SZENT ISTVÁN EGYETEM

KÖRNYEZETI STRESSZTÉNYEZŐKKEL SZEMBEN TOLERÁNS *PSEUDOMONAS* TÖRZSEK ÖKOFIZIOLÓGIAI SZELEKCIÓJA

Doktori értekezés tézisei

Várady György

Gödöllő

2001.

A doktori iskola

megnevezése: A környezetgazdálkodás talajtani, agrokémiai, mikrobiológiai és földművelési alapjai

vezetője: Prof. Dr. Menyhért Zoltán
az MTA doktora, egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Környezeti és Talajgazdálkodási Intézet

A doktori alprogram

megnevezése: Mezőgazdasági-, környezeti mikrobiológia és talajbiotechnológia

vezetője: Prof. Dr. Kecskés Mihály
az MTA doktora (biol.), egyetemi tanár
MTA Környezetvédelmi Mikrobiológia Tanszéki Kutatócsoport

Tudományága: környezettudomány

Témavezető: Prof. Dr. Kecskés Mihály
az MTA doktora (biol.), egyetemi tanár
MTA Környezetvédelmi Mikrobiológia Tanszéki Kutatócsoport

…….. ……
az iskolavezető jóváhagyása a témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Az intenzív ipari és mezőgazdasági tevékenységek következtében a környezetbe kerülő szennyező anyagok (pl. peszticidek, xenobiotikumok, festékek, mosószerek, stb.) egyre fokozódó mértékben károsítják a bioszférát.

A talajokba és vizekbe jutó szennyező anyagok lebontásában elsődleges szerepet játszanak a lebontó mikroorganizmusok. A tartósan vagy erősen szennyezett talajokban csak az adott mérgező anyaggal szemben rezisztenssé váló mikroorganizmusok képesek tartósan fennmaradni. Ezek elfoglalják a kevésbé rezisztens, az adott szennyeződést tolerálni nem képes mikrobák ökológiai niche-ét, melynek következtében az adott talajok biológiai diverzitása nagymértékben csökken, és így sokkal kevésbé képes alkalmazkodni a környezet egyéb irányú változásaihoz (a biológiai egyensúly megzavarása).

Napjainkban egyre fokozottabb az igény a szennyező anyagok által kiváltott káros, a magasabb rendű élőlényeket is kedvezőtlenül érintő, sokszor visszafordíthatatlan változásoknak a megelőzésére. Ennek legfontosabb területei közül kiemelkedően fontos a termőföldek és a természetes vizek védelme. A széles körben alkalmazott agrokemikáliák (főként a lassú lebomlású és a nehézfém-tartalmú növényvédő szerek) fokozott terhelést jelentenek a termőtalajok életközösségeire.

A környezetidegen vegyszeres védekezési módnak a mérséklésére egyre inkább előtérbe helyeződik a környezetkímélő biológiai védekezés lehetősége. A megfelelően kiválasztott mikroorganizmusok (főként baktériumok és mikroszkópikus gombák) egyenkénti vagy törzseinek kombinált felhasználásával viszonylag kis beruházással is sok esetben tartós hatást és nagy sikereket lehet elérni.

Vizsgálataink a talaj–növény–mikroorganizmus rendszerben orientált alapkutatási céllal – az általunk szelektált baktérium törzsek gyakorlati felhasználási lehetőségeit is szem előtt tartva – a következőképpen kerültek kidolgozásra:

1. Előkészítő vizsgálatok:
   - Mintavétel a Magyarország különböző tájegységein előforduló legalapvetőbb talajtípusokból;
   - Fluoreszkáló *Pseudomonas* törzsek izolálása a talajmintákból és a talajmintákban nevelt növények rizoszférájából;
   - Az izolátumok faji szintű azonosítása klasszikus és modern (BIOLOG) mikrobiológiai módszerek alkalmazásával.
2. *In vitro*, Petri-csészés vizsgálatok:
   - A *Pseudomonas* törzsek egymással és *Rhizobium*okkal szembeni antagonista tulajdonságainak kimutatására;
   - Antagonista tesztek *Pseudomonas*oknak néhány gyakori növénypatogén gomba *(Pythium, Phoma, Ascochyta, Fusarium*) képviselőivel és az *Erwinia* (tűzelhalás) törzseivel szemben;
   - *Pseudomonas* törzseink antibiotikum érzékenységének vizsgálata korongteszt segítségével;
   - a *Pseudomonas*ok hidrogén-cianid (HCN) és auxin termelésének (IES), valamint pH tűrésének meghatározása;
   - Környezetkárosító fémvegyületek hatásának kimutatása a *Pseudomonas*ok szaporodására és sziderofor termelésére krómazurolos módszerrel;
   - A *Pseudomonas*ok fémérzékenységének vizsgálata folyadékkultúrában fotométerrel mérve;
   - Csíranövény teszt a *Pseudomonas*ok gyökérnövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálatára.
3. Műszeres vizsgálatok:
   - A *Pseudomonas*ok által termelt antibiotikus természetű, másodlagos anyagcseretermékek jelenlétének és mennyiségének vizsgálata HPLC segítségével kétféle táptalajon.
4. Tenyészedényes kísérletek:
   - *Pseudomonas* törzsek és törzskeverékek antagonista hatásának kimutatása növénypatogén gombák törzseivel és törzskeverékeivel szemben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. A kísérletekhez használt *Pseudomonas* törzsek begyűjtése, izolálása, azonosítása és törzsgyűjtemény létrehozása

- A hazánkban előforduló főbb talajtípusok begyűjtése és jellemzése;
- Sziderofor termelő *Pseudomonas*ok izolálása:
  - a begyűjtött talajok szuszpenziójából King B táptalajon határhígításos módszerrel (SIMON et al., 1973),
  - a begyűjtött talajokban nevelt tenyészedényes növények rizoszférájából Tepper módszerével (TEPPER, 1945).
- Az izolált törzsek azonosítása:
  - klasszikus módszer szerint: Gram festés, kataláz, oxidáz teszt, morfológiai tulajdonságok, szénhidrátok hasznosítása, fermentációs képesség, különböző hőmérsékleteken történő növekedés, nitrát redukció, UV pigmentek jelenléte alapján (BERGEY'S MANUAL, (1984), JESSEN, (1965) és LÁNYI, (1980));
  - BIOLOG teszttel: 95 eltérő szénforrás hasznosítását alapul véve a TTC színváltozása alapján detektálva, számítógépes adatbázis segítségével kiértékelve;
- Az izolált *Pseudomonas* törzsek tárolása glicerines közegben mélyhűtőben.

2. *In vitro*, Petri-csészés ökofiziológiai tesztek *Pseudomonas*okkal

- Antagonista tesztek *Pseudomonas* törzsek között: King B táptalajon egynapos baktérium szuszpenzióból történő pontszerű leoltással, 24 órával később egy másik törzs szuszpenziójának ráporlasztásával, 48 óra múlva a gátlási zóna mérete alapján kiértékelve;
- Antagonista tesztek hat *Erwinia amylovora* és hét *Rhizobium* törzzsel szemben King B táptalajon, valamint a *Rhizobium* törzsek között élesztőmannit (YMA) táptalajon az előbbi módszer szerint;
- Antagonista tesztek növénypatogén gombákkal szemben: King B és maláta táptalajon a *Pseudomonas* törzsek és keverékeik pontszerű leoltásával és gombamicéliummal átszőtt agarkockákkal, 48 óra múlva a gátlási zóna mérete vagy a gombatelep torzulásának mértéke alapján kiértékelve;
- Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok 22 féle RESISTEST antibiotikum korong segítségével King B táptalajon üvegkaccsal szélesztett *Pseudomonas* tenyészeteken, 24 óra múlva a gátlási zóna mérete alapján kiértékelve (CZIRÓK, 1999);

– Ökofiziológiai vizsgálatok a *Pseudomonas*ok hidrogén-cianid (HCN) termelésének, auxintermelésének (IES), kitin- és cellulózbontó képességének és pH tűrésének meghatározására;
– Sziderofor-termelés vizsgálata: *Pseudomonas* törzsek pontszerű leoltásával módosított krómazurolos King B táptalajon 16 fémvegyület ($AgNO_3$, As_2O_3, $CdSO_4 \times {}^8/_3H_2O$, $CoSO_4 \times 7H_2O$, $CrK(SO_4)_2 \times 12H_2O$, $CuSO_4$, $HgCl_2$, $MnSO_4 \times nH_2O$, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, $NiCl_2 \times 6H_2O$, $PbCO_3$, $SbCl_3$, $SnCl_2 \times 2H_2O$, Tl_2SO_4, V_2O_5, $ZnSO_4 \times 7H_2O$) nyolcféle koncentrációjának (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 és 1280 µM) jelenlétében, 48 óra múlva a narancssárga sziderofor gyűrű mérete alapján kiértékelve (SCHWYN és NEILANDS (1987));
– A sziderofor-termelés táptalaj függésének vizsgálata: *Pseudomonas* törzsek pontszerű leoltásával módosított krómazurolos King B és krómazurolos maláta táptalajon, 48 óra múlva a narancssárga sziderofor gyűrű mérete alapján kiértékelve;
– Fémérzékenység vizsgálata folyadékkultúrában: 16 *Pseudomonas* törzs tesztelése három fémvegyület ($CoSO_4 \times 7H_2O$, $CrK(SO_4)_2 \times 12H_2O$, $AgNO_3$) négyféle koncentrációjával szemben (10, 40, 160 és 640 µM) King B tápoldatban. Kiértékelés 24 órás, 28 °C-on végzett rázógépes inkubálás után 550 nm-en mért abszorbancia alapján (SPEKTROMOM fotométer);
– Csíranövény teszt: steril, vizes agarban előcsíráztatott 2-3 mm-es gyökcskéjű borsó magvaknak a *Pseudomonas* törzsek 24 órás folyékony szuszpenziójával történő kezelésével. A ráoltott törzsek növekedést befolyásoló hatásának kiértékelése a gyökerek mérete alapján 5 nap szobahőmérsékleten történő inkubáció után.

3. HPLC-s vizsgálatok a *Pseudomonas*ok antibiotikum jellegű másodlagos anyagcsere termékeinek kimutatására

– A minták előkészítése: *Pseudomonas* törzsek egynapos szuszpenziójának 100 µl-es mennyiségével 20 ml tápoldat inokulálása 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban, inkubálás 27 °C-on 2 napig rázatva. A létrejött szuszpenzió lesavanyítása sósavval pH 2-re, extrahálása 2×20 ml etilacetáttal két lépésben 5-5 perces rázatással. A szerves fázis 30 percig 250×g-n centrifugálása Falcon csövekben, majd egy éjszakára -20 °C-ra hűtése. A szerves fázis vákuumos rotációs desztilláló készülékkel (Rotovapor, RE120) cseppnyi mennyiségre párlása, 1 ml metilalkoholban történő felvétele, majd 2 ml-es Eppendorf csövekben 10 percig 500×g-n centrifugálása, a felülúszó kétharmadának HP csövekbe pipettázása és leplombálása;
– A mérés folyamata: 10 µl előkészített minta mérése metilalkoholos rendszerben 10 MP nyomáson 200 és 400 nm között 13 percnyi retenciós idő-

vel nagynyomású folyadék-kromatográfiás módszerrel (HP-1090 HPLC) az alábbi metabolitok vizsgálatára: phloroglucinol, monoacetil-phloroglucinol, pyochelin, pyoluteorin és szalicilsav;

– Az antibiotikum jellegű másodlagos anyagcsere-termékek termelődésének összehasonlítása GCM tápoldaton, és az antibiotikumok fokozott termelődését kiváltó Karner's PDA tápoldaton történő inkubálással.

4. Tenyészedényes vizsgálatok *Pseudomonas*okkal

– Antagonista tesztek 35 *Pseudomonas* törzs egyenkénti és párokban történő magoltásával kétféle *Pythium ultimum* és hatféle *Phoma medicaginis* var. *pinodella* növénypatogén gomba törzskeverékeivel szemben borsó tesztnövénnyel (Gloria de quimper fajta);

  – A fertőzött talaj elkészítése: a *Pythium*ok három napig, a *Phomá*k tenyészeteinek egy hétig 24°C-on történő inkubálása Erlenmeyer lombikokban steril nedves kukorica granulumon. Az azonos fajhoz tartozó gombatörzsek összekeverése, majd a granulumok apró morzsákra zúzása után 1,5%-os *Pythium*, illetve 3%-os *Phoma* micéliummal fertőzött talajkeverék (12-12 kg) létrehozása, átrostálása. A tenyészedények (14×3 cm-es műanyag csövek) beállítása az alsó és a felső részükbe kerülő fertőzésmentes és a középső részbe kerülő fertőzött talajréteggel;

  – *Pseudomonas* szuszpenzió készítése: 250 µl egy napig 27 °C-on rázatott baktérium szuszpenzió King B agarra szélesztése Petri-csészében. 24 óra inkubáció után a baktérium réteg felszedése 20-20 ml steril 0,5%-os karboximetil-cellulóz (CMC) oldattal;

  – A *Pseudomonas*-szal kezelt magvak előkészítése: steril vizes agarban előcsíráztatott, 2-3 mm-es gyököcskéjű borsó magvak *Pseudomonas* szuszpenzióba mártása 10 percre, majd a kezelt illetve kezeletlen (kontroll) magvak fertőzött talajrétegbe helyezése;

  – A tenyészedények elhelyezése: üvegházban napi 16 órás megvilágítással, fénycsövekkel (150000 Lumen), napközben természetes fényt is kapva, nappal 22, éjszaka 20°C-on, nedvesen tartott talajban, random elrendezésben 888 tenyészedényben;

  – A kísérlet értékelése a növények túlélési százalékának kiszámításával, a fertőzöttségi fok meghatározásával és a növények nedves tömegének lemérésével történt.

AZ EREDMÉNYEK

1. *Pseudomonas* törzsek izolálása, azonosítása, törzsgyűjtemény létrehozása

– A 22 lelőhelyről begyűjtött talajok (30-50 kg/minta) elemzése kimutatta, hogy a talajok semleges vagy enyhén lúgos pH-júak, egyeseknél bizonyos fémvegyületek mennyisége nagy, mások pedig humuszban gazdagok, de *Pseudomonas*ok három lelőhely kivételével mindegyikükben előfordulnak.
– A mintegy 300 fluoreszkáló *Pseudomonas* izolátum közül a 22 legintenzívebb pigmenttermelő képességű törzset klasszikus meghatározási módszerrel teszteltük, majd a BIOLOG eredményeivel összevetve az alábbi fajokat azonosítottuk: 3 *P. corrugata* (PCO1-3), 8 *P. fulva* (PFU1-8), 6 *P. putida* (PPU1-6), 2 *P. tolaasii* (PTO1-2) és egy *P. synxantha* (PSY1). A törzseket a nemzetség és fajnevük kezdőbetűivel és egy sorszámmal jelöltük. és Az autentikus *P. fluorescens* és az általunk azonosított törzseket azok spontán mutánsaival (jelölésük: törzsnév+*,$^{\times}$,$^{+}$) együtt a kutatócsoport törzsgyűjteményében, fagyasztócsövekben tartjuk fenn -20°C-on glicerin-tápoldat 1:1 arányú elegyében (összesen 54 törzs).

2. *In vitro*, Petri-csészés ökofiziológiai tesztek *Pseudomonas*okkal

– 35 különböző *Pseudomonas* törzs egymással szembeni antagonista hatását teszteltük két ismétlésben 1225 Petri-csésze felhasználásával King B táptalajon. Megállapítást nyert, hogy a sziderofor termelés és az antagonista képesség között pozitív összefüggések vannak az intenzíven fluoreszkáló törzsek (pl. PFU8, PFU3*, PFU2) esetén.
– A növénypatogén gombákkal (*Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia, Sclerotinia* és *Phoma*) szemben végzett antagonista tesztek eredménye szerint a különböző fajokhoz tartozó saját törzsek (PCO1, PFU2, PTO1) megfelelő hatékonysággal rendelkeztek a gátlási zóna mérete vagy a gombatelep torzulásának mértéke alapján. A két *P. fluorescens* referencia törzs (CHA0 és 2-93) viszont ezeknél is erősebb antagonista hatásúnak bizonyult, főleg a *Fusarium* gomba reprezentánsokkal szemben.
– A legerősebb antagonista hatású *Pseudomonas* törzseket párosával tesztelve általában szinergista, egymás hatását erősítő (PPU3$^{\times}$–PAE1, CHA0$^{\times}$–PAE1, PTO1–PAE1), vagy néhány esetben (PTO1–TMIA3, PTO1–PPU3$^{\times}$) csökkentő, gyengítő antagonista hatások voltak detektálhatók.
– A legjobb hatású párokból alkotott hármas kombinációkkal (PAE1–PSP7–2-79, PAE1–PSP7–PTO1, PAE1–PSP7 PPU3$^{\times}$) az antagonista hatás erőssége

olyan mértékben nőtt, hogy a kórokozó *Ascochyta* gomba szaporodását teljes mértékben meggátolta.

– 19 antagonista jellegű *Pseudomonas* tesztelése történt meg hat *Erwinia amylovora* törzzsel szemben King B táptalajon. A referencia törzsek (TMIA3, 2-79, CHA0) antagonista képessége mellett a PFU8 és a PAE1 jelzésű, saját izolálású törzsek erős antagonista hatása volt kiemelendő. Az *Erwiniá*k *Pseudomonas*okkal szembeni antagonista hatásának vizsgálatánál a gátlási zóna hiánya miatt az *Erwinia*-telepek felületi módosulása alapján lehetett az antagonizmus mértékére következtetni.
– 35 *Pseudomonas* törzset teszteltünk hét *Rhizobium* törzzsel szemben. A *Pseudomonas*ok többsége gátlóan hatott a hasznos N_2-kötők fejlődésére is, de lehetett olyan – a patogénekkel szemben megfelelő antagonizmust mutató – törzseket (PCO1, PTO1) szelektálni, amelyek kompatibilisek lehetnek a *Rhizobium*os magoltásokkal.
– Hét *Rhizobium* törzs egymással szembeni antagonista tesztjénél egyetlen esettől eltekintve gátló hatásokat nem tapasztaltunk.
– 54 *Pseudomonas* törzs érzékenységét teszteltük 22 féle antibiotikummal szemben. Néhány törzs (PFU4*, PCO3, PSY1) fokozottan érzékenynek bizonyult számos antibiotikummal szemben, különösen a kanamycin, a tobramycin és a paromycin esetében, a penicillin, a nystatin és az ampicillin hatása ugyanakkor elhanyagolható volt.
– A 33 tesztelt *Pseudomonas* törzs közül 10 rendelkezett a hidrogén-cianid termelésének képességével, a CHA0 referencia törzs kivételével viszont egyiküknél sem lehetett auxin termelést kimutatni. 6,0-7,5 pH tartományban mindegyik *Pseudomonas* törzs szaporodóképes volt, pH 5 körüli értéknél viszont néhány már nem volt képes szaporodni. A savas körülményeket leginkább tolerálók 4,4-es pH értéknél is szaporodtak, de a PSP5 törzs kivételével sziderofor-termelésre már nem voltak képesek.
– 54 *Pseudomonas* törzsnek 16 fémvegyület nyolcféle koncentrációja hatására bekövetkező sziderofor-termelést detektálva meghatározásra került az alkalmazott fémvegyületek toxicitási sorrendje a legmérgezőbb hatásútól a legenyhébbig: Hg>Co>Sb>Ag>Tl>As>V>Cd>Ni>Cu>Mo>Pb>Mn>Zn>Sn>Cr. Az első nyolc fém vegyületeinek nagyobb koncentrációi erősen mérgező hatásúaknak bizonyultak, nemcsak a sziderofor-termelést, de a *Pseudomonas*ok szaporodását is gátolták. A nikkel és a sorban utána következő fémek lényeges szaporodásbeli gátlást még a legnagyobb koncentrációban sem okoztak.

Néhány törzsnél a sziderofor-termelés fokozódása is megfigyelhető volt a növekvő fémion koncentrációknál (pl. a PFU8 törzs az antimon, réz, ólom, mangán, cink és ón ionok hatására).

– Az 54 *Pseudomonas* törzs proteóz-pepton tartalmú táptalajon történő sziderofor termelésének összehasonlítása során kimutattuk, hogy a kimagasló sziderofor szintézissel rendelkező törzsek (CHA0$^{\times}$, PFU4, PCO3) nagyságrendekkel nagyobb mennyiségű vaskelátot termeltek a legkisebb intenzitású törzsekhez képest. Maláta táptalajon ugyanakkor minden törzsnél nagyságrendekkel kisebb mértékű sziderofor mennyiségeket lehetett detektálni.

– 16 folyadékkultúrás *Pseudomonas* törzs három fémvegyülettel szembeni fémérzékenységének tesztelésekor megállapítást nyert, hogy legtoxikusabbak az ezüst ionok voltak, 160 µM-nál a PFU3 és a PTO1 törzs kivételével az összes *Pseudomonas* fejlődését megakadályozta. Kevésbé hatottak toxikusan a kobalt ionok és legkevésbé a króm ionok, ez utóbbi alacsonyabb koncentrációinál (40 µM-ig) kismértékű szaporodás serkentést lehetett tapasztalni.

– A borsó csíranövény tesztnél 19 *Pseudomonas* törzs közül a PFU2^{+} kifejezetten serkentette a tesztnövények gyökérnövekedését. A kimagasló antagonista hatású törzsek között ugyanakkor erőteljes gyökérnövekedést gátló hatást is ki lehetett mutatni.

3. HPLC-s vizsgálatok a *Pseudomonas*ok antibiotikum jellegű másodlagos anyagcsere termékeinek kimutatására

– A 35 vizsgált *Pseudomonas* törzsnél a leggyakrabban előforduló antibiotikum jellegű vegyület a 2,4-diacetil-phloroglucinol (PHL) volt, ami CGM tápoldatban valamivel nagyobb mennyiségben képződött, mint a Karner's PDA táptalajon. Néhány törzs kivételével (PFU5, PFU6*, PPU3, PPU6, PSP1) a legtöbb *Pseudomonas*nál előfordult. Mindkét táptalajon nagy mennyiségű PHL termelést mutatott a CHA0 referencia törzs. A hazai izolátumok közül GCM tápoldaton csak a PFU8 és a PTO1 volt képes nagyobb mennyiségben szintetizálni, viszont a burgonyakivonatos (Karner's PDA) tápoldat alkalmazásánál az PCO2 kimagaslóan nagy, a PCO1 közepes mennyiségben termelte ezt az antagonizmusért felelős benzolszármazékot.

– A pyoluteorin (PLT) viszonylag ritkábban fordult elő, és a termelt mennyisége is kisebb volt a PHL-hez képest. PDA tápoldatban csak a két referencia törzs (CHA0, 2-79) termelte, GCM tápoldaton viszont a vizsgált törzseink közül a PFL1, a PFU7 és a PPU5 termelt a legtöbbet. Nyolc pyoluteorint

gyengén termelő törzs kivételével a többi *Pseudomonas* nem volt képes a szintézisére.

– A monoacetil-phloroglucinol (MPHL) a PHL egyik prekurzora, így leginkább azzal együtt fordult elő. GCM táptalajon legnagyobb mennyiségben a CHA0 és a PFL1 törzs termelte, de a PTO1, a PTO2 és a PCO3 is jelentős mennyiségben szintetizálta. PDA tápoldatban a CHA0-n kívül igen sokat termelt a PCO2, közepes mennyiséget az PFU7, PFL1, PPU5 és a PSP1 törzs. 13 törzsnél egyik tápoldat alkalmazása esetén sem sikerült kimutatni.

– A pyochelin volt a legritkábban előforduló metabolit. A CHA0 törzs mindkét tápoldatban nagy mennyiségben termelte. GCM tápoldatban a PPU5 és a PSP1 törzs sokat termelt, három másik törzs (PTO2, PTO2*, 2-79) kevesebbet. A burgonyakivonatos tápoldaton kis mennyiségben a PCO1 és a PCO2 törzsnél is ki lehetett mutatni. A többi törzsnél jelenléte nem volt detektálható.

– A kétféle tápoldat hatása között a szalicilsav-termelésnél mutatkozott a legnagyobb különbség. GCM tápoldaton a CHA0-t kivéve csak igen kis mennyiségben termelték a törzsek, 14-nél nem volt kimutatható. PDA tápoldaton sokkal nagyobb mennyiségben termelődött, és minden törzsnél kimutatható volt. Különösen az Érdről származó törzsek (PCO2 és PCO2*) emelkedtek ki rendkívüli mértékű szalicilsav-termelésükkel.

4. Tenyészedényes vizsgálatok *Pseudomonas*okkal

– 35 *Pseudomonas* törzs *Pythium*mal szembeni tesztjeinél még a kimagasló antagonista tulajdonságokkal rendelkező referencia törzsek (CHA0, 2-79) sem tudtak kellő fokú védelmet nyújtani a gyors gombafertőzéses pusztulással szemben. A túlélő növények száma alapján a legkedvezőbbek hatékonysága sem érte el az 50 %-ot. Néhány törzs (PFU2, a PPU5 és a PSP2) esetében a baktérium nélküli kontrollhoz képest is gyengébb eredményeket detektálhattunk. A *Phomá*s kezelésnél a túlélő növények egyedszámaiban nem mutatkoztak nagy eltérések. Az átlagtömegek alapján a legkedvezőbb hatású törzs a PTO1, a PSP1 és a PPU4 volt, a leggyengébb eredményeket pedig a TMIA3, a CHA0 és a PFU7 törzsek mutatták.

– A PAE1 törzs négy kombinációban (PAE1-PTO1, PAE1-PPU3$^{\times}$, PAE1-TMIA3, PAE1-PSP7) kimagasló eredményeket produkált. A *Pythium* ezekben az esetekben is alaposabb pusztítást végzett növényekben, mint a *Phoma.*

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A három legszélsőségesebb lelőhely talajainak kivételével (Nádasladány: síkláptalaj; Apaj: szoloncsák; Kunszentmiklós: szolonyec) mindegyikben előfordultak a fluoreszkáló *Pseudomonas* fajok képviselői.

2. A BIOLOG teszttel és a klasszikus meghatározásokkal is bizonyítást nyert, hogy a *P. fluorescens-putida* fajcsoportba tartozó általunk izolált törzsek között is lényeges rokonságbeli eltérések lehetségesek. A meghatározott fajok egy része a növényi növekedést serkentő talaj-mikroorganizmusok közé sorolható (*P. fluorescens*, *P. putida, P. fulva*), mások fakultatív patogének is lehetnek (*P. corrugata, P. tolaasii, P. aeruginosa*). A meghatározásra került törzsek faji hovatartozásának ismeretében nem lehetett korrelációt találni az izolált törzsek/fajok meghatározott talajtípusokban való előfordulási gyakorisága és az ország egyes területei, illetve talajai között.

3. A növénypatogén gombákkal szembeni teszteknél a CHA0 és a 2-79 referencia törzsekhez képest a saját izolálású törzsek (PCO1, PFU2 és a PTO1) is kimagasló eredményt nyújtottak. Az antagonizmus mértéke viszont erősen függött az alkalmazott táptalajtól és módszertől, illetve a fitopatogén gombáktól. A *Pseudomonas* törzspárok tesztjeinél a közepes antagonista jelleggel bíró törzsek (PAE1, PPU3$^{\times}$, PTO1) együttes oltásával erősebb, szinergista módon fokozott antagonista hatást is lehetett detektálni. Ezen kompatibilis törzspárok aktivitását bizonyos körülmények között egy harmadik törzs (PSP7) tovább növelte. Ezek az adatok a törzsszelekció fontosságát különösen alátámasztják.

4. Az *Erwinia amylovorá*val szembeni vizsgálatok eredményei szerint a *Pseudomonas*ok közötti *in vitro* tesztekben viszonylag nagy gátlási gyűrűt produkáló törzsek (PFU8, 2-79, CHA0, TMIA3, PAE1) tudták leginkább korlátozni a tűzelhalás kórokozóját *in vivo*.

5. A *Pseudomonas*ok sziderofor-termelésének fémvegyületek hatására bekövetkező változása alapján kiemelendő, hogy a fémek (Hg, Co, Ag, Cd) vegyületeinek nagyobb koncentrációi nemcsak a törzsek sziderofor-termelésére, hanem szaporodására is kifejezetten gátló hatásúak voltak. A cink és az ón viszont még a legnagyobb vizsgált koncentrációban is serkentő hatású volt a törzsek sziderofor képzésére.

6. A csíranövény tesztek szerint a nagyfokú antagonista képességgel rendelkező törzsek (PFU2$^{\times}$, PFU8) közül egyesek képesek pozitívan hatni a borsó gyökerek fejlődésére, más részűk viszont a növekedés gátlását is okozhatja.

7. Az *in vitro* antagonista teszteredmények és a tenyészedényes kísérletek között az antagonizmus mértékét illetően egyértelmű pozitív összefüggéseket nem lehetett kimutatni. A *Pseudomonas* törzspárok alkalmazásánál a megfelelő partnerek egymás kedvező hatásának fokozására voltak képesek.
8. A *Pseudomonas*ok antibiotikum-termelése és az antagonista jelleg nagysága között nem minden esetben lehetett összefüggést detektálni, az antagonizmus mértéke elsősorban a törzsek sziderofor-termelésétől függött. A gyenge antagonista képességű törzsek szalicilsavon kívül nem, vagy csak kismértékű egyéb antibiotikum termelésre voltak képesek.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. Az antagonista hatás kiváltásában fontos szerepet betöltő sziderofor-termelés nagymértékben függ a közeg felvehető vastartalmától, amit a talajbeli pH viszonyok is döntően befolyásolnak, ezért adott növény-talaj rendszerre alkalmas törzsek szelektálása különös jelentőségű.
2. A *Pseudomonas* törzsek egymás közötti interakciójában a sziderofor vegyületek termelésének nagy szerepe van az intragenetikus antagonista hatás kiváltásában.
3. A *Pseudomonas* törzsek előzetes laboratóriumi szelekciójánál a pH tűrés tesztelése nem bizonyult elsődlegles szempontnak, mert pH 5 alatt, ahol egyes *Pseudomonas* törzsek szaporodása már gátolt, a $Fe(OH)_3$ oldékonysága már megfelelő, így a vasfelvétel nem akadályozott, ezért szideroforok sem termelődnek. A legjellemzőbb hazai talajok pH-ja pedig 6,0-7,5 tartományba esik.
4. A *Rhizobium* törzsekkel való együttes magoltás során csak olyan *Pseudomonas* törzsek alkalmazása célszerű, melyek a növényi kórokozókkal szemben megfelelően hatásosak, de nem befolyásolják károsan a gümőképző baktériumok szaporodását.
5. Az antibiotikumként viselkedő másodlagos anyagcseretermékek jelenléte és mennyisége az izolált törzsekben – a szideroforokhoz hasonlóan – nagymértékben függött az alkalmazott táptalaj típusától. Ez is alátámasztja azt a tényt, hogy az eltérő talajbeli állapotok lényegesen befolyásolhatják a növényi növekedés fokozására, illetve a növénypatogén kórokozók ellen felhasználható sziderofor *Pseudomonas*ok hatékonyságát.
6. A *Pseudomonas* törzsek alkalmazásánál ugyanakkor figyelembe veendő a preventív vagy a kauzatív jellegű védekezésekhez való törzsszelekció fontossága és lehetősége is.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE

LEKTORÁLT, REFERÁLT KÖZLEMÉNYEK:

1. NAÁR ZOLTÁN, **VÁRADY GYÖRGY**, KISS ZITA, KUCSMA NÓRA, KECSKÉS MIHÁLY (1995): Különböző fajokhoz tartozó *Trichoderma* törzsek kadmium érzékenysége, Agrokémia és Talajtan, 44., 3-4. 457-462.
2. BAYOUMI HAMUDA, KISS ZITA, KUCSMA NÓRA, **VÁRADY GYÖRGY**, BALÁZSY S., KECSKÉS M. (1995): Különböző talajtényezők hatása a *Rhizobium leguminosarum* törzsek szaporodására és túlélésére, Agrokémia és Talajtan 44., 3-4. 463-472.
3. BAYOUMI, BALÁZSY SÁNDOR, **VÁRADY GYÖRGY**, KISS ZITA, KUCSMA NÓRA, KECSKÉS MIHÁLY (1995): Lóbab *Rhizobium* törzsek talaj-fungicid érzékenysége, Agrokémia és Talajtan, 44., 3-4. 473-480.
4. BAYOUMI HAMUDA, KUCSMA NÓRA, **VÁRADY GYÖRGY**, KISS ZITA, BALÁZSY S., KECSKÉS M. (1995): Néhány alumínium vegyület hatása különböző Rhizobium fajokhoz tartozó törzsek szaporodására, Agrokémia és Talajtan, 44., 3-4. 481-490.
5. BAYOUMI HAMUDA, KISS ZITA, **VÁRADY GYÖRGY**, BALÁZSY SÁNDOR, KUCSMA NÓRA, KECSKÉS M. (1996): The Influence of Nitrapyrin and sodium azide on the growth and respiration of some *Rhizobium* strains, Microbiological Research 151. 247-251.
6. BAYOUMI HAMUDA H.E.A.F., KUCSMA N., **VÁRADY GY.**, KISS Z., KECSKÉS M. (1996): Nehézfémek és kombinációik hatása különböző *Rhizobium leguminosarum* törzsek szaporodására. Agrokémia és Talajtan, 45., No. 1-2., 153-168.
7. BAYOUMI, H. E. A. F., KISS Z., **VÁRADY, GY.**, BALÁZSY S., KUCSMA, N., KECSKÉS M. (1996): A N-serve és a nátrium-azid hatása endoszimbionta rhizobiumok szaporodására és légzésére. Agrokémia és Talajtan, 45., No. 1-2., 169-175.
8. BIRÓ B., MAGYAR K., **VÁRADY GY.**, KECSKÉS M. (1998): Specific replant disease reduced by PGPR rhizobacteria on apple seedlings. Proc. 4th Intern. Symp. Replant Probl. Acta Horticult. 477**:** 75-81.
9. **VÁRADY GY.**, KUCSMA N., BIRÓ B., BAYOUMI, H. E. A. F., KECSKÉS M. (2002): Környezetkárosító fémvegyületek hatása a *Pseudomonas*ok szaporodására és sziderofor termelésére. Agrokémia és Talajtan, közlésre beküldve.
10. **VÁRADY GY.**, KUCSMA N., BIRÓ B., BAYOUMI, H. E. A. F., KECSKÉS M. (2002): The influence of antibiotic and siderophore production on the antagonistic effects of *Pseudomonas* strains against fungal pathogens. Int. Microbiol., közlésre beküldve.

RÖVID KÖZLEMÉNYEK:

11. KUCSMA, N., BAYOUMI HAMUDA, H.E.A.F., **VÁRADY, GY.** BIRÓ, B., KECSKÉS, M. (1994): Effect of metal-combination on some strains of various *Rhizobium* species. Abst. Ann. Meet. Hung. Microbiol. Soc. 1994. Aug. 23-25., Szolnok, Hungary, pp. 111.
12. BAYOUMI HAMUDA, H.E.A.F., **VÁRADY, GY.**, KISS, Z., BALÁZSY, S., KUCSMA, N., KECSKÉS, M. (1995): Ecological factors influencing the saprophytic competence of endosymbiont *Rhizobium leguminosarum* strains introduced to brown forest soil. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 43, 274.
13. BAYOUMI HAMUDA, H.E.A.F., KISS, Z., **VÁRADY, GY.**, BALÁZSY, S., KUCSMA, N., KECSKÉS, M. (1995): Nitrification and respiratory process inhibitors influencing

growth and respiration of some *Rhizobium* species. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 43, 273-274.

14. KUCSMA NÓRA, H.E.A.F. BAYOUMI, **VÁRADY GYÖRGY**, BÍRÓ BORBÁLA, KECSKÉS MIHÁLY (1995): Effect of metal combinations on some strains of various *Rhizobium* species, Acta Microbiol. Immunol. Hung. 42, 117-118.
15. BIRÓ, B., KUCSMA, N., KISS, Z., **VÁRADY**, **GY**., KÖVES-PÉCHY, K., VÖRÖS, I., KECSKÉS**,** M. (1996): Interaction between rhizosphere microorganisms and red clover at metal stress. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44**:** 89-90.
16. KECSKÉS, M., BIRÓ, B., BAYOUMI, H.E.A.F., KISS, Z., KUCSMA **VÁRADY**, **GY**., NAÁR, Z. (1997): Heavy metal ion toxicity on various soil and rhizosphere microorganisms. Acta Alimentaria. 26, 313-315.
17. HEGEDŰS, A., FARKAS, S., **VÁRADY**, **GY**., KECSKÉS**,** M. (1999): The role of growth of *Trichoderma* spp. inoculates in the growth of Gerbera plants. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46: 122.

KONFERENCIA KIADVÁNYOK

18. KECSKÉS, M. BIRÓ, B., BAYOUMI, H.E.A.F., NAÁR, Z. , **VÁRADY**, **GY**., KISS, Z., KUCSMA, N. (1996): Microbial component of combined preparations used for plant. Proc. Internat. Multidispl. Conf., North Univ. Baia Mare, Baia Mare, Romania, 21-23 May, 1996. pp. 4-14.
19. KECSKÉS**,** M., BAYOUMI, H.E.A.F., NAÁR, Z., **VÁRADY**, **GY**. (1997): Metal ion sensitivity and tolerance of soil microorganisms. Proc. Internat. Multidispl. Conf., North Univ. Baia Mare, Baia Mare, Romania, 28-29 November, 1997. Sci. Bull. Vol. XI. North Univ. Baia Mare pp. 73-82.
20. **VÁRADY**, **GY**., KECSKÉS**,** M. (1997): Antagonstic effect of *Pseudonomas* strains in connection of their antibiotic production. Proc. Internat. Regional Sem. Environment Protection: Modern studies in Ecology and Microbiology. Uzhgorod, Ukraine. May 13-16, 1997 Vol. 2. pp. 167-172.
21. HEGEDŰS, A., FARKAS, S., **VÁRADY**, **GY**., KECSKÉS**,** M. (1997): Interactions of *Pseudomonas* and *Fusarium* strains on root of seedlings of wheat cultivars. Proc. Internat. Regional Sem. Environment Protection: Modern studies in Ecology and Microbiology. Uzhgorod, Ukraine. May 13-16, 1997 Vol. 2**.** pp. 173-176.

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

1. KUCSMA NÓRA, H.E.A.F. BAYOUMI, **VÁRADY GYÖRGY**, BÍRÓ BORBÁLA, KECSKÉS MIHÁLY: Effect of metal combinations on some strains of various *Rhizobium* species, A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Szolnok, 1994. aug. 23-25.
2. BAYOUMI HAMUDA, WELDON KIMBERLY, KUCSMA NÓRA, KISS ZITA, **VÁRADY GYÖRGY**, KECSKÉS MIHÁLY: Effect of various soil states on the multiplication of *Rhizobium leguminosarum* strains, A talaj környezetvédelmének problémái, III. Országos Konferencia, Nyíregyháza, 1994. szeptember 28-29.
3. BAYOUMI HAMUDA, WELDON KIMBERLY, KUCSMA NÓRA, **VÁRADY GYÖRGY**, KISS ZITA, KECSKÉS MIHÁLY: Combined effect of different PGPR and NH_4NO_3 PAE1els on symbiotic characters of *Vicia faba*. Az MTA Szabolcs-Szatmár-Bereg megyei Tudományos Testülete III. Tudományos Ülése, Nyíregyháza, 1994. október 1.
4. BAYOUMI HAMUDA, WELDON KIMBERLY, KUCSMA NÓRA, **VÁRADY GYÖRGY**, KECSKÉS MIHÁLY: Growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* strains af-

fected by different sodium salt concentration, IX. Mikrobiológiai Tudományos Ülés, Nyíregyháza, 1994. okt. 7-8.

5. NAÁR ZOLTÁN, **VÁRADY GYÖRGY**, KISS ZITA, KECSKÉS MIHÁLY, Antagonista trichoderma, pszeudomonasz és foszfátoldó mikroorganizmusok előfordulása a Westsik homoki tartamkísérlet kezeléseiben, Országos Homokkutatási Konferencia, Nyíregyháza, 1995. június 9-10.
6. BAYOUMI HAMUDA, **VÁRADY GYÖRGY**, KISS ZITA, BALÁZSY SÁNDOR, KUCSMA NÓRA, KECSKÉS MIHÁLY: Nitrification and Respiratory Process Inhibitors Influencing Growth and Respiration of some *Rhizobium* Species. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest, 1995. augusztus 23-25.
7. BAYOUMI HAMUDA, KISS ZITA, **VÁRADY GYÖRGY**, BALÁZSY SÁNDOR, KUCSMA NÓRA, KECSKÉS MIHÁLY: Ecological Factors Influencing the Saprophytic Competence of Endosymbiont *Rhizobium leguminosarum* Introduced to Brown Forest Soil, A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest, 1995. aug. 23-25.
8. **VÁRADY GYÖRGY**: Rhizospheric fluorescens pseudomonads antagonists of some phytopathogen fungi, International symposium on current topics in microbiology, Uzghorod, 7-8. February 1996.
9. BÍRÓ BORBÁLA, KUCSMA NÓRA, **VÁRADY GYÖRGY**, KECSKÉS MIHÁLY: Heavy metal sensitivity of some Rhizobium - leguminous plant system, International symposium on current topics in microbiology, Uzghorod, 7-8. February 1996.
10. FARKAS SÁNDOR, HEGEDŰS ANTAL, **VÁRADY GYÖRGY**, KECSKÉS MIHÁLY: Néhány xenobiotikum hatása *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti* és *R. leguminosarum* törzsek szaporodására. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Nyíregyháza, 1996. augusztus 21-23.
11. KUCSMA, N., BAYOUMI HAMUDA, H.E.A.F., KECSKÉS, M., **VÁRADY, GY.**: Abiotikus és biotikus talajfaktorok hatása a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* törzsek szaporodása laboratóriumi feltételek között. Az MTA Sz-Sz-B m. Tud. Testülete, az MMT Mezőgazd. és Élelmiszer Mikrobiol. Szekciója. XII. Mikrobiológiai Tudományos Ülése. 1997. október 10-11, Nyíregyháza.

IRODALOM

BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology (1984): Vol. 1. Williams and Wickins, Baltimore, London.

CZIRÓK, É. (főszerk.) (1999): Klinikai és járványügyi bakteriológia, Budapest, Melania Kft., 592-603.

JESSEN, O. (1965): *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. A taxonomic study. Munksgaard, Copenhagen. pp. 243.

LÁNYI, B. (szerk.), (1980): Járványügyi és Klinikai bakteriológia. Módszertani útmutató. OKI, Budapest, p. 588.

SCHWYN, B. AND NEILANDS, J. B. (1987): Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. Anal. Biochem. 160, 47-56.

SIMON, A., ROVIRA, A. D. AND SAUDS, D. C. (1973): An improved selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonas. J. Appl. Bacter. 36, 141-145.

TEPPER, E. C. (1945): Metodika ucseta tipicsnüh bakterij rizoszferü szelstkohozjajsztvennüh rasztenij. TSZHA dokladü, vüp. 2, 131.