

XXXII. OTDK Biológia szekció

**Terméshozam növelést fokozó talajoltó baktériumok, -
savanyú kémhatású mezőgazdasági talajokban történő-
nyomon követése egy 16 hetes vizsgálati periódus során**

Készítette:

Kari András

Biológia MSc., II. évfolyam

**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar**

Témavezetők:

Nagymáté Zsuzsanna, Romsics Csaba

Budapest 2014

Tartalomjegyzék:

I. Bevezetés	4
<i>1. Magyarország talajainak kémhatása</i>	<i>5</i>
<i>2. Műtrágya használata, és annak veszélyei</i>	<i>6</i>
<i>3. Növényi növekedést serkentő rizobaktériumok–PGPR.....</i>	<i>7</i>
1. Direkt mechanizmusok	7
a) Szabad légköri N ₂ -én fixáció	7
b) Növények ellátása biológiailag felvehető foszforral	8
c) Növények további esszenciális tápanyagokkal való ellátása ...	8
d) Sziderofór termelő PGPR organizmusok.....	9
e) Baktériumok által termelt növényi hormonok	9
2. Indirekt mechanizmusok.....	9
3. A PGPR törzsek megtelepedését, hatékonyságát befolyásoló tényezők	10
II. Célkitűzés	11
III. Anyag és Módszer	11
<i>1. Alkalmazott PGPR törzsek</i>	<i>11</i>
<i>2. In silico modellrendszer kidolgozása</i>	<i>12</i>
1. Elméleti háttér	12
2. DNS izolálás a vizsgálatba vont törzsekből	12
3. Polimeráz láncreakció (PCR)	13
4. Agaróz gélelektroforézis.....	14
5. Bázissorrend meghatározás	14
<i>3. Szabadföldi kísérlet sorozat.....</i>	<i>15</i>
1. Kezelések	15
2. Mintavétel.....	15
3. A minták feldolgozása	16
4. Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP)	17
a) DNS-izolálás	17
b) Polimeráz láncreakció (PCR)	17
c) Agaróz gélelektroforézis	17
d) Restrikciós emésztés.....	18
e) Etanol precipitáció	18
f) Kapilláris elektroforézis	19

g) Adataelemzés	20
5. Statisztikai értékelés	21
IV. Eredmények.....	21
1. In silico modellrendszer létrehozása.....	21
2. A talajminták bakteriális diverzitása és az oltás hatásának vizsgálata	23
1. Az oltást megelőzően a vizsgált talajok teljes bakteriális közösségének szerkezete....	23
2. Az oltás után vizsgált talajok teljes bakteriális közösségének szerkezete	25
3. A talajoltások hatásának nyomon követése.	28
4. A vizsgálatba vont oltótörzsként alkalmazott 7 baktérium aránya a teljes bakteriális közösségen belül.....	32
V. Összegzés	34

I. Bevezetés

A fenntartható mezőgazdaság a környezeti és természeti értékeket előtérbe helyező holisztikus szemléletű gyakorlat. A meglévő erőforrásokra épít és képes a környezeti, társadalmi, gazdasági érdekeket egyforma súllyal mérlegelni, miközben kielégíti az emberiség egészséges táplálék- és rostigényét. Fontossága és aktualitása megkérdőjelezhetetlen a mai gazdasági és társadalmi környezetben. Ezen környezettudatos gyakorlat részét képezik azon mikroorganizmusok, amelyek a növények gyökérzetét kolonizálják és növekedésüket, direkt és indirekt módokon, befolyásolhatják. Egységes néven, KLOEPPER J.– SCHROTH M. (1980) javaslata után, e szervezeteket, növényi növekedést elősegítő rizobaktériumoknak (plant growth- promoting rhizobacteria–PGPR) nevezzük.

A PGPR mikroorganizmusok talajoltó baktériumkészítmény formájában való alkalmazása a kevésbé jó adottságú, vagy leromlott mezőgazdasági területeken, már hazánkban is bevett gyakorlat. Jelenleg, azonban még nem olyan széles körben kerülnek felhasználásra, mint a szintetikus módon, ipari körülmények között előállított, a növények számára esszenciális makro-, illetve mikroelemeket tartalmazó műtrágyák. A műtrágyák leggyakoribb formái többek között, a nagy nitrogén- (ammónium-szulfát, pétisó), foszfor- (kalcium-foszfát, szuperfoszfát), vagy kálium-tartalmúak (kálium-klorid). Ezen anyagok helytelen alkalmazása veszélyforrásnak számít mind a környezetre, mind a társadalomra nézve. Többek között, ezen kockázati tényezők miatt is a fenntartható mezőgazdaság, ezen belül is a PGPR mikroorganizmusok használata, a társadalomban egyre nagyobb jogot nyer.

Munkánk alapját képezte egy savanyú mezőgazdasági talajon a Biofill Kft. által előállított terméshozamot növelő különböző bakteriális oltóanyagok vizsgálata.

Célunk volt a kijutatott PGPR baktérium törzsek a talajban jelenlevő baktériumközösségen belüli arányának időbeli változásának nyomon követése, molekuláris ujjlenyomat módszer alkalmazásával. Ehhez Terminális- Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP) molekuláris technikát alkalmaztunk, amely megfelelő a mikrobiális közösségek szerkezetének és változásának vizsgálatára (EGERT M.–FRIEDRICH M., 2003).

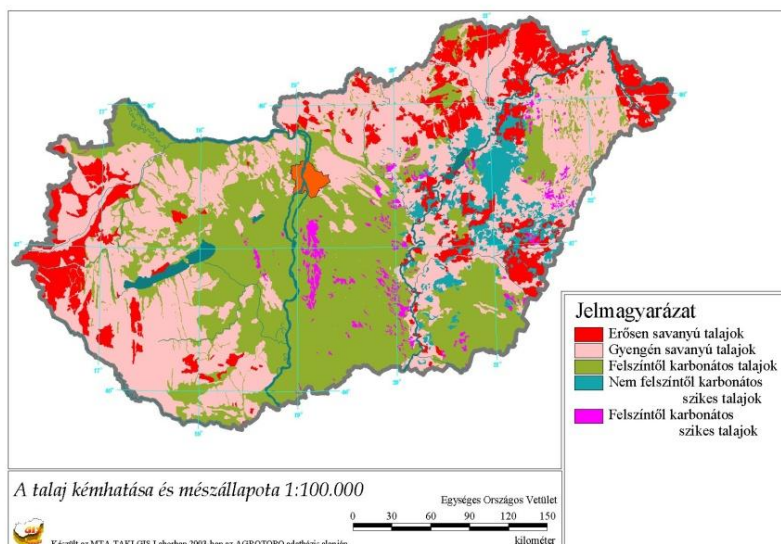
1. Magyarország talajainak kémhatása

Magyarország talajainak közel a felét, a mezőgazdasági termelés számára is optimálisnak tartott, semleges (pH 6,6-7,3) és gyengén savanyú (pH 5,5-6,5) kémhatású területek teszik ki (STEFANOVITS P., 1963). Ehhez képest, a haszonnövény termesztésre kevésbé ideális, savanyú (pH 4,5-5,4) és lúgos (pH 8,5-9,0) területek szintén hasonló arányban fordulnak elő. A növények számára esszenciális tápelemek, mint például -N, P, K, Mg, Zn, Fe, Mn, Ca, Ni -immobilizálódását illetve mobilizálódását a talaj kémhatása határozza meg. Ebből kifolyólag a talaj szélsőséges pH-ja - erősen savas, illetve erősen lúgos-nagymértékben befolyásolja a növények számára hozzáférhető ionok mennyiségét. Egyes esetekben a tápelemek a növények számára hozzá férhetetlenné válnak, amely hiánybetegségek kialakulásához vezethet. Az erősen savanyú talajok (1. táblázat) növényzete komoly tápanyaghiánnyal néz szembe, a talaj tápanyagokban és kationokban elszegényedik (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+). Továbbá akár egyes fémionok (mangán, vas, alumínium) koncentrációja toxikussá válhat a talajban, amely veszélyezteti a növényeket (MUCSI L., 1993). Hasonlóan csökkent termőképesség jellemzi az erősen lúgos (1. táblázat) talajokat, ahol többek között nehezzé válik a tápelemek felvétele a növényzet számára, mint például a foszfát illetve a vas esetében, melyek kicsapódnak oldhatatlan só formájában (CSOMA Z., 2010).

Ezen hatások kivédése komoly nehézségeket jelentenek a mezőgazdasági növénytermesztés során, mely következtében az erősen savas, illetve lúgos területek termelékenységéje jóval elmarad az optimálisan elérhető terméshozamhoz képest (CSOMA Z., 2010).

erősen savanyú	<4,5 pH
savanyú	4,5-5,4 pH
gyengén savanyú	5,5-6,5 pH
közömbös	6,6-7,3 pH
gyengén lúgos	7,4-8,4 pH
lúgos	8,5-9,0 pH
erősen lúgos	>9,0 pH

1. táblázat A hazánkban is előforduló talajok, pH értékei alapján való besorolás, a New York-i Állami egyetem adatai szerint (www.efs.edu)



1. ábra Magyarország talajinak kémhatása és mészállapota
(Készült az MTA TAKI GIS Laborban az AGROTOPO adatbázis alapján 2003-ban)

Hazánk talajtakarójának (1.ábra) 43%-a gyengén savas, 38%-a lúgos (karbonátos), 13%-a erősen savas, míg 6%-a erősen lúgos kémhatású terület (STEFANOVITS P., 1963). Az 1. ábrán feltüntetett karbonátos talajok a talaj mészállapotára (Ca^{2+} tartalmára) vonatkoznak. A megfelelő mészállapot kedvezően hat a talajok morzsalékosságára, illetve a szerkezeti elemek stabilitására, serkenti azon mikroorganizmusok aktivitását, amelyek képesek a tápelemek mobilizálására. A Ca^{2+} a növények számára esszenciális tápanyag, amely hiányában fejlődési rendellenességek, klorofill hiány miatti sárgulás alakul ki (klorózis). A mészhiányos állapotok a talaj savanyodásához vezetnek, amelynek következtében megbomlik a talaj stabil szerkezete, felborul a levegő- és vízháztartása, kimosódnak az ionok.

2. Műtrágya használata, és annak veszélyei

A helyes elveken nyugvó, jól megtervezett műtrágyázás, a környezetre káros mellékhatások nélkül képes a talaj tápanyaghiányát pótolni.

A helytelen, előre nem megtervezett, műtrágya felhasználás elősegítheti többek között az eutrofizációt (HOWARTH R. és MARINO R., 2006), a talajban jelenlevő különböző ionok kimosódást (SIYAL A. et al., 2012) továbbá a környezet (légkör, talajvizek) ammóniával való szennyeződését (MCKAGUE K., 2005), a túlzott és nem megtervezett műtrágya használat szennyezi a felszíni és felszín alatti vizeket nitráttal, nitrittel, nitrozaminokkal vagy akár nitrozamidokkal (MALIK M. et al., 1981 ; DORAN W., 2002.). Ezen kívül nagymértékű zavart okoz a teljes agro-ökoszisztéma szerkezetében, és hozzá járul a mikroorganizmusokra,

növényekre, állatokra és emberre veszélyes anyagok megjelenéséhez (pl: nitrozaminok, mikotoxinok) (BARABASZ W. et al., 2001).

Többek között, ezen kockázati tényezők miatt, és az agrárgazdaságok nitrogén, foszfor, és kálium műtrágya használatának költséghatékony csökkentése végett, a fenntartható mezőgazdasági termelés egyik lehetőségeként, egyre szélesebb körben használják a növényi növekedést serkentő rizobaktériumokat (PGPR) talajerő pótló készítmények formájában. Ezen mikroorganizmusokat nemcsak mezőgazdasági, kertészeti célokra használják fel, hanem esetenként erdő, illetve környezet restaurálásra is (LUCY M. et al., 2004).

3. Növényi növekedést serkentő rizobaktériumok –PGPR

A növényi növekedést serkentő rizobaktériumok–PGPR, kifejezést először KLOEPPER J. és SCHROTH M. fogalmazták meg az 1980-as évek elején, azokra a baktériumokra, amelyek a növények gyökerét kolonizálják és anyagszere sajátásaik révén azok növekedését serkentik, illetve fokozzák azok stressztűrő képességet. Ilyenek például az *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* nemzetségbe tartozó egyes baktérium fajok.

A PGPR mikroorganizmusok növényekre gyakorolt hatásai közé tartozik, hogy növelhetik a csírázási sebességet, a gyökeresedés mértékét, a levél klorofill, magnézium és nitrogén mennyiségét, a növény protein tartalmát, hidraulikus aktivitását, szárazságtűrő képességet, a hajtás és gyökér tömeget, illetve csökkenthetik a levél öregedés mértékét. Továbbá képesek lehetnek a növények számára rezisztenciát biztosítani egyes betegségekkel szemben (LUCY M. et al., 2004).

Mindezen hatásaikat a PGPR szervezetek direkt - mint pl.: N_2 -én fixáció, hormon- és sziderofór termelés -, illetve indirekt módon - antibiotikum és sejtfal lizáló enzim termelés-revén képesek kifejteni.

1. Direkt mechanizmusok

a) Szabad légköri N_2 -én fixáció

A légköri N_2 -én megkötésére úgynevezett diazotróf prokarióták képesek. A N_2 -én redukciót nitrogénáz enzimük révén katalizálják. A szabadon élő N_2 -én-fixáló PGPR mikroorganizmusok asszociatív szimbiózison keresztül, képesek a növényt ammóniával ellátni. Vannak olyan N_2 -én fixációban jelentős mikroorganizmusok, amelyek a gyökérzet, gyökérszőrös zónájában kifejlődő gyökérgümőkben élnek szimbiózisban a növényel. Ezek a

Rhizobium fajok, melyek a *Fabaceae* (pillangós virágúak) család tagjaival élnek együtt, de képesek más családba tartozó növények (pl: *Raphanus sativus* - retek) növekedésének serkentésére is (ANTON H. et al., 1998).

Ezen mikroorganizmusok főleg fakultatív anaerob, mikroaerofil szervezetek, amelyek a N_2 -én fixációt a normál O_2 szintnek csupán az egy-husadánál ($<25 \mu M$) képesek elvégezni (FISCHER M. 1994), és döntőrészt a következő nemzetségekbe tartoznak: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*. Az aerob *Azotobacter* nemzetségbe tartozó szervezetek nitrogenáz enzim komplexe egy konformációs védelmet biztosító proteinnel rendelkezik, így képesek aerob körülmények között is N_2 -én fixációra (SHARAN B.S.– NEHRA V., 2011).

Nitrogén-izotópos modern () technikák segítségével OKON Y. és GONZALEZ C. (1994) rávilágított, hogy a szabad légköri N_2 -fixáló baktériumok magán a N_2 -fixáción túl más módon is képesek elősegíteni a növények növekedését, úgymint auxin, gibberelinsav, citokin és vitaminok termelése.

b) Növények ellátása biológiailag felvehető foszforral

Nitrogén után a foszfor a legnagyobb mértékben limitáló tápanyag a növények számára. A növények az oldott formában lévő mono- és dibázikus foszfátot, képesek hasznosítani. A foszfor kötött szerves (fitát), és szervetlen (apatit) formáját a mikroorganizmusok képesek szolubilizálni, szerves savak és foszfatáz enzim kibocsájtása révén. Ezen szervezetek főleg a *Bacillus*, *Rhizobium*, és *Pseudomonas* nemzetségbe tartoznak.

c) Növények további esszenciális tápanyagokkal való ellátása

A növények számára esszenciális tápanyag, többek között a cink (Zn^{2+}), amely számos növényi enzim strukturális eleme, mint például a DNS replikációban, és génexpresszióban résztvevő fehérjéknek. A bőséges cink ellátás segíti a növény triptofán szintézisét, mely a növényi növekedésében jelentős szerepet játszó indolecetsav (auxin) elővegyülete. A *Bacillus*, *Pseudomonas* nemzetségek egyes tagjai képesek a cink-szolubilizáción keresztül, a növények növekedését serkenteni (YAZDANI M. et al., 2009).

Szintén kiemelt fontosságú nyomelem a nikkel (Ni^{2+}), melynek feltételezhetően a fő funkciója az ureáz enzim felépítésében van, amely a karbamid tartalmú vegyületek lebontását katalizálja. Így lehetővé válik a haszonnövények urea-táplálása, hiszen a felhalmozódó urea nem okoz nekrozist és növekedés gátlást. Ilyen mikroorganizmusok pl.: a *Microbacteriaceae*

család tagjai, melyek segítik a növény szükséges Ni^{2+} utánpótlását (GERENDÁS J.– SATTELMACHER B., 1997).

d) Sziderofór termelő PGPR organizmusok

A talaj vastartalmának reverzibilis megkötésére képesek a PGPR baktériumok által termelt sziderofórok. Ezen kis molekulatömegű (<1kDa) vegyületeken keresztül a mikroorganizmusok képesek a vashiányos talajon, közvetlenül a növények számára felvehetővé tenni a vas (III)-iont, és ilyenformán növekedést serkenteni. Továbbá jelentős szerepet játszanak a növénypatogén szervezetekkel szembeni védekezésben, hiszen a kötött vas elérhetetlenné válik a fitopatogének számára. Ezt a jelenséget nevezzük szubsztrát kompetíciónak (KLOPPER et al., 1980). A fő sziderofór termelő mikroorganizmusok nagytöbbsége a *Pseudomonas* nemzetséghez tartozik.

e) Baktériumok által termelt növényi hormonok

A PGPR mikroorganizmusok képesek a növények növekedését serkentő fitohormon, az auxin (IAA: indol-3-ecetsav) termelésére is, amely fontos szignál molekula, mely a növény teljes egyedfejlődésében, illetve a sejtek differenciációjában is szerepet játszik. Az auxint termelő mikroorganizmusok, ezt a vegyületet felhasználják a szimbióta növény partner kolonizációjában, illetve *Quorum sensing* (baktérium sejtek egymás közötti kommunikációja, amely során összehangolják génműködésüket) során szignálmolekulaként is. Ezen mikroorganizmusok főleg az *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* nemzetségbe tartoznak (SHARAN B.S.– NEHRA V., 2011).

Egyes PGPR mikroorganizmusok képesek különböző növényi hormonok szintjének csökkentésére, például a stressz helyzetekben (árvizek, szárazság, patogén) termelődő etilénének. A fokozott etilén termelés gátlásán keresztül, a gyökér növekedése fokozódik. Mindezt az ACC (etilén prekursor)- deamináz enzim segítségével végzik a *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Variovorax*, *Pseudomonas* nemzetség egyes tagjai (BAL et al., 2012).

2. Indirekt mechanizmusok

Az indirekt mechanizmusok közé tartozik a patogén gomba szervezetek elleni antibiotikum termelés. Ezen szervezetek továbbá képesek gomba sejtfalbontó (kitináz, β -1,3-glukanáz) enzimek és hidrogén-cianid termelése révén kifejteni gátló hatásaikat. A PGPR

mikroorganizmusok, így nem csak növényi növekedés elősegítésére használhatók, hanem egyben biokontrollként is (SHARAN B.S.– NEHRA V., 2011).

Leírtak többek között olyan törzseket is, amelyek képesek a *Fusarium* gombák okozta tüneteket csökkenteni, a gomba toxinok lebontása révén. Indukálni képesek a növényi rezisztenciát a patogének ellen, így biztosítva a növények nagyobb ellenálló képességét. Ezen PGPR mikroorganizmusok főleg a *Pseudomonas* és *Bacillus* nemzetségekbe tartoznak.

Mindezeken túl, még elmondható, hogy képesek kompetálni a növénypatogén mikroorganizmusokkal, a növények gyökerén elfoglalt helyekért.

3. A PGPR törzsek megtelepedését, hatékonyságát befolyásoló tényezők

A PGPR mikroorganizmusok kolonizációs képességeit csökkentheti az alacsony pH, kevés csapadék, magas hőmérséklet, illetve a klimatikus variabilitás (SRURZ A.–NOWAK J., 2000).

Nemcsak a közvetlen környezeti tényezők, hanem az adott talaj szerves anyag tartalma is hatással van a mikroorganizmusokra. Megfigyeltek olyan eseteket, amikor bizonyos baktérium fajok csak bizonyos növények növekedését serkentik. Többek között, ahogy KLOEPPER J. és SCHROTH M (1980) is tapasztalták, miszerint 4 *Pseudomonas* faj bizonyult alkalmasnak arra, hogy fokozza a retek (*Raphanus sativus*) növekedését, míg csak 1 *Pseudomonas* faj volt képes a burgonya (*Solanum tuberosum*) növekedését elősegíteni. Továbbá sokszor már sikeresen kolonizáló mikroorganizmusok, egy a számukra optimálistól eltérő, szélsőségesebb éghajlaton nem képesek túlélni (OKON Y.– GONZALEZ C., 1994)

A PGPR baktérium hatékonyságával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a kezdeti időszakokban megjelent kutatási eredmények szerint egyes szántóföldi növények esetében (gabonafélék, burgonya) 50-70%-os terméshozam növekedés volt megfigyelhető alkalmazásuk eredményeként (BROWN M.E., 1974). A pontosabb adatelemzés segített ahhoz, hogy ma már jobban meg tudjuk becsülni a PGPR baktériumok hatékonyságát. OKON Y.– GONZALEZ C. (1994) kutatásaik során megállapították, hogy az általuk vizsgált területek 60-70 %-án, 5-30 %-os termésnövekedést értek el PGPR organizmusok használatával.

Tapasztalatok szerint kulcsfontosságú, hogy megfelelő baktérium csíraszámmal végezzék az inokulációt. A kutatások alapján a túl nagy mennyiségben kijutatott mikroorganizmusok épp úgy nem képesek a növény növekedését elősegíteni, mint a kis csíraszámú bakterális inokulumok. KLOEPPER J. és SCHROTH M., (1980) eredményei alapján a gyökér kolonizációjára és a talaj mikrobiótájára az az oltóanyag kultúra

bizonyult hatásosnak, mely 9×10^5 TKE (telepképző egység)/ cm (1 cm gyökérre) mennyiségben tartalmazott baktériumokat.

Több tanulmány is kiemeli (KLOEPPER J.– SCHROTH M., 1980, LUCY M. et al., 2004, OKON Y.– GONZALEZ C., BAL H.B. et al., 2012)- a helyes inokulációs technika fontosságát, illetve az oltásra szánt törzsek előzetes minőség vizsgálatát.

II. Célkitűzés

Célunk volt kisparcellás szabadföldi kísérletekben alkalmazott baktérium törzsek talajban való nyomon követése a kijutását követő 16 hetes időintervallumban. Továbbá célunk volt a kiindulási talajok teljes baktérium közösség szerkezetének feltárása és időbeli változásának nyomon követése.

III. Anyag és Módszer

1. Alkalmazott PGPR törzsek

Munkánk során a Biofil Kft. által savanyú talajra kijutatott PGPR baktérium törzsek nyomon követését végeztük, melyek direkt (ld.: I.3.1 fejezet) és indirekt (ld.: I.3.2 fejezet) mechanizmusokon keresztül képesek növelni a terméshozamot (2. táblázat).

Törzs ¹	Anyagcsere sajátosságai
I.	légköri N ₂ fixáció, auxin termelés
II.	légköri N ₂ fixáció, auxin termelés
III.	hiperakkumulátor növények Ni- transzlokáció elősegítés
IV.	foszfát szolubilizáció
V.	sziderofór termelés
VI.	cink -szolubilizáció
VII.	légköri N ₂ fixáció, antimikrobiális anyag termelése

2. táblázat A talajoltás során alkalmazott egyes baktérium törzsek anyagcsere sajátosságai, melyekkel kifejtik jótékony hatásukat, a növény fejlődése során

¹ Mivel, a Biofill Kft., ezen törzseket felhasználva, kíván talajoltó baktérium készítményt előállítani és forgalmazni, nem tette számunkra lehetővé, hogy az egyes törzseket megnevezzem.

2. *In silico* modellrendszer kidolgozása

1. *Elméleti háttér*

A szántóföldi kísérletek során 3 különböző, 4- illetve 5 baktérium törzset tartalmazó, kísérleti oltóanyag vizsgálatát végeztük. Feladatunk volt egy olyan modellrendszer kidolgozása, amely képes egymástól elkülöníteni a vizsgálatba vont egyes törzseket, így lehetővé téve nyomon követésüket a talaj baktériumközösségében.

A modellrendszer a terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (T-RFLP) módszeren és a 16S riboszómális RNS gén (16S rDNS) ~500 bázispár hosszúságú régiójának *in silico* elemzésén alapszik.

A T-RFLP elterjedt és széles körben alkalmazott molekuláris ujjlenyomat módszer, a mikrobiális közösségek szerkezetének és annak időbeli változásának vizsgálatára. A T-RFLP technika egy szemikvantitatív diverzitásbecslő módszer, amely gyors, tenyésztéstől független vizsgálatát biztosítja a mikrobiális közösségeknek. Az eljárás a gyakran hasító II. típusú restrikciós endonukleázok által emésztett, fluoreszcensen jelölt PCR termékek méret szerinti elválasztását teszi lehetővé. Az emésztés során, a hasító helyek különböző felismerő helye miatt, eltérő nagyságú terminálisan jelölt fragmensek keletkeznek. A terminális restrikciós fragment (T-RF) hosszak által kapott csúcsokhoz filogenetikai információ rendelhető, a görbe alatti területekből pedig a relatív gyakorisági viszonyokra következtethetünk (LIU W.T. et al., 1997).

Célunk volt egy olyan primerpár és enzim kombináció keresése, amely során a T-RFLP módszerrel a vizsgálatba vont törzsek terminális restrikciós fragmentjei (T-RF) elkülöníthetők egymástól. Ehhez elsőként meg kellett ismernünk a talajoltásra szánt törzsek teljes 16S rRNS génjének bázissorrendjét.

2. *DNS izolálás a vizsgálatba vont törzsekből*

A vizsgálatba vont 7 baktérium törzsből genomiális DNS-t vontunk ki. A 24 órás tenyészeteket, üveggyöngyöt tartalmazó, 100 µL DEPC (dietil-pirokarbonát) kezelt vízbe szuszpendáltuk. Ezt követően a szuszpendált törzseket 2 percig tartó 30 Hz-en való rázatással tártuk fel, amit 98°C-on 5 percig tartó denaturáció követett. A fizikai feltárást követően a sejttörmelékek üleptetése céljából a szuszpenziót 10000 g 3 percig centrifugáltuk, ezt követően a felülúszó tartalmazta a DNS-t.

3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A törzsek teljes 16S riboszómális RNS génjét (16S rDNS) polimeráz láncreakció segítségével (PCR) amplifikáltuk, 27F forward (LANE D.J., 1991) és 1492R reverse primer pár (POLZ M.–CAVANAUGH M., 1998) alkalmazásával (3. táblázat).

27F forward	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R reverz	5'-TAC GGY TAC CTT ACG ACT T-3'

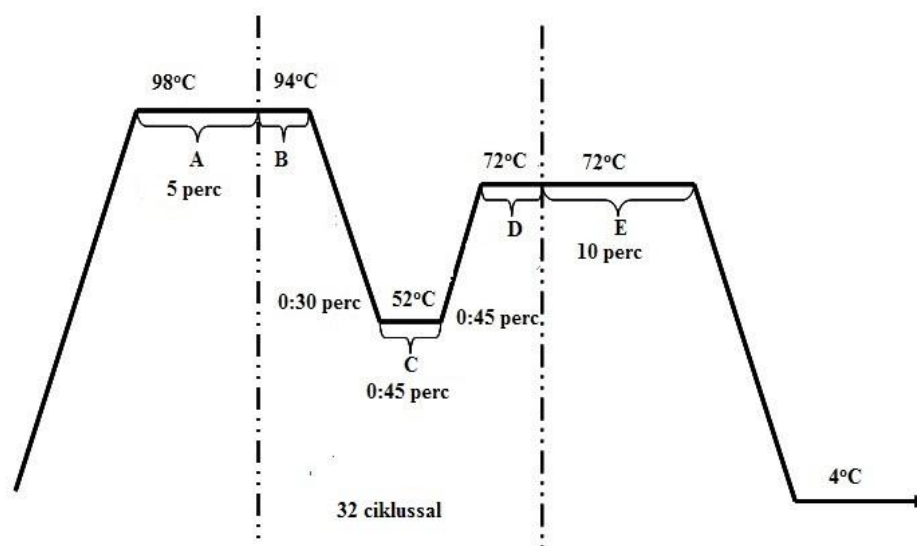
3. táblázat Az alkalmazott primerek bázissorrendje

A 16S rDNS PCR elegy összetétele az 4. táblázatban tekinthető meg. A reakció a Biorad DNAEngine^R Peltier Thermal Cyclor készülékekben zajlott, a 2. ábrán bemutatott hőprofil szerint.

dNTP (Fermentas)	10,00 µL
MgCl ₂ (Fermentas)	4,00 µL
10x puffer (Fermentas)	5 µL
reverz primer	0,5 µL
forward primer	0,5 µL
Taq polimeráz (Fermentas)	2,00 µL
DEPC víz	26,00 µL
BSA ² (Fermentas)	1,00 µL
templát	1,00 µL
Végtérfogat	50 µL

4. táblázat A 16S rDNS PCR elegy összetétele

² BSA- bovine serum albumin (borjú szérum albumin)



2. ábra: A PCR reakció ciklikus hőprofilja, -a B, C, D 32x-i ismétlésével

A kezdeti denaturáció, B denaturáció, C anneláció, D extenzió, E végső extenzió

4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékek detektálása agaróz gélelektroforézis segítségével történt. Az 1%-os agaróz gél (0,8g agar + 80 ml 1%-os TBE³) forralással készült, amely dermedéskor térhálós szerkezet vesz fel. A dermedés előtt 2,5 µl interkaláló fluooreszcens festéket (GR DNA Stain; Fermentas) adtam hozzá, amely UV-fényben a DNS-t láthatóvá teszi. Az elektroforézis 100 V/cm-en, 20 percig történt, a termék méretének meghatározása 2,5µl pUC Mix Marker 100 (Fermentas, Vilnius, Litvánia) molekulasúly marker segítségével történt.

5. Bázissorrend meghatározás

Az amplifikált 16S rDNS gén bázissorrend elemzéséhez Sanger-féle stopnukleotid módszer módosított változatát alkalmaztuk. A kapott bázissorrend adatok kiértékelését MEGA5 (TAMURA K. et al., 2007) program segítségével végeztük el. Az egyes törzsekhez tartozó legközelebbi tenyésztethető rokon fajokat (típustörzseket) az EzTaxon-e (CHUN J. et al., 2012) adatbázisában azonosítottuk.

³ TBE= Tris-bázis, Bórsav, EDTA megfelelő arányú keveréke

3. Szabadföldi kísérlet sorozat

1. Kezelések

A kísérleti kezeléseket Baranya megye mezőgazdasági területein végezték. A területek vizsgálata 2014 áprilisától kezdődően 16 héten keresztül zajlott. Egy kontroll, kezeletlen területen (jelölés 1) valamint, hat - különböző baktérium törzseket tartalmazó - oltóanyaggal (jelölés: 3,4; 5,6; 7,8) kezelt területen folytak a vizsgálatok. A hat kezelési mód esetében elmondható, hogy a baktérium törzsek tekintetében a 3-as és 4-es, 5-ös és 6-os, 7-es és 8-as oltóanyagok azonos összetételűek voltak (5. táblázat). Különbségek az azonos összetételű inokulumokat illetően, a termőtalajra kijutatott mennyiségükben volt: 1kg/ha (páratlan számmal jelölt oltóanyagok), illetve 5 kg/ha (páros számmal jelölt oltóanyagok).

Savanyú talaj	Kezelések		
	3-4 kezelés	5-6 kezelés	7- 8 kezelés
Törzsek	<i>I.</i>	<i>I.</i>	<i>I.</i>
	<i>II.</i>	<i>II.</i>	<i>II.</i>
	<i>III.</i>	<i>III.</i>	<i>III.</i>
	<i>IV.</i>	<i>VI.</i>	<i>IV.</i>
	<i>V.</i>	<i>VII.</i>	<i>V.</i>
	<i>VI.</i>		<i>VII.</i>

5. táblázat Az adott kezelésekre alkalmazott baktérium törzsek

A terület inokulálása vetés előtt történt. Magát a bakteriális oltókultúrát rápermetezték a talajra, majd beforgatták a földbe. A szabadföldi mezőgazdasági növény, amellyel a kísérletet végezték a kukorica (*Zea mays*) volt.

2. Mintavétel

A mintavételezést a Biofill Kft. munkatársai végezték. A talajmintákat a növény gyökérzete körül gyűjtötték. Kísérleti beállításonként 2-3 növény gyökérzetéből származó mintát összekeverték, hogy a minta reprezentálhatósága megfelelő legyen. A gyűjtött mennyiség

80-100 g volt. A mintákat 3-5 °C-on, hűtőben tárolták elszállításig, azonban ha 2 napnál több időt vett igénybe a tárolás, akkor a mintákat lefagyasztották -20 °C-ra. A mintavételezés a kísérleti időszakban 9 alkalommal történt, az oltást közvetlenül megelőzően egészen az oltást követő 16-ik hétig (ld. 6. táblázat).

3. A minták feldolgozása

A beérkezett talajminták csoportosítása a kezelés és a mintavételi időpont szerint történt, a továbbiakban ezen jelölés kerül alkalmazásra a mintákra való hivatkozás során (ld. 6. táblázat).

Savanyú (SSP) talaj	Kezelési típusok							
Mintavételi időpontok		1- oltatlan	3- kezelés	4- kezelés	5- kezelés	6- kezelés	7- kezelés	8- kezelés
	1 (oltás előtt közvetlenül)	11	13	14	15	16	17	18
	2 (oltás után 1 nappal)	21	23	24	25	26	27	28
	3 (oltás után 1 héttel)	31	33	34	35	36	37	38
	4 (oltás után 2 héttel)	41	43	44	45	46	47	48
	5 (oltás után 3 héttel)	51	53	54	55	56	57	58
	6 (oltás után 5 héttel)	61	63	64	65	66	67	68
	7 (oltás után 8 héttel)	71	73	74	75	76	77	78
	8 (oltás után 12 héttel)	81	83	84	85	86	87	88
	9 (oltás után 16 héttel)	91	93	94	95	96	97	98
	Feldolgozott minták							

6. táblázat A különböző időpontokból származó minták jelölése

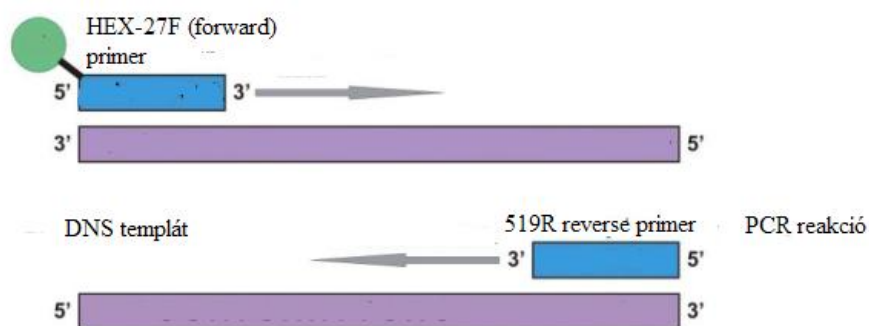
4. Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP)

a) DNS-izolálás

A molekuláris vizsgálatokhoz 1-1 g mennyiségű talajmintából DNS kivonást végeztünk az UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Inc., USA) alkalmazásával a gyártó utasítása szerint. A sejtek feltárása során, a leírásban szereplő enzimatikus eljárás kiegészítésre került egy fizikaival is, amely 2 percig, 25 Hz-en Retsch MM301 típusú sejtmalomban való rázatással történt.

b) Polimeráz láncreakció (PCR)

A reakcióhoz a korábban, *in silico* kísérletek során meghatározott, HEX⁴- 27F forward (LANE D.J., 1991) és 519R reverse primer párt (LANE D.J., 1991) alkalmaztuk (3. ábra). Az alkalmazott primerek bázissorrendjét a 7. táblázat tartalmazza. A reakció hasonló módon zajlott, a ld.: II.2.3 fejezetben leírtakhoz.



3. ábra Az 5' végén fluoreszcens festékkel (HEX) jelölt primerrel történik a DNS templát szaporítása a PCR-reakcióban

27F forward	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
519R reverz	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3

7. táblázat: Az alkalmazott primerek bázissorrendje

c) Agaróz gélelektroforézis

Ugyanazon módon történt, mint II.2.4 fejezet esetében

⁴ HEX- Hexachloro-Fluorescein amely segítségével fluoreszcensen jelöltük a primerünket

d) Restriktációs emésztés

Az amplifikált 16S rDNS szakaszokat, három restriktációs endonukleázzal -*Bsh1236* (Fermentas), *BtsCI* (Fermentas), illetve *BsuRI* (Fermentas)- hasítottuk. Az elegy összemérése után (8. táblázat), 3 órán keresztül zajlott az inkubáció a Biorad DNAEngine^R Peltier Thermal Cycler készülékekben, az enzimekre vonatkozó optimális hőfokon (9. táblázat).

Enzim	0,15 µL
Puffer	2,00 µL
DEPC víz	7,85 µL
Templát	10,00 µL
Végtérfogat	20 µL

8. táblázat Restriktációs elegy összetétele

Név	Hasítóhely	Hőmérséklet (°C)
<i>Bsh1236</i>	CG/CG	37
<i>BtsCI</i>	GGATGNN/ CCTAC/NN	55
<i>BsuRI</i>	GG/CC CC/GG	37

9. táblázat A Restriktációs endonukleáz enzimek hasító helyei, és az inkubáció hőmérséklete

e) Etanol precipitáció

A fehérje- és só-szennyeződésektől az emésztmény etanol precipitáció útján lett megtisztítva.

- 3M Na-acetát, 95%-os etanol és DEPC kezelt víz elegyében mértük az emésztményt, az alábbi koncentrációk szerint (10. táblázat), majd alapos összekeverés után 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

3 M Na-acetát (pH 4,6)	3,0 µL
95%-os etanol	62,5 µL
DEPC víz	14,5 µL
Templát	20,0 µL
Végtérfogat	100,0 µL

10. táblázat Etanol precipitáló elegy összetétele

- Ezt követően a mintánkat 20 percig 18 000 g-n centrifugáltuk, majd a pelletről a felülúszót leöntöttük.
- A pellethez 250µL 70%-os etanolt mértünk, majd alaposan felfuszpendáltuk vortex segítségével.
- A mintánkat 15 percig 18 000 g-n ismét centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük.
- Annak érdekében, hogy a mintákról teljesen eltávolítsuk az etanolt Jouan RC 10.09 centrifuga és Edwards Mudolyo fagyasztva- szárító berendezést és vákuumpumpát használtunk.
- A szárítás után a mintákat, az elektroforézishez 20µL DEPC kezelt vízben vettük fel.

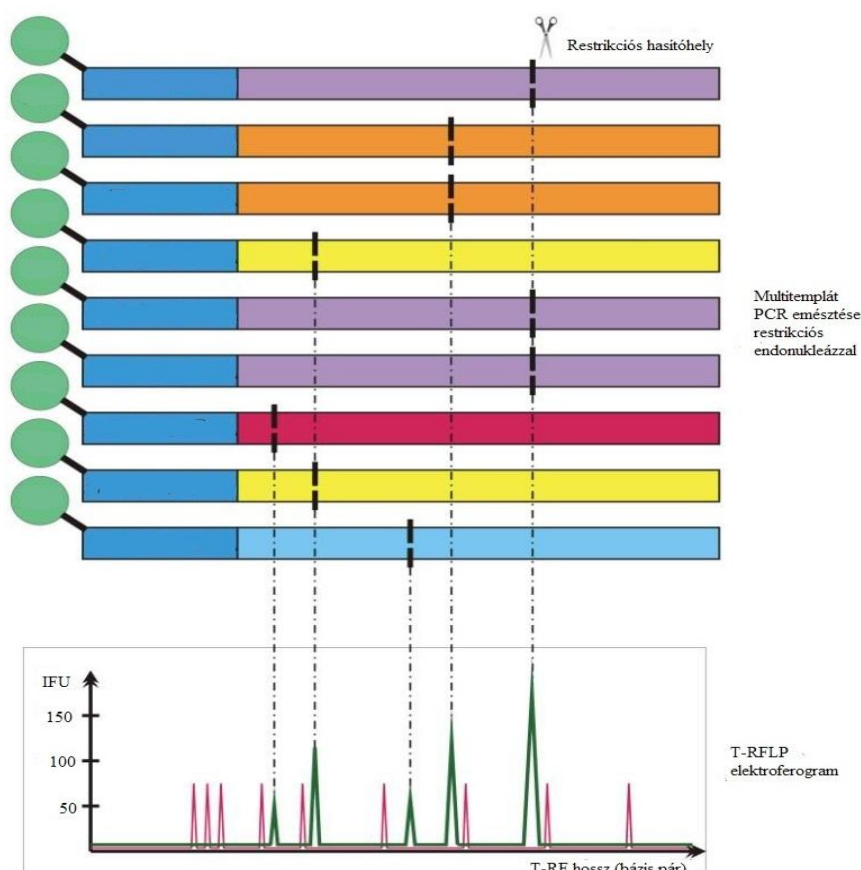
f) Kapilláris elektroforézis

A mintákban lévő fragmentumok elválasztása kapilláris gélelektroforézissel (4. ábra) történt, GeneScanTM-500 TamraTM Standard belső standard alapján. A minták denaturálását az alábbi elegyben (11. táblázat) 5 percig 98 °C-on végeztük, hogy így biztosítsuk a megfelelő elválást.

GeneScan TM -500 Tamra TM	0,3 µL
Formamid	12,00 µL
Templát	1,00 µL
Végtérfogat	13,3 µL

11. táblázat Denaturáló elegy összetétele

A terminális fragmentumok elektroforetikus elválasztása az *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) automata kapilláris készüléken 8 sec injektálás mellett 29 percen keresztül POP-4™ polimeren (*Performance Optimized Polymer 4*, Applied Biosystems), 60°C-on és 15 kV-on történt.



4. ábra Az egyedi szekvenciát felismerő multitemplát PCR termék emésztése során keletkezett, 5' végén fluoreszcensen jelölt, ampliconok elválasztása kapilláris gélelektroforézissel. (SIPOS R., 2009)

g) Adatelemzés

T-RFLP kromatogramok elemzése a GeneMapper szoftverrel (Applied Biosystems, version 3.7) történt. A mintával együtt futó, de eltérő fluoreszcens festékekkel jelölt GeneScan™-500 Tamra™ belső méret standard tette lehetővé, az elválasztott csúcsok (T-RF-ek) pontos fragmentumhossz meghatározását.

5. Statisztikai értékelés

A T-RFLP futások statisztikai kiértékelése a T-REX (*T-RFLP Analysis Expedited*) online programmal történt (CULMAN S. et al., 2009). A kapott adatmátrixból a hierarchikus osztályozást a PAST programmal (HAMMER O. et al., 2001) távolság optimalizáló UPGMA⁵ csoportátlag módszerrel végeztük Bray-Curtis hasonlósági indexszel. Szintén PAST program segítségével, főkomponens analízissel (PCA⁶) is értékeltük az adatmátrix statisztikai sokaságát, és becsültük a talajminták Shannon-, és Simpson diverzitás értékeit.

IV. Eredmények

1. *In silico* modellrendszer által kapott eredmények

A vizsgálatba vont 7 különböző baktérium törzs 16S rRNS gén bázissorrendjének ismeretében, kidolgozásra került egy olyan modellrendszer, amelynek segítségével az adott baktérium törzsekre jellemző T-RF-ek alapján elkülöníthetők egymástól az egyes törzsek a T-RFLP módszer segítségével.

Az *in silico* vizsgálatok során az oltásra használt törzsek 16S riboszómális RNS-t kódoló gén azonosítására, az irodalomban fellelhető több primer pár közül, a következő három: 27F-519R, 341F-971R, 968F-1401R került kiválasztásra. Ugyanis ezek a primer párok voltak alkalmasak ~500 bázispár hosszúságú szakaszok amplifikálására a 16S rRNS génjében.

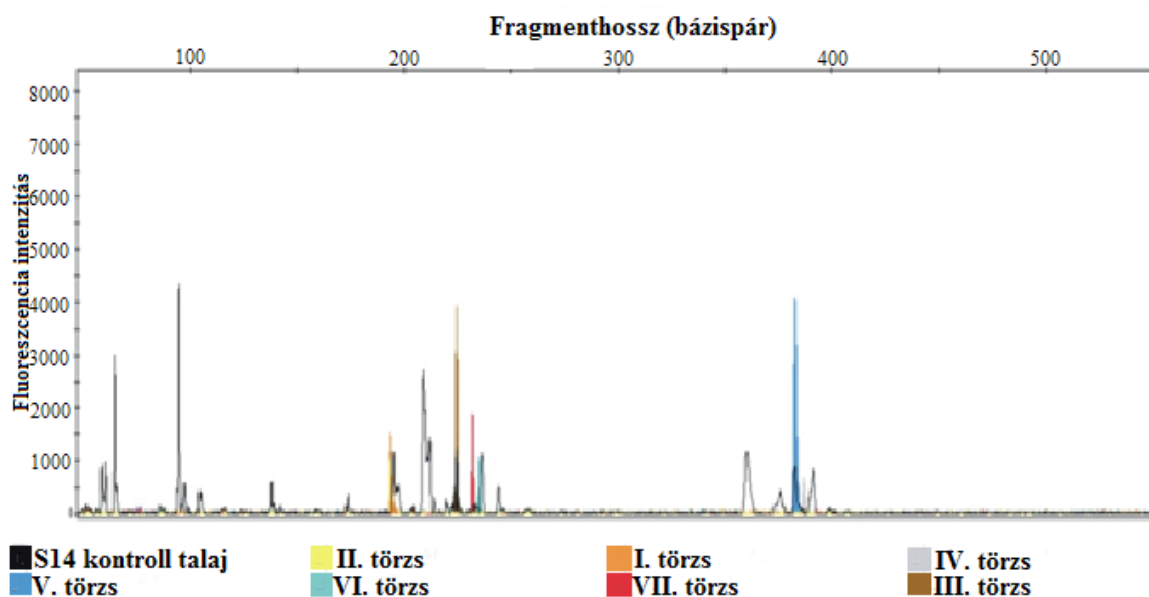
Az *in silico* vizsgálatok során a fent említett 3 primer pár által közre fogott szakaszon teszteltük az Thermo Scientific által forgalmazott restrikciós endonukleázokat. Az *in silico* tesztet követően került kiválasztásra a 27F-519R primer pár által közre zárt gén szakasz, mely a 16S rRNS génen belül a legvariábilisabb régió. Az említett régióban *in silico* 5 enzim (*Bsh*12361, *Bsu*RI, *Msp*I, *Bts*CI, *Faq*I) hasító helye alapján a vizsgálatba bevont törzsek egymástól elkülöníthetők. Az *in silico* és az empirikus értékek közötti eltérések jelensége, bizonyított tény (KAPPLAN–KITTS. 2003), ezért volt szükség arra, hogy gyakorlatban is megvizsgáljuk az egyes törzsek terminális restrikciós fragmenseit (T-RF). A virtuális hasítások valóság alapját a törzsekből készített -restrikciós endonukleázzal emésztett- PCR termékek T-RFLP elemzésével igazoltuk (5. ábra), mely alapján az *in silico* hasítás eredményeivel megfeleltethetők voltak a kapilláris elektroforézissel meghatározott T-RF

⁵ UPGMA- Unweighted Pair Group Method of Average

⁶ PCA-Principal component analysis

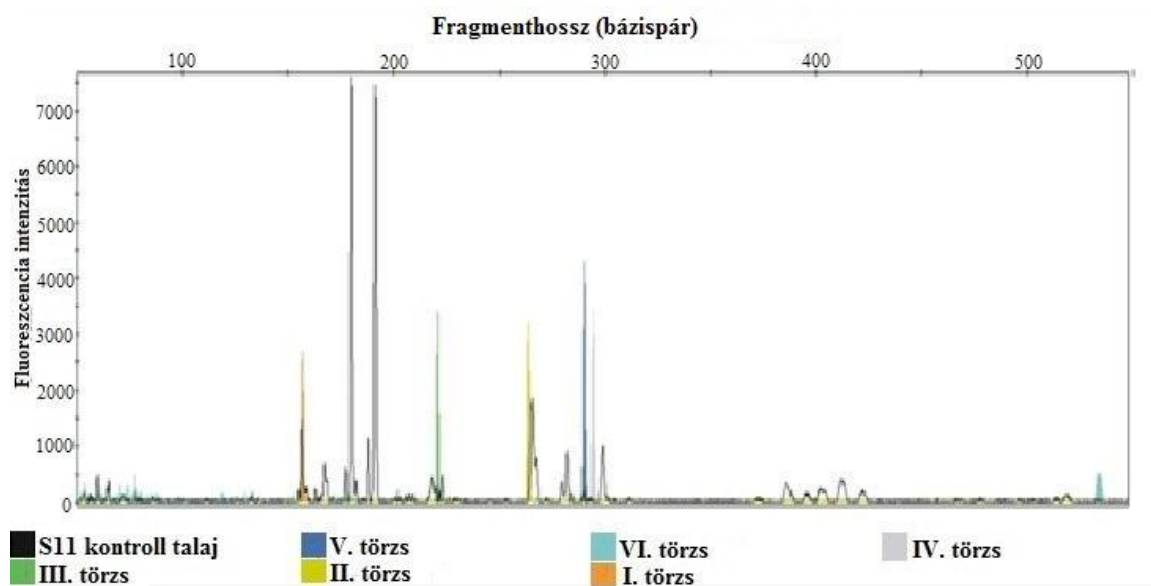
csúcsok. A megfelelő restrikciós endonukleáz kiválasztásánál, figyelembe kell venni, hogy az oltótörzsek kimutatását, a talaj mikrobiótája mellett kellett kivitelezni, így olyan enzimeket, kell használni, melyek nem csak 1-2 bázispárban különböző T-RF-eket eredményeznek.

Az említett öt restrikciós endonukleázt, az oltásra szánt baktérium törzsek T-RF-nek ismeretében szűkítettük a *Bsh1236*, *BtsCI*, illetve *BsuRI* enzimekre.



5. ábra A T-RFLP kromatogram, *Bsh1236* enzimmel történő hasítást követő elválasztás eredményeként kapott T-RF-ek, a vizsgálatba vont törzsek, valamint a kontroll talajminta esetében. Feketével van jelölve a kontroll a talaj, míg az egyes törzseket, az ábrán különböző színekkel jelöltük.

A *Bsh1236* restrikciós endonukleázzal (5. ábra) végzett emésztés során, a kapott T-RFLP kromatogramon, a N_2 fixációra képes I. II. törzsek kivételével sikeresen el tudtuk különíteni az oltásra használt törzseket. Ahhoz, hogy jó eséllyel megkülönböztethetők legyenek az egyes mikroorganizmusok, minimum két enzimmel való emésztésre van szükség.



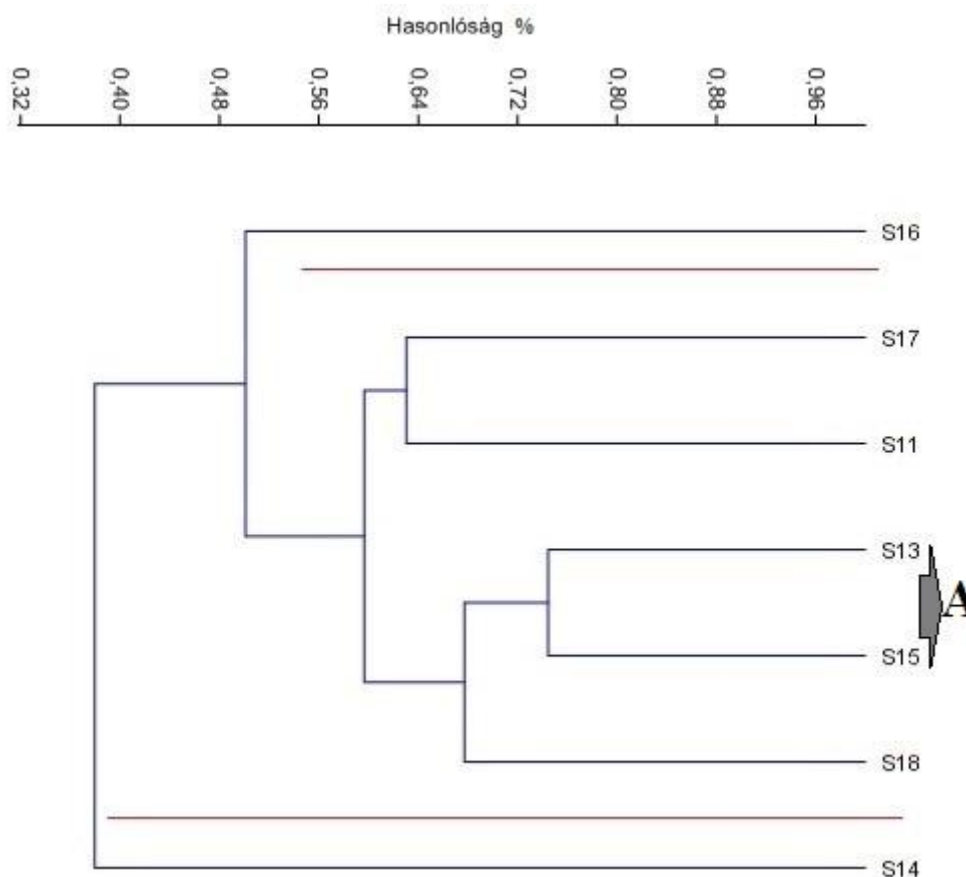
6. ábra A T-RFLP kromatogram, *BtsCI* enzimmel történő hasítást követő elválasztás eredményeként kapott T-RF-ek, a vizsgálatba vont törzsek, valamint a kontroll talajminta esetében. Feketével van jelölve a kontroll a talaj, míg az egyes törzseket, az ábrán különböző színekkel jelöltük.

A *BtsCI* restrikciós endonukleázzal (6. ábra) történő emésztés során, már sikerült elválasztanunk a N_2 fixáció mellett, auxin termelésre is képes I. II.-es törzseket. A VII.-es törzset - amely szintén a légköri N_2 fixációra képes - nem tudtuk *BtsCI* enzim segítségével pontosan detektálni, azonban *Bsh12361* (5. ábra) és *BsuRI* endonukleázzal sikeresen megvalósult, így nyomon tudtuk követni a talaj baktérium közösségén belül.

2. A talajminták bakteriális diverzitása és az oltás hatásának vizsgálata

1. Az oltást megelőzően a vizsgált talajok teljes bakteriális közösségének szerkezete

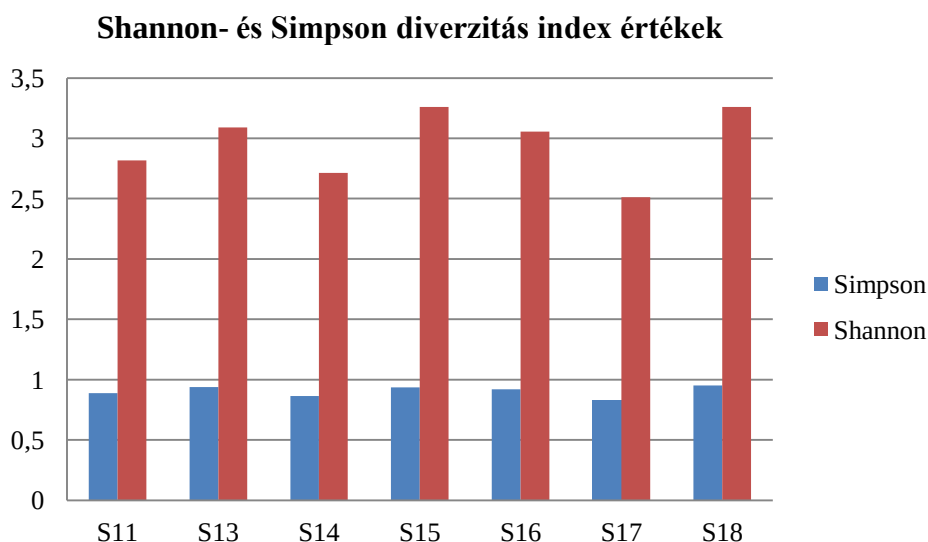
Első lépésben a mintáink közül azokat vizsgáljuk, melyek az egyes kezelések előtről származnak, így információt nyerve az adott talajok mikrobiális háttéréről, illetve az oltásra használt törzsek talajban való előfordulásáról.



7. ábra A kiindulási azaz- kontroll talajminták UPGMA analízise, az A: a legnagyobb hasonlóságot mutató minták

A két (*Bsh1236*, *BtsCI*) enzimmel való emésztés során kapott eredmények, együttes értékelése lehetővé tesz egy kiterjedt osztályozási lehetőséget, melyet az egyes kezelésekhez tartozó kontroll talajminták hasonlóságát tükröző hasonlósági dendrogramon ábrázoltunk (7. ábra).

A dendrogramon jelentős elkülönülést mutatnak a többi talajmintától a 4-es, illetve 6-os kezelés kontroll talajmintái (*S14* és *S16*). Ezzel szemben a legnagyobb hasonlóságot (78%) a 3-as és 5-ös kezelés kontroll talajmintái (*S13* és *S15*) mutatják. A többi mintát illetően egy az előbbiektől alacsonyabb 60% körüli hasonlósági érték volt jellemző.

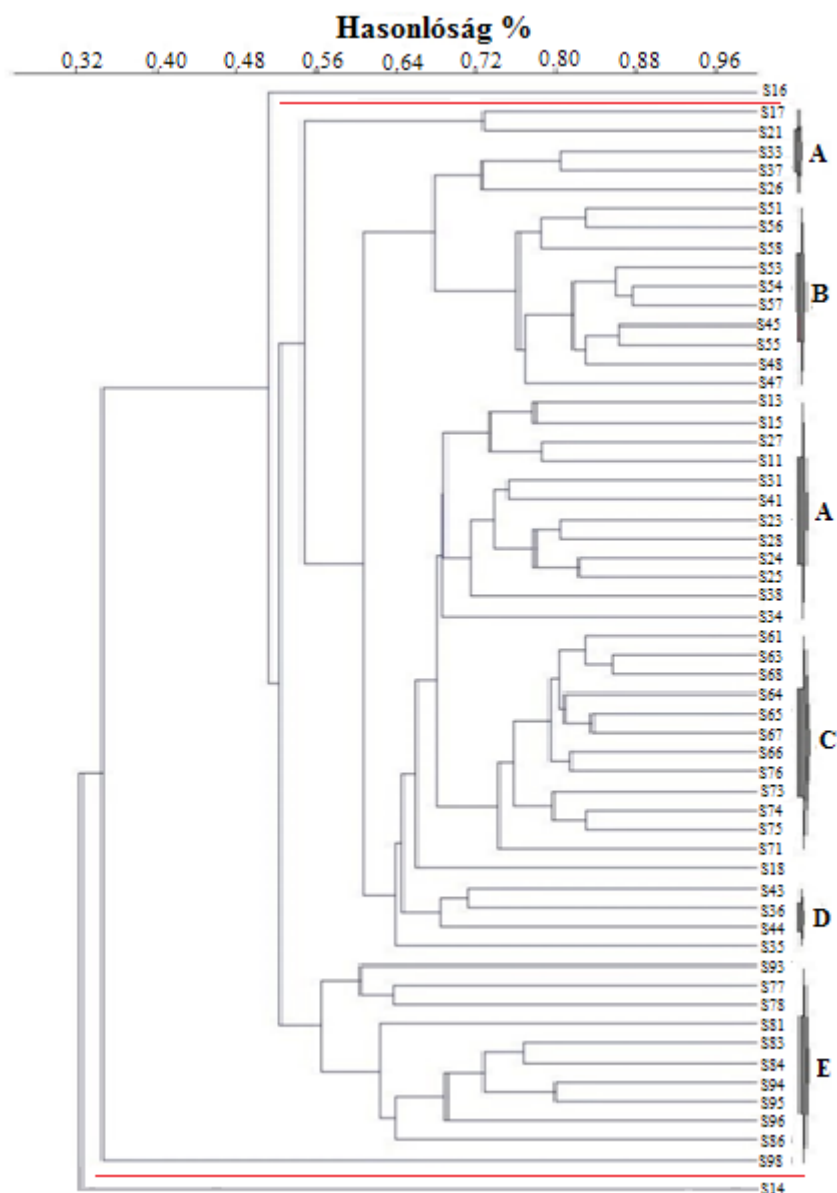


8. ábra A kontroll talajminták bakteriális diverzitásának Shannon-, és Simpson-index mérőszáma a BtsCI enzimmel való emésztés során kapott T-RFLP mintázatok alapján.

A 4-es kezelés kontroll talaja (S14), amely az UPGMA analízis (7. ábra) során is elkülönült a többi mintától, a Shannon-, és Simpson diverzitás indexek (8. ábra) alapján az egyik legkisebb diverzitás értékkel jellemezhető e talaj bakteriális közössége. A 6-os kezelés kontroll talaja (S16) az UPGMA analízis (7. ábra) során szintén elkülönült a többi mintától, a talaj bakteriális közösségének diverzitása (8. ábra), azonban hasonló, mint a többi talajminta esetében. Az indexek két szélső értékét, mint a legkevésbé diverz 7-s kezelés kontroll mintája (S17) (Shannon: 2,51, Simpson: 0,83), és legnagyobb diverzitású a 8-as kezelés kontroll mintája (S18) (Shannon: 3,261, Simpson: 0,95) minták adják (8. ábra).

2. Az oltás után vizsgált talajok teljes bakteriális közösségének szerkezete

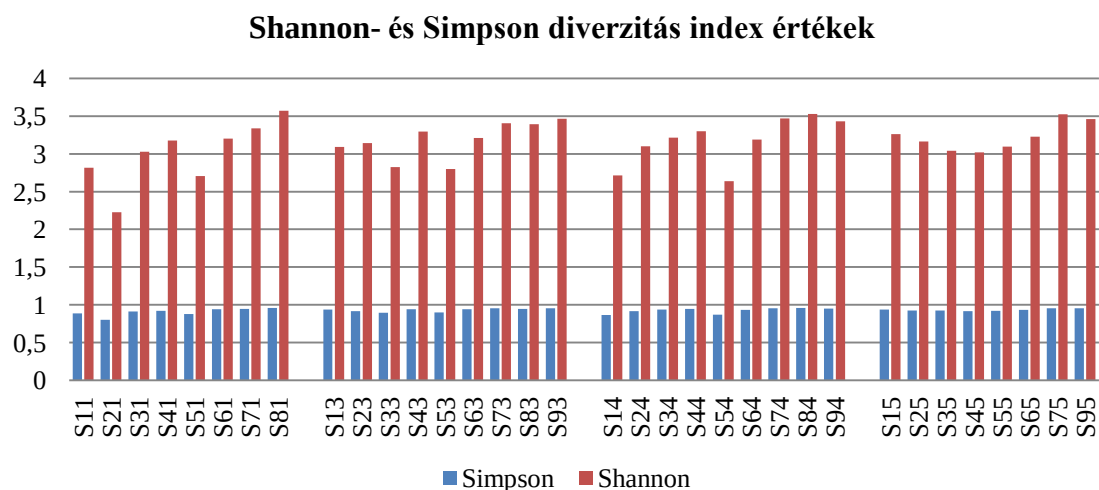
A teljes mintasort vizsgáljuk következőben, ahol benne vannak az egyes talajok oltás előtti kontrolljai, illetve azon talaj, amely az egész kísérlet során nem volt kezelve, így informálódva arról, hogy kezdetben a talajban megtalálható teljes baktérium közösségben milyen változások mentek végbe a vizsgálati időtartam alatt.



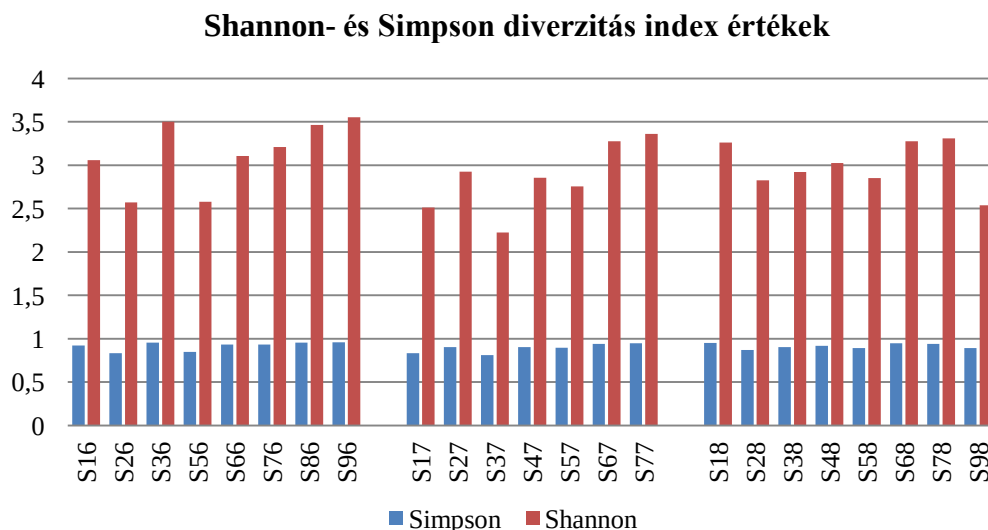
9. ábra A teljes mintasor UPGMA analízise. Jelölések A: oltást megelőzően, illetve az oltást követően az 1 héttel, B: oltás után 2-, és -3 héttel, C: oltás után 5-, és -8 héttel, D: oltás után 1-, és -2 héttel, E: oltás után 12-, és -16 héttel

A teljes mintasorra készített dendrogramon (9. ábra) a kontroll talajokhoz (7. ábra) hasonlóan, a 4-es és 6-os kezelés kontroll mintái (S14 és S16) elkülönülnek a többi mintától. Megállapítható, hogy az egyes minták a mintavétel időpontja szerinti hasonlóságot mutatnak. Az oltást megelőzően közvetlenül, illetve azt oltást követő első hétig (9. ábra) csoportosulnak együtt a minták a dendrogramon, és nagyobb, mint 70%-os hasonlóságot mutatnak. Hasonló mértékben és módon csoportosulnak az oltást követő 1. és 2. hétről, illetve a 3. hétről származó minták. A talajok oltását követő mintavételi időben továbbhaladva, az 5-től a-8-ig hétig, illetve a 12. és 16. hétről származó minták különülnek el a hasonlósági dendrogram alapján. A legnagyobb fokú hasonlóságot (85%) az azonos (5-ös) kezelésben részesült minták mutatják, melyek mintavételezése között 1 hét telt el (S45, S55). Szintén nagyobb fokú

hasonlóságot (75%) mutatnak az oltást követő 6., illetve 8. hétről származó S66, S76 minták, melyekre ugyanazon baktérium törzseket jutatták ki, mint az 5-ös kezelés során, csupán nagyobb dózisban (5kg/ha). A többi minta esetében már nem találunk, a fentebb említetthez hasonló, kezelések szerinti csoportosulást.



10. ábra A kezeletlen, a 3-, 4-, és 5-ös kezelést kapott talajminták bakteriális diverzitásának Shannon-, és Simpson-index mérőszáma a *BtsCI* enzimmel való emésztés során kapott T-RFLP mintázatok alapján.

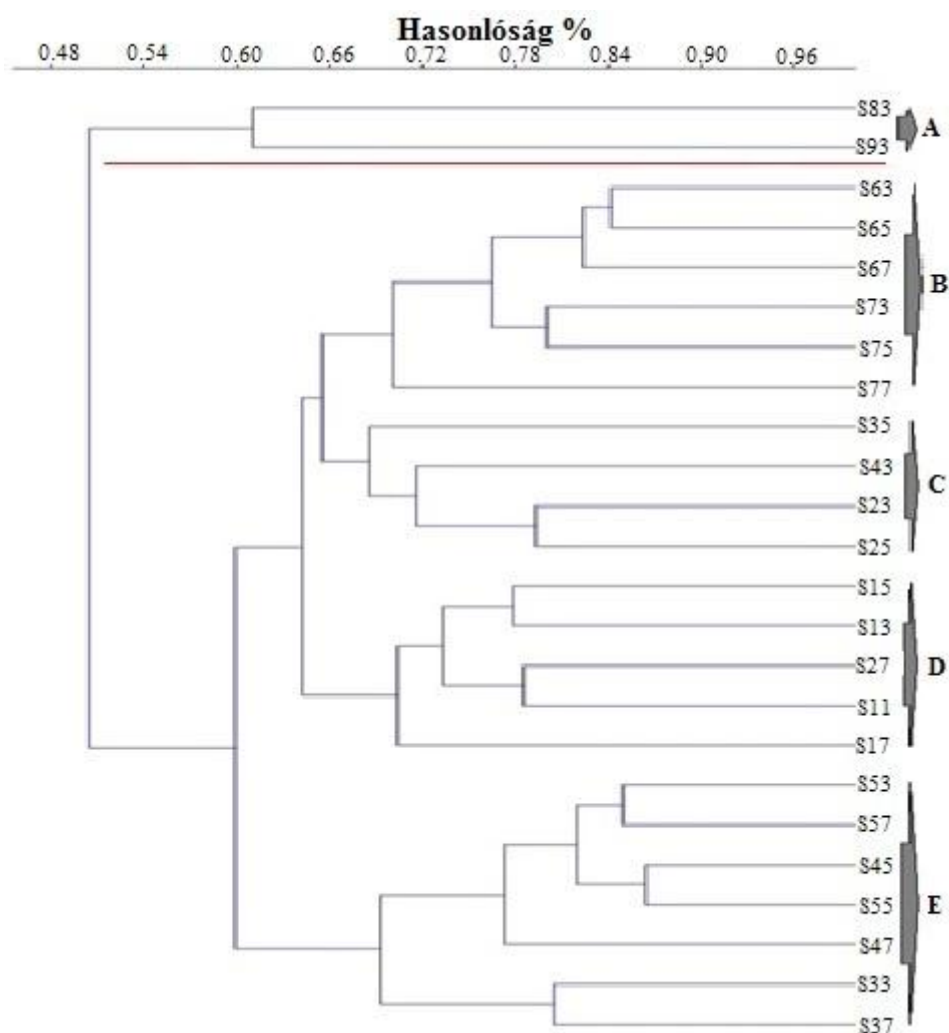


11. ábra A 6-, 7-, és -8-as kezelést kapott talajminták bakteriális diverzitásának Shannon-, és Simpson-index mérőszáma a *BtsCI* enzimmel való emésztés során kapott T-RFLP mintázatok alapján.

A teljes mintasor diverzitás indexe alapján (10., 11. ábra) a legkisebb diverzitású a 7-es kezelésben részsült talaj oltás követő 1 hét múlva gyűjtött mintája (S37) (Shannon: 2,22, Simpson: 0,81), míg a legnagyobb, pedig az oltatlan talaj 12. heti mintája (S81) (Shannon:

3,57, Simpson: 0,96). A különböző kezelést kapott talajok esetében megfigyelhető, hogy az oltást követő 1. és 3. héten, az adott talajok bakteriális közösségének csökkent a diverzitása, míg a 16. hétre, a 8-as kezelés kivételével, a legnagyobb diverzitás értékeket érte el. Az adott minták elkülönülését az egyes mintavételi időpontokon számos biotikus és abiotikus tényező is befolyásolhatja (hőmérséklet, nedvességtartalom stb.), melyek komoly hatással lehetnek a talaj mikrobiótájára (SRURZ A.–NOWAK J., 2000).

3. A talajoltások hatásának nyomon követése.

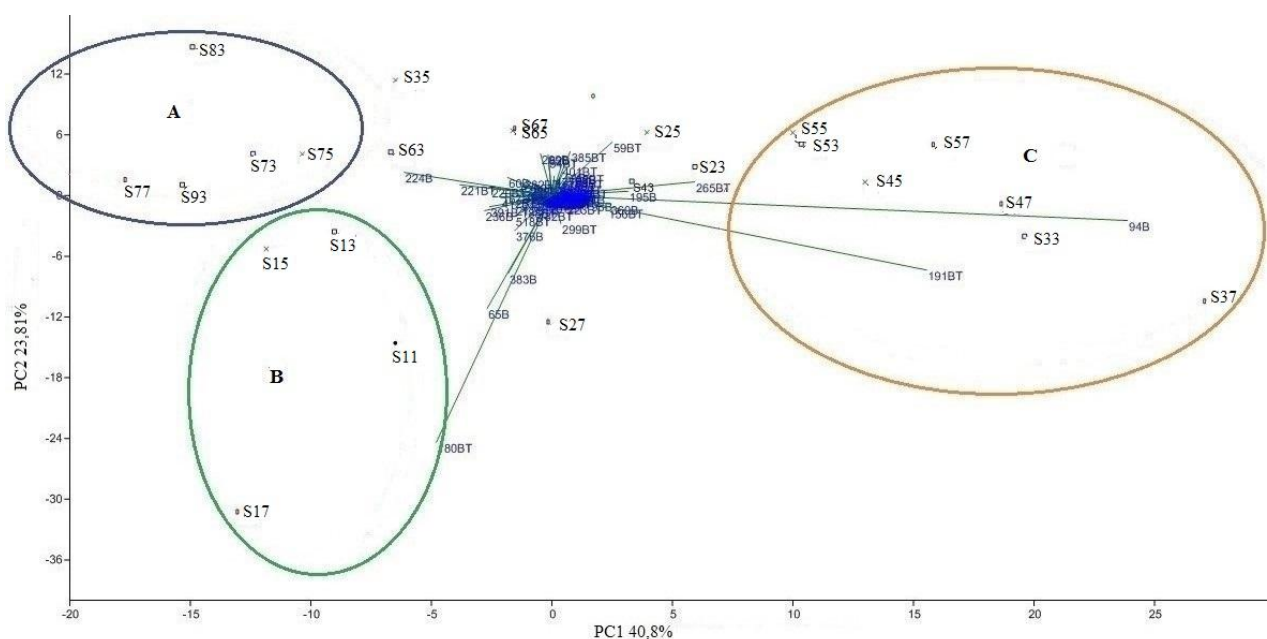


12. ábra A Bray- Curtis hasonlósági index alapján készített hierarchikus osztályozása a kis dózisban alkalmazott oltóanyaggal kezelt talajok esetében. Jelölések: A: oltás után 12-, és-16 héttel, B: oltás után 5-, és-8 héttel, C: oltás után közvetlenül, illetve 1 héttel, D: kontroll talajok, E: oltás után 2-, és-3 héttel

A különböző, kis dózisú, kezelésekből származó minták a hasonlósági dendrogramon (12. ábra) a mintavétel időpontja alapján csoportosulnak, hasonlóan a teljes mintasorból származó talajminták (9. ábra) esetében. Továbbá a legnagyobb fokú (84%) hasonlóságot

szintén az azonos (5-ös) kezelést kapott S45 és S55 talajminták mutatják, melyek vételezése között 1 hét telt el. Jelentősen elkülönülnek a többi mintától a 12. és 16. heti minták. Hasonló módon csoportosul a többi minta is, miszerint azok mutatnak nagyobb hasonlóságot, melyek vételezése között nem telt el 3 és 4 hétnél több idő. Ellenben azt tapasztaljuk, hogy az oltáskori minták és az oltás után 12. és 16. hétről származó minták jóval kisebb fokú hasonlóságot mutatnak egymással. Az adott kezelések oltás előtti (kontroll) talajai is együtt csoportosulnak, egyedül a 7-es kezelés oltás utáni első napból származó mintája (S27) az, amelyik nagyobb fokú hasonlóságot mutat a kontroll talajokkal.

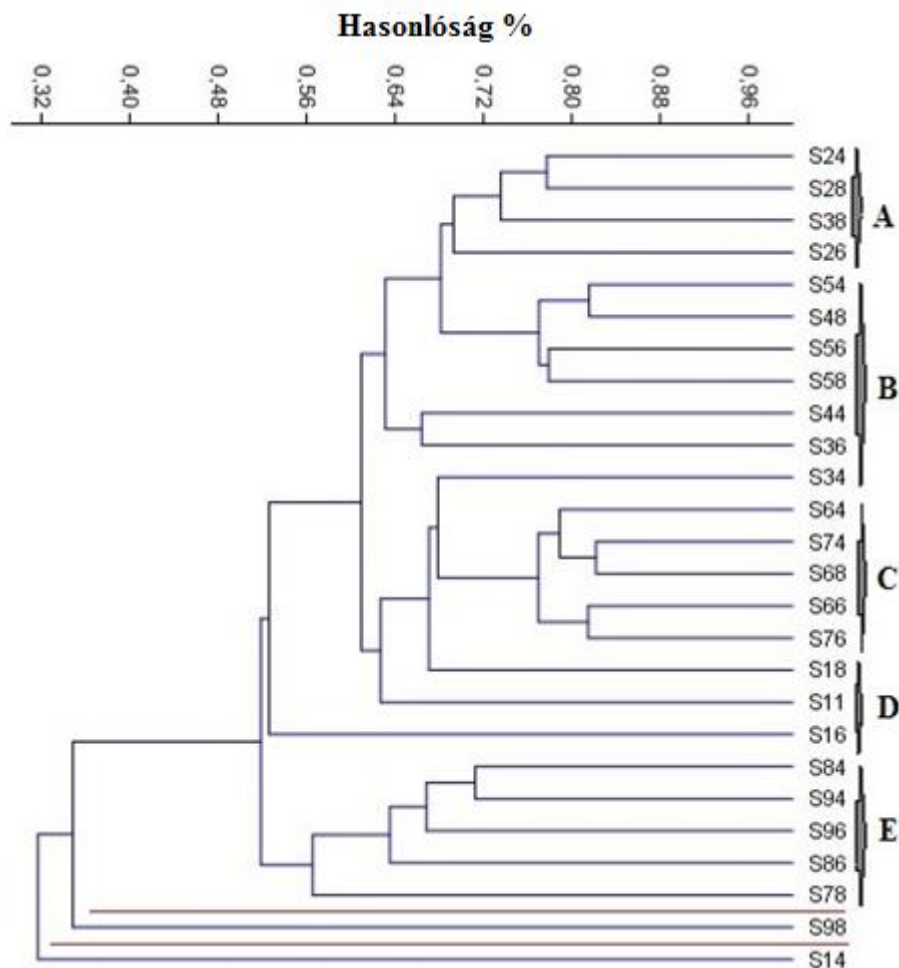
A pontosabb adatfeldolgozás érdekében, nem csak hasonlósági dendrogramon, hanem főkomponens analízissel is elemeztük a mintákra kapott T-RFLP adatmátrixokat (13. ábra).



13. ábra: Főkomponens analízis alapján kapott biplot ábra a kis dózissal kezelt talajok estében. Jelölés: A: oltás után 8-,12-, és-16 héttel, B: kontroll talajok, C: oltás után 1,-2-, és-3 héttel

A főkomponens elemzés során, szintén azt tapasztaltuk, hogy a minták a mintavétel időpont szerint mutatnak csoportosulást. Akár a hasonlósági dendogrammon itt is elkülönülnek azok a minták, melyek az oltást megelőző talajokból származnak (S11, S13, S15, S17), azok melyek az oltást követő 1-, 2- és 3- ik héten lettek gyűjtve (S33, S37, S45, S47, S53, S55, S57), továbbá 8-, 12- és 16-ik heti minták(S73 ,S77, S75, S83 ,S93, S95).

A savanyú talajra nagy dózisban (5 kg/ha), kijutatott kezelésekből származó minták, statisztikai értékelését (Bray-Curtis hasonlósági index-el) mutatja a 14. ábra.

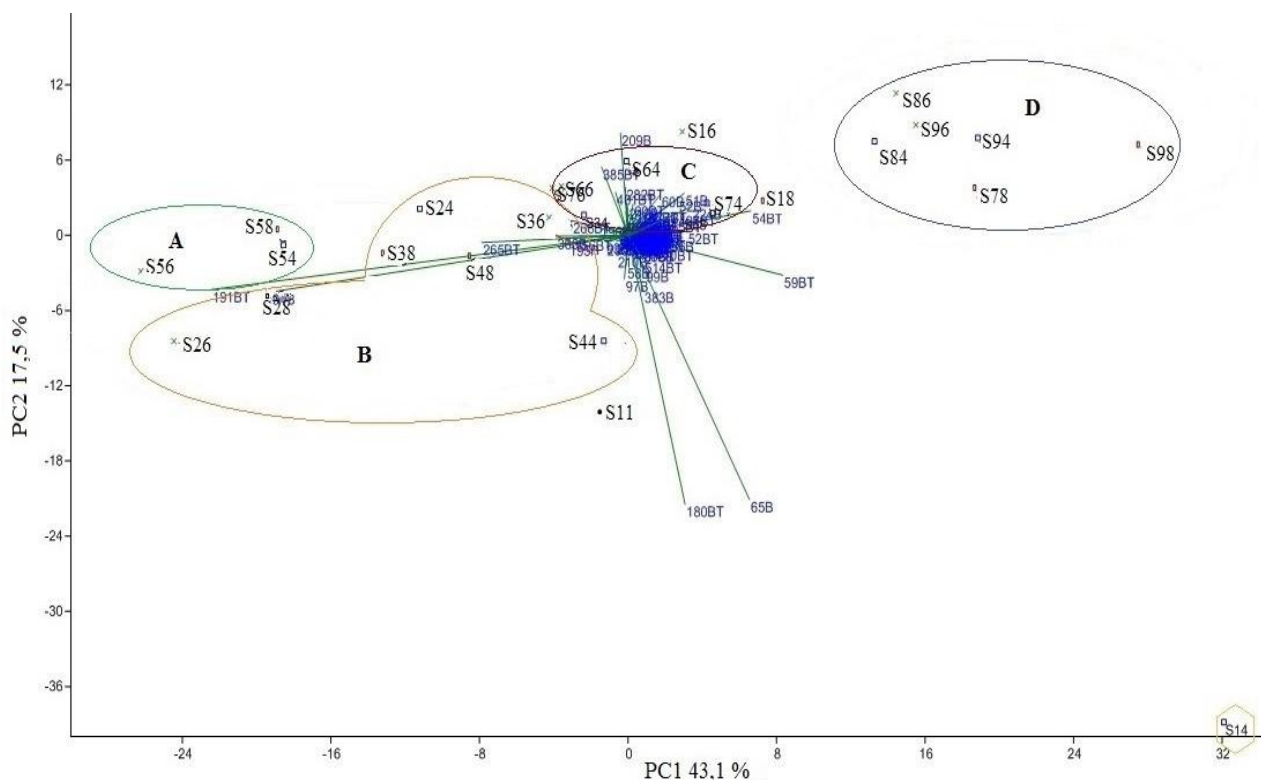


14. ábra Bray-Curtis hasonlósági index alapján végzett hierarchikus osztályozása a nagy dóziséból (4, 6, 8-as kezelésekből) származó mintáknak. Jelölések: A: oltás után 1 nappal, 1 héttel, B: oltás után 2-, és-3 héttel, C: oltás után 6-, és-7 héttel, D: kontroll talajok, E: oltás után 12-, és-16 héttel

A különböző, nagy dózisú, kezelésekből származó minták a hasonlósági dendrogramon, hasonlóan a kis dózisénál tapasztaltakhoz, itt is a mintavétel ideje szerint csoportosulnak. Ahogy a teljes mintasor hasonlósági dendrogramj valamint a Shannon diverzitás index alapján, itt is jelentősen elkülönül a 4-es kezelés kontroll (S14) mintája. A 8-as kezelés 16. heti (S98) talajmintája, épp úgy, mint a teljes hasonlósági dendrogramon (9. ábra) itt is elválást mutat, a többi mintától.

A kis dózis (1 kg/ha) hasonlósági dendrogramjához (12. ábra) hasonlóan külön csoportosulnak az egyes kontroll minták, illetve az oltás követő 12. és 16. héten gyűjtött

minták. Közel 70%-os hasonlóság jellemzi az oltás után közvetlenül, illetve 1 héttel vizsgált talajokat, továbbá 75%-os hasonlóságot találunk az oltást követő 2. és 3. hetet reprezentáló minták esetében is. A legnagyobb fokú hasonlóság (80%), itt is a korábban látottakhoz hasonlóan, az a két talajminta esetében van, melyek azonos kezelésben részesültek, és az oltást követő 6- és 8-ik hétről származnak (S66, S76).



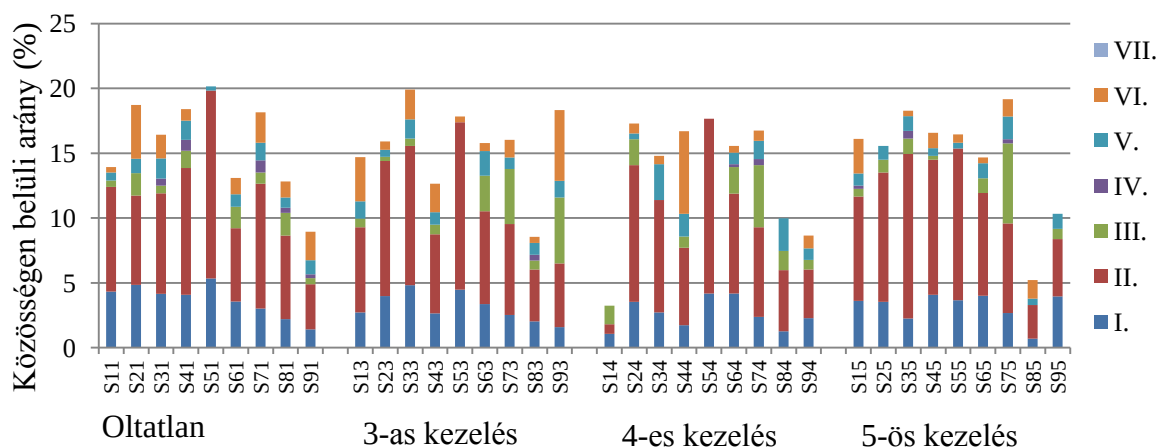
15. ábra Főkomponens analízise a nagy dózissal kezelt talajmintáknak. Jelölések: A: oltás után 3 héttel, B: oltás után 1 nappal, illetve 1-, és-2 héttel, C: oltás 5-, és-8 héttel, D: oltás után 12-, és-16 héttel

A főkomponens analízis (15. ábra) során vizsgált nagy dózisú minták esetében 4 csoportra oszlik az adatsor a mintavétel ideje szerint. Külön csoportosulnak az oltást követő kéthétben a minták (S26, S28, S36, S38, S48, S44,), az oltás utáni harmadik hétekből származó minták (S54, S56, S58), az oltás utáni ötödik, és nyolcadik (S64, S66, S74), illetve tizenkettedik, és tizenhatodik (S84, S86, S94, S96, S98) heti minták. A korábbi hasonlósági dendogramokhoz (7., 9., 14. ábra), vagy diverzitás indexekhez (8., 10. ábra) hasonlóan, itt is elkülönül a többi mintától a 4-es kezelés kontroll mintája (S14).

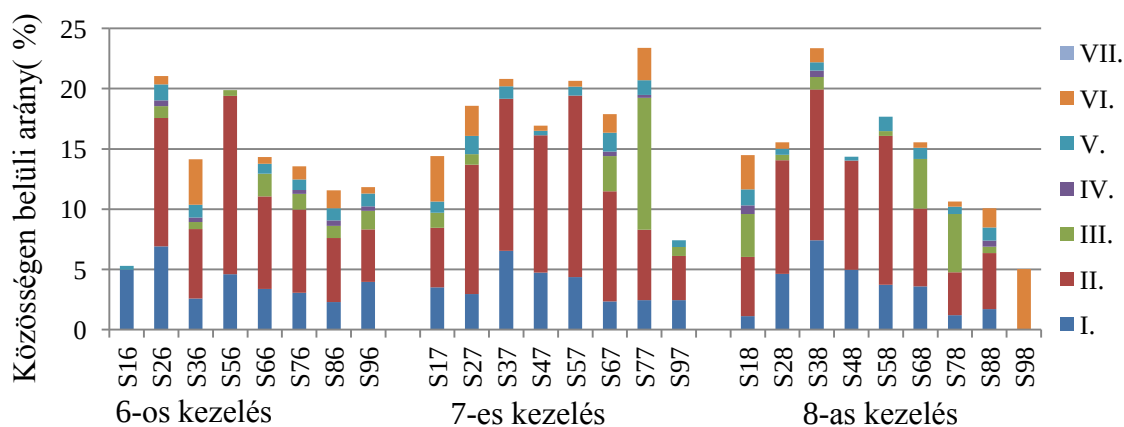
4. A vizsgálatba vont oltótörzseként alkalmazott 7 baktériumtörzs aránya a teljes bakteriális közösségen belül.

A savanyú talajra, kis dózisban (1 kg/ha), kijutatott talajoltó készítményekben alkalmazott törzsek a talaj teljes bakteriális közösségén belüli arányának változását mutatja a 16., 17. ábra, az adott kezelésekben részsült talajokban illetve kísérlet során kezeletlen talajokban egyaránt.

Az oltás során alkalmazott törzsek, jelen voltak a kezelés előtti és a folyamatosan monitorozott oltatlan talajokban egyaránt, mivel a természetes talaj bakteriális közösségének részei.



16. ábra Az alkalmazott törzsek a teljes bakteriális közösségen belüli aránya az oltatlan talajban, illetve a 3-, 4-, 5-ös kezelések hatására BtsCI által kapott T-RF-ek alapján



17. ábra Az alkalmazott törzsek a teljes bakteriális közösségen belüli aránya a 6-, 7-, 8-as kezelések hatására BtsCI által kapott T-RF-ek alapján

A 3-as és 4-es kezelés során használt bakteriális oltókultúra nem tartalmazta a N₂ fixáló, és antimikrobiális anyag termelésére képes VII. számú törzset.

Az 5-ös és 6-os kezelés esetében, a foszfát szolubilizáló IV., és a sziderofór termelő V., míg a 7-es és 8-as kezelés során pedig a cink- szolubilizáló VI. törzs hiányzott.

A N₂ fixáló, és auxin termelő törzsek (I. II.) voltak a legnagyobb arányban jelen előzetesen a talajban, az oltásra használt baktérium törzsek közül. A kezelések hatására ezen törzsek közösségen belüli arányában egészen a harmadik hétig tartó növekedést figyeltünk meg, amely fokozatosan az utolsó mintavételi időpontokra (12., 16. hét) visszaállt hasonló közösségen belüli arányra, mint amit a kezelés előtt tapasztaltunk. Többek között, ahogy ezt a 7-es kezelés esetében is láttuk az I. törzs esetében, a kezdeti 3,53%-os közösségen belüli arányuk (*BtsCI* enzim alapján) az oltást követő első hétre 6,55%-ra emelkedett, majd a 16-ik hétre 2,46% lett. Mind a két törzs esetén a több enzimmel való emésztés során is hasonló jelenséggel találkoztunk. Volt olyan eset is, hogy az I. törzs kezdeti kis arányához képest (0,75%, *BtsCI* enzim alapján, 4-es kezelés során) az oltást követő harmadik hétre igen jelentős mértékben nőtt az arányuk (13,49%), majd bár ez lecsökkent a 16. hétre (6,08%), de még így is nagyobb volt, mint a kezelést megelőzően az oltatlan talajban.

Az oltatlan talajjal összehasonlítva, hasonló módon változik a két törzs aránya, viszont az oltatlan talaj esetében a 16. hétre nagyobb mértékű a közösségen belüli arány csökkenés, mint az egyes kezelést kapott talajok esetében,

A növények nikkell (Ni²⁺) ellátásában szerepet játszó III. törzs, szintén jelen van a kontroll és oltatlan talajokban egyaránt. Az egyes kezelések hatására, a talajok nagytöbbségében (kivételt képez a 6-os kezelés) az oltást követő 8. hétre egy közösségen belüli aránynövekedést tapasztalunk, 5-ös kezelést kapott talajok esetében, a kezdeti 5,79%-os arányuk (*Bsh1236* enzim alapján), a 8. hétre 12,32% lett. Találtunk arra is példát, hogy nem csak az oltást követő 8. hétre, hanem csak a 16. hétre éri el a III. törzs a legnagyobb közösségen belüli arányát. Ezt figyeltük meg többek között a 3-as kezelés hatására, ahol (*BtsCI* enzim alapján) a kezdeti 0,69%-os arányuk a 16. hétre 5,09% lett. Többször is előfordult, főleg az oltás utáni 2. és 3. héten, hogy nagymértékben lecsökkent a törzs közösségen belüli aránya, vagy akár nem is sikerült detektálnunk, viszont 8. hétre érte el a legnagyobb közösségen belüli arányát.

Az oltatlan talaj esetében viszont az említett baktériumtörzs szintén a 8. hétre, mutatott jelentősebb változást az arányában, viszont ez a kezelt talajokkal ellentétben egy közösségen belüli csökkenés volt.

A foszfát szolubilizáló IV. törzset több esetben nem sikerült kimutatni a kontroll talajokban, csupán az 5-, illetve 8-as kezelés kontroll talajában, tudtuk - kis arányban - detektálnunk (0,57 %, és 0,72 %). A 3- és 4-es kezelés esetében a törzset a 6-, és 8-ig héten detektáltuk, de a 16. héten nem sikerült kimutatnunk. A 8-12. hétre a 7- és 8-as kezelésben, kimutathatóság határán (0,38%, 0,51%), de jelen volt a bakteriális közösségben.

Az oltatlan talaj esetében, *BtsCI* enzimmel való emésztés során, detektálni tudtuk az oltást követő 1-2 héten (0,53%, 0,82%), illetve a 8-ik héten (0,94%), is. A 12-16-ik héten, viszont nem voltak kimutathatók.

A sziderofór termelő képessége által, a növények növekedését serkentő és egyben a növény patogének elleni védekezésben is szerepet játszó V. törzs közösségen belüli aránya, a 16 hetes vizsgálati periódus alatt nem mutatott jelentős változást a két talajoltó készítménnyel való kezelést követően. Aránya és annak változása a közösségben megegyezik az oltatlan talajban tapasztaltakkal.

Az oltatlan talaj esetében az oltás után 1 nappal, illetve 1 héttel tapasztalunk egy növekedést a törzs arányában, amely viszont a 16-ik hétig fokozatosan csökken.

A VI. törzs, amely a cink (Zn^{2+}) szolubilizációján keresztül, képes a növényt ezzel az esszenciális tápanyaggal ellátni, így közvetve serkenti növekedését, a kezelt talajban többször is jelentős arányban fordult elő (pl.: a 3-, 5-, 7-es kezelésben részesült területeken). Ez a nagyobb közösségen belüli arány (6,49% a 3-as kezelés esetében) a 3-5-ik hétre a legtöbb esetben nagymértékben csökkent (0,45%, szintén 3-as kezelés) majd a 16-ik hétre szintén kisebb arányban volt jelen, mint kezdetben. Olyan esetet, amikor magasabb lett volna a 16-ik hétre az aránya, mint az oltás előtt nem tapasztaltunk.

Az oltatlan talajban a törzs legnagyobb közösségen belüli aránya a mintavételezés kezdetén volt, majd a 16-ik hétre, hasonlóan a kezelt talajokhoz, itt is fokozatosan csökkent.

V. Összegzés

A munkánk során felállított modellrendszer alkalmasnak bizonyult arra, hogy különböző talajokban nyomonkövessük az oltásra használt 7 baktérium törzset. A kezelés előtti kontroll talajok mikrobiális diverzitása nem változott a kezelések hatására, amit nem is várhattunk, hiszen az egyes kezelések során használt öt-hat oltótörzs, nem képes egy olyan nagy fajgazdagságú közegben, mint a talaj, mérhető változást eredményezni. A teljes mintasor egyidejű vizsgálata rávilágított, hogy a talaj mikrobiális közössége a mintavétel időtartama

alatt (16 hét) átalakult, ahogy azt láttuk is az oltás utáni 1 nap, illetve 1-2-3 hétben vett minták elváltak az oltás után 12-16-ik heti mintáktól.

Az azonos összetételű, de eltérő mennyiségben (1kg/ha, és 5kg/ha) kijutatott bakteriális inokulumok esetében eddigi eredményeink alapján nem tapasztaltuk, hogy a kezdeti nagyobb mennyiség következtében, a közösségen belüli aránynövekedés is nagyobb lett volna. Nem befolyásolta jelentősen az oltótörzsek közösségen belüli arányát az, hogy mekkora mennyiségben került kijuttatásra az adott törzs.

A N₂ fixáló törzsek (I. II.) közösségen belüli aránya megnőtt egészen az oltást követő harmadik hétig, hasonlóan, mint az oltatlan talajban. A kezelt talajok esetében, viszont ezen közösségen belüli aránynövekedés jóval jelentősebb volt, mint az oltatlan talaj esetében. A foszfát- szolubilizáló (III.) és nikkel- transzlokáló (IV.) törzsek közösségen belüli aránya az 5.- 8.-ik hétre nő meg, de arra is találunk példát, hogy a 3-as kezelés hatására a foszfát-szolubilizáló III.-as törzs, a 16-ik héten éri el a legnagyobb közösségen belüli arányát. A további három törzs (V. VI. VII.) a kontroll talajokban alacsony arányban voltak jelen, mely a kezelések hatására sem változott.

Megállapítható, hogy négy törzs esetében (melyek N₂ fixálók, auxin termelők, foszfát- és nikkel- szolubilizálók) az oltás hatására közösségen belüli arányuk növekedett, míg három törzs esetében (melyek sziderofór termelők, cink-szolubilizálók, és N₂ fixálók) az oltás hatását nem tapasztaltuk. A nagy mennyiségű mintaszám következtében a *BsuRI*-el enzimmal való emésztés adatait, még nem sikerült teljes mértékben feldolgozni. Ezen adatok feldolgozásával, egy pontosabb képet kaphatunk az alkalmazott kezelések hatékonyságáról.