



# Mezőgazdasági talajoltó baktérium törzsek nyomonkövetése molekuláris ujjlenyomat módszerrel



András Karfi<sup>1</sup>, Zsuzsanna Nagymáté<sup>1</sup>, Yan Correa Rodrigues<sup>2</sup>, André Bordinassi Medina<sup>3</sup>, Csaba Romics<sup>4</sup>, József Kutsai<sup>4</sup>, Ilkó Pusztai<sup>4</sup>, Éva Kárpáti<sup>4</sup>, Rita Kovács<sup>4</sup>, Károly Márialiget<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Yokohama National University, Department of Microbiology, Yamato P. utca 1/C, H-1117, Budapest, Hungary; Fax: +36-1-381-2174; <sup>2</sup>Evandro Chagas Institute, Bacteriology and Mycology Section, Rodovia BR 116, Km 07, São Levindando, Ananiasópolis, Brazil; <sup>3</sup>University of São Paulo, Faculty of Philosophy, Sciences and Languages of Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes Baturo Monte Alegre, BR-990, Ribeirão Preto-SP, Brazil  
<sup>4</sup>BioFil Ltd., Váci út 87, H-1139 Budapest, Hungary  
<sup>5</sup>Samplint Ltd., Rákóczi u. 19, H-1035 Budapest, Hungary  
andkari@yahoo.com

## Bevezetés

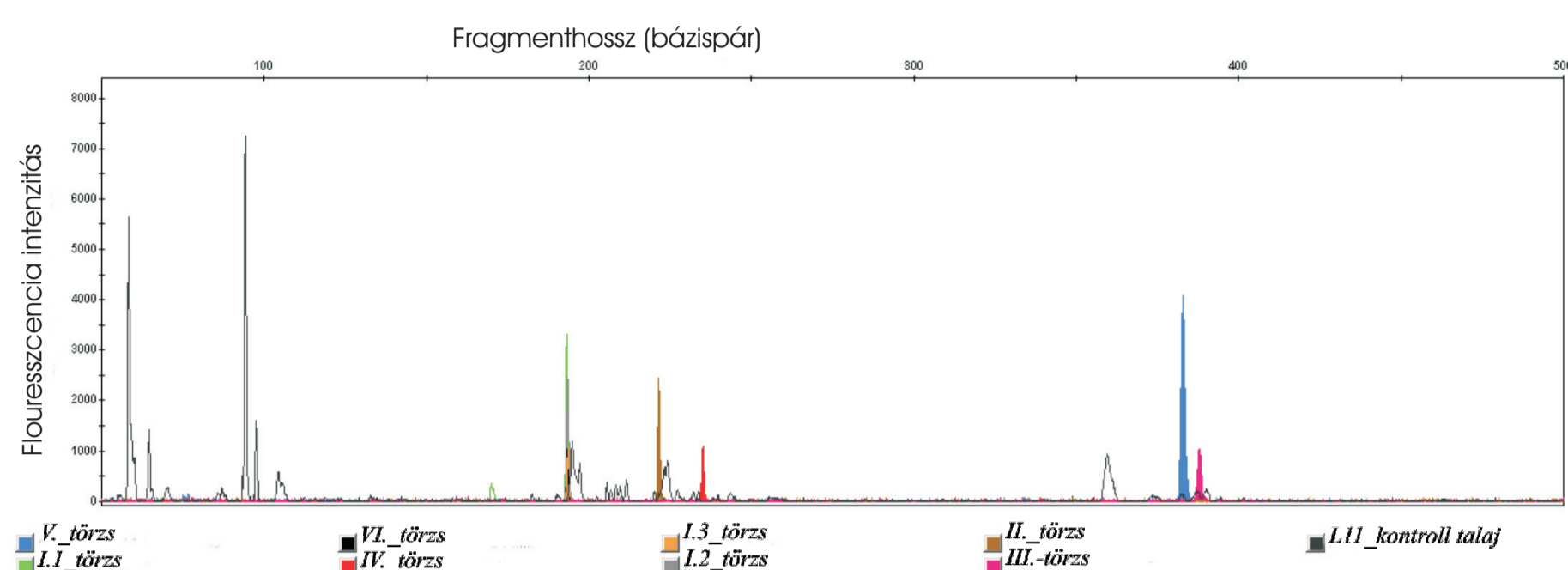
A növényi növekedést serkentő talajbaktériumok használata, a fenntartható mezőgazdasági termelés egyik lehetőségeként, egyre nagyobb teret nyer napjainkban. Ezen mikroorganizmusok jótékony hatással vannak anyagcsere sajátosságuk révén, mint például- N<sub>2</sub>-fixáció, szideroforok, hormonok (auxin) termelése által a növények növekedésére, gyökérféregződésére és nem elhanyagolható módon a terméshozam növelésére. A környezeti tényezők, a talaj szerkezete, fizikai- kémiai tulajdonságai, illetve a talaj mikrobiótája együttesen befolyásolhatják a különböző baktériumtörzsek talajban való túlélését, illetve meglepedését.

Az elmúlt több mint tíz évben a Biofil Kft. által előállított különböző oltóanyag-kultúrákat hatékonyan alkalmaztak szabadföldi természetben a növényi növekedés valamint terméshozam növelésére.

Munkánk során különböző baktériumtörzsek keverékéből álló hat féle oltókultúra tesztelését végeztük egy szabadföldi kísérlet sorozatban. Célunk volt a különböző baktériumtörzsek talajban való túlélésének, közösségen belüli aránybeli változásának monitorozása molekuláris biológiai ujjlenyomat módszerekkel, úgymint Terminális Restriktív Fragmenthossz Polimorfizmus (T-RFLP).

## A vizsgálatba vont törzsek jellemzése, anyagcsere sajátosságai

Az I. VI. X. számmal jelzett törzsek N<sub>2</sub>-fixációra való képességükkel, és a növényi hormontermelésen (auxin) keresztül képesek a növény növekedését, továbbá gyökérféregződést fokozni. Szintén képes a gyökérféregződést, és növekedést serkentő a II-es törzsek. Foszfát szolubilizációra és szideroforok termelésére egyaránt képesek a IX., XI. számmal jelzett törzsek, így növelve a növény tápanyag ellátottságát és védelmét az egyes növény patogén gombákkal szemben. Szintén jelen van a sziderofor termelési képesség az V. VIII. -as törzsek esetében. Extracelluláris enzim (proteáz, pektináz) termelése révén képesek tápanyagokat mobilizálni a III., VII. számmal jelzett törzsek, illetve Zn- szolubilizáció keresztül tápanyag növekedést elősegíteni a IV. számú törzsek.



1. ábra. T-RFLP kromatogram. BtsCI enzimmel történő hasítást követő elválasztás eredményeként kapott T-RF-ek a vizsgálatba vont törzsek valamint a kontroll talaj minta esetében.

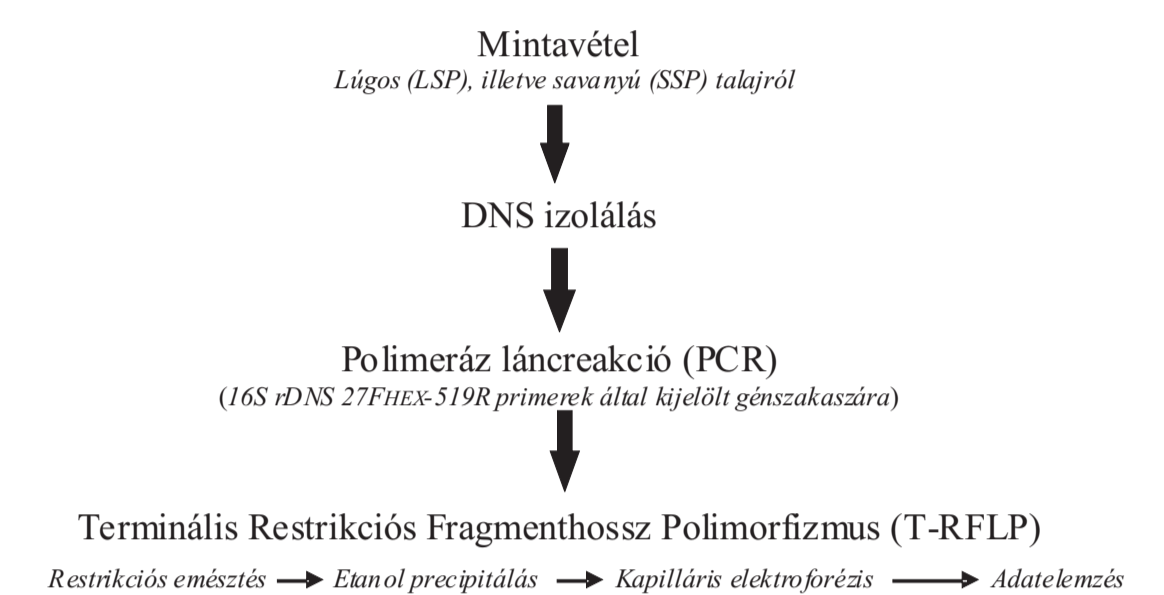
## Anyag és módszer

A 15 baktérium törzsek, molekuláris biológiai vizsgálata során, meghatározásra kerültek az adott törzsek Terminális Restriktív Fragmentjei (T-RF), melyek ismeretében az egyes törzsek teljes bakteriális közösségen belül azonosíthatók, arányuk meghatározható. Továbbá ezen módszer alkalmazásával a szabadföldi kísérletbe vont törzsek közösségen belüli változása nyomon követhető, az oltást megelőző, illetve az oltást követő ötödik hétig, savanyú, illetve lúgos talajon egyaránt.

### Modell rendszer felállítása a különböző baktériumtörzsek elkülönítése céljából

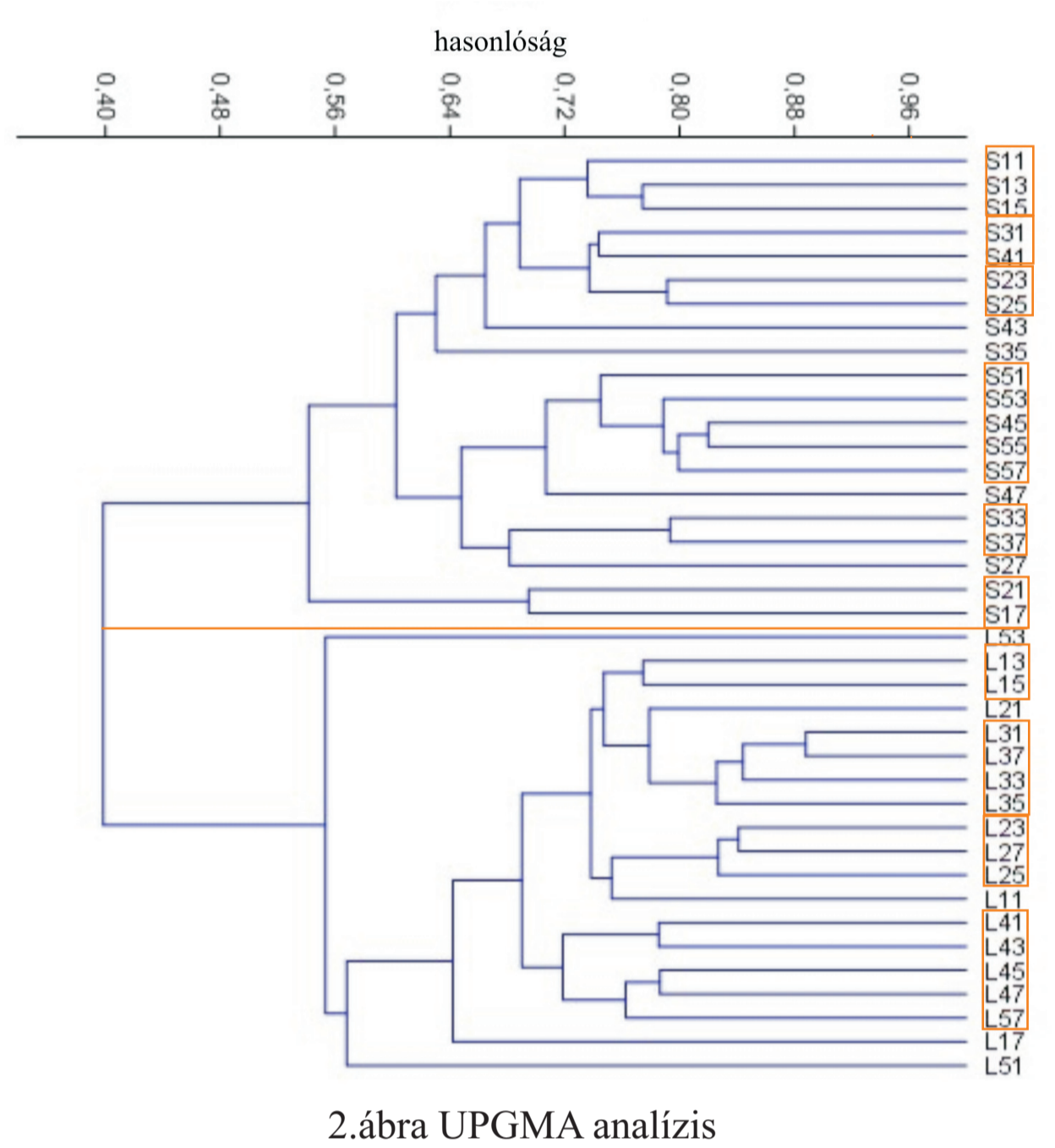
1. A baktérium törzsek teljes 16S rRNS génjének bázisrendet meghatározása.
2. *In silico* a 16S rRNS gén legvariábilisabb 500 bázispár hosszúságú szakaszának kiválasztása.
3. A kiválasztott génszakaszon, *in silico* nagyszámú restriktív endonukleáz tesztelésével meghatározásra kerültek a törzsek Terminális- Restriktív Fragmentjei (T-RF).
4. *Bsh*1236, *Bts*CI restriktív endonukleázok kiválasztása, melyek a vizsgálatba vont törzsek esetében eltérő T-RF-eket eredményeztek a 27F-519R primer pár által közre fogott génszakaszon.
5. A kiválasztott primer pár és enzimek gyakorlati tesztelése a törzseken.

### A talajoltó törzsek monitorozása



## Eredmények

Mivel az egyes talajokra alkalmazott kezelések eltértek, ezért azt a továbbiakban külön jelöljük, lúgos talajon 1,3,5,7-es kezelés, míg savanyú talajon 2,4,6,8-as kezelés



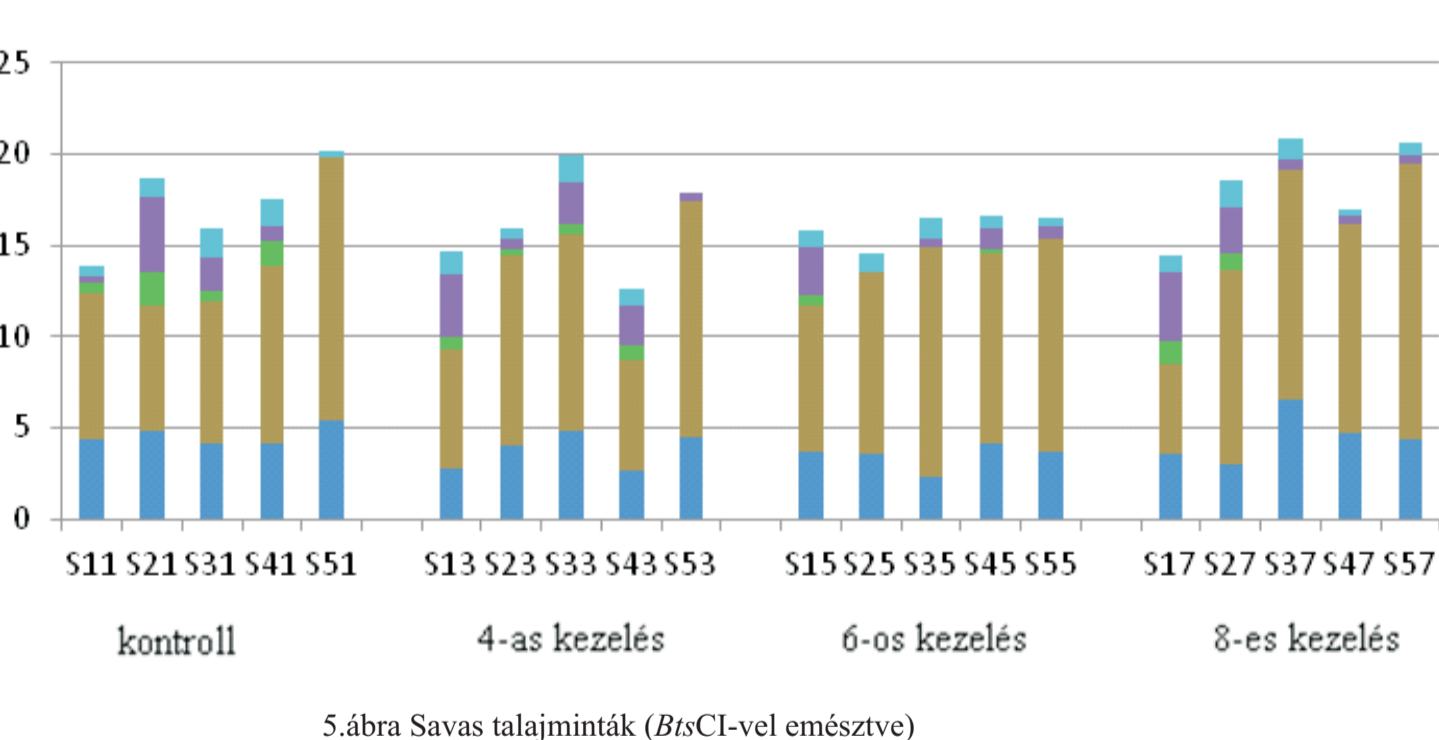
2. ábra UPGMA analízis

A vizsgált talajminták teljes bakteriális közösségére készített hasonlósági dendrogramon a savas, illetve a lúgos talajminták elválást mutatnak.

Mindkét talajtípus esetén elmondható, hogy a kezeletlen (kontroll) talajok elkülönülnek az oltókultúrákkal kezeltéktől. Az eltérő kezeléseket kapott talajok, a mintavétel időpontja szerint mutatnak hasonlóságot.

A legnagyobb (>80%) hasonlóság a lúgos talajnál: az oltást követő 1 héten vett minták esetében (L31, L37, L33, L35), illetve az oltást követő 1 napon (L23, L27, L25) figyelhető meg. A savanyú talaj mintáknál általánosan jellemző, hogy a hasonlóság kisebb mértékű, viszont két minta esetében, melyek azonos kezelést (S45, S55) kaptak, eléri a 80% körüli értéket.

### Savanyú talajra kijuttatott törzsek a talaj teljes baktérium közösségen belüli arányának változása



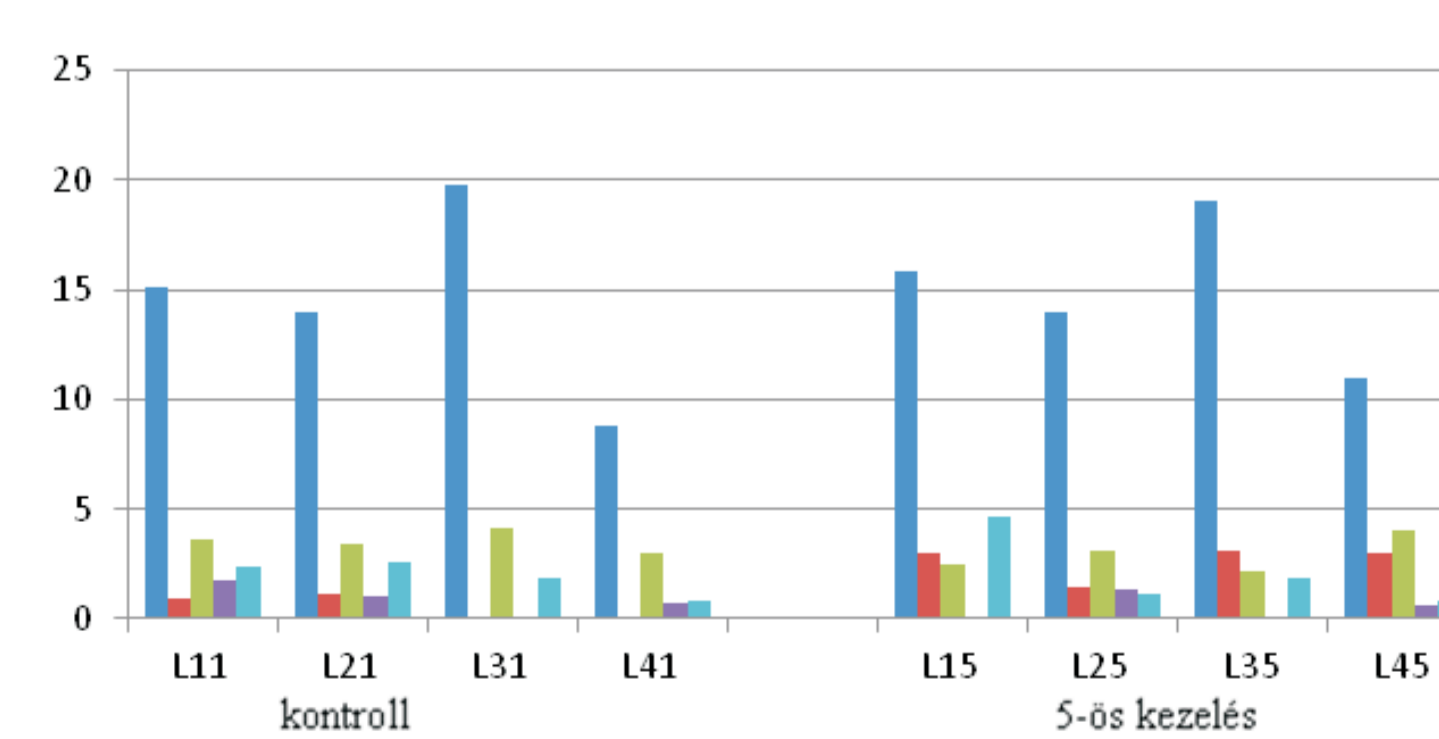
5. ábra Savas talajminták (BtsCI-vel emésztve)

A vizsgálatba vont baktérium törzsek a savanyú talaj esetében a kezelést megelőzően a talaj teljes baktérium közösségében kimutathatók volt.

A VI. számmal jelzett törzsek közösségen belüli aránya az oltást követő harmadik hétig növekedett mind a kezelt, mind pedig a kontroll talajok esetében. A további törzsek esetében a közösségen belüli arányuk a harmadik hétre csökkent mutat.

Elmondható, hogy az egyes törzsek közösségen belüli arányai hasonlóan változott mutatnak mind a kontroll mind pedig a kezelt talajokban egyaránt.

### 5-ös kezelésben alkalmazott törzsek közösségen belüli arányainak időbeli alakulása az oltást követő harmadik hétig

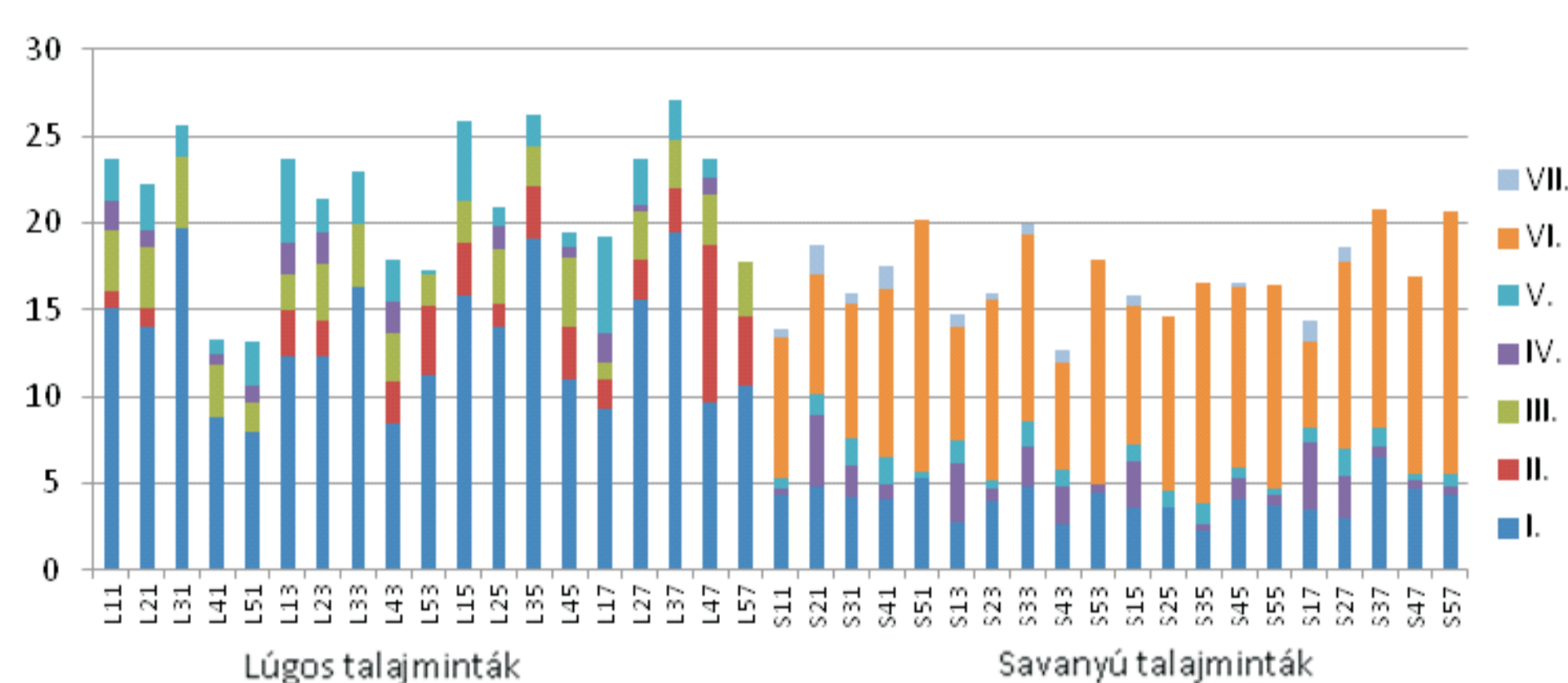


8. ábra Az 5-ös kezelést kapott és a kezeletlen (kontroll) talajok oltótörzseinek arányai.

A lúgos talajon végezték 5-ös kezelésben alkalmazott két baktérium törzsek közösségen belüli arányában növekedés volt tapasztalható a kontroll talajhoz viszonyítva. A kezelést kapott talajon a második hétre (L45) kimutatható volt a IV. számmal jelzett törzsek, amely az oltást megelőzően (L15) nem volt kimutatható a közösségen belül. Továbbá a kezelés hatására a III.-as törzsek aránya is növekedést mutatott a közösségen belül.

A kontroll talajjal ellentétben, ahol egy hét (L31) elteltével nem volt kimutatható a II-es törzsek, a kezelést követően megjelent az adott talajminták közösségében.

### A vizsgálatba vont törzsek teljes baktérium közösségen belüli aránya a két különböző talajtípus esetében az oltást megelőző időponttól az oltástól eltelt harmadik hétig



3. ábra Alkalmazott törzsek teljes bakteriális közösségen belüli aránya lúgos, illetve savas talajon (BtsCI enzimmel által adott T-RF-ek alapján)

### Lúgos talajra kijuttatott törzsek a talaj teljes baktérium közösségen belüli arányának változása

A vizsgált 15 baktérium törzsek közül, 5 törzset mindkét talajtípusra kijuttattak. A kezelést megelőzően, a lúgos talaj teljes baktérium közösségében nagyobb arányban voltak jelen az egyes oltásra használt törzsek, mint a savanyú esetében, mely a vizsgálat első három hetében is megfigyelhető volt.

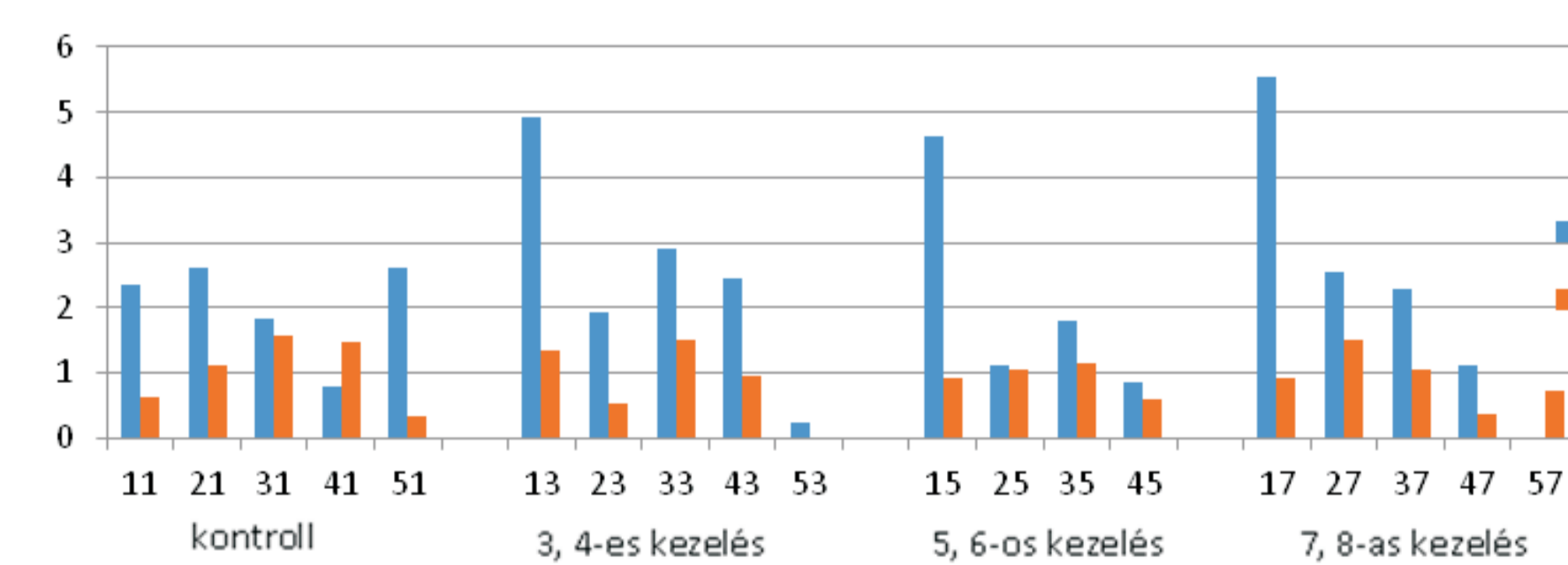
Az I-es számmal jelzett törzsek, azonban nem egyetlen, hanem több, azonos nemzetségre tartozó baktérium törzset jelöl. Az azonos nemzetségre tartozó törzsek a 16S rDNS szekvenciáinak nagy hasonlósága miatt, a két enzimmel (*Bsh*1236, *Bts*CI) történő emésztés során, azonos T-RF-eket eredményeztek. Ezzel a módszerrel, mindössze a VI-os számmal jelölt törzset tudtuk elkülöníteni, a nemzetségből, ezt kiküszöbölendő egy harmadik restriktív endonukleázal való emésztést is bevezettünk, amely adatok még feldolgozás alatt állnak.

### Közös törzsek a két talajon

Három törzsek, az I., V. és IV. mindkét talajtípusra alkalmazott oltókultúrában jelen volt, így összehasonlíthatóvá válik az eltérő talaj típusok ezen baktériumtörzsekre gyakorolt hatása.

A IV-es törzsek jelentős arányban van jelen a savas kémhatású kezeletlen és kezelt talajokban egyaránt, míg az V-ös törzsek a lúgos, kezeletlen és kezelt talajokban volt számottevőbb. Azonban mindkét törzsek és mindkét talajtípus esetében elmondható, hogy a közösségen belüli aránya az oltást követő harmadik hétre csökkent.

### Az V. számú törzsek közösségen belüli arányának változása a két különböző talajtípus esetében az oltást követő harmadik hétig

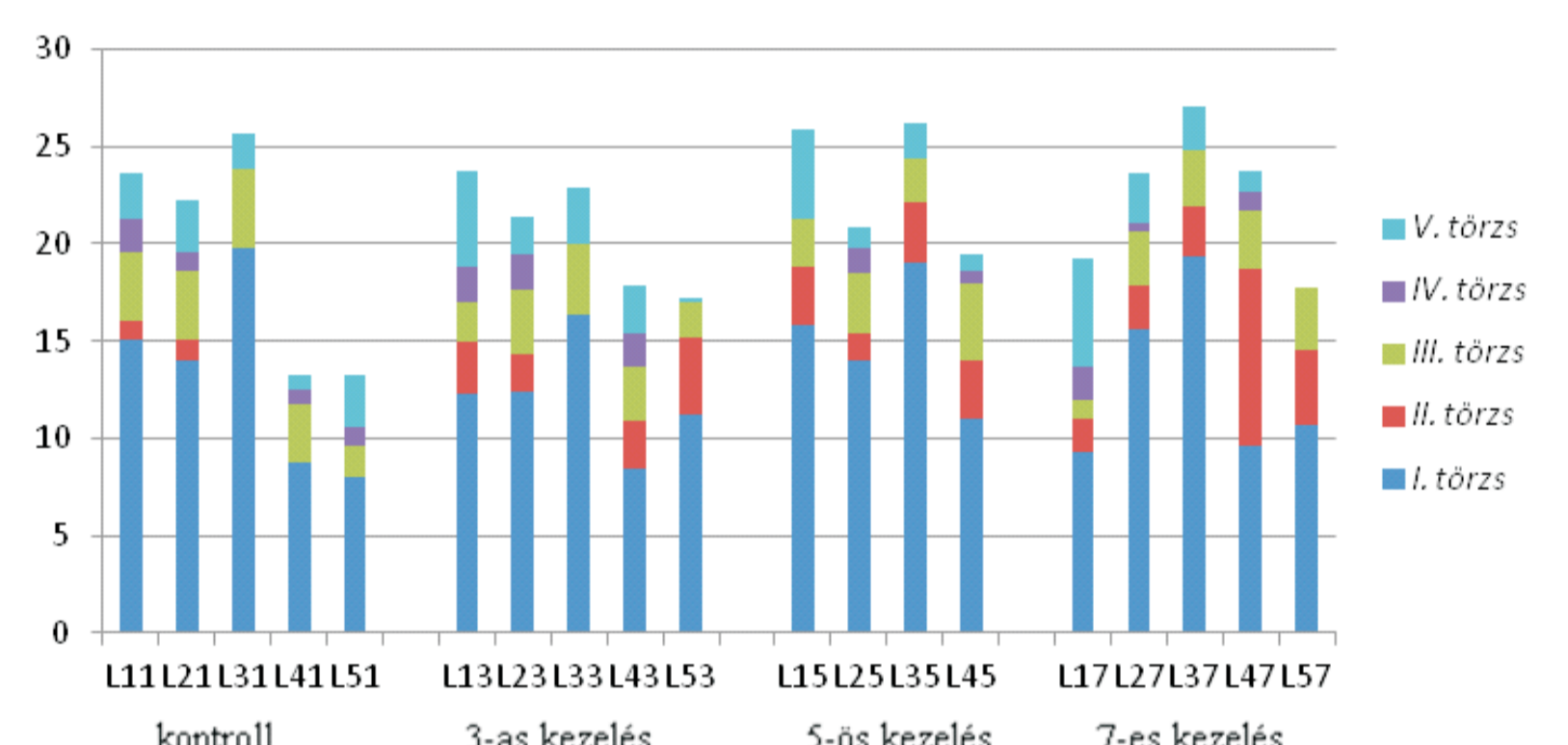


6. ábra Lúgos (LSP), és savas (SSP) talajon az V. törzsek

A sziderofor termelő V-ös törzsek, a lúgos talajon a 3,5 és 7-es kezeléseknél közvetlenül az oltást előtt nagy arányban voltak jelen az adott talaj bakteriális közösségében, míg az oltást követő harmadik hétre aránya csökkent mutatott. Ellenben a kezeletlen talajban ilyen jellegű változás nem volt megfigyelhető.

A savanyú talajban hasonló aránybeli változást mutat az egyes kezeléseknél a törzsek. A legtöbb esetben, az oltás hatására nőtt a törzsek közösségen belüli aránya, egészen az oltást követő első hétre, majd fokozatosan csökkent, hasonló arányra, mint amit az oltást előtt tapasztaltunk.

### Lúgos talajra kijuttatott törzsek a talaj teljes baktérium közösségen belüli arányának változása



4. ábra Alkalmazott törzsek teljes bakteriális közösségen belüli aránya a különböző kezeléseknél hatására az oltást követő harmadik hétig lúgos talajon a (BtsCI enzimmel által adott T-RF-ek alapján)

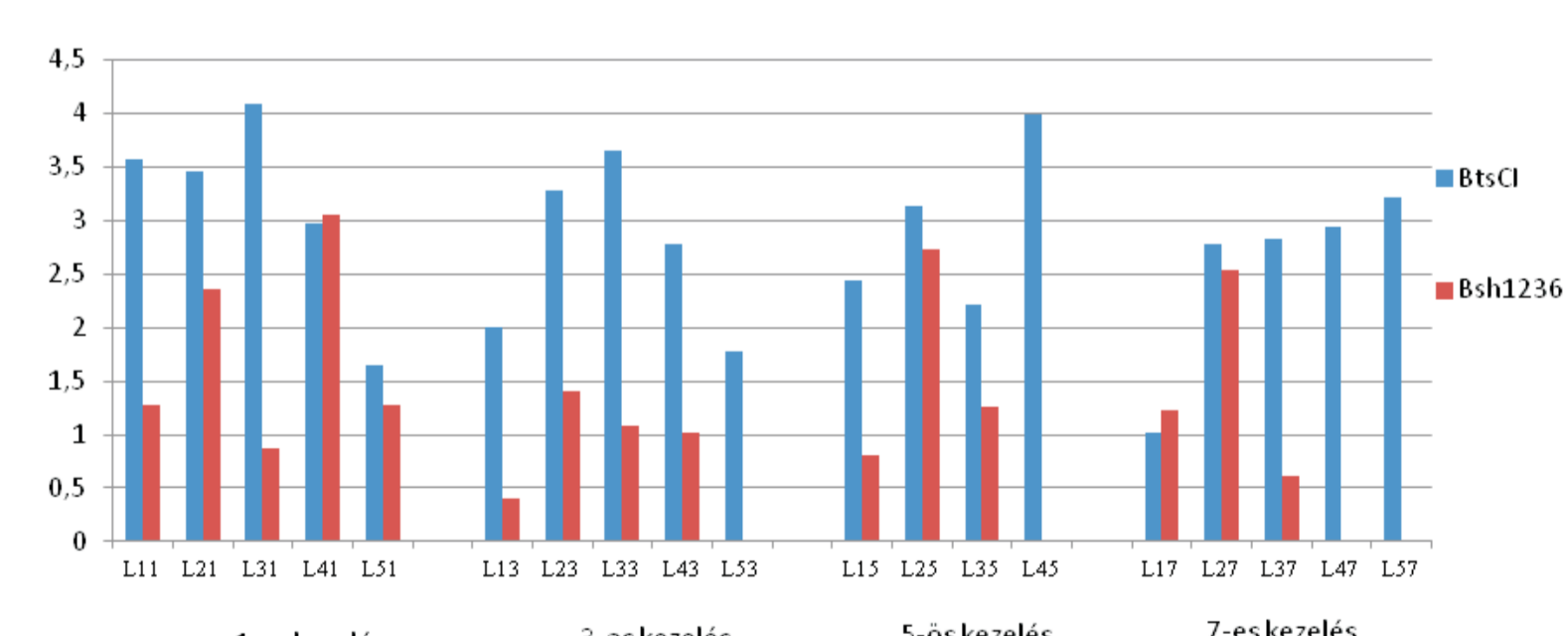
A talajban, a Zn- szolubilizációra képes, IV-es törzsek kivételével (L15), mindegyik törzsek jelen volt a kezeletlen (kontroll) talajban, az oltást megelőzően valamint oltást követően is.

A kontroll talajban az első hét után a növényi növekedésre serkentő ható II-es törzsek, nem volt kimutatható. A kezelésen átesett talajmintákban viszont jelen volt, sőt a 7-es kezelés esetében az oltást követően két héttel aránya a közösségen belül növekedett.

A III. számú törzsek oltatlan (kontroll), illetve a 3-as kezelésen közösségen belüli aránya az oltást követő első hétig növekszik, majd fokozatosan lecsökken az oltást követő harmadik hétre. Ugyanezen törzsek aránya viszont az 5-ös illetve 7-es kezelés során fokozatosan növekszik a harmadik hétre.

A vizsgálatba vont számos törzsek esetén elmondható, hogy közösségen belüli arányainak változásában hasonlóság tapasztalható a kontroll és a különböző kezeléseken átesett talajokban egyaránt. Azaz közösségen belüli arányuk az oltást követő első hétig növekedést mutat, majd a harmadik hétre kismértékben lecsökken.

Egyes törzsek esetében tapasztalható, hogy az oltást követően közvetlenül közösségen belüli arányukban nem tapasztalható változás, azonban az első hétre arányukban kis mértékű növekedés figyelhető meg, mely az adott mintavételi időpont kontroll talaja esetében nem jelentkezik (például V-ös törzsek).



7. ábra Az V. számmal jelzett törzsek közösségen belüli arányának változása két restriktív endonukleázal (BtsCI, Bsh1236) kapott T-RF-ek alapján az oltást követő harmadik hétig

## Összegzés

A lúgos, és savanyú talajok teljes baktérium közössége elkülönül egymástól, továbbá az egyes kezeléseknél is együtt csoportosulnak a hasonlósági dendrogramon.

A három hetes vizsgálati periódus során az egyes törzsek közösségen belüli arányai eltérően alakultak. Számos törzsek esetében a harmadik hétre egy a közösségen belüli aránya növekedés tapasztalható, azonban egyes törzsek esetében viszont csökkentés volt kimutatható.

Ahhoz hogy pontosabban lássuk egyes kezeléseknél hatásait, jelenleg is folyik a további mintavételi időpontokból származó adatok feldolgozása, amelyek egészen az oltást követő 16. hétre is magukba foglalják. Mindez kiegészítendő azzal, hogy a két restriktív endonukleázal (*Bsh*1236, *Bts*CI) nem elkülöníthető törzsek esetében egy további enzimet is bevontunk a vizsgálatba, amely szintén feldolgozás alatt áll. Ezen adatokkal kiegészítve, az egyes kezeléseknél hatékonyságáról, pontosabb képet kaphatunk.

A nitrogén fixációra képes törzsek esetében, amelyek 16S rDNS alapon nem voltak elkülöníthetők, felmerülhet a nitrogénáz enzimet kódoló *nif* funkció gén alapon való elkülönítés lehetősége.