

---

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Környezettudományi Doktori Iskola

Környezetbiológiai Program

---

*Kari András*

## A TALAJOK TARTÓS SZERVES ANYAG PÓTLÁSA

*Bioszén és növényi növekedést serkentő rizobakteriális talajerőpótlók kombinált hatásának vizsgálata leromlott talajokon*

-doktori értekezés-

Témavezető:

Dr. Márialigeti Károly

egyetemi tanár

Doktori Iskola vezető:

Dr. Turányi Tamás

egyetemi tanár

Programvezető:

Dr. Tóth Erika habilitált

egyetemi docens



ELTE TTK BIOLÓGIAI INTÉZET MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

BUDAPEST

2021

*„Nem létezik olyan, hogy alkalmazott tudományok, csupán a tudományok és azok alkalmazása, melyek úgy kapcsolódnak egymáshoz, mint az alma és a fa, amelyen az megszületett”*

—Louis Pasteur—

## TARTALOMJEGYZÉK

I.	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK .....	6
II.	BEVEZETÉS .....	7
III.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	9
	III.1 A talaj és alkotó elemei.....	9
	III.2 A talaj degradációja.....	11
	III.2.1 Hagyományos műtrágyázás hatása a talajra.....	12
	III.2.2 A fenntartható mezőgazdaság fogalma, lehetőségek .....	13
	III.3 Növényi növekedést serkentő rizobaktériumok (PGPR).....	14
	III.3.1 A rizoszféra növény baktérium kapcsolatai és PGPR szervezetek .....	14
	III.3.1.1 Direkt mechanizmusok.....	16
	III.3.1.1.1 Nitrogén fixálás.....	16
	III.3.1.1.2 Foszfor szolubilizáció .....	17
	III.3.1.1.3 Növényi növekedési hormon termelés.....	18
	III.3.1.1.4 ACC deamináz aktivitás.....	20
	III.3.1.1.5 Sziderofór termelés .....	21
	III.3.1.2 Indirekt mechanizmusok .....	22
	III. 3.1.2.1 Indukált szisztémás rezisztencia (ISR) és sziderofór termelés .....	22
	III.3.2 A PGPR talajoltóanyagok alkalmazásaink a korlátai .....	23
	III.3.2.1 Oltóanyag hordozók .....	24
	III.3.2.2 PGPR szervezetek nyomon követése .....	24
	III.4 Bioszén.....	26
	III.4.1 Története, áttekintés .....	26
	III.4.2 Fizikai-kémiai tulajdonságai .....	26
	III.4.3 Bioszén a talajban.....	30
	III.4.4 A bioszén mezőgazdasági alkalmazása .....	32
	III.4.5 Bioszén hatása a talajbiótára .....	33
	III.4.6 A bioszén oltóanyag hordozóként való használata .....	36
IV.	Célkitűzések .....	38
V.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	39

V.1	A kísérletbe vont területek jellemzése .....	39
V.2	A felhasznált bioszén kiválasztása és jellemzése .....	40
V.3	Az oltásra használt PGPR törzsek kiválasztása és jellemzése .....	41
V.3.1	Mintavételezés .....	45
V.4	Fizikai kémiai vizsgálatok .....	46
V.5	A PGPR törzsek nyomon követésére szolgáló <i>in silico</i> modellrendszer felállítása... 46	
V.5.1	Terminális Restriktációs Fragmens hossz Polimorfizmus (T-RFLP).....	46
V.5.2	DNS kivonás .....	47
V.5.3	Polimeráz láncreakció (PCR).....	48
V.5.4	<i>In silico</i> jellemzése a PGPR törzseknek .....	49
V.6	A rizoszféra bakteriális közösségének és a PGPR oltókultúrák jellemzése (T-RFLP, PLFA, NGS, SEM) .....	49
V.6.1	Terminális Restriktációs Fragmens hossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat .....	49
V.6.2	16S rDNS klóntárak létrehozása és filogenetikai elemzések.....	50
V.6.3	Foszfolipid-zsírsav (PLFA) elemzés.....	52
V.6.4	Illumina MiSeq szekvenálás .....	54
V.6.5	A minták mikroszkópos vizsgálata .....	55
V.6.6	Eredmények statisztikai értékelés.....	55
VI.	Eredmények és értékelésük .....	57
VI.1.3.	A talajoltásra használt PGPR törzsek molekuláris jellemzése és monitorozása ....	57
VI.1.1	PGPR organizmusok azonosítása és a molekuláris nyomon követési rendszer felállítása.....	57
VI.1.2	A kijutatott baktériumok relatív abundanciájának a nyomon követése.....	60
VI.1.2.1	Savanyú Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talajra adaptált PGPR oltóanyagok	60
VI.1.2.2	Lúgos Mollic Umbrisol (Őrbottyán) talajra adaptált PGPR oltóanyagok.....	63
VI.1.3	A kukorica rizoszféra bakteriális közösségében végbemenő változások a genotípusos és fenotípusos vizsgálatok segítségével.....	67
VI.1.3.1	„Szekvenciával-támogatott T-RFLP” analízis .....	67
VI.1.3.1.1	Savanyú Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talaj esetében .....	69
VI.1.3.1.2	Karbonátos Mollic Umbrisol (Őrbottyán) talaj esetében.....	74
VI.1.3.2	Fenotípusos PLFA analízis .....	78

VI.1.3.2.1 Savanyú Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talaj esetében .....	78
VI.1.3.2.2 Karbonátos Mollic Umbrisol (Órbottyán) talaj esetében .....	80
VI.2 A bioszén kezelés hatása a talajok mikroba közösségeire 30 hónap távlatából .....	83
VI.2.1 Kétsugaras pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	83
VI.2.2 A talajok fizikai és kémiai paraméterei .....	86
VI.2.3 Újgenerációs DNS szekvenálási eredmények.....	90
VII. Következtetések .....	99
VIII. Összefoglaló .....	103
IX. Summary .....	105
X. Irodalomjegyzék.....	106
XI. Függelék.....	128
XII. Köszönetnyilvánítás .....	134

# I. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

16S rRNS	riboszóma kisaegységének RNS molekulája	PGPR	növényi növekedést serkentő rizobaktérium (plant growth promoting rhizobacteria)
ANOSIM	hasonlóságok elemzése (analysis of similarities)	PLFA	foszfolipid-zsírsv elemzés (phospholipid fatty acid analysis)
ANOVA	varianca elemzés (analysis of variance)	SIMPER	hasonlósági százalékok (similarity percentages)
ARDRA	amplifikált riboszomális DNS restrikciós analízis	SEM	pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope)
BC	bioszén (biochar)	OTU	operatív taxonómiai egység (operational taxonomic unit)
BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)	TBE	trisz-bórsav-EDTA
DEPC	dietil-pirokarbonát	TKE	telepképző egység
dNTP	dezoxi-nukleotid-trifoszfát	T-RFLP	terminális restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (terminal restriction fragment length polymorphism)
PC	főkomponens (principal component)	T-RF	terminális restrikciós fragmens (Terminal restriction fragment)
PCA	főkomponens elemzés (principal component analysis)	X-gal 5	5-bróm-4-klór-3-indol- $\beta$ -D-galaktopiranozid
PCR	polimeráz láncreakció (polimeráz chain reaction)		

## II. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek során az intenzív mezőgazdasági termelés (fokozott műtrágya bevitel, peszticid alkalmazás és genetikai módosítás) következtében nemcsak az egységnyi területre és időtartamra jutó termésmennyiség nőtt meg, hanem az ökoszisztémára, az egészséges környezetre és az éghajlatváltozásra gyakorolt negatív hatások is. A mezőgazdasági területek degradációja, a talaj tápanyagtartalmának csökkenésével a talajerózió fokozódásával együtt, kiemelt gondot jelent a gazdaságok számára. Ezen problémák felismerése vezetett a holisztikus szemléletű fenntartható mezőgazdasági gyakorlathoz. A meglévő erőforrásokra épít és képes a környezeti, társadalmi, gazdasági érdekeket egyforma súllyal mérlegelve az emberiség egészséges táplálék- és rostigényét kiszolgálni (Benbrook, 1999).

Kiemelt jelentőségű a leromlott élőhelyek, mezőgazdasági területek egyszerű és fenntartható módszerekkel történő javítása. Ennek a környezettudatos gyakorlatnak a részét képezi a bioszénrel történő mezőgazdasági talajjavítás (Lehman és mtsai, 2003). A porózus, finomszemcsés és nagy széntartalmú bioszén a szerves mezőgazdasági (állati, növényi) biomassza oxigénmentes hőbontása (pirólízise) során állítják elő (Lehmann és mtsai, 2011). A szénraktározási célok mellett, egyre nagyobb érdeklődés övezi a leromlott szerkezetű és kis tápanyagtartalmú talajok bioszén kezelés révén megvalósuló mezőgazdasági termelésbe vonását is. A bioszén alkalmazása a talaj tápanyagainak (mint a nitrogén, foszfor stb.) megkötésén, a talajszerkezet és hőháztartás javításán keresztül képes a növények tápanyagfelvételét és ez által a termésmennyiséget növelni (Glaser és mtsai., 2002).

A növényi növekedés serkentő rizobaktériumok (PGPR) biostimulátorként való alkalmazása a fenntartható mezőgazdaság leggyakrabban használt módszere, hiszen környezeti szennyezés nélkül képes a növények egészségét és növekedését elősegíteni (Singh és mtsai, 2017). A PGPR szervezetek a növények gyökerét kolonizálva anyagcsere sajátságai révén képesek direkt (fitohormon termelés,  $N_2$  fixáció, foszfor szolubilizáció, sziderofór termelés) és indirekt mechanizmusok segítségével (szubsztrát kompetíció, indukált szisztémás rezisztencia) a növényi növekedés serkentésére, illetve stressztűrő képességeik fokozására (Kloepper és mtsai, 1980).

A PGPR organizmusokkal történő hatékony talajoltás egyik legnagyobb kihívása a kijutatott törzsek változó, illetve csekély túlélése a talajban (Hale és mtsai, 2014). Ezért a nagy porozitással rendelkező bioszén jelentős adszorpciós kapacitásának köszönhetően a mikróbák számára hatékony (védelem és tápanyag) életteret biztosíthat. Ugyanakkor kevés tudományos

ismeret áll rendelkezésünkre a bioszén oltóanyag hordozóként való felhasználásával kapcsolatban szabadföldi körülmények között, illetve a két szerves talajerőpótló (bioszén és PGPR) közös használatának a rizoszféra mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról. Ennek értelmében fontos, hogy egyre több ismeretünk legyen a bioszén és PGPR szerves talajerőpótlók együttes használatáról, nemcsak a talaj fizikai-kémiai és a termésmennyiség vonatkozásában, hanem a rizoszféra mikrobiális közösségre gyakorolt hatásairól.



### III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### III.1 A talaj és alkotó elemei

A talaj egy rendkívül komplex környezeti rendszer, önálló természeti képződmény, amely a földi élet alapja. Meghatározó szerepet játszik az elemek biogeokémiai ciklusaiban, a tápanyagforgalomban, illetve kapcsolatot teremt a többi környezeti elemmel (pl. víz, levegő). Komplexitását és funkcionalitásának mértékét jelzi, hogy tudományterületenként különböző módon értelmezik a talaj fogalmát. A mezőgazdasági szempontú meghatározás szerint a talaj a Föld szilárd burkának legkülső rétege, amely a növények termőhelyéül szolgál, míg alapvető tulajdonsága a termékenység, tehát hogy megfelelő időben és a szükséges mennyiségben képes ellátni a rajta élő növényzetet vízzel és tápanyagokkal, lehetővé téve az elsődleges biomassza megtermelését. A földtani megközelítés értelmében, pedig a regolit azon része, amely képes a gyökeres növények fenntartására. A talaj sokoldalú funkciói létfontosságúak a bioszféra szempontjából. A talaj legjelentősebb funkció közé tartozik a tápanyag forgalom, hő-, víz-, növényi tápanyagok és energia raktározása, továbbá élettér biztosítása, biotikus szabályozás. Ezek mellett a talaj a potenciálisan veszélyes anyagok szűrő és detoxikáló rendszere, amely pufferkapacitása által képes a talajt érő különböző stresszhatásokat bizonyos mértékig tompítani (Várallyay, 1997; Balestrini és mtsai, 2015).

A talaj egy polidiszperz rendszer, melynek lényeges alkotó elemei közé tartozik a szilárd – szervesetlen és szerves– (50%), folyadék (30-45%) és gázfázis (5-20%) is. Optimális esetben a talaj 45%-a szervesetlen fázisból (főként ásványok), 5%-a szerves anyagból és 50%-a talaj pórusréből áll. A pórusrét egyenlő arányban van vízzel és levegővel elfoglalva. Az ásványi fázis alkotóelemei lehetnek elsődleges–alogén, vagy másodlagos–autigén ásványok, amíg az elsődleges ásványok az alapkőzet fizikai mállásának eredményeként keletkeznek (kő, kavics, homok), addig a másodlagos ásványok a talajban átalakult és újraképződött ásványokat (kristályos és amorf anyagok) foglalja magába (Stefanovits és mtsai, 2010).

A talajok élettelen szervesanyagai elhalt növényekből és állati maradványokból, illetve excretumokból származik. A holt szervesanyag estében megkülönböztetjük a málló szerves anyag átalakulásának kezdeti szakaszaiban képződő nem humusz anyagokat (fehérjék és egyéb aminovegyületek, lignin, szénhidrátok, flavonok viaszok stb.), illetve a lebontott növényi eredetű szerves anyagok és új szerves képződmények, illetve szervesetlen eredetű autigén anyagok (főleg agyagásványok) keverékéből kialakuló humusz szerves anyagot.

A humusz lényeges alkotó eleme a bomlásra rezisztens növényi maradványok, fulvosavak, huminsavak. A humusz mennyisége, illetve minősége határozza meg a talaj termékenység mértékét. A humuszformákat képződésük helye szerint megkülönböztetjük a víz alatt képződött, félig szárazföldi és szárazföldi humuszformákat. A félig szárazföldi humuszformák esetében a kótu szervesanyag tartalma kisebb, mint 30%-ék, míg a tőzeg szervesanyag-tartalma magasabb mint 30%-ék. A szárazföldi humuszformákat a szerves maradványok bontottsági foka és az így kialakuló morfológiai jegyek határozzák meg az egyes humuszfajtákat: a) mór – kevésbé lebontott, nincs kolloid forma a növényi szövetek jól felismerhetők; b) moder – fokozottabban bontott, van kolloid forma; c) mull – erős lebontású humusz és fokozottan kolloidális (Stefanovits és mtsai, 2010; Stolt és mtsai, 2018).

A globális földi szénkészletnek egy jelentős hányadát a talaj szervesanyaga tartalmazza, hiszen ahogy Kalev és Toor (2018) is rávilágított a talaj közel kétszer annyi szenet tartalmaz, mint a föld légköre és vegetációja együttesen. Ennek köszönhetően egyre nagyobb figyelem irányul a talaj szénraktározási tulajdonságára, hiszen képes ellensúlyozni a folyamatosan növekedő légköri CO<sub>2</sub> szintet (Kučerík és mtsai, 2018).

A talaj levegő tartalma az egyik leginkább változékony talajalkotó komponens. A legfőbb és mennyiségileg legkevésbé változékony alkotórésze a molekuláris nitrogén (78,2 %), amely kissé magasabb koncentrációban fordul elő, mint a légkörben, míg általánosságban elmondható, hogy a talajlevegő O<sub>2</sub> tartalma kevesebb (15,0–20,0%), míg CO<sub>2</sub> tartalma pedig több (0,36–5,0%) mint az atmoszféráé. Jól átszellőzött talaj esetében a metán nem számottevő, azonban ha a talajban oxigén hiányos környezet alakul ki az anaerob metanogén baktériumok életvékenysége által a talaj szerves anyagának lebontásakor a végtermék nem CO<sub>2</sub>, hanem CH<sub>4</sub> lesz (Serrano és mtsai, 2014). A talajra ható pillanatnyi külső feltételeknek megfelelően a talajoldat a gázfázissal együtt a talaj pórusait kitöltve dinamikus egyensúlyba van.

A talajoldat funkciója, hogy a szilárd fázis önmagában inaktív elemeit reakcióképes alakba tudja hozni (pl. oldja vagy hidrolizálja), továbbá az elszállításukat is biztosítja. Ennek értelmében a talaj vízháztartásától függ a növények vízigényének kiszolgálása, a biológiai aktivitás mértéke és tápanyagforgalom kialakítása egyaránt. A talaj vízháztartását leíró tulajdonságok egyike a talaj víztartó képessége, melynek mérése segítségével meghatározhatjuk, hogy a talajba szivárgó, növények számára elérhető vizet mennyi ideig képes raktározni. A talaj víztartó képességét elsősorban a talajszerkezet (szemcseméret) a talajkolloidok mennyisége határozza meg. A kis méretű szemcsékből álló talajok esetében (iszap és agyag) a nagyobb felületi felszín miatt a víz erősebben kötődik, mint a nagyobb

szemcseméretű talajok esetében (homok). A talaj szervesanyag tartalma szintén befolyásolja a víztartó képességet, így a talaj szervesanyag utánpótlása általában a víztartó képesség növelésével jár együtt (Murphy, 2014).

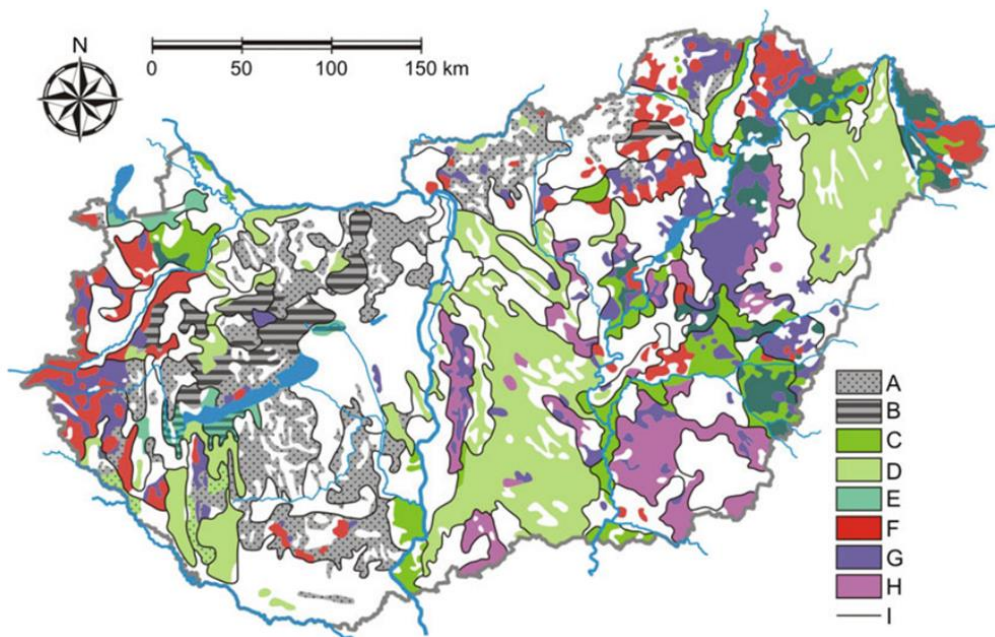
Bár a talajbióta százalékos aránya kevesebb mint 1%-ék a teljes talajtömeghez képest, mégis életfolyamataik nemcsak, hogy hozzájárulnak a talaj kialakulásához, de hatással vannak a talajfejlődésre is. Egy gyűszűnyi mennyiség a talaj felső rétegéből, több mint 20 000 élőlényt tartalmaz. A mikrométer nagyságú mikrobióta (baktériumok, gombák, archeák és algák) és mikrofauna (protozoák és nematódák) felelős az elsődleges szerves anyag átalakításáért és lebontásáért. A talaj-táplálékháló (soil food web) közepén elhelyezkedő mezofauna (0,2-2,0 mm-es testméret) csoportját a mikroarthropodák, elsősorban az ugróvillások (Collembola) és az atkák (Acari) alkotják. Amellett, hogy a tápanyag lebontás sebességét szabályozzák, és visszajelzést adnak növényeknek, a talaj struktúrájának kialakításában is szerepet játszanak, kiváltképpen a fél-száraz területeken (Flórián és mtsai, 2019). A talaj makrofauna (cm-es méret) tagjai - a nagyobb ízeltlábúak (ászkák, ikerszelvényesek), a giliszták és a kisemlősök, akik elsődleges szerepet játszanak a talaj szerkezet kialakításában, heterogén élettereket és kedvező mikroklímát alakítanak ki a szerves anyag átalakításában, lebontásában (humifikáció, mineralizáció), illetve a tápelemek körforgásában (pl: nitrogén, szén körforgalom) szerepet játszó mikroszervezetek számára (Sofó és mtsai, 2020).

### **III.2 A talaj degradációja**

A folyamatos társadalmi fejlődés következtében egyre több és egyre változatosabb formában kerülnek az egyes talajfunkciók igénybevételre. A talajerőforrások számára az emberiség fokozódó tápanyag igénye jelenti az egyik legjelentősebb terhet. Tilman és mtsai (2011) előrejelzései alapján a 2050-re annak érdekében, hogy az emberiség a megnövekedett tápanyag igényét kitudja szolgálni további 1 milliárd hektár területet kell intenzív mezőgazdasági termelés alá vonni. Az intenzív mezőgazdasági termelés (fokozott műtrágya bevitel, peszticid alkalmazás és genetikai módosítás) következtében nemcsak az egységnyi területre és időtartamra jutó termésmennyiség növekszik meg, hanem az ökoszisztémára, az egészséges környezetre és az éghajlatváltozásra gyakorolt negatív következmények is (Nkebiwe és mtsai, 2016).

A talaj degradációja – az említett antropogén hatások következtében is – egy olyan globális jelenség, amely az ökológiai szolgáltatások és a biodiverzitás együttes csökkenésével jár. A területek savanyodása, szikesedése, szerkezet romlása és tömörödése, a talajok csökkenő

vízartó képessége, kationcserélő kapacitása (CEC), illetve szervesanyag tartalma mind a talaj degradáció következményei. Hazánkban a talajerózió az egyik legjelentősebb talaj degradációs folyamat, amely hozzávetőleg 2 millió hektár termőterületet érint (Magyarország összterületének 15,6%-a) (Mezősi, 2017). A kémiai talajdegradációs folyamatok közül a savanyodás Magyarország összterületének 12,8%-át, míg a szikesedés 10,7%-át teszi ki (1. ábra). A további talaj termékenységét gátló tényezőkkel (nagy homoktartalom, nagy agyagtartalom, láposodás, felszín közeli tömör kőzet) együtt a talajerózió és savanyodás Magyarország összterületének 53,5%-át érinti (mahanty, 2015; Mezősi, 2017).



1. ábra. A talajok termékenységét gátló tényezők Magyarországon: A erózió; B vékony termőréteg; C nagy agyagtartalom; D nagy homoktartalom; E láposodás; F savanyodás; G szikesedés; H szikesedés a mélyebb talajrétegekben; I a terület határok jelölése (Mezősi, 2017)

### III.2.1 Hagyományos műtrágyázás hatása a talajra

A mezőgazdasági termelés hatékonyságának növelése, illetve a magasabb minőségű végtermék elérése érdekében alkalmazzák a trágyázást. A szervezetlen műtrágyák leginkább foszfát, nitrát, ammónium és káliumsókat tartalmaz. Az elmúlt években az intenzív mezőgazdasági tevékenységek hatására robbanásszerűen megnövekedett a műtrágyahasználat, amely számos nagyon súlyos környezeti problémát idézett elő, amely egyaránt kiterjed a talaj, levegő és víz szennyezésekre. A nagymennyiségben, feleslegben kijutatott szervezetlen kémiai komponensek felhalmozódnak talajvízben, így veszélyeztetve a vízbázisokat, illetve hozzájárulnak a vizes élőhelyek eutrofizációjához is (Mahanty és mtsai, 2016).

A talaj minőségromlásában is közrejátszanak ezen vegyületek, hiszen lerontják a talajszerkezetet ezáltal csökkentve a talaj víztartó képességét és termékenységét (kiváltképpen a  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  műtrágyák). Fokozzák talaj sótartalmát, továbbá zavart okoznak a talaj tápanyagforgalmában, hozzájárulva a talajbiótára, állatokra és emberekre egyaránt veszélyes anyagok (pl: nitrozaminok, nitrozamidok) megjelenéséhez. A felsorolt környezeti problémák, mellet szintén súlyos következményekkel jár, hogy számos műtrágya nehézfém (pl. kadmium és króm) és természetes radioizotópokat ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ) tartalmaz (Savci, 2012). A műtrágya használat következtében csökken a talaj pH, amely szintén hozzájárul a nehézfémek kioldódásához (leginkább Cd, Pb, Cr és As) és táplálék lánc magasabb szintjein történő megjelenéséhez, felhalmozódásához (Atafar és mtsai, 2010).

Bishopp és Lynch (2015) rávilágított, hogy bár a 20-ik század során megnövekedett termésmennyiség a műtrágya használat a növények földfelszíni hajtásainak sikeres kezelésének köszönhető, amennyiben a 21-ik század élelmiszer igényét is hatékonyan kiakarjuk szolgálni, elengedhetetlen a felszínalatti növényi részekre (gyökér) fordított nagyobb hangsúly.

### III.2.2 A fenntartható mezőgazdaság fogalma, lehetőségek

Figyelembe véve az intenzív műtrágya használat által képviselt kockázatokat, megnövekedett az igény egy olyan mezőgazdasági gyakorlatra, amely a környezeti, társadalmi, gazdasági érdekeket egyforma súllyal mérlegelve képes az emberiség egészséges táplálék- és rostigényét kiszolgálni (Benbrook, 1999). Ez vezetett a fenntartható mezőgazdasági termelés gyakorlatához, melynek hatékonysága a talaj mikrobiótától nagyban függ (Patil és mtsai, 2014). A növényi növekedés serkentő rizobaktériumok (PGPR) biostimulátorként való alkalmazása a fenntartható mezőgazdaság leggyakrabban használt módszere, hiszen környezeti szennyezés nélkül képes a növények egészségét és növekedését elősegíteni (Singh és mtsai, 2017). A talajoltó készítmények általi talaj szerkezet és egészség visszaállításának egy másik hatékony módszere a bioszén alkalmazása. A megújuló erőforrásokon alapuló porózus, finomszemcsés és nagy széntartalmú bioszén a talaj szerkezetét, biológiai aktivitását és termékenységét egyaránt képes jótékonyan befolyásolni amellet, hogy szerepet játszik az üvegházhatású gázok általi terhelés csökkentésében is (Wang és mtsai, 2013; Lu és mtsai, 2015).

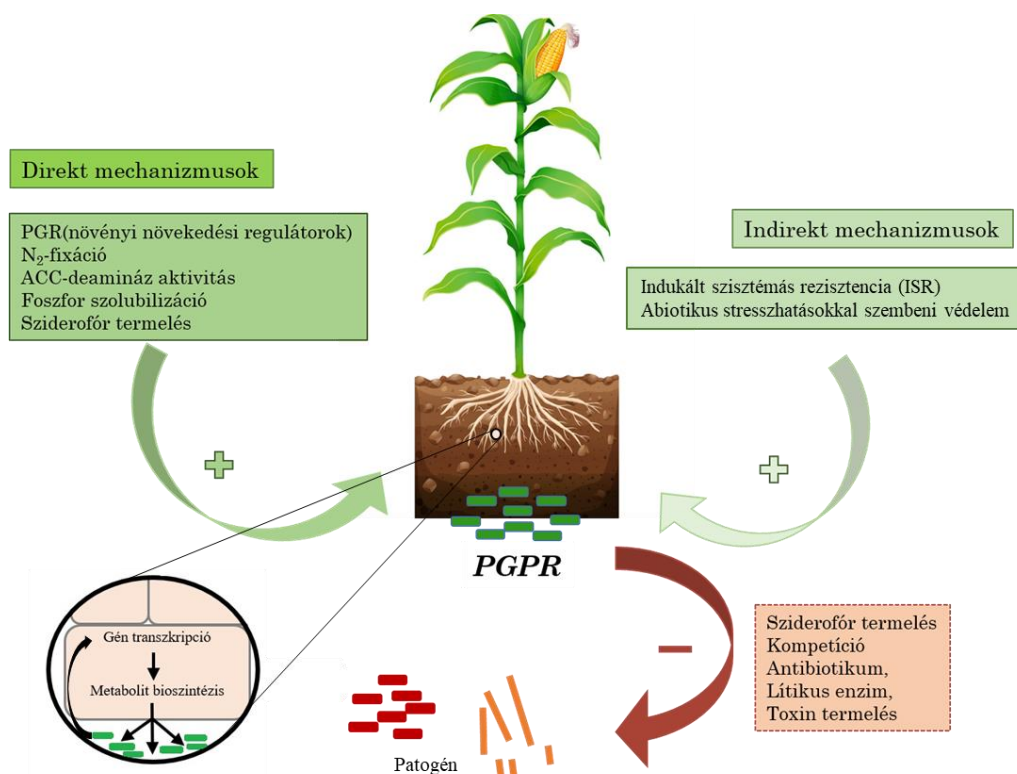
### III.3 Növényi növekedést serkentő rizobaktériumok (PGPR)

#### III.3.1 A rizoszféra növény baktérium kapcsolatai és PGPR szervezetek

Hiltner 1904-es definíciója alapján a rizoszféra egy jól körülhatárolható ökológiai niche, amely a növényi gyökérzet közvetlen környezetében lévő talajréteget foglalja magába, a legjelentősebb bakteriális diverzitással és abundanciával, melyet a növényi gyökérzet által kibocsájtott exudátumok szabályoznak (Hartmann és mtsai, 2008). A rizoszféra bakteriális populációjának abundanciája 100–1 000-szerese is lehet a talaj többi rétegéhez képest, mindez annak köszönhető, hogy ezen szervezetek változatos anyagcsere útvonalak segítségével képesek alkalmazkodni és hatékonyan felhasználni a gyökérexudátumokat. A növényi fotoszintézis termékeinek 5–21%-a gyökérzet által különböző szénhidrátok, karbonsavak és aminosavak formájában kerül kiválasztásra, melyet mikrobiális közösség hasznosít. Ebből kifolyólag a gyökérexudátumok hatására a gyökérfelszínen és a gyökér környezetében a mikrobák felszaporodnak, aktivitásuk növekszik. A növények a gyökérexudátumok által nemcsak a mikrobapopulációk abundanciáját, aktivitását, de összetételét is befolyásolják. A gyökérexudátumok szignalizációs és kemoattraktáns molekulákat egyaránt tartalmazhat, amelyek hatására azon jótékony mikrobák kerülnek a növényzet környezetében, amelyek szerepet játszanak a patogének elleni rezisztencia, és a növényi növekedés serkentésében. Az így kialakuló szimbiotikus kölcsönhatás, mindkét fél számára kölcsönös előnyökkel jár (Lu és mtsai, 2018).

A növényi növekedést serkentő rizobaktériumok (PGPR) közé tartoznak azon szervezetek, amelyek a növény gyökérzetét kolonizálják és fokozzák a növények stressztűrő képességét, illetve serkentik a növekedésüket (Kloepper és Schroth, 1980). Goswami és mtsai (2016) értelmezése szerint egy bizonyos rizobaktérium, akkor tekinthető PGPR szervezetnek, amennyiben a kijuttatását követően valamilyen pozitív hatással van az adott növényre, és jó kompetíciós képességgel rendelkezik a helyszíni rizoszféra baktériumokkal szembe. Átlagosan a rizoszféra baktériumainak 2–5%-át tartják PGPR szervezetnek (Jha és mtsai, 2010). Az első kereskedelmi forgalomba hozott PGPR oltókultúra (*Rhizobium* baktériumok) 1895-ben jelent meg Nagy-Britanniában (GB 189511460), míg az azóta eltelt időszakban több tucat baktérium nemzetség került talajoltókészítmény formájában a kereskedelmi forgalomba és gyakorlati alkalmazásba, sőt azóta napjainkra akár több fajt tartalmazó PGPR talajoltó készítmények is mindennappossá váltak (Bakker és mtsai., 2010).

Hagyományosan a PGPR szervezetek növényekre gyakorolt hatásait direkt, illetve indirekt mechanizmusokként csoportosítják (2. ábra). A két csoport közötti különbség, nem minden esetben teljesen egyértelmű. Alapvetően indirekt mechanizmus alatt azokat a PGPR folyamatokat értik, amelyek a növényen kívül játszódnak le, ezzel szemben azok, amelyek a növényen belül zajlanak és közvetlen módon befolyásolják a növényi metabolizmust direkt mechanizmusoknak tartják. Ennek megfelelően a direkt mechanizmusok közé tartoznak azok, amelyek növényi növekedés befolyásoló vegyületek arányát változtatják meg, vagy úgy, hogy maga a mikroorganizmus termel ilyen szabályozó vegyületet, vagy a növények által kibocsájtott hormonokat bontja le, vagy a növények metabolizmusának serkentése által erősíti meg az alkalmazkodó képességet (Govindasamy és mtsai, 2011). Az indirekt mechanizmusok során viszont szükség van a növény immunrendszerének közreműködésére, amely a baktériumok által küldött jelekre reagál. Két nagyon fontos folyamat tartozik ezen mechanizmusok közé, az egyik a növényi indukált szisztémás rezisztencia (ISR) serkentése, illetve az abiotikus stressz elleni védelem biztosítása (Aeron és mtsai, 2011; Ahemad és Kibret, 2014).

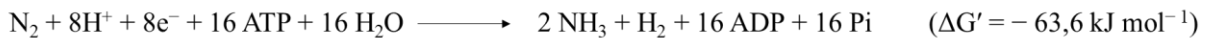


2. ábra. A PGPR baktériumok a növények növekedését befolyásoló direkt és indirekt mechanizmusainak az összefoglalása. A PGPR szervezetek a növények gyökérzetének fiziológiai állapotát direkt gén transzkripciós szabályozáson keresztül metabolit bioszintézis segítségével befolyásolják (Vacheron és mtsai, 2013).

### III.3.1.1 Direkt mechanizmusok

#### III.3.1.1.1 Nitrogén fixálás

A N<sub>2</sub> bár 78%-át alkotja a légkörnek a növények számára nem felvehető. A biológiai nitrogénkötés (BNF) során a légköri N<sub>2</sub> ammóniává kerül átalakításra a nitrogén fixáló baktériumok segítségével, akik a szerves vegyületek lebontásából nyert energia segítségével biztosítják a folyamatot. A nitrogénfixáló szervezetek a folyamatot a nitrogenáz enzim komplexük segítségével katalizálják. A jelentős energiabefektetéssel (1 mól N<sub>2</sub> fixálására minimum 16 ATP kerül felhasználásra) járó folyamat akkor játszódik le (3. ábra), ha a nitrogén más hasznosítható formában nincs jelen a környezetben, továbbá általános tapasztalat, hogy működését a sejtek számára elérhető NH<sub>3</sub> gátolja (Aasfar és mtsai, 2021).



#### 3. ábra. A légköri N<sub>2</sub> fixációnak az egyenlete

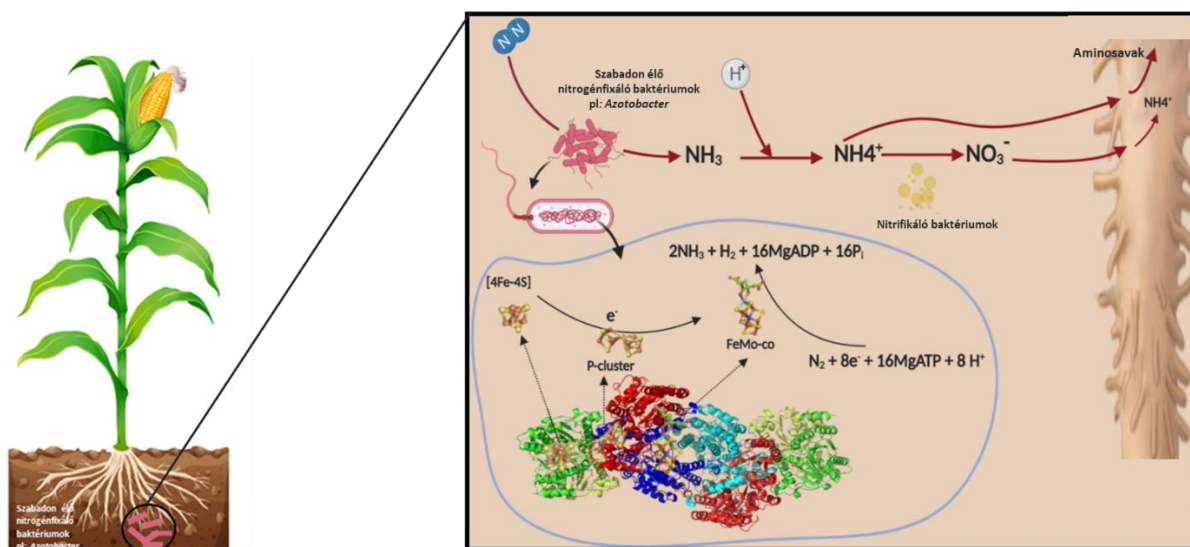
A nitrogén fixálás folyamatát szabályozó funkció gének a *nif* gének. A diazotróf szervezetek *nif* génjei általában 20–24 kb nagyságú klaszterekben találhatóak, 7 operonnal melyek 20 különböző fehérjét kódolnak (Glick, 2012). A *nif* gének közé tartoznak olyan strukturális gének, melyek szerepet játszanak a Fe-fehérje aktivációjában, a Fe-Mo kofaktor bioszintézisében, az elektron transzport folyamatokban, vagy olyan szabályozó gének is, amelyek az enzim komplex szintéziséért és funkcionalitásáért felelnek. A molibdén nitrogenáz enzim komplexnek két strukturális fehérjéjét a *nifDK* és *nifH* gének kódolják. A *nifH* gén kódolja a nitrogenáz enzim dinitrogenáz-reduktáz vas–fehérje egységét (4. ábra). A *nifDK* által kódolt két különböző alegységből felépülő heterotetramer (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>) fehérje két alegységének (*nifD*) aktív régiójához csatlakozik a MoFe-kofaktor (*nifK*) (Rubio and Ludden, 2008).

A nitrogén fixáló szervezetek között megkülönböztetünk szimbiotikus és szabadon élő, vagy endofita nem szimbiotikus szervezeteket. A szimbiotikus nitrogén fixációt, a legfontosabb biológiai nitrogén fixációs folyamatoknak tartják, melynek évi átlagos mértéke eléri a 227 kg N ha<sup>-1</sup>, a nem szimbiótikus nitrogén fixáció mértéke viszont átlagosan 15,5 kg N ha<sup>-1</sup> (Aasfar és mtsai, 2021). A szimbiótikus N<sub>2</sub> fixáció helye a gyökérgümő (nodulusz). A gyökérgümőben, a baktérium–növény interakció hatására képződő, leghomoglobinnal nagyobb affinitással köti az O<sub>2</sub>-t mint a nitrogenáz enzim, így biztosítja az enzim aktivitását. Mivel az O<sub>2</sub> irreverzibilisen gátolja a nitrogenáz enzim komplex működését, a diazotróf szervezetek, különböző stratégiákat alakítottak annak érdekében, hogy megvédjék a nitrogenáz enzimkomplexüket (Cooper és Scherer, 2011). A szimbiótikus N<sub>2</sub> fixáló rizobaktériumok a *Rhizobiaceae* (α-proteobacteria)



család tagjai (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*) melyek a pillangósvirágú növényekkel (*Fabaceae*) élnek együtt.

A diazotróf szabadonélő talajmikróbák között megtalálunk olyan fakultatív aerob szervezetek, melyek csak anaerob viszonyok között fixálnak légköri nitrogént (pl: *Kelbsiella* nemzetség tagjai). Az aerob nitrogénfixáló szervezetek mikroaerofil környezetben, a normál O<sub>2</sub> szintnek csupán az egy-huszadánál (<25 μM) fixálnak N<sub>2</sub>-ént és döntőrészt a következő nemzetségekbe tartoznak: *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Paenibacillus*, *Pantoe*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* és *Stenotrophomonas* (Ahemad és mtsai, 2014).



4. ábra. A nem szimbiotikus légköri nitrogén fixáció folyamata az *Azotobacter* nemzetség példáján keresztül (Aasfar és mtsai, 2021)

Az *Azotobacter* nemzetség tagjai, melyek nagyméretű 2-4 μm átmérőjű pálcák vagy kokkusok, a légköri nitrogén felhasználása során külső nyálkásburkot vagy kapszulát formálnak, amely segíti nitrogénáz enzim O<sub>2</sub>-el szembeni védelmét. Továbbá nitrogénáz enzim komplexe egy konformációs védelmet biztosító Shethna (FeSII) fehérje segítségével képes magas O<sub>2</sub> elleni védelmet biztosítani, így amikor újra a kedvező redox körülmények alakulnak ki nitrogénfixáció tekintetében, az enzim újra aktívvá válhat, így képesek aerob körülmények között is N<sub>2</sub>-én fixációra (Sharan és Nehra, 2011) (4. ábra).

### III.3.1.1.2 1 Foszfor szolubilizáció

A Nitrogén után a foszfor a legnagyobb mértékben limitáló tápanyag a növények számára. A műtrágyázás során kijutatott foszfort leginkább a foszfor kőzetek bányászása során állítják elő. Az előrejelzések alapján viszont, a termelés ütemétől függően, 50-100 év múlva a foszfor

kőzet lelőhelyek kimerülnek (Cordell és mtsai, 2009). Számos talaj jelentős P készlettel rendelkezik (30-70% szerves formában) azonban átlagosan kevesebb mint 10 %-a a teljes P mennyiségének hozzáférhető a növények számára ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) (Nannipieri és mtsai, 2011). Foszfor műtrágyák alkalmazása során, a kijutatott mennyiség csupán kis része hasznosul a növények által, nagyobb része a talaj-alkotóelemeivel reakcióba lépve kevésbé oldható formába kerül (Sundara és mtsai, 2002). A legjellemzőbb foszforformák savanyú talaj esetében Fe és Al komplexek, míg lúgos talajon a kalciummal (Ca) alkotott komplexek.

A mikroorganizmusok fontos szerepet töltenek be a növények számára hasznosítható foszfor mennyiségének növelésében. A foszfor kötött szerves és szerves formáját a mikroorganizmusok egyaránt képesek szolubilizálni, illetve mineralizálni. A szerves foszfor mikrobiális szolubilizációnak az elsődleges folyamatai közé tartozik különböző szerves savak (citromsav, oxálsav, ecetsav, tejsav, fumársav stb.), szerves savak (szénsav, kénsav, salétromsav), sziderofór, hirdogén ion, illetve  $\text{CO}_2$  termelés (Alori és mtsai, 2017). A talaj szerves anyaga a szerves foszfor formáknak a forrása. Ebben az esetben a foszfor mineralizáció szerves foszfor szolubilizációjára és képződő molekula lebontására vonatkozik. Az elsődleges enzimek melyek szerepet játszanak a szervesanyagok foszfát-észter és foszfoanhidrid kötéseinek defoszforilálójában, azok a savas és alkalikus foszfatázok (Jorquera és mtsai, 2011). A szerves fitát bontásában, amely a talajban mineralizálódott foszforvegyületek akár 80%-át is kiteheti, pedig kulcsszerepet játszik a mikrobiális fitáz enzim termelés (Turner és mtsai, 2002). Azon baktérium törzsek, melyek jelentős szerepet játszanak a növények számára nehezen elérhető foszfor hozzáférhetőségének növelésében a *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Kushneria*, *Paenibacillus*, *Ralstonia*, *Rhizobium* (Alori és mtsai, 2017).

#### III.3.1.1.3 Növényi növekedési hormon termelés

A PGPR organizmusok a növényi hormonok termelése és rizoszférába való kiválasztása által képesek a növények fejlődését befolyásolni. Ilyen fitohormonok többek között az auxin, citokinin és gibberelin sav (dos Santos és mtsai, 2020). Az indol-3-ecetsav (IAA), amely a leglényegesebb (és a leginkább ismert) mikroorganizmusok által termelt fitohormon, központi szerepet játszik a sejtek differenciációjában, a gyümölcs fejlődésében és a levelek öregedésében. Az IAA amellet fontos szignál molekula, a növény minden részére (gyökér, levelek, virág) hatással van (Phillips és mtsai, 2011). A korábbi tapasztalatok alapján a rizoszférából izolált baktériumok 80%-a képes IAA termelésre (Patten és Glick, 1996). Ez felhívja a figyelmet az auxin szignál molekulaként betöltött szerepére, amely központi

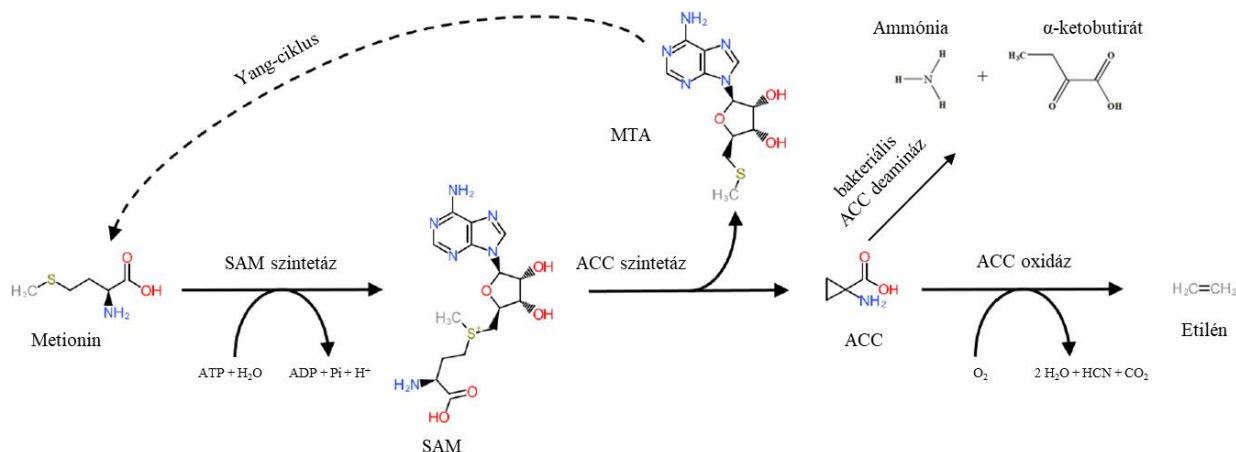


lépéseként a triptofán prekursor transzaminálása valósul meg IPA-vá az aminotranszferáz enzim segítségével. A jelen doktori értekezés során is a PGPR oltókultúra jelentős részét képező *Azospirillum brasilense* és *Azospirillum lipoferum* a korábbi szakirodalmi adatok alapján is jelentős aminotranszferáz aktivitással rendelkeztek (Ruckdäschel és mtsai. 1988; Baca és mtsai. 1994). A folyamat sebességkorlátozó lépése az IPA indol-3-acetaldehiddé (IAAld), történő dekarboxilezése, amelyet az indol-3-piruvát dekarboxiláz enzim katalizál, amelyet az *ipdC* gén kódol. Végül lépésként a IAAld dehidrogenáz enzim segítségével IAA-vá alakul (Spaepen és Vanderleyden, 2011).

#### III.3.1.1.4 ACC deamináz aktivitás

A PGPR szervezetek a növények növekedését a növekedési hormonok termelése mellett, a növekedést gátló hormonok szintjének csökkentése által is képesek serkenteni. Az etilén, egy olyan gázhalmazállapotú növényi hormon, amely a növény növekedését és fejlődését egyaránt befolyásolja. Míg az etilén kezdeti alacsony koncentrációja a növényi szövetekben létfontosságú a gyökér és hajtás megnyúlásos növekedéséhez, a virágzáshoz, illetve a termés képzéshez, addig a megemelkedett etilén szint következtében a gyökér növekedés gátlódik, hipertrófiás folyamatok indulnak meg, fokozódnak az öregedési és abszcissziós folyamatok, gátlódik az auxin transzport és az auxin válasz faktorok (ARF) szintézise is (Glick és mtsai, 2007; Dugardeyn és Van Der Straeten, 2008).

Az etilén bioszintézise magasabb rendű növényekben a SAM szintetáz által katalizált metionin S-adenozil-metioninná (SAM) való átalakulásával kezdődik (6. ábra). A SAM hidrolízise által 1-aminociklopropán-1-karbonsav (ACC), mely folyamatot az ACC szintáz (ACS) által katalizál. A reakció mellékterméke az 5'-metiltioadenozin (MTA), mely a Yang-ciklusba belépve végső soron újra metioninná alakul. Végül az ACC-t az ACC oxidáz enzim etilénné alakítja, CO<sub>2</sub> és cianid mellett. A baktériumok növekedésükhöz az ACC-t mint nitrogén forrás feltudják használni az ACC-deamináz enzimük segítségével. ACC-ből keletkező ammónia és  $\alpha$ -ketobutirát könnyen metabolizálható a baktériumok által. Az ACC-deamináz enzim, viszont jóval kisebb kötési affinitással rendelkezik ( $K_m$  1,5– 17,5 mM), mint az ACC oxidáz ( $K_m$  8– 120  $\mu$ M), ebből kifolyólag a 100–1000-szer nagyobb mennyiségben kell jelenlegyen a deamináz enzim annak érdekében, hogy csökkentse az etilén koncentrációt (Glick és Penrose, 1997).



6. ábra. A növényi etilén bioszintézisének útvonala a bakteriális ACC deamináz aktivitás függvényében. Jelölések: SAM: S-adenozil-metionin, ACC: 1-aminociklopropán-1-karbonsav

Az ACC deamináz enzim termelés szabályozása az *acdS* strukturális génen keresztül valósul meg. A legtöbb mikroba esetében ismeretlen a szabályozás folyamata, azonban a *Pseudomonas putida* UW4 (korábban *Enterobacter cloacae* UW4) jól ismert (Li és mtsai, 2001). A bonyolult szabályozási rendszer aktiválása ACC-kötés által, míg gátlása az *acdS* géntől upstream elhelyezkedő *acdR* génszakaszról átíródó ACC deamináz szabályozó fehérje által történik. A *Mesorhizobium loti*, amely a *Lotus* (kerek) nemzetség tagjaival él szimbiózisban, *acdS* génjének szabályozása függ a *nif* gén expresszióját aktiváló *nifA* géntől, azonban a pontos folyamata még nem tisztázott. Az ACC deamináz aktivitással rendelkező baktériumok leginkább a *Bacillus*, *Variovorax*, *Pseudomonas Sinorhizobium*, *Variovorax* nemzetségbe tartoznak (Singh és mtsai, 2015).

### III.3.1.1.5 Sziderofór termelés

Aerob körülmények között a talajban a vas elsődlegesen a három vegyértékű ferri-ion (Fe<sup>3+</sup>) alakban fordul elő, és nagy valószínűséggel formál oldhatatlan hidroxid és oxi-hidroxid formákat, melyek nem hozzáférhetőek a növények számára (Rajkumar és mtsai, 2010). Rendszerint a baktériumok a kis-molekulású vas-kezelő sziderofórok termelése által jutnak hozzá a vashoz. A kis molekulatömegű (<1kDa) sziderofórok, melyek lehetnek extra-, illetve intracellulárisak, nagy hányada vízzoldékony vegyület. A rizobaktériumok a sziderofór hasznosítási tulajdonságai alapján csoportosíthatóak, olyan szervezetekre melyek ugyanazon nemzetségen belül termelt sziderofórokat (homológ sziderofórok) képesek hasznosítani, vagy más nemzetség szervezeti által termelt sziderofórokat (heterológ sziderofórokat) hasznosítanak (Khan és mtsai, 2018).

A Gram-pozitív és Gram-negatív rizobaktériumokban egyaránt a vas ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a  $\text{Fe}^{3+}$ -sziderofór komplexben a bakteriális membránban redukálódik  $\text{Fe}^{2+}$ -vé, amely utána a membrántranszport segítségével a citoplazmába kerül. A bakteriális sziderofórban megkötött vasat a növények különböző mechanizmusok segítségével képesek hasznosítani, mint például ligand csere reakció vagy direkt felvétele a sziderofór-Fe komplexnek (Schmidt, 1999). Számos tanulmány jelentős növényi növekedést jelentett a sziderofór termelő rizobaktériumok – leginkább a *Pseudomonas* nemzetség– általi talajoltás következtében kialakuló sziderofór-irányított vas felvétel következtében (Rajkumar és mtsai, 2010).

### III.3.1.2 Indirekt mechanizmusok

#### III. 3.1.2.1 Indukált szisztémás rezisztencia (ISR) és sziderofór termelés

Számos PGPR organizmusok képesek a gyökérparazita szervezetek gátlására olyan különféle mechanizmusokon keresztül, mint a volatilis és nem volatilis antibiotikumok, sziderofórok, enzimek, és további másodlagos anyagcseretermékek (HCN) termelése. A növényekhez kapcsolódott organizmusok nem csak antagonizmus révén tudják csökkenteni a káros szervezetek aktivitását, hanem képesek indukálni az ellenálló-képességet, úgynevezett indukált szisztémás rezisztenciát (ISR) váltanak ki. Az egész növényre kiterjedő rezisztencia közvetítésében elsődleges szerep a jazmonátoknak és az etilénnek van (Conrath és mtsai, 2002). A PGPR szervezetek közül *Pseudomonas simiae* (syn. *Pseudomonas fluorescens*), *Paenibacillus polymyxa*, és a *Trichoderma* fajok esetében mutattak már ki ISR aktiválást növényekben (Romera és mtsai, 2019).

A növénypatogén gombák számát a PGPR szervezetek hidrolizáló aktivitású, sejtfalbontó enzimek (kitináz, glukonáz) termelése által szabályozzák. Ezek mellett leírtak olyan törzseket is, amelyek képesek a *Fusarium* gombák okozta tüneteket csökkenteni, a gomba toxinok lebontása révén. Indukálni képesek a növényi rezisztenciát a patogének ellen, így biztosítva a növények nagyobb ellenálló képességét. Ezen PGPR mikroorganizmusok főleg a *Pseudomonas* és *Bacillus* nemzetségekbe tartoznak (Romera és mtsai, 2019).

A sziderofór termelésén keresztül a PGPR organizmusok nemcsak direkt, hanem indirekt módon is képesek a növény növekedését elősegíteni. A jelentős szerep jut a sziderofór termelő organizmusoknak a növénypatogén szervezetekkel szembeni védekezésben, hiszen a kötött vas elérhetlenné válik a fitopatogének számára, így vashiányos környezet alakul ki a rizoszférában. A szakirodalmi adatok szerint a sziderofór termelés a *Pseudomonas* nemzetségre jellemző a leginkább (pl: *Pseudomonas aeruginosa* és *putida*). Ezt a jelenséget nevezzük

szubsztrát kompetíciónak (Kloepper és mtsai, 1980). Buysens és mtsai. 1994-ben megfigyelték, hogy a mutáns *Pseudomonas aeruginosa*, amely elvesztette sziderofór termelő képességét, biokontrollként való alkalmazása sikertelen volt, alátámasztva a sziderofór termelés jelentőségét.

A PGPR organizmusok kompetálnak a növénypatogén mikroorganizmusokkal az alapvető tápanyagokért, a növények gyökerén elfoglalt helyekért, és képesek hosszútávon a patogén szervezeteket túlnőni. Az antagonista baktériumok által leggyakrabban termelt antibiotikumok közé tartozik az ammónia, butyrolakton, 2,4-diacetyl floroglucynol (DAPG), kanozamin, ologomycin A, oomicyn A, fenazin-1 karboxilsav, pyoluterin, pyrrolnitrin, xantobacin (Whipps és mtsai, 2001). Baker és Schippers (1987) megfigyelték, hogy az aerob organizmusok 4%-a továbbá a burgonya rizoszféra *Pseudomonas* nemzetségének 40%-a képes HCN másodlagos anyagcseretermékek termelésére. Amíg a termelő szervezetek cianid-rezisztens citokróm-oxidázzal rendelkeznek, addig számos organizmus, köztük a patogének, citokróm-oxidázát gátolja a termelt és a környezetbe kijutatott HCN.

### III.3.2 A PGPR talajoltóanyagok alkalmazásaink a korlátai

Az egyes jótékony, szimbiota vagy nem szimbiota (rizoszférális) baktériumokat (PGPB) tartalmazó oltóanyagok hatékonyságát számos faktor befolyásolja. Ezek közül a legfontosabbak a gazdanövény– PGPR baktérium viszonya, a kijutatott- és az autochton baktérium közösség közötti kapcsolat, a talaj típusa, az oltásra szánt baktérium törzs gyökérkolonizáló képessége, az életképes baktériumok száma az oltóanyagban, az oltókultúra hordozó, és a kijuttatás módja. Ismert jelenség az is, hogy a sikeresen kolonizáló mikroorganizmusok számára az éghajlat is kiemelt jelentőségű, hiszen gyakran szélsőséesebb éghajlaton nem képesek túlélni (Okon és Labandera-Gonzalez, 1994). Annak az eljárásnak az optimalizálása, amely során egy adott baktérium törzs talajoltókészítményként használható, elengedhetetlen a sikeres oltás elérése érdekében, épp úgy, mint a több baktérium törzset tartalmazó oltókultúrák során az egyes törzsek egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata.

A kereskedelmi forgalomba hozott bakteriális oltókultúrák egyik legjelentősebb limitáló tényezője a kijutatott oltótörzsek talajban való gyenge túlélési rátája (Okon és Labandera-Gonzalez, 1994). Már 1988-ban hatékonyan demonstrálták Aca és mtsai (1988), hogy az inokulum formájában kijuttatott *Pseudomonas*, *Rhizobium* és *Bacillus* fajok csökkenő populációja a Protozoák, vagy gombák általi predációnak a következménye. A folyékony formában történő talajoltás, a talajoltó baktériumok a talajszemcsékhez való nagyfokú

adhéziója miatt kevésbé hatékony, hiszen az adhézió következtében nagyban csökken a PGPR fajok gyökérekolonizáló képessége (Huysman és Verstraete, 1993).

#### *III.3.2.1 Oltóanyag hordozók*

A bakteriális talajoltás során kijutatott törzsek túlélését, kiváltképpen változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező talajban, nagyon sok komponens határozza meg. Többek között az *Azospirillum brasilense* esetében jól ismert, hogy az olyan abiotikus talajtulajdonságok, mint a víztartó képesség, a talaj struktúrája, a talaj nitrogén vagy szerves anyag tartalma, nagyban befolyásolja ezen PGPR szervezetek talajoltást követő túlélését (Bashan és mtsai, 1995). Ennek megfelelően azért, hogy a PGPR fajok általi talajoltás sikeres legyen, kiemelt fontosságú a hatékony hordozóanyag kiválasztása. A hordozóanyaggal szemben alapvető követelmény, hogy biztosítania kell az oltásra szánt baktériumok túlélését a tárolás során, és a talajoltást követően lehetővé kell tegye, hogy a PGPR szervezetek hatékonyan gyarapodhassanak, kolonizálják a növényi gyökérzetet és kifejtsék jótékony hatásukat a növény számára. Egy hatékony hordozóanyagnak védelmet kell nyújtania a hordozott baktériumok számára a különböző biotikus és abiotikus stresszhatásokkal szemben, a folyamatos tápanyagutánpótlás és menedék biztosítása által (van Veen és mtsai, 1997). Abd El-Fattah és mtsai (2013) értelmezésében egy jó hordozóanyagnak könnyen használhatónak, csomagolhatónak, elérhetőnek és költséghatékonynak kell lennie.

A talajoltóanyagok leggyakrabban por, granulátum, vagy folyékony formában kerülnek kiszerezésre (Hale és mtsai, 2015). A leggyakoribb oltóanyag-hordozók alapanyaga vermikulit, lignit és nátrium-alginát. A tőzegmoha szintén gyakori és hatékony hordozóanyag kiváltképpen a *Rhizobium* fajok esetében, azonban az alapanyag minősége nem konstans és a lópokból való bányászata hosszútávon nem fenntartható megoldás (Herrmann és Lesueur, 2013). A tőzegmóhához hasonlóan a vermikulit használata is a véges alapanyagforrások kiaknázásán múlik, ezért a széles körben elérhető, fenntartható módon felhasználható hordozóanyag az iparág számára fokozottan keresett. Az algináton alapuló oltóanyag kapszulák ígéretes alternatívát kínálnak, azonban előállításuk költségesebb a többi alapanyaghoz képest, illetve kapszulák nagy számú tömegtermelésben való előállítása, még továbbra sem elterjedt. (Schoebitz és mtsai, 2015).

#### *III.3.2.2 PGPR szervezetek nyomon követése*

A PGPR oltóanyagok leromlott termőképességű talajokon való használatával, a talajban történő hosszútávú nyomon követésével, és kukorica rizoszféra mikrobiális közösségére



gyakorolt hatásokkal kapcsolatban kevés a rendelkezésre álló információ. A tenyésztés vizsgálatok, amelyek egy specifikus fenotípusos bélyeg alapján a kijutatott törzsek direkt nyomon követését teszik lehetővé, a molekuláris technikák mellett, szintén használatosak (Ahmad és mtsai, 2011). A tenyésztési eljárás során antibiotikum rezisztens PGPR organizmusokat használnak, annak érdekében, hogy megtudják különböztetni az inokulomot a talaj természetes baktérium közösségétől (Lottmann et al., 2000). Attól függetlenül, hogy ezek az eljárások a költséghatékonyak, a horizontális géntranszfer által megjelenő antibiotikum rezisztencia az autochton baktériumközösségben, nagyban visszaveti a módszer pontosságát. Direkt nyomon követési módszer a genetikailag módosított PGPR organizmus használata. A leggyakrabban olyan riporter géneket (GFP az *Aequorea victoria*-ból vagy LUX gén *Vibrio fischeri*-ből) juttatnak az oltásra használt baktériumba, amely biolumineszcens fehérjét kódol (Stuurman és mtsai, 2000; Darwent és mtsai, 2003; Hao és Chen, 2017).

Az oltóanyagok természetes környezetben való molekuláris nyomkövetésének lehetősége kiszélesedett az olyan tenyésztéstől független molekuláris technikákkal, mint a repetitív elemeken alapuló polimeráz láncreakció (rep PCR), vagy a véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS (RAPD) módszer (Ahmad és mtsai, 2011). Szintén jól alkalmazható technika a terminális fragmens hossz polimorfizmus (T-RFLP) molekuláris ujjlenyomat módszer. A mikrobiális diverzitás és közösség szerkezet vizsgálatára megalkotott módszer, egy nagy érzékenységű és jól ismételtető szemikvantitatív eljárás (Liu és mtsai, 1997; Moeseneder és mtsai, 2001; Bharti és mtsai, 2016). Korábban sikeresen alkalmazták az oltásra használt endofita aktinobaktériumok szétválasztására és talajban történő nyomon követésére (Conn és Franco, 2004), illetve *phlD*+ *Pseudomonas* fajok elkülönítésére és detektálására (von Felten és mtsai, 2011). T-RFLP egy jól automatizálható módszer, amely lehetővé teszi a nagy mintaszám melletti adatfeldolgozást, és biztosítja a hatékony ismételtetőséget, így téve lehetővé a releváns mikrobiológiai ökológiai kérdések vizsgálatát (Karczewski és mtsai, 2017).

## III.4 Bioszén

### III.4.1 Története, áttekintés

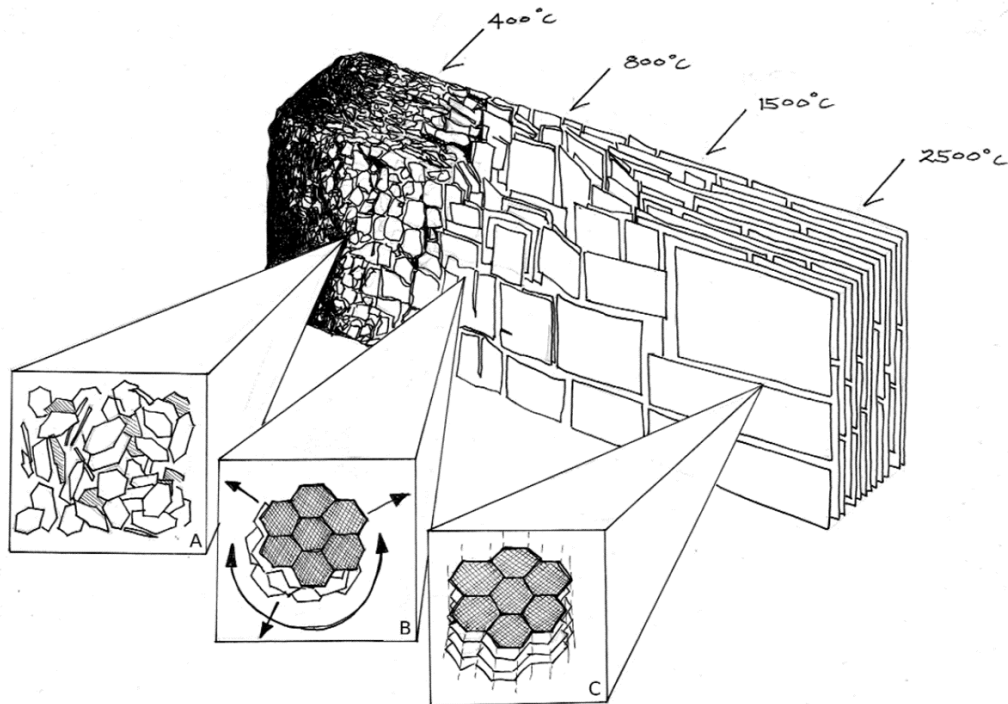
A bioszén eredete visszavezethető az ősi (Kr.e. 500) Amazonas menti civilizációkra. A trópusi éghajlat alatt az ún. fekete földek („Terra preta”) a mély földüregekben oxigénszegény környezetben hevítéssel történő szerves hulladék „kezelés” hatására, a biomassza termikus bomlásának következtében jöttek létre. A közel egy méter vastagságú, mai napig fellelhető, fekete színű területek szénben, magnéziumban, kalciumban foszforban és mikroelemekben egyaránt gazdagok. Az Amazonas- medencére jellemző „ferralsol” típusú savanyú, tápanyagszegény, mezőgazdasági művelésre alkalmatlan talajjal szemben erős kontrasztot mutatnak ezen területek. A fekete földeken termesztett növények jobb tápanyagellátottsága egyaránt visszavezethető a talaj kedvezőbb tápanyag- és vízmegtartó képességére, jobb levegőzöttségére, illetve a megnövekedett mikrobiális aktivitásra (Glaser és Birk, 2012).

A pirolízis során napjainkban előállított bioszén elemösszetétele összefügg az alapanyagok kezdeti összetételével, továbbá nagyban függ a pirolízis hőmérsékletétől (<400 °C; 450-500 °C; 550-650 °C; >800 °C). Általános tapasztalat, hogy a hőmérséklet emelésével nő a stabil szénformák aránya, a pH, és a hamutartalom, míg párhuzamosan csökken a bioszén mennyisége, illóanyag tartalma, oxigén, hidrogén, nitrogén és kén tartalma (Zhang és mtsai 2015; Suman és Gautam, 2017). Megoszlanak a pirolízis hosszának (1-4 h) szignifikáns hatásával kapcsolatos tapasztalatok. Míg Zhang és mtsai (2015) nem mutattak ki összefüggést, addig Suman és Gautam (2017) szerint a pirolízis időtartama hasonló módon és mértékben határozza meg a termék tulajdonságait, mint a hőmérséklet.

### III.4.2 Fizikai és kémiai tulajdonságai

A szerves anyagból a pirolízis során három különböző frakció alakul ki a folyamat eredményeként, amelyek aránya meghatározza a bioszén-tápanyagszolgáltató képességét. A grafityszerű kristályos struktúrákat tartalmazó amorf anyag a további biológiai és kémiai bomlásnak ellenelálló, perzisztens frakció, amely általában a legnagyobb arányban van jelen (Chen és mtsai, 2019). Mivel a bioszén nagy szén tartalmú szerves anyagból épül fel, amely leginkább hat szénatomból álló aromás gyűrűkből tevődik össze oxigén vagy hidrogén molekula nélkül. Abban az esetben, ha ezek az aromás gyűrűk tökéletesen rendezett lemezek formájába tömörülnek akkor alakul ki a grafit forma. Azokon a hőmérséklet tartományokon (300-700 °C), amelyen a bioszén pirolízise zajlik, nem jellemző a grafit forma kialakulása. A

magas hőmérsékleten történő pirolízis (600–700 °C) következtében a képződő bioszén magas hidrofóbitással rendelkező, jól strukturált C réteg kialakulásához vezet. Az alacsony hőmérsékletű pirolízis (300–400 °C) következtében, erősebben diverzifikált szerkezetű bioszén struktúra alakul ki, a különböző szerves jellegű alifás és cellulóz típusú struktúrák következtében (Glaser és mtsai, 2002; Novak és mtsai 2009). A pirolízis hőmérsékletének emelkedése által folyamatosan növekedik a szén rétegek strukturális rendezettsége, és ezzel arányosan csökken a felületi funkciócsoportok aránya (Ahmad és mtsai, 2014) (7.ábra).



7. ábra. A bioszén szerkezetében a pirolízis hőmérsékletének növelése következtében bekövetkező változások. (a) Az aromás C formák magasabb aránya, erősen rendezetlen amorf alakban. (b) a konjugált aromás szénformák fokozatosan növekvő lapjai, turbosztrikus elrendezés (c) kialakul grafit hosszú távú rendezettséget mutató szabályos kristályszerkezete (Downie és mtsai, 2009).

A második jellemző anyagcsoport a labilis frakció, amely a talajba kerülve, akár néhány hét alatt is mineralizálódhat, ellentétben a perzisztens frakciókkal, amelyek akár több százévig is változatlan formában maradhatnak a talajban. Ez a frakció főleg a pirolízis során át nem alakuló cellulózból és hemicellulózból áll, kiváltképpen a növényi alapanyag esetében. Nemcsak a bioszén alapanyaga, hanem a pirolízis időtartama is befolyásolja a labilis frakciók arányát, hiszen minél gyorsabb a pirolízis folyamata a labilis frakció aránya ezzel párhuzamosan növekszik (Uzinger és Rékási, 2015).

A pirolízis hőmérsékletével és a folyamatban résztvevő oxigén mennyiségével nő a bioszén harmadik hamu frakciójának az aránya. A hamu frakció gazdag a könnyen hasznosítható,

mineralizált formában jelen lévő elemekben. A nagyobb hamutartalom a bioszén pH-értékét is növeli (Singh és mtsai, 2010).

A bioszén pórusainak mérete szerint három porozitási csoportot különböztetünk meg. A talajtani szakemberek, habár a 200 nm-nél kisebb belsőátmérőjű pórusokat összességében tekintik mikropórusnak, a bioszén esetében a <2 nm-nél kisebb belső átmérőjű pórusokat mikropórusoknak nevezik, míg a 2-50 nm belső átmérőjű pórusokat mezopórusnak, és a 200 nm-nél nagyobb pórusokat pedig makropórusoknak nevezik. A mikropórusok alkotják a bioszén fajlagos felületét és felelősek a molekulák és vegyületek adszorpciós kapacitásának kialakításáért. A nagyobb mezo-, illetve makropórusoknak a bioszén talajba juttatása során kiemelt szerepük van a talaj vízháztartásában és a mikrobiológiájában. A nagyobb pórusok életteret biztosítanak, ahová a víz, a növényi gyökerek és a gombasejtek is egyaránt behatolnak a mikroorganizmusokkal együtt. Ugyanakkor a pórusok védelmet nyújtanak a mikroorganizmusoknak a nagyobb ragadozó organizmusokkal szemben (Lehmann és mtsai, 2011; Ding és mtsai, 2016).

A porozitás gyakorlatilag meghatározza a bioszén fajlagos felületét, amely alapanyagtól és a pirolízis hőmérsékletétől függően 1,5–500 m<sup>2</sup>/g között változik (Laghari és mtsai, 2016; Chen és mtsai, 2019). A bioszén porozitása a pirolízis hőmérsékletének növelésével szignifikánsan emelkedik, ezzel párhuzamosan pedig a bioszén fajlagos felülete is növekszik, így pedig több kémiai kölcsönhatásban vehet részt a bioszén, grammonként. Lua és mtsai (2004) sikeresen demonstrálták, hogy a pirolízis hőmérsékletének 250°C-ról 500°C-ra történő emelése által a bioszén BET (Brunauer, Emmett és Teller adszorpciós izotermaegyenlet) fajlagos felülete megemelkedett. Mivel a bioszén kation, illetve anion tápanyag megkötő kapacitása nagyban függ a kationcsere (CEC) és az anioncsere (AEC) kapacitásától, a pirolízis hőmérsékletének növelése által fokozatosan emelkedik a bioszén CEC tulajdonsága.

A bioszén felületén nagyszámú funkcionális csoportokat tartalmaz, amelyek legtöbbször oxigén tartalmú, karboxil-, karbonil- vagy hirdoxilcsoportok. A funkcionális csoportok denzitása és száma csökken a pirolízis hőmérséklet növekedésével, amely során az C–O kötések, C–H kötések és O–H kötések felszakadnak, melynek eredményeként az O-tartalmú funkcionális csoportok aránya csökken, míg a bázikus funkciós csoportok aránya megnő (Chen és mtsai, 2019).

A bioszén pH tartománya az alapanyagtól és pirolízis körülményeitől függően a 6,2-től 9,6-ig terjed (átlag pH 8,1). A zöld növényi és fahulladék alapanyagból készült bioszén pH-ja

alacsonyabb, míg az állati trágyán alapuló bioszén pH-ja a legmagasabb szokott lenni (Lehmann, 2007; Chen és mtsai., 2019). A bioszén pH-ját leginkább a pirolízis hőmérséklete befolyásolja. A pirolizálás hőmérsékletének növelésével, nő a végtermék pH-ja, hiszen a szerves anyag volatilizációja során felbomlanak a savas funkciós csoportok (karboxil-, és hirdoxilcsoportok) (Laghari és mtsai, 2016; Chen és mtsai, 2019).

A bioszén elem összetételét tekintve leginkább C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg, Na, Si a fő alkotókomponensek, amelyek közül, több mint 60%-al a C van jelen a legnagyobb arányban, amit a H és O követ. A szerves elemek legtöbb esetben a hamufrakcióban található (Chen és mtsai, 2019). A nitrogén, azonban a hamu frakcióban nincs, vagy csak minimális arányban van jelen, hiszen a szerves anyag oxidációja a nitrogén gáz halmazállapotú vegyületekben távozik. Bagreev és mtsai 2001-ben bemutatták, hogy a szerves nitrogén, amely nagyvalószínűséggel, amin vegyületek formájában van jelen alacsony hőmérsékleten, a bioszén felületének bázikusságának növekedése során a magas pirolízis hőmérséklet tartományban (>600°C) piridin vegyületek kialakulásához vezetett. Ennek köszönhetően a N hozzáférhetősége csökken a bioszénben.

A foszfor mivel mindhárom bioszén-frakcióban megtalálható – a perzisztens frakcióban megkötve, továbbá a mineralizálható és ásványi formában egyaránt – koncentrációja sokkal szélesebb skálán változik, mint a nitrogéné. Átlagosan egy tonna bioszénben 0,2–25 kg között foszfor található (Uzinger és Rékási, 2015). A szennyvíziszap alapanyagú bioszén esetében Bridel és Pritchard (2004) a pirolízis hőmérsékletének növekedésével a végtermékben arányosan megemelkedett foszfor koncentrációt tapasztalták. 100%-a az alapanyag foszfor tartalmának megtalálható volt a bioszénben (míg a N esetében ez az arány csupán 45% volt), azonban a laboratóriumi inkubációs vizsgálatok rávilágítottak, hogy csupán 13%-a volt hozzáférhető a teljes foszfor tartalomnak.

A korábbi irodalmi tapasztalatok alapján a bioszén a talaj K-ellátottságát, közvetlenül a magas K-tartalmának köszönhetően (átlagosan 1-22 kg kálium van egy tonna bioszénben) serkenti. Több tanulmány is bemutatta a bioszén hatására szignifikánsan megemelkedett talaj K-tartalmat, leginkább 10 és 25 t·ha<sup>-1</sup> dózis közötti mennyiség esetében (Jones és mtsai, 2012; Liu és mtsai, 2012). A tapasztalatok alapján a növények számára hasznosítható K koncentrációja a 600°C fok feletti hőmérsékleten történő pirolizálás során folyamatosan csökken.

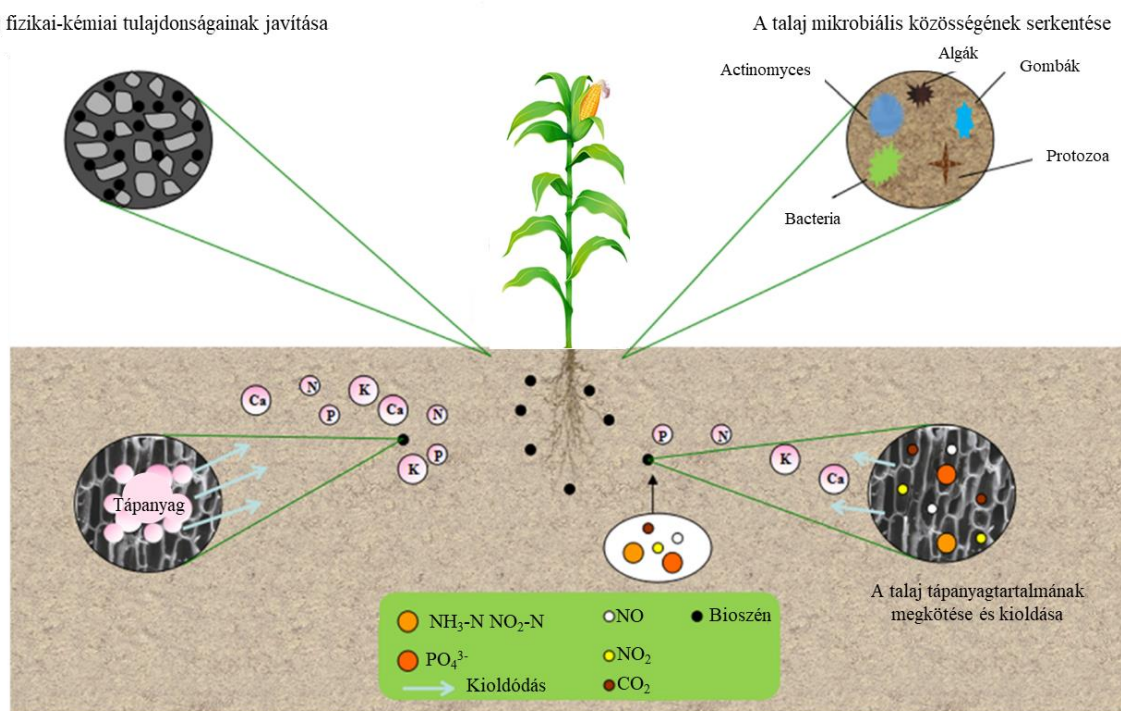
### III.4.3 Bioszén a talajban

A szénraktározási célok mellett, egyre nagyobb érdeklődés övezi a leromlott szerkezetű és kis tápanyagtartalmú talajok bioszén kezelés révén megvalósuló mezőgazdasági termelésbe vonását is (Ding és mtsai, 2016). Többféle folyamat van a növények által hasznosítható tápanyag mennyiségének növekedése mögött a bioszén kezelést követően. A bioszén kezdeti oldható tápanyagtartalma és a mineralizálható szerves kötésben tárolt tápelemek hasznosítása mellett, a savanyú talajok esetében a pH optimalizálásával is összefüggésbe hozható a megnövekedett tápanyag szint (Lehman és mtsai, 2009; Van Zwieten és mtsai, 2010).

A bioszén fizikai-kémiai tulajdonságainak köszönhetően (nagy kation-adszorpciós képességével) csökkenti a talaj tápanyag kimosódását (Liang és mtsai, 2006), mérsékeli az ammonifikáció során képződő  $\text{NH}_3$  volatilizációs és a denitrifikációs folyamatok ( $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) által bekövetkező nitrogén veszteséget (Cauyela és mtsai, 2013), valamint a talajbióta aktivitásának és közösségszerkezetének befolyásolása által elősegíti a talaj tápanyag (N, P, S) megtartását (Pietikäinen és mtsai, 2000; Liang és mtsai, 2006; Liang és mtsai, 2010). Szabadföldi kísérletek során több kutatócsoport is a talajszerkezet javulásával párhuzamosan megnövekedett terméshozamot tapasztalt (Uzoma és mtsai, 2011; Liu és mtsai 2014). Jeffrey és mtsai (2017) arra a következtetésre jutottak a bioszén talajerőpótlóként való használatát vizsgáló tudományos publikációk (111) metaanalízise során, hogy az a tápanyagszegény savanyú talajok esetén használható nagy hatékonysággal. Asai és mtsai (2009), továbbá Crane-Droesch és mtsai (2013) kutatásai ugyanakkor felhívták a figyelmet, hogy a bioszén kezelés hatására egyaránt csökkenhet a termésmennyiség és a növény növekedése. A csökkent termésmennyiség és gátolt növénynövekedés a bioszén nagy mennyiségű illó- és mérgezőanyag- tartalmára vezethető vissza (Ding és mtsai, 2016).

A bioszén talajerőpótlóként történő hasznosítását indokolja: i) a növények számára hozzáférhető N, P, K elem tartalma, ii) továbbá a pirolízis alapanyagától függően különböző mennyiségben előforduló szerves anyag, humin- és fulvosavszerű anyag tartalma (8. ábra). Lin és mtsai (2012) bemutatták, hogy a 380 °C-on akáciából (*Acacia saligna*) és 450 °C-on eukaliptusz fűrészporból (*Eucalyptus pilularis*) készített bioszén humin- és fulvosavszerű anyag tartalma 17,7% és 16,2% volt. A 300 °C-on pirolizált sétányrózsa (*Lantana camara*) alapanyagú bioszén felvehető P (0,64 mg kg<sup>-1</sup>), K (711 mg kg<sup>-1</sup>), Na (1145 mg kg<sup>-1</sup>), Ca (5880 mg kg<sup>-1</sup>), Mg (1010 mg kg<sup>-1</sup>) tartalommal rendelkezett (Masto és mtsai, 2013). Mikrokozmosz kísérletek során a papírgyártási szennyvíziszap hulladék és gabonahéj alapanyagú bioszén a savanyú homoktalajok felvehető K tartalmát 60,4 mg kg<sup>-1</sup>-ről (kontrol) 122 mg kg<sup>-1</sup>-ra (1%

w/w bioszén kezelés), míg a felvehető P tartalmat 89,2 mg kg<sup>-1</sup>-ről (kontrol) 152 mg kg<sup>-1</sup>-ra (1% w/w) emelte (Molnár és mtsai, 2016).



8. ábra. A szakirodalmi adatok alapján a bioszén lehetséges mechanizmusai, melyek a talaj termékenységét növelik (Ding és mtsai, 2016)

A bioszén tápanyagainak felvehetőségét a talaj pH-ja szintén befolyásolhatja. A  $\text{PO}_4^{3-}$  és  $\text{NH}_4^+$  elérhetősége (pH 2–7 között) a talaj pH értékének növelésével párhuzamosan csökkent, míg a bioszén  $\text{K}^+$  elérhetősége nem változott (Zheng és mtsai, 2013). Ugyanitt felhívták továbbá a figyelmet arra, hogy a bioszén talajerőpótlóként való használata során figyelembe kell vennünk a bioszén tápanyag kibocsájtásának időtartamát is. Az olasznádból (*Arundo donax*) készített bioszén esetében az  $\text{NH}_4^+$  kibocsájtás 120 órán belül, míg a  $\text{PO}_4^{3-}$  és  $\text{K}^+$  kibocsájtás 24 óra alatt megtörtént. A mikrobiális C mineralizáció és N immobilizáció szintén befolyásolja (csökkentheti) a bioszén tápanyag kibocsájtását (Zimmerman, 2010).

A bioszén tápelem megkötésének egyik leginkább kutatott szegmense a talajok dinitrogén-oxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) emissziójának csökkenésével kapcsolatos folyamatok felderítése. Jelenleg azon abiotikus folyamatok, amelyek a bioszénrel kezelt talajok  $\text{N}_2\text{O}$  megtartásáért felelnek, összefüggésbe hozhatók a pH-beli változásokkal, a talajok jobb tápanyag, strukturális és adszorpciós kapacitásával. Korábbi kutatások során megfigyelték, hogy a fűzfa, kukorica és fenyőfa alapanyagú, bioszénrel kezelt talajok  $\text{N}_2\text{O}$  emissziója 60–90%-kal, míg NO emissziója 30-90%-kal csökkent (Nelissen és mtsai, 2014). A szerzők feltételezései szerint, a  $\text{N}_2\text{O}$

megtartásával kapcsolatos folyamatok leginkább (i) a nagyobb mértékű NH<sub>3</sub> volatilizációval (ii) biotikus nitrogén immobilizációval és (iii) az NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nem elektrosztatikus adszorpciójával hozhatók összefüggésbe.

A bioszén fizikai-kémiai tulajdonságainak köszönhetően képes a talaj tulajdonságait kedvezően befolyásolni és a termésmennyiséget növelni. A bioszénnek a talaj tulajdonságaira gyakorolt közvetlen hatásai közé tartozik a talaj megnövekedett vízmegtartó képessége (WHC), kationcsere kapacitása (CEC), porozitása és a talaj pH-jának befolyásolása (Jien és Wang, 2013; Wang és mtsai, 2014). Többek között Peake és mtsai. (2014) kimutatták, hogy a bioszén alkalmazásának köszönhetően 22%-kal nőhet meg a talaj vízmegtartó képessége, míg Jien és Wang (2013), hogy a talaj kationcsere kapacitása pedig 7,4-ről 10,8 mgé/100g értékre emelkedhet. Lu és mtsai (2014) a rizshéj alapanyagú bioszén használata során a talaj porozitásának és nyírószilárdságának 20%-os emelkedést tapasztaltak. Molnár és mtsai (2016) 7 hetes mikrokozmosz kísérlet során a savanyú homoktalajok (pH 4,0) pH-jának 0,9 egységnyi emelkedését tapasztalták 1% w/w bioszén kezelés hatására.

A közvetett bioszén hatások közé tartozik a talajaggregátumok stabilitásának erősítése, a gyökeresedés elősegítése, a vízelvezetés és jobb levegőzöttségi tulajdonságok biztosítása. Továbbá a jobb tápanyagmegkötő kapacitás jellemzi a bioszénrel kezelt talajokat, ahogy azt Wang és mtsai, (2014) a K, Ca, Na és Mg esetében is tapasztalták. Mindezek ellenére, nem minden esetben volt megfigyelhető a talaj fizikai-kémiai tulajdonságainak szignifikáns javulása a bioszén kezelés hatására. Nelissen és mtsai (2015) akik a bioszén kezelést követő első évben a talaj jobb fizikai-kémiai tulajdonságait mérték, a második évre a talaj vízvezető képességében, a talaj kémiai paramétereiben (a szerves széntartalom és C : N arány kivételével) és a növények számára felvehető víz mennyiségében sem találtak különbséget a kontrol talajhoz képest. A tapasztalatok rávilágítanak, hogy a bioszénnek a talaj fizikai-kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatása nagymértékben függ az alkalmazási körülményektől és dózistól. Hosszú távú szabadföldi kísérletek sorozatára van szükség ahhoz, hogy biztosabb információnk legyen, hogy hogyan és milyen mértékben lehet a talaj szerkezetét és szerkezetével kapcsolatos tulajdonságait a bioszén használatával befolyásolni.

#### III.4.4 A bioszén mezőgazdasági alkalmazása

Szabadföldi és üvegházi bioszén kísérleteket leíró tudományos publikációk metaanalízise során a bioszén talajoltást követően 13%-os termésnöveléstől (Jeffery és mtsai, 2017) egészen a 30%-os eredményig (Biederman és Harpole, 2013) találunk megfigyeléseket. Ezen



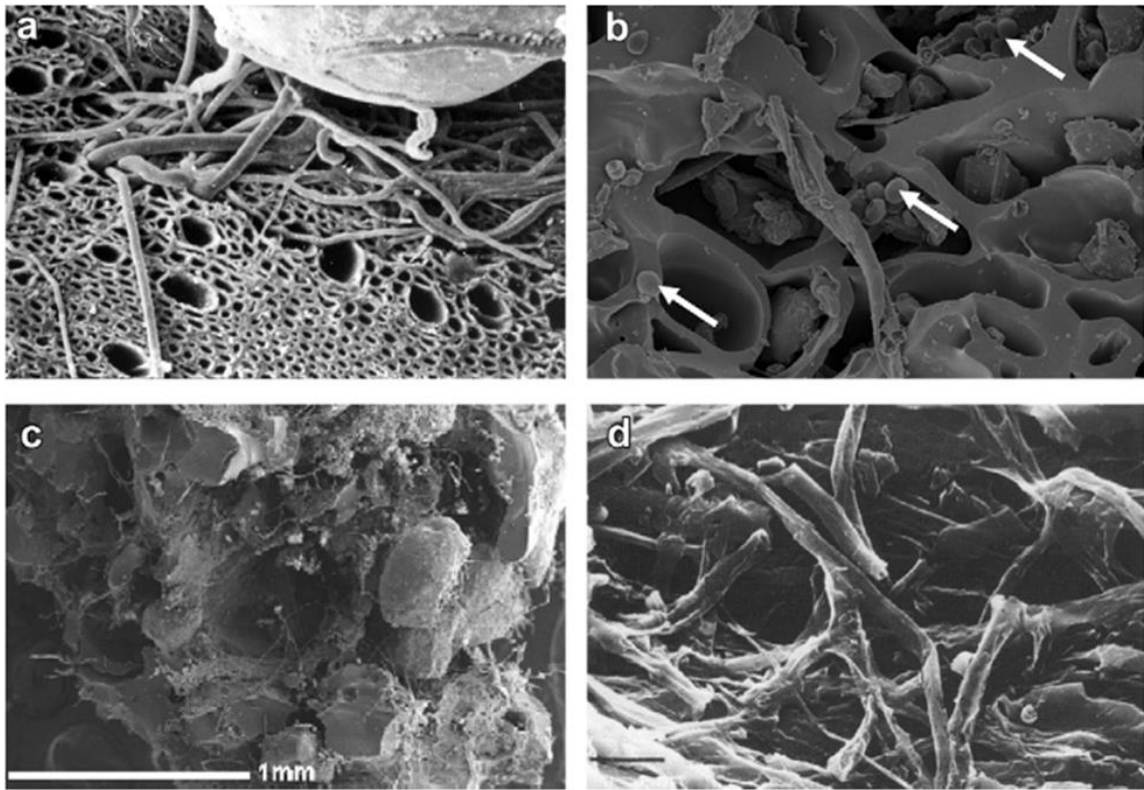
publikációk által nyilvánvalóvá vált, hogy a bioszén eltérő hatással van az egyes növények növekedésére és termésmennyiségére, amelyet a talaj és bioszén egyedi tulajdonságai, az alkalmazott dózis és a növény genotípusa egyaránt meghatároz. A legnagyobb termésmennyiségbeli növekedést olyan savanyú, agyagos vagy homokos talajok esetében tudtak elérni az eddigi szabadföldi kísérleti sorozatokban, melyek alacsony szerves anyag tartalommal és a gyenge vízmegtartó kapacitással rendelkeztek. A jobb termőképességű talajok esetében Jeffery és mtsai (2017) előrevetítették, hogy a bioszén alkalmazásával csökkenthető a műtrágya és meszezés használata és ennek következtében a termesztési költségek feltéve, ha az alkalmazott dózisban és kezelési gyakoriság csökken.

#### III.4.5 Bioszén hatása a talajbiótára

A talajbiótára gyakorolt bioszén hatás felderítése alapvető fontosságú a nagymértékű használatba vonás előtt. A bioszén talajjavító szerként való alkalmazása – mint láttuk – nagyban befolyásolja a talaj fizikai-kémiai paramétereit és szerkezetét, amely tulajdonságok megváltozása szintén hatással van a talaj biológiai közösségeire, a mikrobiális növekedésre. Több korábbi tanulmány is bemutatja a gombák, baktériumok és enzimek bioszén felszínéhez való kötődését. Az 9. ábra pásztázó elektronmikroszkóppal készített felvételén jól látszik, ahogy a gomba hifák behatolnak a bioszén pórusaiba, és a baktérium sejtek pedig megtapadnak a felszínén (Lehmann és mtsai, 2011). Mikroszkópos, kromatográfiás és spektroszkópos vizsgálatok szintén rávilágítottak, hogy a növényi hajszálgökök a bioszén vízzel telt makropórusaiba hatolnak, vagy megtapadnak a felszínen (Joseph és mtsai, 2010). A gyökér által kibocsájtott szerves anyagok egy része megkötődik a bioszénen, így biztosítva ideális mikrokozmoszt további biológiai folyamatok számára. A mikrobiom változásait összességében visszavezethetjük az alábbi folyamatokra: (1) a tápanyag elérhetőség; (2) a növény-mikróba szignalizáció megváltoztatása, továbbá; (3) élőhely és védelem biztosítása a mikrobiális patogénekkal szemben (Ding és mtsai, 2016).

A bioszén felszínén elérhető nagyobb tápanyag- és azon belül hasznosítható szervesanyag-tartalom, továbbá a jobb levegőztetési és vízgazdálkodási tulajdonságainak köszönhetően számos kutatás a „mikrobiális abundancia” növekedéséről számol be bioszén kezelést követően (9. ábra). Domene és mtsai (2014) a kontrol talaj mikrobiális biomasszájának C-tartalmának (MBC) 366,1  $\mu\text{g C g}^{-1}$ -ről 730,5  $\mu\text{g C g}^{-1}$ -ra emelkedését tapasztalták, a bioszén kezelést követően. A talaj pH befolyásolása által is hatással van a bioszén a „mikrobiális abundanciára”, ahogy azt Demisie és Zhang (2015) is megfigyelték, miszerint a talaj pH értékének

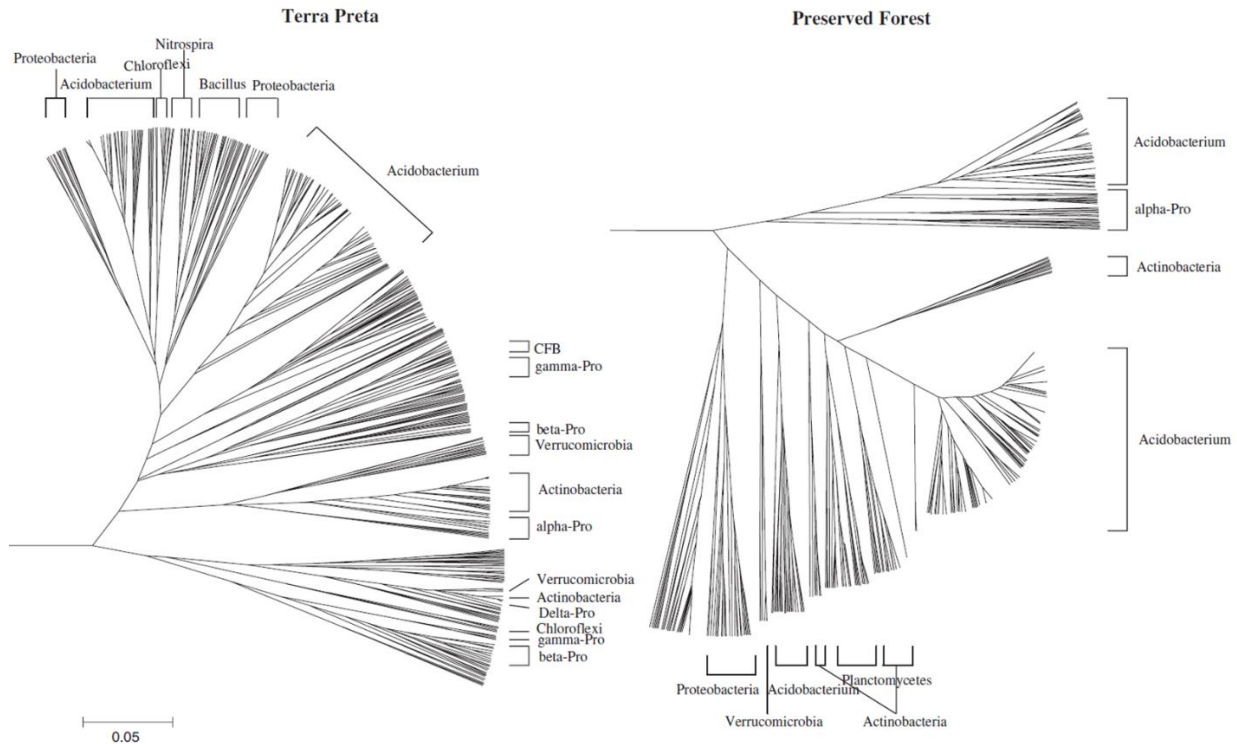
emelkedésével párhuzamosan nőtt a mikrobiális biomassza mennyisége. Továbbá Rousk és mtsai (2010) bemutatták, hogy a bioszén kezelés hatására a pH 7-re emelkedett talajban a bakteriális biomassza gyarapodott, ugyanakkor a gomba biomassza értékekben nem volt változás megfigyelhető.



9.ábra Különböző korú és eredetű bioszenek mikrobiális kolonizációja. Jelölések: a) a talajba frissen kijuttatott bioszén gomba hifával történő kolonizációja; b) frissen a talajba juttatott kukorica alapanyagú bioszén felszínén megtapadt baktériumok (nyilak); c) 100 éves erdőtűzbe keletkezett elszenesedett struktúra *Haplorthod* talajból izolálva; d) 350 éves erdőtűzben képződött szén a boreális régióban (Lehmann és mtsai, 2011)

A bioszén kezelés hatására a mikrobiális közösségen belüli szignifikáns változásokat figyeltek meg. A mikrobiális diverzitás növekedése és csökkenése egyaránt általános tapasztalat a bioszén használatát követően (Prayogo és mtsai, 2014). Többek között a bioszénrel kezelt és a fekete földek – Terra preta – esetében is 25%-kal nagyobb bakteriális diverzitást tapasztaltak a kontrol talajokhoz képest, mind tenyésztéstől független (10. ábra, Kim és mtsai, 2007), mind a tenyésztéses eljárások segítségével (O'Neill és mtsai, 2009). Mindezek mellett a kontrol talajhoz képest kisebb ősbaktérium és gomba diverzitást figyeltek meg a Terra preta és a bioszénrel kezelt talajok esetében. Nelissen és mtsai, (2014) hasonlóan több korábbi

tanulmányhoz, arra a következtetésre jutottak, hogy a bioszén kezelés összefüggésbe hozható az egyes bakteriális taxon csoportokban bekövetkező változásokkal.



10. ábra. A terra preta és egy szomszédos érintetlen terület taxonómiai klaszterelemzése 16S rRNS gén szekvencián alapuló taxonómiai klaszterelemzése (Kim és mtsai, 2007).

A bioszén alkalmazása a mikrobiális aktivitással összefüggésbe hozható talaj enzim aktivitást is befolyásolja. Park és mtsai (2011) a csirke trágya alapanyagú bioszénrel kezelt talajok dehidrogenáz aktivitásának 6,21 mg TPF (trifenil-formazán)  $\text{kg}^{-1}$   $24\text{h}^{-1}$  értékkel való emelkedését tapasztalták, míg Paz-Ferreiro és mtsai (2012) a szennyvíziszap alapanyagú bioszén hatására a kontrol talajhoz képest 70,8%-kal megnőtt foszfomonoészteráz aktivitást detektáltak. Harter és mtsai 2014-ben a nitrogén ciklusban szerepet játszó gének arányát és expresszióját vizsgálták 10 % (w/w) bioszén kezelés hatására, és arra a következtetésre jutottak, hogy a megváltozott mikrobiális aktivitás a  $\text{N}_2\text{O}$  esetében igen nagy jelentőséggel bír, hiszen a dinitrogén-oxid reductáz transzkript szám szignifikánsan megemelkedett.

A bioszén használata serkentheti és gátolhatja is egy-egy talaj tápanyagciklus-elemeit, mint például a denitrifikációt és a metán oxidációt (Van Zwieten és mtsai, 2009), vagy a tápanyagok transzformációját (Deluca és mtsai, 2009). A bioszén mineralizációja és oxidációja a mikrobiális közösség különböző funkciókat betöltő csoportok arányának megváltozásával hozható összefüggésbe. Többek között a bioszén kezelés serkentheti a mikrobiális

tápanyagciklust, mint ahogy Ball és mtsai (2010) is megnövekedett nitrifikációs aktivitást tapasztaltak az erdőtalajok esetében. Bailey és mtsai (2011) a bioszén használatával párhuzamosan megemelkedett alkalikus foszfatáz, aminopeptidáz és N-acetilglükózaminidáz aktivitást tapasztaltak. Anderson és mtsai (2011) tapasztalat szerint, azon baktérium családok (*Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*) amelyek a N<sub>2</sub>-t, és NO<sub>3</sub>-ot fel tudják használni nitrogén fixációs és denitrifikációs folyamataikban a bioszén kezelés hatására megemelkedik a közösségen belüli aránya.

### III.4.6 A bioszén oltóanyag hordozóként való használata

A nagy porozitással rendelkező bioszén, ahogy azt már korábban is megismertük a mikróbák számára hatékony életteret biztosít, hiszen a bioszén felületi pórusaiban élő baktériumok nagyobb védelemmel rendelkeznek a kiszáradással, a szélsőséges pH viszonyokkal, a predációval és a megemelkedett toxikus elem koncentrációval szemben (Saranya és mtsai, 2011; Chen és mtsai, 2013; Głodowska és mtsai, 2017). Ennek megfelelően már több esetben is felhasználták, mint oltóanyag-hordozó (1. táblázat).

1. táblázat. Bioszén mint PGPR oltóanyag hordozóként való korábbi használata

<b>PGPR</b>	<b>Növény</b>	<b>Bioszén</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pseudomonas putida</i>	Kukorica ( <i>Zea mays</i> )	Fenyőfából	Sun és mtsai, 2016
<i>Enterobacter cloacae</i>	Uborka ( <i>Cucumis sativus</i> )	Fenyőfából	Hale és mtsai, 2015
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Szójabab ( <i>Glycine max</i> )	Kemény fából	Głodowska és mtsai, 2017
<i>Pseudomonas libanensis</i>	Kukorica ( <i>Zea mays</i> )	Kemény fából	Głodowska és mtsai, 2016
<i>Azospirillum</i> sp.	Kukorica ( <i>Zea mays</i> )	Kókuszshéj	Saranya és mtsai, 2011
<i>Rhizobium</i> sp.	Bab ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Rizsszalma	Gazi, 2017

A kezdeti tapasztalatok már utaltak a bioszén hatékony talajoltóanyagként való használatára, többek között a csicseriborsóval szimbiózisban élő *Rhizobium* nemzetség talajon belüli aránya jóval magasabb volt a bioszénrel kezelt talajon belül, mint a kontrol talajban (Beck, 1991). Głodowska és mtsai 2017-ban szignifikáns összefüggést találtak a bioszén fizikai tulajdonságai (porozitás, adszorpciós kapacitás) és a *Bradyrhizobium japonicum* túlélése között. Hale és mtsai (2015) korábban *Enterobacter cloacae* UW5 túlélését vizsgálták több fajta bioszén és hagyományos oltóanyag hordozókon egyaránt (pl: vermikulit). Eredményeik

értelmében a legmagasabb 600 °C-on előállított bioszénen volt a legmagasabb törzs túlélése. A doktori munkám során kísérletbe vont *Azospirillum* nemzetséggel kapcsolatban Saranya és mtsai 2011-ben a bioszén kezelés hatására szignifikánsan megnövekedett arányát figyelték meg a nemzetségnek, míg az *Azospirillum lipoferum* esetében kókuszshéj alapananyagú bioszénen tapasztalták a legmagasabb túlélési rátáját. Az eddigi eredmények alapján, általános tapasztalatként elmondható, hogy a bioszén oltóanyag-hordozóként való alkalmazása ígéretes, amelynek hatékonysága az alapananyagtól, a pirolízis hőmérsékletétől, és bioszén szemcseméretétől függ nagymértékben (Egamberdieva és mtsai 2018).

## IV. CÉLKITŰZÉSEK

Az Irodalmi áttekintésben összefoglaltak alapján világossá vált, hogy a PGPR talajoltó készítmények a szezonálitástól független termésbiztonság elérésének hatékony és fenntartható eszközei. Ahhoz azonban, hogy a PGPR fajok aránya a talajban tartósan megemelkedjen, többszöri talajoltásra van szükség. Annak érdekében, hogy a PGPR fajok általi talajoltás minél hatékonyabb legyen, kiemelt fontosságú a legmegfelelőbb hordozóanyag kiválasztása, amely képes garantálni a tárolás során a túlélést, a hatékony gyökérkolonizációt és a baktériumok folyamatos védelmét. A megújuló erőforráson alapuló bioszén, amellyel, hogy a leromlott szerkezetű és kis tápanyagtartalmú talajok mezőgazdasági termelésbe vonását segíti, fizikai-kémiai tulajdonságai predesztinálják sikeres oltóanyag-hordozóként való felhasználását is.

Ennek megfelelően céljaink a szabadföldi kísérletsorozat során az alábbiak voltak:

- Célunk volt egy olyan molekuláris modellrendszer felállítása, amely lehetővé teszi a kijutatott PGPR szervezetek *in situ* szabadföldi nyomon követését és közösségen belüli relatív gyakoriságának meghatározását.
- Célunk volt, hogy a bioszén bakteriális oltóanyag hordozóként való használatát megvizsgáljuk, a bioszénre vitt PGPR fajok közösségen belüli arányának változása az oltást követő egy tenészedőn belül a kukorica rizoszférájában.
- A savanyú és meszes homoktalajokon a bioszén és a PGPR oltóanyag közös használatának hatását felderítsük a kukorica rizoszférájának mikrobiális közösségszerkezetére, a növény teljes fenofázisa során.
- A bioszén általi tartós szerves anyag pótlás hatásának vizsgálata 2 év távlatából savanyú homok, illetve meszes homoktalajokon egyaránt. A két különböző szerkezetű és kémhatású talaj baktérium közösségszerkezetében lévő különbségek feltárása álat.

## V. ANYAG ÉS MÓDSZER

### V.1 A kísérletbe vont területek jellemzése

A szabadföldi kísérletsorozat az Agrártudományi Kutatóközpont Talajtani Intézetének őrbottyáni és nyírlugosi kísérleti telepehelyein valósult meg. Az őrbottyáni (é. sz. 47° 40', k. h. 19° 14') karbonátos homoktalaj, amely a World Reference Base of Soil Resources (WRB) (IUSS Working Group WRB, 2014) szerint Mollic Umbrisol (Arenic) talajként van osztályozva, az 5-10 méteres talajvízszint mélység mellett mérsékelt heterogenitást mutat a szervesanyag- (0,6 és 1,3% között) és CaCO<sub>3</sub>-tartalom tekintetében (0,1 és 9,0% között). A nyírlugosi (é. sz. 47° 43', k. h. 22° 00') savanyú homoktalaj (WRB alapján Lamellic Arenosol) 3-6 méteres talajvízszint mélységgel és 20-25 cm-es humuszos réteggel rendelkezik. Mindkét kísérleti terület, mérsékelt éghajlati övezetbe tartozik és hajlamos az aszályra. Az egyes talajok fizikai és kémiai tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza, a felhasznált bioszén függvényében.

2. táblázat. A kísérletbe vont talajok és bioszén fizikai és kémiai tulajdonságai.

	Karbonátos homokos talaj Őrbottyán Mollic Umbrisol (Arenic)	Savanyú homokos talaj Nyírlugos (Lamellic Arenosol)	Gabonahéj és papírgyártási szennyvíziszap alapanyagú bioszén
A talajok			
szemcseösszetétele- Homok:	81:13:6	85:10:5	–
Vályog: Agyag (%)			
pH (H <sub>2</sub> O)	7,9	4,4	10,4
CEC meq/100g	9,05	1,48	9,64
Szervesanyag %	1,0	0,6	27,5
CaCO 3%	2	0	10,7
összes N (m/m%)	0,06	0,04	0,848
összes P (mg kg <sup>-1</sup> )	545	260	5976
összes K (mg kg <sup>-1</sup> )	2152	1193	10547
NH <sub>4</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	8,36	22,1	2,30
NO <sub>3</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	8,32	22,4	36,8
AL-oldható P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	158	68,9	2852
AL-oldható K <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )	43,2	36,1	8598

A 2015-ös évben a szabadföldi kísérlet időtartama alatt (április–szeptember) a csapadék mennyiség 275 mm volt Nyírlugoson és 215 mm Őrbottyánban, amely így jelentősen elmaradt

az elmúlt 50 év azonos időszakának átlagától (Nyírlugos 362 mm és Órbottyán 317 mm) és a kukorica optimális (400 mm) vízellátottságától vályogtalajon. Annak érdekében, hogy a nyírlugosi területen a kukorica túlélhesse az aszályt 2015 júliusában 50 mm kiegészítő öntözést kapott.

## V.2 A felhasznált bioszén kiválasztása és jellemzése

A szabadföldi kísérletsorozatban felhasznált bioszén, 14 különböző alapanyagú és eredetű bioszén közül került kiválasztásra. A szelektálás először egy multikritériumos pontrendszeren alapuló technológiai és környezeti hatékonyság vizsgálatot (European Biochar Certificate, International Biochar Initiative és 36/2006. (V.18.) FVM rendelet szerint), illetve egy 2 hetes és 1 éves időtartamot átfedő mikrokozmosz kísérletet foglalt magába. A mikrokozmosz kísérletsorozat kiterjedt a különböző bioszén alapanyagok a talaj fizikai-kémiai tulajdonságaira, a biológiai aktivitásra és az esetleges toxikus hatásoknak a felderítésére is. A Budapesti Műszaki Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékének kutatói által végzett kísérletsorozat eredményeként a karbonátos (Órbottyán) és savanyú (Nyírlugos) homokos talajokra egyaránt a gabonahéj és papírgyártási szennyvíziszap alapanyagú bioszénen találtak legalkalmasabbnak (Molnár és mtsai, 2016). A gabonahéj és papírgyártási szennyvíziszap alapanyagú bioszén fizikai és kémiai paramétereit a 2. táblázat tartalmazza.

Az ausztriai Sonnenerde GmbH vállalat által forgalmazott bioszén gyártása az alapanyag optimalizálásával kezdődik, amely során a gabonahéj és papírgyártási szennyvíziszap szárazanyagtartalmát a kezdeti átlagos 20%-ról 70%-ra növelik, továbbá biztosítják a homogén <15 mm szemcseméretét (Shackley és mtsai, 2016). A pirolizálás során az alapanyag szervesanyagainak termokémiai 450–500 °C között 20 percig tartó bontása a PYREG® 500-as típusú készülékben valósult meg. A folyamat eredményeként az elszenesített végtermék tulajdonságait az 1. táblázat foglalja össze. A bioszénben potenciálisan fellelhető toxikus elemek koncentrációi a magyar határértékek alatt maradtak (36/2006. (V. 18.) FVM rendelet). A bioszén PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon – policiklusos aromás szénhidrogén) tartalma 1,68 mg kg<sup>-1</sup>, TPH (Total Petroleum Hydrocarbon – kőolajszármazék) tartalma 28 mg kg<sup>-1</sup> volt (CEN/TS 16181:2013) és 60%-ának részecske mérete kisebb volt, mint 2 mm. A felhasznált bioszén az alapanyag, a gyártási technológia és végtermék fizikai kémiai tulajdonságait figyelembe véve megkapta a EBF (European Biochar Foundation) „prémium” minősítését (European Biochar Foundation, 2019).



### V.3 Az oltásra használt PGPR törzsek kiválasztása és jellemzése

A savanyú és a karbonátos homoktalajokra adaptált kereskedelmi forgalomban nem kapható PGPR oltóanyagokat a Biofil Kft. állította elő a WO 2015118516 szabadalmi szabvány szerint (Kutasi és mtsai, 2015). Magyarország természetes homoktalajaiból izolált baktérium törzsek a növényi (kukorica) növekedés serkentő, illetve esetleges szinergisztikus [például a foszfát szolubilizáló *Arthrobacter crystallopoietes* aktivitása által a megnövekedett biológiailag hozzáférhető foszfor mennyisége kedvező hatással van az *Azospirillum brasilense* légköri nitrogén fixációra (Kovács és mtsai., 2015)] tulajdonságaik szerint kerültek szelektálásra bioszén (gabonahéj és papírgyártási szennyvíziszap) jelenlétében. A kísérletbe von baktérium törzsek növényi növekedést serkentő tulajdonságait 3. táblázat tartalmazza.

Az oltásra használt baktérium törzsek hordozó anyaga a hagyományos oltóanyag-hordozó (alappor) esetében perlit, zeolit és diatomaföld 1:0,6:0,9 arányú keveréke volt Vivapur® 101 mikrokristályos cellulóz adalékanyaggal (B kezelés). A bioszén felszínén immobilizált baktérium törzsek esetében (C kezelés) az 500 ml baktériumtenyésztettel és 225 ml 50% szorbit, laktóz és trehalóz 4:4:1 arányú keverékét tartalmazó elegyet nedvesen 1:1 arányban keverték össze a korábban sterilizált (121°C-on 2 órán át) bioszénnel, így a PGPR törzseket tartalmazó elegy bevonta a bioszén szemcséket (Kutasi és mtsai, 2015). A savanyú, és karbonátos talajra használt bakteriális oltóanyagok összetételét, a WO 2015/118516 szabadalmi leirat szerint a 4-es és 5-ös táblázat tartalmazza.

3. táblázat. A talajoltásra használt PGPR törzsek stressztűrő képessége és detektált növény növekedést serkentő hatása a WO 2015118516 szabadalmi szabvány szerint (Kutasi és mtsai, 2015).

PGPR törzsek	Törzsek stressztűrő képessége	Növényi növekedést serkentő hatás
<i>Azospirillum brasilense</i> NF7 NCAIM (P) B 001433	savanyú pH (3-6,9) és normál (pH 7,0-7,5) körülmények közötti növekedés só stressztűrő (5-8% NaCl)	nitrogén fixálás IAA termelés
<i>Azospirillum brasilense</i> NF 11 NCAIM (P) B 001428	lúgos pH (7,6-8) körülmények közötti növekedés só stressz érzékeny (1-2% NaCl)	nitrogén fixálás indol-3-ecetsav termelés
<i>Azospirillum brasilense</i> 242/9 NCAIM (P) B 001403	normál pH (7,0-7,5) körülmények közötti növekedés só stressz érzékeny (1-2% NaCl)	nitrogén fixálás IAA termelés
<i>Azospirillum irakense</i> NF6 NCAIM (P) B 001425	normál pH (7,0-7,5) körülmények közötti növekedés só stressztűrő (5-8% NaCl)	nitrogén fixálás
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> S 153 NCAIM (P) B 001424	lúgos pH (7,6-8) körülmények közötti növekedés só stressz érzékeny (1-2% NaCl)	IAA termelés foszfát-szolubilizáló sziderofór termelés szinergesztikus hatás <i>Azospirillum</i> törzsek légköri nitrogén fixációja során
<i>Bacillus aryabhattai</i> LU44 NCAIM (P) B 001423	savanyú pH (3-6,9), normál (pH 7,0-7,5) és lúgos (pH 7,6-8,0) körülmények közötti növekedés só stressztűrő (5-8% NaCl)	IAA termelés foszfát-szolubilizáló
<i>Bacillus megaterium</i> ES232 NCAIM (P) B 001291	lúgos (pH 7,6-8,0) körülmények közötti növekedés só stressztűrő (5-8% NaCl)	IAA termelés foszfát-szolubilizáló
<i>Kocuria rosea</i> S 225 NCAIM (P) B 001426	savanyú pH (3-6,9), normál (pH 7,0-7,5) és lúgos (pH 7,6-8,0) körülmények közötti növekedés só stressz érzékeny (1-2% NaCl)	IAA termelés exopoliszacharid (EPS) termelés foszfát-szolubilizáció
<i>Paenibacillus peoriae</i> S 284 NCAIM (P) B 001430	savanyú pH (3-6,9) só stressz érzékeny (1-2% NaCl)	sziderofór termelés EPS termelés
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 13/4 B NCAIM (P) B 001370	lúgos (pH 7,6-8,0) körülmények közötti növekedés só stressz érzékeny (1-2% NaCl)	IAA termelés sziderofór termelés exopoliszacharid (EPS) termelés

4. táblázat. A savanyú talajra kijuttatott bakteriális oltóanyag összetétele. Jelölés: TKE: telepképző egység

Savanyú talajra adaptált bakteriális oltóanyag	Oltóanyag-hordozó	
	Hagyományos por*	Bioszén
	TKE g <sup>-1</sup>	TKE g <sup>-1</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> NF7 NCAIM (P) B 001433	4,2×10 <sup>6</sup>	3,6×10 <sup>6</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> 242/9 NCAIM (P) B 001403	1,32×10 <sup>8</sup>	6,6×10 <sup>7</sup>
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> S 153 NCAIM (P) B 001424	2×10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>Paenibacillus peoriae</i> S 284 NCAIM (P) B 001430	2,4×10 <sup>6</sup>	2,2×10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus aryabhatai</i> LU44 NCAIM (P) B 001423	3,4×10 <sup>7</sup>	1,7×10 <sup>7</sup>

5. táblázat. A lúgos talajra kijuttatott bakteriális oltóanyag összetétele. Jelölés: TKE: telepképző egység

Karbonátos (lúgos) talajra adaptált bakteriális oltóanyag	Oltóanyag-hordozó	
	Hagyományos por*	Bioszén
	TKE g <sup>-1</sup>	TKE g <sup>-1</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> NF 11 NCAIM (P) B 001428	4,8×10 <sup>7</sup>	2,4×10 <sup>7</sup>
<i>Azospirillum irakense</i> NF6 NCAIM (P) B 001425	1,4×10 <sup>8</sup>	7×10 <sup>7</sup>
<i>Kocuria rosea</i> S 225 NCAIM (P) B 001426	4×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus megaterium</i> ES232 NCAIM (P) B 001291	5,4×10 <sup>7</sup>	2,7×10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 13/4 B NCAIM (P) B 001370	5,8×10 <sup>7</sup>	2,9×10 <sup>7</sup>

A kísérlet beállítása mindkét terület esetében megegyezett. A véletlenszerű blokk elrendezésben kialakításra kerülő elrendezés az alábbi kezeléseket tartalmazta: csak bioszén (A), bioszén + hagyományos por oltóanyag-hordozó (B), bioszén mint oltóanyag hordozó (C, por oltóanyag-hordozó nélkül). A három kezelés három különböző dózisban került alkalmazásra (3, 15 és 30 t ha<sup>-1</sup>), a nem kezelt kontrol talajok mellett. Ennek megfelelően a minták jelölési rendszere aszerint épül fel, hogy a különböző kezelések betűvel (A, B, C a savanyú talaj és D, E, F lúgos talaj esetében) az eltérő kezelési dózisok pedig számmal kerülnek jelölésre (1, 2, 3, 4) (6. táblázat).

A kísérleti terület mérete 4m × 5m (1 parcella 1 m széles és 5 m hosszú) volt, a parcellák szélén körben 1 m-es szegéllyel, így a bruttó parcella 6 m<sup>2</sup> (2×3 m) területű volt. A 4 ismétlés, 3 kezeléssel 4 dózissal 48 parcellát eredményezett mindkét helyen. 11 parcella műtrágyázása a Pro Planta szaktanácsadási rendszer által javasolt NPK ásványi műtrágya dózisának felével történt (savanyú homokon: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 225 kg ha<sup>-1</sup>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> + CaSO<sub>4</sub>: 120 kg

ha<sup>-1</sup>, KCl: 75 kg ha<sup>-1</sup>; karbonátos meszes homokon: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 200 kg ha<sup>-1</sup>, KCl: 80 kg ha<sup>-1</sup>). Abszolút kontrol talajként maradt meg az A1 jelzésű parcella, amely esetében semmilyen kezelés nem került alkalmazásra (NPK műtrágya, bioszén és bakteriális oltóanyag) (6. táblázat).

6. táblázat. A savanyú és karbonátos homokos talajon alkalmazott PGPR, bioszén (BC) és NPK ásványi műtrágya kezelések. A bioszén (BC t 1 ha<sup>-1</sup>) a bakteriális inokulum (TKE ha<sup>-1</sup>) és az NPK kezelések jelölve vannak.

Kezelés	Kezelési szint			
	1	2	3	4
<i>Savanyú homok (Nyírlugos)</i>				
Bioszén (A)	Abszolút kontrol (A1)	3 BC + NPK (A2)	15 BC + NPK (A3)	30 BC + NPK (A4)
	Bioszén + hagyományos por oltóanyag (B)	Kontrol + NPK (B1)	3 BC + 4 × 10 <sup>10</sup> + NPK (B2)	15 BC + 2 × 10 <sup>11</sup> + NPK (B3)
Bioszén mint oltóanyag hordozó (C)	Kontrol + NPK (C1)	3 BC + 1 × 10 <sup>12</sup> + NPK (C2)	15 BC + 5 × 10 <sup>12</sup> + NPK (C3)	30 BC + 1 × 10 <sup>13</sup> + NPK (C4)
<i>Karbonátos homok (Órbottyán)</i>				
Bioszén (D)	Abszolút kontrol (D1)	3 BC + NPK (D2)	15 BC + NPK (D3)	30 BC + NPK (D4)
	Bioszén + hagyományos por oltóanyag (E)	Kontrol + NPK (E1)	3 BC + 1,7 × 10 <sup>11</sup> + NPK (E2)	15 BC + 8,5 × 10 <sup>11</sup> + NPK (E3)
Bioszén mint oltóanyag hordozó (F)	Kontrol + NPK (F1)	3 BC + 1 × 10 <sup>12</sup> + NPK (F2)	15 BC + 5 × 10 <sup>12</sup> + NPK (F3)	30 BC + 1 × 10 <sup>13</sup> + NPK (F4)

A szabadföldi kísérlet sorozatban, mindkét talaj esetében az Mv 277 fajtájú (Marton Genetics, Magyarországi) kukorica (*Zea mays*) került felhasználásra. Az FAO 200-as (130-140 nap) tenyészidő szerinti csoportba tartozó kukorica fajta virágzási ideje 2 nappal elmarad a csoport standardjától. A kukorica vetése 2015 április 28-án történt, amelyet közvetlenül előzött meg az alkalmazott talajerőpótlók (bioszén, oltóanyag, műtrágya) 0-25 cm-es

talajrétegbe forgatása. Május végén (30 nap távlatból) Jumbo Turbo (BASF, Németország, amely szulfonil-urea, benzotiadiazinonok, benzoészav-származék hatóanyagcsoportú) növényvédőszer került felhasználásra  $4 \text{ L ha}^{-1}$  mennyiségben, az egy- és kétszikű gyomnövények ellen.

Az egyes kezelések hatásának értékelését Rékási és mtsai (2018) végezték a kukorica növény földfeltetti vegetatív biomasszájának (szár és levél), illetve a szemtermés mennyiségére vonatkoztatva. A vizsgálat során minden egyes parcella esetében 10 darab véletlenszerűen kiválasztott növény csőszáma, csövekenti szemtermése, szár és levél tömege lett lemérve betakarításkor (a vetéstől számított 149-ik napon).

A 2016 és 2017-es évben az egyes területeken nem történt további talajoltás sem bioszénnel sem pedig PGPR oltóanyaggal. A kísérleti területen ugyanazt az Mv 277 fajtájú kukoricát vetették, ugyanazon növényvédőszer (Jumbo Turbo) használata mellett. Ezekben az időszakokban a növények vegetatív biomasszájának értékelése nem történt meg.

### V.3.1 Mintavételezés

A mintavételi ütemterv igazodott a kukorica fenofázisához, ennek megfelelően a vetést (0) követően történt mintavétel, a kukorica vegetatív 4 – 6 leveles állapotában (I; 29-ik nap vetést követően), a reprodukív R1– bibekitolás (II; 98-ik nap) és az R6 –fiziológiai érettség állapotában egyaránt megvalósult. Annak érdekében, hogy az alkalmazott kezelések hosszútávú hatásait is vizsgálni tudjuk a talaj bakteriális szerkezetére 30 hónappal a kezelés után is történt mintavétel (IV).

A rizoszféra talajminták az MSZ-08-0202:1977 (Helyszíni mintavétel mezőgazdasági célú talajvizsgálatokhoz) szabványnak megfelelően minden egyes parcella 0–25 cm-es rétegből lettek gyűjtve. A szűrőbotos Pürckhauer-féle talajmintavevő segítségével minden egyes területről véletlenszerűen 9 talajmintát gyűjtöttünk átlósan 0,75 m szélesség és 1 m hossz távolság betartásával az egyes mintavételi pontok között. A kukorica későbbi fenológiai fázisai (R1– bibekitolás és az R6 –fiziológiai érettség) során gyűjtött talajminták a növény 5 cm-es körzetéből lettek véve. A parcellánként gyűjtött 9 talajmintát egyesítettük. Ezt követően a 4 ismétlésből származó egyesített talajmintákat szintén összekevertük létrehozva egyetlen kompozit talajmintát. A növényi maradványok (levelek, gyökerek) és az esetleges kavics darabok eltávolítása után, az egyenként hozzávetőleg 100g kompozit talajminta  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lett a laboratóriumba szállítva. A laboratóriumban a minták feldolgozásáig a mélyhűtő tárolóban  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kerültek raktározásra.

A 6. táblázathoz igazodva az 2015-ös minták jelölései a későbbiekben az alábbiak szerint történik: római számmal kezdődik a mintavétel időpontja (0, I, II, III, IV), melyet a kezelés típusa (A, B, C, D, E, F) és alkalmazott dózis (1, 2, 3, 4) jelölése követ. Ennek megfelelően például az IA4 jelölés a kukorica vegetatív 4 – 6 leveles állapotában (I) bioszénrel (A) a legnagyobb  $30 \text{ t ha}^{-1}$  (4) dózisban kezelt talajmintára vonatkozik.

#### **V.4 Fizikai és kémiai vizsgálatok**

A talajok, illetve a bioszén fizikai-kémia vizsgálatait az Agrártudományi Kutatóközpont Talajtani Intézetének a Talajkémiai és Anyagforgalmi Osztályának munkatársai végezték. A bioszén és talajminták esetében ugyanazon módszerek kerültek felhasználásra. A talaj pH az MSZ-08-0206/2:1978 szabvány szerint 1:2.5 talaj:1 M KCl és 1:2.5 talaj:víz szuszpenziók 12 órán át történő rázatása után került meghatározásra. Módosított Walkey-Black módszer (MSZ-08-0452:1980) által került meghatározásra a talaj szervesanyag tartalma. A talajok kationcserélő kapacitása a módosított Mehlich-eljárással került meghatározásra (MSZ-08-0215:1978). A talajok könnyen oldható (növények által felvehető) kálium, illetve foszfor koncentrációja hagyományos ammónium-laktát-ecetsav (AL) kivonatban került meghatározásra (AL-oldható  $\text{P}_2\text{O}_5$  és AL-oldható  $\text{K}_2\text{O}$   $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Egnér és mtsai, 1960). A talajok összes nitrogén tartalma a Kjeldahl módszer segítségével került meghatározásra (ISO 11261:1995). Az ammónium-nitrogén ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) és a nitrát-nitrogén ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) koncentrációját az MSZ 20135:1999 szabványos módszer által határozták meg. A talajok  $\text{CaCO}_3$  tartalmának meghatározása a Scheibler-féle gázvolumetriás módszerrel (MSZ-08-0206/2:1978) történt.

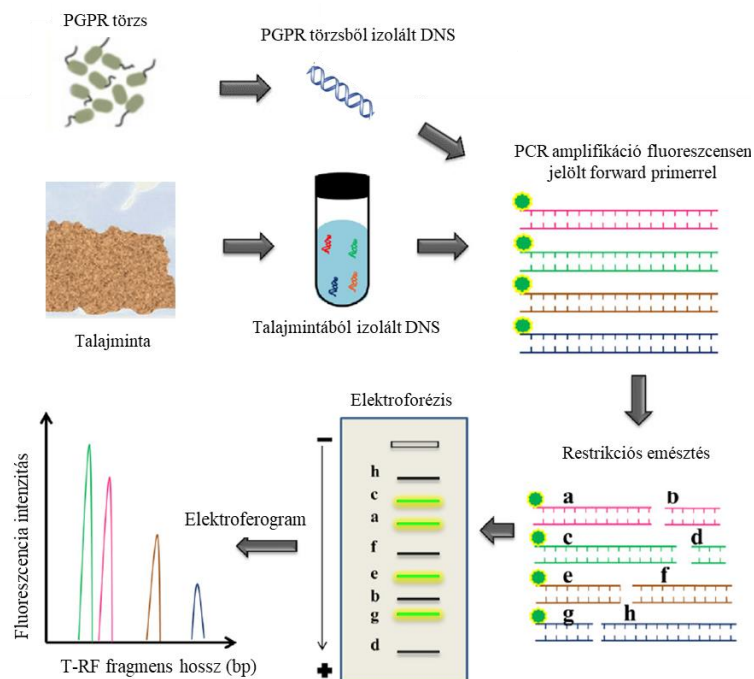
#### **V.5 A PGPR törzsek nyomon követésére szolgáló *in silico* modellrendszer felállítása**

##### **V.5.1 Terminális Restrikciós Fragmens hossz Polimorfizmus (T-RFLP)**

A talajoltásra használt PGPR törzsek elkülönítésére, illetve a talajoltást követően az oltó kultúrák fajszerű nyomon követésére a terminális restrikciós fragmens hossz polimorfizmus molekuláris ujjlenyomat módszert (T-RFLP) választottuk. A T-RFLP eljárás széles körben elterjedt a mikrobiális közösségek diverzitásának és szerkezetének vizsgálata során (Liu és mtsai, 1997). A módszert korábban sikeresen alkalmazták a talajoltóként használt *Actinobacteria* endofita elkülönítésére és nyomon követésére (Conn és Franco, 2004), illetve biokontrol *phlD+* *Pseudomonas* szervezetek detektálására és elkülönítésére (von Felten és mtsai, 2011). A nagy érzékenységű szemikvantitatív diverzitásbecslő módszer, gyors

tenyésztéstől független vizsgálatát biztosítja a mikrobiális közösségeknek (Dickie és Fitzjohn, 2007). Ennek értelmében a rendelkezésünkre álló molekuláris módszerek közül a szabadföldi kísérleti beállítás nagy mintaszámának tükrében, a T-RFLP módszer volt az amelyik biztosította a talajoltó PGPR szervezetek elválasztását, fajszintű nyomon követését, és a mikrobiális közösség szerkezet együttes vizsgálatának lehetőségét.

A T-RFLP módszer során a fluoreszcens jelöléssel ellátott forward primerrel felszaporított DNS terméket restrikciós endonukleázzal hasítottuk. Az egyes PGPR szervezetekhez tartozó eltérő bázissorendű PCR termékek enzimhasítása következtében eltérő, fluoreszcens jelölt terminális restrikciós fragmensek keletkeznek (T-RF-ek). Nagy felbontású kapilláris gélelektroforézissel és lézer általi gerjesztéssel az egyes T-RF-ek egymástól elválaszthatóak és detektálhatóak, míg méretük belső hossz sztenderd alkalmazásával határozható meg. A vizsgálat eredményeképpen kapott elektroferogram csúcsok az T-RF-ek mérete szerint (bázis pár) növekvő sorrendben jelennek meg, míg a csúcs alatti terület pedig arányos a szervezet közösségen belüli relatív abundanciájával (gyakoriságával) (11. ábra).



11. ábra. A T-RFLP vizsgálatok sematikus ábrája

## V.5.2 DNS kivonás

Az egyes baktérium törzsek genomiális DNS kinyerése céljából a 24 órás tenyészetekből egy oltókacsnyi mennyiség 25  $\mu\text{L}$  0.5M NaOH oldatban került felüloldásra. 15 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően 25  $\mu\text{L}$  1M TRIS-puffer (pH 8) és 300  $\mu\text{L}$

DEPC (dietil-pirokarbonát) víz került hozzáadásra az oldathoz, amely 10,000g-én 3 percen keresztüli centrifugáláson esett át.

A talajminták esetében a DNS-kivonás 0,25-gram talajmintából a PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc. Carlsbad, USA) segítségével történt a gyártó utasításainak megfelelően, kiegészítve az enzimátikus eljárást fizikai feltárással. A talajminták 'Bead Solution tubes' (MoBio Laboratories Inc., USA) kerültek ráztatásra 25 Hz-en 2 percen keresztül az MM301sejtmalomban (Retsch, Haan, Germany) a minél hatékonyabb sejtfeltárási érdekében.

### V.5.3 Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (PCR) során a PGPR törzsek majdnem teljes 16S riboszomális RNS génjeit specifikus kezdőszekvencia (primer) párok segítségével amplifikáltuk. Az univerzális 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') és 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer párokat (Lane, 1991) tartalmazó PCR reakció összetételét a *XI. Függelék 1. táblázatában*.

A talajminták T-RFLP analízise során a bakteriális 16S rRNS gén fragmensek amplifikálása érdekében a fluoreszcens festékkel-hexaklór-fluoreszcinnel (HEX) jelölt 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') és 519R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') primerpárok kerültek felhasználásra (Lane, 1991). A 16S rRNS gén felszaporítására alkalmazott PCR reakció hőprofilja 98 °C-on 5 percig tartó kezdeti denaturációval indult, melyet 32 amplifikációs ciklus követett 30 másodpercig tartó 94 °C-os denaturációval, 52 °C-on 30 másodpercig tartó annealációval, és 60 másodperc 72 °C-on történő extenzióval, a végső extenzió időtartama 10 perc volt 72 °C-on. A rizoszféra minták esetében azonban a PCR reakciókban az alábbi változtatásokat alkalmaztunk: a kezdeti denaturáció hőmérséklete 98 °C, az annealáció hossza 45 másodperc, hasonlóan az elongációhoz 45 másodperc. A PCR reakciók a GeneAmp PCR System (Model 2400, Applied Biosystems, Foster City, USA) készülékben kerültek végrehajtásra.

A PCR termékek detektálása agaróz gélelektroforézissel történt. A keletkezett PCR termékeket töltő pufferrel (30 v/v % glicerin, 0,25 mM brómfenolkék) történő összekeverését követően 1%-os agaróz gélben (1g agaróz, 100 ml 1x TBE puffer [*XI. Függelék 1. protokoll*] és 5 µl 10 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú etídiumbromid) detektáltuk. Az elektroforézis 100V/cm feszültségen 20 percig tartott, míg a termékek méretének meghatározását 2,5 µL pUC Mix Marker 100 (Fermentas, Vilnius, Litvánia) molekulásúly marker segítségével valósult meg.



#### V.5.4 In silico jellemzése a PGPR törzseknek

A törzsek közel teljes 16S rRNS gén szekvenciája meghatározásra került Sanger szekvenálás által az LGC Ltd. (Berlin, Germany) vállalatnál. A nyers szekvencia minőségellenőrzése MEGA6 programmal (Tamura és mtsai, 2013) történt, míg az EZTaxon (Kim és mtsai, 2012) adatbázisban a legközelebbi tenyésztésbe vont törzs került meghatározásra. Annak érdekében, hogy egymástól elkülöníthetők legyenek az egyes stressz-adaptált PGPR törzsek, *in silico* vizsgálatnak vetettük alá a 16s rRNS gén szekvenciákat. A leginkább alkalmas restriktív endonukleáz és primer pár kombinációt kerestük annak érdekében, hogy egyedi T-RF-et tudjunk rendelni minden egyes törzshöz. A 16s rRNS gén legvariábilisabb régiói kerültek tanulmányozásra, melyeket a 27F-519R (Lane, 1991), 341F-907R (Teske és mtsai, 1996) és 968F-1401R (Heuer és mtsai, 1997) primer párok határoztak meg. Harmincnégy, kiváltképpen II-es típusú Fermentas (Thermo Fisher, USA) restriktív endonukleázok kerültek tesztelésre. Az *in silico* analízis a MEGA6 program és a Microbial Community Analysis (MiCA) programcsomag (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) ISPaR (In Silico PCR and Restriction) szoftverének segítségével került kivitelezésre (Shyu és mtsai, 2007).

Az oltóanyag-törzsek szekvenciái a Genbank nukleotid szekvencia adatbázisban érhetők el az MH421836–MH421846 azonosító számok alatt.

## V.6 A rizoszféra bakteriális közösségének és a PGPR oltókultúrák jellemzése

### V.6.1 Terminális Restriktív Fragmens hossz Polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálat

Az *in silico* analízisnek eredményeképpen a *Bsh12361* és *BsuRI* (Thermo Fisher, USA) restriktív endonukleázok lettek kiválasztva a törzsek 16s rRNS gén 27F-519R primer párja által meghatározott génszakaszának a T-RFLP vizsgálatba vonására. A T-RFLP analízis érdekében 1 µL and 10 µL (hozzávetőleg 20 és 200 ng DNS-ek felel meg) a törzs és a rizoszféra (16S rRNS gén) PCR termék került emésztésre 3 U restriktív endonukleáz segítségével 20 µL végterfogóban. A PCR ampliconok *Bsh12361* és *BsuRI* enzimek segítségével 37 °C-on 3 órán át emésztődtek. Az enzimátikus emésztmények só, illetve fehérjesszenyeződéstől való megtisztítását etanolos precipitáció segítségével valósítottuk meg. A módszer alapja, hogy alkoholos közegben a DNS kationos anyagokkal reagálva csapadékot képez, így lehetővé téve az elektroforézist zavaró szennyezőanyagoktól való eltávolítást (XI. Függelék 2. protokoll és 2. táblázat).

A T-RF-ek elválasztása kapilláris gélelektroforézissel történ, méretüket pedig GeneScan™-500 Tamra™ Standard (Applied Biosystems, Foster City, USA) belső sztenderd használatával határoztuk meg. Azok T-RF csúcsok kerültek vizsgálatra melyek fragmens mérete nagyobb volt mint 50 bázis pár, míg fluoreszcens intenzitása meghaladta az 50-en egységet (csúcs magasság). A gélelektroforézis során a denaturálódott egyszálú DNS-termékek detektálhatóak. Ennek érdekében fluoreszcensen jelölt T-RF-ek formamid (elegy összetételét *Függelék 3. táblázat*) denaturálószerrel, illetve a 98°C-on 5 percig történő denaturációt követően kerültek elemzésre. A gélelektroforézist ABI Prism™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) berendezéssel végeztük POP-4™ polimer (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystems) alkalmazásával. Az elektroforézis 8 másodperc injekciós és 29 perces futási idővel, 60 oC-on és 15 kV feszültségen történt. GeneScan (Applied Biosystems Version 3.7, Foster City, USA) szoftverrel végeztük az egy T-RFLP kromatogramok elemzését. A T-RF csúcsok közül, azokat vettük figyelembe, melyek meghaladták az 50 bázispár hosszát, illetve fluorezcencia intenzitása meghaladta az 50 fluorezcencia egységet csúcsenként.

T-REX program (T-RFLP Analysis EXpedited; Culman és mtsai, 2009) segítségével az egyes minták párhuzamos futásai alapján egy konszenzus profilt hoztunk létre, annak érdekében, hogy kiküszöböljük a futásbeli hibákat. Az illesztés során létrehozott adatmátrixban objektumokként az egyes mintavételi pontok, míg változókként a terminális fragmensek (T-RF) szerepeltek, a mátrix értékeit a T-RF-ekhez tartozó görbe alatti területek százalék értékei adták. Az adatmátrixból kizártuk az 1% alatti relatív abundanciával rendelkező T-RF-eket, továbbá a robusztusabb eredmények elérése céljából a két különböző restrikciós endonukleázzal kapott eredményeket együttesen kezeltük. Az adatmátrix létrehozása során azok az  $\geq 1\%$  relatív abundanciával (az egyedi T-RF-ek csúcsok nagyasága osztva az össz csúcs nagyságával) rendelkező T-RF-ek kerültek felhasználásra (Fredriksson és mtsai, 2014).

#### V.6.2 16S rDNS klóntárak létrehozása és filogenetikai elemzések

A bakteriális közösségek domináns közösségalkotóinak meghatározásának céljából klóntárakat készítettünk. Az egyes kezelések kiválasztott mintáiból bakteriális parciális 16S rDNS klóntárakat hoztunk létre, majd a klónokat T-RFLP-vel csoportosítottuk. Célunk nem a klóntárak általános elemzése, hanem a főbb T-RFLP csúcsok nemzetség szintű azonosítása volt. A kiválasztott minták közé tartozott mindkét talaj esetében az abszolút kontrol talaj kezelés előtti mintája (0A1, és 0D1), a 30 t ha<sup>-1</sup> bioszénnel kezelt talajok mintája eltérő időpontokban

(IA4, IIA4, IIIA4 és ID4, IID4, IIID4), illetve a savanyú talaj esetében a bioszén felszínen immobilizált bakteriális oltóanyaggal kezelt minták R1 és R6 növekedési fázist (IIC4, IIIC4) reprezentáló mintái. Azon kezelések kerültek kiválasztásra, az abszolút kontrol mellett, melyeket korábban a legnagyobb hatást gyakorolták a talaj fizikai kémiai tulajdonságaira (Rékási és mtsai, 2018), illetve a talaj mikrobiális közösség szerkezetére.

A klónkönyvtárak készítéséhez a T-RFLP-hez felhasznált közösségi PCR termékeket használtuk fel. A kék-fehér szelekción alapuló InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint monoklonális PCR termékeket állítottunk elő. A PCR reakciók összetételükben, illetve hőprofiljukban megegyezettek a korábban közöltekkel, a végső extenziós idő kivételével, melyet 30 percre módosítottunk. A 3' végein túlnyúló timin nukleotidot tartalmazó linearizált pTZ57R/T vektorba való bekötődését a PCR termékeknek, a reakcióban használt polimeráz enzim (LCTaq DNS Polimeráz) terminális transzferáz aktivitása révén kiépülő túlnyúló láncvégi adenin nukleotidok teszik lehetővé. A keletkezett termékeket a további zavaró szennyeződésektől (só- és fehérjeszennyeződések, klónozni nem kívánt primerek) EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (Bio Basic, Amherst, USA) alkalmazásával tisztítottuk meg a gyártó utasítása szerint. A Bacteria 16S rRNS géneket Mix & Go! Competent Cells-JM109 (Zymo Research, USA) kompetense sejtekbe transzformáltuk. Annak érdekében, hogy elkerüljük a szuperkompetens sejtek DNS-nek zavaró hatását, a DNS termékek reamplifikációja először a vektorspecifikus M13 (M13f: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; M13r: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') primerekkel történt. Az M13 PCR reakciót követően a klónozott 16S rRNS gén felszaporítására ugyanazt a PCR reakciók elegy összetételt és hőprofilját használtunk, mint a rizoszféra bakteriális közösségének T-RFLP analízise során.

Az amplifikált inzerteket a T-RFLP módszer esetében használt, gyakran hasító restrikciós endonukleázokkal (Bsh1236I és BsuRI) emésztettük. Az így létrehozott ARDRA (Amplifikált Riboszomális DNS Restrikciós Analízis) mintázataik alapján csoportosítottuk a mintákat, míg a klón csoportok egy-egy reprezentatív tagja esetében meghatároztuk a T-RF-t, illetve elvégeztük azok bázissorrend elemzését. A bázissorrend elemzéshez az M13-as PCR termékekre a 27F-519R primer párral újabb PCR terméket készítettünk. A termékek tisztítását követően (EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (Bio Basic, Amherst, USA) a bázissorrend meghatározást az LGC Ltd. (Berlin, Németország) munkatársai végezték Sanger-féle láncterminációs szekevánálás által.

A kapott bázissorrend adatok kiértékelését MEGA6 (Tamura és mtsai, 2013) program segítségével végeztük. Az egyes reprezentánsok legközelebbi rokon szervezeteit a GenBank adatbázisban, míg a legközelebbi típusörzseket az EzTaxon-e (Kim és mtsai, 2012) adatbázisában azonosítottuk BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) algoritmus alkalmazásával. A megközelítőleg 500 bázispár hosszúságú OTU-k (Operational Taxonomic Unit – operatív taxonómiai egység) meghatározása során a Tindall és mtsai (2010) által javasoltak alapján 95% feletti hasonlóság nemzetség szintű, 97% feletti hasonlóság alapján fajszintű besorolást végeztünk.

A klónszekvenciákat a Genbank nukleotid szekvencia adatbázisban érhetőek az MN081907.1 - MN082019.1 azonosítók alatt.

### V.6.3 Foszfolipid-zsírsv (PLFA) elemzés

A foszfolipidek a baktériumok és eukarióták körében is univerzálisak, viszont a foszfolipideket alkotó zsírsavak (PLFA) változatosak, előfordulásukat az adott taxon zsírsav-anyagcserében aktív enzimatikus működése szabja meg. Egy sejt membránjának fő zsírsavai általában univerzálisak és csak kis részét alkotják az össz PLFA-mennyiségnek, arányuk változékony, erősen függ például a külső környezeti tényezőktől (hőmérséklet, pH stb.). Adott faj PLFA-összetételét azonban csak tiszta tenyészetből tudjuk meghatározni. A talajból kivont foszfolipidek a foszfolipid-foszfátban, illetve -zsírsvban kifejezett összmennyiségük alapján lehetőséget adnak a talaj mikrobióta közösség biomasszájának jellemzésére. Foszfolipid zsírsav-spektrum alapján a tágabb taxoncsoportok jelenlétének, tér-, és időbeli dinamikájának megállapítására, ezáltal az életközösség érzékeny bioindikációjára kapunk választ (Zelles, 1999).

A nagyfokú molekulaszervezeti változékonysággal rendelkező foszfolipidek és az ezeket alkotó foszfolipid-zsírsavak spektruma alkalmas mikroorganizmusok taxonómiai meghatározásához. Az egyszeresen telítetlen zsírsavak az eukarióta mikrobák, a Gram-negatív illetve Gram-pozitív baktériumok körében fordulnak elő, de az utóbbi csoportban rendkívül kis mennyiségben. A kétszeresen telítetlen linolsav (18:2 $\omega$ 6,9) egyes vizsgálati eredmények szerint a gombák jó biomarkere. A zsírsavakban a lánchossznál általában jelentősebb taxonómiai információ a szubsztituens vagy a telítetlen kötés láncevgtől számított helyzete, ami azt tükrözi, hogy milyen anyagcsere-úton jöhetett létre az adott zsírsav. Ezen információk függvényében a Gram negatív baktériumokra a ciklikus szerkezettel rendelkező (cy17:0; cy19:0) zsírsavakat, valamint az egyszeresen telített zsírsavak közül a 18:1 $\omega$ 7-t alkalmazzák. Gram pozitív

baktériumok esetén a leginkább elfogadott marker a 15-17 C atomból álló telítetlen zsírsavak iso, és anteiso formája (i15:0; a15:0; i16:0; i17:0; a17:0), az Actinobacteria törzsekre a metilezett zsírsavakat (10Me16:0; 10Me17:0; 10Me18:0), míg Protozoák esetén az 20:4 arachidonsavat alkalmazzák markerként (Frostegard, és Baath, 1996)

A foszfolipid-zsírsav analízis során a biokémiai markerek meghatározása a kivonás (extrakció), elkülönítés (izoláció) és elválasztás (szeparáció) főbb lépései segítségével valósultak meg. A talaj homogenizációját követően 2 g talajmintából történt a lipidek kivonása módosított egyfázisú Bligh-Dyer módszerrel. Az extrakció alapja, hogy a nátrium-citrát-puffer, kloroform és metanol alkalmazása során a citrát-puffer–kloroform-metanol 0,8:1:2 (v/v/v) arányú elegye egy fázist alkot. Az eljárás során a 2 g talajhoz annyi citrát-puffert (0,15 M, pH=4,0) adtunk, hogy a talaj víztartalmával együtt (10% víztartalom) 2,0 mL legyen az ösztérfogat (1,8 mL citrát puffer + 0,2 mL talaj víztartalma), majd 2,5 mL kloroformot és 5,0 mL metanolt adtunk hozzá.

Az extrakciós elegyet vortexszel történő homogenizálását követően, 2 órán keresztül szobahőmérsékleten hagytuk. Ezt követően Beckman Coulter J2-MC (USA) centrifuga segítségével 5 percig, 2500 fordulat/perc sebességgel, 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszóhoz 3,2 mL kloroform és 3,2 mL citrát puffer elegyet adtunk, és éjszakára sötétben tároltuk, hogy a fázis szeparáció lejátszódhasson. A fázis szeparáció következtében az alsó elegy kloroformos fázisában koncentráltak a neutrális, gliko- és foszfolipidek, míg a felső szerves fázisban a metanol, víz és a vízben oldott anyagok.

A következő lépésben a lipid-extraktumot vákuum bepárló segítségével koncentráltuk, illetve szilárdfázisú extrakció (SPE) során szilikagél töltetű oszlopon kondicionálás után a foszfolipideket metanollal elkülönítettük a többi lipidfrakciótól. Az oszlopról először a neutrális lipideket 1,5 mL kloroformmal, majd a glikolipideket 6,0 mL acetonnal, végül pedig a foszfolipideket 1,5 mL metanollal eluáltuk. A légmentesen zárható üvegcsében összegyűjtött foszfolipid frakciót nitrogénáramban 40 °C-on került kiszáritásra kiszáritott. A lúgos metanolízis során a kiszáritott mintához 1 mL 1:1 (v/v) arányú metanol-toluol oldat adtunk, majd 1 mL 37 °C-ra előmelegített 0,2 M KOH-oldatunk hozzá. Ezt követően vízfürdőben 15 percen keresztül, 37 °C-on inkubáltuk, majd hagytuk lehűlni. A reakció eredményeként a foszfolipidek felszabaduló zsírsavaiból metilészterek képződtek, így lehetővé téve a gázkromatográfiás eljárással való vizsgálatukat (Frostegard, és mtsai., 1993). Ezt követően 2 mL hexán:kloroform 4:1 (v/v) arányú keverékét adtuk hozzá, 0,3 mL 1 M ecetsav (pH 6), 2 mL desztillált víz mellett, és 1 percig vortexeltük. 5 perc (3000 fordulat/perc) centrifugálást követően a felülúszó szerves fázist leválasztottunk, amit nitrogénáramban bepároltunk.

A gázkromatográfiás elemzéshez 50 µl IS16 (injektálási standard) oldatot (19:0) adtunk hozzá, melyet vortexelést követően -4 °C-on tároltunk. Perkin Elmer Autosystem XL GC-készülékben HP-5 (50 m hosszú, 0,32 mm átmérőjű és 0,17 µl filmvastagságú) típusú kolonnával végeztük az elemzést, 99,99%-os tisztaságú hélium vivőgáz segítségével.

Az egyes bakteriális csoportokra specifikus foszfolipideket alkotó zsírsavak segítségével (PLFA) a Gram-pozitív baktériumok (i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0), a Gram-negatív baktériumok (16:1ω9, cy17:0, 18:1ω7c, cy19:0) és Actinomycetesek (10Me16:0, 10Me17:0 and 10Me18:0) koncentrációja, továbbá az „univerzális” (14:00; 15:00; 16:00; 17:00; 18:00) foszfolipid-zsírsavak koncentrációja került meghatározásra a Gram-negatív/Gram-pozitív szervezetek aránya mellett (Frostegård and Bååth, 1996).

#### V.6.4 Illumina MiSeq szekvenálás

A 2017-es talajminták (30 hónappal az oltást követően) közösségi DNS izolátumaiból a bakteriális 16S rRNS gén V3-V4 régióját Bacteria-specifikus primerekkel szaporítottuk fel. Az amplicon szekvenálás az 5' végükön univerzális Fluidigm CS1 (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA-3) és CS2 (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3') szekvenciákat tartalmazó specifikus B341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' (Herlemann és mtsai, 2011) és B805R 5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3' (Herlemann és mtsai, 2011) primer párok segítségével történt. A PCR reakció során a *XI. Függelék 4. táblázatában* bemutatott premix hőprofilja 98 °C-on 5 percig tartó kezdeti denaturációval indult, melyet 25 amplifikációs ciklus követett 40 másodpercig tartó 95 °C-os denaturációval, 55 °C-on 30 másodpercig tartó annealációval, és 60 másodperc 72 °C-on történő extenzióval, a végső extenzió időtartama 10 perc volt 72 °C-on. A Michigan State University (USA) Research Technology Support Facility, Genomics Core laboratóriumban történt az amplicon könyvtárak tisztítás, minőség-ellenőrzést és koncentráció meghatározását. A szekvenálás 2 × 250 bp „paired end” eljárásban történt az Illumina által gyártott v2, 500 cycle MiSeq platformon.

A szekvenciák bioinformatikai elemzése a mothur v1.38.1 (Schloss és mtsai, 2009) szoftverrel a MiSeq SOP ([http://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP), Kozich és mtsai, 2013) alapján történt. Kozich és mtsai (2013) leírt elemzéssel ellentétben a 'make.contigs' parancsban a 'deltaq' paraméter 10-re lett állítva, valamint a kimérák detektálására a UCHIME (Edgar és mtsai, 2011) szoftvert által történt, továbbá Kunin és mtsai (2010) javaslata alapján az az adathalmazból a singleton szekvenciák kiszűrésre kerültek. A taxonómiai

besorolást 1000 iteráció alapján számolt legalább 80%-os bootstrap konfidencia érték alkalmazásával az ARB-SILVA SSU Ref NR 132 adatbázisa (Quast és mtsai, 2012) alapján végeztük. Az OTU-k elkülönítéséhez 0,15-ös cutoff értéket lett beállítva a mothur „dist.seqs” parancsánál. A prokarióták faji elkülönítésénél figyelembe vett 97%-os 16S rRNS gén szekvencia hasonlóságot alkalmaztuk (Tindall és mtsai, 2010).

#### V.6.5 A minták mikroszkópos vizsgálata

A 2017-es talajmintavétel (30 hónappal az oltást követően) során a pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) végzett vizsgálatokhoz a különböző kezelésekből származó mintákat 3 órán keresztül 5%-os glutáraldehidben (0,1 M Na-K foszfát puffer; pH=7) fixáltuk. Az inkubálási idő letelte után a fixált mintákat kétszeri foszfát pufferrel (0,1 M; pH=7) történő mosását követően sokkoló fagyasztáson (-85 °C) majd fagyasztva szárító (Edwards) készülékben 5-10 órán keresztül szárítottuk (2 x 10<sup>-2</sup> mbar, -60 °C), amíg a fagyasztott mintából a jég elszublimált. A vizsgálat előtt közvetlenül a kiszárított mintákat vékony aranyfilmmel vontuk be, majd az MTA Ökológiai Kutatóközpontjának Duna-kutató Intézetében EVO MA 10 Zeiss mikroszkópban figyeltük meg.

#### V.6.6 Eredmények statisztikai értékelés

Az egyéves szabadföldi kísérlet során annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a kezelések hatását a kijutatott PGPR fajok közösségen belüli arányát tekintve az ANOVA (Analysis of variance) varianciaanalízist használtunk Tukey páronkénti post hoc teszttel, a normális eloszlású csoport átlagának összevetésére, a PAST szoftver 3.13 verzió segítségével (Hammer és mtsai, 2001). Pearson féle korrelációs együttható tesztet végeztünk, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk PGPR szervezetek közösségen belüli arányának és kukorica biomassza eredmények közötti összefüggést. Az ANOSIM (analysis of similarities, 999 permutáció) hasonlóságok elemzése által vizsgáltuk meg (a PAST szoftver segítségével), hogy a bakteriális közösségszerkezeti átalakulásokban a mintavétel időpontja (kukorica fenofázisa), vagy az alkalmazott kezelések szerepet játszottak-e. Annak érdekében, hogy az egyes csoportok közötti elválást leginkább befolyásoló csúcspontokat és így a domináns szervezeteket azonosítani tudjuk, SIMPER (similarity of percentage) hasonlósági százalék elemzést végeztünk (Clarke, 1993).

Főkomponens elemzés (PCA: principal component analysis) segítségével ábrázoltuk a talaj bakteriális közösségszerkezetében végbemenő változásokat, a PAST szoftver 3.13 verzió segítségével (Hammer és mtsai, 2001). Továbbá annak érdekében, hogy a környezeti változók

és a bakteriális közösség szerkezetben bekövetkező változások kapcsolatát feltárjuk a PCA főbb komponenseire vektorként vetítettük a környezeti paramétereket. A környezeti paramétereket az R program (R Core Team, 2016; <http://www.r-project.org/>) „envfit” parancsának segítségével illesztettük a PCA ordinációra (T-RFLP, PLFA és OTU arányok), majd ezen illeszkedés és szignifikancia szintjét határoztuk meg random permutációk segítségével (Oksanen és mtsai, 2018).



## VI. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### VI.1 3. A talajoltásra használt PGPR törzsek molekuláris jellemzése és monitorozása

#### VI.1.1 PGPR organizmusok azonosítása és a molekuláris nyomon követési rendszer felállítása

A szabadföldi kísérletsorozat megelőzően a talajoltásra szánt 10 baktérium törzs teljes 16S rRNS gén bázissorrend meghatározását elvégeztük. A törzsekhez tartozó legközelebbi rokon fajokat és azok illesztési adatait az 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat A PGPR oltóanyagként felhasznált PGPR törzsek 16S rRNS gén bázissorrend szerinti azonosítása a legközelebbi tenyésztésbe vont rokon fajjal

Törzskód	Legközelebbi típustörzs	Hasonlóság		Génbanki szám
		%	Illesztési adat (bp)	
242_9	<i>Azospirillum brasilense</i>	98,16	26/1415	AY150046
NF_11	<i>Azospirillum brasilense</i>	98,89	30/1420	AY150046
NF_7	<i>Azospirillum brasilense</i>	97,991	20/955	AY150046
NF_6	<i>Azospirillum irakense</i>	99,42	8/1381	Z29583
S_153	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	98,83	17/1454	X80738
S_225	<i>Kocuria rosea</i>	99,73	4/1456	X87756
S_284	<i>Paenibacillus peoriae</i>	99,73	4/1476	AJ320494
LU_44	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99,93	1/1491	EF114313
13_4	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>piscium</i>	99,76	3/1239	FJ168539
ES_232	<i>Bacillus megaterium</i>	99,93	1/1373	JJMH01000057

A szakirodalmi adatok alapján 3 különböző primerpár kombináció által fedhető le a 16S rRNS génje ~500 bázispár hosszúságú variábilis régiói (Sipos és mtsai, 2009). A vizsgálatba bevont három primerpár a 27F-519R, 341F-971R és 968F-1401R (Lane, 1991) volt, melyek szekvenciái a XI. Függelék 5. táblázatában találhatóak. A kiválasztott három primerpárral közre fogott 16S rDNS régiókon *in silico* emésztést végeztünk, gyakran hasító II. típusú restrikciós endonukleázokkal, az azokra jellemző felismerő helyeik alapján. Az általunk vizsgált enzimek négy, illetve öt bázispár hosszúságú (27F-519R primer által közrefogott régió esetén) specifikus szekvenciákon belül hasítják a kétszálú DNS molekulát. A régiókat egyenként végig vizsgáltuk az enzimekre jellemző hasítóhelyek alapján, a törzsekre jellemző terminális fragmensek (T-RF) után kutatva. Az *in silico* vizsgálatok eredményeit a XI. Függelék

6.a, 6.b, 7 és 8-as táblázataiban mutatjuk be, az egyes régiókon belül az enzim-törzs párokra jellemző fragmenshosszak (T-RF-ek) feltüntetésével.

A 27F-519R primer pár által közre zárt 16S rRNS V1-V3 régiója bizonyult a legvariábilisabbnak a vizsgálatba vont három primerpár által közre zárt régiók közül. (XI. Függelék 6.a és 6.b táblázat). A vizsgálatokba bevont törzsek közül, négy az *Azospirillum* nemzetségbe tartozott, míg kettő pedig a *Bacillus* nemzetségbe. A felsorolt nemzetségek tagjai jelentős homológiát mutatnak egymáshoz 16S rDNS alapon, így elválasztásuk nem, vagy egynél több enzim alkalmazásával valósítható meg. A négy *Azospirillum* nemzetségbe tartozó törzs az NF\_6, mely az *Azospirillum irakense* típus törzsszel azonosítható, továbbá az NF\_7, NF11 illetve 242\_9 jelzésűek az *Azospirillum brasilense* típus törzsnek felelnek meg. Ez a 3 talajoltó törzs jelenlegi ismereteink alapján 16S rDNS alapon nem különböztethető meg egymástól. Vizsgálataink kiterjedtek az *Azospirillum brasilense* esetében a nitrogén-fixációban résztvevő génekre is (*nifA* és *nifH*). Az adatbázisban fellelhető *nifA* és *nifH* gének alapján azonban *Azospirillum brasilense* faj alatti besorolása nem lehetséges. A *Bacillus* nemzetséghez tartozó két LU\_44 és ES\_232 jelzésű törzs, mint említettük szintén jelentős szekvencia egyezést mutatott, mivel eltérő talajokra szánt (lúgos, savanyú) oltóanyagban szerepelnek, így a többi törzstől való elválasztásuk megvalósítható. Továbbá, figyelembe kell venni, hogy az oltótörzsek kimutatását a talajra jellemző mikrobióta mellett kell megvalósítani, így nem célszerű 1-1,5 bázis hosszban különböző T-RF-eket alkalmazni a különböző oltótörzsek azonosítása céljából.

A fenti észrevételek alapján az *in silico* elemzések alapján a 16S rRNS gén 27F-519R régiójára, továbbá öt potenciális enzim *Bsh12361*, *BsuRI*, *MspI*, *BtaCI*, *FaqI* került tesztelésre (hasítóhelyei a számú függelékben). A virtuális hasítások valóság alapját a törzsekből egyenként készített PCR termékek T-RFLP elemzésével igazoltuk (8. táblázat). A kapott eredmények tükrében az említett öt enzim közül a *Bsh12361*, *BsuRI* enzimek segítségével a vizsgálatba vont törzsek a 27F-519R primer pár által közre zárt a 16S rRNS V1-V3 régió belül nagy biztonsággal elválaszthatóak egymástól (az *Azospirillum brasiliense* kivételével a savanyú talajoltó keverék esetében).

8. táblázat. A PGPR törzsek *in silico* becsült és a T-RFLP által meghatározott 16S rRNS fragmens hosszai (bázis párok) a *Bsh12361* and *BtsCI* restriktív endonukleáz általi emésztéssel

Törzsek	Restriktív endonukleáz			
	Becsült fragmens hossz		Aktuális fragmens hossz	
	<i>Bsh12361</i>	<i>BsuRI</i>	<i>Bsh12361</i>	<i>BsuRI</i>
<i>Azospirillum brasilense</i> 242/9 NCAIM (P) B 001403	185	61	195	66
<i>Azospirillum brasilense</i> NF11 NCAIM (P) B 001428	185	61	195	66
<i>Azospirillum brasilense</i> NF7 NCAIM (P) B 001433	185	61	195	66
<i>Azospirillum irakense</i> NF6 NCAIM (P) B 001425	185	215	192,5	222
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> S 153 (P) NCAIM B 001424	215	218	221	225
<i>Kocuria rosea</i> S 225 NCAIM (P) B 001426	383	220	387	227
<i>Paenibacillus peoriae</i> S 284 NCAIM (P) B 001430	396	226	232	230
<i>Bacillus aryabhatai</i> LU44 NCAIM (P) B 001423	227	223	234	232
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 13/4 B NCAIM (P) B 001370	379	190	383	198
<i>Bacillus megaterium</i> ES232 NCAIM (P) B 001291	228	226	235	231

A kapott eredmények tükrében az említett öt enzim közül a *Bsh12361*, *BsuRI* enzimek segítségével a vizsgálatba vont törzsek a 27F-519R primer pár által közre zárt a 16S rRNS V1-V3 régió belül nagy biztonsággal elválaszthatóak egymástól (az *Azospirillum brasiliense* kivételével a savanyú talajoltó keverék esetében). Az egyes PGPR szervezetek relatív abundancia értékeit a két enzimmel történő emésztés átlag értékeiből számoltuk. A módszer lehetővé tette a talajoltásra használt PGPR szervezetek relatív abundancia változásainak monitorozását szabadföldi körülmények között.

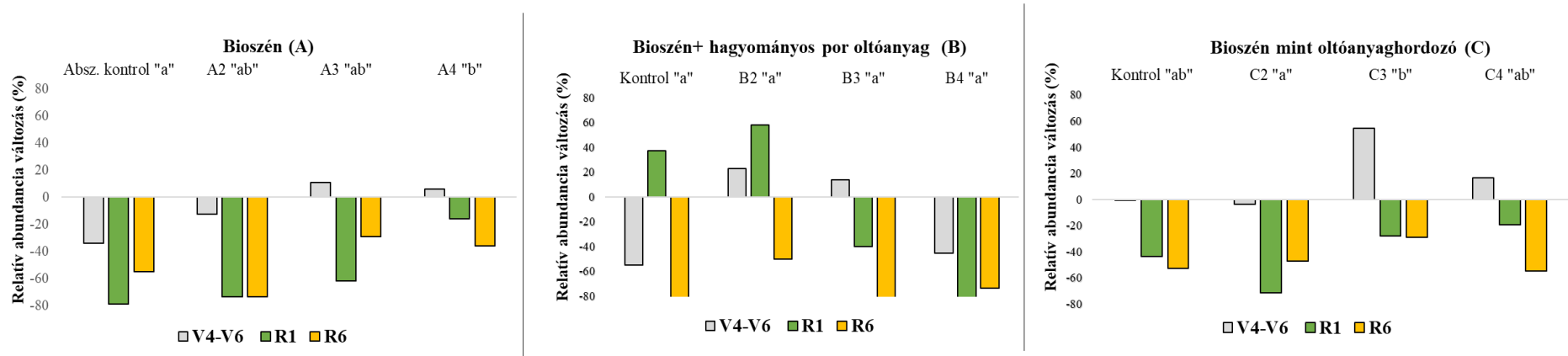
## VI.1.2 A kijutatott baktériumok relatív abundanciájának a nyomon követése

### VI.1.2.1 *Savanyú Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talajra adaptált PGPR oltóanyagok*

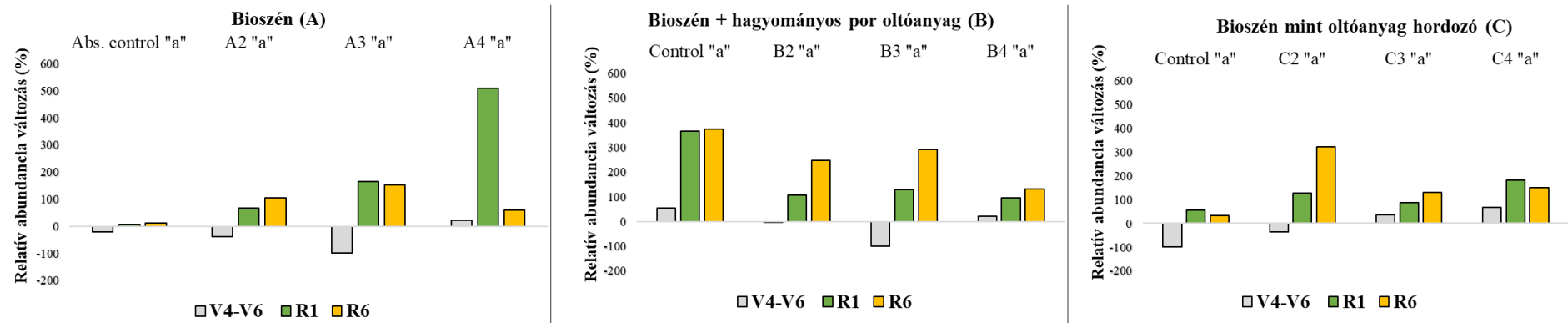
A 12-es 13-as ábra az oltásra használt baktériumok százalékos relatív abundancia változását mutatja a kezdeti oltást megelőző időponthoz képest, a kukorica 4-6 leveles (V4-V6), bibekitolás (R1) és fiziológiai érettség (R6) fázisában. A savanyú talajra adaptált baktériumok közül a *Bacillus aryabhatai* és *Paenibacillus peoriae* baktériumok közösségen belüli relatív gyakorisága 1%-ék alatt maradt a kezelt talajokban. A *Paenibacillus peoriae* esetében a kezeletlen (B1 és C1) talajokban bár meghaladta a 2%-ék körüli közösségen belüli arányt az R6 időpontra, azonban összességében a kimutatási küszöb alatt volt a baktérium relatív abundanciája. Ezért a szervezetek közösségen belüli arány változását nem ábrázoltuk, viszont az egyes időpontokban mért relatív abundancia értékeiket táblázatosan a XI. Függelék 9. táblázatában mutatjuk be. Ez a jelenség felhívja a figyelmet az alkalmazott módszer korlátaira, hiszen számításba kell vennünk azt is, hogy az endospórát képző baktériumok DNS izolálása gátolt (Bueche és mtsai, 2013). A számos abiotikus (talaj típus, szerkezet, pH, hőmérséklet, tápanyag, víztartalom stb.) és biotikus (protozoák és nematodák általi predáció, bakteriofág aktivitás, az erőforrásokért való kompetíció stb.) tényezők nagyban befolyásolják a rizoszféra mikrobáinak túlélését és gyakoriságát (beleértve a PGPR szervezetekét is) (Wakelin és mtsai, 2016), és csökkenthetik arányukat.

Oltás előtt az *Azospirillum brasilense* 1-3%-át képviselte a savanyú Lamellic Arenosol talaj bakteriális közösségének. Az abszolút kontrol talajhoz viszonyítva (A1) a 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelés hatására szignifikánsan emelkedett az *A. brasilense* talajon belüli aránya. A bioszén oltóanyagghordozóként való alkalmazása során a 15 t ha<sup>-1</sup> (A3) mennyiség alkalmazása, szintén szignifikánsan emelte meg a baktérium közösségen belüli arányát, a kis dózisz kezeléshez viszonyítva (C2) (12. ábra). A kukorica 4–6 leveles vegetatív fázisában a 15 t ha<sup>-1</sup> bioszén (A3), a 3 és 15 t ha<sup>-1</sup> bioszén + hagyományos por oltóanyag kezelés (B2, B3), illetve a legnagyobb dózisban alkalmazott bioszén mint oltóanyagghordozó (C4) kezelések, nem szignifikánsan bár, de megemelték az *A. brasilense* közösségen belüli arányát a kontrol talajhoz viszonyítva. Abujabnah és mtsai (2018) szintén erős pozitív korrelációt találtak az *Azospirillum* fajok közösségen belüli aránya és a fa alapanyagú bioszén alkalmazott dózisa között fekete agyagos talajban. Saranya és mtsai (2011) is az *Azospirillum* nemzetség szignifikáns emelkedését tapasztalták tenyésztéses vizsgálataik során, mind az akácfa alapanyagú bioszén 25 t ha<sup>-1</sup> használta, illetve a bioszén és az *Azospirillum* (AZ 204) együttes alkalmazása mellett. Abujabnah és mtsai (2018) szintén erős pozitív korrelációt találtak az *Azospirillum* fajok

közösségen belüli aránya és a fa alapanyagú bioszén alkalmazott dózisa között fekete agyagos talajban. Az *A. brasilense* közösségen belüli arányának csökkenő tendenciáját a növény egyedfejlődés során, hasonlóan az általunk tapasztaltakhoz, Ceccherini és mtsai (2001) is megfigyelték. A kukorica növényvel végzett szabadföldi kísérletben májustól novemberig az azonosított *A. brasilense* törzs aránya 1/6-ra csökkent. Az *A. brasilense* esetében ismert az organizmus azon képessége, hogy a gyökér kolonizáció során, a baktérium képes behatolni a növény belsejébe és endofita kapcsolatot kialakítani (Bashan, 1999; Chamam és mtsai, 2013). A PGPR faj ezen képessége magyarázatot adhat a késői reproduktív növekedési fázisban alacsonyabb közösségen belüli arányára.



12. ábra. Az *Azospirillum brasilense* közösségen belüli arányváltozása a 0-ik napi kontrol talajmintához képest. A relatív abundancia értékek a *Bsh12361* és *BsuRI* restriktív endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Abszolút kontrol talaj, amely nem kapott NPK szerves műtrágya kezelést "Absz. kontrolként" van jelölve. Az egyes számok 2,3,4 jelölik az alkalmazott bioszén dózist ( $3 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $3 = 15 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $4 = 30 \text{ t ha}^{-1}$ ). A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). A különböző betűk (a, b) idézőjelben az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelöli  $P < 0,05$  szinten.



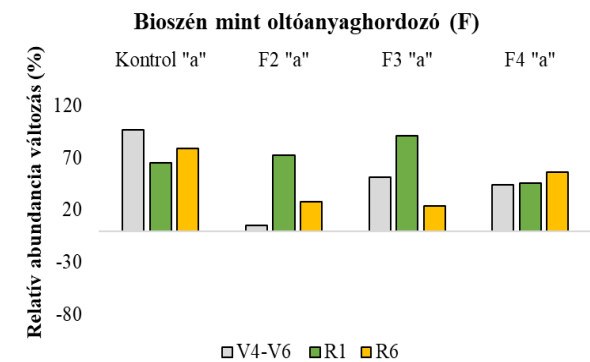
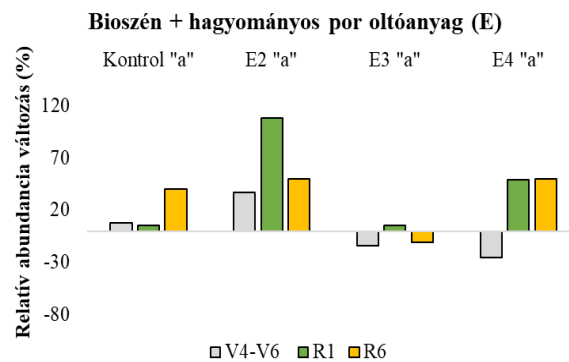
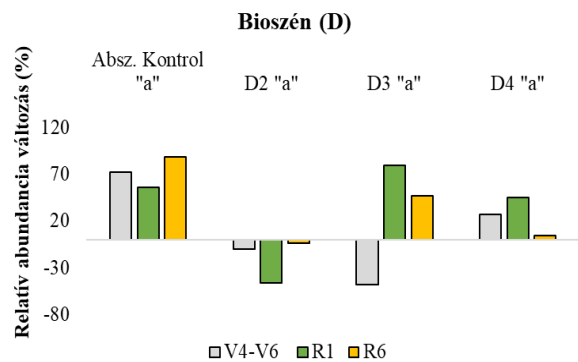
13. ábra. Az *Arthrobacter crystallopoietes* közösségen belüli arányváltozása a 0-ik napi kontrol talajmintához képest. A relatív abundancia értékek a *Bsh12361* és *BsuRI* restriktív endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Abszolút kontrol talaj, amely nem kapott NPK szerves műtrágya kezelést "Absz. kontrolként" van jelölve. Az egyes számok 2,3,4 jelölik az alkalmazott bioszén dózist ( $3 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $3 = 15 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $4 = 30 \text{ t ha}^{-1}$ ). A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). A megegyező betűk (a) idézőjelben az egyes kezelések között nem tapasztalt szignifikáns különbségeket jelölik  $P < 0,05$  szinten.

*Arthrobacter crystallopoietes* oltás előtt a savanyú homokos talaj bakteriális közösségének 1–2.9%-át képviselte. A kísérleti periódus alatt az *Art. crystallopoietes* közösségen belüli arányváltozása nem mutatott szignifikáns eltéréseket a kezelt és a kontrol talajok között. Mégis a kukorica reprodukív fázisaiban (R1, R6) – összevetve a vegetatív 4-6 leveles fázishoz – az *Art. crystallopoietes* relatív gyakorisága egyaránt megemelkedett a kontrol és a kezelt talajokban is. A kontrol talajhoz viszonyítva a nagy dózisu 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén (A4) kezelés, és a bioszén mint oltóanyag hordozóként való használata (minden egyes dózisban) pozitívan befolyásolta az *Art. crystallopoietes* közösségen belüli arányát mindhárom növekedési fázisban. Zheng és mtsai 2019-ben a rizs és szójabab alapanyagú bioszén hatékonyságát igazolták, mint az *Arthrobacter* fajok oltóanyag hordozója. A szervesetlen foszfát szolubilizáló *Arthrobacter* nemzetség tagjait leginkább a bioszén foszfor és nitrogén tartalma volt a legnagyobb hatással, a porozitás és a fajlagos felülete mellett. Fox és mtsai 2014-ban az óriás virágos nád (*Miscanthus giganteus*) alapanyagú bioszén hatására szignifikáns növekedést tapasztaltak az *Arthrobacter* nemzetség tagjain belül. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy mind a natív és mind az inokulált baktériumok túlélése a bioszén a tápanyagmegkötő képességétől nagyban függ (Zheng et al., 2019).

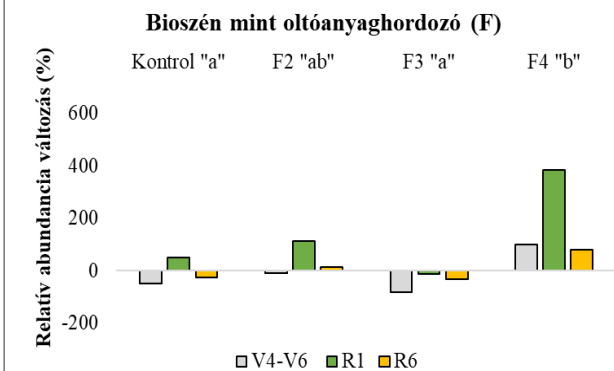
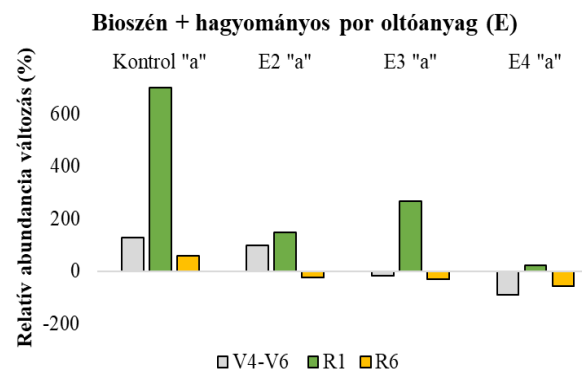
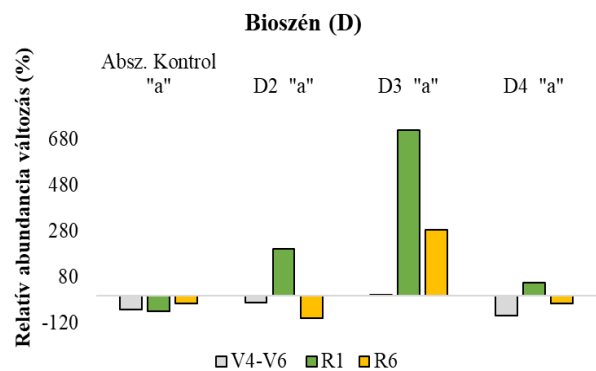
#### VI.1.2.2 Lúgos Mollic Umbrisol (Órbottyán) talajra adaptált PGPR oltóanyagok

Az órbottyáni karbonátos homokos talajon az oltást megelőzően az *Azospirillum brasilense* közösségen belüli aránya 3,6-5,0 % volt, míg az *Azospirillum irakense* 0,5-2,5% közösségen belüli relatív gyakorisággal rendelkezett (14. ábra). A kezeléseknél köszönhetően szignifikáns változásokat az *A. brasilense* relatív abundancia változásaiban bár nem tapasztaltunk, a bioszén + hagyományos oltóanyag hordozó alkalmazása során a kis dózis (E2: 3 t ha<sup>-1</sup> + 1,7 × 10<sup>11</sup> PGPR) kezelés hatására kukorica teljes egyedfejlődése során megnőtt a közösségen belüli aránya.

Az *Azospirillum irakense* esetében viszont szignifikánsan növelte a faj közösségen belüli arányát a nagy dózisu (30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés a kontrol és a közepes dózisu kezeléssel szemben (15. ábra). Addig amíg bioszén oltóanyag hordozóként való használata, minden dózisban, a kontroll talajban tapasztaltakhoz hasonlóan segítette elő az *A. brasilense* arány változását, addig a kis dózisu 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén (D2) kezelés használata negatívan befolyásolta a faj közösségen belüli arányát. Továbbá, a csak bioszén kezelést kapott talajok nagyobb dózisu esetén is faj közösségen belüli aránya elmaradt a kontrol talajban tapasztaltakhoz képest, hasonlóan az *Azospirillum irakense* bioszén + hagyományos por

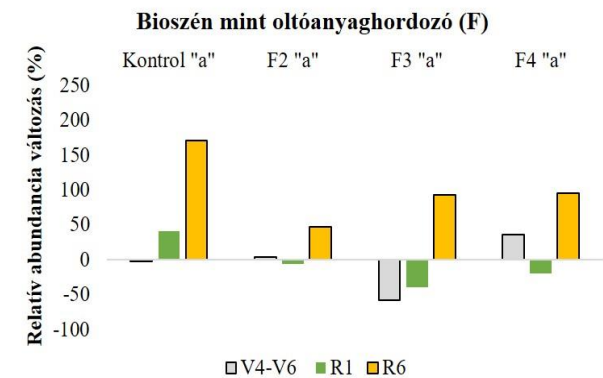
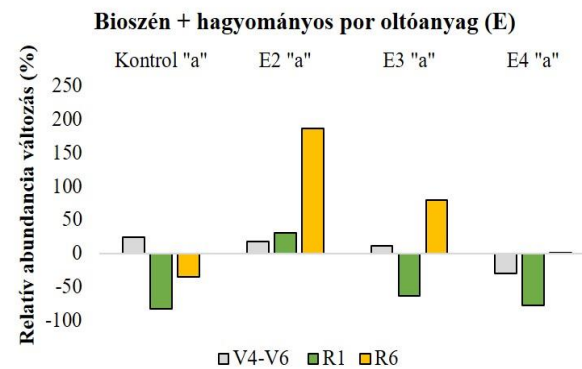
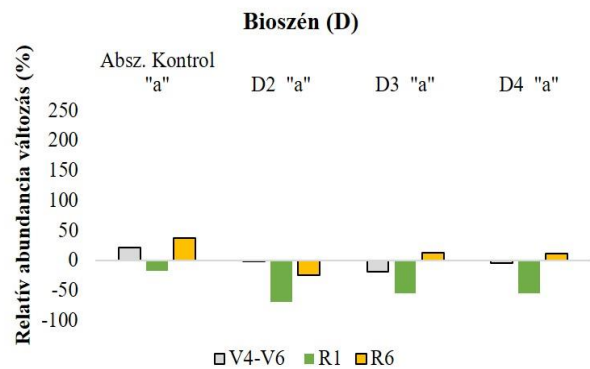


14. ábra. Az *Azospirillum brasilense* közösségen belüli arányváltozása a 0-ik napi kontrol talajmintához képest. A relatív abundancia értékek a *Bsh12361* és *BsuRI* restriktációs endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Abszolút kontrol talaj, amely nem kapott NPK szerves műtrágya kezelést "Absz. kontrolként" van jelölve. Az egyes számok 2,3,4 jelölik az alkalmazott bioszén dózist ( $3 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $3 = 15 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $4 = 30 \text{ t ha}^{-1}$ ). A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). A megegyező betűk (a) idézőjelben az egyes kezelések között nem tapasztalt szignifikáns különbségeket jelölik  $P < 0,05$  szinten.



15. ábra. Az *Azospirillum irakense* közösségen belüli arányváltozása a 0-ik napi kontrol talajmintához képest. A relatív abundancia értékek a *Bsh12361* és *BsuRI* restriktációs endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Abszolút kontrol talaj, amely nem kapott NPK szerves műtrágya kezelést "Absz. kontrolként" van jelölve. Az egyes számok 2,3,4 jelölik az alkalmazott bioszén dózist ( $3 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $3 = 15 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $4 = 30 \text{ t ha}^{-1}$ ). A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). A különböző betűk (a, b) idézőjelben az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelöli  $P < 0,05$  szinten.





16. ábra. A *Kocuria rosea* közösségen belüli arányváltozása a 0-ik napi kontrol talajmintához képest. A relatív abundancia értékek a *Bsh12361* és *BsuRI* restrikciós endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Abszolút kontrol talaj, amely nem kapott NPK szerves műtrágya kezelést "Absz. kontrolként" van jelölve. Az egyes számok 2,3,4 jelölik az alkalmazott bioszén dózist ( $3 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $3 = 15 \text{ t ha}^{-1}$ ;  $4 = 30 \text{ t ha}^{-1}$ ). A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). A megegyező betűk (a) idézőjelben az egyes kezelések között nem tapasztalt szignifikáns különbségeket jelölik  $P < 0,05$  szinten.

oltóanyag kezeléshez. Ez felhívja a figyelmet a bioszén általi szerves anyagpótlás során az alkalmazott dózis és a talaj minőségének együttes befolyásoló hatására (Ding és mtsai, 2016).

Ahogy azt Prendergast és Miller 2014-ben bemutatta, a bioszén használata visszavetheti a növényi gyökérszőrök növekedését a kontrol talajhoz képest, a bioszén magas foszfor tartalmának köszönhetően. Ebből kifolyólag a rizoszféra mikróbák egy része a bioszén felszínéhez kötődve fordul elő (Lehmann, 2007).

Az IAA és EPS termelő *Kocuria rosea* kezdeti közösségen belüli arányát (1,5-4,2 %) az egyes kezelések nem változtatták meg szignifikánsan (16. ábra). A kis dózisú bioszén + hagyományos por oltóanyag kezelés hatására kukorica teljes egyedfejlődése során nőtt a faj közösségen belüli aránya a kezdeti időponthoz képest. Fox és mtsai 2014-ben tenyészedényes tanulmányukban az óriás virágosnád (*Miscanthus giganteus*) alapanyagú bioszén kezelés hatására szignifikáns mértékben megnövekedett közösségen belüli arányát tapasztalták a foszfát-szolubilizáló *Kocuria rizophila* fajnak angolperje (*Lolium perenne*) esetében.

A *Bacillus aryabhattai* és *Paenibacillus peoriae* baktériumok közösségen belüli relatív gyakorisága 1%-ék alatt maradt a kezelt és kezeletlen talajokban egyaránt. Ezért a szervezetek közösségen belüli arány változását nem ábrázoltuk, viszont az egyes időpontokban mért relatív abundancia értékeket táblázatosan a XI. Függelék 10. táblázatában mutatjuk be.

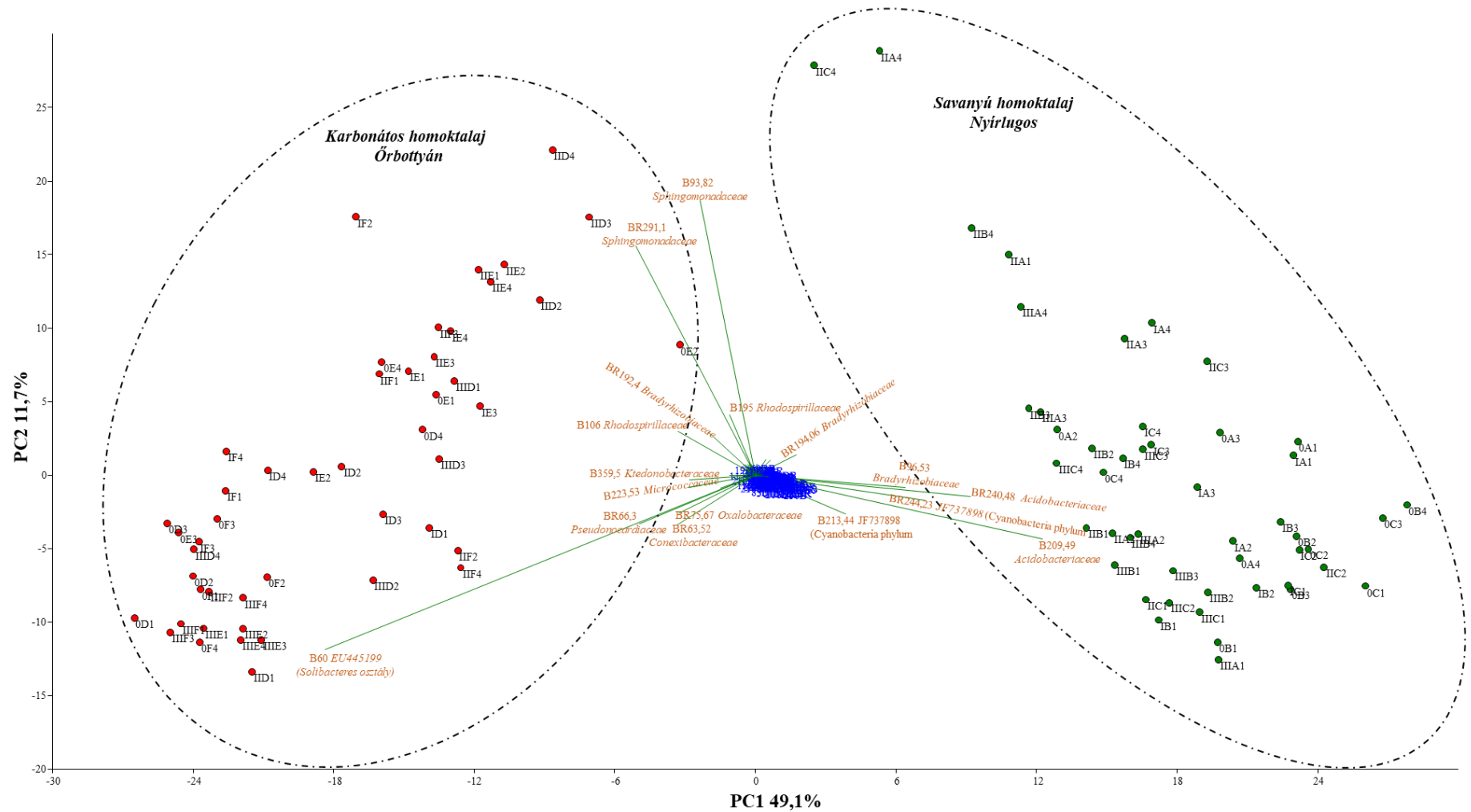
### VI.1.3 A kukorica rizoszféra bakteriális közösségében végbemenő változások a genotípusos és fenotípusos vizsgálatok segítségével

#### VI.1.3.1 „Szekvenciával-támogatott T-RFLP” analízis

A „szekvenciával-támogatott T-RFLP” (sequence-aided T-RFLP) analízis lehetővé teszi, hogy nyomon kövessük a kukorica rizoszféra mikroba közösségeiben bekövetkező változásokat a különbségeket okozó domináns T-RF azonosítása mellett. A PCA biplot analízis első két főkomponense (17. ábra) a teljes variancia 60,8% reprezentálta. Szignifikáns ( $R^2=0,9776$ ;  $P=0,0001$ ) különbséget mutatott a savanyú és karbonátos homokos talaj rizoszférájának bakteriális közösség szerkezete. Az első főkomponens (a teljes variancia 49,1%-a) szerint válik el a két különböző talaj bakteriális közösség szerkezete. Az elválást okozó domináns T-RF-ek a savanyú talaj esetében az Acidobacteriaceae család, míg a karbonátos talaj esetében a Solibacteres osztályba tartozó EU445199 család tagjainak köszönhető, mindkét szervezet az Acidobacteria törzsbe tartozik.

A karbonátos homokos talaj és savanyú homokos talaj bakteriális közösség szerkezetei közötti szignifikáns különbség a talaj fizikai kémiai különbségének köszönhető. Mezőgazdasági talajokon Bartram és mtsai (2014) a talaj pH gradiense (4,5-től 7,5-ig) menti változásokat figyeltek meg az egyes baktérium taxon csoportok között. Hasonlóan hozzánk az Acidobacteria változatos előfordulását mutatták be különböző pH tartományú talajokban, amely értelmében specifikus Acidobacteria alcsoportok különböző pH tartományú környezetekhez adaptálódtak.

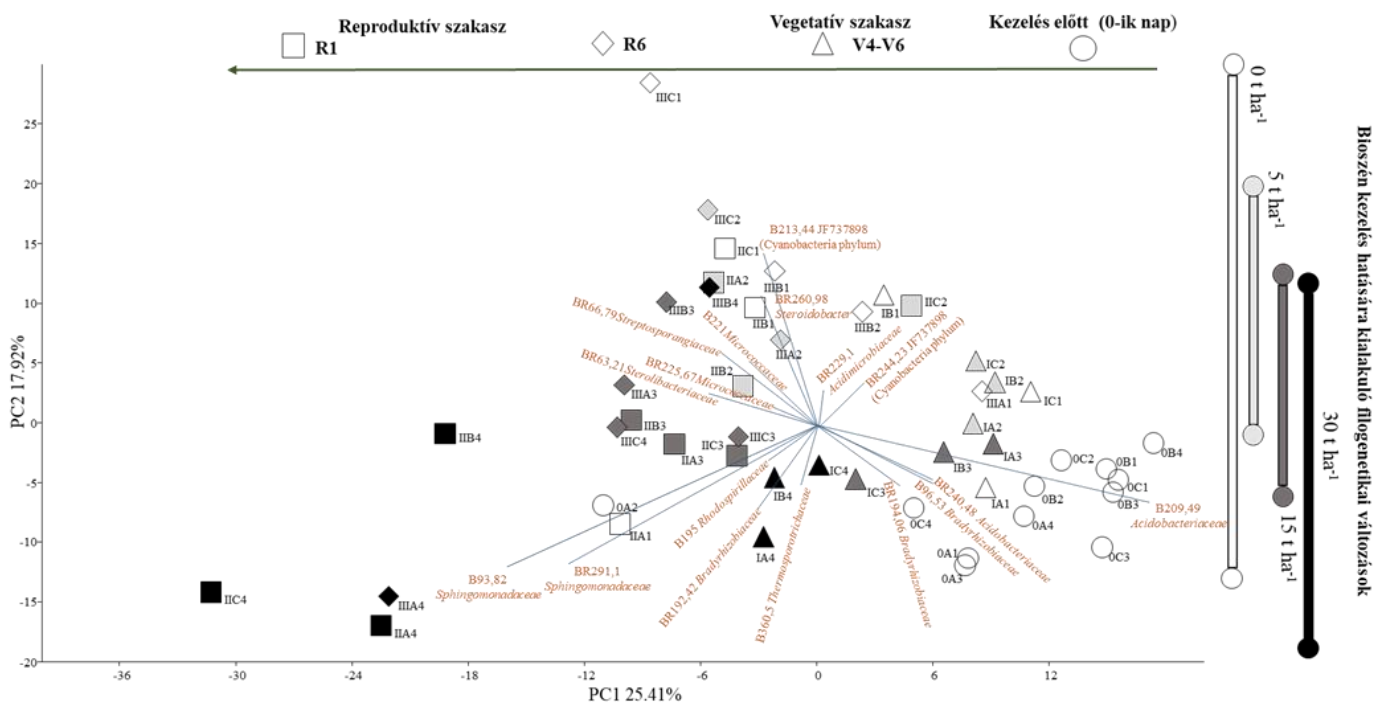
A második főkomponens (teljes variancia 11,7%) szerinti elválást a Sphingomonadaceae család tagjainak köszönhető. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a második főkomponens szerinti elválás hátterét (kezelés, növény fenofázisa stb.) az egyes talajok bakteriális közösségszerkezetét külön-külön is megvizsgáltuk.



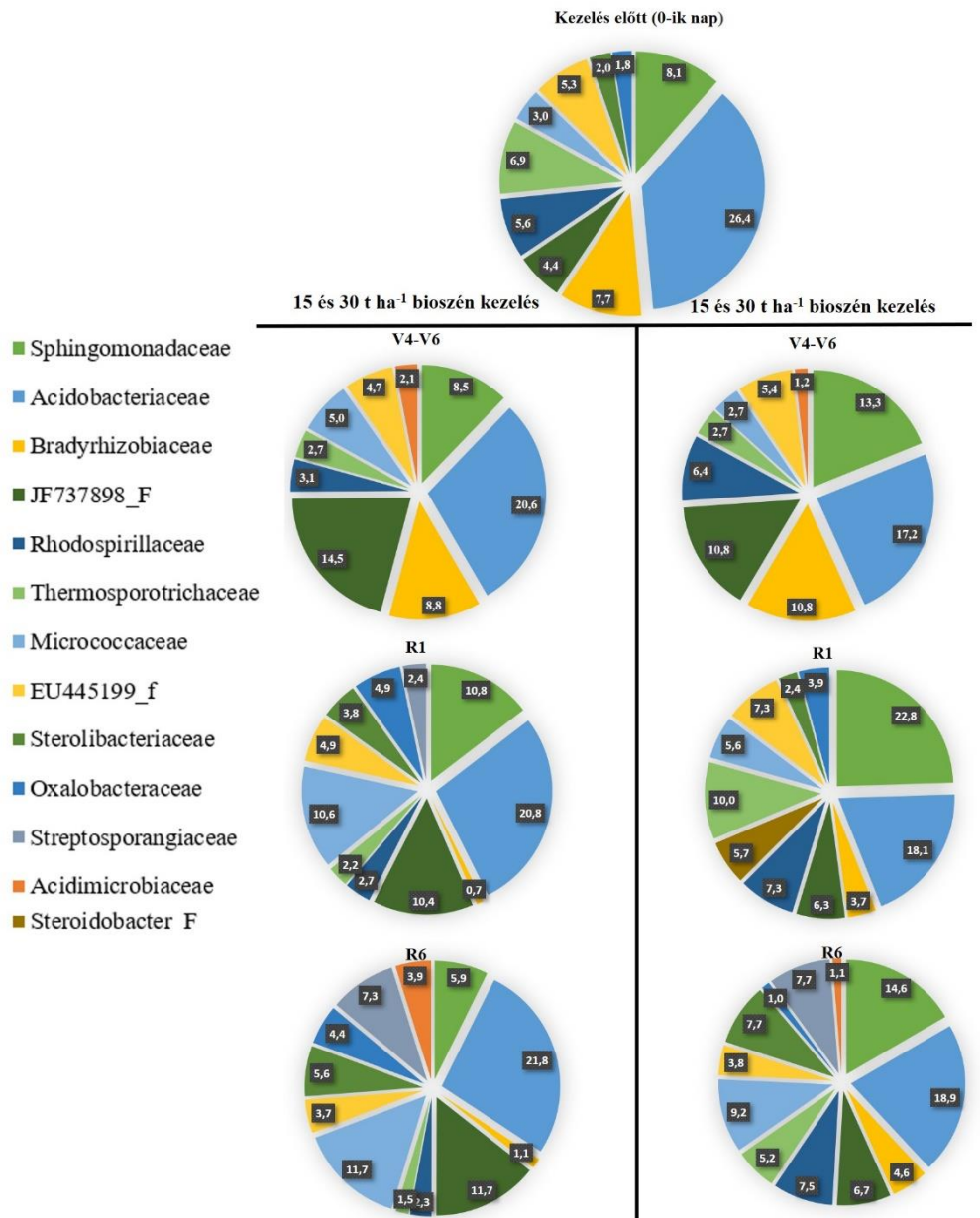
17. ábra. A két különböző talajból származó kukorica rizoszféra bakteriális közösség szerkezetét ábrázoló főkomponens analízis (PCA), *Bsh12361* and *BtsCI* restriktions endonukleázok felhasználásával. A *Bsh12361* általi emésztés által kapott T-RF-ek 'B', míg a *BsuRI* enzim általi emésztést 'BR' jelöléssel ábrázoltuk. A domináns T-RF-hez tartozó baktérium családok a restriktions endonukleázzal együtt kerültek ábrázolásra. A klónkönyvtár elkészítéséhez az alábbi minták lettek feldolgozva: 0A1; IA4; IIA4; IIIA4; IIC4; IIIC4; 0D1; 0D2; 0D3; 0D4

### VI.1.3.1.1 Savanyú Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talaj esetében

A főkomponens analízis (PCA) az első két komponens bakteriális közösség teljes variációjának 46,5%-át reprezentálja (18. ábra). A Lamellic Arenosol (Nyírlugos) kukorica rizoszférájának bakteriális közösség szerkezetét a nagy dózisu bioszén kezelés ( $R^2 = 0.295$ ;  $p = 0.0001$ ) szignifikánsan befolyásolta, a kukorica fenofázisa mellett ( $R^2 = 0.607$ ;  $p = 0.0001$ ). A  $3t\ ha^{-1}$  bioszén kezelés, a kontrol talajhoz hasonlóan, nem volt szignifikáns hatással a talaj bakteriális közösség szerkezetére. A kukorica egyedfejlődési szakaszaival összefüggő közösség szerkezeti változások az első főkomponens szerint rendeződtek (a teljes variancia 25,41%), a nagy dózisu bioszén kezeléssel kapcsolatos változások pedig a második főkomponens szerint (a teljes variancia 17,92%) (18. ábra). A növény fenofázisa által befolyásolt bakteriális közösségen belüli változások már több korábbi tanulmány is bemutatta (Li és mtsai, 2014; Yang és mtsai, 2017;). A nagydózisu bioszén kezelés hatására bekövetkező a bakteriális közösségen belüli szignifikáns változásokat tapasztalt korábban Cheng és mtsai (2017), illetve Han és mtsai (2017) is.



18. ábra. A savanyú homokos (Lamellic Arenosol) talaj kukorica rizoszférájának bakteriális közösség szerkezetét ábrázoló főkomponens analízis (PCA), Bsh12361 and BtsCI restriktív endonukleázok felhasználásával. A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). Az egyre inkább feketedő minta jelölés az alkalmazott bioszén dózissal függ össze. Ennek értelmében a fehér = 0 t ha<sup>-1</sup> bioszén, világos szürke = 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén, sötét szürke = 15 t ha<sup>-1</sup> és fekete 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén. A Bsh12361 általi emésztés által kapott T-RF-ek 'B', míg a BsuRI enzim általi emésztést 'BR' jelöléssel ábrázoltuk. A domináns T-RF-hez tartozó baktérium családok a restriktív endonukleázzal együtt kerültek ábrázolásra. A klónkönyvtár elkészítéséhez az alábbi minták lettek feldolgozva: 0A1; IA4; IIA4; IIIA4; IIC4; IIIC4



19. A 0 és 3 t ha<sup>-1</sup> és nagy dózisu 15, illetve 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajok baktérium családjainak a közösségen belüli százalékos aránya, a kukorica különböző egyedfejlődési szakaszaiban. A relatív abundancia értékek a Bsh12361 és BsuRI restriktions endonukleázal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Csak azok a baktérium családok kerültek kimutatásra, amelyekhez T-RF-ek elsődlegesen tehető felelőssé a két csoport közötti elválásért a kukorica fenofázisa során (az egyes csoportok elválásához együttesen 50%-ban járulnak hozzá, és közösségen belüli relatív gyakoriságuk  $\geq 2\%$ ).

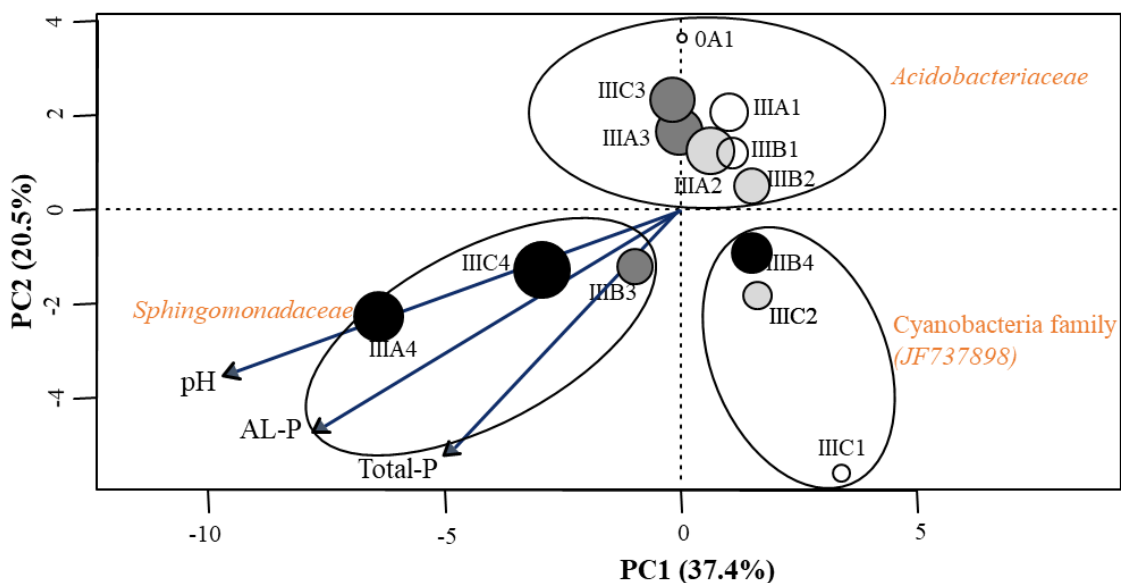
SIMPER módszer segítségével meghatároztuk az elválást leginkább befolyásoló csúcsokat a kukorica fenofázisa, illetve a nagy dózisu bioszén kezelés függvényében. A nagy dózisu (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a Sphingomonadaceae család (pl: *S. palustris*, *S. jaspsi*, *S. glacialis*, *S. pruni*, JQ426858, AM697355; V4–V6 +4.8%; R1 +12%; R6 +8.7%) közösségen belüli aránya, hasonlóan a Rhodospirillaceae család tagjaihoz

(pl. *Azospirillum brasilense*, EF516955, AM936715; V4–V6 +3.3%; R1 +4.5%; R6 +5.2%) a kukorica fenofázisa során, a 0 vagy 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezeléssel szemben. A Bradyrhizobiaceae (pl: *B. mercantei*, *B. jicamae*, *B. japonicum*, *B. lablabi*, *B. rifense*) család tagjainak közösségen belüli aránya szintén magasabb volt a nagy bioszén kezelés hatására (V4–V6 +2%; R1 +3%; R6 +3.5%). A Thermosporotrichaceae (R1 +3.6%; R6 +3.7%), Sterolibacteriaceae (R1 +3.5%; R6 +2.1%), és Streptosporangiaceae (R1 +1.5%; R6 +0.4%) család tagjainak közösségen belüli aránya szintén magasabb volt a kukorica fenofázisa során, mint a 0 vagy 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajok esetében. Az Acidobacteriaceae család tagjainak közösségen belüli aránya viszont a nagy dózisú bioszén kezelés (15 és 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén) szignifikánsan csökkent (V4–V6 –3.4%; R1 –2.7%; R6 –2.9%), hasonlóan a JF737898 (Cyanobacteria rend) családhoz (V4–V6 –3.7%; R1 –4.1%; R6 –4.9%). A Micrococcaceae (V4–V6 –2.3%; R1 –0.7%; R6 –2.5%), Oxalobacteraceae (R1 –2.5%; R6 –3.3%) és Acidimicrobiaceae (V4–V6 –0.9%; R6 –2.8%) család tagjainak közösségen belüli aránya szintén csökkent (19. ábra).

A Sphingomonadaceae család tagjainak bioszén kezelés hatására megnövekedett arányát tapasztalta korábban Anderson és mtsai (2011), Xu és mtsai (2014), illetve Kolton és mtsai (2017) is. A Sphingomonadaceae organizmusai fontos szerepet játszanak a szén körforgalomban, számos szénforrás hasznosítási képessége által (Shintani és mtsai, 2007; Boersma és mtsai, 2009). A szignifikánsan megemelkedett közösségen belüli arányuk, a bioszén kezelés következtében a talajba juttatott pirogén szén formáknak köszönhető (Thu és mtsai, 2018).

A légköri N<sub>2</sub> fixációban szerepet játszó családok (Rhodospirillaceae, Bradyrhizobiaceae) közösségen belüli aránya megnőtt a nagy dózisú bioszén kezelés hatására (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>). Anderson és mtsai (2011), illetve Thu és mtsai (2018) szintén a Rhodospirillaceae család megemelkedett közösségen belüli arányát tapasztalták faalapú (*Pinus radiata*, és *Eucalyptus saligna*) bioszén kezelést követően savanyú talajon (Ferralsol és Templeton) Ezzel szemben Xu és mtsai (2014) a Rhodospirillaceae szignifikánsan lecsökkent arányát tapasztalta rizsszalma alapanyagú bioszén esetében Acrisol talajon (pH 4,48). Ezek az ellentétes tapasztalatok rávilágítanak a bioszén alapanyagának kiemelt fontosságára, a mikrobiális közösség szerkezet szempontjából (Zhu és mtsai, 2017). A N<sub>2</sub> fixáló és denitrifikáló Bradyrhizobiaceae család tagjainak közösségen belüli aránya a nagy dózisú bioszén kezelés hatására szintén megnőtt, hasonlóan több korábbi tanulmányhoz (Anderson és mtsai, 2011; Khan és mtsai, 2014; Kolton és mtsai, 2017).

Az Acidobacteriaceae csökkenő arányát tapasztalta Cheng és mtsai (2017), illetve Li és mtsai (2018) a bioszén használatát követően. Az Acidobacteriaceae család tagjai oligotróf és alacsony pH- tartományú talajokban gyakoriak. A bioszén következtében csökkenő közösségen belüli aránya összefüggésbe hozható a bioszén következtében kialakuló kopiotróf és semleges pH tartományú talaj környezetnek (Li és mtsai, 2018). A kutatásunk során a kopiotróf baktérium családoknak a megemelkedett közösségen belüli aránya melyek az Alphaproteobacteria (Sphingomonadaceae, Rhodospirillaceae, Bradyrhizobiaceae) és Actinobacteria (Streptosporangiaceae) osztályba tartoznak, igazolják a bioszén használat következtében kialakuló „kopiotróf baktérium közösségi változást” (Jenkins és mtsai, 2017).



20. ábra PCA ordinációja a savanyú homokos talaj kukorica R6 (fiziológiai érés) rizoszférájának és a kezelés előtti talajnak (0A1) a bakteriális közösség szerkezetéről, a Bsh12361 and BtsCI restriktív endonukleázok felhasználásával. Az egyre inkább feketedő minta jelölés az alkalmazott bioszén dózissal függ össze. Ennek értelmében a fehér = 0 t ha<sup>-1</sup> bioszén, világos szürke = 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén, sötét szürke = 15 t ha<sup>-1</sup> és fekete 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén). A kezelés hatása a növény biomasszájára (t ha<sup>-1</sup>) a mintákat ábrázoló buborékok méretével arányos (0A1 minta nem reprezentál biomassza mennyiséget). Azok a baktérium családok kerültek ábrázolásra, melyek a SIMPER módszer segítségével legalább 8%-ban hozzájárultak az elváláshoz. A környezeti paraméterek vektorként kerültek ábrázolásra.

Annak érdekében, hogy jobban megértsük és összefoglaljuk a bioszén által befolyásolt talaj paraméterek, a bakteriális közösség dinamikája és kukorica biomassza közötti kapcsolatot a szignifikáns talaj paramétereket a T-RFLP adatok főkomponens elemzése által kapott ordinációra illesztettük, továbbá buborékdiagram „bubble plot” segítségével ábrázoltuk a kukorica biomassza adatait az egyes kezeléseknél (20. ábra). Rékási és mtsai (2018) a szabadföldi kísérletsorozatunk fizikai-kémiai elemzése során világossá vált, hogy a savanyú talaj pH, P és K tartalma erős, míg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N tartalma mérsékelt korrelációt mutat a bioszén

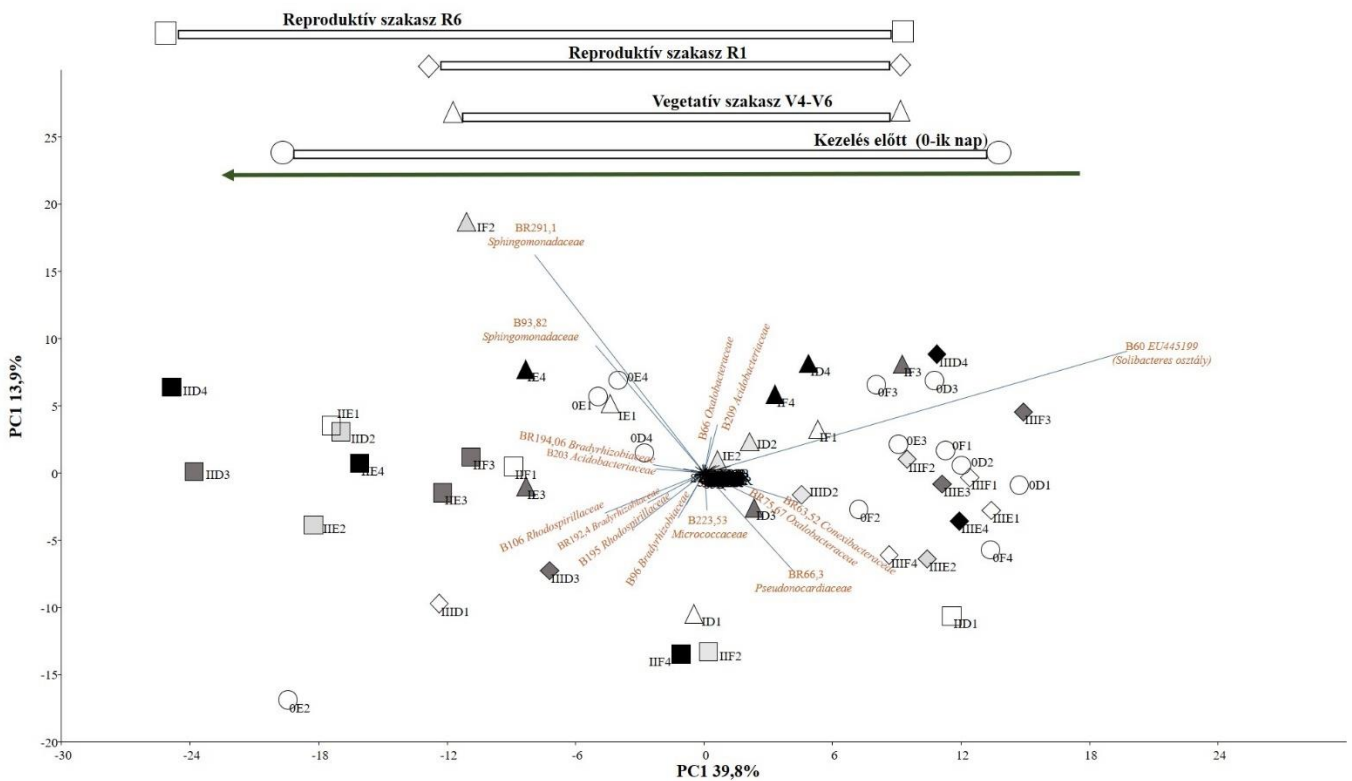


kezeléssel. Jelen kutatás eredményei viszont tisztázták, hogy 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelés PGPR oltóanyag nélkül volt a legnagyobb hatással a talaj bakteriális közösség szerkezetére, a kemoorganotróf Sphingomonadaceae család tagjai voltak a legnagyobb arányban. Az eredmények rámutattak, hogy a bioszén által a talajba juttatott szénformák szelektív nyomást gyakoroltak a gyors növekedési ütemmel rendelkező Sphingomonadaceae család tagjaira (r-stratégisták). 149 nappal a kezelést követően (R6 fázis) több nagy dózisu bioszén kezelést kapott talaj (IIIC3, IIIA3; IIIB4) oligotróf alacsony pH környezetet mutatott, hasonlóan a kezdeti abszolút kontroll talajhoz (0A1), illetve a 0 vagy 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott területekhez. Ezekben az oligotróf környezetekben a lassan növekedő K-stratégista szervezetek, az Acidobacteriaceae család tagjai voltak a leggyakoribbak.

Rékási és mtsai (2018) mérései alapján arra következtetésre jutottak, hogy a legnagyobb kukorica biomassza növekedést a bioszénnel kezelt talajokban tapasztalták. A mi kutatási eredményeink viszont rávilágítottak, hogy a bioszén használata mellett, hogy a talaj fizikai-kémiai paramétereit, és mikrobiális közösségszerkezetét egyaránt befolyásolja, a bioszénnek mint oltóanyag hordozónak szignifikáns hatása van a szabadföldi terméseredményekre. A bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés (C3-as) nem csak szignifikánsan megemelte az *A. brasilense* közösségen belüli relatív gyakoriságát, hanem a kukorica biomasszáját is növelte. A többi kezelés esetében az elmaradt szignifikáns növény hatás köszönhető a nagyon alacsony éves csapadékszintnek, a nem elegendő kiegészítő öntözéssel együtt. A bioszén kezelés hatására kifejtett pozitív változások a talaj fizikai kémiai paramétereiben és az ezzel összefüggő termésmennyiségre a szárazság stressz következtében gátlódhatnak. Az eredmények tisztázták, hogy a bioszén mint hagyományos oltóanyag hordozó (C) képes a kukorica biomassza növekedését elősegíteni extrém savanyú (4,4 pH) homokos talajban, szárazság stressz idején is. Mivel a sikeres növényi növekedés serkenetés alapfeltétele a hatékony gyökré kolonizáció (Buddrus-Schiemann és mtsai, 2010), a kukorica biomasszájának növekedése a PGPR szervezetek túlélésre utal a bioszén felszínén. Mindez utal a bioszén jól kiterjedt és meghatározott porozitásának mikrobiális élettér teremtő funkciójára, amelyben megtapadva az egyes PGPR szervezetek kifejtetik jótékony hatásukat (Ding és mtsai, 2016; Vurukonda és mtsai, 2016). Ezek az eredmények a bioszén, mint hatékony oltóanyag hordozó tulajdonságára utalnak.

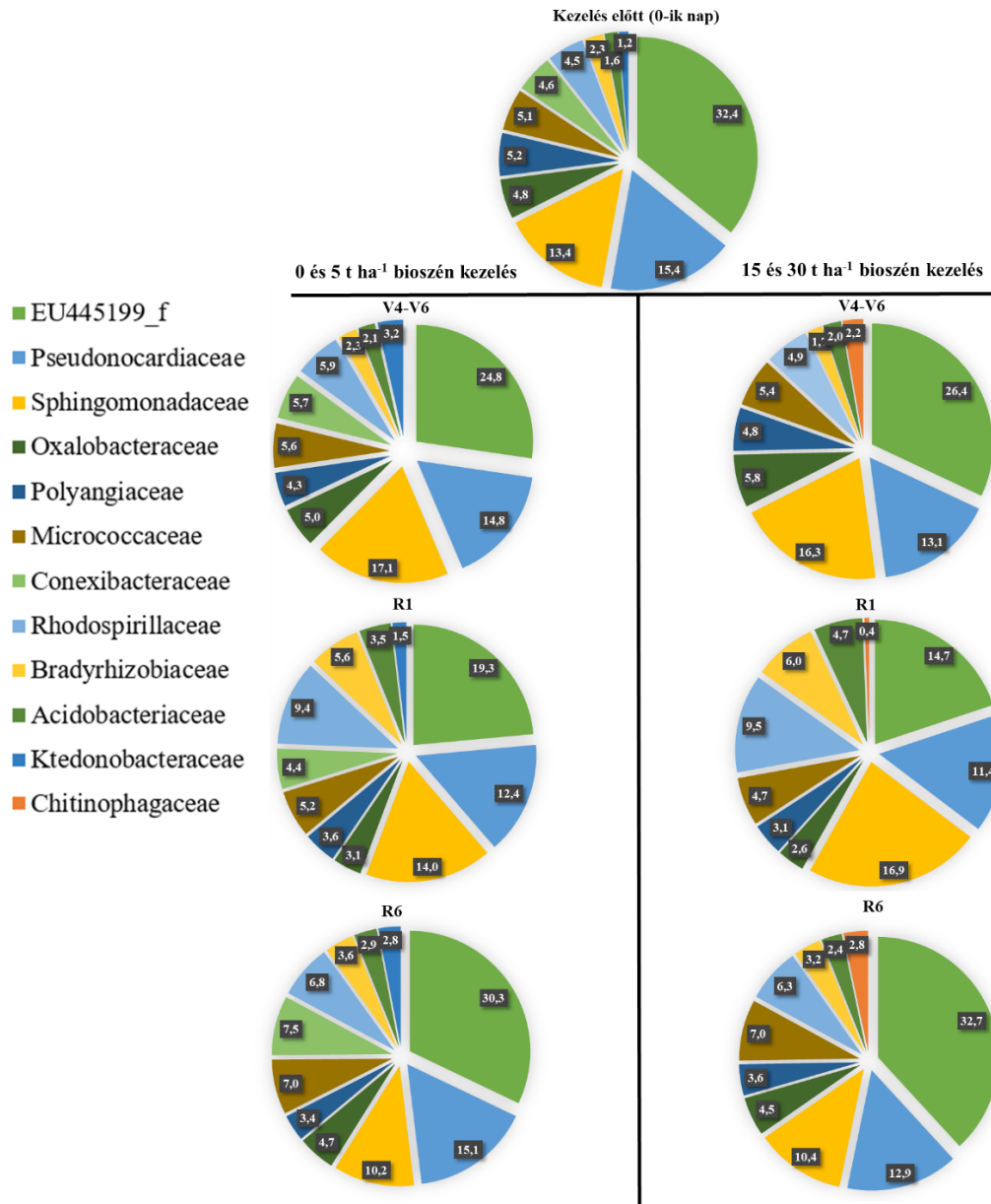
### VI.1.3.1.2 Karbonátos Mollic Umbrisol (Őrbottyán) talaj esetében

A karbonátos homokos talaj főkomponens analízisének (PCA) az első két komponense a bakteriális közösség teljes varianciájának 53,7%-át reprezentálja (21. ábra). A Mollic Umbrisol (Őrbottyán) kukorica rizoszférájának bakteriális közösség szerkezetét a kukorica fenofázisa szignifikánsan befolyásolta ( $R^2 = 0,42892$ ;  $p = 0,0001$ ). A bioszén kezelés, dózistól függetlenül, a bakteriális közösség szerkezet időbeli változásait nem módosította szignifikánsan ( $R^2 = -0,03442$ ;  $p = 0,6518$ ). A kukorica egyedfejlődési szakaszaival összefüggő közösség szerkezeti változások az első főkomponens szerint rendeződtek (a teljes variancia 25,41%), a nagy dózisu bioszén kezeléssel kapcsolatos változások pedig a második főkomponens szerint (a teljes variancia 39,8%) (21. ábra).



21. ábra A karbonátos homokos (Mollic Umbrisol) talaj kukorica rizoszférájának bakteriális közösség szerkezetét ábrázoló főkomponens analízis (PCA), Bsh12361 and BtsCI restriktív endonukleázok felhasználásával. A kukorica növekedési fázisainak jelölés V4–V6 (négy-hat leveles állapot), R1 (bibekitolás), R6 (érettség). Az egyre inkább feketedő minta jelölés az alkalmazott bioszén dózissal függ össze. Ennek értelmében a fehér = 0 t ha<sup>-1</sup> bioszén, világos szürke = 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén, sötét szürke = 15 t ha<sup>-1</sup> és fekete 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén). A Bsh12361 általi emésztés által kapott T-RF-ek 'B', míg a BsuRI enzim általi emésztést 'BR' jelöléssel ábrázoltuk. A domináns T-RF-hez tartozó baktérium családok a restriktív endonukleázal együtt kerültek ábrázolásra. A klónkönyvtár elkészítéséhez az alábbi minták lettek feldolgozva: 0D1; ID4; IID4; IIID4.

A nagy dózisu (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelés hatására szignifikánsan csökkent a Pseudonocardiaceae család (pl: PAC000300\_s; V4–V6 -1,7%; R1 -1,0%; R6 -2,2%) közösségen belüli aránya. A Solibacteres osztályba tartozó EU445199 család tagjai, hasonlóan a Polyangiaceae család (*Labilithrix* sp.) tagjaihoz a kukorica egyedfejlődésének reprodukív R1-bibekitolás szakaszában bár kisebb volt a közösségen belüli aránya, a többi mintavételi időpontban nagyobb a volt a nagy dózissal kezelt talajokban (V4–V6 +1,6%; R1 -4,6%; R6 +4.4%), mint a 0 és 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelés esetében.



22. ábra. A 0 és 3 t ha<sup>-1</sup> és nagy dózisu 15, illetve 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajok baktérium családjainak a közösségen belüli százalékos aránya, a kukorica különböző egyedfejlődési szakaszaiban. A relatív abundancia értékek a Bsh12361 és BsuRI restriktós endonukleázal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlagát tartalmazza. Csak azok a baktérium családok kerültek kimutatásra, amelyekhez T-RF-ek elsődlegesen tehetők felelőssé a két csoport közötti elválásért a kukorica fenofázisa során (az egyes csoportok elválásához együttesen 50%-ban járulnak hozzá, és közösségen belüli relatív gyakoriságuk  $\geq 2\%$ ).

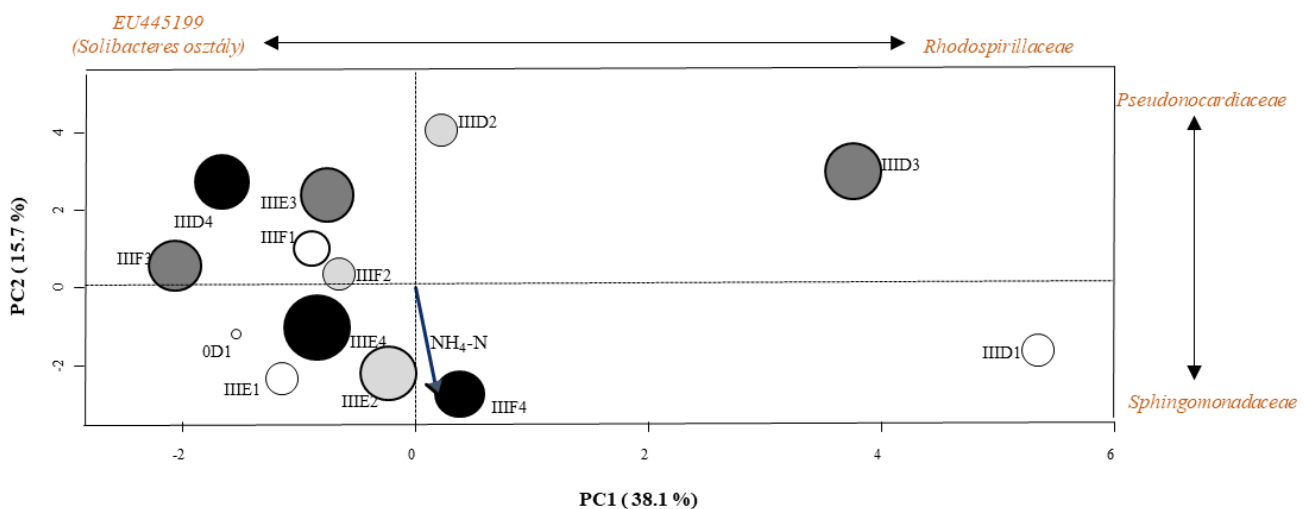
A Sphingomonadaceae család tagjainak közösségen belüli aránya a növény reprodukív egyedfejlődési szakaszaiban (R1: +2,9%; R: +0,2%) magasabb volt a nagy dózisú bioszénrel kezelt talajban. A Rhodospirillaceae (pl: *Azospirillum brasilense*, EF516955, AM936715), Bradyrhizobiaceae (pl: *B. mercantei*, *B. jicamae*, *B. japonicum*, *B. lablabi*, *B. rifense*) Oxalobacteraceae (pl: *Noviherbaspirillum denitrificans*, *Noviherbaspirillum* sp.) család tagjainak közösségen belüli arányváltozása nem mutatott összefüggést az alkalmazott bioszén kezeléssel, hasonlóan a további SIMPER módszer segítségével meghatározott, az elválást leginkább befolyásoló, baktérium családokhoz.

A szignifikánsan csökkenő Pseudonocardiaceae család tagjainak közösségen belüli aránya, összefüggésbe állhat a bioszén kezelés következtében kialakuló kopiotróf talajviszonyoknak (Jenkins és mtsai, 2017). A család tagjai a stabil, perzisztens szénformák, illetve szennyezőanyag bontó képességéről ismertek (Jiang és mtsai, 2021). A bioszén kijuttatása által a talajba kerülő labilis szénformák magasabb aránya miatt, a tápanyag profilban kialakuló változás miatt, a gyorsabban szaporodó kopiotróf szervezetek túlnőhetik az oligotróf tápanyagforrásokra specializált szervezeteket (Jenkins és mtsai, 2017).

A Zhang és mtsai (2019) 4 talajtípuson végzett tenyészedényes kísérletsorozatuk során a földmogyoróhéj alapanyagú bioszén kezelés hatását vizsgálták a talaj bakteriális közösség szerkezetére. A savanyú talajon talált szignifikáns hatások, melyek leginkább a bioszén következtében megváltozott pH és szervesanyagtartalommal hozható összefüggésbe, a lúgos pH talajokban nem okozott szignifikáns változásokat. Ahogy azt Jeffery és mtsai (2011) által végzett metaanalízis is bemutatta, a bioszén használata következtében kialakuló talaj változások a savanyú és semleges pH tartományú területeken hatékony, mivel a lúgos talajon nem érvényesül a talaj meszező hatása.

A karbonátos Mollic Umbrisol talajon végzett szabadföldi kísérlet esetében, annak érdekében, hogy összefoglaljuk a bioszén által befolyásolt talaj fizikai-kémiai paraméterek, a bakteriális közösség dinamikája és kukorica biomassza közötti kapcsolatot, szintén a szignifikáns talaj paramétereket a T-RFLP adatok főkomponens elemzése által kapott ordinációra illesztettük, a buborékdiaagram segítségével ábrázoltuk a kukorica biomassza adatai mellett (23. ábra). Rékási és mtsai (2018) a karbonátos homokos talaj esetében a megemelkedett P és K elem koncentrációt tapasztalt, a növények által felvehető AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> és AL-K<sub>2</sub>O-hoz hasonlóan. Szignifikáns hatás viszont csak a foszfor elem esetében a bioszén + hagyományos oltóanyag hordozó kezelés (B) során volt tapasztalható. Jelen kutatás eredményei viszont tisztázták, hogy 15 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelés PGPR oltóanyag nélkül volt a legnagyobb

hatással a talaj bakteriális közösség szerkezetére, ahol a Rhodospirillaceae család tagjai voltak a legnagyobb arányban. Az eredmények rámutattak, hogy a bioszén által a talajba juttatott szénformák hasonlóan a savanyú talajhoz továbbra is szelektív nyomást gyakoroltak a gyors növekedési ütemmel rendelkező Rhodospirillaceae család tagjaira (első főkomponens, 38,1%-a teljes varianciának). A második főkomponens szerint is talaj bakteriális közösség változása azon szervezetek mentén történt, akik a labilis szénformákat gyorsan hasznosították, mint a Sphingomonadaceae család tagjai, illetve azok a szervezetek, akik a perzisztens szénformák hasznosítására specializáltak.



23. ábra PCA ordinációja a karbonátos homokos talaj kukorica R6 (fiziológiai érés) rizoszférájának és a kezelés előtti talajnak (0A1) a bakteriális közösség szerkezetéről, a Bsh12361 and BtsCI restriktions endonukleázok felhasználásával. Az egyre inkább feketedő minta jelölés az alkalmazott bioszén dózissal függ össze. Ennek értelmében a fehér = 0 t ha<sup>-1</sup> bioszén, világos szürke = 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén, sötét szürke = 15 t ha<sup>-1</sup> és fekete 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén). A kezelés hatása a növény biomasszájára (t ha<sup>-1</sup>) a mintákat ábrázoló buborékok méretével arányos (0A1 minta nem reprezentál biomassza mennyiséget). Azok a baktérium családok kerültek ábrázolásra, melyek a SIMPER módszer segítségével legalább 4%-ban hozzájárultak az elváláshoz. A környezeti paraméterek vektorként kerültek ábrázolásra.

A bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés legnagyobb dózisa esetében nőtt meg leginkább a talajok NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N tartalma, bár a változás nem volt szignifikáns, mégis a kontrol talajhoz képest 22%-al nőtt az NH<sub>4</sub>-N koncentrációja, amely a kijuttatott PGPR szervezetek N<sub>2</sub> fixációs tevékenységére utalhat (Singh és mtsai, 2011; Rékási és mtsai, 2018). Az eredményeink ezen következtetéseket igazolják, hiszen ez a kezelés volt, amely hatására N<sub>2</sub> fixáló *Azospirillum irakense* közösségen belüli aránya szignifikánsan megemelkedett, míg a kukorica biomassza mennyisége is 15%-ot emelkedett a kontrol talajhoz képest. A legnagyobb biomassza növekedés (+30%) a nagy dózissú bioszén + hagyományos oltóanyag hordozó (E4) kezelés esetében volt. Ezen eredmények hasonlóan a savanyú homokos talajban tapasztaltakhoz, utal a PGPR szervezetek talajban való túlélésükre és sikeres

gyökérekolonizációjára, ezáltal utalva a hatékony oltóanyag-hordozóként való későbbi felhasználásra.

#### VI.1.3.2 Fenotípusos PLFA analízis

A foszfolipid-zsír-sav analízis módszer előnye a mennyiségi meghatározás és a specifikus mikrobacsoportok kimutatásának kombinációjából fakad, valamint abból, hogy a zsírsavak a talajban gyorsan lebomlanak, így a zsír-sav-analízis mindig az aktuális mikrobaközösségről ad információt. A foszfolipid-zsír-sav analízis hátránya eszköz-igényén túl egyes membránlipid-zsír-savak és a biomasza nem egyértelmű összefüggésében keresendő, ugyanis az egyes zsírsavak mennyisége környezeti tényezők hatására fajon belül is eltérhet. Jelentős hátrány továbbá, hogy nagy az átfedés a különböző zsírsavak előfordulása között, és viszonylag kevés a kellő mértékben specifikus zsír-sav (Zelles, 1999). Ennek köszönhetően a PLFA analízis a T-RFLP elemzés érzékenységétől és reprodukálhatóságától elmaradt, így a foszfolipid-zsír-sav elemzés eredményeit az aktuális mikrobaközösség biomasza becslésére tudtuk a leginkább felhasználni.

##### VI.1.3.2.1 Savanyú Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talaj esetében

A foszfolipid-zsír-sav során a kukorica fenofázisával összefüggő mikrobiális közösség szerkezet szignifikáns változását tapasztaltuk a savanyú homokos Lamellic Arenosol (Nyírlugos) talaj esetében ( $R^2 = 0,169$ ;  $p = 0,0061$ ). A bioszén kezelés hatására azonban nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a talaj bakteriális közösség szerkezetében ( $R^2 = 0,008$ ;  $p = 0,4202$ ). A nagy (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) dózisu bioszén kezelés hatására a bakteriális foszfolipid zsír-sav arányokban nem volt változás, bár az "univerzális" foszfolipid zsír-savak aránya konstansan magasabb volt a 15 and 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajokban (9. táblázat).

9. táblázat Foszfolipid zsírsavak mennyisége (nmol PLFA g<sup>-1</sup> talaj) savanyú homokos talajban, csoportosítva specifikus (Gram-negatív, Gram-pozitív és Aktinobaktériumok), „univerzális” és Gram-negatív/Gram-pozitív arányra, a 0 és 3 t ha<sup>-1</sup>, illetve a 15 és 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajokban, a kukorica fenofázisa során.

Közösségi PLFA	A bakteriális foszfolipid-zsírsavak átlagos koncentrációja						
	Vetés előtt	V4-V6 fázis		R1-Bibekitolás		R6-Érés	
	nincs kezelés	0 és 3 t ha <sup>-1</sup> bioszén	15 és 30 t ha <sup>-1</sup> bioszén	0 és 3 t ha <sup>-1</sup> bioszén	15 és 30 t ha <sup>-1</sup> bioszén	0 és 3 t ha <sup>-1</sup> bioszén	15 és 30 t ha <sup>-1</sup> bioszén
	nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj	nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj		nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj		nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj	
Gram-pozitív specifikus PLFA összege (i15:0; a15:0; i16:0; i17:0; a17:0)	410,02±188,62	547,92±383,5 4	461,77±270,60	483,09±116,16	409,16±56,95	399,62±28,78	397,69±24,39
Gram-negatív specifikus PLFA összege (16:1w9; cy17:0; 18:1w7; cy19:0)	681,50±545,77	603,71±298,1 9	486,55±260,30	364,11±54,75	325,03±39,29	340,39±42,04	320,58±24,92
Aktinobaktériumok specifikus PLFA összege (10Me16:0; 10Me17:0; 10Me18:0)	161,65±109,71	162,38±103,7 4	205,32±83,10	278,82±32,51	267,05±18,60	311,29±29,86	276,55±25,62
Az „univerzális” PLFA összege (14:00; 15:00; 16:00; 17:00; 18:00)	640,89±362,60	342,61±383,1 3	769,34±299,39	844,60±52,83	911,98±76,52	811,74±85,47	930,95±59,84
Gram-negatív/Gram-pozitív arány	1,66	1,10	1,05	0,75	0,79	0,85	0,81

A foszfolipid-zsírsv elemzésnek (PLFA) kisebb a felbontóképessége, mint a terminális restriktós fragmens hossz polimorfizmus (T-RFLP) analízisnek, hiszen a bioszén kezeléssel összefüggő mikrobiális közösségszerkezeti változásokat nem detektálta. A PLFA módszer limitált felbontóképessége a T-RFLP módszerhez viszonyítva jól ismert jelenség (Wang és mtsai, 2011). A PLFA elemzés megmutatta viszont, hogy a savanyú homokos talaj esetében a Gram-negatív/ Gram-pozitív arány kismértékben csökkent a kukorica fenofázisa során. A Gram-negatív/ Gram-pozitív arányban bekövetkező változások a talaj szerves anyag tartalmának minőségi és mennyiségi változására utal (Kourtev és mtsai, 2003; Zhong és mtsai, 2010). Felvetheti a Gram-pozitív szervezetek általi stabil bioszén frakció hasznosítási lehetőségeit, hiszen ezen organizmusok az oligotróf környezetekhez asszociáltak és a perzisztens szerves anyagok degradációjáért felelnek (Watzinger és mtsai, 2014). A 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén használata szignifikánsan megemelte a talaj szerves anyag tartalmát (0,30 ± 0,09%) a kontrol talajhoz viszonyítva, habár 50%-a kijuttatott bioszénnek szervesetlen volt (Rékási és mtsai, 2018).

#### VI.1.3.2.2 Karbonátos Mollic Umbrisol (Órbottyán) talaj esetében

A karbonátos homokos talaj esetében is a kukorica egyedfejlődésével összefüggő bakteriális közösségen belüli szignifikáns változásokat ( $R^2 = 0,21001$ ;  $p = 0,0019$ ) tapasztatunk. Ezt az időbeli változást az alkalmazott kezelések nem befolyásolták ( $R^2 = 0,048942$ ;  $p = 0,261$ ). Az egyes baktérium csoportok reprezentáló zsírsvak időbeli változásában a nagydózisú bioszén kezelés, nem szignifikánsan, de hatással volt. Az aktinobaktériumok, az „univerzális” foszfolipid zsírsvak aránya, hasonlóan a Gram-negatív/ Gram-pozitív arányhoz, a kukorica reproduktív R1-bibekitolás fázisát kivéve, a kezelést követően minden egyes mintavételi időpontban magasabb volt. A legnagyobb különbségek az R6 érettségi fázisban jelentkeztek, amikor is a Gram-negatív/ Gram-pozitív arány a nagy bioszén (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) kezelést kapott talajokban jóval meghaladta, mint a 0 és 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajok esetében (*10. táblázat*).



10. táblázat Foszfolipid zsírsavak mennyisége (nmol PLFA g<sup>-1</sup> talaj) karbonátos homokos talajban, csoportosítva specifikus (Gram-negatív, Gram-pozitív és Aktinobaktériumok), „univerzális” és Gram-negatív/Gram-pozitív arányra, a 0 és 3 t ha<sup>-1</sup>, illetve a 15 és 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajokban, a kukorica fenofázisa során.

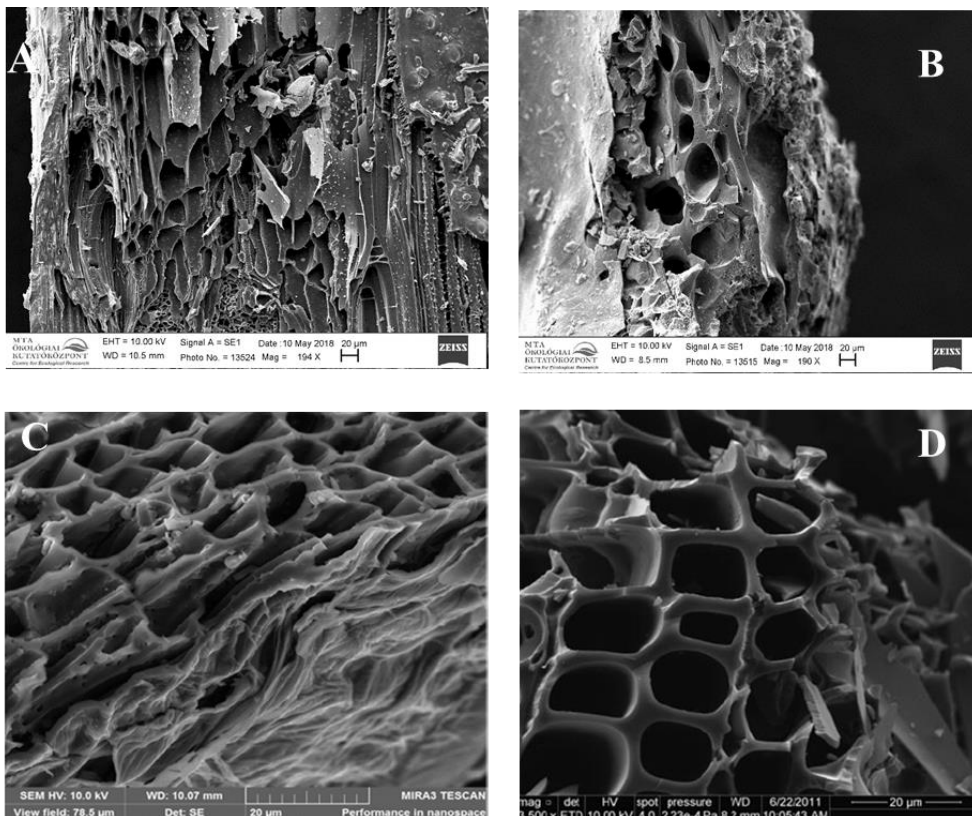
Közösségi PLFA	A bakteriális foszfolipid-zsírsavak átlagos koncentrációja						
	Vetés előtt	V4-V6 fázis		R1-Bibekitolás		R6-Érés	
	nincs kezelés	0 és 3 t ha <sup>-1</sup> bioszén	15 és 30 t ha <sup>-1</sup> bioszén	0 és 3 t ha <sup>-1</sup> bioszén	15 és 30 t ha <sup>-1</sup> bioszén	0 és 3 t ha <sup>-1</sup> bioszén	15 és 30 t ha <sup>-1</sup> bioszén
	nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj	nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj		nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj		nmol PLFA g <sup>-1</sup> talaj	
Gram-pozitív specifikus PLFA összege (i15:0; a15:0; i16:0; i17:0; a17:0)	567,5±60,7	519,99±137,21	529,78±94,57	483,09±116,16	409,16±56,95	483,18±105,66	347,31±119,93
Gram-negatív specifikus PLFA összege (16:1w9; cy17:0; 18:1w7; cy19:0)	461,19±56,39	371,76±55,71	450,42±28,87	475,50±155,03	325,03±39,29	1200±199,22	1423,07±568,7
Aktinobaktériumok specifikus PLFA összege (10Me16:0; 10Me17:0; 10Me18:0)	543,16±118,19	435,44±108,23	556,98±59,15	617,92±272,54	267,05±18,60	21,66±5,63	382,47±126,27
Az „univerzális” PLFA összege (14:00; 15:00; 16:00; 17:00; 18:00)	628,14±168,01	799,35±215,29	643,90±146,28	377,81±128,05	911,98±76,52	137,41±17,11	419,58±247,23
Gram-negatív/Gram-pozitív arány	0,81	0,71	0,85	1,29	0,79	2,48	4,09

A savanyú talaj esetében is felhívtuk a figyelmet a Gram-negatív/ Gram-pozitív arányban bekövetkező változások és a talaj szerves anyag tartalmának minőségi és mennyiségi változásának összefüggésével. Watzinger és mtsai (2014) savanyú, illetve karbonátos talajon végzett tenyészedényes kísérlet sorozatukban búza héj és fűzfa alapanyagú C<sup>13</sup>-jelölt bioszén hatását PLFA módszerrel vizsgálták az árpával (*Hordeum vulgare*) asszociált mikrobiális közösség esetében. Hasonlóan a mi eredményeinkhez nemcsak a savanyú, de a karbonátos talaj esetében is a Gram-negatív, illetve az aktinobaktériumok foszfolipid-zsírsavainak megemelkedett arányát tapasztalták. Az érés fázisában továbbá a nagymértékben lecsökkent Gram-pozitív szervezetek aránya járult hozzá a magas Gram-negatív/ Gram-pozitív arányhoz. A bioszén kezelés hatására, a rövid idejű stressz faktorként jelentkező megváltozott talaj környezet, hozzájárulhat a gyors növekedési rátával rendelkező Gram-negatív mikroorganizmusok megemelkedett közösségen belüli arányához, illetve hozzásegíti az olyan új élethelyek sikeres kolonizálást, mint a bioszén. Ezzel szemben a Gram-pozitív, illetve aktinobaktériumok szervezetek, lassabban szaporodnak és tápanyag szegény környezetekhez jobban asszociáltak, továbbá perzisztens komplex szubsztrátumokat jól hasznosítanak (Kolton és mtsai, 2011). Megemelkedett arányuk a bioszén labilis szénformái mellett a perzisztens szervesanyag mikrobiális hasznosítására is utal, hasonlóan Watzinger és mtsai (2014) tapasztalataihoz.

## VI.2 A bioszén kezelés hatása a talajok mikróba közösségeire 30 hónap távlatából

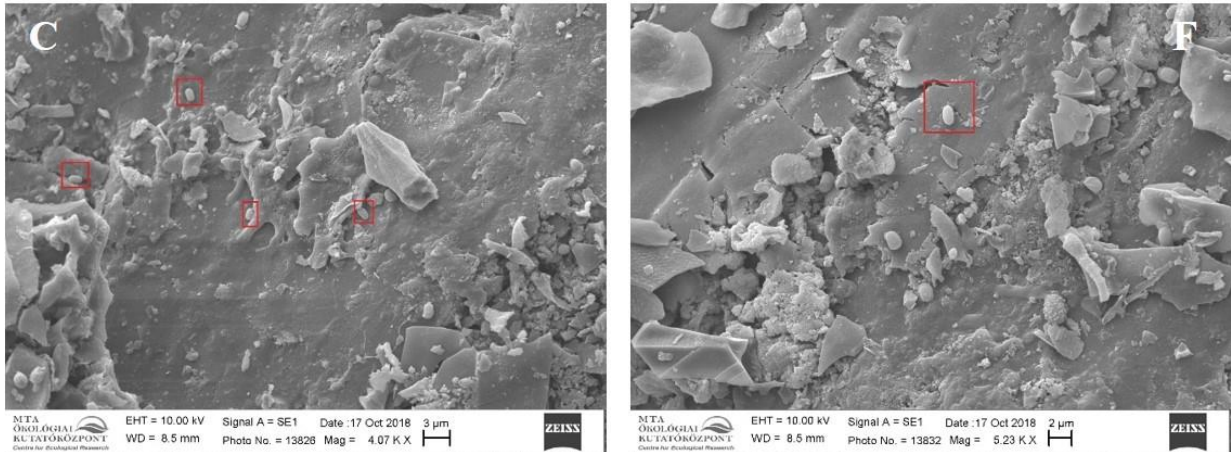
### VI.2.1 Kétsugaras pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

A kétsugaras pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével arra kerestük a választ, hogy van-e a különbség a bioszén felszínét kolonizáló szervezetek között a két talajtípusban. Kijuttatás előtt a talajoltásra szánt gabonamaghéj és papírgyártású szennyvíziszap alapanyagú bioszén SEM analízise (*1. kép*) során a szerves talajerőpotló makropórus szerkezetét vizsgálva, longitudinális elrendezetségű pórus szerkezetet figyeltünk meg. A bioszén makropórus szerkezete nagyban függ az alapanyagtól, ahogy azt Viglašová és mtsai (2018), vagy Tammeorg és mtsai (2012) által készített SEM felvételeken is jól látszik a bambusz és fenyő alapanyagú bioszén esetében sima felületű szabályos formájú felület alakult ki (*1. kép*). A bioszén makropórus szerkezete és aránya amellet, hogy szerepet játszik a bioszén vízmegtartó kapacitásában, a talaj mikrobióta számára kínál életteret és menedéket. A bioszén makropórus szerkezete nagyban függ az alapanyagtól.



*1. kép. A savanyú és karbonátos homokos talajoltására szánt gabonamaghéj és papírgyártású szennyvíziszap alapanyagú bioszénről készült SEM felvételek (A; B). Összehasonlítva a bambusz alapanyagú (C; Viglašová és mtsai, 2018) és fenyő alapanyagú (D; Tammeorg és mtsai, 2012) bioszénről készült SEM felvételekkel. Mérték: 20 µm mindegyik felvétel esetében*

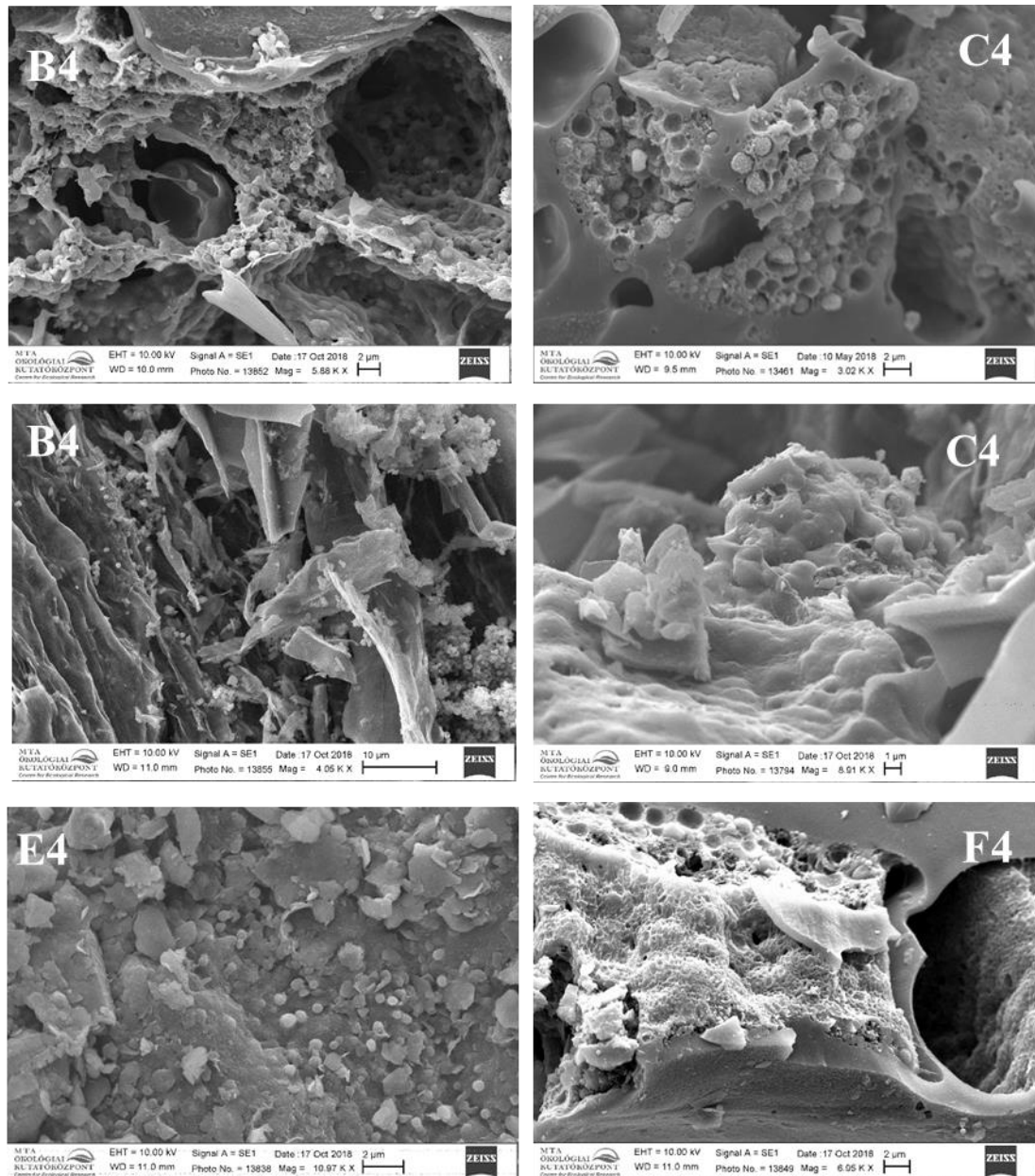
A bioszén felszínére vitt PGPR organizmusok szintén azonosíthatóak voltak a talajoltásra szánt bioszén mint oltóanyag-hordozó (C és F) inokulum esetében, a kétsugaras pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok során (2. kép). Az azonosított 2-3  $\mu\text{m}$  nagyságú gömbölyded pálcika alakú sejtek az *Azospirillum* nemzetségre jellemző alakot mutatnak (Pinheiro és mtsai, 2002).



2. kép. A bioszén mint oltóanyag-hordozó (C és F) talajoltókról készült SEM felvételek. A C esetben mérték: 3  $\mu\text{m}$ , míg az F esetben a mérték: 2  $\mu\text{m}$

A savanyú és karbonátos homokos talajban a nagy dózisú bioszén kezelés (IVB4, IVC4, IV3, IVF) hatására a bioszén felszínét az egyes mikroba csoportok sikeresen kolonizálták. A savanyú homokos talajban az egyes mikrobák a bioszén felületét beborító felszíni aggregátumban voltak jelen és leginkább szőlőfürt szerűen elrendeződve (3. kép). A karbonátos homokos talajminták esetében az egyes organizmusok kész láncolatokat alkottak a bioszén mellett vagy a bioszén makropórusaiban elhelyezkedve. Ouyang és mtsai (2013) is a bioszén kezelés hatására bekövetkező nagyfokú mikrobiális kolonizációt figyelték meg fél éves mikrokozmosz kísérlet sorozatukban. Nagymértékű talaj aggregátum felhalmozódást és stabilizálódást figyelhetünk meg az egyes bioszének felszínén (3. kép). Az aggregát formálás és stabilizálás a bioszén felszínén, amelyben beágyazva szintén megtalálhatók a mikrobák, nagymértékben függ a szerves anyag típusától és mennyiségétől. Eltérő molekula méretű és kémiai szerkezetű változatos anyagok (pl. ásványok, szerves anyag) tapadhatnak a bioszén felszínére, melyek bár csökkenthetik a bioszén fajlagos felületét a molekuláris tartományban, de kötési kölcsönhatásokba léphetnek a talaj aggregátumokkal (Liang és mtsai, 2006). Az általunk készített SEM analízis során is a 30 hónappal a talajba juttatás követően a bioszén felszínének nagy heterogenitást mutattak, relatív nagy belső terekkel és makroporozitással. Eredményeink összhangban vannak Ouyang és mtsai (2013) eredményeivel, akik a tejipari szennyvíziszap alapanyagú bioszén felszínét vizsgálták homokos vályog talajon.

A savanyú homokos talajban az egyes mikróbák a bioszén felületét beborító szervesanyag-hálóban voltak jelen, leginkább szőlőfürt szerűen elrendeződve. A karbonátos homokos talajminták esetében az egyes organizmusok kész láncolatokat alkotnak a bioszén mellett vagy a bioszén makropórusaiban.



3 kép. A nagy dózisu (30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelést kapott (B4, C4, E4, F4) savanyú és karbonátos homokos talajtólókról készült SEM felvételek. Az első és harmadik sor felvételeinek mértéke: 2 μm, míg a második sor B4 mértéke: 10 μm és C4 mértéke pedig 1 μm.

## VI.2.2 A talajok fizikai és kémiai paraméterei

Az Őrbottyáni karbonátos homokos talajokat és a Nyírlugosi savanyú homokos talajokat 30 hónappal az egyes kezeléseket követően ismét megvizsgáltuk, annak érdekében, hogy felderítsük a baktériumközösség szerkezetében esetlegesen végbement változásokat az alkalmazott bioszén hatására. Az egyes PGPR fajok közösségen belüli arányát ezen mintavétel során nem kívántuk vizsgálni, hiszen azt már korábban is megismertük ahhoz, hogy a PGPR fajok aránya a talajban tartósan megemelkedjen, többszöri talajoltásra van szükség (Backer és mtsai, 2018).

Az egyes talajok fizikai-kémiai vizsgálatait melyet az Agrártudományi Kutatóközpont Talajtani Intézetének a Talajkémiai és Anyagforgalmi Osztályának munkatársai végeztek rámutatott, hogy 30 hónap távlatából is mindkét talaj esetében vannak a bioszén kezelés hatásával összefüggésbe hozható fizikai-kémiai változások (11. és 12. táblázat). A savanyú homokos talaj esetében a nagy dózisú ( $30 \text{ t ha}^{-1}$ ) bioszén kezelés az A4 és C4-es talajok pH-ja szignifikánsan magasabb volt. Ennek köszönhetően a kezelt talaj 4,6 pH-hoz képest a nagy dózisú kezelés hatására a talaj pH 6,49-re nőtt. Ezek a tapasztalatok összhangban vannak a korábban már megfigyelt tapasztalatokkal, amely a bioszén jól ismert „meszező” képességével hozható összefüggésbe (Ding és mtsai, 2016).

A nagy dózisú bioszén kezelés hatására mindkét talaj esetében, szignifikáns változásokat figyeltünk meg a talaj kationcserélő kapacitásában (CEC) és szervesanyag-tartalmában. A bioszén nagy fajlagos felületének és a felületi funkciók csoportok magas arányával hozható összefüggésbe a megnövekedett CEC (Lehmann és mtsai, 2003). A pH-függő talajtöltés megemelkedése is szerepet játszhat CEC növekedésében, ahogy azt Gul és mtsai is bemutatták (2015). A talajok szervesanyag-tartalma bár karbonátos homokos talaj esetében magasabb volt korábban, mint a savanyú homokos talajban, mindkét területen szignifikánsan emelkedett a nagy dózisú (B4) bioszén kezelés hatására a talajok szervesanyag-tartalma. Hasonlóan Demeyer és mtsai (2001) eredményeihez a bioszén dózissal összefüggő szervesanyag-tartalom növekedést tapasztaltunk.

11. táblázat. A savanyú homokos (Lamellie Arenosol) talaj fizikai kémiai paramétereit a különböző dózisu bioszén kezelések (IVA2 = 3 t ha<sup>-1</sup>; IVA3, IVB3, IVC3 = 15 t ha<sup>-1</sup>; IVA4, IVB4, IVC4 = 30 t ha<sup>-1</sup>) hatására a kezeletlen talajhoz (IVA1) viszonyítva. A különböző betűk (a, b, c) az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelöli P < 0,05 szinten.

		pH (H <sub>2</sub> O)	Szervesanyag %	összes N (m/m%)	AL-oldható K <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )	AL-oldható P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	CEC meq/100g	összes K (mg kg <sup>-1</sup> )	összes P (mg kg <sup>-1</sup> )
Savanyú homokos talaj Nyírlugos (Lamellie Arenosol)	IVA1	4,61	0,57	0,05	71,73	62,29	2,03	16,11	3,62	1076,36	212,24
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,30	0,09	0,00	19,38	7,48	0,26	2,58	0,33	67,44	13,70
		a	a	a	a	a	a	a	abc	a	a
	IVA2	4,91	0,66	0,05	120,07	93,71	2,05	16,52	3,94	1268,80	230,93
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,30	0,09	0,01	10,37	15,23	0,24	4,44	0,27	159,89	17,40
		ab	ab	a	a	a	a	a	abc	a	a
	IVA3	5,71	0,88	0,05	138,68	129,14	1,93	21,25	4,29	1297,50	277,73
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,82	0,13	0,00	39,87	40,96	0,03	2,46	0,10	78,87	36,46
		ab	ab	a	a	a	a	a	ab	a	a
IVA4	6,27	0,89	0,05	137,82	144,43	2,13	18,72	4,32	1263,78	295,18	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,52	0,03	0,00	21,31	26,99	0,29	3,05	0,19	114,56	27,00	
	b	ab	a	a	a	a	a	ab	a	a	
IVB3	5,88	0,78	0,05	167,71	95,43	2,50	24,29	3,30	1289,16	244,34	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,58	0,26	0,01	28,51	35,43	0,26	15,95	0,48	209,24	40,24	
	ab	ab	a	a	a	a	a	ac	a	a	
IVB4	5,73	0,88	0,05	158,11	101,11	2,64	16,02	3,26	1205,93	244,15	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,52	0,07	0,00	29,83	5,68	0,27	6,33	0,26	115,03	20,72	
	ab	ab	a	a	a	a	a	ac	a	a	
IVC3	5,68	0,85	0,05	171,08	134,58	3,28	24,80	3,69	1269,76	294,40	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,86	0,07	0,01	67,63	70,05	0,47	7,28	0,65	168,38	99,41	
	ab	ab	a	a	a	a	a	abc	a	a	
IVC4	6,49	1,02	0,05	165,52	149,52	2,66	22,93	3,44	1172,76	295,00	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,3	0,2	0,0	52,7	30,8	0,5	7,0	0,3	166,2	49,0	
	b	b	a	a	a	a	a	abc	a	a	

12. táblázat. A karbonátos homokos (Mollic Umbrisol) talaj fizikai kémiai paramétereit a különböző dózisú bioszén kezelések (IVD2 = 3 t ha<sup>-1</sup>; IVD3, IVE3, IVF3 = 15 t ha<sup>-1</sup>; IVD4, IVE4, IVF4 = 30 t ha<sup>-1</sup>) hatására a kezeletlen talajhoz (IVD1) viszonyítva. A különböző betűk (a, b, c) az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelöli P < 0,05 szinten.

		pH (H <sub>2</sub> O)	Szervesanyag %	CaCO <sub>3</sub> %	összes N (m/m%)	AL-oldható K <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )	AL-oldható P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	CEC meq/100g	összes K (mg kg <sup>-1</sup> )	összes P (mg kg <sup>-1</sup> )
Karbonátos homokos talaj Órbottyán Mollic Umbrisol (Arenic)	IVD1	7,61	0,88	0,62	0,07	50,56	77,16	2,07	3,65	8,52	1641,46	380,99
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,19	0,04	0,73	0,00	7,29	13,85	0,72	0,91	0,60	266,03	69,83
		a	a	a	a	a	a	a	a	abc	a	a
	IVD2	7,61	0,88	0,62	0,07	50,56	77,16	2,07	3,65	8,52	1641,46	380,99
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,19	0,04	0,73	0,00	7,29	13,85	0,72	0,91	0,60	266,03	69,83
		a	ab	a	a	ab	a	a	a	abc	a	a
	IVD3	7,36	0,96	0,42	0,07	61,44	94,99	2,06	4,17	8,45	1643,92	391,16
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,32	0,02	0,25	0,01	5,84	34,07	0,51	1,31	0,43	316,86	68,20
		a	ab	a	a	ab	a	a	a	a	a	a
IVD4	7,44	1,12	0,24	0,08	61,58	100,68	2,55	4,94	9,23	1911,59	426,98	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,32	0,13	0,15	0,00	12,36	45,17	0,73	1,93	0,33	66,67	39,99	
	a	ab	a	a	ab	a	a	a	b	a	a	
IVE3	7,58	1,14	0,57	0,07	87,07	109,72	2,52	3,46	7,37	1742,59	423,04	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,37	0,16	0,60	0,01	20,97	22,42	0,73	1,62	0,58	269,10	30,54	
	a	ab	a	a	abc	a	a	a	bc	a	a	
IVE4	7,62	1,21	0,50	0,07	105,58	143,18	2,60	5,67	7,26	1928,76	431,12	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,15	0,03	0,20	0,00	6,67	3,51	0,29	2,47	0,38	145,99	10,99	
	a	b	a	a	bc	a	a	a	bc	a	a	
IVF3	7,69	1,09	0,61	0,06	62,46	95,25	2,35	2,65	7,29	1769,20	415,08	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,28	0,11	0,31	0,01	8,81	30,63	0,52	0,21	0,89	199,12	33,50	
	a	ab	a	a	ab	a	a	a	bc	a	a	
IVF4	7,67	0,99	0,32	0,06	138,18	139,10	2,11	2,82	6,95	1708,49	459,64	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,0	0,1	0,1	0,0	48,2	53,3	0,4	0,0	0,1	382,5	22,7	
	a	ab	a	a	c	a	a	a	c	a	a	



A növények által felvehető AL-K<sub>2</sub>O szignifikánsan megemelkedett a karbonátos homokos talaj esetében (63%-kal), míg a savanyú hámokos talajban bár nem szignifikánsan, de a legnagyobb dózisú bioszén kezelés hatására is 50%-kal emelkedett az AL-K<sub>2</sub>O koncentráció. Korábban már több tanulmány is bemutatta, hogy mérsékelt égövön a bioszén 10–25 t·ha<sup>-1</sup> dózisban alkalmazva szignifikáns K-tartalom növekedés érhető el a talajokban (Novák és mtsai, 2009; Liu és mtsai, 2012). Igazodva az általunk tapasztaltakhoz Oram és munkatársai (2014) tenyészedényes kísérletükben savanyú homoktalajra kijutatott 10 t·ha<sup>-1</sup> bioszén hatására szignifikánsan növelte a növények által felvehető K-tartalmát és a növényi biomassza mellett. Liang és munkatársai (2014) 90 t·ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést alkalmazva karbonátos talajon, három évvel a talajkezelést követően a felvehető K-tartalom több mint négyszeresét tapasztalták a kontroll talajhoz képest. Bár nem szignifikánsan, de mindkét talaj esetében a növények által hasznosítható AL-P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációja is megemelkedett (11. és 12. táblázat).

A savanyú homokos talaj esetében 52%-kal, a karbonátos homokos talaj esetében, pedig 39%-kal emelkedett meg az AL-P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége a legnagyobb dózisú bioszén kezelést kapott talajokban kontrollhoz képest. Általánosságban elmondható, hogy a foszfor jobban hozzáférhetővé válik a bioszénrel kezelt talajokban. Hasonlóan az általunk tapasztaltakhoz Xu és munkatársai (2013) bioszén hatására a KCl-oldható P-koncentráció szignifikáns növekedését tapasztalták, melyet egyrészt a bioszén nagy foszfor tartalmának, illetve a pH emelkedésnek köszönhető talaj P-készleteinek mobilizálásának tulajdonítottak. Liang és munkatársai (2014) karbonátos talajon végzett szabadföldi kísérletükben nem tapasztaltak változást a talaj felvehető AL-P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségében, mindezt a lúgos kémhatású talajokban a pH növekedés hatására a bioszénben található felvehető foszfor kevésbé felvehető kalcium-foszfát formába való kicsapásának tulajdonítják. Mivel esettünkben a bioszén kezelés hatására a karbonátos homokos talajban nem emelkedett a nagy dózisú bioszén kezelést kapott talajok pH-ja a kontrollhoz képest, magyarázatot adhat a magasabb AL-P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségre.

### VI.2.3 Újgenerációs DNS szekvenálási eredmények

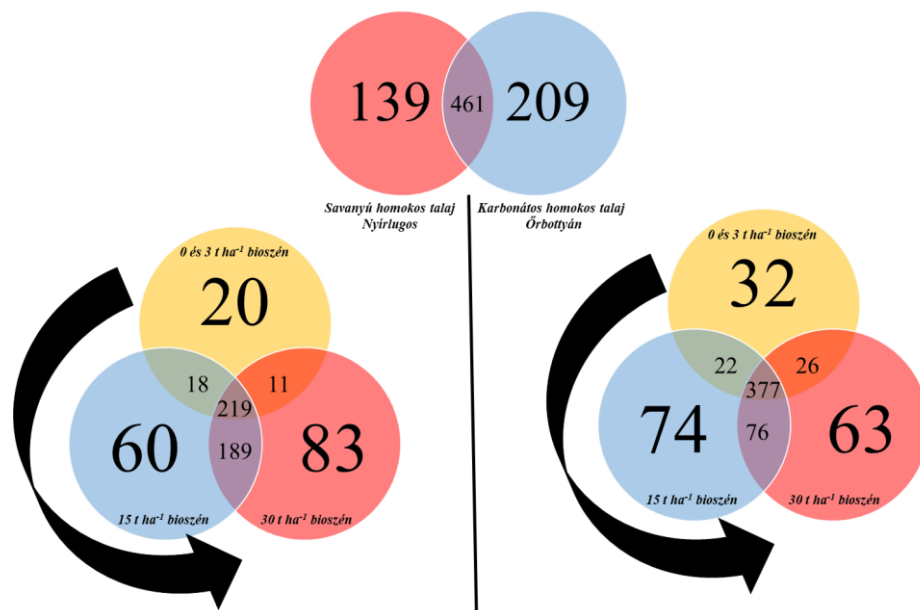
A savanyú homokos (Lamellic Arenosol) és a karbonátos homokos (Mollic Umbrisol) talajok bakteriális közösségszerkezeti vizsgálata során 8-8 talajminta újgenerációs DNS szekvenálását végeztük el. Összesen 221 564 szekvenciát kaptunk a 2 típusú talaj 16 mintájából, amely mintánként 9 776-22 836 szekvenciát jelentett (13 táblázat). A szekvenciák száma elegendő volt a vizsgált baktériumközösségek összetételének megfelelő leírására.

Az egyes talajok diverzitás elemzése (a Shannon index és az inverz Simpson diverzitás alapján) alapján megállapítható, hogy a karbonátos homokos talaj baktériumközössége nagyobb diverzitással rendelkezik, mint a savanyú homokos talaj. Azonban a savanyú homokos talajon alkalmazott nagy dóziséű bioszén kezelés (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) hatására a kezelt talajok diverzitása jóval meghaladta a kontrol talajban tapasztalt diverzitást, elérve a karbonátos homokos talajban tapasztalt diverzitás értékeket (13. táblázat). A talajok gazdag diverzitását jól jelzi, hogy Kim és mtsai (2007) által a terra preta területek Shannon index diverzitás (5,4) értékét minden egyes kezelt és kezeletlen talaj meghaladta.

13. táblázat. A savanyú (Lamellic Arenosol) és karbonátos (Mollic Umbrisol) homokos talajok 30 hónappal a különböző dóziséű bioszén kezelések (IVA2, IVD2 = 3 t ha<sup>-1</sup>; IVA3, IV3, IVC3, IVD3, IVE3, IVF3 = 15 t ha<sup>-1</sup>; IVA4, IVAB4, IVC4, IVD4, IVE4, IVD4 = 30 t ha<sup>-1</sup>) alkalmazását követő mintáikból származó újgenerációs szekvenálás főbb adatai és diverzitás indexe a kezeletlen talajhoz képest (IVA1). Szaggatott keretézéssel jelöltük a kezeletlen és kis dóziséű bioszén kezelést kopott talajok eredményeit

Minta	Törzsek száma	Nemzettségek száma	Szekvencia szám	Shannon index	Inverz Simpson diverzitás
IVE3	26	91	14 080	6,7	277,4
IVA4	25	93	18 964	6,7	336,9
IVE4	23	93	12 654	6,6	303,2
IVD4	25	79	10 074	6,4	254,7
IVD2	24	75	11 126	6,4	228,4
IVD3	25	85	13 604	6,3	205,8
IVF3	28	82	13 179	6,3	223,4
IVB3	25	85	22 836	6,3	208,2
IVD1	27	78	9 776	6,3	216,7
IVB4	25	86	16 484	6,2	207,6
IVC3	25	78	14 747	6,2	221,3
IVA3	23	70	9 559	6,2	216,4
IVC4	25	76	12 888	6,1	194,9
IVF4	25	68	9 823	6,0	174,6
IVA2	19	64	15 962	5,6	121,2
IVA1	18	64	15 808	5,5	106,3

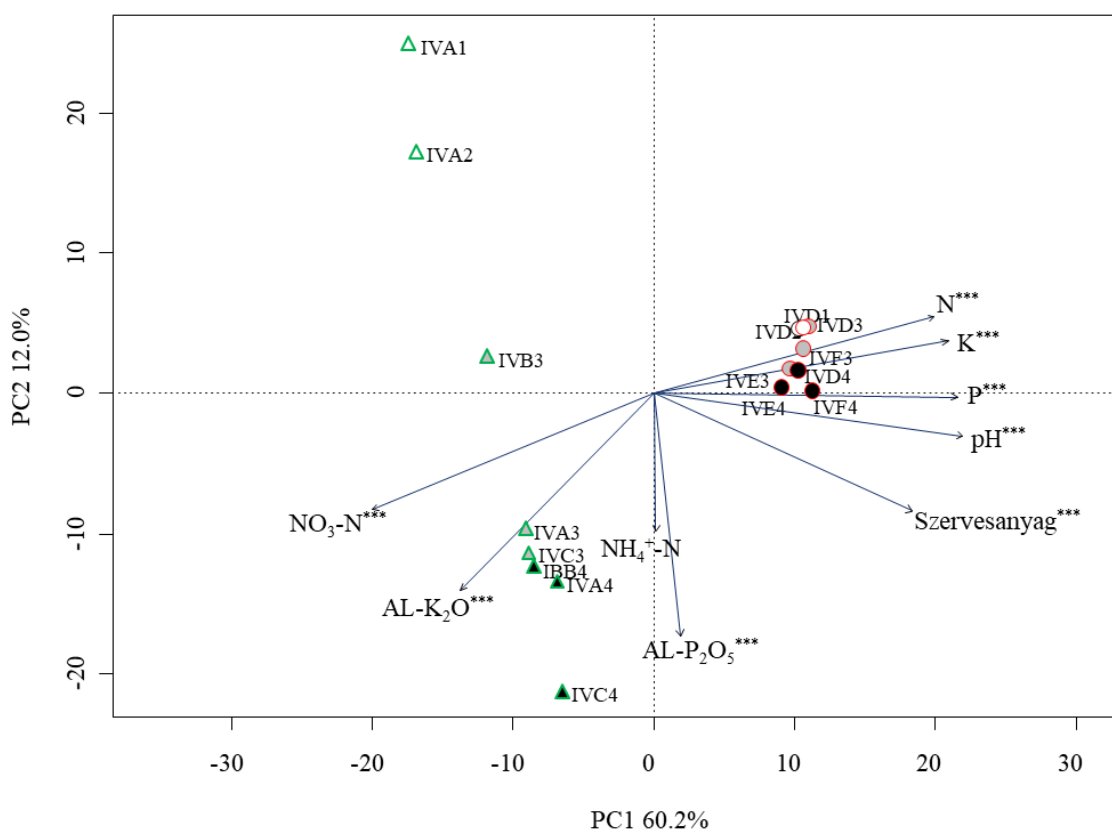
Az azonosított OTU-k szerinti megoszlást a két talaj, illetve a talajokon belül az alkalmazott bioszén függvényében a 24. ábra mutatja be.



24. ábra. Az Illumina Miseq szekvenálás során kimutatott OTU-k megoszlása savanyú és homokos talajokban, illetve az egyes talajokon belül a különböző bioszén dózist kapott mintákban. A fekete nyíl a bioszén dózis növekedésének irányát hivatott reprezentálni az egyes csoportokban.

Jól látható, hogy egyaránt voltak kizárólag az adott talajban (Lamellic Arenosol és Mollic Umbrisol), valamint mindkét környezetben előforduló OTU-k. A savanyú homokos talaj esetében (Lamellic Arenosol) amíg a kimutatott OTU-k 17%-a volt kizárólag az adott élőhelyen jelen, addig a karbonátos homokos talaj esetében (Mollic Umbrisol) ez arány elérte a 26%-ot. Az összes detektált OTU 56%-a volt jelen mindkét talajban. Mindkét talaj esetében a kontrol és kis (0 és 3 t ha<sup>-1</sup>) a közepes (15 t ha<sup>-1</sup>) és a nagy dózisu (30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelést kapott talajok OTU megoszlását is vizsgáltuk. Ennek értelmében a karbonátos homokos talaj esetében a kontrol és kis (0 és 3 t ha<sup>-1</sup>) bioszén dózist kapott talajok egyedi OTU aránya 4%-ék volt, addig a közepes (15 t ha<sup>-1</sup>) esetében 11%-ék, és a nagy dózisu (30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelés esetében 9%-ék volt. A közepes és nagy dózisu bioszén kezelés közös OTU aránya meghaladta 68%-ot, míg a kontrol és kis (0 és 3 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelést kapott talajok esetében 63%-ék volt. A savanyú homokos talaj esetében a kontrol és kis (0 és 3 t ha<sup>-1</sup>) bioszén dózist kapott talajok egyedi OTU aránya 3%-ék volt. A közepes (15 t ha<sup>-1</sup>) esetében 10%-ék, míg a nagy dózisu (30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelés esetében 14%-ék volt. A két nagyobb dózisu kezelést kapott talajok bakteriális közösségének hasonlóságára utal, hogy közös OTU aránya meghaladta 68%-ot, míg a kontrol és kis (0 és 3 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelést kapott talajok esetében 41%-ék volt.

Annak érdekében, hogy összefoglaljuk a bioszén által befolyásolt talaj fizikai-kémiai paraméterek, a rizoszféra bakteriális közösség dinamikája közötti kapcsolatot, az új generációs szekvenálási adatok főkomponens elemzése által kapott ordinációra illesztettük, az egyes talajok fizikai kémiai paramétereit. A PCA elemzés során, amelynek első két főkomponense a teljes variancia 72,2%-át reprezentálja, jól elkülönült egymástól a savas és karbonátos homokos talajok bakteriális közösség szerkezete. A talajtípus szerinti elválás az első főkomponens (teljes variancia 60,2%-a) szerint csoportosult. A PCA elemzés második főkomponense (teljes variancia 12%-a) szerinti csoportosulás, viszont a közepes (15 t ha<sup>-1</sup>) és nagy (30 t ha<sup>-1</sup>) dóziséű bioszén kezelés szerint történt (25. ábra).



25. ábra PCA ordinációja a homokos és karbonátos homokos talaj különböző bioszén dózist (IVA2, IVD2 = 3 t ha<sup>-1</sup>; IVA3, IV3, IVC3, IVD3, IVE3, IVF3 = 15 t ha<sup>-1</sup>; IVA4, IVAB4, IVC4, IVD4, IVE4, IVD4 = 30 t ha<sup>-1</sup>) és kezeletlen talajainak (IVA1) az újgenerációs szevenálással feltárt bakteriális közösség szerkezetéről. Az egyre inkább feketedő minta jelölés az alkalmazott bioszén dózissal függ össze. Ennek értelmében a fehér = 0 t ha<sup>-1</sup> bioszén, világos szürke = 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén, sötét szürke = 15 t ha<sup>-1</sup> és fekete 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén). A savanyú talajok zöld, míg a karbonátos talajok piros szegéllyel vannak jelölve. A környezeti paraméterek vektorként kerültek ábrázolásra, melyek szignifikancia szintjei a következők: : 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

Kiváltképpen szembevető ez a savanyú homokos talaj esetében, ahol a 0 (IVA1), illetve 3 t ha<sup>-1</sup> (IVA2) bioszén kezelést kapott talajokhoz képest elkülönülnek a közepes és nagy dóziséű bioszén kezelést kapott talajok. Az főkomponens analízisre illesztett környezeti paraméterek,

minden esetben szignifikáns különbségeket mutattak. Ennek értelmében a kezdeti oligotróf savanyú homokos talaj, bakteriális közösség szerkezetének változása a bioszén kezelés (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) hatására megemelkedett NO<sub>3</sub>-N, AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, AL-K<sub>2</sub>O tápanyag koncentrációval szignifikáns összefüggésbe hozható. A karbonátos homokos talaj esetében a kezdeti magasabb pH, K, P, N és szervesanyag tartalomnak köszönhetően jól elkülönült a savanyú homokos talajtól. A bioszén kezelés hatása viszont a talaj bakteriális közösségszerkezetére nem volt hatással.

Az Illumina MiSeq DNS szekvenálás során a vizsgált talajmintákban összesen 16 legalább 1%-os relatív abundanciával rendelkező törzs képviselőit azonosítottuk. Ezek az Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteria\_unclassified, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Patescibacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, Rokubacteria, Verrucomicrobia és WPS-2 törzsek voltak. A vizsgálatba vont talajok esetén egyedül a karbonátos homokos talaj esetében azonosítottunk olyan baktérium törzset, amely nem volt jelen a savanyú homokos talajban az pedig a Rokubacteria törzs organizmusai voltak. A mixotróf metabolizmusa képes törzsbe, jelentős számú tenyésztésbe nem vont baktériumot sorolnak. A diverzifikált talaj környezetben előforduló törzs általában magas genomi heterogenitást mutat, amely visszavezethető a törzs képviselőinek alulreprezentáltságára a tenyésztéses és metagenom tanulmányokban (Beckraft és mtsai 2017). A savanyú homokos talaj esetében a legnagyobb arányban az Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes törzsek voltak jelen. A karbonátos homokos talajban is ezek a törzsek voltak a legjelentősebbek, azonban a legnagyobb arányban a Proteobacteria törzsek képviselői voltak, megelőzve az Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi és Actinobacteria.

*14. táblázat. A savanyú és karbonátos homokos talaj bakteriális közösségeiben tapasztalt különbségekért leginkább felelős baktérium törzsek, a hozzájuk tartozó közösségen belüli aránnyal. Azok a baktérium törzsek lettek figyelembe véve, melyek a SIMPER módszer segítségével legalább az össz különbségek 8%-hoz hozzájárulnak.*

<b>Törzs</b>	<b>Savanyú homokos talaj</b>	<b>Karbonátos homokos talaj</b>	<b>Hozzájárulás %</b>
Acidobacteria	28,2	18,1	21
Proteobacteria	22,2	32,2	21
Bacteroidetes	5,2	13,3	17
Chloroflexi	11,4	5,7	12
Planctomycetes	9,0	5,3	8

A SIMPER analízis segítségével az egyes talajminták vizsgálata során kerestük azokat törzseket, amelyek az egyes talajok bakteriális közösségen belüli különbségéért felelnek. Azokat vettük figyelembe melyek az össz különbségek legalább 8%-ért felelnek (14. táblázat). Ennek értelmében a savanyú homokos talaj és a karbonátos homokos talaj baktérium közösségszerkezetében felárt eltérések a savanyú talaj Acidobacteria, Chloroflexi és Planctomycetes törzsek arányával, míg az karbonátos homokos talajban a Proteobacteria és Bacteroidetes törzsek magasabb arányával függ össze. Az eredmények összhangban vannak a korábban tapasztaltakkal, miszerint az oligotróf környezethez adaptált Acidobacteria törzs gyakoribb az alacsony pH-jú tápanyag szegény talajokban, míg a Proteobacteria törzs organismusai a tápanyaggazdagabb neutrális pH tartományhoz közelebb álló talajokban a gyakoribb (Bartram és mtsai, 2014).

A savanyú homokos talaj esetében az alkalmazott bioszén dózis függvényében változott a főbb taxonok abundanciája (15. táblázat). Amint az alábbi táblázatból is látszik a bioszén dózis növelése mellett nőtt a Proteobacteria és Bacteroidetes törzs aránya, míg ezzel párhuzamosan csökkent az Acidobacteria és Chloroflexi törzsek aránya. A Proteobacteria és a Bacteroidetes növekvő aránya összhangban van Kolton és mtsai által 2011-ben közölt eredményekkel, akik 454 piroszekvenálással tárták fel a paprika rizoszféra bakteriális közösségében bekövetkező változásokat a bioszén kezelés hatására. Az Acidobacteria törzs képviselőinek arány csökkenés már általunk is korábban többször ismerttetett bioszén kezelés hatására bekövetkező változás.

15. táblázat. A savanyú homokos talaj törzseinek közösségen belüli arányának változása, a különböző bioszén kezelést kapott talajokban, 30 hónappal a kezelést követően.

<b>Törzs</b>	<b>0 és 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén</b>	<b>15 t ha<sup>-1</sup> bioszén</b>	<b>30 t ha<sup>-1</sup> bioszén</b>
Proteobacteria	22,2 ± 1,2	31,7 ± 3,5	32,7 ± 2,1
Acidobacteria	28,2 ± 1,3	18,5 ± 0,6	17,7 ± 1,3
Bacteroidetes	5,2 ± 0,6	12,0 ± 2,6	14,6 ± 0,9
Chloroflexi	11,4 ± 2,0	7,0 ± 2,2	4,3 ± 1,7

A bioszén következtében csökkenő közösségen belüli aránya az Acidobacteria törzsnek (Cheng és mtsai, 2017; Li és mtsai, 2018) összefüggésbe hozható a bioszén következtében kialakuló kopiotróf és semleges pH tartományú talaj környezettel (Li és mtsai, 2018). A terra preta területeken is az Acidobacteria törzs képviselteti magát a legnagyobb mennyiségben specifikus alcsoportok által, melyek adaptálódtak a szenesítés hatására megváltozott pH

tartományú környezetekhez (Kim és mtsai, 2007). A Chloroflexi törzs csökkenő arányát tapasztalta bioszén kezelés hatására korábban Li és mtsai (2018) Entisol talajon Illumina MiSeq újgenerációs szekvenálás segítségével. A karbonátos homokos talaj esetében nem táltunk a nagy dózisú bioszén kezelés hatására a baktérium törzsek arányában bekövetkező változásokat.

A karbonátos és savanyú homokos talaj baktérium közösségeinek család szintű összehasonlítása során, csupán két olyan családot azonosítottunk, amely nem volt jelen mindkét talajban. Az Acidothermaceae és az Acidobacteriales rendbe tartozó azonosítatlan család (Acidobacteriales\_unclassified) csak a savanyú karbonátos talajban volt jelen, amely eredmények igazodnak a korábban tapasztaltakhoz, hiszen ezeket a családokat korábban oligotróf, alacsony pH-jú környezethez asszociáltan írták le (Anderson és mtsai, 2011). A legnagyobb közösségi aránnyal rendelkező baktérium családok a savanyú talajban a Chitinophagaceae, Ktedonobacteraceae, Solibacteraceae (Subgroup\_3), Acidobacteriaceae és Planctomycetes rendbe tartozó WD2101 csoport. A karbonátos homokos talaj esetében a legnagyobb arányban előforduló családok a Pyrinomonadaceae, Chitinophagaceae, Sphingomonadaceae, illetve az Acidobacteria törzsbe tartozó azonosítatlan család (Subgroup\_6\_fa) képviselői.

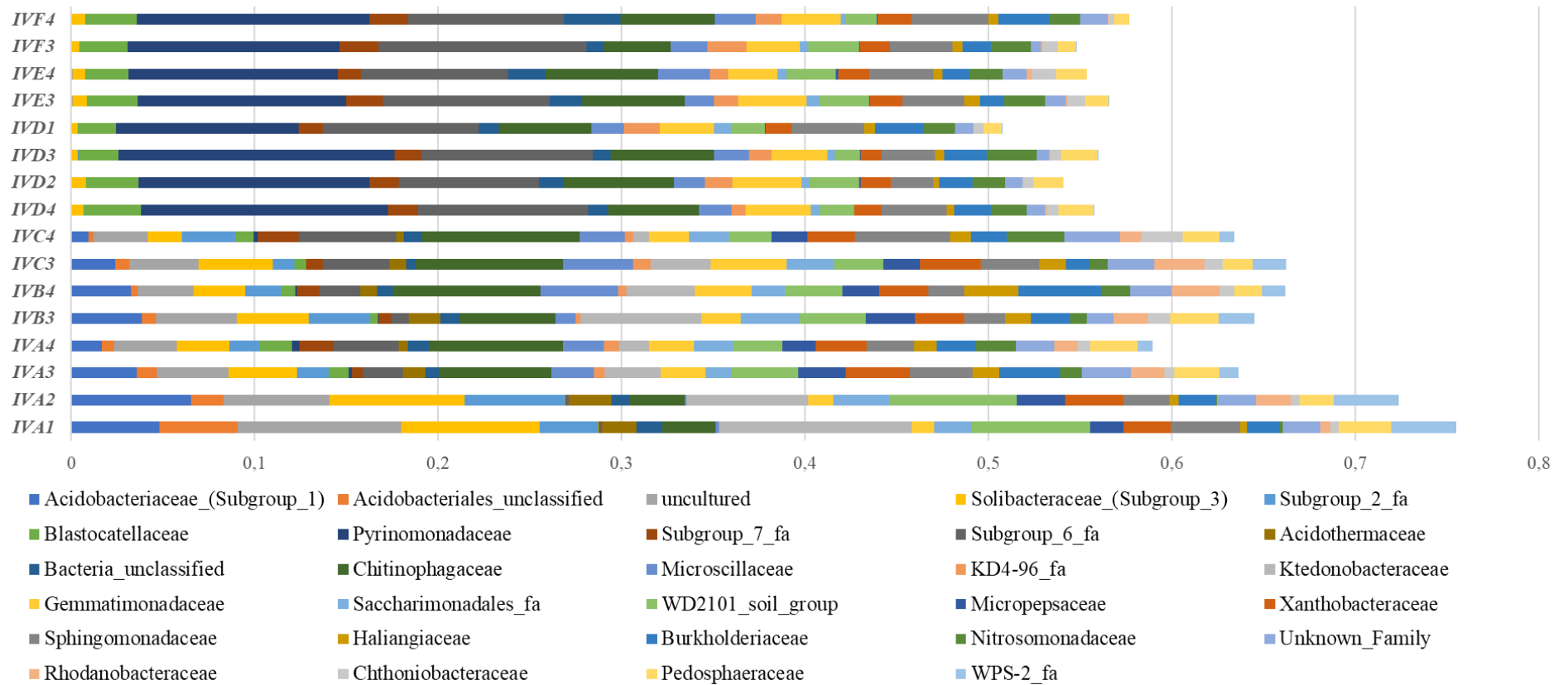
A savanyú homokos talaj esetében a bioszén kezelés hatására az alkalmazott bioszén dózis függvényében változott a főbb taxonok abundanciája. A Chloroflexi törzsbe tartozó, korábban homokos talajokban gyakran kimutatott, Ktedonobacteraceae család közösségen belüli aránya csökkent a bioszén dózis használatával párhuzamosan. Összefüggésben van az eredmény a korábbi tapasztalatokkal, amikor a család közösségen belüli aránya a talaj szerves anyag tartalmával párhuzamosan csökkent (Zhelezova és mtsai, 2018). Szintén az alkalmazott bioszén kezelés hatására csökkent a talajban a Solibacteraceae (Subgroup\_3) és Acidobacteriaceae család közösségen belüli aránya. A bioszén hatására csökkenő aránya az oligotróf környezethez adaptálódott Acidobacteriaceae és Solibacteraceae szervezeteknek már jól ismert (Cheng és mtsai, 2017).

A savanyú homokos talajban a bioszén kezelés hatására a Chitinophagaceae család képviselőinek közösségen belüli aránya megemelkedett. Zhang és mtsai (2019), szintén a bioszén kezelés hatására nagymértékben megnövekedett arányát tapasztalták bioszén kezelés hatására. A Chitinophagaceae család képviselői fontos szerepet játszanak a talaj tápanyag ciklusában, hiszen korábban a cellulóz bontásban szerepet játszó  $\beta$ -glukozidáz enzim aktivitásának fokozódását a Chitinophagaceae család megemelkedett közösségen belüli arányának tulajdonították (Smith és mtsai, 2016). A jelenség utal a bioszén használat

következtében kialakuló „kopirotrof baktérium közösségi változásra” (Jenkins és mtsai, 2017), amelynek eredményeként a nagyobb reprodukciós rátával rendelkező kopirotrof szervezetek az oligotrof alacsony reprodukciós rátával rendelkező szervezeteket túl nővik.



Az egyes taxonok relatív abundancia arányai



26. A savanyú (*Lamellic Arenosol*) és karbonátos (*Mollic Umbrisol*) homokos talajok bakteriális családjainak (>1%) az új generációs szevenálással feltárt aránya a különböző dózisu bioszén kezelések (IVA2, IVD2 = 3 t ha<sup>-1</sup>; IVA3, IV3, IVC3, IVD3, IVE3, IVF3 = 15 t ha<sup>-1</sup>; IVA4, IVAB4, IVC4, IVD4, IVE4, IVD4 = 30 t ha<sup>-1</sup>) alkalmazását követően, 30 hónap távlatából.

A karbonátos homokos talajban a legnagyobb közösségen belüli aránnyal a Pyrinomonadaceae család képviselői voltak. A család reprezentánsait korábban félszáraz szavannai területekről izolálták, melyek a talaj pH tartománytól függő közösségen belüli eloszlását korábban Sun és mtsai (2021) is bemutatták. Az Órbottyáni (Mollic Umbrisol) terület főbb családjainak eloszlását, közösségen belüli arányát nem befolyásolta ( $\pm 1\%$ ) az alkalmazott bioszén kezelés.

## VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Az oltóanyagokban jelenlévő törzsek elválasztását, valamint azok nyomon követését a szabadföldi kísérlet sorozat során a T-RFLP módszer segítségével sikeresen megvalósítottuk. Az általunk megalkotott modellrendszer lehetővé tette a kijutatott törzsek jelenlétének és relatív mennyiségi változásainak meghatározását a jelenlévő talajbaktériumok mellett. A T-RFLP módszer ~500 bázispár hosszúságú fragmensek elkülönítésére kiválóan alkalmas volt. Hozzánk hasonlóan korábban sikeresen alkalmazták az oltásra használt endofita aktinobaktériumok szétválasztására és talajban történő nyomon követésére (Conn és Franco, 2004), illetve *phlD*+ *Pseudomonas* fajok elkülönítésére és detektálására (von Felten és mtsai, 2011).

A két különböző talajon eltérő dózisban alkalmazott PGPR és bioszén kezelések a savanyú és karbonátos homokos talaj esetében is szignifikáns hatásokat váltottak ki. Mindkét esetben a  $N_2$  fixáló és auxin termelő *Azospirillum* nemzetség tagjainak a közösségen belüli aránya emelkedett meg szignifikánsan. A savanyú homokos talaj esetében az *Azospirillum brasilense* közösségen belüli arányát a 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén (A4, +1-3%-ék) és a 15 t ha<sup>-1</sup> (C3 +0,5-3,2%) bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés szignifikánsan, pozitívan, befolyásolta. Az *Azospirillum irakense* esetében is a nagy dózisú (30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés hatására nőtt meg a +1,5%-kal szervezet százalékos relatív gyakorisága, a kezelést megelőző kontroll talajhoz képest. A további PGPR szervezetek közül az *Arthrobacter crystallopoietes* és a *Kocuria rosea* esetében is detektálható volt a különböző bioszén kezelések hatására kialakuló közösségen belüli relatív abundancia gyarapodások. A foszfát szolubilizáló és sziderofór termelő *Arthrobacter crystallopoietes* esetében bár nagy dózisú bioszén kezelés hatására (A4) megduplázódott a közösségen belüli aránya, a pozitív hatás nem volt szignifikáns. Hasonlóan a karbonátos homokos talajon az auxin és exopoliszacharid termelő *Kocuria rosea* esetében is detektáltunk 1,9 szerez nem szignifikáns, növekedést. A nyomonkövetésre használt T-RFLP módszer korlátait jelzi, hogy a talajoltásba vont *Bacillus aryabhatai* és *Paenibacillus peoriae* szervezetek, melyek közösségen belüli aránya 1%-ék körül volt, nem voltak detektálhatók nagy biztonsággal. Továbbá a jelenség utal a talaj biotikus és abiotikus tényezőinek kiemelt fontosságára is, melyek a rizoszféra mikrobáinak túlélésére és gyakoriságára egyaránt nagy hatással vannak

A „szekvenciával-támogatott T-RFLP” elemzés és az újgenerációs szekvenálási eredmények is a savanyú homokos (Lamellie Arenosol) és karbonátos homokos (Mollic Umbrisol) talajok kukorica rizoszféra bakteriális közösségszerkezetében levő nagymértékű különbségeket jelezték. A „szekvenciával-támogatott T-RFLP” elemzés során sikeresen azonosított domináns T-RF-ek

képviselői által, a savanyú talaj esetében az Acidobacteriaceae család, míg a karbonátos talaj esetében a Solibacteres osztályba tartozó EU445199 család tagjainak volt köszönhető leginkább a két talaj bakteriális közösség szerkezetén belüli különbség. A savanyú talaj esetében megegyeznek „a szekvenciával-támogatott T-RFLP” analízis során kapott és az új generációs szekvenálási eredmények, míg a karbonátos homokos talaj esetében nem teljes az egyezés. Hiszen a molekuláris klónozáson alapuló módszer segítségével azonosított T-RF-ek esetében a Solibacteres osztályba tartozó EU445199 családot azonosítottuk a két talaj elválásáért leginkább felelős taxonjaként a karbonátos homokos talajban, addig az újgenerációs szekvenálás által a szintén az Acidobacteria törzsbe tartozó Pyrinomonadaceae család képviselőit azonosítottuk. Ezek a tapasztalatok, nemcsak a különböző molekuláris technológiák felbontóképessége között meglévő különbségekre utalnak (Gong és mtsai, 2013), de a korábbi tapasztalatoknak megfelelően reprezentálja, hogy hosszútávon a tápanyag profilban kialakuló változás miatt, a közösségszerkezetben jelentős átalakulások mennek végbe (Bartram és mtsai, 2014; Jenkins és mtsai, 2017). A változatos előfordulású és különböző környezetekhez adaptálódott szervezeteket tartalmazó Acidobacteria törzs jó indikátora tud lenni a talaj fizikai és kémiai paramétereink megváltozására (Bartram és mtsai, 2014).

Az egyes talajok esetében a rizoszféra bakteriális közösségszerkezetének megváltozásában a kukorica egyedfejlődése volt legjelentősebb tényező. A 2015-ös „szekvenciával-támogatott T-RFLP” és PLFA eredmények egyaránt igazolták a kukorica fenofázisának a talaj bakteriális közösségszerkezetére gyakorolt szignifikáns hatását. Ezt a tudomány számára már ismert hatást (Li és mtsai, 2014; Yang és mtsai, 2017), egészítette ki a savanyú homokos talaj esetében az alkalmazott bioszén kezelés. A 2015-ös genotípusos kísérleti eredmények a talaj bakteriális közösségszerkezetében végbemenő szignifikáns változásokat azonosította. Az eredményeink azt jelezték, hogy a  $15 \text{ t ha}^{-1}$  mennyiséget elérő, vagy azt meghaladó gabonamaghéj és papírgyártású szennyvíziszap alapanyagú bioszén kezelés nemcsak a talaj fizikai és kémiai paramétereit változtatja meg szignifikánsan – amely korábban már ismert volt (Rékási és mtsai, 2018) – hanem ezzel összefüggésben a bakteriális közösségszerkezetet is szignifikánsan befolyásolja.

A nagy bioszén kezelés hatására a talajba jutó labilis, könnyen hasznosítható szénformák hatására, a korábban az oligotróf környezethez adaptálódott lassan növekedő K-stratégista Acidobacteriaceae szervezeteket, az r-stratégista gyorsan növekedő koptotróf baktérium szervezetek kiváltképpen, a Sphingomonadaceae család képviselői által hátrányba kerültek. A jelenséget korábban a bioszén használat következtében kialakuló „koptotróf baktérium közösségi változásként” definiálták (Jenkins és mtsai, 2017). A fenotípusos PLFA vizsgálatok eredményi a nagy dózisu bioszén kezelés hatására megváltozott Gram-negatív/ Gram-pozitív aránnyal is a talaj

szerves anyag tartalmának minőségi és mennyiségi változására utalnak (Kourtev és mtsai, 2003; Zhong és mtsai, 2010).

Ezt a jelenséget támasztják alá az az újgenerációs szekvenálási eredmények is a kezelést követően 30 hónappal. A változás nyomon követhető volt a baktériumok törzs (phylum) és család szintjein is. A kópiotróf Proteobacteria törzsbe tartozó Chitinophagaceae család közösségen belüli aránya a 0 és 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajokhoz képest a közepes dózis (15 t ha<sup>-1</sup>) esetében 2,2x-es, míg a nagy dózis esetében 2,7x-es arányban volt jelen. Ezzel párhuzamosan az oligotróf környezethez adaptálódott Ktedonobacteraceae (Chloroflexi phylum), és Solibacteraceae (Acidobacteriaceae phylum) közösségen belüli aránya az alkalmazott dózis függvényében csökkent. A Ktedonobacteraceae esetében a közepes dózissnál (15 t ha<sup>-1</sup>) 2,0x-es, míg a nagy dózis (30 t ha<sup>-1</sup>) esetében 4x-es arányban, addig az Solibacteraceae esetében 1,9x-es és 3,0x-os arányban csökkent a családok képviselőinek közösségen belüli aránya.

A légköri N<sub>2</sub> fixációban szerepet játszó családok (Rhodospirillaceae, Bradyrhizobiaceae) közösségen belüli aránya is megnőtt a nagy dózisú bioszén kezelés hatására (15 és 30 t ha<sup>-1</sup>) a savanyú talajokban, a 2015-ös „szekvenciával-támogatott” T-RFLP vizsgálatok során. Ez a jelenség visszaül Anderson és mtsai (2011) tapasztalataira, akik szintén a közösségen belüli arány növekedését figyelték meg a szervezeteknek a bioszén kezelést követően. Ezt a jelenséget a bioszén által szolgáltatott labilis szénformáknak tulajdonítják, amelyek jól hasznosítható tápanyagot biztosítanak ezen szervezetek számára. A bioszén ilyen formán „nitrogén szigetként” is felfogható, hiszen nemcsak serkenti a légköri N<sub>2</sub> fixáló szervezetek aktivitást, de megakadályozza a N kimosódását is (Anderson és mtsai, 2011).

A bioszén használat következtében kialakuló kópiotróf baktérium közösségi változás az oligotróf alacsony pH-jú talajokban jól detektálható. A tápanyag gazdagabb semleges pH tartományú talajokban viszont ezen hatások a bakteriális közösségszerkezetben nem, vagy csak kis mértékben követhetők nyomon. A 2015-ös kukorica teljes fenofázisát lefedő genotípusos vizsgálati eredmények nem mutattak a bioszén használatával összefüggésbe hozható változásokat a bakteriális közösségszerkezetben. 30 hónappal a kezelést követően sem találtunk bioszén függő bakteriális közösségszerkezeti átalakulást az újgenerációs szekvenálási módszer segítségével. Mégis a fenotípusos PLFA módszer a Gram-negatív/Gram-pozitív arányban bekövetkező jelentősebb változások a bioszén használatával összefüggő szerves anyag minőségi és mennyiségi változását jelzi. Az R6-fiziológiai érettség fázisában a 15 és 30 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajokban 1,6x-os volt a Gram-negatív/ Gram-pozitív arány a 0 és 3 t ha<sup>-1</sup> bioszén kezelést kapott talajokhoz képest.

Rékási és mtsai (2018) a 2015-ös 5 hónapos szabadföldi kísérlet sorozat során tapasztalt növényi biomassza növekedést a bioszén kezeléssel hozták összefüggésbe. A kutatásaink során végzett eredmények viszont rávilágítottak, hogy a bioszén használata által bekövetkező fizikai és kémiai változások mellett, a bioszén mint oltóanyag-hordozó is szignifikáns hatással van a növény növekedésére. Az a tény, hogy több kezelés esetében sem tapasztaltunk szignifikáns növényi biomasszában bekövetkező változást, az extrém alacsony szintű csapadék mennyiségnek, és a nem megfelelő mennyiségű kiegészítő öntözésnek tudható be.

A bioszén pozitív hatásait a talaj fizikai és kémiai paramétereire a szárazság stressz negatívan befolyásolja (Rogovska és mtsai 2016). Az a tény, hogy a bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés (C) az extrém savanyú talajban (4,4 pH) is sikeresen elősegítette a kukorica biomasszájának növekedését, a potenciális oltóanyag-hordozóként való használatát igazolja. Kiváltképpen, ha figyelembe vesszük, hogy ez a kezelés az *A. brasilense* közösségi arányára szignifikáns mértékű pozitív hatással volt. A savanyú homokos talaj esetében a legnagyobb mértékben a C3 és C4-es ( $30 \text{ t ha}^{-1}$  bioszén +  $1 \times 10^{13}$  PGPR TKE  $\text{ha}^{-1}$ ) kezelések hatására nőtt meg a kukorica biomasszája, mégpedig a kezeltlen talajban mért  $1,76 \text{ t szá. ha}^{-1}$  mennyiségről  $3,34$  és  $3,36 \text{ t szá. ha}^{-1}$ -re mennyiségre nőtt. A homokos talaj esetében a B4 ( $30 \text{ t ha}^{-1}$  bioszén +  $4 \times 10^{11}$  PGPR TKE  $\text{ha}^{-1}$ ) kezelés hatására emelkedett leginkább a kukorica biomassza mennyisége ( $5,99 \text{ t szá. ha}^{-1}$ ) a kezeltlen talajhoz képest ( $4,15 \text{ t szá. ha}^{-1}$ ). A növényi növekedés serkentésének alapfeltétele a kijuttatott PGPR szervezetek túlélése és sikeres gyökérkolonizálása (Buddrus-Schiemann és mtsai, 2010). Ennek értelmében az általunk mért közösségen belüli arányok mellett, a Rékási és mtsai (2018) által leírt kukorica biomassza növekedés a bioszén felszínén immobilizált PGPR törzsek túlélését jelzi.

Ezek az adatok felhívják a figyelmet, hogy a bioszén nagymértékű porozitása által a kijuttatott PGPR szervezetek számára életteret és védelmet biztosít, így azok a szárazságstressz esetén is kifejthetik a növényi növekedés serkentő hatásukat (Ding és mtsai, 2016). A kétsugaras pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok során is láthattuk, hogy a talajoltásra szánt PGPR szervezetek sikeresen megtapadtak a bioszén felszínén. A bioszén mint mikrobiális életteret biztosító funkcióját is megfigyelhettük a SEM analízis által. Továbbá nemcsak a nagyfokú mikrobiális kolonizációt tapasztaltuk, de a nagymértékű talaj aggregátum felhalmozódást és stabilizálódást is az egyes bioszének felszínén, így „vizualizálva” bioszén talajaggregátum és tápanyag megkötő képességét.

## VIII. ÖSSZEFOGLALÓ

A bioszenet a szénmegkötő képessége által kezdték el használni a talaj tápanyagtartalmának javítására és a klímaváltozás folyamatának mérséklésére. Figyelembe véve az emberiség folyamatosan növekvő tápanyag igényét, a bioszén és a leromlott termőképességű talajokhoz adaptált növényi növekedés serkentő rizobaktériumok (PGPR) együttes használatának lehetősége, mint szerves talajerőpotló, a fenntartható mezőgazdaság egy lehetséges eszközét kínálja.

Jelen kutatásban a bioszén + savanyú, illetve lúgos (karbonátos) leromlott talajra adaptált PGPR oltóanyagokat használtunk három különböző dózisban, savanyú (pH 4,4) és lúgos (pH 7,9) homokos talajokon, annak érdekében, hogy a talaj termőképességét, illetve a kukorica növekedését és termésmennyiségét növeljük. A kutatás célja, hogy a bioszén és PGPR oltóanyagok együttes használatának hatását detektáljuk a talajbiótára, az oltásra használt PGP baktériumokra és kukorica egyedfejlődésére. A talaj bakteriális közösség szerkezete a genotípusos „szekvenciával-támogatott” terminális restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (T-RFLP) és fenotípusos foszfolipid zsírsav (PLFA) elemzés által egyaránt feltárásra került. Az oltásra használt PGP baktériumok elkülönítése és relatív abundanciájának meghatározása érdekében a T-RFLP módszer lett használva, amely során két különböző restrikciós endonukleáz került kiválasztásra *in silico*, és lett *in vitro* tesztelve. A bakteriális közösség szerkezetén belül a bioszén kezelés hosszútávú (30 hónapos) hatásainak a felderítésére Illumina MiSeq új generációs szekvenálási (NGS) technika lett felhasználva, míg a bioszén felületi karakterisztikájának vizualizációjának érdekében pásztázó elektronmikroszkóp.

A kukorica egyedfejlődését lefedő tanulmány során a megalkotott T-RFLP modell rendszer a savanyú homokos talajra kijuttatott *Azospirillum brasilense* (1-6 szoros közösségen belüli aránya a kontrol talajhoz képest) és a karbonátos homokos talajra kijuttatott *Azospirillum irakense* (1-4 szoros közösségen belüli aránya a kontrol talajhoz képest) esetében a kezelés szignifikáns pozitív hatását mutatott. A bioszén mint oltóanyag hordozó (felszínre immobilizált) és a nagy dóziséű bioszén kezelés egyaránt pozitívan befolyásolta a PGPR baktériumokat. A növény egyedfejlődése és a nagy dóziséű (15 and 30 t ha<sup>-1</sup>) bioszén kezelés szignifikáns hatása egyaránt detektálható volt a savanyú homokos talajon, míg a karbonátos homokos talajon csak a kukorica fenofázisának a szignifikáns hatása volt mérhető. A nagy dóziséű bioszén mint oltóanyag hordozó kezelés a növényi biomasszát szignifikánsan növelte (2,6–3,2 szoros növekedés a kontrolhoz képest). A nagy dóziséű bioszén kezelés szignifikáns hatását mutatta az NGS elemzés is a savanyú homokos talaj esetében. Az eredmények rávilágítottak, hogy a bioszén használat következtében azok a baktérium

csoporthoz közösségen belüli arány került befolyásolásra, melyek fontos szerepet játszanak a talaj tápanyag ciklusában.



## IX. SUMMARY

Biochar is used to improve soil fertility and mitigate climate change by carbon sequestration. Considering the growing nutritional needs of the human population, the potential of using biochar together with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), adapted to deteriorated soils, as a soil fertilization technique, offers an alternative way for sustainable agriculture.

In the present study biochar + acid and alkaline (calcareous) stress adapted PGPR inoculants were applied in three different quantities in order to improve soil fertility to enhance maize growth and crop yield in an acidic (pH 4.4) and calcareous (pH 7.9) sandy soils. The objective of the study was to monitor the effect of biochar on soil biota and on the inoculated PGP bacteria in both soils during the maize (*Zea mays*) development stages. Soil bacterial community structure was characterized with the genotyping sequence-aided terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique and the phenotyping phospholipid fatty acid analysis (PLFA). T-RFLP method was applied also for detecting and estimating the relative abundance of the inoculated PGP bacteria, for that purpose two different restriction endonucleases were selected *in silico* and tested *in vitro* for specific detection of the inoculated PGPR. Long-term (30 month) effects of biochar application were also measured by new generation sequencing (NGS) Illumina Miseq technology, besides visualizing the surface characteristics of the biochar by scanning electron microscopy (SEM).

In the study covering the maize development phases T-RFLP model system indicated significant positive effect of inoculants on the relative abundance of *Azospirillum brasilense* (1–6 times higher relative abundances compared to the control) and *Azospirillum irakense* (1–4 times higher relative abundances compared to the control) in the acidic and calcareous sandy soils, respectively. Inocula immobilized on the biochar surface, as well as high doses of biochar treatments positively influenced the inoculated bacteria. The bacterial community structure in the rhizosphere was significantly influenced both by maize growth stage and by high doses (15 and 30 t ha<sup>-1</sup>) of biochar treatment in the acidic sandy soil, while in calcareous sandy soil only maize growth related significant influence were detected. In the case of the immobilized PGP bacteria on the biochar surface treatment the maize above-ground biomass was significantly enhanced (2.6–3.2 times of the control). Significant high doses of biochar effects were detected by NGS method as well in acidic sandy soil. The results revealed that high doses of biochar treatment influenced the abundance of those bacterial groups that might play important roles in soil nutrient cycles.

## X. IRODALOMJEGYZÉK

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Abd El-Fattah, D. A., Eweda, W. E., Zayed, M. S., & Hassanein, M. K. (2013). Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of Azotobacter chroococcum inoculant. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.07.001>
- Abujabhah, I.S., Doyle, R.B., Bound, S.A., Bowman, J.P., 2018. Assessment of bacterial community composition, methanotrophic and nitrogen-cycling bacteria in three soils with different biochar application rates. *J. Soils Sediments* 18, 148–158. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1733-1>
- Acea, M. J., & Alexander, M. (1988). Growth and survival of bacteria introduced into carbon-amended soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 703–709. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90155-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90155-1)
- Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2011). Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J., 2011. Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. pp. 1–516. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5>.
- Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S., Ok, Y.S. (2014) Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.071>

- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Anderson, C.R., Condron, L.M., Clough, T.J., Fiers, M., Stewart, A., Hill, R.A., Sherlock, R.R., 2011. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia (Jena)* 54, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.07.005>
- Asai, H., Samson, B. K., Stephan, H. M., Songyikhangsuthor, K., Homma, K., Kiyono, Y., Inoue, Y., Shiraiwa, T., & Horie, T. (2009). Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos. 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. *Field Crops Research*, 111(1–2), 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.10.008>
- Atafar, Z., Mesdaghinia, A., Nouri, J., Homae, M., Yunesian, M., Ahmadimoghaddam, M., & Mahvi, A. H. (2010). Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(1–4), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0659-x>
- Baca, B. E., Soto-Urzu, L., Xochihua-Corona, Y. G., & Cuervo-Garcia, A. (1994). Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indoleacetic acid in *Azospirillum* strains. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90195-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90195-3)
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bagreev, A., T. Badosz, and D. Locke. 2001. Pore structure and surface chemistry of adsorbents obtained by pyrolysis of sewage-derived fertilizer. *Carbon* 39:1971–79. doi:10.1016/S0008-6223(01)00026-4
- Baiamonte, G., De Pasquale, C., Marsala, V., Cimò, G., Alonzo, G., Crescimanno, G., & Conte, P. (2015). Structure alteration of a sandy-clay soil by biochar amendments. *Journal of Soils and Sediments*, 15(4), 816–824. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-0960-y>

- Bailey, V. L., Fansler, S. J., Smith, J. L., & Bolton, H. (2011). Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(2), 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.014>
- Bakker, P.A.H., Lemanceau, P., Raaijmakers, J., Bloemberg, G., 2010. New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. Springer.
- Balestrini, R E. Borriello R. L, Bianciotto V., (2015). Chapter 11 - Plant-Soil Biota Interactions. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*, Pages 311-338, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00011-6>
- Balestrini, R., Lumini, E., Borriello, R., & Bianciotto, V. (2015). Plant-Soil Biota Interactions. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (4th ed.)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415955-6.00011-6>
- Ball, P. N., MacKenzie, M. D., DeLuca, T. H., & Montana, W. E. H. (2010). Wildfire and Charcoal Enhance Nitrification and Ammonium-Oxidizing Bacterial Abundance in Dry Montane Forest Soils. *Journal of Environmental Quality*, 39(4), 1243–1253. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0082>
- Bartram, A.K., Jiang, X., Lynch, M.D.J., Masella, A.P., Nicol, G.W., Dushoff, J., Neufeld, J.D., 2014. Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone Experimental Farm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 403–415. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12231>.
- Bashan, Y., 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 246–256. <https://doi.org/10.1007/s003740050549>.
- Bashan, Y., 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 246–256. <https://doi.org/10.1007/s003740050549>.
- Becraft, E. D., Woyke, T., Jarett, J., Ivanova, N., Godoy-Vitorino, F., Poulton, N., Brown, J. M., Brown, J., Lau, M. C. Y., Onstott, T., Eisen, J. A., Moser, D., & Stepanauskas, R. (2017). Rokubacteria: Genomic giants among the uncultured bacterial phyla. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02264>
- Benbrook, C. M. (1999). World food system challenges and opportunities: GMOs, biodiversity, and lessons from America’s Heartland. In Paper presented as part of the University of Illinois World Food and Sustainable Agriculture Program, January (Vol. 27).

- Bharti, N., Barnawal, D., Wasnik, K., Krishna, S., Kalra, A., 2016. Co-inoculation of *Dietzia natronolimnaea* and *Glomus intraradices* with vermicompost positively influences *Ocimum basilicum* growth and resident microbial community structure in salt affected low fertility soils. *Appl. Soil Ecol.* 100, 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.01.003>
- Biederman, L. A., & Stanley Harpole, W. (2013). Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: A meta-analysis. *GCB Bioenergy*, 5(2), 202–214. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12037>
- Bishopp, A., and Lynch, J. P. (2015). The hidden half of crop yields. *Nat. Plants* 1, 10–38. doi: 10.1038/nplants.2015.117
- Boersma, F.G.H., Warmink, J.A., Andreote, F.A., Elsas, J.D. Van, 2009. Selection of Sphingomonadaceae at the base of *Laccaria proxima* and *Russula exalbicans* fruiting bodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1979–1989. <https://doi.org/10.1128/AEM.02489-08>.
- Bridle, T. R. & Pritchard, D., 2004. Energy and nutrient recovery from sewage sludge via pyrolysis. *Water Sci. Technol.* 50. 169–175.
- Buddrus-Schiemann, K., Schmid, M., Schreiner, K., Welzl, G., Hartmann, A., 2010. Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. *Microb. Ecol.* 60, 381–393. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9720-8>.
- Bueche, M., Wunderlin, T., Roussel-Delif, L., Junier, T., Sauvain, L., Jeanneret, N., Junier, P., 2013. Quantification of endospore-forming Firmicutes by quantitative PCR with the functional gene *spo0A*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5302–5312. <https://doi.org/10.1128/AEM.01376-13>.
- Cayuela ML, Sánchez-Monedero MA, Roig A, Hanley K, Enders A, Lehmann J (2013) Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N<sub>2</sub>O emissions? *Sci Report* 3: 17–32. doi:10.1038/srep01732
- Ceccherini, M.T., Castaldini, M., Azzini, A., Fancelli, S., Bazzicalupo, M., Miclaus, N., 2001. Occurrence of *Azospirillum brasilense* in soils amended with swine manure. *Ann. Microbiol.* 51, 29–38.
- Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dyé, F., Bertrand, C., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-

- dependent effect in the *Azospirillum*–*Oryza sativa* association. *Phytochemistry* 87, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>.
- Chen, W., Meng, J., Han, X., Lan, Y., Zhang, W. (2019) Past, present, and future of biochar. *Biochar* 1, 75–87. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00008-3>
- Cheng, J., Lee, X., Gao, W., Chen, Y., Pan, W., Tang, Y., 2017. Effect of biochar on the bioavailability of difenoconazole and microbial community composition in a pesticide-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* 121, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.009>
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18: 117–143
- Conn, V.M., Franco, C.M.M., 2004. Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6407–6413. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6407-6413.2004>.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J., Mauch-mani, B., & Mauch-mani, B. (2002). TiPS-Conrath-2012ReviewPeterseMauchMani. 7(5), 210–216.
- Cooper, J. E., & Scherer, H. W. (2011). Nitrogen Fixation. In Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9>
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Crane-Droesch, A., Abiven, S., Jeffery, S., & Torn, M. S. (2013). Heterogeneous global crop yield response to biochar: A meta-regression analysis. *Environmental Research Letters*, 8(4). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/4/044049>
- Culman, S.W., Bukowski, R., Gauch, H.G., Cadillo-Quiroz, H., Buckley, D.H., 2009. T- REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-171>.
- Darwent, M.J., Paterson, E., McDonald, A.J.S., Tomos, A.D., 2003. Biosensor reporting of root exudation from *Hordeum vulgare* in relation to shoot nitrate concentration. *Exp. Bot.* 54, 325–334.

- DeLuca TH, MacKenzie MD, Gundale MJ, Holben WE (2006) Wildfire- produced charcoal directly influences nitrogen cycling in ponderosa pine forests. *Soil Sci Soc Am J* 70:448–453. doi:10.2136/sssaj2005.0096
- Demeyer, A., Voundi Nkana, J., Verloo, M.. (2001) Characteristics of wood ash and influence on soil properties and nutrient uptake: an overview. *Bioresour. Technol.* 77, 287–295. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00043-2)
- Demisie, W., Zhang M. 2015. Effect of biochar application on microbial biomass and enzymatic activities in degraded red soil. *African Journal of Agricultural Research*, 10(8), 755-766.
- Ding, Y., Liu, Y., Liu, S., Li, Z., Tan, X., Huang, X., Zeng, G., Zhou, L., & Zheng, B. (2016). Biochar to improve soil fertility. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2). <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0372-z>
- Domene, X., Mattana, S., Hanley, K., Enders, A., & Lehmann, J. (2014). Medium-term effects of corn biochar addition on soil biota activities and functions in a temperate soil cropped to corn. *Soil Biology and Biochemistry*, 72, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.035>
- dos Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., & Rigobelo, E. C. (2020). Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136>
- Dugardeyn, J., & Van Der Straeten, D. (2008). Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Science*, 175(1–2), 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.02.003>
- EBC (2012) European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar. European Biochar Foundation (EBC), Arbaz, Switzerland
- Egamberdieva, D., Hua, M., Reckling, M., Wirth, S., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2018). Potential effects of biochar-based microbial inoculants in agriculture. *Environmental Sustainability*, 1(1), 19–24. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0010-6>
- Flórián, N., Ladányi, M., Ittész, A., Kröel-Dulay, G., Ónodi, G., Mucsi, M., Szili-Kovács, T., Gergócs, V., Dányi, L., & Dombos, M. (2019). Effects of single and repeated drought on soil microarthropods in a semi-arid ecosystem depend more on timing and duration than drought severity. *PLoS ONE*, 14(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219975>

- Fox, A., Gahan, J., Ikoyi, I., Kwapinski, W., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Schmalenberger, A., 2016. Miscanthus biochar promotes growth of spring barley and shifts bacterial community structures including phosphorus and sulfur mobilizing bacteria. *Pedobiologia (Jena)* 59, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2016.07.003>
- Fox, A., Kwapinski, W., Griffiths, B. S., & Schmalenberger, A. (2014). The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion of *Lolium perenne*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 78–91. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12374>
- Fredriksson, N.J., Hermansson, M., Wilén, B.-M., 2014. Tools for T-RFLP data analysis using Excel. *BMC Bioinformatics* 15, 361. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0361-7>.
- Frostegård, A., Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22, 59–65. <https://doi.org/10.1007/s003740050076>.
- Frostegård, A., Bååth, E., Tunlid, A., Frostegård, Å., Bååth, E., Tunlio, A., 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 25, 723–730. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90113-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90113-P).
- Ghazi AA (2017) Potential for biochar as an alternate carrier to peat moss for the preparation of *Rhizobia* bio inoculum. *Microbiol Residual Journal Intern* 18(4):1–9
- Glaser, B., & Birk, J. J. (2012). State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de índio). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 82, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.11.029>
- Glaser, B., Lehmann, J., Zech, W. (2002) Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - a review. *Biol. Fertil. Soils* 35, 219–230. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0466-4>
- Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., & McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5–6), 227–242. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>
- Glick, B., R., (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications* Hindawi Publishing Corporation, Scientifica



- Głodowska, M., Husk, B., Schwinghamer, T. et al. Biochar is a growth-promoting alternative to peat moss for the inoculation of corn with a pseudomonad. *Agron. Sustain. Dev.* 36, 21 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0356-z>
- Głodowska, M., Schwinghamer, T., Husk, B., Smith, D., 2017. Biochar based inoculants improve soybean growth and nodulation. *J. Agric. Sci.* 8, 1048–1064.
- Gong, L., Han, Y., Chen, L., Liu, F., Hao, P., Sheng, J., Li, X. H., Yu, D. M., Gong, Q. M., Tian, F., Guo, X. K., & Zhang, X. X. (2013). Comparison of next-generation sequencing and clone-based sequencing in analysis of hepatitis b virus reverse transcriptase Quasispecies heterogeneity. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4087–4094. <https://doi.org/10.1128/JCM.01723-13>
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Gul, S., Whalen, J.K., Thomas, B.W., Sachdeva, V., Deng, H. (2015) Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 206, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.03.015>
- Hale, L., Luth, M., Crowley, D., 2015. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biol. Biochem.* 81, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.023>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T.a.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 1–9. [doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025)
- Han, G., Lan, J., Chen, Q., Yu, C., Bie, S., 2017. Response of soil microbial community to application of biochar in cotton soils with different continuous cropping years. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10427-6>
- Hao, T., Chen, S., 2017. Colonization of wheat, maize and cucumber by *Paenibacillus polymyxa* WLY78. *PLoS One* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169980>.
- Harter, J., Krause, H. M., Schuettler, S., Ruser, R., Fromme, M., Scholten, T., Kappler, A., & Behrens, S. (2014). Linking N<sub>2</sub>O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. *ISME Journal*, 8(3), 660–674. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.160>

- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1–2), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3233–3241. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>.
- Hussain, A., Ahmad, M., Mumtaz, M. Z., Ali, S., Sarfraz, R., Naveed, M., Jamil, M., & Damalas, C. A. (2020). Integrated Application of Organic Amendments with *Alcaligenes* sp. AZ9 Improves Nutrient Uptake and Yield of Maize (*Zea mays*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1277–1292. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10067-7>
- Huysman, F., & Verstraete, W. (1993). Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: Influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90245-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90245-7)
- Jeffery, S., Abalos, D., Prodana, M., Bastos, A. C., Van Groenigen, J. W., Hungate, B. A., & Verheijen, F. (2017). Biochar boosts tropical but not temperate crop yields. *Environmental Research Letters*, 12(5). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa67bd>
- Jeffery, S., Verheijen, F. G. A., van der Velde, M., & Bastos, A. C. (2011). A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 144(1), 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.08.015>
- Jenkins, J.R., Viger, M., Elizabeth C. A., Harris, M.Z, Ventura, M., (2017). Biochar alters the soil microbiome and soil function: results of next-generation amplicon sequencing across Europe. *Global Change Biology - Bioenergy*, 9 (3), pp.591-612. [10.1111/gcbb.12371](https://doi.org/10.1111/gcbb.12371). [ff10.1111/gcbb.12371](https://doi.org/10.1111/gcbb.12371). [ffhal01541800](https://doi.org/10.1111/gcbb.12371)
- Jha, C. K., Patel, D., Rajendran, N., & Saraf, M. (2010). Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *Journal of Basic Microbiology*, 50(3), 211–217. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900272>

- Jiang, H., Chen, Y., Hu, Y., Wang, Z., & Lu, X. (2021). Soil Bacterial Communities and Diversity in Alpine Grasslands on the Tibetan Plateau Based on 16S rRNA Gene Sequencing. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.630722>
- Jien, S. H., & Wang, C. S. (2013). Effects of biochar on soil properties and erosion potential in a highly weathered soil. *Catena*, 110, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.06.021>
- Jones, D.L., Rousk, J., Edwards-Jones, G., DeLuca, T.H., Murphy, D.V. (2012) Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biol. Biochem.* 45, 113–124.
- Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D., & De La Luz Mora, M. (2011). Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00995.x>
- Joseph, S. D., Camps-Arbestain, M., Lin, Y., Munroe, P., Chia, C. H., Hook, J., Van Zwieten, L., Kimber, S., Cowie, A., Singh, B. P., Lehmann, J., Foidl, N., Smernik, R. J., & Amonette, J. E. (2010). An investigation into the reactions of biochar in soil. *Australian Journal of Soil Research*, 48(6–7), 501–515. <https://doi.org/10.1071/SR10009>
- Kalev, S. D., & Toor, G. S. (2018). The Composition of Soils and Sediments. *Green Chemistry: An Inclusive Approach*, 339–357. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00014-5>
- Karczewski, K., Riss, H.W., Meyer, E.I., 2017. Limnological comparison of DNA-finger- printing (T-RFLP) and high-throughput sequencing (HTS) to assess the diversity and composition of microbial communities in groundwater ecosystems. *Limnologica* 67, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.10.001>.
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, 212–213(August), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Kim, J. S., Sparovek, G., Longo, R. M., De Melo, W. J., & Crowley, D. (2007). Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 684–690. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.010>

- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. In *Nature* (Vol. 286, Issue 5776, pp. 885–886). <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M. et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885–886 (1980). <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Kolton, M., Graber, E.R., Tsehansky, L., Elad, Y., Cytryn, E., 2017. Biochar-stimulated plant performance is strongly linked to microbial diversity and metabolic potential in the rhizosphere. *New Phytol.* 213, 1393–1404. <https://doi.org/10.1111/nph.14253>
- Kolton, M., Harel, Y. M., Pasternak, Z., Graber, E. R., Elad, Y., & Cytryn, E. (2011). Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4924–4930. <https://doi.org/10.1128/AEM.00148-11>
- Kovács, R., Puspán, I., Rizó, B., Imre, C.S., Pék, N., Imri, Á., Kárpáti, E., Kutasi, J., 2015. The effects of biochar on rhizobacteria. In: 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. *Acta Microbiol. IMM. H.*, 62. July 8–10. Supplement. (170 p)
- Kučerík, J., Tokarski, D., Demyan, M. S., Merbach, I., & Siewert, C. (2018). Linking soil organic matter thermal stability with contents of clay, bound water, organic carbon and nitrogen. *Geoderma*, 316(November 2017), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.001>
- Kutasi, J., Kárpáti, É., Kovács, R., Szkladányi, S., Imre, Cs., Pék, N., Erdélyi, B., 2015. Soil bacteria for inoculating stress soils. Patent number WO2015118516.
- Laghari, M., Naidu, R., Xiao, B., Hu, Z., Mirjat, M.S., Hu, M., Kandhro, M.N., Chen, Z., Guo, D., Jogi, Q., Abudi, Z.N., Fazal, S. (2016) Recent developments in biochar as an effective tool for agricultural soil management: a review. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4840–4849. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7753>
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* Pp. 115–175 in Stackebrandt E. and Goodfellow M., editors
- Lehmann J, Czimczik C, Laird C, Sohi S (2009) Stability of biochar in soil. In: Lehmann J, Josep S (eds) *Biochar for environmental management: science and technology*. Earthscan, London
- Lehmann, J., 2007. Bio-Energy in the Black. *Frontiers in Ecology Environments* 5, 381–387.

- Lehmann, J., Da Silva, J.P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W., Glaser, B. (2003) Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: Fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant Soil* 249, 343–357. <https://doi.org/10.1023/A:1022833116184>
- Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1812–1836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>
- Li, J., Glick, B.R., 2001. Transcriptional regulation of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene (*acdS*). *Can. J. Microbiol.* 47, 359–367
- Li, M., Liu, M., Li, Z. pei, Jiang, C. yu, & Wu, M. (2016). Soil N transformation and microbial community structure as affected by adding biochar to a paddy soil of subtropical China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1), 209–219. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61136-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61136-4)
- Li, Q., Lei, Z., Song, X., Zhang, Z., Ying, Y., Peng, C., 2018. Biochar amendment decreases soil microbial biomass and increases bacterial diversity in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) plantations under simulated nitrogen deposition. *Environ. Res. Lett.* 13. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aab53a>
- Li, X., Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A., Mackie, R., 2014. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol. Biochem.* 68, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Li, X., Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A., Mackie, R., 2014. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol. Biochem.* 68, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O’Neill, B., Skjemstad, J.O., Thies, J., Luizão, F.J., Petersen, J., Neves, E.G., 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society of America Journal* 70, 1719–1730. Loon, V. (2007). Plant responses to plant growth-promoting bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119, 243.

- Liang, F., Li, G., Lin, Q., Zhao, X. (2014) Crop yield and soil properties in the first 3 years after biochar application to a calcareous soil. *J. Integr. Agric.* 13, 525–532. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60708-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60708-X)
- Liu, J., Schulz, H., Brandl, S., Miehtke, H., Huwe, B. & Glaser, B., 2012. Short-term effect of biochar and compost on soil fertility and water status of a Dystric Cambisol in NE Germany under field conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175. 698–707.
- Liu, W., Marsh, T., Cheng, H., Forney, L., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4516–4522. doi:0099-2240/97/\$04.00?0.
- Lottmann, J., Heuer, H., Vries, J.D., Mahn, A., During, K., Wackernagel, W., Smalla, K., Berg, G., 2000. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33, 41–49. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00042-8).
- Lu, H., Siddique, M., Liu, X., Ji, H., Li, L., Zheng, J., Wanjiru, G., Joseph, S., & Pan, G. (2015). European Journal of Soil Biology Changes in soil microbial community structure and enzyme activity with amendment of biochar-manure compost and pyroligneous solution in a saline soil from Central China. *European Journal of Soil Biology*, 70, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.07.005>
- Lu, S. G., Sun, F. F., & Zong, Y. T. (2014). Effect of rice husk biochar and coal fly ash on some physical properties of expansive clayey soil (Vertisol). *Catena*, 114, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.10.014>
- Lu, T., Ke, M., Lavoie, M., Jin, Y., Fan, X., Zhang, Z., Fu, Z., Sun, L., Gillings, M., Peñuelas, J., Qian, H., & Zhu, Y. G. (2018). Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering. *Microbiome*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0615-0>
- Lua, A.C., Yang, T., Guo, J. (2004) Effects of pyrolysis conditions on the properties of activated carbons prepared from pistachio-nut shells. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 72, 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2004.08.001>
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development.

- Environmental Science and Pollution Research, 24(4), 3315–3335.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
- Masto RE, Ansari MA, George J, Selvi V, Ram L (2013) Co-application of biochar and lignite fly ash on soil nutrients and biological parameters at different crop growth stages of Zea mays. *Ecol Eng* 58:314–322. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.07.011
- Mezősi, G. (2017). Soils of Hungary. 165–174. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45183-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45183-1_4)
- Moeseneder, M.M., Winter, C., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2001. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J. Microbiol. Methods* 44, 159–172. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00247-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00247-5)
- Molnár, M., Vaszita, E., Farkas, É., Ujaczki, É., Fekete-Kertész, I., Tolner, M., Klebercz, O., Kirckeszner, C., Gruiz, K., Uzinger, N., Feigl, V., 2016. Acidic sandy soil improvement with biochar — A microcosm study. *Sci. Total Environ.* 563–564, 855–865. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.091>
- Murphy, B. W. (2014). Soil organic matter and soil function - Review of the literature and underlying data. Commonwealth of Australia report, May, 1–155.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Phosphorus in Action. 26, 215–243. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Nelissen V, Ruysschaert G, Manka'Abusi D, D'Hose T, De BeufK, Al-Barri B, Cornelis W, Boeckx P (2015) Impact of a woody biochar on properties of a sandy loam soil and spring barley during a two-year field experiment. *Eur J Agron* 62:65–78. doi:10.1016/j.eja.2014.09.006
- Nelissen V, Saha BK, Ruysschaert G, Boeckx P (2014) Effect of different biochar and fertilizer types on N<sub>2</sub>O and NO emissions. *Soil Biol Biochem* 70:244–255. doi:10.1016/j.soilbio.2013.12.026
- New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research. (2010). <http://books.google.com/books?id=KULpLE3EzcYC&pgis=1>
- Nkebiwe, P. M., Weinmann, M., & Müller, T. (2016). Improving fertilizer-depot exploitation and maize growth by inoculation with plant growth-promoting bacteria: From lab to field. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0065-5>

- Novak, J.M., Busscher, W.J., Laird, D.L., Ahmedna, M., Watts, D.W., Niandou, M.A.S. (2009) Impact of biochar amendment on fertility of a southeastern coastal plain soil. *Soil Sci.* 174, 105–112. <https://doi.org/10.1097/SS.0b013e3181981d9a>
- Novak, J.M., Lima, I., Xing, B., Gaskin, J.W., Steiner, C., Das, K.C., Ahmedna, M., Rehrh, D., Watts, D.W., Busscher, W.J., Schomberg, H. (2009) Characterization of designer biochar produced at different temperatures and their effects on a loamy sand URES AND THEIR EFFECTS ON A LOAMY SAND. *Ann. Environ. Sci.* 3, 195–206.
- O'Neill B, Grossman J, Tsai MT, Gomes JE, Lehmann J, Peterson J, Neves E, Thies JE (2009) Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microb Ecol* 58:23–35. doi:10.1007/s00248-009-9515-y
- Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C. A. (1994). Review Agronomic Applications of Azospirillum: an Evaluation of 20 Years Worldwide Field Inoculation. 26(12), 1591–1601.
- Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2018. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oram, N. J., Van de Voorde, T. F. J., Ouwehand, G. J., Bezemer, T. M., Mommer, L., Jeffery, S., & Groenigen, J. W. Van. (2014). Soil amendment with biochar increases the competitive ability of legumes via increased potassium availability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 191, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.031>
- Ouyang, L., Wang, F., Tang, J., Yu, L., & Zhang, R. (2013). Effects of biochar amendment on soil aggregates and hydraulic properties. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(4), 991–1002. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000078>
- Park JH, Choppala GK, Bolan NS, Chung JW, Chuasavathi T (2011) Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant Soil* 348:439–451. doi:10.1007/s11104-011-0948-y
- Patil, S. S., Adetutu, E. M., Rochow, J., Mitchell, J. G., & Ball, A. S. (2014). Sustainable remediation: Electrochemically assisted microbial dechlorination of tetrachloroethene-contaminated groundwater. *Microbial Biotechnology*, 7(1), 54–63. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12089>



- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207–220. <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Paz-Ferreiro J, Gascó G, Gutiérrez B, Méndez A (2012) Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. *Biol Fertil Soils* 48:511–517. doi:10.1007/s00374-011-0644-3
- Peake LR, Reid BJ, Tang X (2014) Quantifying the influence of biochar on the physical and hydrological properties of dissimilar soils. *Geoderma* 235:182–190. doi:10.1016/j.geoderma.2014.07.002
- Phillips, K. A., Skirpan, A. L., Liu, X., Christensen, A., Slewinski, T. L., Hudson, C., Barazesh, S., Cohen, J. D., Malcomber, S., & McSteen, P. (2011). *vanishing tassel2* Encodes a Grass-Specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *Plant Cell*, 23(2), 550–566. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075267>
- Pietikäinen J, Kiiikkilä O, Fritze H (2000) Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. *Oikos* 89:231–242. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.890203.x
- Prayogo C, Jones JE, Baeyens J, Bending GD (2014) Impact of biochar on mineralisation of C and N from soil and willow litter and its relationship with microbial community biomass and structure. *Biol Fertil Soils* 50:695–702. doi:10.1007/s00374-013-0884-5
- Prendergast-Miller, M. T., Duvall, M., & Sohi, S. P. (2014). Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and impacts on soil nutrient availability. *European Journal of Soil Science*, 65(1), 173–185. <https://doi.org/10.1111/ejss.12079>
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Rékási, M., Szili-Kovács, T., Takács, T., Bernhardt, B., Puspán, I., Kovács, R., Kutasi, J., Draskovits, E., Molnár, S., Molnár, M., Uzing, N., 2018. Improving the fertility of sandy soils in the temperate region by combined biochar and microbial inoculant treatments. *Archives of Agronomy and Arch. Agron. Soil Sci. Soil Science* 0, 1–14. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1482536>
- Rogovska, N., Laird, D.A., Karlen, D.L., 2016. Corn and soil response to biochar application and stover harvest. *Field Crops Res.* 187, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.12.013>

- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M., & Pérez-Vicente, R. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, 10(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4:134–151. doi:10.1038/ismej.2010.58
- Rubio, L., M. & Ludden, P., W., (2008). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase *Annual Reviews of Microbiology*, 62 (2008), pp. 93-111
- Ruckdäschel, E., Kittell, B. L., Helinski, D. R., & Klingmüller, U. (1988). Aromatic Amino Acid Aminotransferases of *Azospirillum Lipoferum* and Their Possible Involvement in IAA Biosynthesis. *Azospirillum IV*, 49–53. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-73072-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-73072-6_7)
- Saranya, K., Kumutha, K., Krishnan, P.S., 2011. Influence of biochar and *Azospirillum* application on the growth of maize. *Madras Agric. J.* 98, 158–164.
- Savci, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73–80. <https://doi.org/10.7763/ijesd.2012.v3.191>
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(4), 751–765. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>
- Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L., & Luna-Guido, M. (2014). Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere*, 24(3), 291–307. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60016-3)
- Sharan BS, Nehra V, 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011, 1-30.
- Shintani, M., Urata, M., Inoue, K., Eto, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., Nojiri, H., 2007. The *Sphingomonas* plasmid pCAR3 is involved in complete mineralization of carbazole. *J. Bacteriol.* 189, 2007–2020. <https://doi.org/10.1128/JB.01486-06>.
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S.J., Foster, J.A., Forney, L.J., 2007. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length

- polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microb. Ecol.* 53, 562–570. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9106-0>.
- Singh BP, Hatton BJ, Balwant S, Cowie AL, Kathuria A (2010) Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. *J Environ Qual* 39:1224–1235. doi:10.2134/jeq2009.0138
- Singh, M. P., & Baruah, J. B. (2017). Modulation of dual fluorescence modes and emissions of 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydro-naphthalen-2-yl-amino)benzoic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1149, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.004>
- Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A., & Jha, P. N. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: A weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>
- Smith, C. R., Blair, P. L., Boyd, C., Cody, B., Hazel, A., Hedrick, A., Kathuria, H., Khurana, P., Kramer, B., Muterspaw, K., Peck, C., Sells, E., Skinner, J., Tegeler, C., & Wolfe, Z. (2016). Microbial community responses to soil tillage and crop rotation in a corn/soybean agroecosystem. *Ecology and Evolution*, 6(22), 8075–8084. <https://doi.org/10.1002/ece3.2553>
- Sofa, A., Mininni, A. N., & Ricciuti, P. (2020). Soil macrofauna: A key factor for increasing soil fertility and promoting sustainable soil use in fruit orchard agrosystems. *Agronomy*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy10040456>
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. 1–13.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stefanovits P., Füleky Gy. Filep Gy., (2010) Talajtan. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Stolt, M. H., & Lindbo, D. L. (2010). Soil Organic Matter. In *Interpretation of Micromorphological Features of Soils and Regoliths*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53156-8.00017-9>
- Stuurman, N., Bras, C.P., Schlaman, H.R.M., Wijfjes, A.H.M., Bloemberg, G., Spaink, H.P., 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 1163–1169. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1163>.

- Suman, S., & Gautam, S. (2017). Effect of pyrolysis time and temperature on the characterization of biochars derived from biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 39(9), 933–940. <https://doi.org/10.1080/15567036.2016.1276650>
- Sun D, Hale L, Crowley D (2016) Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology of Fertile Soils* 52(4):515–522
- Sun, M., Chen, B., Wang, H., Wang, N., Ma, T., Cui, Y., Luan, T., Chun, S., Liu, C., & Wang, L. (2021). Microbial Interactions and Roles in Soil Fertility in Seasonal Freeze-Thaw Periods under Different Straw Returning Strategies.
- Sundara, B., Natarajan, V., & Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 77(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00048-5)
- Tammeorg, P., Brandstaka, T., Simojoki, A., & Helenius, J. (2013). Nitrogen mineralisation dynamics of meat bone meal and cattle manure as affected by the application of softwood chip biochar in soil. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 103(1), 19–30. <https://doi.org/10.1017/S1755691012000047>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., Ramsing, N.B., 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1405–1415.
- Thu, T., Nguyen, N., Wallace, H.M., Xu, C., Zwieten, L. Van, Han, Z., Xu, Z., Che, R., Tahmasbian, I., Hu, H., Hosseini, S., 2018. The effects of short term, long term and reapplication of biochar on soil bacteria. *Sci. Total Environ.* 636, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.278>.
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20260–20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>

- Tindall BJ, Rosselló-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P, (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Micr*, 60, 249-266.
- Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M., & McKelvie, I. D. (2002). Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1420), 449–469. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0837>
- Uzinger, N., & Rékási M., M. T. A. (2015). A bioszén felhasználásának lehetőségei a talaj tápanyag - utánpótlásában – Szemle –. 64, 239–256.
- Uzoma KC, Inoue M, Andry H, Fujimaki H, Zahoor A, Nishihara E (2011) Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. *Soil Use Manag* 27:205–212. doi:10.1111/j. 1475-2743.2011.00340.x
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- van Veen, J. A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 121–135. <https://doi.org/10.1128/mubr.61.2.121-135.1997>
- Van Zwieten L, Singh BP, Joseph S, Kimber S, Cowie A, Chan KY (2009) Biochar and emissions of non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases from soil. In: Lehmann J, Joseph S (eds) *Biochar for environmental management: science and technology*. Earthscan, London, pp 227–249
- Várallyay Gy. (1997): A talaj funkciói. *Magyar Tudomány*. XLII. 12. 1414–1430.
- Várallyay, G., 2015. Soils, as the most important natural resources in Hungary (potentialities and constraints) – a review. *Agrokém. Talajt.* 64, 321–338. <https://doi.org/10.1556/0088.2015.64.2.2>.
- Viglašová, E., Galamboš, M., Danková, Z., Krivosudský, L., Lengauer, C. L., Hood-Nowotny, R., Soja, G., Rompel, A., Matík, M., & Briančin, J. (2018). Production, characterization and adsorption studies of bamboo-based biochar/montmorillonite composite for nitrate removal. *Waste Management*, 79 (September), 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.005>

- von Felten, A., Meyer, J.B., Défago, G., Maurhofer, M., 2011. Novel T-RFLP method to investigate six main groups of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads in environmental samples. *J. Microbiol. Methods* 84, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.012>.
- Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A., 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 184, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>.
- Wakelin, S.A., Gerard, E., van Koten, C., Banabas, M., O'Callaghan, M., Nelson, P.N., 2016. Soil physicochemical properties impact more strongly on bacteria and fungi than conversion of grassland to oil palm. *Pedobiologia* 59, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2016.03.001>.
- Wang Y, Yin R, Liu R (2014) Characterization of biochar from fast pyrolysis and its effect on chemical properties of the tea garden soil. *J Anal Appl Pyrol* 110:375–381. doi:10.1016/j.jaap.2014.10.006
- Wang, W., Niu, J., Zhou, X., Wang, Y., 2011. Long-term change in land management from subtropical wetland to paddy field shifts soil microbial community structure as determined by PLFA and T-RFLP. *Pol. J. Ecol.* 59, 37–44. <https://doi.org/10.1007/s11664-009-0947-4>
- Wang, Z., Zheng, H., Luo, Y., Deng, X., Herbert, S., & Xing, B. (2013). Characterization and influence of biochars on nitrous oxide emission from agricultural soil. *Environmental Pollution*, 174, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.003>
- Watzinger, A., Feichtmair, S., Kitzler, B., Zehetner, F., Kloss, S., Wimmer, B., Zechmeister-Boltenstern, S., & Soja, G. (2014). Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized <sup>13</sup>C-labelled biochar as revealed by <sup>13</sup>C PLFA analyses: Results from a short-term incubation and pot experiment. *European Journal of Soil Science*, 65(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/ejss.12100>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(SPEC. ISS. MAR.), 487–511. [https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl\\_1.487](https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl_1.487)
- Xu, H.J., Wang, X.H., Li, H., Yao, H.Y., Su, J.Q., Zhu, Y.G., 2014. Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape. *Environ.Sci. Technol.* 48, 9391–9399. <https://doi.org/10.1021/es5021058>

- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., Ye, B., 2017. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by highthroughput pyrosequencing. *PLoS One* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178425>
- Zelles, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils* 29, 111–129 (1999). <https://doi.org/10.1007/s003740050533>
- Zhang, J., Liu, J., & Liu, R. (2015). Effects of pyrolysis temperature and heating time on biochar obtained from the pyrolysis of straw and lignosulfonate. *Bioresource Technology*, 176, 288–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.011>
- Zhang, M., Riaz, M., Zhang, L., El-Desouki, Z., & Jiang, C. (2019). Biochar induces changes to basic soil properties and bacterial communities of different soils to varying degrees at 25 mm rainfall: More effective on acidic soils. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01321>
- Zhelezova, A., Chernov, T., Tkhakakhova, A., Xenofontova, N., Semenov, M., & Kutovaya, O. (2018). Prokaryotic community shifts during soil formation on sands in the tundra zone. *BioRxiv*, 449926. <https://doi.org/10.1101/449926>
- Zheng H, Wang Z, Deng X, Zhao J, Luo Y, Novak J, Herbert S, Xing B (2013) Characteristics and nutrient values of biochars produced from giant reed at different temperatures. *Bioresour Technol* 130: 463–471. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.044
- Zheng, B.X., Ding, K., Yang, X.R., Wadaan, M.A.M., Hozzein, W.N., Peñuelas, J., Zhu, Y.G., 2019. Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Sci. Total Environ.* 647, 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.454>
- Zhong, W., Gu, T., Wang, W., Zhang, B., Lin, X., Huang, Q., Shen, W., 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant Soil* 326, 511–522. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9988-y>.
- Zimmerman AR (2010) Abiotic and microbial oxidation of laboratory- produced black carbon (biochar). *Environ Sci Technol* 44:1295– 1301. doi:10.1021/es903140c

## XI. FÜGGELÉK

### 1. táblázat. A bakteriális 16S rRNS gén felszaporítására alkalmazott PCR elegy összetétele

Komponens	Koncentráció	Mennyiség mintánként (50 µl végtérfogat)
dNTP keverék (Fermentas Vilnius, Litvánia)	1mM dATP, 1mM dTTP 1mM dGTP, 1mM dCTP,	10,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	2 mM	4,0 µl
10x-es Taq PCR puffer (Fermentas)	750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1% Tween20	5,0 µl
Reverz primer (IDT, Coralville IA,USA)	0,3 µM	0,5 µl
Forward primer (IDT, Coralville IA,USA)	0,3 µM	0,5 µl
BSA (borjú szérum albumin) (Fermentas)	20 µg/µl	1,0 µl
Steril desztillált víz		26,0 µl
Taq polimeráz (Fermentas)	1U/ µl	2,0 µl
DNS templát	hozzávetőleg 20 ng	1,0 µl

### 1. protokoll. A Trisz-Bórsav-EDTA (TBE) összetétele

**TBE puffer:** tris-bázis 10,78 g +bórsav 5,50 g + EDTA 7,40 g keveréke. A keveréket desztillált vízzel 1,0 literre kiegészítve, pH 8,3-ra beállítva 15 percen keresztül 121°C-on és 1 atm nyomás alatt autoklávozzuk

### 2. protokoll. Az etanolos tisztítás lépései

Etanolos tisztítás lépései

- 3M Na-acetát, 95%-os etanol és DEPC kezelt víz elegyében mértük az emésztményt a táblázat szerint, majd alapos összekeverés után 20 percig szobahőmérsékleten hagytuk.
- Az inkubálási idő letelte után a mintákat 20 percen keresztül 18 000 g-n centrifugáltuk, majd a pelletről a felülúszót leöntöttük.
- A pellethez 250 µl 70%-os etanolt mértünk, majd vortex segítségével alaposan homogenizáltuk.
- Újabb centrifugálás következett 15 percig 18 000 g-n, a felülúszót ismét leöntöttük.



- A mintákról az etanol teljes eltávolításához Jouan RC 10.09 centrifuga és Mudolyo fagyasztva-szárító berendezést és Edwards vákuumpumpát használtunk.
- A szárítás után a mintákat 20 µl DEPC kezelt vízben vettük fel az elektroforézishez.

2. táblázat. Etanol precipitáló elegy összetétele

Összetevő	Mennyiség 100 µl-re vonatkoztatva
3 M Na-acetát (pH 4,6)	3,0 µl
95%-os etanol	62,5 µl
Steril desztillált víz	14,5 µl
Templát	20,0 µl

3. táblázat A kapillaris elektroforézis elegy összetétele.

Összetevő	Mennyiség mintánként
GeneScan™-500 Tamra™ Standard	0,3 µl
Formamid	12,0 µl
Templát	1,0 µl

4. táblázat. A bakteriális 16S rRNS gén V3-V4 régiójának felszaporítására alkalmazott PCR elegy összetétele az Illumina MiSeq szekvenálás során

Komponens	Koncentráció	Mennyiség mintánként (20 µl végtérfogat)
dNTP keverék (Fermentas Vilnius, Litvánia)	1mM dATP, 1mM dTTP 1mM dGTP, 1mM dCTP,	4,0 µl
Phusion II HF puffer (Fermentas)	1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	4,0 µl
Reverz primer	0,6 µM	0,5 µl
Forward primer	0,6 µM	0,5 µl
BSA (borjú szérum albumin) (Fermentas)	20 µg/µl	0,4 µl
Steril desztillált víz		9,4 µl
Phusion High-Fidelity polimeráz (Fermentas)	2U/ µl	0,2 µl
DNS templát	hozzávetőleg 20 ng	1,0 µl

5. táblázat. A PGPR organizmusok 16S rRNS génjének *in silico* vizsgálatára kiválasztott primer párok szekvenciái

Primer	Nukleotid szekvencia
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
519R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
971R	5'-CCCTYGTTCATGTARCGGC-3'
968F	5'-AACGCGGAAGAACCTTAC-3'
1401R	5'-CGGTGTGTACAAGAAGACCC--3'

6. a. táblázat. A 10 törzs 16S rRNS gén szekvenciájának és a restriktív enzimek hasítóhelyének ismeretében végzett virtuális hasítások eredménye 27F-519R gén régió alapján.

Enzim neve (Hasítóhely)	Törzs kód	242_9	NF_11	NF_7	NF_6	S_153	S_225	S_284	LU_44	ES_232
<i>Alu</i> I (AG/CT)	27F-519R primerek által közrefogott 16SrDNS szakaszok T-RF-jeinek bázispár hossza	238	238	238	238	226	62	65	64	64
<i>Bsh</i> 1236I (CG/CG)		185	185	185	185	215	383	396	227	228
<i>Bsp</i> 143I (/GATC)		229	229	229	229	53	n.a.	298	164	165
<i>Bsu</i> RI (GG/CC)		61	61	61	215	218	220	226	223	226
<i>Csp</i> 6I (G/TAC)		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	444	446	479	447	448
<i>Fsp</i> BI (C/TAG)		64	n.a.	n.a.	469	n.a.	n.a.	82	239	240
<i>Hha</i> I (GCG/C)		72	72	72	70	359	463	235	n.a.	n.a.
<i>Hin</i> 1II (CATG/)		174	174	174	348	176	176	183	180	181
<i>Hin</i> 6I (G/CGC)		70	70	70	68	357	461	233	n.a.	n.a.
<i>Mbo</i> I (/GATC)		229	229	229	229	53	n.a.	298	164	165
<i>Msp</i> I (C/CGG)		140	140	140	138	57	271	133	133	134
<i>Rsa</i> I (GT/AC)		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	445	447	480	448	448
<i>Tai</i> I (ACGT/)		90	90	90	88	102	102	108	80	80
<i>Tas</i> I (/AATT)		482	482	482	482	517	519	552	549	551

6.b. táblázat. A 10 törzs 16S rRNS gén szekvenciájának és a restrikciós enzimek hasítóhelyének ismeretében végzett virtuális hasítások eredménye 27F-519R génrégió alapján.

Enzim neve (Hasítóhely)	Törzs kód	242_9	NF_11	NF_7	NF_6	S_153	S_225	S_284	LU_44	ES_232
<i>Bcn</i> I (CC/SGG)		428	428	428	428	70	n.a.	497	n.a.	n.a.
<i>Bme</i> 13901 (CC/NGG)		427	427	427	427	70	133	497	437	439
<i>Cfr</i> 131 (GG/NCC)		61	180	n.a.	281	311	313	225	222	224
<i>Hinfl</i> (G/ANTC)		286	286	286	286	118	118	331	328	331
<i>Hpy</i> F31 (C/TNAG)		271	63	63	271	274	276	289	286	288
<i>Mva</i> I (CC/WGG)		548	548	548	548	132	132	437	n.a.	n.a.
<i>Nmu</i> CI (/GTSAC)		n.a.	n.a.	n.a.	393	281	283	210	n.a.	n.a.
<i>Pfe</i> I (G/AWTC)		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	356	353	355
<i>Sat</i> I (GC/NGC)		301	301	301	179	216	333	86	84	84
<i>Taa</i> I (ACN/GT)		408	408	408	408	443	445	478	475	477
<i>Tau</i> I (GCSG/C)		351	351	351	351	218	383	88	86	86
<i>Bta</i> CI (GGATG/)		146	146	146	144	209	211	224	n.a.	n.a.
<i>Bse</i> NI (ACTGG/		268	268	268	268	298	144	313	129	129
<i>Bse</i> XI (GCAGC/)		304	304	304	182	334	336	349	346	348
<i>Bs</i> LI (GGN/NCC)		94	94	94	n.a.	445	447	480	223	225
<i>Bve</i> I (ACCTGC/)		100	100	100	n.a.	113	113	119	117	117
<i>Cfr</i> 13I (G/GNCC)		60	179	179	280	310	312	224	221	223
<i>Faq</i> I (GGGAC/)		271	271	271	271	301	303	316	313	315

27F-519R primerek által közrefogott 16SrDNS szakaszok T-RF-jeinek bázispár hossza

7. táblázat. A 10 törzs 16S rRNS gén szekvenciájának és a restriktív enzimek hasítóhelyének ismeretében végzett virtuális hasítások eredménye 341F-907R génrégió alapján.

Enzim neve (Hasítóhely)	Törzs kód	242_9	NF_11	NF_7	NF_6	S_153	S_225	S_284	LU_44	ES_232
<i>AluI</i> (AG/CT)		96	96	96	96	220	220	96	525	525
<i>Bsh1236I</i> (CG/CG)	341F-907R primerek által közrefogott 16SrDNS szakaszok T-RF-jeinek bázispár hossza	65	65	65	65	65	65	65	65	65
<i>Bsp143I</i> (/GATC)		50	50	50	50	n.a	n.a	86	n.a	n.a
<i>BsuRI</i> (GG/CC)		80	80	80	80	80	80	n.a	n.a	n.a
<i>Csp6I</i> (G/TAC)		527	527	527	527	128	128	148	119	119
<i>FspBI</i> (C/TAG)		464	464	464	183	469	294	488	n.a.	n.a.
<i>HhaI</i> (GCG/C)		217	217	217	217	145	145	240	240	240
<i>Hin1II</i> (CATG/)		62	482	62	n.a	416	416	n.a	n.a	n.a
<i>Hin6I</i> (G/CGC)		215	215	215	215	143	143	238	238	238
<i>MboI</i> (/GATC)		50	50	50	50	n.a	n.a	86	n.a	n.a
<i>MspI</i> (C/CGG)		141	141	141	141	146	146	166	218	218
<i>RsaI</i> (GT/AC)		528	528	528	528	129	129	149	120	120
<i>TaiI</i> (ACGT/)		n.a.	n.a.	n.a.	109	160	160	119	180	180
<i>TasI</i> (/AATT)		196	196	196	196	201	201	221	221	221

8. táblázat. A 10 törzs 16S rRNS gén szekvenciájának és a restriktív enzimek hasítóhelyének ismeretében végzett virtuális hasítások eredménye 968F-1401R génrégió alapján.

Enzim neve (Hasítóhely)	Törzs kód	242_9	NF_11	NF_7	NF_6	S_153	S_225	S_284	LU_44	ES_232
<i>AluI</i> (AG/CT)	968F-1401R primerek által közrefogott 16SrDNS szakaszok T-RF-jeinek bázispár hossza	103	103	103	101	100	100	101	103	103
<i>Bsh1236I</i> (CG/CG)		293	293	293	298	165	n.a	300	300	300
<i>Bsp143I</i> (/GATC)		389	389	389	386	388	388	390	151	151
<i>BsuRI</i> (GG/CC)		242	242	242	239	68	275	276	421	421
<i>Csp6I</i> (G/TAC)		426	426	426	423	279	279	265	280	280
<i>FspBI</i> (C/TAG)		378	378	378	181	377	377	317	378	378
<i>HhaI</i> (GCG/C)		144	144	144	141	140	140	141	143	143
<i>Hin1II</i> (CATG/)		94	94	94	91	90	90	91	93	93
<i>Hin6I</i> (G/CGC)		142	142	142	139	138	138	139	141	141

9. táblázat. A *Paenibacillus peoriae* és a *Bacillus aryabhattai* relatív abundancia értékei a savanyú homokos a Bsh12361 és BsuRI restriktív endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlaga alapján

PGPR szervezetek		Kezelések											
	Időpont	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
<i>Paenibacillus peoriae</i>	Vetés	0	0	0	1,75	1,515	0	1,13	0	1,085	1,01	0	0
	V4-V6	0	1,465	1,04	0	2,555	0	1,62	0	1,28	1,56	0	0
	R1	0	0	0	0	2,055	0	0	0	1,67	0	0	0
	R6	1,035	1,36	0	0	0	2,055	1,255	0	2,155	0	0	0
<i>Bacillus aryabhattai</i>	Vetés	0	0	0	1,44	1,725	0	0	0	1,725	0	0	1,66
	V4-V6	0	1,185	0	0	0	1,36	1,305	0	1,185	1,08	0	0
	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10. táblázat. A *Paenibacillus peoriae* és a *Bacillus aryabhattai* relatív abundancia értékei a karbonátos homokos talajban a Bsh12361 és BsuRI restriktív endonukleázzal történő emésztések által kapott T-RF-ek átlaga alapján

PGPR szervezetek		Kezelések											
	Időpont	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
<i>Paenibacillus peoriae</i>	Vetés	0	0,105	1,105	1,165	0,395	0,89	0	0,225	0	0,77	0,585	0,15
	V4-V6	0,535	0,33	1,32	0,44	0	0	0,39	1,27	1,52	0,6	0,66	0,245
	R1	0,105	0	0,17	0,34	0	0	0	0,3	0,115	0	0,22	0,8
	R6	0	0,285	1,26	0	0	0	0	0	0,13	0	0,215	0,495
<i>Bacillus aryabhattai</i>	Vetés	0,26	0,235	0,155	0,645	0,185	0,23	0,145	0,21	0,28	0	0,66	0
	V4-V6	0,225	1,205	0,39	0,595	0,63	0,54	0,82	0,32	0	0,69	0,81	0,22
	R1	0	0	0	0	0,485	0	0,45	0,165	0,145	0	0	0,24
	R6	0	0,21	0,645	0	0,275	0	0	0	0	0	0	0

## XII. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani azoknak az embereknek, akik nélkül a dolgozatom nem készülhetett volna el:

**Dr. Márialigeti Károlynak**, témavezetőmnek, aki lehetővé tette, hogy doktori munkámat az az érdeklődési körömnek leginkább megfelelő témában végezzem. Szakmai iránymutatása mellett, kiemelt hálával tartozom a folyamatos támogatása és biztatása miatt. Szakmai és emberi szempontból is olyan példával járt előttem, amely mindig is viszonyítási alap marad számomra.

**Dr. Nagymáté Zsuzsának**, mert a kezdetektől fogva segített a molekuláris mikrobiológia rejtjelmeinek megismerésében. Időt és fáradságot nem sajnálva támogatta a munkámat.

**Romsics Csabának**, szakmai segítségéért és útmutatásaiért, illetve a folyamatos támogatásért

**Dr. Vajna Baláznak**, az eredmények statisztikai értékelésében nyújtott fáradhatatlan segítségéért.

**Rizó Boglárkának** a foszfolipid zsírsav mérésekben nyújtott segítségéért

**Dr. Szabó Attilának**, az újgenerációs szevenálásban és a bioinformatikai adatértékelésben nyújtott segítségéért.

**Dr. Felföldi Tamásnak**, a szekvenálások során nyújtott segítségéért;

**Dr. Makk Juditnak**, aki a pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségéért

**Dr. Tóth Erikának**, aki a foszfolipid zsírsav vizsgálati eredmények kiértékelésében segített

**Dr. Molnár Mónikának** és **Dr. Farkas Évának**, akik segítették a szabadföldi kísérletsorozat kivitelezését

**Dr. Turányi Tamásnak** és **Dr. János Imrének**, hogy lehetővé tették számomra az ELTE Környezettudományi Doktori Iskolájának Környezetbiológiai programjában való részvételt

Köszönöm az **ELTE Mikrobiológiai Tanszék** munkatársainak a segítséget

Köszönettel tartozom a **Dr. Kutasi Józsefnek** és **Biofil Kft munkatársainak**, akik munkájukkal hozzájárultak a dolgozat megvalósulásához.

Elsősorban **Menyasszonyomnak**, **Szüleimnek**, **Testvéreimnek**, **Barátaimnak** és **Kollegáimnak** vagyok hálás, a hosszú évek során mutatott támogatásukért és biztatásukért.