

AZ ALUMÍNIUM TOXICITÁS MÉRSÉKLÉSE BAKTÉRIUM KÉSZÍTMÉNNYEL A KUKORICA KEZDETI NÖVEKEDÉSI STÁDIUMÁBAN

EXAMINATION OF COMPENSATION EFFECT OF BACTERIUM CONTAINING PRODUCT IN ALUMINUM TOXICITY IN EARLY GROWTH STAGE OF MAIZE

Kaczur Dávid^{1*}, Illés Árpád², Bojtor Csaba³, Győri Zoltán⁴, Tóth Brigitta⁵

^{1, 2, 3} Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Debreceni Egyetem
^{4, 5} Táplálkozástudományi Intézet, Debreceni Egyetem, Magyarország

Kulcsszavak:

Alumínium
Kukorica
Tápanyag-gazdálkodás
Növényi növekedés

Keywords:

Aluminum
Corn
Nutrient supply
Plant growth

Cikktörténet:

Beérkezett: 2017. augusztus 24.
Átdolgozva: 2017. szeptember 20
Elfogadva: 2017. október 19.

Összefoglalás

Kísérletünkben az alumínium (Al) toxikus hatását vizsgáltuk kukoricán (*Zea mays* L.). A növényeket hidropóniásan, kontrollált körülmények között neveltük. Az alumíniumot $AlCl_3$ formában adagoltuk a tápoldathoz $40 \mu M$ koncentrációban. A használt biológiai készítmény *Pseudomonas* és *Bacillus* törzset tartalmaz, az alkalmazás ideje eltérő volt a kezeléseknél: (1) Al-kezelés előtt 48 órával (Phy+40), (2) egy időben az Al-kezeléssel (40+Phy). A kísérletben mértük a gyökér és a hajtás száraz tömegét, a második levél relatív klorofill tartalmát (SPAD-index), a fotoszintetikus pigmentek mennyiségét, a fotoszintetikus aktivitást, a gyökérhosszt, a lipid peroxidációt és a szuperoxid-dizmutáz aktivitását. A lipid peroxidáció és SOD aktivitása nem szignifikánsan nőtt Al-kezelés hatására. Az (1) jelű kezelésnél a lipid peroxidáció során keletkezett malon-dialdehid mennyisége kevesebb volt, mint a (2) kezelésnél.

Abstract

The toxic effect of aluminum (Al) was examined in maize (*Zea mays* L.) in our experiment. Plants were grown in hydroponic culture in controlled environmental circumstances. Al was added to the nutrient solution in form of $AlCl_3$ in $40 \mu M$ concentration. The used biological product contains *Pseudomonas* and *Bacillus*, the time of treatments were different: (1) 48h before Al-treatment, (2) at the same time with Al-treatment. The shoot and the root dry weight, the relative chlorophyll content (SPAD-index), quantity of photosynthetic pigments, photosynthetic activity, the root length, lipid peroxidation and SOD were measured. Lipid peroxidation and SOD was higher at $40 \mu M$ treatment than at the control. The amount of MDA was lower at (1) treatment compared to (2) treatment.

* Kapcsolattartó, szerző, Tel.: +36 263 89 37
E-mail cím: kiskaczurka@gmail.com

1. BEVEZETÉS

Hazánkban a talajok egyik jelentős problémája a savasodás. A talajsavanyúság előidézői főleg az éghajlatváltozás, a növényzet és a domborzat, azaz természetes okok. Valamint az antropogén hatások, a mezőgazdasági eljárások, a műtrágyázás és a környezetszennyezés.

A termőtalajok alumíniumtartalma az anyakőzettől függ, azonban csak a mozgékony és kicserélhető formái hatnak hátrányosan a talaj termékenységére és az élővilágra.

A savanyú kémhatású talajokban az alumínium mozgékonyága pH 5,5 alatt fokozatosan megnő. Az alumíniummérgezés jellemző tünetei közé tartozik, hogy a növények gyökerének és hajtásának hossznövekedése leáll, élettani és biokémiai folyamatai gátlódnak, a növények tápanyag- és vízfelvétele csökken. Az alumíniummérgezésben szenvedő növényekben a legtöbb esszenciális makroelem (Ca, Mg, K, N és P) és mikroelem (Cu, Fe, Mn és Zn) felvétele lelassul, hajtásba történő szállítása és a biokémiai folyamatokban történő hasznosulása csökken [11]. Az alumínium toxicitás változásokat okoz a növények szén-dioxid asszimilációjának intenzitásában, a levelek klorofill tartalmában, és számos élettanilag fontos szerepet játszó kulcsenzim aktivitásában [7]. Mindez közvetlen vagy közvetett hatást gyakorol a növények növekedésére és hozamára [10].

Kísérletünkben az Al toxikus hatásának mérséklési lehetőségét vizsgáltuk baktérium tartalmú biológiai készítmény használatával. Sheng et al., [17] kutatása szerint a növények számára toxikus nehézfém koncentráció kompenzálható nehézfém toleráns baktériumtörzsek alkalmazásával. Több tanulmány is foglalkozott a baktériumok pozitív hatásaival, nehézfémekkel terhelt talajon, vagy tápoldaton folytatott kísérletben [14] [2] [6]. A baktériumok a növényekhez hasonlóan szerves savakat választanak ki, az alumínium komplexet képez a szerves savval, s az így létrejött Al-szerves sav komplex nehezen, vagy egyáltalán nem felvehető a növények számára. Egyes baktériumok ún. szideroforokat választanak ki, a szideroforral az Al szintén komplexet tud képezni, ezáltal csökken a növények által felvett alumínium mennyisége [12] [3].

Gyakorlati szempontból fontos annak ismerete, hogy a baktérium készítmény alkalmazási ideje hatással van-e az Al-toxicitás mérséklésére. A kísérletben a baktérium készítményt két időpontban adtam a tápoldathoz: 1) Al-kezelés előtt 48 órával (Phy+40), 2) az Al-kezeléssel egy időben (40+Phy).

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti növényként kukoricát (*Zea mays* L. cv. DKC 5170) használtunk. A növények nevelése módosított Hoagland tápoldaton történt [18]. A tápoldat pH-ja 5,5 volt. A pH stressz elkerülése érdekében a pH-t naponta 0,5-tel csökkentettük, majd a 4,5 pH értéket elérve a kísérlet befejezéséig ezt az értéket tartottuk. Az alumínium $AlCl_3$ formában került alkalmazásra, 40 μM koncentrációban. A növényeket kontrollált körülmények között, klímaszobában neveltük. A növényeket a csírázást követő 5. napon tápoldatra helyeztük, és a főgyökeret a gyökércsúcstól mért két centiméternél alkoholos filctoll segítségével megjelöltük, majd a kezelés utáni 4; 8; 24; 48 és 72 órában mértük a gyökérhosszt. A relatív klorofill tartalmat SPAD-502 (MINOLTA, Japán) klorofill mérővel, az abszolút klorofill a, b és karotinoid tartalmat Metertek SP 80 Spektrométerrel mértük [13]. A száraz tömeg meghatározását termogravimetriás módszerrel végeztük. A fotoszintézis aktivitás megállapításához, közvetett módszerként a klorofill fluoreszcencia indukciós módszert alkalmaztuk, a klorofill fluoreszcencia indukció gyors szakaszának a paramétereit PAM-2001 típusú fluorométerrel (WALZ GmbH, Németország) határoztuk meg. Az alkalmazott biológiai készítmény két baktérium törzset tartalmaz az *Azotobacter chroococcumot* ($1-2 \times 10^9$ db/cm³) és a *Bacillus megatheriumot* ($1-2 \times 10^8$ db/cm³), a baktériumkészítményt 2 ml dm⁻³ koncentrációban alkalmaztuk.

A lipid peroxidáció mértékét a keletkezett malon-dialdehid mennyisége alapján határoztuk meg Health és Packer [16] módszere alapján. A szuperoxid-dizmutáz aktivitását Giannopolities és Ries [9], valamint Beyer és Fridovich [4] módszere szerint mértük.

3. EREDMÉNYEK

Irodalmi adatok szerint az Al-toxicitás a gyökér növekedésére van a legnagyobb hatással a növény kezdeti fejlődési stádiumában. Mértük a gyökérnövekedést a kezelés után 4, 8, 24, 48 és 72 órával (1. Táblázat). A kukorica gyökérének hossza 38%-kal csökkent 40 μM $AlCl_3$ kezelés hatására

a kontrollhoz viszonyítva a kezelés után 4 és 8 órával. 24 óra elteltével ez a csökkenés 12,5%, 48 óra után 33% és 72 óra Al-kezelés után 10% volt. A kukorica gyökérhossza 15%-kal nőtt, amikor a baktérium készítmény az Al-mal egy időben volt alkalmazva a kezelés után 4 órával, 14%-kal a kezelés után 8 órával és 12%-kal 48 órával.

1. Táblázat: a kukorica gyökerének növekedése (mm) a kezelés után 4h, 8h, 24h, 48h és 72 órával, $n=12 \pm$ S.E.

| Kezelések | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|------------|-----------|------------|------------|-------------|-------------|
| Kontroll | 6,42±1,93 | 11,83±3,90 | 30,18±7,69 | 49,9±10,38 | 69,90±14,51 |
| 40 μ M | 4,00±1,73 | 7,42±2,50 | 26,42±5,23 | 33,33±8,40 | 63,58±17,85 |
| Phy+40 | 4,00±1,76 | 7,50±2,11 | 22,00±7,31 | 35,42±11,95 | 59,58±13,53 |
| 40+Phy | 4,73±1,49 | 8,63±2,01 | 22,36±5,82 | 37,82±11,30 | 56,57±18,41 |

A kísérlet 10. napján mértük a relatív klorofill tartalmat és a fotoszintetikus pigmentek mennyiségét a kukorica második levelében (2. Táblázat). A klorofill-a mennyisége nem változott egyik kezelés hatására se a kontroll értékhez képest. A klorofill-b mennyisége 61%-kal csökkent Al-kezelés hatására, míg a baktérium-készítménnyel történt kezeléseknél nem változott a kontrollhoz viszonyítva. A karotinoidok mennyisége Al-kezelésnél 7%-kal nőtt, míg a Phy+40 kezelésnél 14%-kal a 40+Phy kezelésnél 17%-kal csökkent a kontrollhoz mérten. A relatív klorofill tartalomban (SPAD-index) nem volt változás a kezelésekre hatására.

2. Táblázat: a 10. napos kukorica második levelében mért fotoszintetikus pigmentek mennyisége (klorofill-a, klorofill-b, karotinoidok) és a SPAD-index alakulása különböző kezelésekre hatására. fotoszint.pigment: $n=3 \pm$ S.E., SPAD-index: $n=60 \pm$ S.E.

| Kezelések | klorofill-a | klorofill-b | karotinoidok | SPAD-index |
|------------|-------------|-------------|--------------|------------|
| Kontroll | 10,02±0,26 | 2,66±0,34 | 7,78±0,23 | 35,94±2,78 |
| 40 μ M | 9,66±0,56 | 1,05±0,19 | 8,36±0,72 | 36,49±2,02 |
| Phy+40 | 9,95±1,18 | 2,79±0,29 | 6,73±0,92* | 36,10±1,85 |
| 40+Phy | 10,06±0,43 | 2,92±0,36 | 6,49±0,18 | 35,09±1,61 |

A fotokémiai aktivitás értékeit klorofill fluoreszcencia indukciós módszerrel vizsgáltuk. Mértük az indukciós görbe gyors szakaszának a paramétereit, így az optimális fotokémiai aktivitást (F_v/F_m), a változó (F_v) és az alap (F_o) fluoreszcencia értéket. Az F_v/F_m értéke optimális fejlődési körülmények között élő, hajtásos növényeknél 0,832±0,004 [5]. A kukorica második levelében mért F_v/F_m , F_o és F_m értékeket a 3. Táblázatban mutatjuk be. A mért értékek között nincs szignifikáns különbség, az Al-kezelés nem volt hatással a kukorica fotoszintetikus aktivitására a növekedés kezdeti szakaszában.

Az alkalmazott kezelésekre csökkentették az F_v/F_m értéket. Baktérium kezelés hatására nem következett be emelkedés az F_v/F_m értékben, függetlenül a baktérium készítmény alkalmazási idejétől. Az F_o és F_m értékek minden kezelésnél emelkedtek a kontrollhoz képest.

3. Táblázat: a 10. napos kukorica második levelében mért fotoszintetikus aktivitás változása Al (40 μ M) és baktérium készítmény hatására (Phy), $n=5 \pm$ S.E.

| Kezelések | F_v/F_m | F_o | F_m |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| Kontroll | 0,8002±0,01 | 0,3028±0,02 | 1,1513±0,05 |
| 40 μ M | 0,807±0,00 | 0,3047±0,01 | 1,5375±0,08 |
| Phy+40 | 0,7994±0,01 | 0,3036±0,02 | 1,5144±0,14 |
| 40+Phy | 0,7964±0,01 | 0,3086±0,02 | 1,4658±0,13 |

Számos stresszre a növények általánosan azzal válaszolnak, hogy megnő az aktív oxigén gyökök mennyisége a növény sejteiben. Reakcióképes oxigén gyökök állandóan keletkeznek a növényi sejtekben az anyagcsere folyamatok melléktermékeként függetlenül attól, hogy éri-e stressz hatás a növényt, vagy sem. A növényekben jól szervezett védekezési mechanizmusok léteznek a képződött oxigén gyökök semlegesítésére, ezért ha a növény egészséges, akkor az oxigén gyökök keletkezése és megkötése egyensúlyban van [1]. A legtöbb stresszfaktor, például a nehézfém ionok hatására, a növényi sejtek fiziológiai egyensúlya megbomlik, főként az enzimek reakciók jellegének és aktivitásának befolyásolásával. Kísérletünkben a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitását és a lipid-peroxidáció intenzitását mértük a keletkezett malon-dialdehid mennyiségével (4. Táblázat). A lipid peroxidáció során keletkezett malon-dialdehid mennyisége 15%-kal nőtt az Al-kezelésnél, 5%-kal a Phy+40 és 10%-kal a 40+Phy kezelésnél.

Az alumínium toxicitás és a lipid-peroxidáció változás közötti összefüggés magyarázatában megoszlanak a vélemények. Egyes kutatók a megnövekedett lipid peroxidációt az Al toxikus hatásának tulajdonítják, míg mások szerint a lipid peroxidációban bekövetkezett változás nem az Al toxicitás hatása, hanem annak a következménye.

Rath és Barz [15] szójával végzett kísérletükben azt tapasztalták, hogy 4 órával a 15 μM Al-kezelés után a lipid peroxidáció megnőtt a kontrollhoz képest. Az Al-ra érzékeny kukorica hibridben a lipid peroxidáció növekedését figyelték meg, míg az Al-toleráns kukoricában a lipid peroxidáció mértéke nem változott [8].

A SOD aktivitás 34%-kal nőtt Al-kezelés hatására a kontrollhoz képest. Ez a növekedés 30% a Phy+40 és 34% a 40+Phy kezelésnél. Amikor a baktérium készítményt az Al-kezelés előtt 48 órával adtuk a tápoldathoz a SOD aktivitása alacsonyabb volt, mint amikor a baktérium készítmény és az Al egy időben került alkalmazásra. A SOD aktivitásában bekövetkezett növekedés minden kezelésnél szignifikáns a kontroll értékhez hasonlítva.

Wang et al. [19] kísérletükben azt tapasztalták, hogy a gyökérben mért SOD aktivitása 24 h Al-kezelés után szignifikánsan csökkent, majd 48 h alumínium kezelés után nem volt változás, 72 h Al-kezelés után szignifikáns növekedés következett be, míg a kontroll növényeknél a SOD aktivitása nem változott.

4. Táblázat: a 10. napos kukorica gyökerében mért lipid-peroxidáció mértéke a keletkezett malon-dialdehid (MDA) mennyisége ($n=5 \pm \text{S.E.}$) alapján, a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitása ($n=5 \pm \text{S.E.}$), a gyökér és a hajtás száraz tömege ($n=7 \pm \text{S.E.}$)

| Kezelések | nmol g^{-1} MDA | SOD (U g^{-1}) | Hajtás (mg növény^{-1}) | Gyökér (mg növény^{-1}) |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Kontroll | 17,78 \pm 2,41 | 0,12 \pm 0,02 | 64,7 \pm 9,3 | 25,7 \pm 7,5 |
| 40 μM | 20,96 \pm 4,8 | 0,18 \pm 0,01*** | 48,0 \pm 6,5 | 22,1 \pm 2,5 |
| Phy+40 | 16,81 \pm 1,53 | 0,17 \pm 0,02*** | 55,5 \pm 6,8 | 25,1 \pm 7,8 |
| 40+Phy | 19,69 \pm 2,17 | 0,18 \pm 0,02*** | 52,3 \pm 7,2 | 25,9 \pm 5,5 |

A növény szerves anyag felhalmozására és tömegére az Al toxikusan hathat. A kezelések hatását a kukorica hajtásának és gyökerének száraz tömegére a 4. Táblázat szemlélteti. 40 μM AlCl_3 kezelés hatására a hajtás száraz tömege 26%-kal, a gyökéré 14%-kal csökkent a kontrollhoz képest. A Phy+40 kezelésnél ez a csökkenés 15% a hajtásnál és 2% a gyökérnél. A 40+Phy kezelésnél a kukorica hajtásának száraz tömege 20%-kal csökkent, míg a gyökér száraz tömege nem változott, a kontrollhoz viszonyítva.

4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Kísérletünkben megállapítottuk, hogy az alkalmazott baktérium készítmény mérsékelheti az Al-toxicitást. Azonban egyértelműen nem bizonyítható, hogy a baktérium készítmény alkalmazási ideje befolyásolja-e a baktérium kedvező hatását az Al-toxicitásban. Javasoljuk baktérium tartalmú készítmények használatát nehézfémekkel szennyezett területeken.

Irodalomjegyzék

- [1] Arora A., Sairam R. K., Srivastava C.G. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82 (10), pp. 1227-1238.
- [2] Ayangbenro A. S., Babalola O. O. 2017. A new strategy for heavy metal polluted environment: A review for microbial biosorbents. *Int J Environ Res Public Health* 14, 94. 1-16.
- [3] Beveridge, T. J., Forsberg, C. W., Doyle, R. J. (1982) Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. *J. Bacteriol.* 150, 1438–1448.
- [4] Beyer W. F., Fridovich I. (1987): Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequence of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 161, pp. 559-566
- [5] Björkmann O., Demming-Adams D. (1987): Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, pp. 489-504.
- [6] Bojtó Cs, Tóth B. 2017. Magán-ellátottság és baktériumtrágya közötti kölcsönhatás vizsgálata hidropóniásan nevelt kukoricánál. *Növénytermelés* 66(2), pp. 7-24.
- [7] Boscolo P. R.S., Menossi M., Jorge R. A. (2003): Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62, pp. 181-189.
- [8] Giannakoula A., Moustakes M., Mylona P., Papadakis I., Yupsanis T. (2008): Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al-accumulation. *J Plant Phy* 165, pp. 385-396.
- [9] Giannopolities C. N., Ries K. (1977): Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59, pp. 309-314.
- [10] Hang A., Shi B. (1991): Biochemical basis of aluminium tolerance in plant cells. *Plant-Soil Interactions at low pH*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- [11] Jones D. L., Blancoflor E. B., Kochian L. V., Gilroy S. (2006): Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment* 26, pp. 1309-1318.
- [12] Matthews, T. H., Doyle, R. J., Streips, U. N. (1979) Contribution of peptidoglycan to the binding of metal ions by the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* 3, 51–53.
- [13] Moran R., Porath D. (1980): Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using *N,N*-Dimethylformamide. *Plant Physiology* 65 (1. sz.) pp. 478-479.
- [14] Rajkumar, M., Ae, M. N. V., Freitas, H.: 2009. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 28.3: 142–149.
- [15] Rath I., Barz W. (2000): The role of lipid peroxidation in aluminum toxicity in soybean cell suspension cultures. *Z Naturforsch C* 55 (11-12), pp. 957-964.
- [16] R.L. Heath, L. Packer - *Archives of biochemistry and biophysics*, 1968 – Elsevier pp.189-198
- [17] Sheng X F.- Juan X.- Yu J.- Lin Y.- Qian M. (2008): Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*. 156. 1164-1170. p.
- [18] Tóth B., Lévai L., Kovács B., Varga B. M., Veres Sz. (2013): Compensation effect of bacterium containing biofertilizer on the growth of *Cucumis sativus* L. under Al-stress conditions. *Acta Biol Hung* 64(1), pp. 64-74
- [19] Wang L., Fan X. W., Pan J. L., Huang Z. B., Li Y. Z. (2015): Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. *Plant* 246 (2), 1391-1403.