

ÉS VIZSGÁLATA TALAJBAKTÉRIUM TÖRZSEKBŐL

Rizó Boglárka; Kovács Rita; Puspán Ildikó; Fekete-Kertész Ildikó; Imre Csilla; Kutasi József

BioFil Mikrobiológiai, Géntechnológiai és Biokémiai Kft. 1139 Budapest, Váci út 87.

A PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) talajbaktériumokat évtizedek óta alkalmazzák a növénytermesztésben, hiszen a rizoszférában elszaporodva tápanyagokat biztosítanak a növények számára, visszaszorítják a növénypatogéneket, javítják a talaj szerkezetét, illetve kioldják vagy akkumulálják a szerves anyagokat és növényi növekedést szabályozó anyagokat, fitohormonokat termelnek. A növekedést serkentő hormonok közül az indol-3-ecetsav (IAA), a gibberellin-3-sav (GA3) és a különböző citokininek, mint a kinetin, zeatin (ZEA) és transz-Zeatin-ribozid (ZR) kiemelkedő fontossággal bírnak.

Az indol-3-ecetsav legfeltűnőbb és legjellegzetesebb hatása a sejtek és szervek, elsősorban a szár megnyúlásos növekedésének serkentése. A gibberellinsav főként csírázást serkentő és virágzást befolyásoló szereppel rendelkezik, míg a citokininek részt vesznek a sejtosztódás szabályozásában, növekedési, fejlődési és differenciálódási folyamatokban.

Vannak bizonyos baktériumtörzsek, melyek képesek fitohormonok termelésére, melyet aztán a növények képesek saját növekedésükre fordítani. Ilyen termelő baktériumok pl. *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.*, *Bradyrhizobium japonicum*. (Costacurta et. al. 1994)

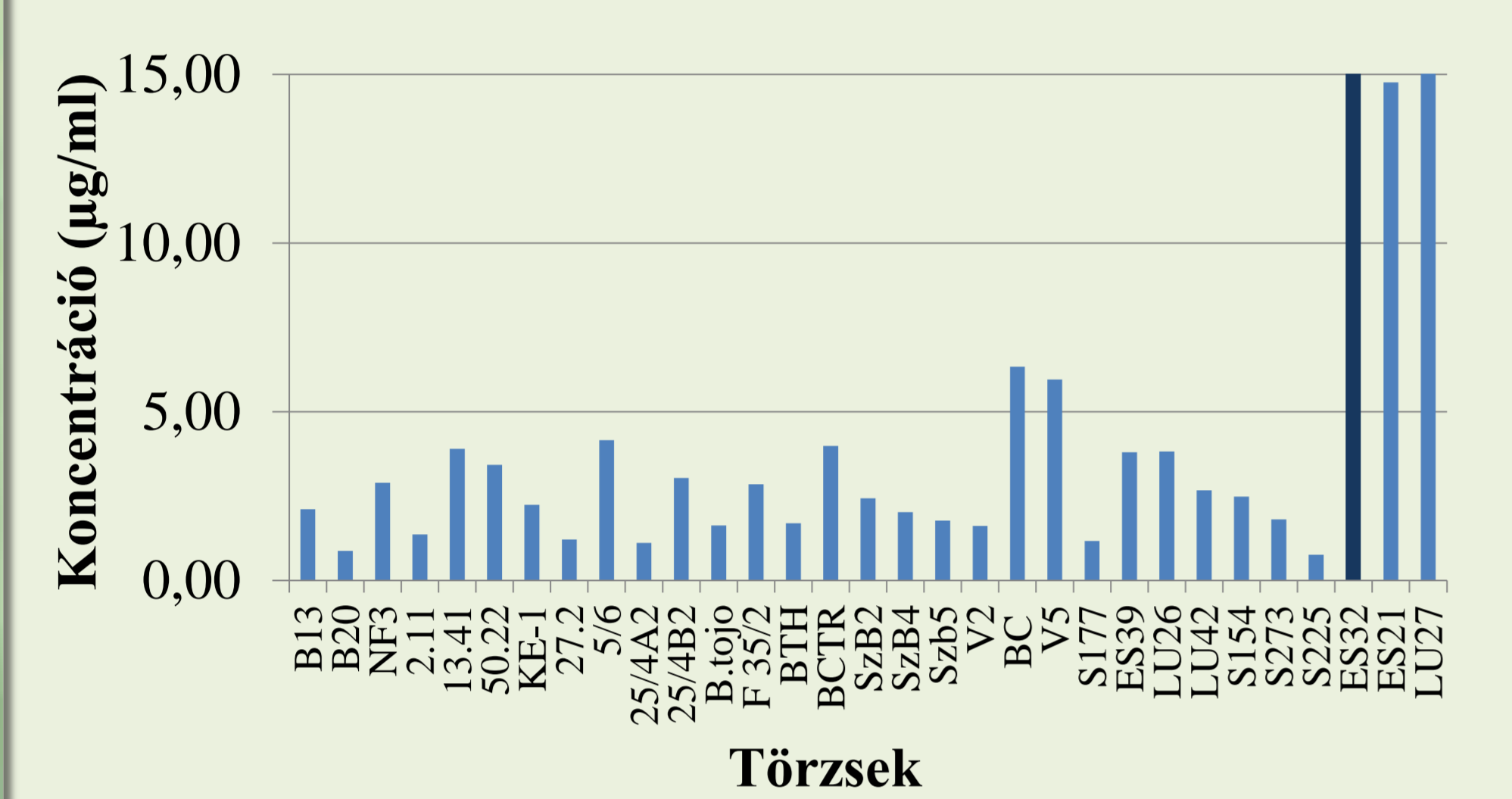
CÉLKITŰZÉSEK

Célunk a Biofil Kft. törzsgyűjteményi törzseinek (SBSS – Soil Bacteria Screening System) növényi növekedésserkentő hormontermelésének átfogó vizsgálata. A törzsek PGPR hatásának elemzése mellett, a környezeti tűrőképesség (humán- és növénypatogének kizárásával) figyelembe vételével a legjobb termelő törzseket válogatjuk ki, melyek az adott talajokban szaporodóképesek és a későbbiekben talajoltóanyag előállításra is alkalmasak.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Munkánk során TSB (Tryptic Soy Broth) táptalajon vizsgáltunk meg közel 150 törzset, melyeket IAA, GA3, ZEA és ZR hormontermelésre teszteltünk. TSB táptalajon a válogatott törzsek hormon termelését (28°C, 250 rpm) 2 nap elteltével vizsgáltuk szerves oldószeres extrakciós lépések után Tien módosított vékonyréteg kromatográfiás (TLC) módszerével (Tien et.al,1979). A TLC lemezek kiértékelését Cp Atlas 2.0 szoftver segítségével végeztük el. A törzsek IAA termelését spektrofotometriás módszer segítségével is igazoltuk (Ehmann,1977). A tenyészetek extraktumait HPLC –PDA vizsgálatoknak is alávetettük (Crozier et.al.1988). Referencia törzseként a Biofil® talajoltóanyag termékekben szereplő *Kocuria rosea S225* NCAIM (P)B 001426 és *Azospirillum brasilense 242/9* NCAIM (P)B001403 fitohormon termelő talajoltó törzseket választottuk.

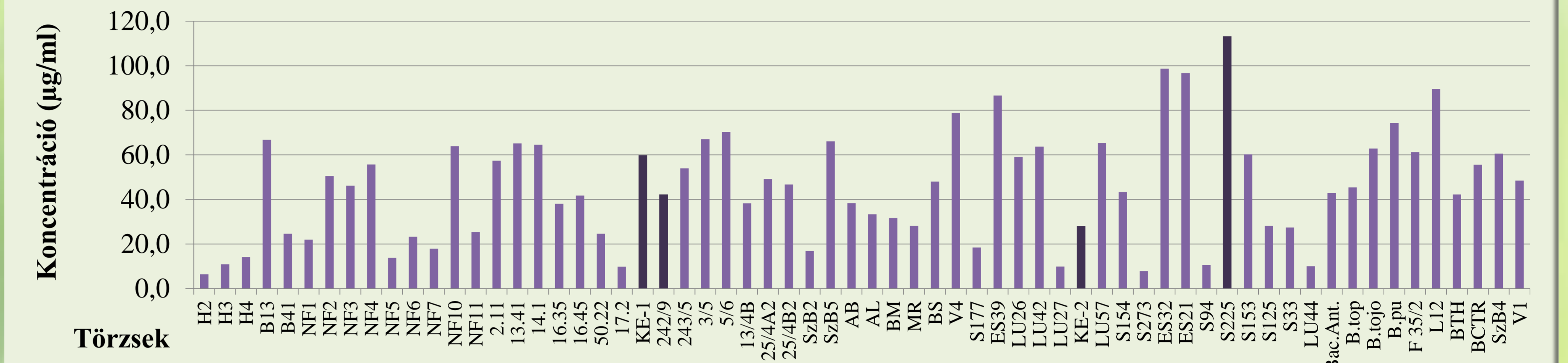
CITOKININ TERMELEÉS



7.ábra Zeatinok mérése TLC segítségével

A különböző citokininek detektálását 254 nm UV tartományban végezzük. Az általunk mért legmagasabb koncentrációt elsősorban patogén törzsek produkálták. Tien(1979) mérése alapján egy *A.brasilense* törzs 0,001 µg/ml citokinint termelt. A legmagasabb citokinin produkcióval az *ES32* törzs tenyészeté rendelkezett **25 µg/ml** koncentrációban.

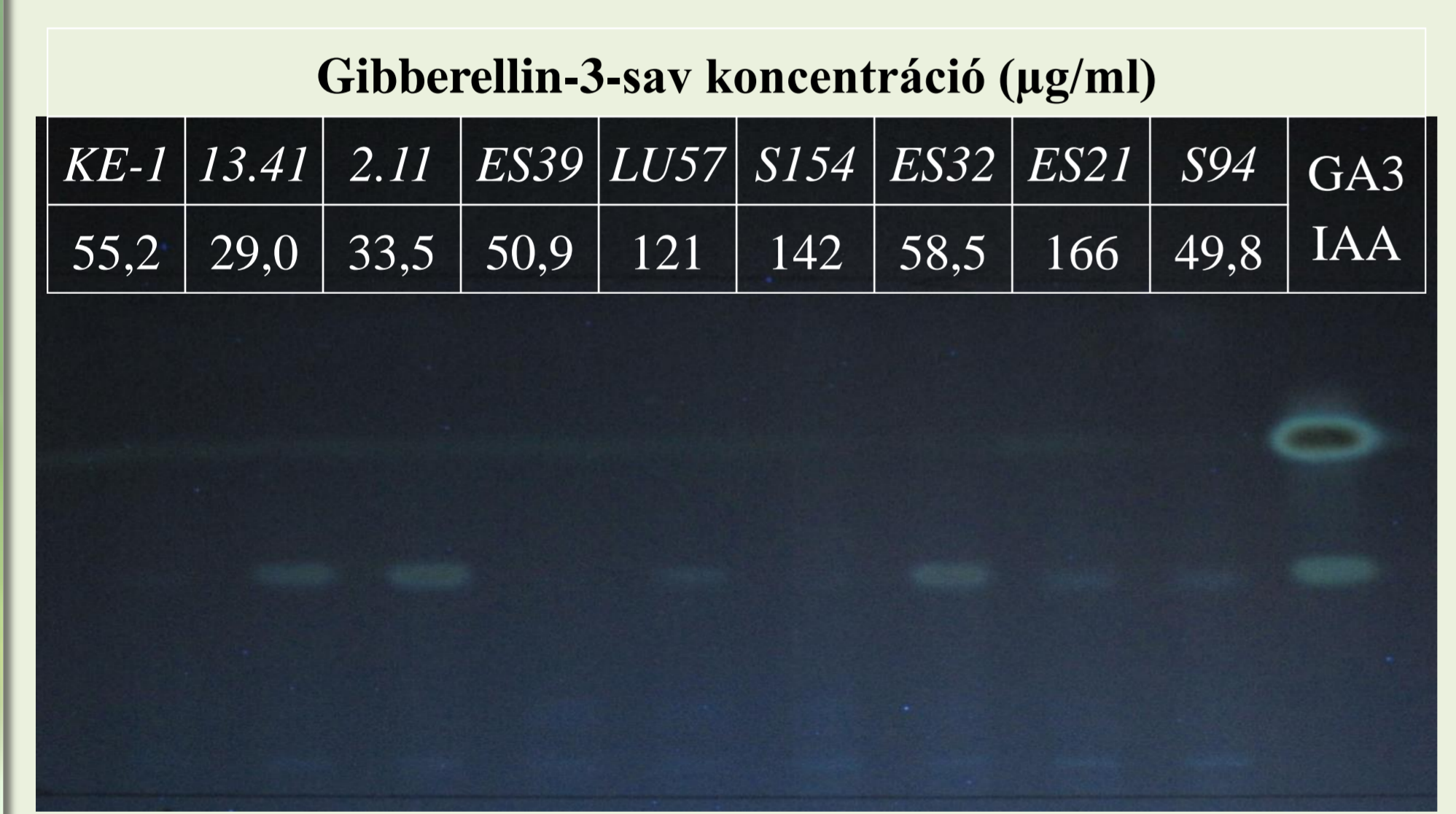
INDOL-3-ECETSAV TERMELEÉS



1.ábra Az SBSS törzsgyűjtemény legjobb hormon termelő törzseinek IAA produkciója TSB táptalajon

A törzsek szelektálását TLC módszerrel végeztük. A referencia törzsek mellett az *Azospirillum brasilense KE-1* és *Azospirillum lipoferum KE-2*, valamint más fontos PGPR hatással rendelkező törzsek kerültek kiválasztásra összehasonlító elemzés céljából.

GIBBERELLIN-3-SAV TERMELEÉS

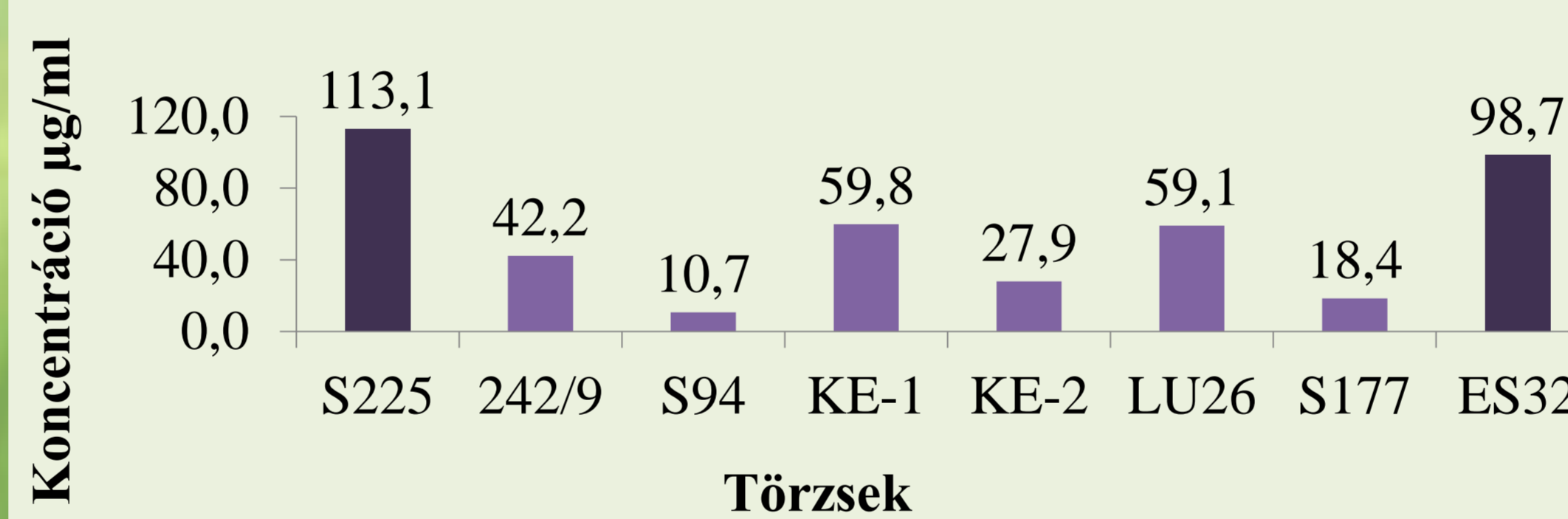


8.ábra GA3 termelését kimutató TLC lemez

Az IAA és GA3 kimutatása ugyanazon extraktumból történik, ezért megkülönböztetés céljából a lemezekre IAA standard felvitel is szükséges. A GA3 Rf értéke **0,35-0,4** közé esik, így az IAA-tól (Rf **0,5-0,6**) könnyen megkülönböztethető.

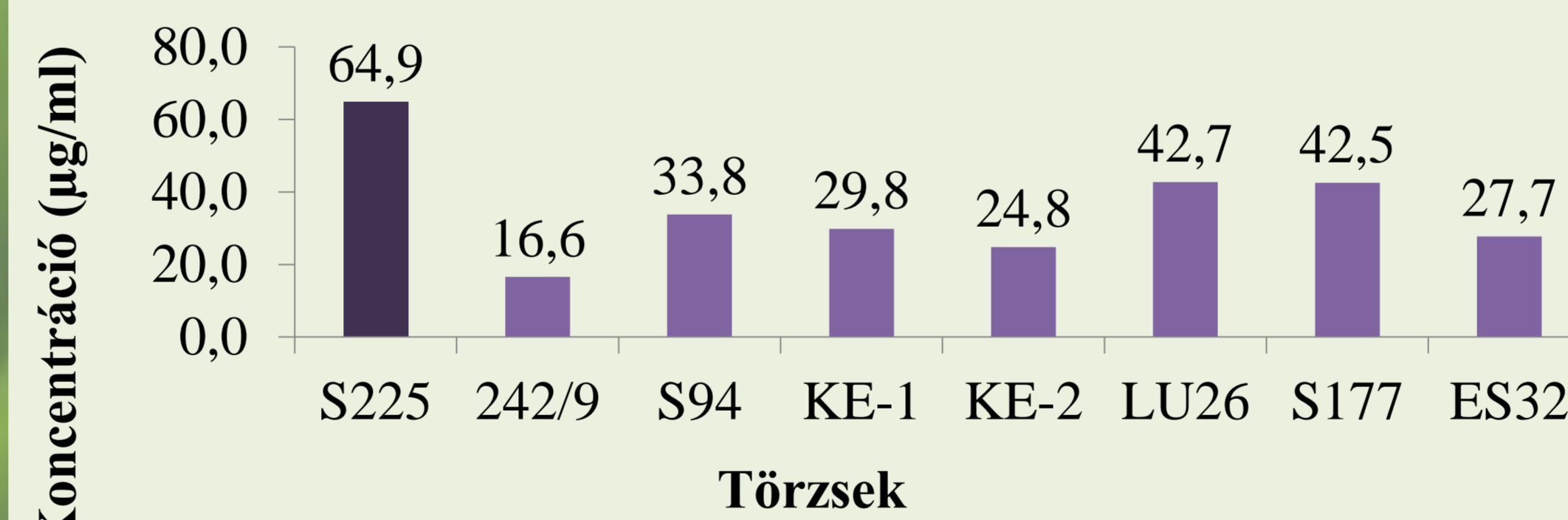
A lemezek detektálása 366 nm UV tartományban előhívó reagens hozzáadására történik, mely alapján az *ES21* **166 µg/ml** koncentrációban volt képes GA3 termelésére. Irodalom alapján *A.brasilense* törzsek 0,05 µg/ml GA3 termelésére képesek (Tien,1979).

VIZSGÁLT TÖRZSEK IAA TERMELEÉSÉNEK ÖSSZEHOSONLÍTÓ ELEMZÉSE



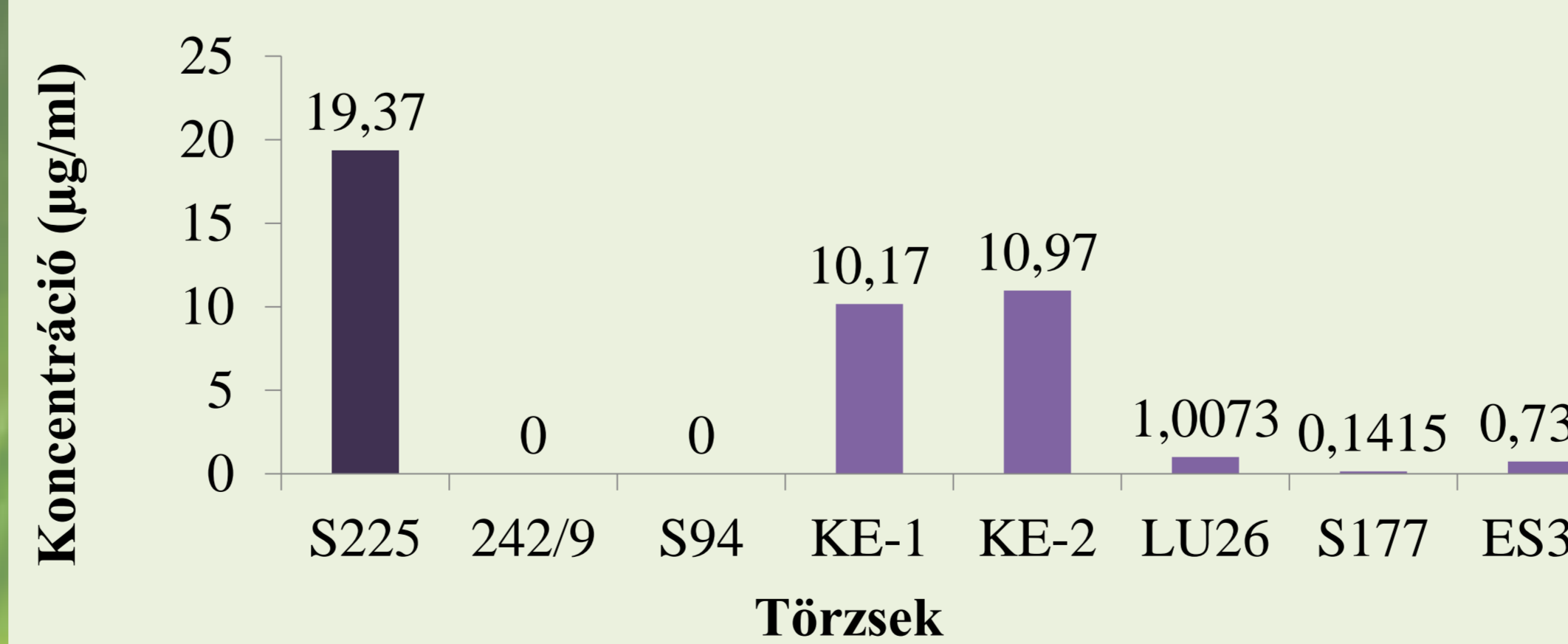
4.ábra TLC lemezen mért IAA koncentráció

TLC lemezen Ehrlich reagens hozzáadására a legmagasabb mért IAA koncentrációt a *Kocuria rosea S225* **113,1 µg/ml**-el és az *ES32* **98,7 µg/ml**-el mutatta.



5.ábra UV-Vis Spektrofotometriás mérési eredmények

UV-Vis Spektrofotometriás méréssel az indol-vázis vegyületek együttesen mutathatók ki Salkowsky reagens hozzáadására. A legmagasabb mért koncentrációt **64,89 µg/ml**-t a *Kocuria rosea S225* mutatta.



6.ábra HPLC-PDA mérési eredmények

HPLC-PDA mérés során a *Kocuria rosea S225* **19,37 µg/ml**, az *Azospirillum lipoferum KE-2* pedig **10,97 µg/ml** koncentrációban volt képes IAA termelésére. Néhány törzs termelőképessége a kimutatási határ alá esett.

ÖSSZEFOGLALÓ

A TLC módszer gyors kvalitatív és tájékoztató kvantitatív mérésre egyaránt alkalmasnak bizonyult és nagyszámú minta egyidejű elemzésére adott lehetőséget. Segítségével a standard minták felvitelével az indol vegyületek megkülönböztethetőek egymástól, míg UV-Vis Spektrofotometriás méréssel több indol-vázis vegyület együttes kimutatására van csak lehetőség. HPLC-PDA-el mért koncentrációk a legtöbb esetben alacsonyabb IAA értéket mutattak, mint az UV-Vis vagy a TLC módszerrel kapott értékek, így a kiválasztott törzsek IAA termelő képességének mértékét HPLC méréssel szükséges igazolni.

GA3 kimutatása a Tien módosított TLC módszer segítségével a törzsek fermentlevéből sikeresen megoldható, ugyanakkor a mért koncentrációkat HPLC-PDA-el egyelőre nem sikerült igazolni. A zeatinok és ribozidjaik kimutatása TLC-vel együttesen valósítható meg, hiszen míg a ZEA Rf értéke 0,5, addig a ZR 0,45-0,48 közé esik. Az SBSS törzsgyűjtemény izolátumai között nagyszámban találtunk zeatin típusú vegyületeket előállítókat. A ZEA és a ZR citokininek elválasztására további HPLC-PDA vizsgálatokra van szükség.