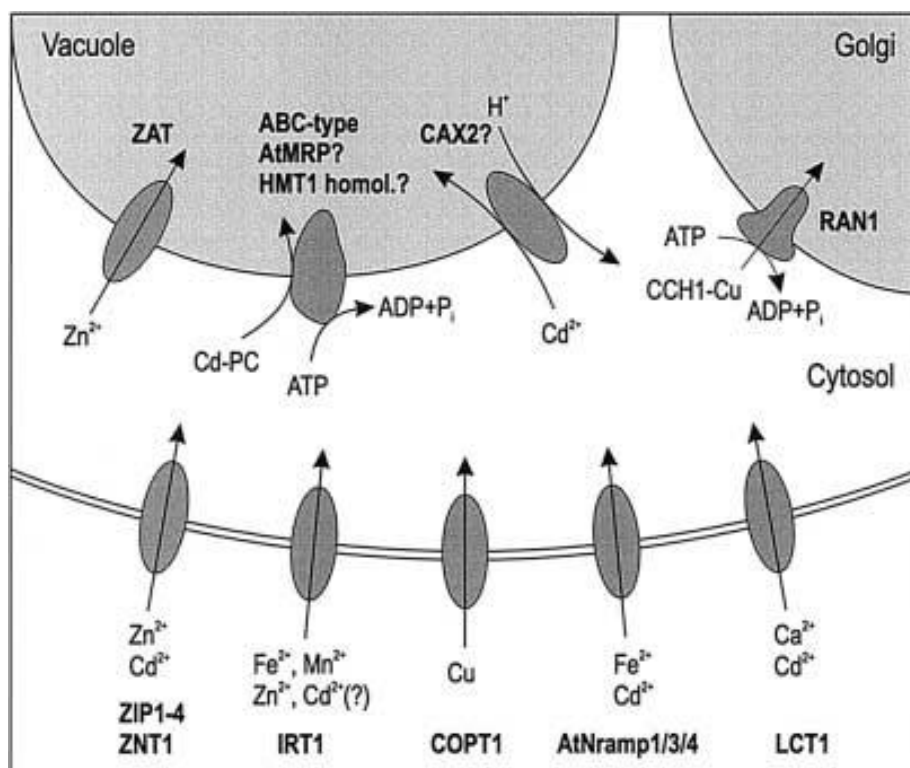
A fémionok sejtbe való bejutását a membránba ágyazott transzporter fehérjék teszik lehetővé. A Fe és Zn felvételét a ZIP családhhoz tartozó transzmembrán transzpoterek mediálják. A ZIP családba tartozó IRT transzporter fehérje akkor íródik át az *Arabidopsis* növényekben, amikor Fe hiány következik be.



1.ábra. Növényi sejtek fém homeosztázisának elemei (Clemens, 2001)

Az élesztőkön végzett kísérletek kimutatták, hogy az IRT transzporter fehérjék a Fe transzportja mellett a Mn, Zn és Cd transzportját is végzik. A nem esszenciális fémek széles

szubsztrátspecifitással rendelkező kation transzporterek útján jutnak be a sejtbe (2 ábra). A sejtbe jutott fémionokat kelátképzők kötik meg, amelyeknek jelentős szerepe van a citoplazma fémion koncentrációjának fenntartásában. Más fémionok, a chaperonok segítségével a sejtszervecskékbe illetve a megfelelő fehérjékhez jutnak. A növények esetében a fontosabb fémkötő vegyületcsoportok a fitokelatinok, metalotioneinek, szerves savak és az aminosavak. A sejten belül történő tárolás a növényi sejtekben a toxikus anyagok kompartmentumába, a vakuólumba történik (Clemens, 2001).



2.ábra. A fémtranszporterek típusai (Clemens, 2001)

A nehézfémek közül a Cd viszonylag mobilis a talajban, illetve az egyik legmérgezőbb elem. A Cd-nak még nem ismertek a biológiai funkciói a növényekben, de gátolja a növekedést, klorózt és a növény elhalását okozza, továbbá befolyásolja a tápanyag felvételt, az aktivált oxigén anyagcserét és a sejtekben zavart okoz. A talaj Cd-al való szennyezése negatív hatással van a növény-mikrobiális közösségek biodiverzitására és aktivitására (He és mtsai, 2013).

A Zn a növények számára nélkülözhetetlen mikroelem, szervezetükben az enzimek kofaktoraként játszik szerepet. Aktívan részt vesz a fehérjeanyagcserében és az auxintermelés serkentése révén a növények növekedés szabályozásában. A Zn többlet klorózist okoz, jellemző a levelek vöröses vagy sárgásbarna elszíneződése és ezáltal a növény visszamarad növekedésben.

A hiperakkumulátor növények nagymennyiségű nyomelemet képesek felhalmozni szöveteikben, anélkül, hogy valamilyen toxikus tünetet mutatnának. Azok a növények, melyek több mint 100 mg/kg Cd, 1000 mg/kg Cu, Co, Cr, Ni és Pb vagy több mint 10000 mg/kg Mn vagy Zn felhalmozására képesek, hiperakkumulátor fajoknak tekinthetők. Több mint 400 növényfajt azonosítottak hiperakkumulátorként, melyek 75%-a Ni-t halmoz fel bázikus talajokban (Sessitsch és mtsai., 2013).

A legegyszerűbb nyomelem toleráló mechanizmus abban áll, hogy a növény bizonyos mennyiséget akumulál szervezetébe. Viszont egyértelmű bizonyíték a mechanizmusra az arzén toleráló növények esetében van. A legtöbb nehézfém toleráns magasabb rendű növény esetében a nyomelem a gyökér szöveteiben nagymértékben akumulálódik. Függetlenül attól, hogy a nyomelemek leginkább a gyökérben vagy a hajtásokban halmozódnak fel, a nyomelemek tolerálása hátterében egy belső mechanizmus áll. A belső méregtelenítés a nyomelemek visszatartására alapszik, például a sejtalkotókhoz való szállításuk nem része az élettani folyamatoknak (vakuólum, sejtfa), a komplexálás a fémkötő fehérjékkel, mint például a metalotioneinek és a fitokelatinok (Sessitsch és mtsai., 2013).

1.3. A PGPR baktériumok és a növények kapcsolata

A növényi rizoszféra a talaj azon része amelybe a növények gyökeréből nagy mennyiségű metabolit jut ki a talajba. Ezek a metabolitok vegyi jelzésként hatnak a mozgásképes baktériumokra, amelyek számukra táplálékforrást jelentenek és lehetővé teszik az elszaporodásukat. Ennek köszönhető, hogy a rizoszférában intenzív mikrobiális aktivitás figyelhető meg. A mikroorganizmusok ebben a régióban érintkeznek a magasabb rendű növények gyökereivel, és speciális kölcsönhatásokat alakítanak ki a növényekkel (szimbiózis, antagonizmus, stb.) (Nihorimbere és mtsai., 2011).

Egyes mikrobák amelyek a rizoszférát népesítik be baktériumok, amelyek nagy sikerrel kolonizálják a növények – így a haszonnövények – gyökerét is. Ezeket a baktériumokat növényi

növekedés serkentő rizobaktériumokként emlegetik (PGPR baktériumok). A PGPR baktériumok igen fontos szerepet töltenek be a növények életében, hiszen egyrészt elősegítik a növények növekedését, másrészt visszaszorítják a patogének elszaporodását. A direkt növényi növekedés serkentése két módon mehet végbe, egyrészt a tápanyag mobilizás és felvétel elősegítése, másrészt pedig a fitostimuláció révén.

A tápanyag mobilizálásban szerepet játszó baktériumok mint a *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* törzsek képesek a például foszfát mobilizálására (szerves és szervetlen forrásból).

Más baktériumtörzseknek fitostimuláló hatásuk van a növényekre, amely a fitohormon (indolecetsav, auxin, citokinin és giberellin) termelő képességüknek köszönhető. Egyes *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* törzsek képesek – eddig nem egészen pontosan jellemzett – növekedés szabályozó és fitohormonokat termelni.

A PGPR baktériumok harmadik típusába a biokontroll baktériumok tartoznak. Ezek a baktériumtörzsek képesek negatívan hatni a fitopatogén mikroorganizmusokra antibiotikumok, illékony szerves vegyületek, toxinok, felületaktív anyagok vagy parazitizmus révén. A *Pseudomonas sp.* fajok esetében több vegyületet is kimutattak, mint a 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazin és hidrogén cianid, míg a *Bacillus* fajok esetében eddig ismert antimikrobiális anyagok a bacillomicin és fengicin (Nihorimbere és mtsai., 2011).

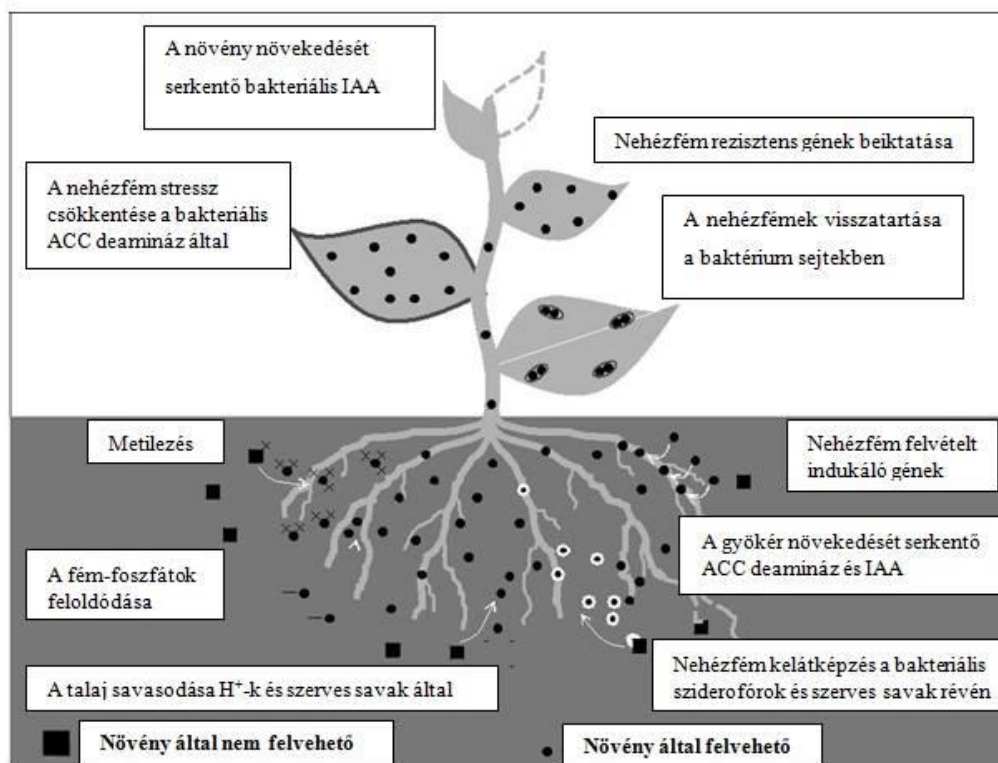
1.4. A növény mikroba kölcsönhatás és a fémek akkumulációja

A nagymértékű nehézfém felhalmozódás a talajban jelenünk egyik fontos leküzdhetetlen problémája, mivel ezek megmaradnak a környezetben. Az ember egészsége és a környezet helyreállítása érdekében szükségeszerű egy új kármentesítési (remediációs) stratégia kifejlesztése. A fitoremediáció egy olyan esztétikus, költséghatékony és környezetbarát technológia, amely során a növények által kilehet vonni vagy ártalmatlanná tenni a szennyező anyagokat (He és mtsai, 2013). A *Brassica juncea* (szareptai mustár) az egyik széleskörben vizsgált növény, amely a legtöbb toxikus nehézfémre toleráns és potenciálisan használható a fitoremediációban. Baudh és Singh (2012) kutatásai igazolták, hogy a szareptai mustár és a ricinus egyaránt tolerálja a talaj magas Cd tartalmát és alkalmas Cd fitoremediációra. A ricinus ökológiailag stresszelt környezetben (szárazság és sótartalom) hatékonyabbnak bizonyult a biomassza termelés

tekintetében, ennek ellenére a szareptai mustár egy egységnyi biomasszára nézve nagyobb mennyiségű Cd-t akkumulált (Bauddh és Singh, 2012). Zn hiperakkumulátor fajként ismerjük a *Thlaspi caerulescens* fajt (Sessitsch, 2013). A *Sedum plumbizincicola* egy újonnan felfedezett Cd és Zn hiperakkumulátor faj, amely nagy hatékonysággal veszi fel mindkét elemet a szennyezett talajokból. Terepen végzett kísérletek bizonyították a *Sedum plumbizincicola* faj magas potenciálját a Cd és Zn extrakciójában (Li és mtsai, 2014).

Mindazonáltal számos tényező korlátozza a fitoremediáció hatékonyságát, többek között alacsony növekedési ráta és kismennyiségű növényi biomassza, a nehézfémek fitotoxicitása és korlátozott fémfelvétel. Mindez arra enged következtetni, hogy egy alternatív megoldásra van szükség a fitoremediáció kihasználására. A biomassza és a nehézfém felvétel növelésére nehézfém felhalmozó növényeket, illetve nehézfém toleráns és növényi növekedést elősegítő rizobaktériumokat (PGPR-plant growth-promoting rhizobacteria) ajánlott használni (He és mtsai, 2013).

A PGPR baktériumok számos mechanizmus által elősegítik a gazdanövény növekedését (3. ábra). Ilyen mechanizmusok a növényi növekedést serkentő anyagok termelése, például az indol-3-ecetsav (IAA), sziderofórok, 1-aminociklopropán-1-karboxil (ACC) deamináz vagy a foszfát mobilizálás képessége. A bakteriális IAA a növény növekedését serkenti, míg az ACC deamináz a nehézfém stresszt csökkenti (Sessitsch és mtsai., 2013). Ezenkívül bizonyított tény, hogy néhány baktériumfaj megváltoztatja a rendelkezésre álló nehézfém mennyiséget sziderofórok és szerves savak termelése által (He és mtsai., 2013). A növény által nem felvehető nehézfémek metilezést, a fém-foszfátok feloldódását okozzák, illetve a talaj savasodását H^+ -k és szerves savak által (Sessitsch és mtsai., 2013).



3. ábra A növény-mikroba kölcsönhatás befolyásolja a nyomelemek akkumulációját a növényekben (Forrás: Sessitsch és mtsai., 2013)

A *Polygonum pubescens* egy újonnan felfedezett Mn-hiperakkumulátor faj, amely széleskörben elterjedt Kínában a bányák környezetében, ahol magas a Mn, Cd, Pb, Zn és a Cr. A *P. pubescens* gyökér zónájából izolált *Rahnella sp. JN6* baktériumtörzs magas Cd, Pb és Zn toleranciát mutatott laboratóriumi körülmények között. Ugyanakkor növényi növekedést serkentő hatását is kimutatták in vitro. Ezért He és mtsai. (2013) a *Rahnella sp. JN6* baktériumtörzs hatását vizsgálta a repce növekedésére és nehézfém akkumulációjára. A Cd, Pb és Zn esetén mind a föld feletti, mind a földalatti szervek nagyobb száraz tömeget és nehézfém koncentrációt mutattak a kontroll mintához viszonyítva.

2. A kutatás célkitűzése

Célunk a bab, a növényi növekedést serkentő baktériumok (PGPR) és a nehézfémek kapcsolatának felderítése. Kutatásunk első lépéseként három baktériumtörzs nehézfém toleranciáját vizsgáltuk. A legnagyobb nehézfém toleranciával rendelkező baktériumtörzs (*Mitsuaria chitosanitabida*) hatását mértük a bab (*Phaseolus vulgaris*) növekedésére, biomasszájára, víztartalmára, nehézfém akkumulációjára nézve. A kutatás azt hívta bizonyítani, hogy az általunk kiválasztott *Mitsuaria chitosanitabida* baktériumtörzs alkalmazható fitoextrakciós eljárás javítására.

3. Anyag és módszer

3.1. Alkalmazott baktériumtörzsek

A kísérletek kivitelezéséhez három baktériumtörzset alkalmaztunk: *Serratia proteomaculans*, *Serratia sp.* és *Mitsuaria chitosanitabida* (3 ábra). A *Serratia proteomaculans* (S10) baktériumtörzs növényi növekedést serkentő tulajdonságai között megemlíthetjük az acetilén redukciót, sziderofór termelést, szerves foszfor mobilizálást és az indolecetsav termelést. A *Serratia sp.* (S5) baktériumtörzs képes a szerves és szervetlen foszfát mobilizálására, indolecetsav termelésre, illetve acetilén redukcióra. A *Mitsuaria chitosanitabida* (M) baktériumtörzs mind az öt tulajdonság esetében pozitív értékeket adott (Laslo és mtsai., kézirat).



3.ábra. Az alkalmazott baktériumtörzsek ferde agaron

3.2. Baktériumok nehézfém-tűrő képességének vizsgálata

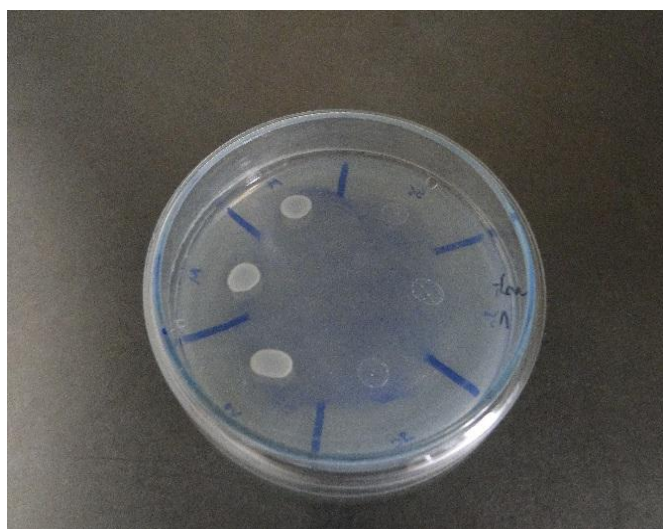
A baktériumok nehézfém-tűrő képességének tesztelésére Nutrient tápagart használtunk. Nehézfém forrásként $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ és $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ sókat alkalmaztunk. A Cd^{2+} esetében: 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, valamint az Zn^{2+} esetében pedig 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 25 mM nehézfém koncentrációt állítottunk be (4 ábra). A baktériumtelepek átmérőjének átlagai, illetve szórásértékei a 2. táblázatban található.

2. táblázat A baktériumok nehézfém-tűrő képességének vizsgálata

Nehézfém	Koncentráció	Baktériumfajok	Telep átmérőjének átlaga (mm)
Zn	0,5 mM	Mitsuaria chitosanitabida	12,9475 ± 2,49
		Serratia sp.	9,8675 ± 2,10
		Serratia proteomaculans	10,975 ± 2,22
	1 mM	Mitsuaria chitosanitabida	10,0475 ± 0,59
		Serratia sp.	8,705 ± 0,64
		Serratia proteomaculans	9,67 ± 0,55
	5 mM	Mitsuaria chitosanitabida	6,45 ± 1,12
		Serratia sp.	0 ± 0,00
		Serratia proteomaculans	6,51 ± 1,36
Cd	0,5 mM	Mitsuaria chitosanitabida	11,215 ± 1,75
		Serratia sp.	9,0925 ± 0,55
		Serratia proteomaculans	9,845 ± 1,03
	1 mM	Mitsuaria chitosanitabida	7,2275 ± 1,63
		Serratia sp.	0 ± 0,00
		Serratia proteomaculans	6,93 ± 2,04
Kontroll		Mitsuaria chitosanitabida	15,485 ± 0,82
		Serratia sp.	12,8875 ± 0,30
		Serratia proteomaculans	11,7325 ± 0,62

3.3. Növényi kísérletek

A bab magokat előbb etil alkohollal, majd hipoklorid (6-14% aktív klór) oldattal 20 percig sterilizáltuk, majd ezt követően hatszor egymásután ultratiszta vízzel öblítettük. 28°C-on Memmert inkubátorban, Petri csészében nedves szűrőpapíron, sötétben hét napon át csiráztattuk. A kicsirázott magok közül mintánként négy, körülbelül egyformán fejlett egyed sterilizált tápanyagdús 1 l térfogatú kertészeti talajba ültettünk, melynek összetétele a 3. táblázatban látható.



4.ábra. A baktériumok tenyésztése nehézfém tartalmú táptalajon

3. táblázat A használt talaj pH-ja és elemi összetétele

pH	5-7
	mg/L
N	150-400
P ₂ O ₅	250
K ₂ O	250-600

Növényenként 1 ml (OD₆₀₀=1,98) baktérium szuszpenziót (*Mitsuaria chitosanitabida*) pipettáztunk a talajba a magok környezetébe.

A baktérium és a nehézfém hatásának kimutatása érdekében 6 kontrollt alkalmaztunk, jelölésük K(1-6). A 4. táblázatban foglaltuk össze az adott kontroll kezelési paramétereit.

4. táblázat Kontroll növények

Elnevezés	Mitsuaria chitosanitabida*	Nhézfém	Nhézfém koncentráció (mM)
K1	-	-	-
K2	+	-	-

K3	-	Cd	0,1
K4	-	Cd	0,5
K5	-	Zn	0,5
K6	-	Zn	3

* (-) a talaj nem tartalmaz/ (+) a talaj tartalmaz

A növényeket kontrollált körülmények között neveltük egy Sanyo MLR-351, Versatile Environmental Test Chamber növénynevelő kamrában 12 napig, 25°C-on, 70% relatív páratartalom és 14 h/nap 2500 lx megvilágítás mellett (5. ábra). A növényeket öt alkalommal 100 ml steril vízzel öntöztük mintánként.



5.ábra. Versatile Environmental Test Chamber növénynevelő kamra

3.4. Nehézfémek hatásának kimutatása

A bab növénykéek szárának és gyökerének hosszát és nedves tömegét mértük le, majd a növényi szervek nedvességtartalom meghatározása céljából 48 órát szárítottuk 105° C-on G-Therm 115 szárítószekrényben (F-Ili Galli) tömegállandóságig (6.ábra). A nehézfém oldatokkal kezelt növények szárának és gyökerének hosszát és biomasszáját egy kontroll mintához viszonyítottuk (n=4).



6.ábra. G-Therm 115 szárítószekrény

3.5. Nehézfémionok bioakkumulációs mértékének meghatározása atomabszorpciós spektrofotométerrel

A nehézfém koncentráció meghatározására Varian Spektra AA 110 típusú atomabszorpciós spektrofotométert használtunk (7. ábra). A növényi minták előkészítését száraz hamvasztással végeztük Gefran 1001 égető kemencében. 1 g előzetesen szárított mintát porcelán tégelybe helyeztünk, majd elhamvasztottuk. A hamvasztás során a hőmérsékletet szobahőmérsékletről

fokozatosan emeltük 450°C-ra 1 óra leforgása alatt, majd 4 órán keresztül ezen a hőmérsékleten tartottuk, amíg fehér vagy szürkés hamut nyertünk. Az így nyert hamu mennyiségét 5 ml 25% HNO₃-ban feloldottuk, majd szűrőpapíron leszűrtük és desztillált vízzel 10 ml térfogatra egészítettük ki. Az előkészített mintákat az atomabszorpciós készülékbe porlasztottuk és leolvastuk az abszorbancia értékeket. A koncentráció meghatározásához előzetesen előkészített standard oldatokat alkalmaztunk, amelyek alapján megszerkesztettük a kalibrációs görbét.



7.ábra. Varian Spektra AA 110 típusú atomabszorpciós spektrofotométer

3.6. Statisztikai analízis

Az adatok feldolgozására és ábrázolására a Microsoft Office Excel Worksheet 2007-es verziót és a Past.exe 2.17c statisztikai kimutatásokat készítő programot használtuk.

4. Eredmények és kiértékelése

4.2. A nehézfémek hatása a növényi növekedésre

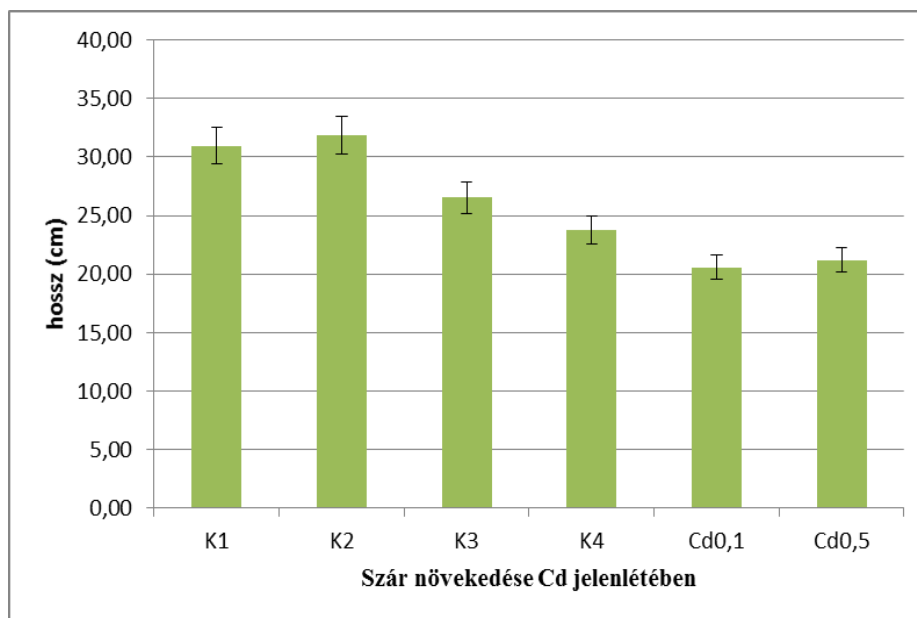
A Cd és a Zn hatását vizsgáltuk a bab fejlődésére és növekedésére. 12 napig növeltük a növényeket, majd lemértük a növények gyökerének és szárának hosszát, illetve tömegét.

Meghatároztuk a növények nedvességtartalmát, mivel a szakirodalmi adatok szerint a Cd jelentősen befolyásolhatja a vízfelvételt. A mért adatokat az 4. táblázat tartalmazza, ahol az egyes paraméterek átlaga és átlag szórása van feltüntetve.

1. táblázat A szár és gyökér tömegének, ill. hosszának változása a nehézfém koncentráció függvényében (n=4)

			Cd		Zn		Kontroll
			0,1 mM	0,5 mM	0,5 mM	3 mM	
Baktérium nélkül	szár	hossz (cm)	26,525 ±3,59	29,37 ±13,97	21,28 ±9,48	21,90 ±4,89	30,97 ±4,10
		biomassza (g)	4,8575 ±1,61	4,18 ±1,96	3,00 ±2,25	3,04 ±1,21	4,67 ±1,52
	gyökér	hossz (cm)	21,05 ±1,47	15,13 ±0,72	19,98 ±6,29	20,40 ±4,62	25,80 ±4,83
		biomassza (g)	3,1275 ±0,63	2,36 ±0,99	1,56 ±1,00	1,76 ±0,87	2,11 ±0,58
<i>Mitsuaria chitosanitabida</i>	szár	hossz (cm)	20,575 ±6,40	21,20 ±5,44	20,75 ±4,99	31,45 ±7,77	31,87 ±5,87
		biomassza (g)	2,9325 ±1,27	3,38 ±0,41	3,50 ±0,88	3,30 ±1,08	4,66 ±1,64
	gyökér	hossz (cm)	17,275 ±3,92	16,80 ±1,81	18,90 ±1,62	19,30 ±2,95	21,97 ±5,22
		biomassza (g)	1,4075 ±0,36	1,94 ±0,14	1,72 ±0,52	1,74 ±0,70	1,63 ±0,80

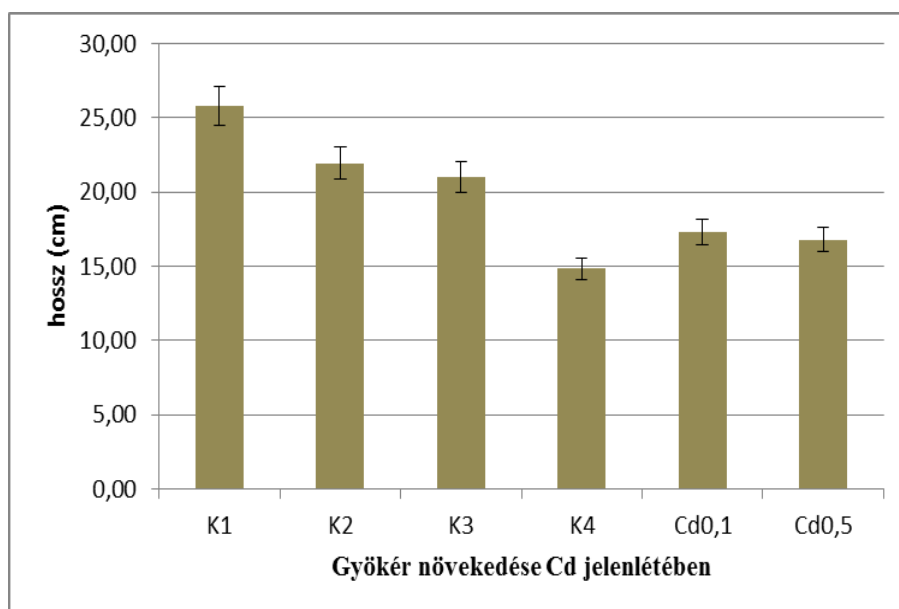
A 8. ábra szemlélteti a szár növekedését Cd jelenlétében, a K2 kontroll (nehézfém nélkül, baktérium jelenlétében) esetében jelentős növekedést figyelhetünk meg. A K1 kontroll (nehézfém nélkül, baktérium nélkül), K3 kontroll (Cd 0,1 mM, baktérium nélkül), K4 kontroll (Cd 0,5 mM, baktérium nélkül) esetében a növények szárának növekedése csökkenést mutatott. A 0,1 mM Cd-al kezelt kontroll és minta értékei között jelentős különbség figyelhető meg, a baktériummal kezelt minta esetében a hajtás rövidebb, mint a kontroll. A két mintasor közötti különbséget Mann-Whitney statisztikai teszttel ellenőriztük, amely nem adott statisztikailag szignifikáns eredményt (Mann-Whitney U teszt, $z=-1,299$, $p=0,1939$). Hasonló összefüggés megfigyelhető a szár növekedése esetében 0,5 mM-os Cd jelenlétében, ahol a baktérium törzs jelenléte csökkentette a szár hosszának fejlődését, de szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető (Mann-Whitney U teszt, $z=-0,176$, $p=0,8597$).



8. ábra Szár növekedése Cd jelenlétében

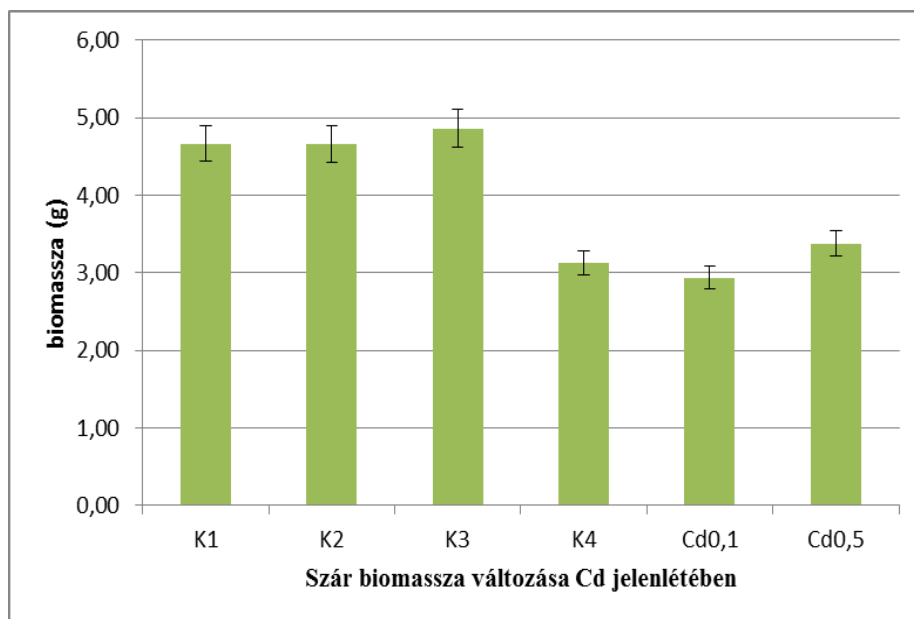
A Cd hatását a bab növények gyökerének növekedésére a 9. ábra szemlélteti, hogy a K1 kontroll (nehézfém nélkül, baktérium nélkül) esetében kiemelkedően magas értéket mértünk, mely meghaladja a többi minta egyre csökkenő értékeit. A K4 (Cd 0,5 mM, baktérium nélkül) kontroll értéke a legkisebb, ez azzal magyarázható, hogy magas koncentrációban a nehézfém gátolta a

növény növekedését, illetve a baktérium hiánya is hozzájárult a növekedés csökkenéséhez. Észrevehető, hogy a baktérium nélküli kontroll esetében (K3) a gyökér növekedése nagyobb, mint a baktériummal kezelt minta esetében.



9. ábra A gyökér növekedése Cd jelenlétében

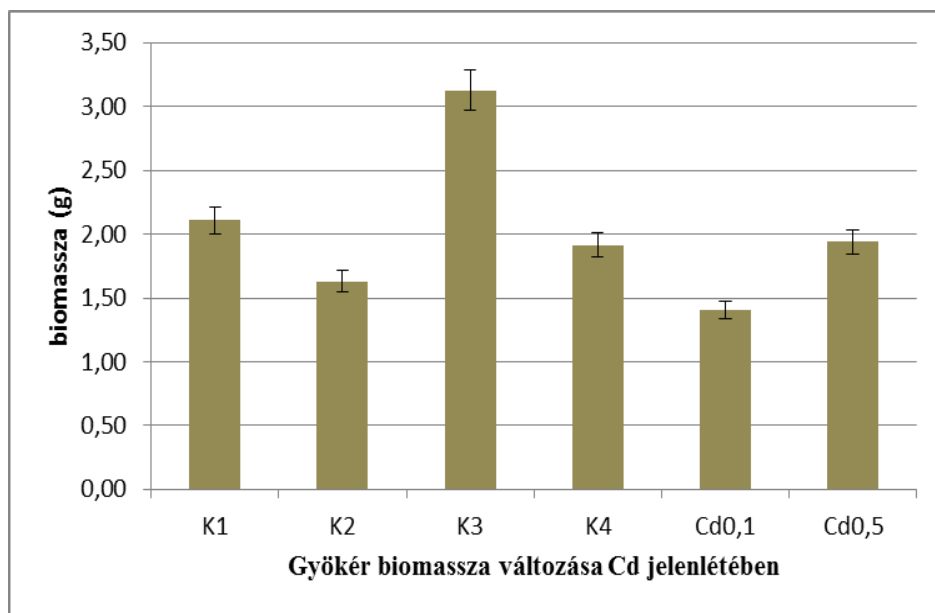
A szár biomasszáját tekintve észrevehető, hogy kiemelkedően magas értéket kaptunk a K3 kontroll (Cd 0,1 mM, baktérium nélkül) esetében (10. ábra). A két mintasor közötti különbséget Mann-Whitney statisztikai teszttel ellenőriztük, amely nem adott statisztikailag szignifikáns eredményt (0,1 mM Cd esetében Mann-Whitney U teszt, $z=-1,299$, $p=0,1939$, 0,5 mM-os Cd esetében Mann-Whitney U teszt, $z=-0,176$, $p=0,8597$).



10. ábra Szár biomassza változása Cd jelenlétében

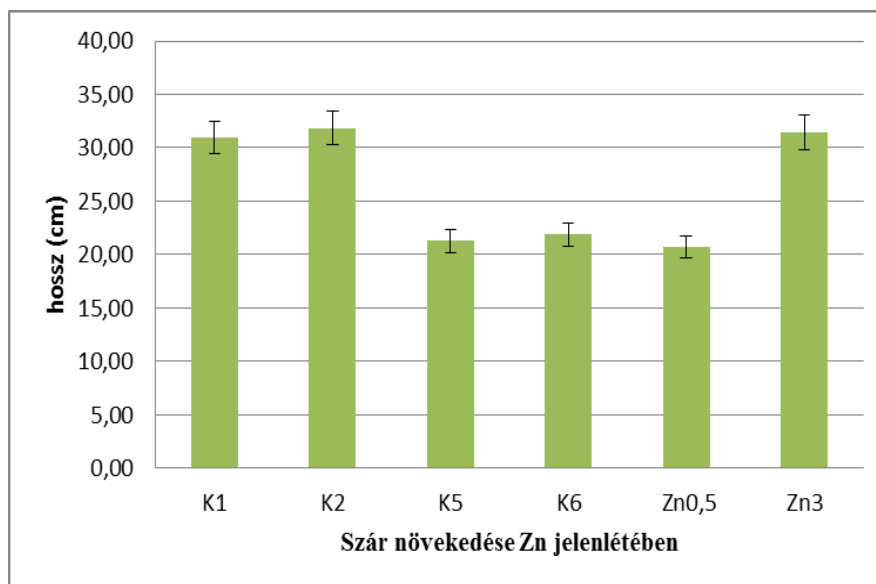
A gyökér biomasszáját tekintve is észrevehető, hogy kiemelkedően magas értéket kaptunk a K3 kontroll (Cd 0,1 mM, baktérium nélkül) esetében (11. ábra). A baktérium jelenléte Cd-al kezelt növények esetében a gyökér biomasszájának csökkenését okozta.

A 12. ábrán látható a szár növekedése Zn jelenlétében, a K2 kontroll (nehézfém nélkül, baktérium jelenlétében) és Zn 3 (Zn 3 mM, baktérium jelenlétében) minta esetében jelentős növekedést figyelhetünk meg. A K1 kontroll (nehézfém nélkül, baktérium nélkül), a K5 kontroll (Zn 0,5 mM, baktérium nélkül) és a K6 kontroll (Zn 3 mM, baktérium nélkül) esetében is a növények szárának növekedése csökkenést mutatott.



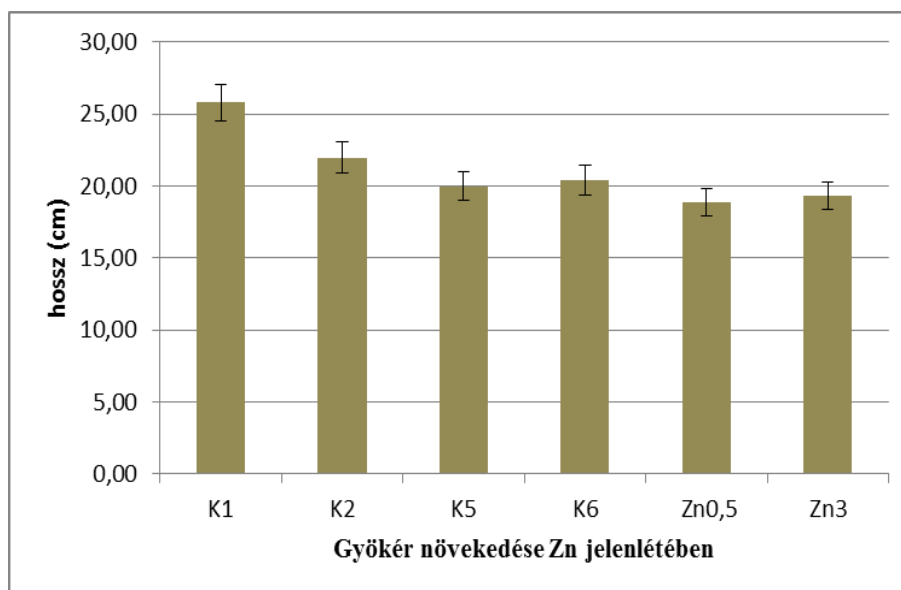
11. ábra Gyökér biotassza változása Cd jelenlétében

A K5 (Zn 0,5 mM, baktérium nélkül) kontroll és a Zn 0,5 minta értékei között nincs jelentős különbség, a baktérium nem befolyásolta a szár hosszanti növekedését. Mann-Whitney statisztikai tesztet alkalmaztunk a Zn 0,5 mintára, ahol ugyancsak nem figyeltünk meg statisztikailag szignifikáns eredményt (Mann-Whitney U teszt, $z=-0,5808$, $p=0,5614$). A Zn 3 mintára kapott értékek alapján elmondható, hogy a K6 kontrollhoz viszonyítva a baktérium jelenléte pozitív hatást gyakorol a szár növekedésére (Mann-Whitney U teszt, $z=-1,588$, $p=0,1124$).



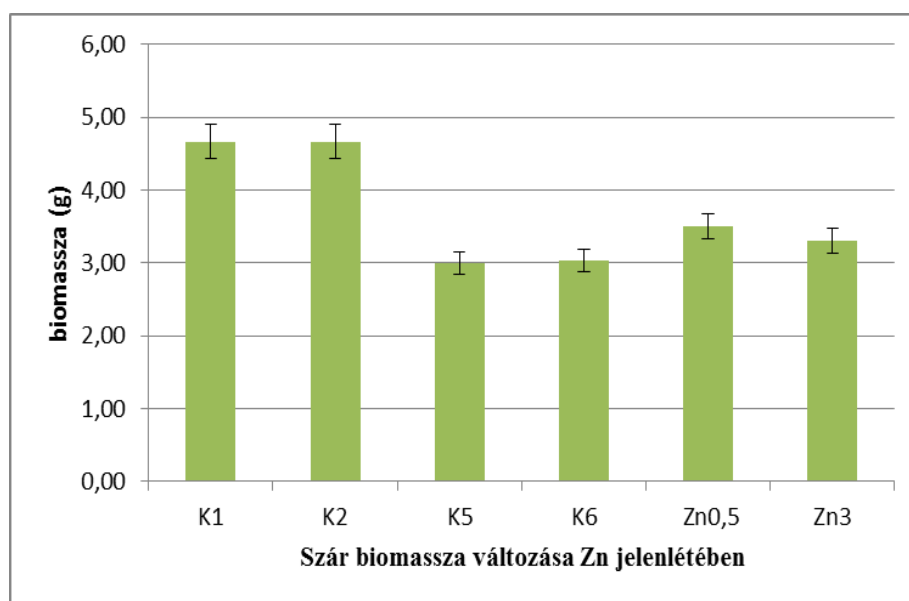
12. ábra Szár növekedése Zn jelenlétében

A Zn hatása a bab növények gyökerének hosszanti növekedésére a 13. ábrán látható. Megfigyelhető, hogy a K1 kontrollhoz (nehézfém nélkül, baktérium nélkül) viszonyítva alacsonyabb értékeket mértünk. Úgy a baktériummal nem kezelt, mint a kezelt minta esetében a Zn nem befolyásolta a gyökér hosszának növekedését.



13. ábra Gyökér növekedése Zn jelenlétében

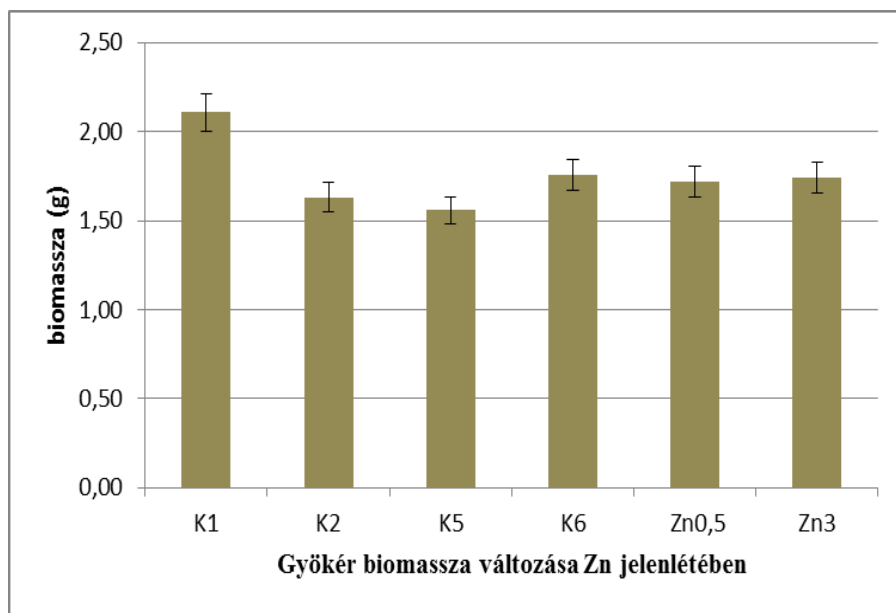
A szár biomassza változását a 14. ábra szemlélteti. A K5 (Zn 0,5 mM, baktérium nélkül) és K6 kontrollokhoz (Zn 3 mM, baktérium nélkül) viszonyítva a baktériummal kezelt minták (Zn 0,5, Zn 3) esetében a biomassza mennyiségének növekedése észlelhető. A két mintasor közötti különbséget Mann-Whitney statisztikai teszttel ellenőriztük, amelynek eredménye nem mutatott jelentős eltérést (0,5 mM Zn esetében Mann-Whitney U teszt, $z=0,1443$, $p=0,8852$, 3 mM-os Zn esetében Mann-Whitney U teszt, $z=-0,2904$, $p=0,7715$).



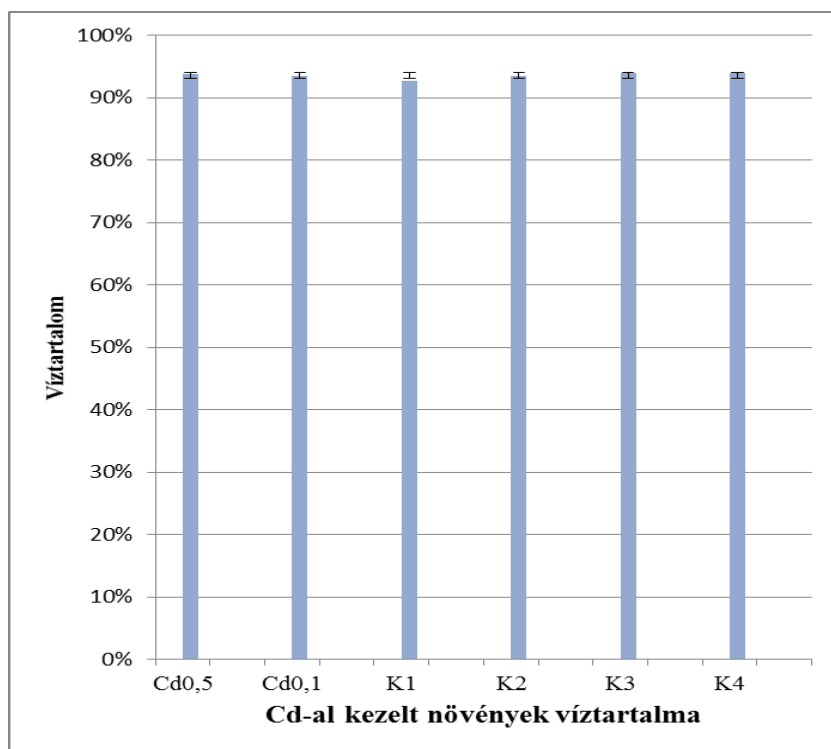
14. ábra Szár biomassza változása Zn jelenlétében

A gyökér biomasszájának változását Zn jelenlétében a 15. ábra mutatja, melyen észrevehető, hogy kiemelkedően magas értéket kaptunk a K1 kontroll (Zn 0,5 mM, baktérium nélkül) esetében.

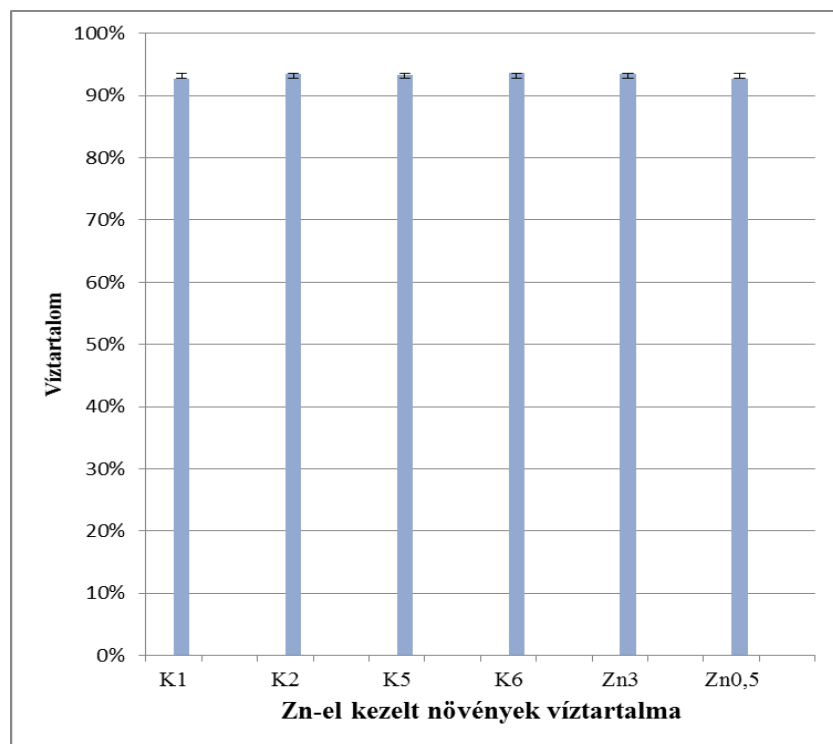
A bab víztartalmát tekintve sem a Cd az alkalmazott koncentrációkban (0,1 mM; 0,5 mM), sem a Zn esetében alkalmazott koncentrációkban (0,5 mM; 3 mM) nem változott a víztartalom a használt nehézfém, illetve a baktériumok jelenlétében (16.-17. ábra).



15. ábra Gyökér biomassza változása Zn jelenlétében



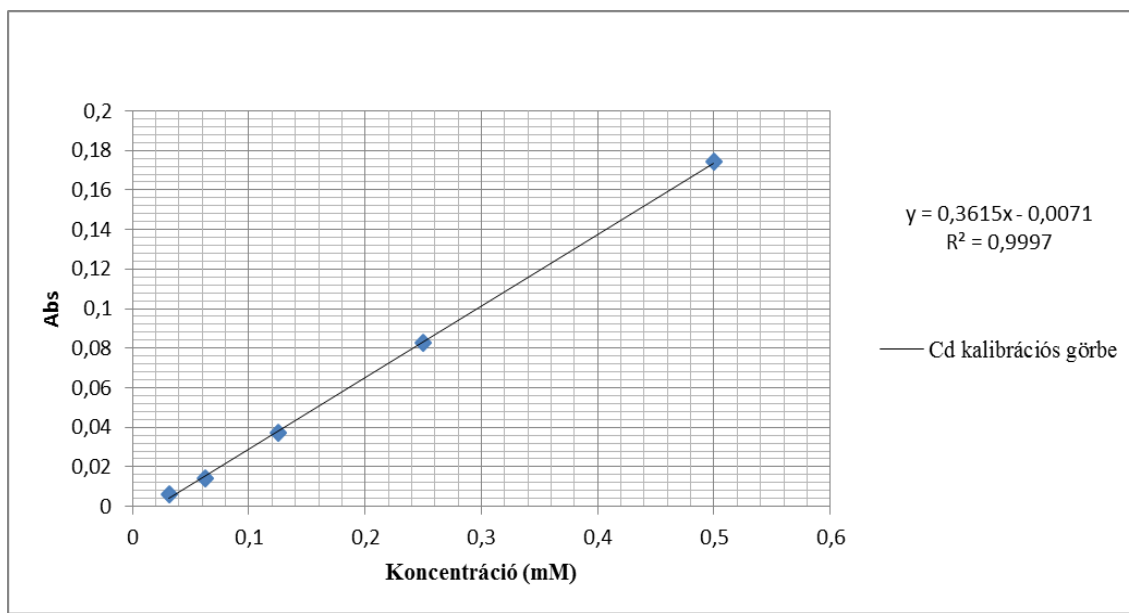
16. ábra A Cd-al kezelt növények víztartalma



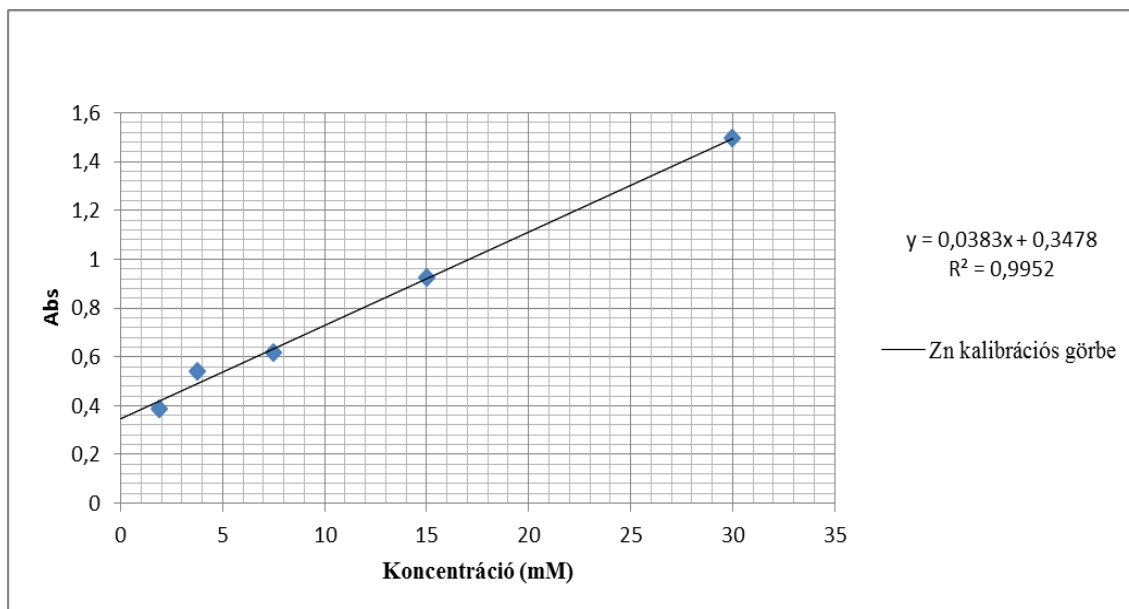
17. ábra A Zn-el kezelt növények víztartalma

4.1. A nehézfémek akkumulációja

A nehézfémek (kadmium és cink) mennyiségének meghatározása céljából standard oldatokat készítettünk mM koncentrációban és lemértük az oldatok abszorbancia értékeit atomabszorpciós spektrofotométerrel. A 18-19-as ábrán figyelhetők meg a kapott kalibrációs görbék.



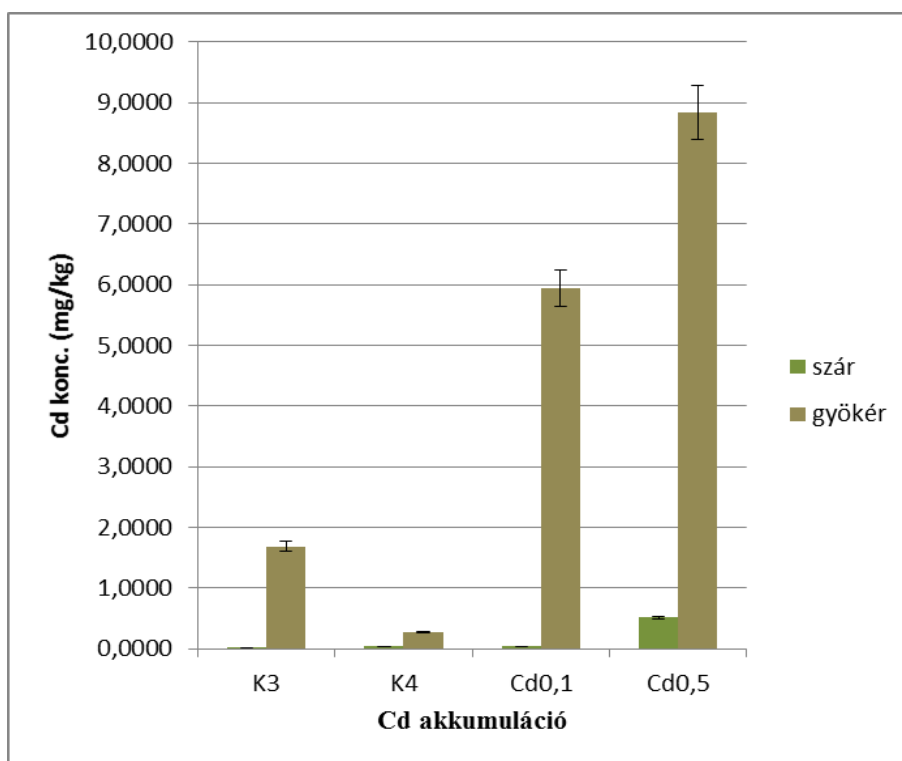
18. ábra A kadmium (Cd) kalibrációs görbéje



19. ábra A cink (Zn) kalibrációs görbéje

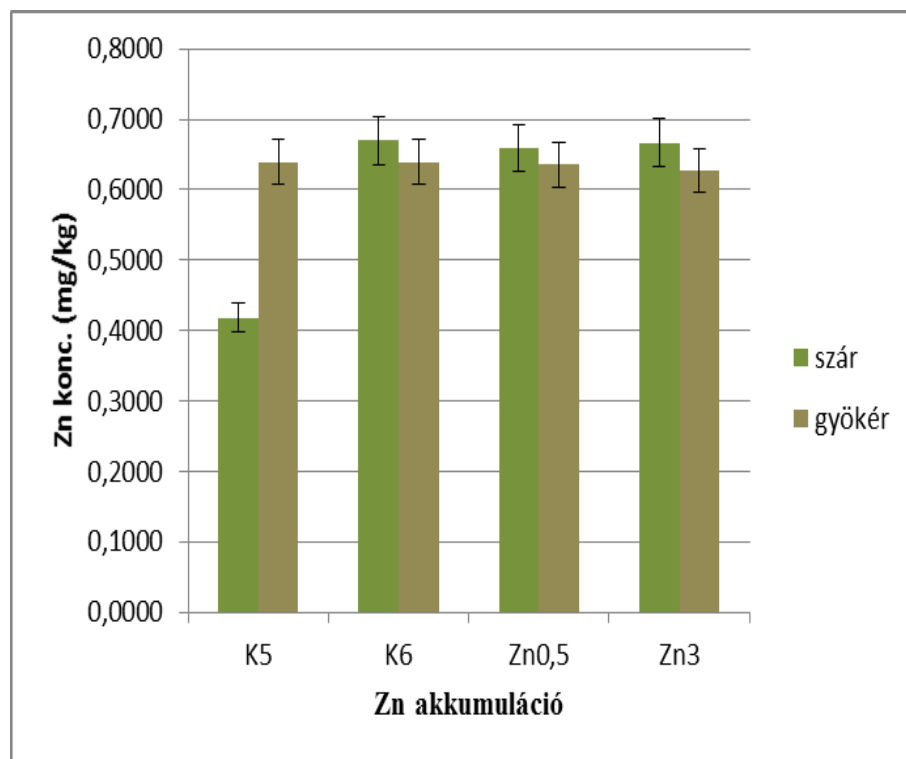
A Cd akkumulációját a baktérium jelenléte nagymértékben növelte amint a 20. ábrán látható. A Cd 0,1 (0,1 mM Cd, baktérium) minta 3,52x nagyobb mennyiségű nehézfémeket akkumulált a K3 kontrollhoz képest (0,1 mM Cd, nincs baktérium). A talajba juttatott nehézfém koncentrációval arányosan nő a növényi mintákba akkumulálódott nehézfém mennyiség. A gyökér nehézfém

tartalma jóval alacsonyabb a szárban tapasztaltnál, hiszen a nehézfém elsőként a gyökérbe jut be a gyökérszőröcskéken keresztül, és a gyökérből a szárba való szállítás (transzlokáció) lehet gátolt, illetve egy lassú folyamat eredménye.



20. ábra Kadmium (Cd) akkumulációja gyökérben és szárban

A Zn felvételt a 21. ábra szemlélteti, amelyen megfigyelhető, hogy a felvett Zn koncentráció 0,4-0,7 mg/kg értékek között mozog. Mivel a Zn egy mikroelem, a bab (*Phaseolus vulgaris*) szabályozza a Zn felvételt, így a növényben egy állandó koncentrációjú Zn található. Az általunk cinkkel kezelt növények a Zn-t nem akkumulálták, csak a számukra szükséges mennyiséget vették fel.



21. ábra Cink (Zn) akkumulációja gyökérben és szárban

5. Következtetések

- A PGPR baktériumtörzs hatására (*Mitsuaria chitosanitabida* (M)) megfigyelhető, hogy a bab növénykéék hajtása intenzívebb növekedést mutatott. A PGPR baktérium és a Cd együttes hatására viszont a bab növények hajtása fejlődött a leggyengébben. A *Mitsuaria chitosanitabida* (M) törzs annak ellenére, hogy nehézfém hiányában elősegítette a bab növény növekedését, nehézfém jelenlétében serkentette a nehézfém által okozott stressz hatását.
- A bab növénykéék víztartalmát egyik nehézfém, valamint a baktériumtörzssel történő beoltás sem befolyásolta a használt koncentrációkban.
- A bioakkumuláció a kadmium esetében növekedést mutat a rendelkezésre álló nehézfém mennyiségével és a baktérium jelenlétével. A Cd akkumulációjában megfigyelhető, hogy a *Mitsuaria chitosanitabida* (M) PGPR baktériummal való beoltás növelte a bab növényekben akkumulálódott nehézfém mennyiséget. A Zn esetében, mivel a Zn mikroelem, nem figyelhettük meg a Zn akkumulációját, viszont a felvett Zn mennyiség 0,6-0,7 mg/l értéknél eléri a maximumot.
- Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a bab növények gyökere jelentős akadályt képez a nehézfémek felvételében és igen nagy immobilizáló kapacitással bír.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak dr. Laslo Éva adjunktusnak a kísérletek során használt PGPR baktérium törzsekért, valamint a mikrobiológiai és növényi kísérletek során nyújtott önzetlen segítségéért és hasznos tanácsaiért.

Irodalomjegyzék

1. Brooker, R.J., Widmaier, E.P., Graham, L.E., Stiling, P.D., Biology, 2-ik kiadás, McGrawHill Kiadó, New York
2. Chen L., Luo S., Xiao X., Guo H., Chen J., Wan Y., Li B., Xu T., Xi Q., Rao C., Liu C., Zeng G., 2010, Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils, *Applied Soil Ecology* 46: 383-389
3. Clemens, S. 2001, Molecular mechanism of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.
4. He H., Ye Z., Yang D., Yan J., Xiao L., Thong T., Yuan M., Cai X., Fang Z., Jing Y., 2013, Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*, *Chemosphere* 90: 1960-1965
5. Laslo É., Ábrahám B., György É., Lányi Sz., Mara Gy., Bacterial strains with nutrient mobilization ability from Ciuc Mountains, Transylvania
6. Li Z., Wu L., Hu P., Luo Y., Zhang H., Christie P., 2014, Repeated phytoextraction of four metal-contaminated soils using the cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*, *Environmental Pollution* 189: 176-183
7. Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2), 327-337
8. Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W. W., Fallmann K., Puschenreiter M., 2013, The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils, *Soil Biology & Biochemistry* 60: 182-194
9. Srivastava S., Verma P. C., Chaudhry V., Singh N., Abhilash P. C., Kumar K. V., Sharma N., Singh N., 2012, Influence of inoculation of arsenic/resistant *Staphylococcus arlettae*

on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46, Journal of Hazardous Materials, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.019>