

A MUSTÁRMAG (*SINAPIS ALBA*) CSÍRÁZÁSÁNAK VIZSGÁLATA NEHÉZFÉMEK ÉS NÖVÉNYI NÖVEKEDÉST SERKENTŐ BAKTÉRIUMOK JELENLÉTÉBEN

TOXIC EFFECTS OF HEAVY METALS ON EARLY GROWTH OF MUSTARD SEEDS (*SINAPIS ALBA*) IN PRESENCE OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA

VARGA HILDA-MÁRIA – VINCZE ÉVA BOGLÁRKA – BECZE ANNAMÁRIA

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar/

Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar

hilda.aaaa@gmail.com, vincze_bogi@yahoo.com,

beczeannamaria@uni.sapientia.ro

Összefoglalás

*Az antropogén beavatkozások, mint a bányászat vagy az ipari tevékenységek, világszerte komoly problémát jelentenek, amelynek következtében a talajok nehézfémekkel szennyeződhetnek. A nehézfémek általában toxikusak a koncentráció és az élő szervezet érzékenységének függvényében. A növényi növekedést serkentő (PGP) baktériumok elősegítik a növény növekedését és emellett támogatják a növényeket az abiotikus stressz helyzetekben, mint a nehézfém stressz. A kutatásunk célja a mustár (*Sinapis alba*) kezdetleges növekedésének vizsgálata különböző koncentrációjú esszenciális (Zn^{2+}) és nem esszenciális (Cd^{2+}) nehézfémek jelenlétében, valamint a növényi növekedést serkentő baktériumok szerepének tanulmányozása a nehézfémek okozta stresszválaszban.*

Kulcsszavak: nehézfém, PGP baktériumok, mustár, csírázás, kezdeti növekedés

Bevezető

A Föld népessége rohamosan nőtt az elmúlt pár évtizedben, elérvén jelenleg a 7 milliárdos lakosságot. A szakemberek a következő 50 évre ezt az értéket 10 milliárdra becsülik, és a népességnövekedés eredményeképpen az élelmszer szükséglet is nő. A magasabb termékkereslet miatt a termelés nőtt, viszont a mezőgazdasági területek túlterheltek lettek és degradálódtak. Nemcsak az antropogén beavatkozások érintik negatívan a termelést és a talajművelést, hanem különböző környezeti tényezők is befolyásolják, mint például az abiotikus stressz (Etesami

és Maheshwari, 2018). Világszerte komoly problémát okoz a környezetünk nehézfémekkel való szennyeződése, amely a növényzet, állatvilág és az ember egészségét fenyegeti, mivel biológiailag nem bonthatóak le (Solanki és Dhankhar, 2011).

Nehézfémek okozta problémák, valamint hatásuk a növényekre

A nehézfémek csoportjába megközelítőleg 65 elem tartozik, melyeknek a sűrűsége nagyobb, mint 5 g/cm^3 . Néhány nehézfém, mint például a cink, a réz, a vas, a mangán, a nikkel vagy a kobalt kis koncentrációban szükséges a szervezetek metabolikus folyamatainak normális működéséhez (Lin és Aarts, 2012), viszont nagy koncentráció esetén negatív hatásuk lehet a növény növekedésére, a biomasszamennyiségre és a fotoszintézis működését is befolyásolhatják (Etesami, 2018). A ***cink*** és a ***kadmium*** kémiaiilag két nagyon hasonló elem, viszont a biológiai funkcióik nagyon különböznek. A ***cink*** minden növény számára esszenciális fém, míg a kadmiumot az egyik legtoxikusabb nehézfémnek tartják (Tang és mtsai., 2016). A cink - annak ellenére, hogy esszenciális elem - nagyobb mennyiségben toxikus, gátolja a növény hajtásának és gyökerének a növekedését, illetve károsítja a sejtosztódást (Mustafa és Komatsu, 2016). A cink többlet csökkenti az összes klorofill mennyiséget, a klorofill-a és klorofill-b arányát, illetve gátolja a CO_2 asszimilációt (Rai és mtsai., 2016). A ***kadmium*** és a cink a növényekben szerkezeti és működési zavarokat okoz, főképpen a fotoszintetizáló képességben: gátolja a pigmentek termelését, a fényenergia hasznosulását, a fotoszintetikus elektrontranszportot és a CO_2 -hoz való hozzáférést (Paunov és mtsai., 2018). A kadmium nagyon erős enzim gátló, degenerálja a mitokondriumot és a fotoszintetikus apparátust (Lin és Aarts, 2012).

Növényi növekedést serkentő baktériumok szerepe a nehézfém stresszben

A növényi növekedést serkentő rizobaktérium (PGPR) gyűjtőnévvel illetjük azokat a baktériumokat amelyek képesek kolonizálni a növényi gyökeret, serkentik a növekedést, növelik a terméshozamot és jótékony hatásúak a növényre nézve. A növényi növekedést serkentő baktériumtörzseket a következő nemzetségekbe lehet sorolni: *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium*, *Serratia*. A nehézfémtűrő PGP baktériumok növényi növekedést szabályozó anyagokat, fitohormonokat, másodlagos anyagcsere termékeket termelnek, amelyek elősegítik a növény fejlődését, illetve csökkentik a nehézfémek okozta toxicitás mértékét (Etesami és Maheshwari, 2018).

Anyag és módszer

Alkalmazott PGP baktériumtörzsek

A kísérlet során a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem törzsgyűjteményéből származó növényi növekedést serkentő tulajdonságokkal és nehézfém tűrő kapacitással rendelkező baktériumtörzseket alkalmaztunk: *Viridibacillus sp.* (BP13) és *Delftia acidovorans* (BP12).

Csíráztatás

A csíráztatásra szánt mustármagok felületét 10 percig hipoklorit oldattal sterilizáltuk, majd desztillált vízzel öblítettük. UV sugárzással 20 percig sterilizáltuk a műanyag dobozokat, amelyekbe egyenként 4 mL steril desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírra 40 mustármagot helyeztünk. A magokat 400 μL ($\text{OD}_{595}=0,3$) baktérium szuszpenzióval oltottuk be, majd Sanyo MLR-351, Versatile Environmental Test Chamber növénynevelő kamrában kontrollált körülmények között csíráztattuk (22 °C, 70%-os páratartalom, 12 h/nap 2500 lx megvilágítás). Három nap után 3 mL különböző koncentrációjú steril nehézfém oldatot pipettáztunk a magokra. Nehézfém forrásként $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ és $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ sókat alkalmaztunk. A mustármagok csírázását 8 különböző nehézfém kezelés mellett vizsgáltuk. A kontroll kísérletet nem bakterizáltuk, a BP13-al jelölt mintasor a *Viridibacillus sp.* BP13 és a BP12-vel jelölt *Delftia acidovorans* BP12 baktériumtörzsszel volt beoltva. A kísérletek során alkalmazott kezelési paramétereket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. A minták kezelési paraméterei

	Baktérium	Minta - Nehézfém típusa és koncentrációja (mM)								
		Kontroll	Zn^{2+}		Cd^{2+}		$\text{Zn}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$		$\text{Zn}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$	
Kontroll	-	0	0,5	1	0,1	0,5	0,5+0,1	0,5+0,5	1+0,1	1+0,5
BP13	+	0	0,5	1	0,1	0,5	0,5+0,1	0,5+0,5	1+0,1	1+0,5
BP12	+	0	0,5	1	0,1	0,5	0,5+0,1	0,5+0,5	1+0,1	1+0,5

Forrás: saját szerkesztés

Klorofill tartalom meghatározása

Az összklorofill (klorofill-a és klorofill-b) tartalom meghatározásához ammóniás-aceton oldatot készítettünk (1 L 80%-os aceton, 1,5 mL 25%-os ammónia oldat). Kimértünk 0,15 g levelet, majd dörzsmozsárban ammóniás-acetonnal roncsoltuk a növényi sejteket. Centrifugacsövekben 5000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk a növényi kivonatot, majd a felülúszót térfogat beosztásos csövekbe töltöttük és 5 mL térfogatig kiegészítettük ammóniás-acetonnal. Az előkészített minták abszorbanciáját spektrofotométerrel (HACH DR 6000) kvarc küvettában a következő hullámhosszokon mértük: 800 nm, 730 nm, 664 nm és 647 nm. A 800 nm és a 730 nm az aceton elnyelésének korrigálásához szükséges, a 664 nm a klorofill-a, míg a 647 nm a klorofill-b elnyelési maximuma. Az abszorbancia értékekből Porra és mtsai. (1989) által javasolt képlet alapján meghatároztuk a klorofill-a és klorofill-b mennyiségét.

Eredmények és kiértékelése

Morfológiai paraméterek

A 15 napig tartó kísérletünk során megfigyelhettük, hogy legtöbb esetben mind a 40 mustármag kicsírázott. A baktériummal beoltott minták már első napra kicsíráztak, míg a kontroll magok csak a második nap kezdtek el csírázni. A kadmiummal kezelt növények levélkéi legtöbb esetben enyhén sárgásak voltak. A baktériummal való beoltás láthatóan serkentette a csíranövények gyökerének hosszanti növekedését (max. 60 mm), míg a nehézfém kezelés és a koncentráció növekedése a gyökerek hosszának csökkenését eredményezte (15-20 mm).

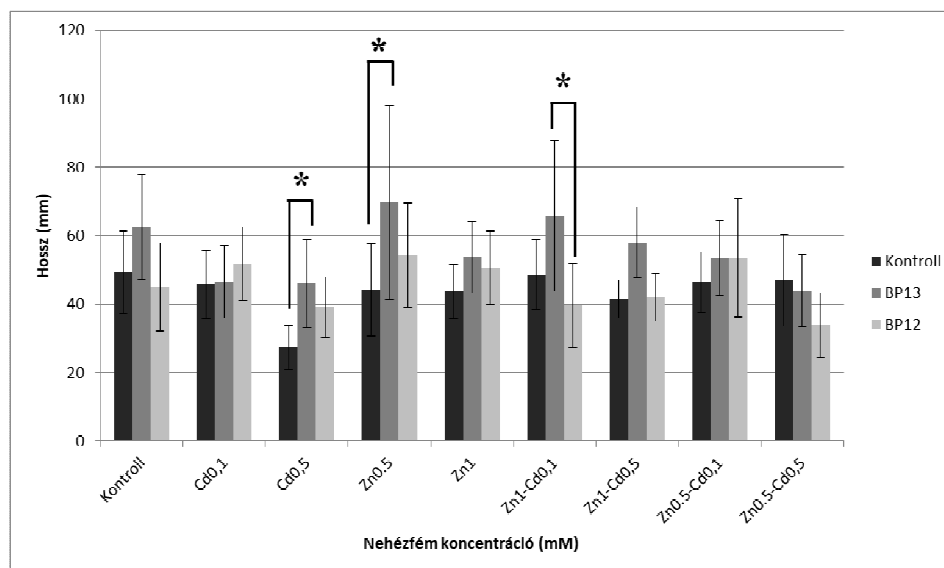
A csíranövények hosszának változása

A csíranövények hosszának változását az 1. ábra szemlélteti. Eredményeink alapján általánosan elmondható, hogy a nem bakterizált csírák esetében figyelhető meg a legjobban a nehézfémek hatása: a nagyobb koncentrációjú kadmium (0,5 mM) negatívan hatott a növénykéek növekedési paramétereire. A baktériummal beoltott minták esetében a 0,5 mM koncentrációjú cink pozitívan befolyásolta a növénykéek hosszát a kontrollokhoz viszonyítva. Megfigyelhető, hogy az adott nehézfém kezeléseket összehasonlítva a nehézfémek koncentrációjának növekedésével csökkent a növénykéek hossza. A 0,5 mM-os kadmiummal és az 1 mM-os cinkkel kezelt minták hossza kisebb, mint a 0,1 mM-os kadmium és a 0,5 mM-os cink kezeléseket esetében.

Összegezőképpen elmondható, hogy a nem bakterizált kontrollhoz viszonyítva a BP13 és a BP12 baktériummal beoltott növénykékek hossza nőtt a legtöbb esetben. A két baktériummal történt kezeléseket összehasonlítva elmondható, hogy a *Viridibacillus sp.* BP13 baktériumtörzs erőteljesebben kifejtette növényi növekedést serkentő hatását, mint a *Delftia acidovorans* BP12 baktériumtörzs.

Statisztikai adatok alapján szignifikáns különbséget figyeltünk meg a 0,5 mM kadmium, illetve a 0,5 mM cink esetében, ahol elmondható, hogy a nem bakterizált kontrollhoz viszonyítva a *Viridibacillus sp.* BP13 baktériumtörzs erőteljesen befolyásolta a növény növekedését. A Zn1-Cd0,1 kombinált nehézfémvel kezelt növénykékek esetében a BP12 baktériumtörzssel beoltottak hossza jelentősen csökkent a BP13-al bakterizált növénykékekhez viszonyítva (n=15, ANOVA, p<0,05).

Hasonló eredményt közöltek Kamran és mtsai. (2015), ahol a rukkolán (*Eruca sativa*) végzett kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a PGP baktériumok jelenlétében a gyökér 32%-os növekedést ért el az abiotikus stressz ellenére is a nem bakterizált mintákhoz viszonyítva.



1. ábra. A kontroll, a BP13 és a BP12 baktériumtörzsszel beoltott minták hossza (*statisztikailag szignifikáns különbségek; n=15, ANOVA, p<0,05)

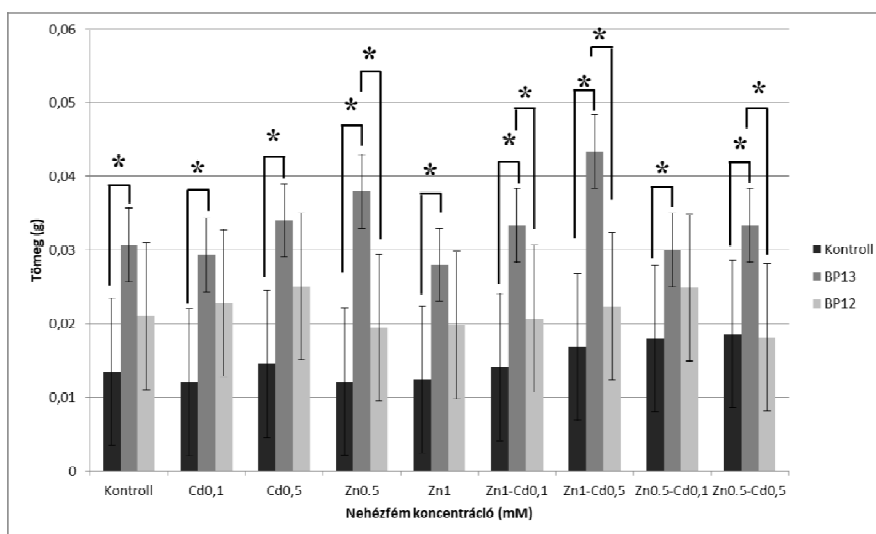
Forrás: saját szerkesztés

A csíranövények biomasszájának változása

A 2. ábra alapján elmondható, hogy egy kísérletsoron belül nincsenek jelentős biomassza változások, illetve a növekvő koncentráció és a kombinált nehézfém kezelések sem befolyásolták a növények tömegét. A *Viridibacillus sp.* BP13 baktériumtörzshöz képest a biomasszára kifejtett jótékony hatása is erőteljesebb volt a *Delftia acidovorans* BP12 baktériumtörzshöz képest.

Statisztikailag szignifikáns biomassza növekedést figyeltünk meg az összes kezelés esetében a nem bakterizált csíranövényekhez képest a BP13 baktériumtörzsszel kezelt csíranövények esetében (2. ábra). A két baktériumtörzsszel kezelt mintákat összehasonlítva a Zn0,5, a Zn1-Cd0,1, a Zn1-Cd0,5 és a Zn0,5-Cd0,5 kezeléseknél statisztikailag szignifikáns tömegcsökkenés figyelhető meg a *Delftia acidovorans* BP12 baktériumtörzsszel kezelt minták esetében (n=15, ANOVA, p<0,05). A kontrollhoz viszonyítva a *Delftia acidovorans* BP 12 baktériumtörzsszel való beoltás is serkentette a növények tömegnövekedését, de a változás statisztikailag nem szignifikáns.

A nehézfémek negatív hatása a növények növekedésére és fejlődésére ismert a szakirodalomból. A cink kezelés negatívan hatott a kukoricánövények biomasszájára az Islam és mtsai. (2014) által végzett kísérletsorozatban. Tang és mtsai. (2016) tanulmányukban leírják, hogy a fehér varjúháj (*Sedum alfredii*) esetében az 50-100 mg/kg kadmium kezelés a hajtások száraz tömegének növekedését idézte elő (1,6-3,2-szeres növekedés). A növényi növekedést serkentő baktériumok jelenléte befolyásolja a nehézfémek által kiváltott stresszt. Kamran és mtsai. (2015) az általunk leírtakhoz hasonló eredményeket kaptak kutatásaik során, hiszen megfigyelték, hogy a kadmium koncentráció növekedésével csökkent a rukkola (*Eruca sativum*) tömege, de a beoltott csíranövények biomasszája akár 40%-al is megnőtt a nem bakterizált növényekhez viszonyítva.



2. ábra. A kontroll, a BP13 és a BP12 baktériumtörzssel beoltott minták biomassza változása

(*statistikailag szignifikáns különbségek; $n=15$, ANOVA, $p<0,05$)

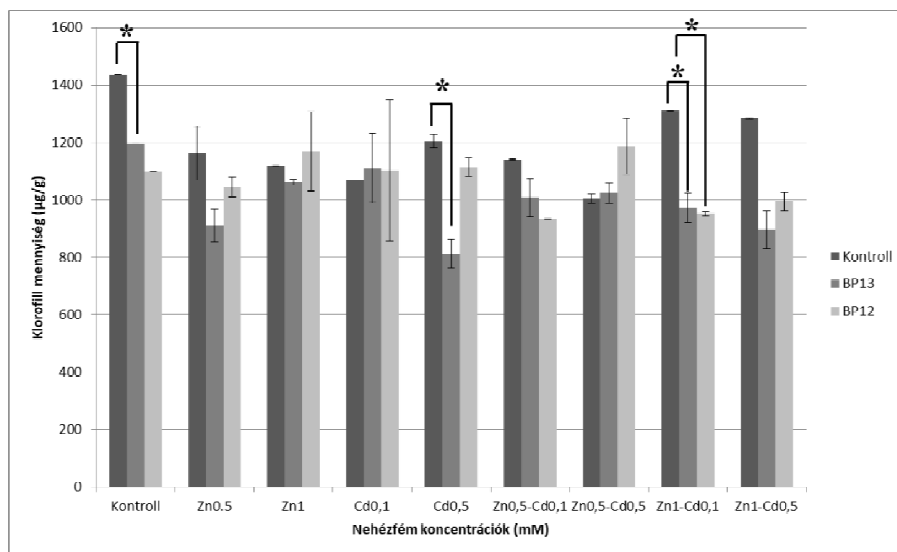
Forrás: saját szerkesztés

Klorofill mennyiségének változása

A 3. ábra alapján elmondhatjuk, hogy a nehézfémek jelenléte kis mértékben befolyásolta a csíranövények klorofill mennyiségét, az abszolút kontrollhoz (nem bakterizált, nehézfém mentes) viszonyítva minden minta klorofill mennyisége csökkenő tendenciát mutat. A három, nehézfémekkel nem szennyezett kontroll minta esetében észrevehető, hogy a növényi növekedés serkentő baktériumokkal kezelt mintákban a csíranövények klorofill mennyisége csökkent az abszolút kontrollhoz képest. A PGP baktériumok és a nehézfém együttes hatásaként a növények klorofill tartalma általában csökkent a kontrollhoz képest. A 3. ábra alapján elmondható, hogy a *Viridibacillus sp.* BP13 baktériumtörzs alkalmazása esetén a kontrollhoz képest, a Cd0,5 és a Zn1-Cd0,1 koncentrációjú nehézfémekkel szennyezett mintáknál szignifikáns csökkenés figyelhető meg. A nem bakterizált minták klorofill tartalmát a *Delftia acidovorans* BP12 baktériummal kezelt mintákéval összehasonlítva ugyancsak jelentős csökkenés látható a Zn1-Cd0,1 kombinált kezelés esetében ($n=3$, ANOVA, $p<0,05$). A klorofill mennyiségi csökkenését a nehézfémekkel történő kezelés okozza, hiszen a nehézfém stressz következtében a fotoszintézis hatékonysága csökken. A kadmium és a cink befolyásolja az I. és a II. fotorendszer működését

és az elektrontranszportláncot is. A fotoszintetikus pigmentek (klorofill-a és b) mennyiségének csökkenését kadmium (52%, 31%-os) és cink (55%, 24%) jelenlétében már megfigyelték a durumbúza növények kezdeti fejlődésében (Paunov és mtsai., 2018). A rizsben (*Oryza sativa*) vizsgált összklorofill mennyiséget a cink 17,4%-al csökkentette. A cinkhez hasonlóan, a kadmium is csökkenti az összklorofill mennyiséget és a klorofill-a és klorofill-b arányát. A csillagpázsitban (*Cynodon dactylon*) vizsgált összklorofill mennyiséget a kadmium 14,8%-al csökkentette (Rai és mtsai., 2016).

A kísérleteink során nem figyelhettük meg a növényi növekedés serkentő baktériumok stressz kompenzáló hatását, az alkalmazott nehézfémek a fotoszintetikus pigmentek károsodását és mennyiségi csökkenését okozták a mustár növények esetében. Kamran és mtsai. (2015) vizsgálták a *Pseudomonas putida* növényi növekedést serkentő baktériumtörzs hatását a kadmiummal kezelt rukkola (*Eruca sativa*) növényeken, kutatásuk során megfigyelték, hogy a PGP baktérium akár 26%-al is megnövelheti a növény klorofill mennyiségét, míg ez a kadmiummal kezelt növényeknél drasztikusan csökken. Heidari és Golpayegani (2012) kísérletei során a bazsalikom (*Ocimum basilicum L.*) klorofill mennyiségének növekedését figyelte meg a vízstressz (például a só) ellenére is. Islam és mtsai. (2014) a cinkkel kezelt kukoricánövények esetében megfigyelte, hogy a klorofill mennyiség az első 10 napban jelentősen megnőtt a PGP rizobaktériumnak köszönhetően.



3. ábra. A kontroll, a BP13 és a BP12 baktériumtörzssel beoltott minták klorofill tartalma (*statisztikailag szignifikáns különbségek) ($n=3$, ANOVA, $p<0,05$)

Forrás: saját szerkesztés

Következtetések

- Általánosan elmondhatjuk, hogy a két alkalmazott növényi növekedést serkentő baktériumtörzs pozitívan befolyásolta a növény fejlődését, azaz a kontrollkísérlethez viszonyítva a növények hossza és biomasszája növekedett a nehézfémstressz hatására is.
- Kutatásaink során megfigyeltük, hogy a mustárnövények össz klorofill mennyisége csökkent a nehézfém koncentráció növekedésével és kombinációjával, a baktériumos beoltás ellenére is.
- A *Viridibacillus sp.* BP13 baktériumtörzs erőteljesebben fejtette ki a jótékony hatását a mustárnövények kezdeti növekedésére és segítette a növényt a stressz helyzetben, mint a *Delftia acidovorans* BP12 baktériumtörzs.
- A *Viridibacillus sp.* BP13 baktériumtörzs jótékony hatását a kadmium és cink toxicitás mérséklésében korábbi tanulmányok nem említik.

Irodalomjegyzék

- Etesami H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 147. 175–91. p., <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>.
- Etesami H. és Maheshwari D. K. (2018). Use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) with Multiple Plant Growth Promoting Traits in Stress Agriculture: Action Mechanisms and Future Prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 156. 225–46. p., <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.
- Heidari M. és Golpayegani A. (2012). Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum L.*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Vol. 11. No. 1. 57–61. p., <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2011.09.001>.
- Islam F., Tahira Y., Muhammad R., Muhammad S. A., Shafaqat A. és Syed H. R. (2014). Proteus Mirabilis Alleviates Zinc Toxicity by Preventing Oxidative Stress in Maize (*Zea Mays*) Plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 110. 143–52. p. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.020>.

- Kamran M., Jabir H. S., Samas E., Muhammad F. H. M. és Hassan J. C. (2015): Effect of plant growth promoting rhizobacteria inoculation on cadmium (Cd) uptake by *Eruca sativa*. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 22., <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4074-x>.
- Lin Y.-F. és Aarts M. G. M. (2012). The Molecular Mechanism of Zinc and Cadmium Stress Response in Plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 69. No. 19. 3187–3206. p. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1089-z>.
- Mustafa G. és Komatsu S. (2016). Toxicity of Heavy Metals and Metal-Containing Nanoparticles on Plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Vol. 1864. No. 8. 932–44. p. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.020>.
- Paunov M., Lyubka K., Andon V., Jaco V. és Vasilij G. (2018). Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19. No. 3. <https://doi.org/10.3390/ijms19030787>.
- Porra R. J., Thompson W. A. és Kriedemann P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Vol. 975. No. 3. 384–94. p. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).
- Rai R., Madhoolika A. és Agrawal S. B. (2016). Impact of Heavy Metals on Physiological Processes of Plants: With Special Reference to Photosynthetic System. In *Plant Responses to Xenobiotics*. Anita Singh, Sheo Mohan Prasad és Rajeev Pratap Singh (szerk.), 127–40. p. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2860-1_6.
- Solanki R. és Rajesh D. (2011). Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia*, Vol. 66. No. 2. 195–204. p. <https://doi.org/10.2478/s11756-011-0005-6>.
- Tang L., Aijun Y., Ming Y., Yetao T., Jian L., Xi L. és Rongliang Q. (2016). Transcriptional up-regulation of genes involved in photosynthesis of the Zn/Cd hyperaccumulator *Sedum alfredii* in response to zinc and cadmium. *Chemosphere*, Vol. 164. 190–200. p. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.026>.

Abstract

The anthropogenic effects like mining or industrial activities are causing serious problems worldwide, one of them being the heavy metal contamination. Heavy metals are toxic by their quantity and concentration and it depends on the living organisms sensibility. The plant growth promoting (PGP) bacterias are stimulating and enhance the plants growth and development and they are protecting the plants from the abiotic stress, like heavy metals.

*The purpose of this research is to examine the germination and early growth of mustard plants (*Sinapis alba*) contaminated with different concentrations of an essential (Zn^{2+}) and a not essential (Cd^{2+}) heavy metal, inoculated with plant growth promoting (PGP) bacteria.*

Keywords: heavy metals, PGP bacteria, mustard, germination, early growth