

TALAJ – NÖVÉNY HOLOBIONT KOMPLEX – A MEGISMERÉSTŐL AZ ALKALMAZÁSIG

című online tudományos ülés
2021. szeptember 16.

**Metabolikus aktivitás-mintázatok elemzése
a talajhasználat és trágyázási módok függvényében**

Szili-Kovács Tibor, Mucsi Márton

ATK Talajtani Intézet



Mikrobiális funkciók a talajban:

- Szerves anyagok lebontása
- Tápanyagok ciklusa (szén, nitrogén)
- Foszfor-mobilizáció
- Biológiai kontroll (kártévők, patogének ellen)
- Talajszerkezet: csatornák, aggregátumok képzése
- Talajrészecskék összekapcsolása (hifák, EPS, glomalin)
- Xenobiotikumok lebontása (pl. növényvédőszer)
- Bioremediáció (pl. nehézfémek, szénhidrogének)
- Horizontális génkicserélődés
- Antibiotikum-termelés



Mikrobiális funkciók a talajban: 1. Vizsgálati megközelítések

1. Mikrobiális biomassza mérések:

mikroszkópos módszerek, extrakciós módszerek, aktivitás mérésen alapuló módszerek.

2. Mikrobiális összetétel, diverzitás mérések:

Tenyésztésen alapuló módszerek,
tenyésztéstől független módszerek: pl. PLFA
Genetikai módszerek: DGGE, tRFLP

3. **"Talajbiológiai aktivitás" mérések:** talajrespiráció, dehidrogenáz-aktivitás
enzimaktivitás-mérések



Mikrobiális funkciók a talajban: 2. történeti áttekintés

Kvalitatív vizsgálatok:

Pochon J, Tardieux P (1962): *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Paris, France

Szénforrás-hasznosításon alapuló mintázat elemzés:

1. Biolog mikrotiter (GN plate): 95 szénforrás (Garland & Mills, 1991)
2. Biolog ecoplate: 31 szénforrás: ökol. Releváns, de 3 ism. (Insam, 1997)
3. Multi-SIR: szubsztrát-indukált respiráción alapul (Cmic: Anderson & Domsch 1977), de sok szubsztrátra (Degens & Harris 1997)
4. MicroResp: több szubsztrátos szubsztrát indukált respiráció összekapcsolása mikrotiter alapú megközelítéssel (Campbell et al. 2003)

Metagenomikai megközelítés:

DNS microarray a funkcionális génekre (Taroncher-Oldenburg et al.. (2003). Appl Environ Microbiol 69: 1159–1171.)

Talajból kivont összes DNS shotgun metagenom elemzése a funkcionális génekre



A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil

Colin D. Campbell,^{1*} Stephen J. Chapman,¹ Clare M. Cameron,¹
Mitchell S. Davidson,¹ and Jacqueline M. Potts²

*Macaulay Institute¹ and BioSS, Macaulay Institute,² Craigiebuckler,
Aberdeen AB15 8QH, United Kingdom*

Received 27 August 2002/Accepted 6 March 2003

Sole-carbon-source tests (Biolog), designed to identify bacteria, have become very popular for metabolically fingerprinting soil microbial communities, despite disadvantages associated with the use of carbon source profiles that primarily select for fast-growing bacteria. In this paper we describe the use of an alternative method that combines the advantages of the Biolog community-level physiological profile (CLPP) method, in which microtiter-based detection plates are used, with the ability to measure carbon dioxide evolution from whole soil. This method facilitates measurement over short periods of time (4 to 6 h) and does not require the extraction and culturing of organisms. Deep-well microtiter plates are used as test wells into which soil is placed. The apparatus to fill the deep-well plates and interface it with a second removable detection plate is described. Two detection systems, a simple colorimetric reaction in absorbent alkali and scintillation counting with radioactive carbon sources, are described. The methods were compared to the Biolog-CLPP system by using soils under different vegetation types and soil treated with wastewater sludge. We aimed to test the hypothesis that using whole soil would have specific advantages over using extracts in that more immediate responses to substrates could be obtained that would reflect activity rather than growth. The whole-soil method was more rapid and gave earlier detection of C source use. Also, the metabolic fingerprints obtained could discriminate between sludge treatments.



Bevezetés: Szubsztrátok a MicroResp módszerben, 15; 23

TABLE 1. Concentrations of different carbon sources added to soil in MicroResp CLPP tests when the colorimetric and radioactive (^{14}C) detection systems were used

Carbon source	Concn (mg g of soil water ⁻¹)	
	Colorimetric test	Radioactive test
None	0	
L-Alanine	7.5	
L-Arabinose	30	0.77
L-Arginine	30	
DL-Aspartic acid	7.5	1.14
γ -Aminobutyric acid	30	
Protocatechuic acid	30	
Citric acid	30	
D-Fructose	30	
D-Galactose	30	0.77
D-Glucosamine hydrochloride		0.92
<i>N</i> -Acetylglucosamine	7.5	
D-Glucose	30	0.77
Glycine		1.29
L-Leucine		0.45
L-Lysine hydrochloride	30	0.67
L-Malic acid	30	
Oxalic acid	30	
D-(+)-Trehalose	30	



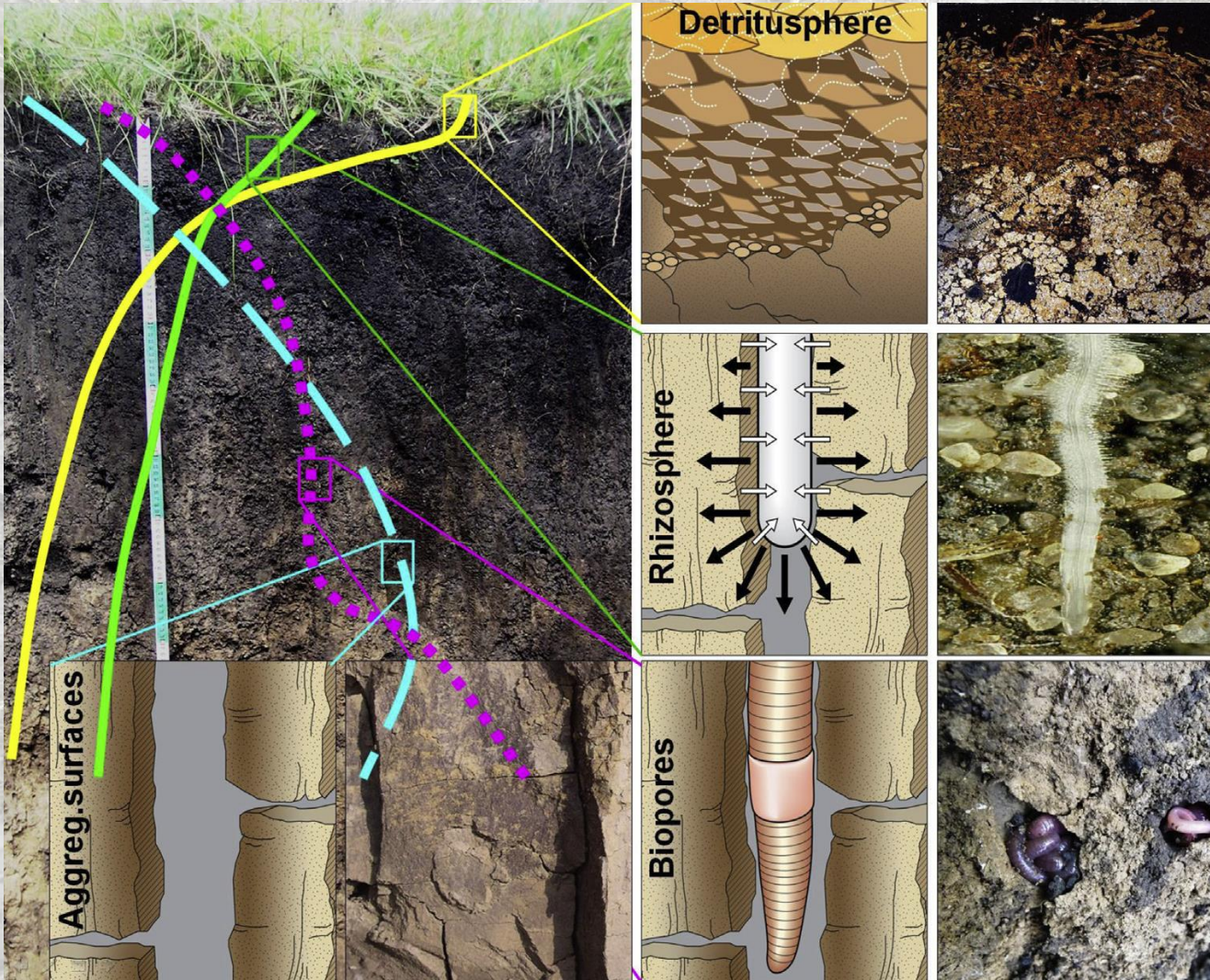
Bevezetés: Biológ szubsztrátok, 95 szubsztrát

TABLE 1. Sole carbon sources in BIOLOG GN microplates

C sources		
<u>Carbohydrates</u>	<u>Carboxylic acids</u>	<u>Amino acids</u>
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	Acetic acid	D-Alanine
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	<i>cis</i> -Aconitic acid	L-Alanine
Adonitol	Citric acid	L-Alanyl-glycine
L-Arabinose	Formic acid	L-Asparagine
D-Arabitól	D-Galactonic acid lactone	L-Aspartic acid
Cellobiose	D-Galacturonic acid	L-Glutamic acid
<i>i</i> -Erythritol	D-Gluconic acid	Glycyl-L-aspartic acid
D-Fructose	D-Glucosaminic acid	Glycyl-L-glutamic acid
L-Fucose	D-Gluconic acid	L-Histidine
D-Galactose	α -Hydroxybutyric acid	Hydroxy-L-proline
Gentiobiose	β -Hydroxybutyric acid	L-Leucine
α -D-Glucose	γ -Hydroxybutyric acid	L-Ornithine
<i>m</i> -Inositol	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetic acid	L-Phenylalanine
α -Lactose	Itaconic acid	L-Proline
Lactulose	α -Ketobutyric acid	L-Pyroglutamic acid
Maltose	α -Ketoglutaric acid	D-Serine
D-Mannitol	α -Ketovaleric acid	L-Serine
D-Mannose	D,L-Lactic acid	L-Threonine
D-Melibiose	Malonic acid	D,L-Carnitine
β -Methylglucoside	Propionic acid	γ -Aminobutyric acid
Psicose	Quinic acid	
D-Raffinose	D-Saccharic acid	<u>Aromatic chemicals</u>
L-Rhamnose	Sebacic acid	Inosine
D-Sorbitol	Succinic acid	Urocanic acid
Sucrose		Thymidine
D-Trehalose	<u>Alcohols</u>	Uridine
Turanose	2,3-Butanediol	
Xylitol	Glycerol	<u>Brominated chemicals</u>
		Bromosuccinic acid
<u>Esters</u>	<u>Amides</u>	
Mono-methylsuccinate	Succinamic acid	<u>Amines</u>
Methylpyruvate	Glucuronamide	Phenylethylamine
	Alaninamide	2-Aminoethanol
<u>Polymers</u>		Putrescine
Glycogen	<u>Phosphorylated chemicals</u>	
α -Cyclodextrin	D,L- α -Glycerol phosphate	
Dextrin	Glucose-1-phosphate	
Tween 80	Glucose-6-phosphate	
Tween 40		



Bevezetés: Mikrobiális "forró pontok" a talajban



1. Detrituszféra
2. Rizoszféra
3. Biopórusok
4. Aggregátum-felszínek

Kuzyakov & Blagodatskaya 2015. Soil Biol. Biochem.



Bevezetés:

Eddigi vizsgálataink a katabolikus aktivitás-mintázat elemzéssel

1. **Vöröstó töbör (Aggtelek Nemzeti Park, Jósmafő mellett), erdő**
2. **Szikes területek (Kiskunság: Böddi-szék, Kelemen-szék, Zab-szék), rét**
3. **Szikes területek (Apajpuszta), rét**
4. **Józsefmajor (Talajművelési tartamkísérlet), szántó**
5. **Organikus-konvencionális gazdálkodás (Martonvásár, Karcag, Nyíregyháza), szántó**
6. **Órbottyán: Ureáz-inhibitoros kísérlet, szántó (+ Nagyhörcsök)**
7. **Martonvásár: Vetésforgó kísérlet, szántó + Parlag + Löszpusztagyep (Bicske) + 3 erdőrész (Martonvásár - Ráckeresztúr), akác és tölgyerdő**
8. ...



Katabolikus-aktivitás mintázat Vöröstő-töbör a: koratavas; b: késő tavasz

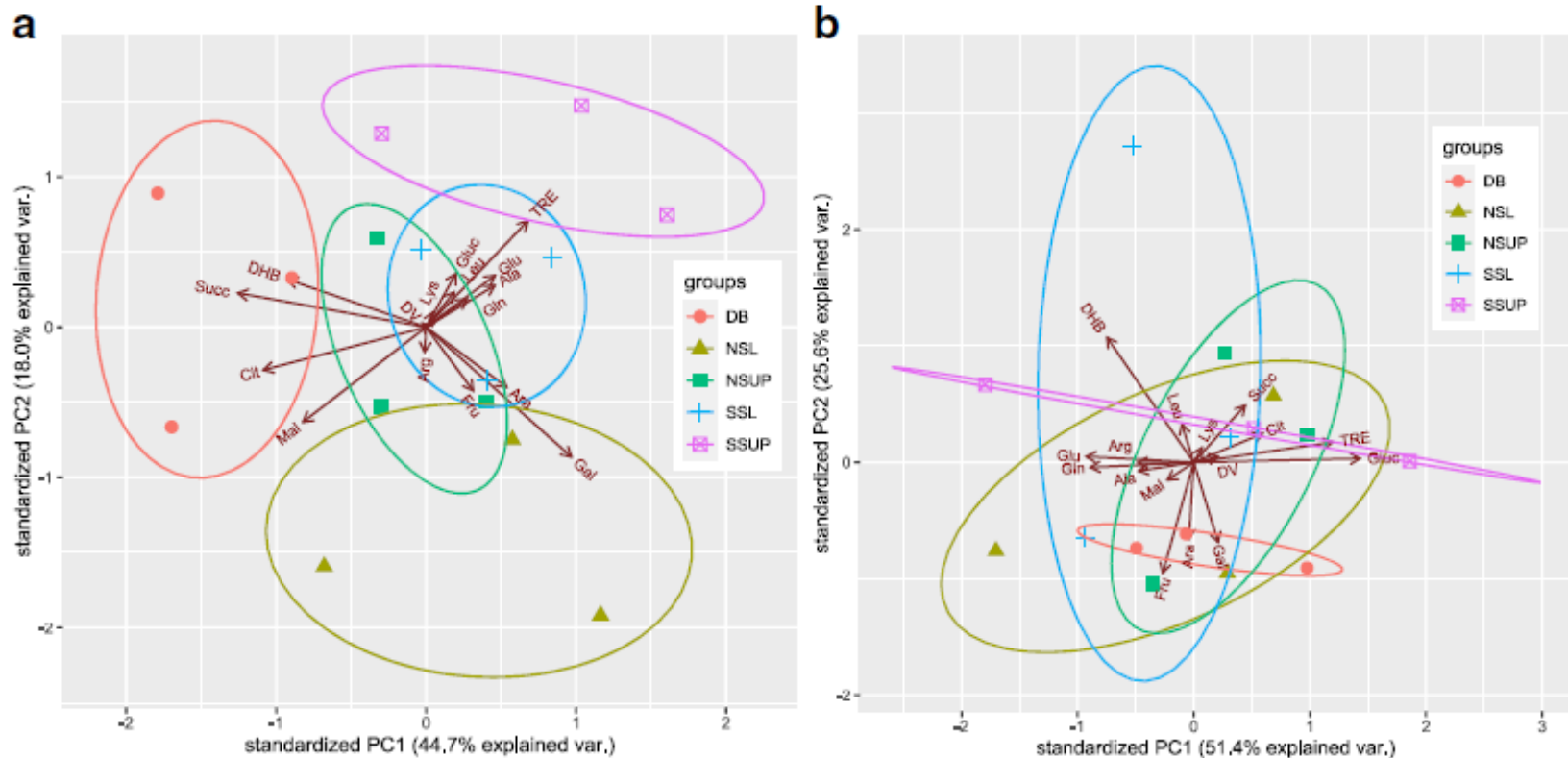
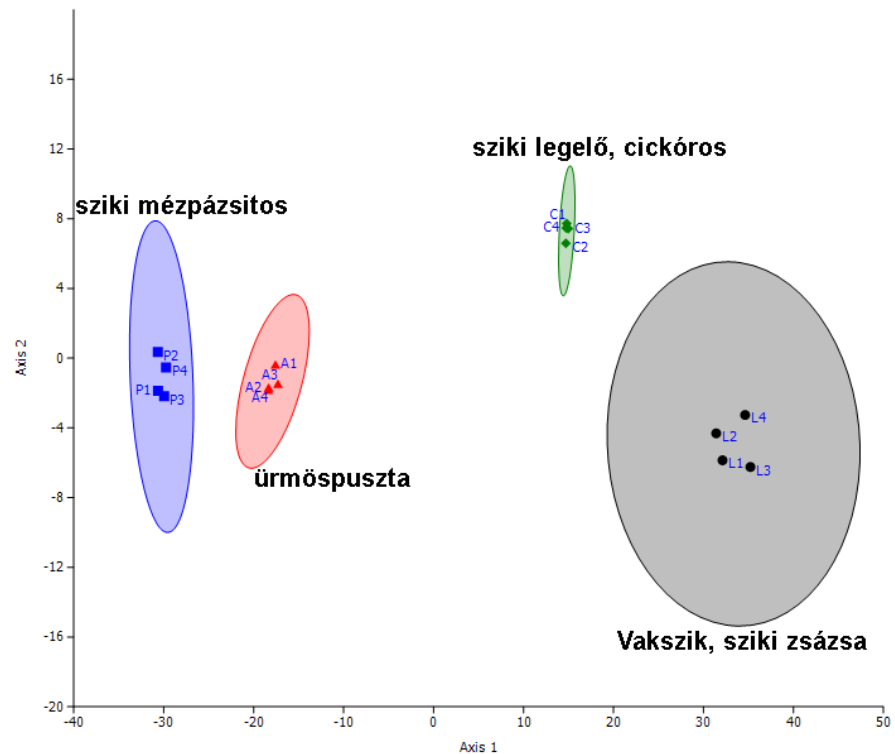


Fig. 4 Results of principal components analysis of MicroResp fingerprints from early (a) and late (b) spring period. Ellipses represent the 95% confidence intervals of the groups. Arrows of the biplot

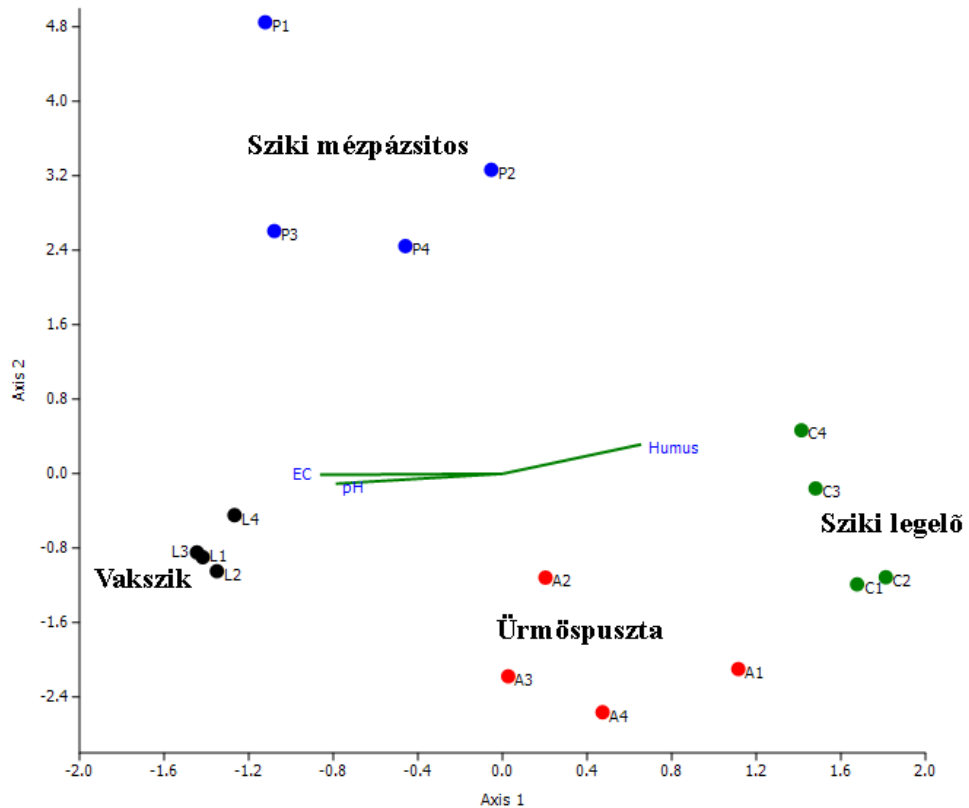
correspond to the contribution of the original substrates to the variance represented by the principal components

Apajpuszta, 2014. szeptember; vízzel átítatott gyep

Katabolikus-aktivitás mintázat Apajpuszta, szikes rét, 2014. szeptember



Apajpuszta, 2014.szept. Kanonikus korrespondencia-analízis

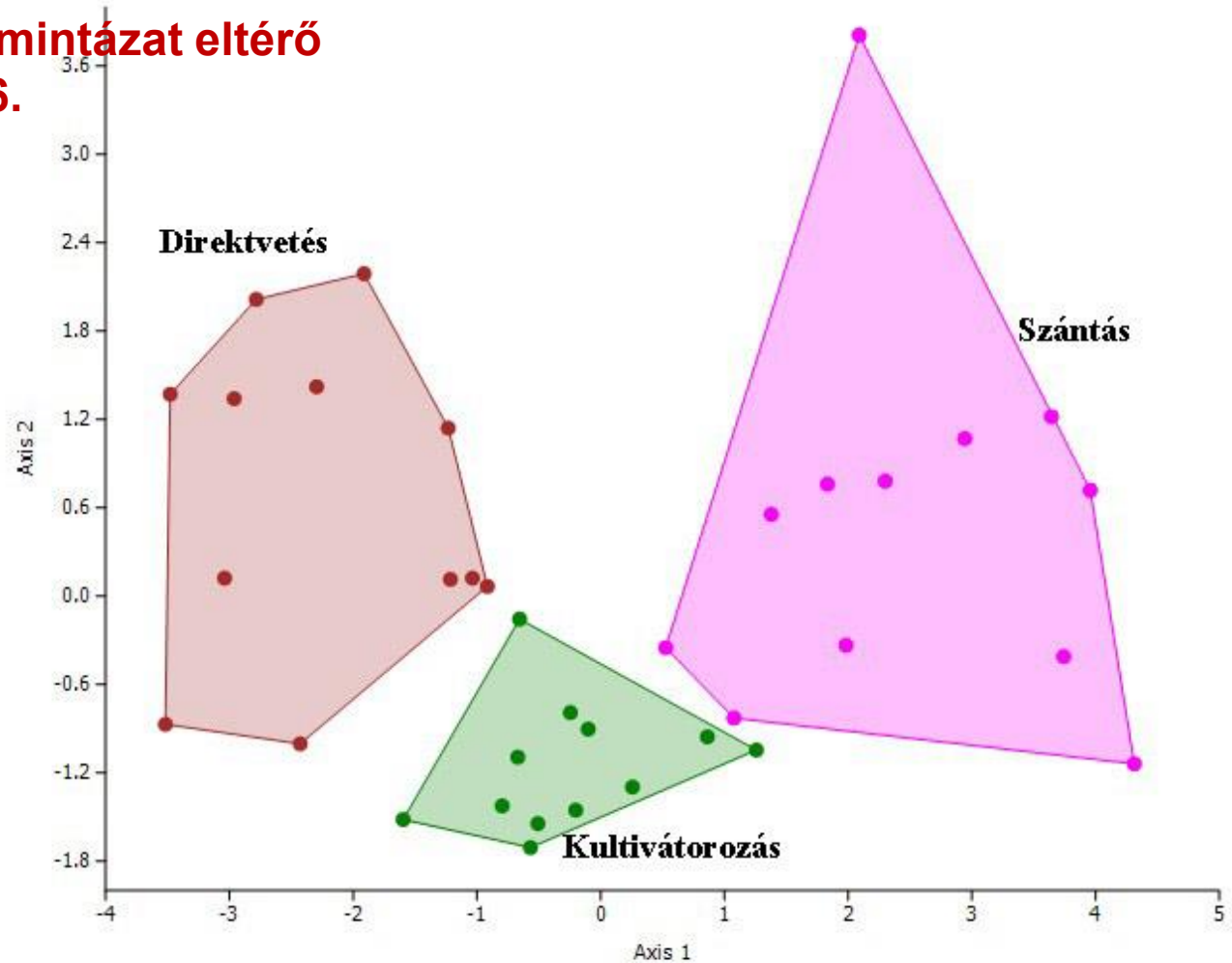


Borsodi et al. 2021. Microorganisms 9. 1673.



Józsefmajor, talajművelés 2016, mikrorespiráció, 15 szubsztráttal.
Diszkriminancia-analízis.

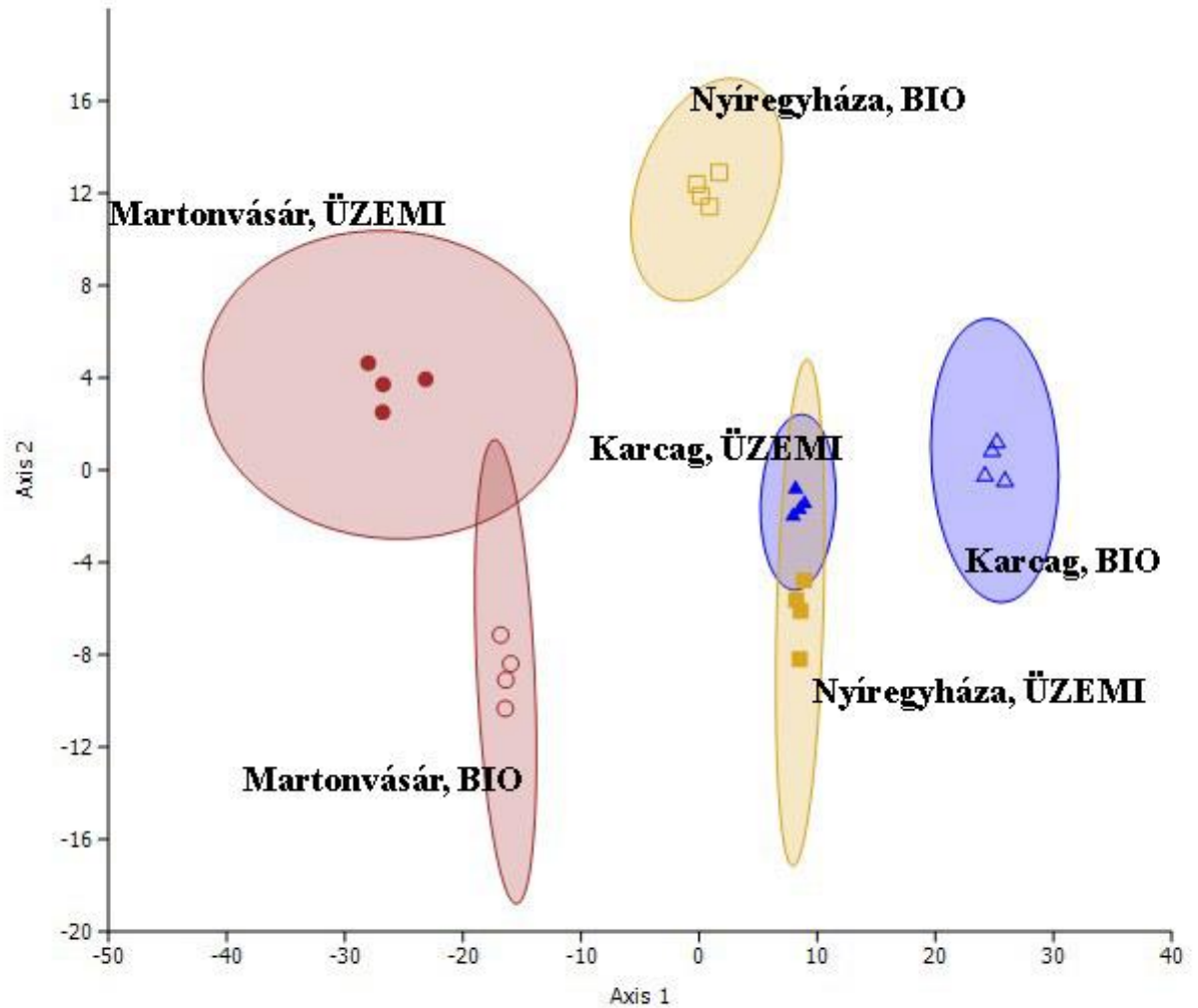
**Katabolikusan aktivitás mintázat eltérő
művelési módok, 2016.**



Nem publikált.



**Biogazdálkodás vs. üzemi gazdálkodás, mikrorespiráció, 23 szubsztráttal.
Diszkriminancia-analízis.**

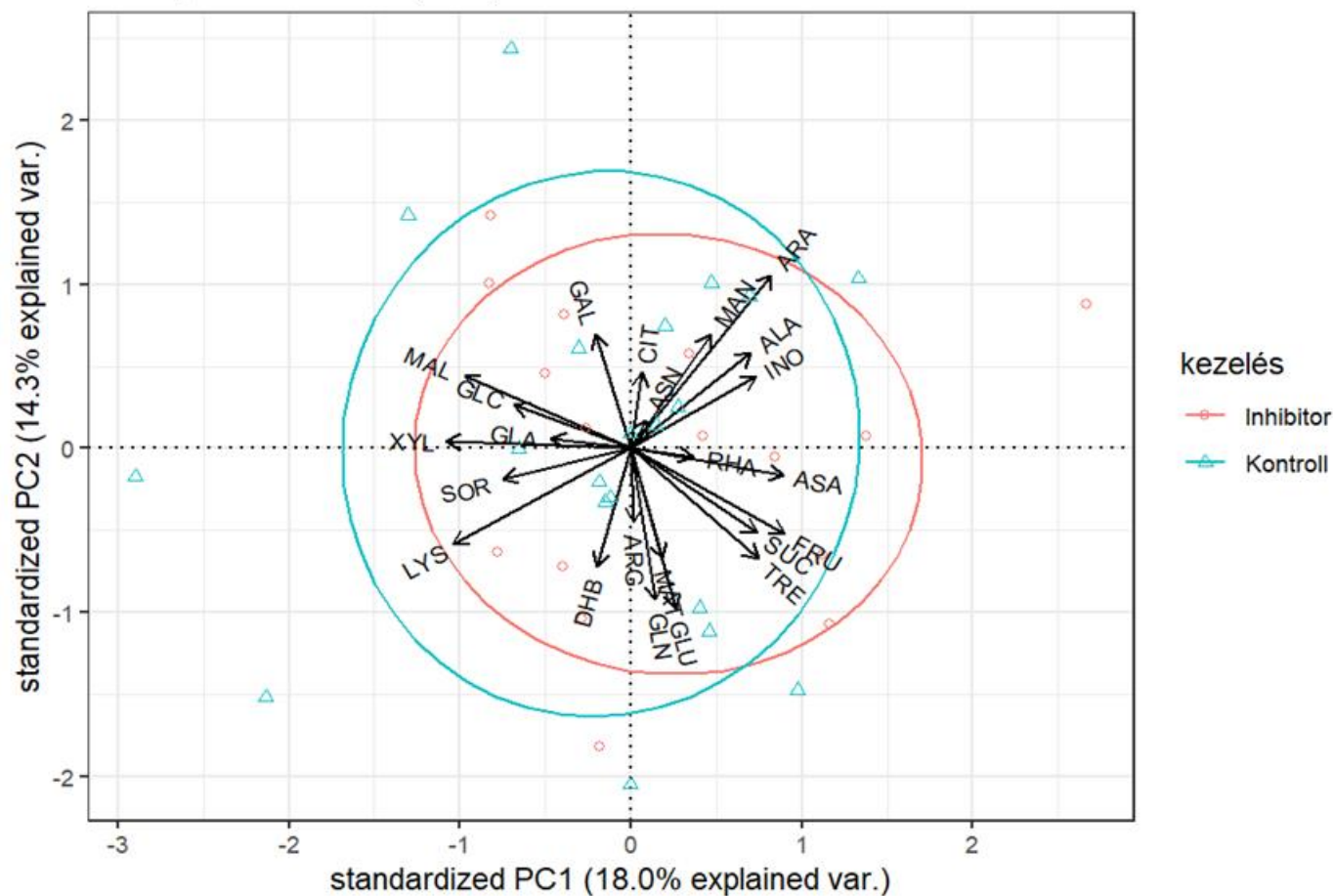


Gazdag et al. 2019. *Microbes and Environment* 34:234-243.



Ureáz-inhibitor hatás vizsgálata a katabolikus-aktivitás mintázatra

2. ábra: Az inhibitor hatásának vizsgálata a katabolikus aktivitás-mintázatokra
Főkomponens elemzés (PCA)



Nem publikált.



MTA•ATK
Talajtani és Agrokémiai
Intézet

Szili-Kovács et al.

Célkitűzés

1. Katabolikus aktivitás-mintázat vizsgáló módszerek összehasonlítása

(multiSIR (Degens&Harris) vs. microResp (Campbell et al.)

Gyep – Parlag – sz.kontroll – sz.NPK – sz.Istállótrgy.

2. Katabolikus aktivitás-mintázat vetésforgó talajában:

2.a. Kukorica vs. Búza monokultúra összehasonlítása

2.b. Trágyázási módok összehasonlítása
(kontroll; NPK kezelés; NPK + istállótrágya)

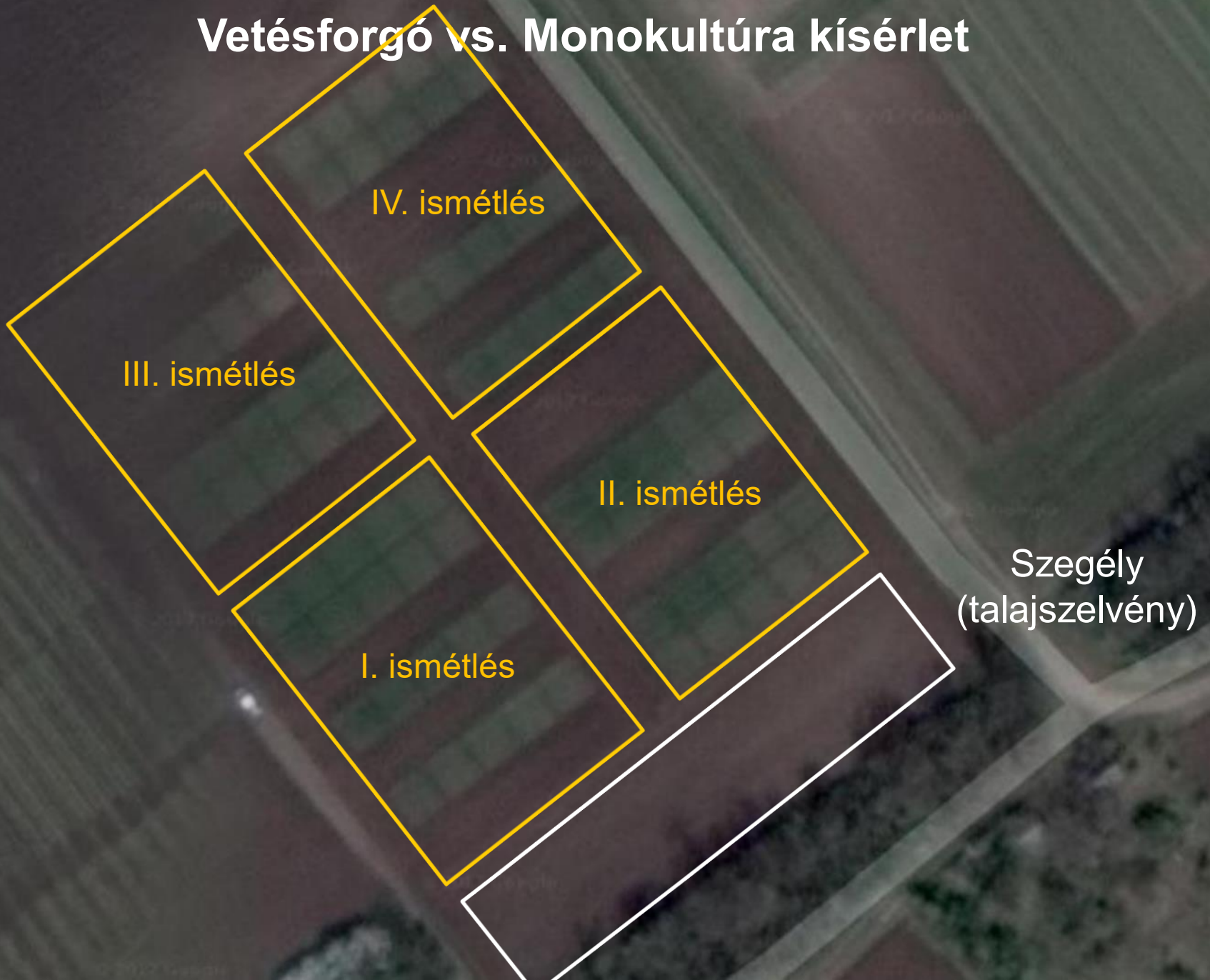
2.c. Szezonális hatások



Módszer: Martonvásári szabadföldi tartamkísérletek, 2017-2019.



Vetésforgó vs. Monokultúra kísérlet



Módszer: Vetésforgó vs. Monokultúra kísérlet kezelései és elrendezése

Vetésforgó	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968
	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976
	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024

Vetési sorrendek:

- 1 kukorica monokultúra
- 2 őszi búza monokultúra
- 3 kukorica időszakos monokultúra (3 év lucerna + 5 év kukorica)
- 4 búza időszakos monokultúra (3 év lucerna + 5 év őszi búza)
- 5 búza-kukorica dikultúra (2 év őszi búza + 2 év kukorica)
- 6 trikultúra (3 év lucerna + 3 év kukorica + 2 év őszi búza)
- 7 Norfolki-típusú vetésváltás (kukorica + tavaszi árpa + borsó + őszi búza)

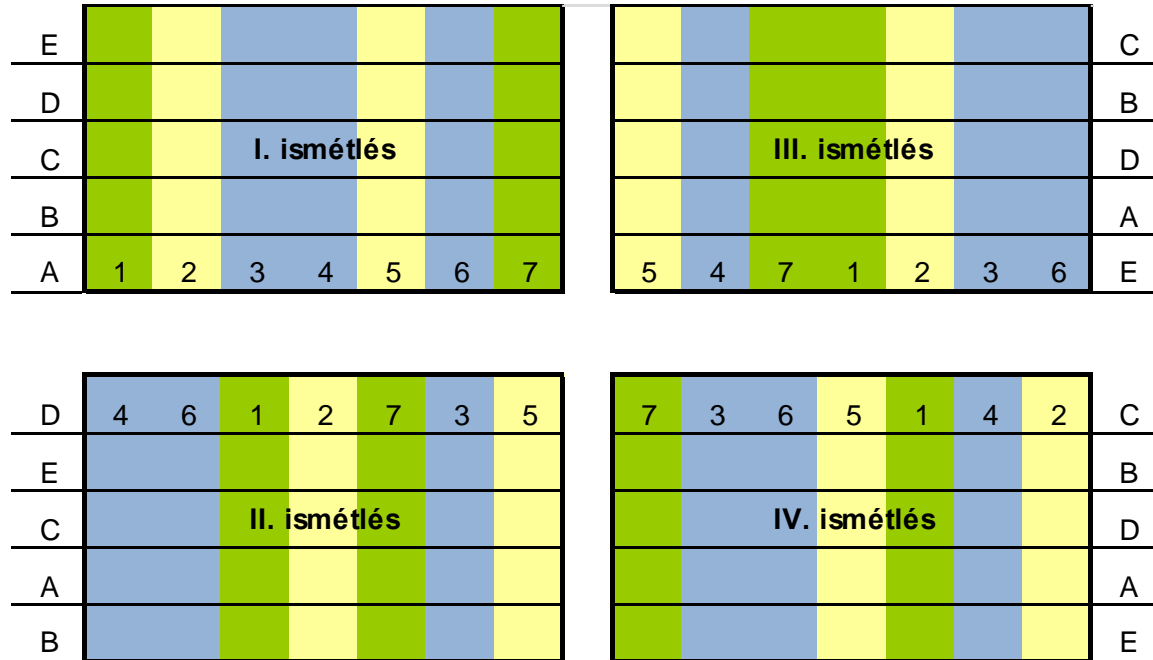
Tápanyag-kezelések:

- A 0
- B # (30 t/ha/4év) + NPK (100+50+50 kg/ha/év)
- C 2008-ig szár/szalma + NPK (100+50+50 kg/ha)
- D NPK (100+50+50 kg/ha)
- E felvett NPK (kukorica: 230+110+200 kg/ha/év, búza: 175+35+70 kg/ha/év)

1	K	K	K	K	K	K	K	K
2	B	B	B	B	B	B	B	B
3	L	L	L	K	K	K	K	K
4	L	L	L	B	B	B	B	B
5	B	B	K	K	B	B	K	K
6	L	L	L	K	K	K	B	B
7	K	Tá	Bo	B	K	Tá	Bo	B

♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
♣
Fasor

Szegély terület (talajszelvény helye)





Módszer:

Talajszelvény feltárás

Martonvásár

Kísérleti terület (szegély)

Március 24, 2017.

Erdőmaradványos

Csernozjom talaj

WRB: Chernic Phaeozem

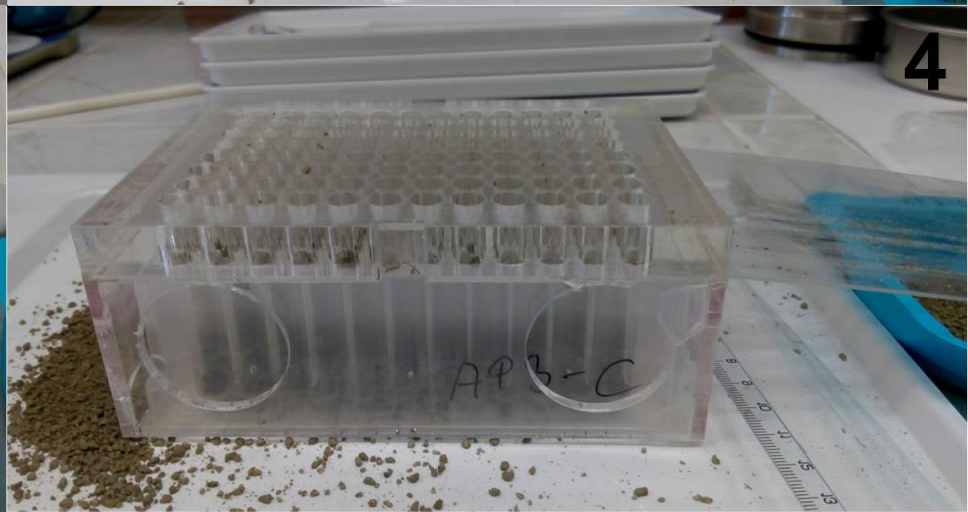
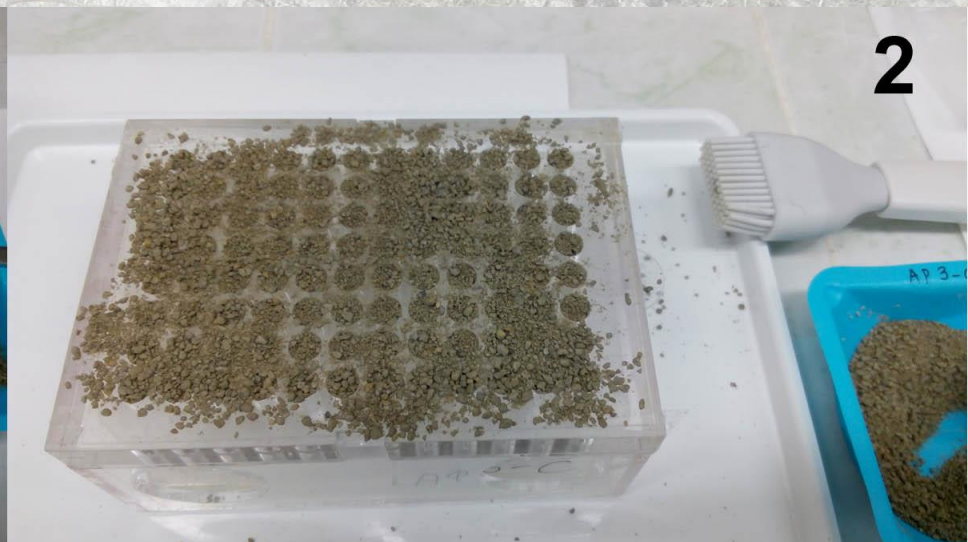
(Loamic, Aric)

24/03/2017

2021. szeptember 20.

Szerző Neve

Módszer: Talajbemérés a plétbe

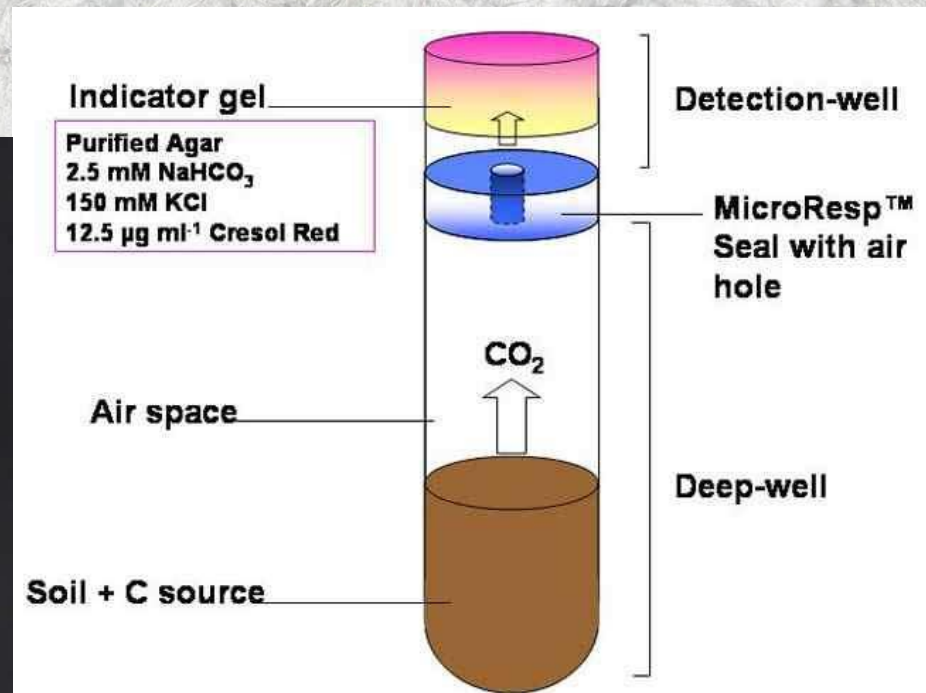
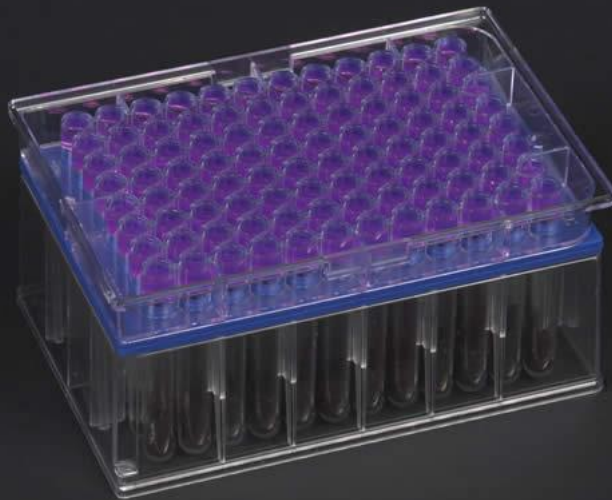


Módszer:

Tenyésztéstől független, közösségi katabolikus aktivitás-mintázat mikrorespirációs módszerrel (MicroResp™)

Szubsztár-indukált respirációs módszer kiterjesztése több-szubsztrátos mikroplét-alapú kolorimetriás mérési eljárással

www.microresp.com

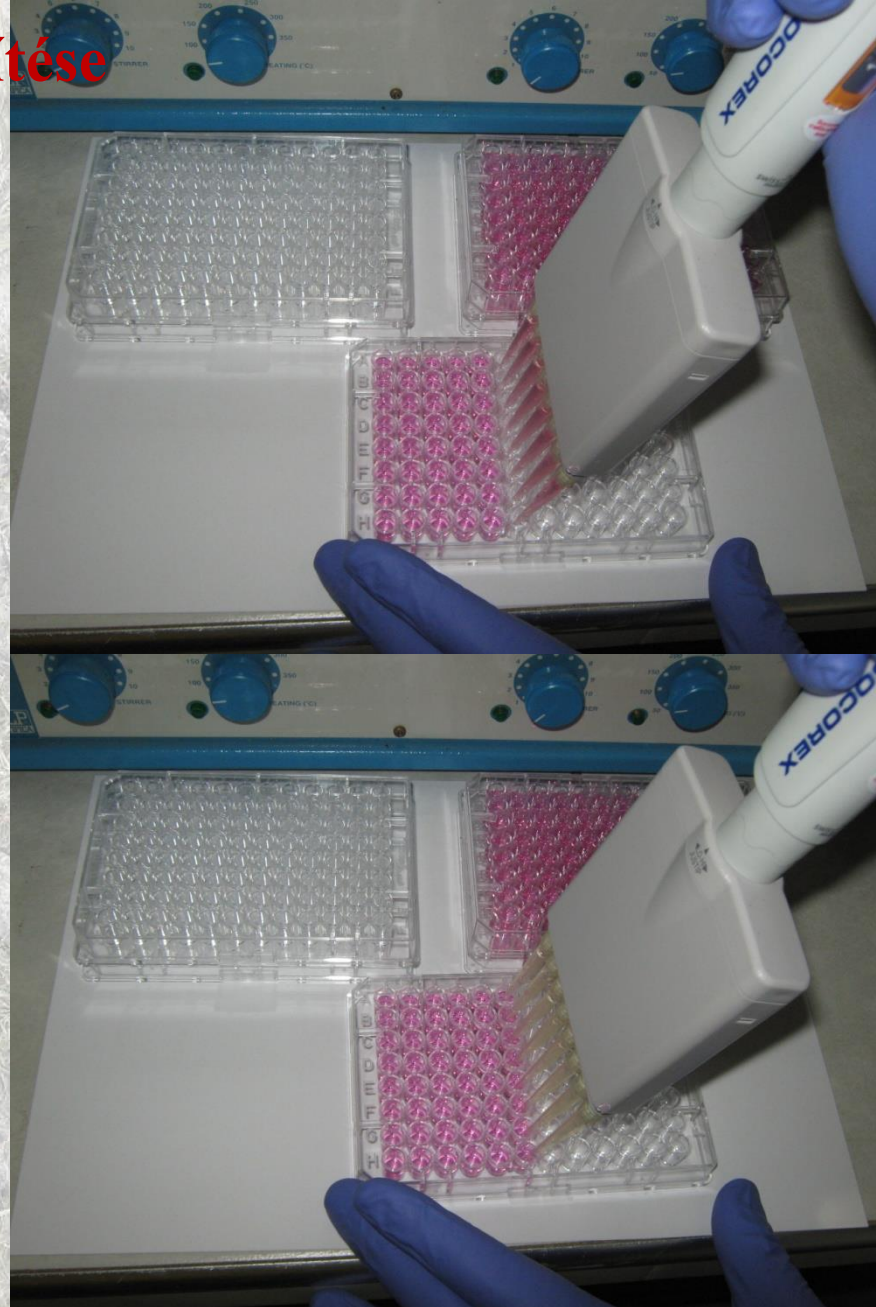


Módszer: Szubsztrátok elrendezése a deepwell plétekben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	TRE	TRE	TRE	TRE	A	GAL	GAL	GAL	GAL	A	DV	DV	DV	DV
B	FRU	FRU	FRU	FRU	B	GLC	GLC	GLC	GLC	B	ARA	ARA	ARA	ARA
C	SUC	SUC	SUC	SUC	C	MAL	MAL	MAL	MAL	C	CIT	CIT	CIT	CIT
D	GLN	GLN	GLN	GLN	D	LYS	LYS	LYS	LYS	D	ALA	ALA	ALA	ALA
E	GLU	GLU	GLU	GLU	E	DHB	DHB	DHB	DHB	E	ARG	ARG	ARG	ARG
F	MAT	MAT	MAT	MAT	F	XYL	XYL	XYL	XYL	F	INO	INO	INO	INO
G	RHA	RHA	RHA	RHA	G	SOR	SOR	SOR	SOR	G	MAN	MAN	MAN	MAN
H	ASA	ASA	ASA	ASA	H	GLA	GLA	GLA	GLA	H	ASN	ASN	ASN	ASN

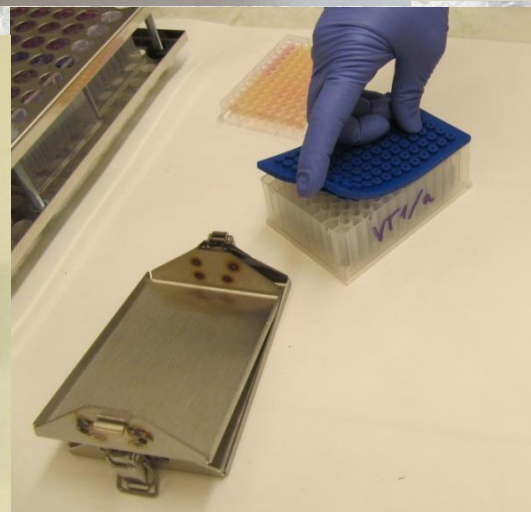
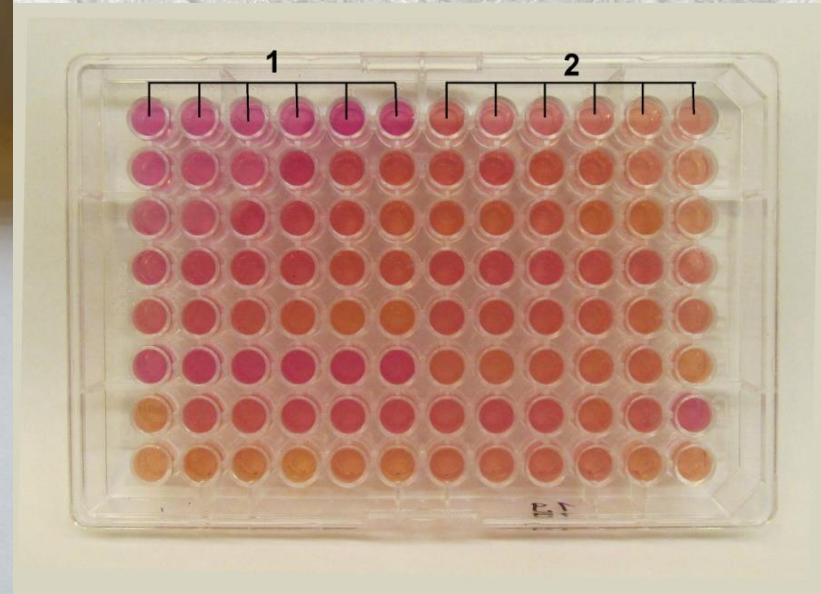


Módszer: Detektor plétek elkészítése



Módszer: mérés

Mikroplét kiértékelése Mikroplét-olvasó fotométerrel 570nm



Módszer: statisztika

- 1. Főkomponens-analízis (PCA)**
- 2. NP-MANOVA (Nem paraméteres permutációs többváltozós variancia-analízis)**
- 3. ANOSYM (Szimilaritás-elemzés)**
- 4. SIMPER –teszt (Similarity percentages)**
- 5. MANTEL-teszt (többváltozós korreláció elemzés)**
- 6. Redundancia-analízis (RDA)**



Eredmények: Alaprespiráció

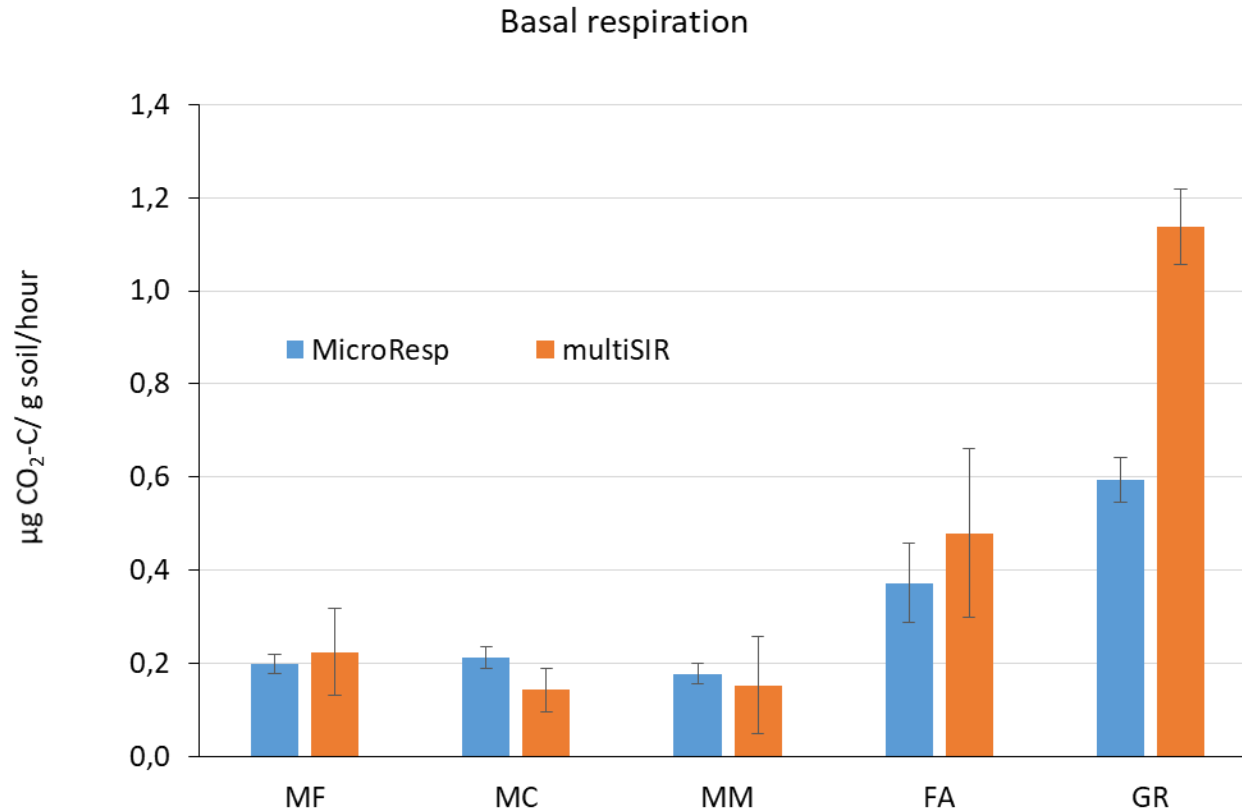
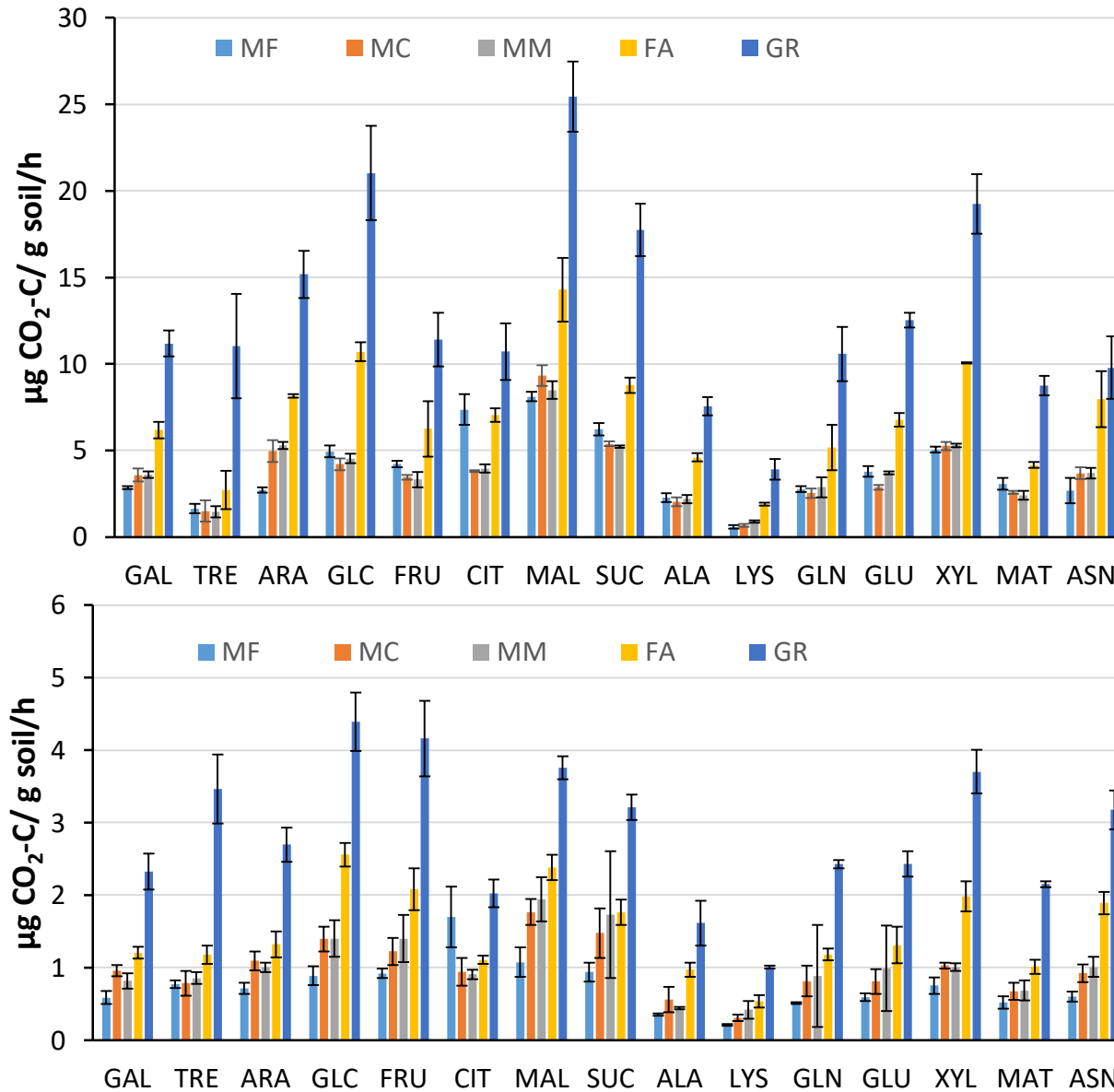


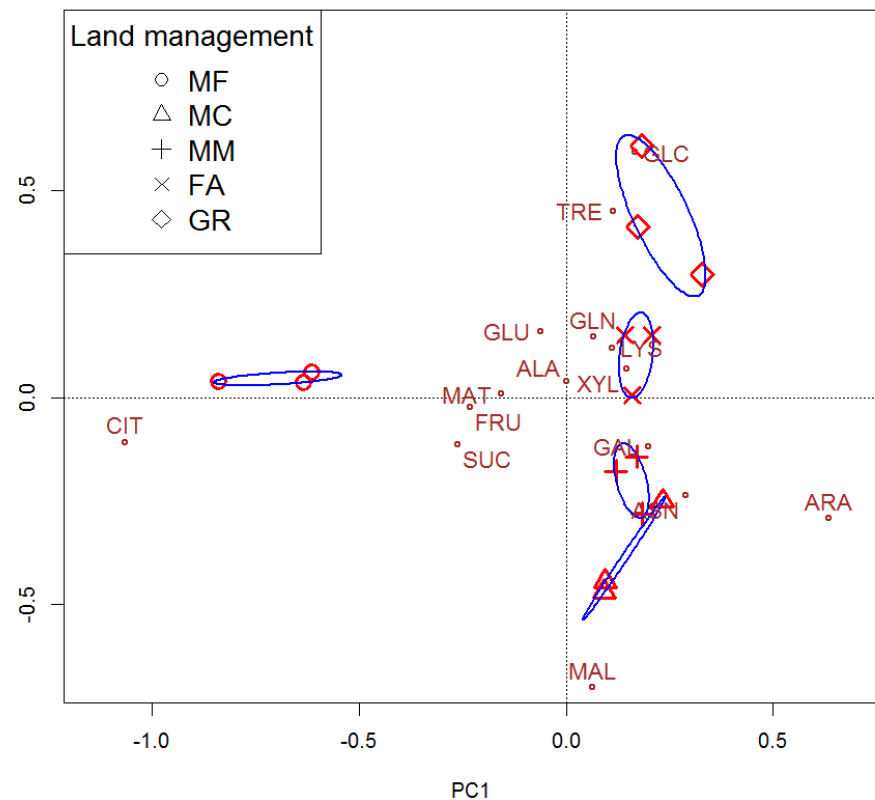
Figure 1. Means (\pm standard deviation, $n=3$) of the MicroResp and multiSIR measurements basal respiration without substrate additions. MF: maize, NPK fertilized, MC: maize, control, MM: maize, manure added, FA: fallow, GR: grassland.



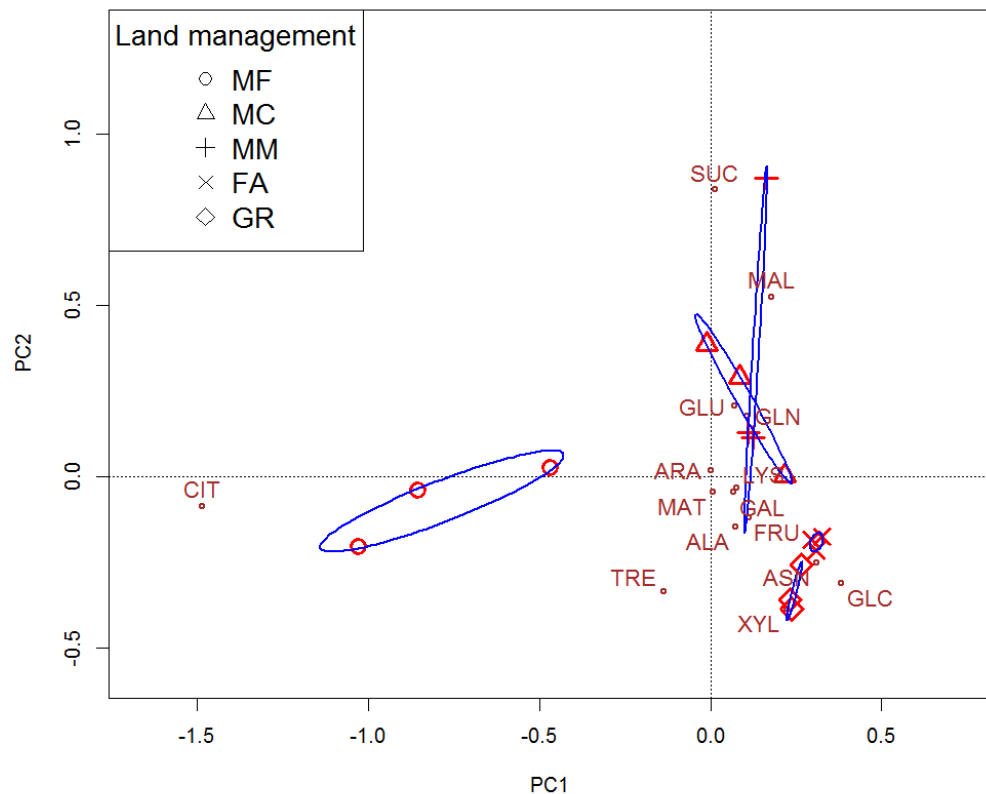
Eredmények: multiSIR felső ábra; microResp alsó ábra



Eredmények: Főkomponens-analízis, multiSIR(bal); microResp(jobb)



multiSIR

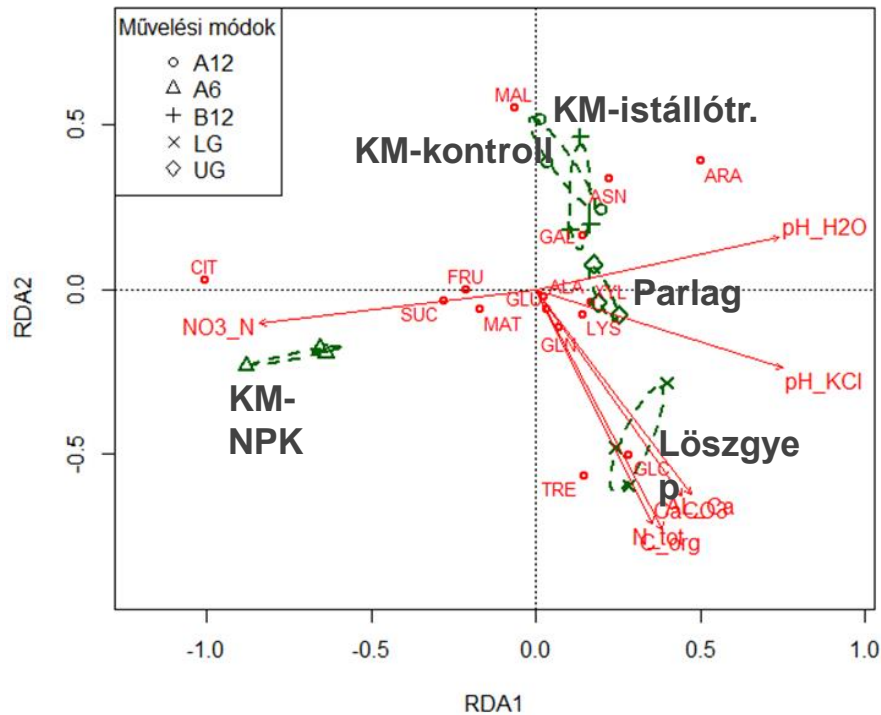


microResp

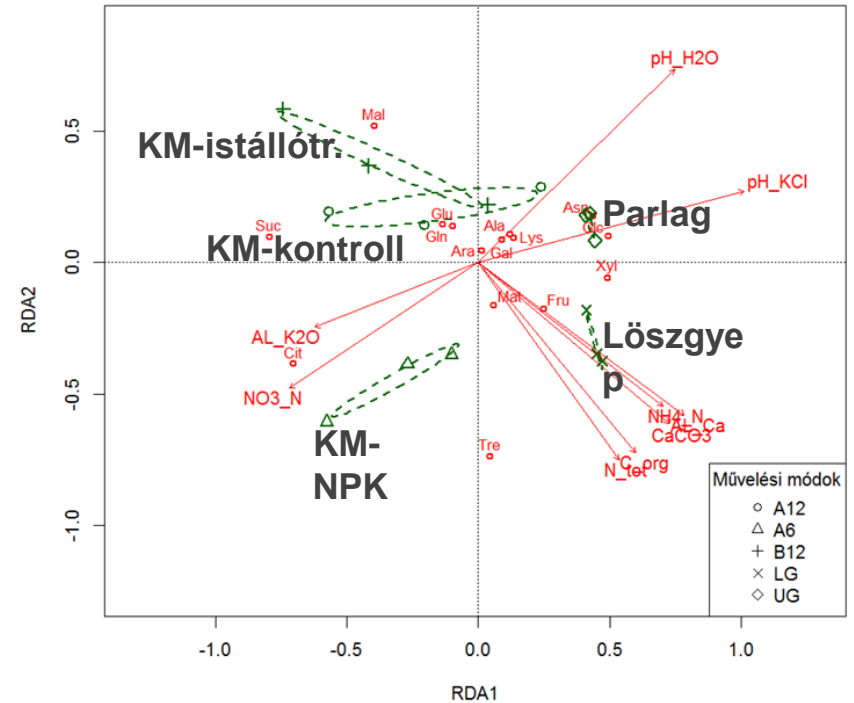
Mantel-teszt: ($r = 0.574$, $p = 0.001$)



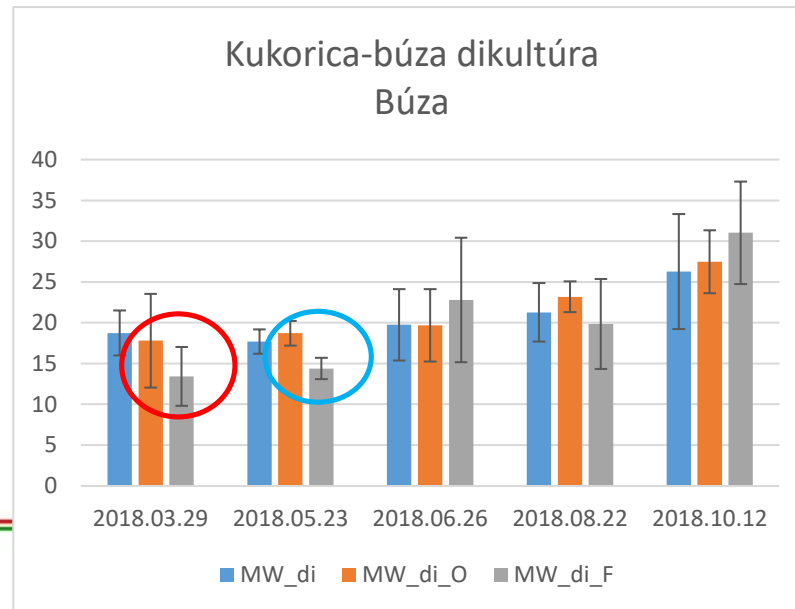
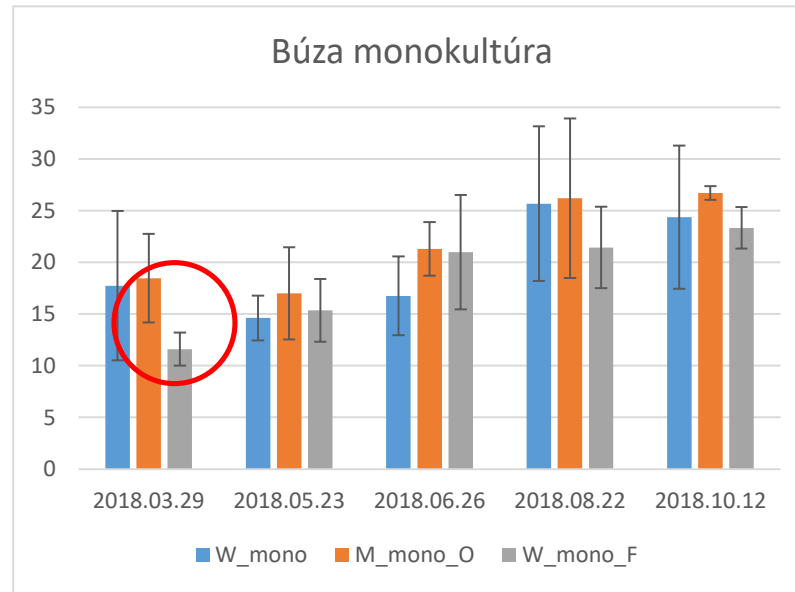
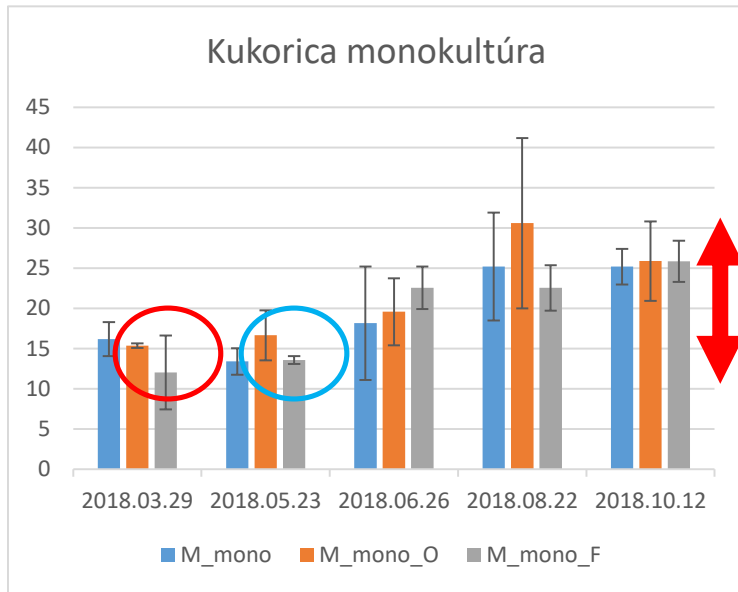
Eredmények: Metabolikus aktivitás-mintázatok redundancia-analizise a talajkémiai változók hatásának feltűntetésével



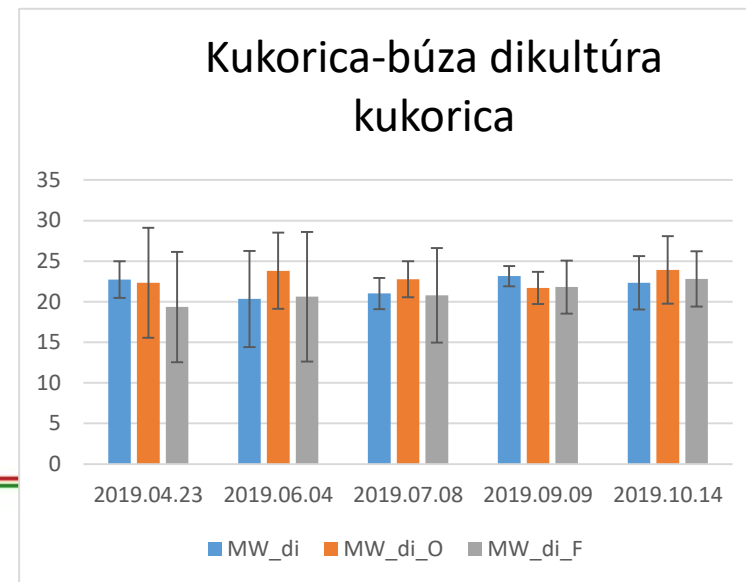
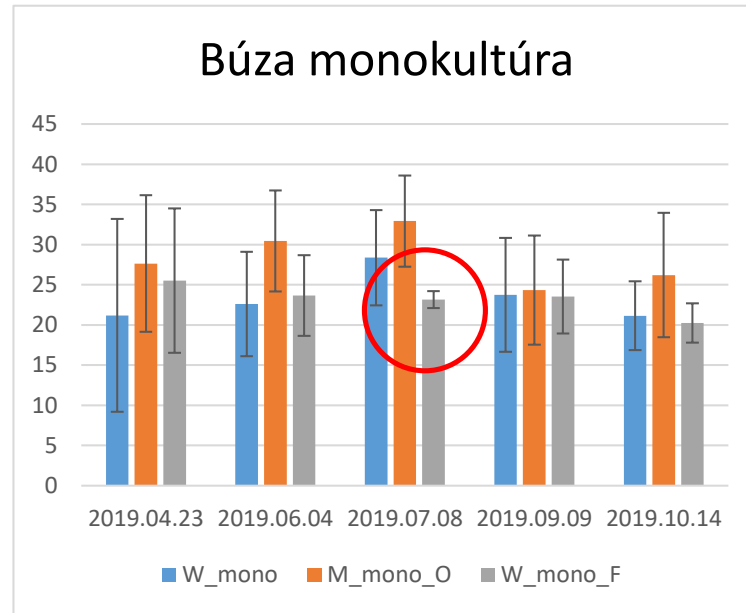
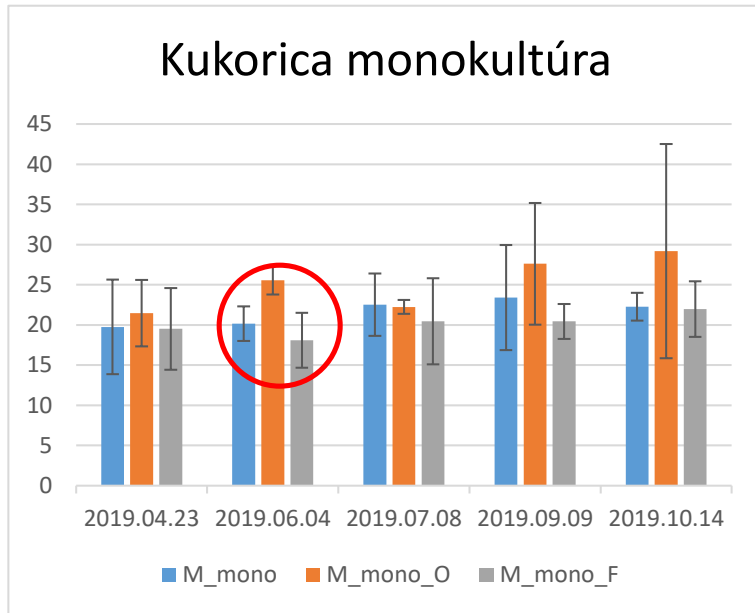
Szignifikáns hatások: pH; Szerves-C; Nitrát-N



Eredmények: Kummulatív szubsztrát-indukált respirációs értékek 5 időpontban, 2018-ban



Eredmények: Kummulatív szubsztrát-indukált respirációs értékek 5 időpontban, 2019-ben



**Eredmények: mikrorespirációs eredmények, 2018. év, Martonvásár
VF(Búza + Kukorica mono; 3trágyázási kezelés: kontroll, NPK,
NPK+istállótrágya)**

**Kezelések összehasonlítása permutációs többváltozós variancia-
analízissel (NPMANOVA) a mikrorespirációs mérési adatok
szubsztrát-átlagokra standardizált adatai alapján.**

Idő- pont	Összes kezelés	Növény (Búza mono-Kukorica mono)	Trágyázás (p) (kontroll; NPK; NPK+trágya)
1	n.s.	n.s.	0.091
2	n.s.	n.s.	0.026
3	0.069	n.s.	0.016
4	n.s.	n.s.	0.053
5	n.s.	n.s.	0.027



Összefoglalás

A mikrorespirációs (MicroResp™) módszer alkalmazása ígéretesnek tűnik a talaj mikrobiális közösség in situ katabolikus aktivitás-mintázatának elemzésére eltérő talajok, művelési módok vagy egyéb kezelések hatásának kimutatására.

A vizsgált multiSIR és Microresp módszerek eredményei összhangban vannak egymással, eltérő talajhasználat elkülönült.

A talaj kémiai paraméterek közül a pH, a nitrát-N és a szerves-C a meghatározó elsősorban a respirációs mintázatra.

A növénykultúra hatása (kukorica vagy búza) nem vagy alig kimutatható.

A respirációs mintázatot a műtrágyázás nagyobb mértékben befolyásolhatja.

A szezonális hatás is jelentős lehet, főleg a kukorica monokultúra talajában.





PROJEKTINDÍTÓ ÉRTEKEZLET

TALAJBIOM KUTATÓ TRANSZDISZCIPLINÁRIS KIVÁLÓSÁGI
KÖZPONT LÉTREHOZÁSA A FENNTARTHATÓ TALAJERŐFORRÁS
BIZTOSÍTÁSA ÉRDEKÉBEN

GINOP-2.3.2-15-2016-00056 PROJEKT

2017. január 16., hétfő, 9 h

MTA Agrártudományi Kutatóközpont,
Martonvásár, Kastély 5. terem

SZÉCHENYI 2020



BEFEKTÉS A JÖVŐRE



MTA • ATK
Talajtani és Agrokémiai
Intézet

2021. szeptember 20.

Szerző Neve

Köszönet az összes közreműködőnek:

Agrártudományi Kutatóközpont:

Csontos Péter, Gazdag Orsolya, Villányi Ilona, Horváth Georgina, Márton Orsolya, Krett Gergely, Schellenberger Judit, Tamás Júlia, Dencső Márton, Tóth Márton, Pohner Zsuzsanna, Dombos Miklós, Gergócs Veronika, Flórián Norbert, Radimszky László, Sipőcz László, Tóth Zsolt, Dányi László, Árendás Tamás, Sugár Eszter, Bónis Péter

Csillagászati és Földtudományi Kutatóközpont:

Szalai Zoltán, Jakab Gergely, Ujházy Noémi, Madarász Balázs, Zacháry Dóra

ELTE oktatói és diákjai: Márialigeti Károly, Borsodi Andrea, Kalapos Tibor, Kovács M. Gábor, Megyes Melinda, Korponai Kristóf, Ujvári Gergely, Szabó Attila, Knapp G. Dániel, Nagymáté Zsuzsanna, Boda Klaudia, Hegedűs Dorottya

Óbudai egyetem BSc hallgatói:

Tompa Ilona, Aminaa Lkhagvasuren, Vasziljevics Tímea, Gyutai Lilla, Botlik Melinda



KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

TALAJBIOM KUTATÓ TRANSZDISZCIPLINÁRIS
KIVÁLÓSÁGI KÖZPONT
LÉTREHOZÁSA A FENNTARTHATÓ TALAJERŐ
FORRÁS BIZTOSÍTÁSA ÉRDEKÉBEN

GINOP 2.3.2-15-2016-00056 PROJEKT

SZÉCHENYI  2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Strukturális
és Beruházási Alapok



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE