

Anna LENART-BOROŃ<sup>1\*</sup>, Piotr BOROŃ<sup>2</sup>, Tomasz BANACH<sup>1</sup>

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii, \*email: annalenart82@gmail.com

<sup>2</sup> Katedra Fitopatologii Leśnej, al. 29 listopada 46, 31-425 Kraków

## Wpływ wybranych metali ciężkich na wzrost i namnażanie promieniowców z rodzaju *Streptomyces* izolowanych z gleb

Mając na uwadze wzrost zanieczyszczenia środowiska naturalnego metalami ciężkimi i ich oddziaływanie na mikroorganizmy w glebie, podjęto próbę określenia wpływu wybranych metali ciężkich: miedzi, kadmu, cynku i ołowiu na wzrost promieniowców wyizolowanych z gleb pobranych z terenu huty ArcelorMittal w Krakowie. Do badań wykorzystano 5 gleb, z których do dalszych badań wyselekcjonowano 10 izolatów promieniowców należących do rodzaju *Streptomyces*. Przeprowadzone analizy wykazały, że obecność huty przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska glebowego poprzez emisję metali ciężkich. Ma to wpływ także na populację promieniowców w glebie nie tylko poprzez ograniczenie ich liczebności, lecz również poprzez selekcję szczepów opornych na zanieczyszczenia gleb, a przez to na ograniczenie ich bioróżnorodności. Pośrednim skutkiem ograniczenia różnorodności promieniowców może być wyginięcie szczepów ważnych pod względem funkcjonalnym dla środowiska, zubożenie mikroflory gleby, a także zmiany właściwości fizykochemicznych gleby. Niniejsza praca pokazuje, że skażenie środowiska metalami ciężkimi jest poważnym problemem środowiskowym. Zjawisko to należy monitorować i kontrolować, aby zapobiec nieodwracalnym zmianom w ekosystemie.

**Słowa kluczowe:** *Streptomyces* spp., promieniowce, gleby, metale ciężkie, tereny przemysłowe, zanieczyszczenie środowiska

### Wprowadzenie

Człowiek od zarania dziejów zmienia swoje otoczenie, a zjawisku temu towarzyszy wzrost emisji zanieczyszczeń do środowiska. Większość produkowanych zanieczyszczeń organicznych może zostać rozłożona przez mikroorganizmy naturalnie występujące w środowisku. Bardzo poważnym problemem może stać się emisja do otoczenia metali ciężkich, ponieważ mogą one zalegać w glebie przez setki, a nawet tysiące lat oraz mogą włączać się do obiegu pierwiastków w przyrodzie. Źródłem metali ciężkich w środowisku naturalnym mogą być procesy wietrzenia skał, erupcje wulkanów, parowanie oceanów, procesy glebotwórcze. Istotny wpływ ma także działalność człowieka i związany z nią przemysł chemiczny, wydobywczy, energetyczny, metalurgiczny oraz gospodarka komunalna i komunikacja. Na terenach zakładów przemysłowych, głównie hut metali, a także w ich sąsiedztwie zaobserwowano zwiększone stężenia metali ciężkich, a często wartości te są przekroczone kilka razy względem obowiązujących norm. Zmiany te nie są obo-

jętne dla środowiska [1]. Metale ciężkie emitowane do środowiska ulegają w glebach różnym transformacjom w zależności od ich typu, zawartości koloidów organicznych i nieorganicznych, zawartości związków pochodzących z rozkładu biomasy, metabolitów wtórnych czynnie wydzielanych przez systemy korzeniowe roślin oraz przez mikroorganizmy, w zależności od odczynu czy zawartości wody [2]. Metale ciężkie mogą zaburzać funkcjonowanie poszczególnych enzymów glebowych, ważnych ze względu na aktywny udział w rozkładzie biomasy [3]. Wysokie stężenia miedzi w glebie zmniejszają aktywność enzymów, takich jak dehydrogenaza, ureaza, fosfataza kwaśna i fosfataza alkaliczna [4]. Hamują także namnażanie się mikroorganizmów w glebie, zwłaszcza promieniowców. Wykazano, że wyższe stężenia cynku powodowały zahamowanie ich sporulacji [5]. Wrażliwość promieniowców z rodzaju *Streptomyces* na metale ciężkie zależy od fazy rozwojowej: wegetatywnej lub generatywnej. Miedź nie wpływa na procesy kiełkowania konidiów promieniowców, ponieważ jest ważnym mikroelementem. Jej obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania oksydazy cytochromowej. Natomiast kadm ma odmienne działanie, wyraźnie hamuje przechodzenie jasnej fazy kiełkowania konidiów promieniowców w fazę ciemną. Formy wegetatywne *Streptomyces* charakteryzują się mniejszą wrażliwością na kadm niż ich kiełkujące konidia [6].

Promieniowce są mikroorganizmami, które bardzo licznie zasiedlają warstwę próchniczną gleby. Ich obecność w środowisku glebowym jest ściśle uzależniona m.in. od właściwości chemicznych, fizycznych oraz fizykochemicznych gleby. Promieniowce ze względu na zdolności do rozkładu różnych związków chemicznych, w tym polisacharydów oraz związków aromatycznych, odgrywają kluczową rolę w obiegu wielu pierwiastków w przyrodzie. Uczestniczą także w procesach tworzenia związków humusowych w glebie [7].

Mając na uwadze wzrost zanieczyszczenia środowiska naturalnego metalami ciężkimi i ich oddziaływanie na mikroorganizmy w glebie, podjęto próbę określenia wpływu wybranych metali ciężkich: miedzi, kadmu, cynku i ołowiu na wzrost promieniowców wyizolowanych z gleb pobranych z terenu huty ArcelorMittal w Krakowie. Priorytetem tej analizy było wyznaczenie stężeń hamujących wzrost i namnażanie uzyskanych izolatów. Wyniki tych badań umożliwią ocenę oporności promieniowców pochodzących z terenów przemysłowych na podwyższone stężenia metali ciężkich, co pozwoli uzyskać informacje, czy odpowiedzią na silne skażenie gleb jest selekcja i ewolucja w kierunku zwiększającej się oporności.

## 1. Materiały i metody

Pięć próbek wierzchniej warstwy gleby (ok. 20 cm od powierzchni) zostało pobranych z terenu huty ArcelorMittal w Krakowie wiosną 2012 roku, zgodnie z zasadami określonymi przez normę PN-ISO 10381-6:1998 [8]. W tabeli 1 podano lokalizację punktów pobrania. Każda próba została pobrana w 3 powtórzeniach. Próbkę gleb poddano analizom fizykochemicznym - oznaczono ich odczyn w H<sub>2</sub>O

[9] i wilgotność [10]. Oznaczono także zawartość metali ciężkich w glebach - miedzi, kadmu, cynku i ołowiu metodą absorpcyjnej spektroskopii atomowej [11, 12] i zawartość substancji organicznej metodą Tiurina w modyfikacji Oleksynowej [13].

Tabela 1. Lokalizacja punktów pobrania badanych gleb na terenie huty ArcelorMittal w Krakowie

Table 1. Location of sampling sites within the ArcelorMittal steelworks in Cracow

Nr	Lokalizacja	Współrzędne GPS
1	Brama nr 2	N 50°04.958' E 20°04.423'
2	Walcownia rur zgrzewanych	N 50°05.450' E 20°05.735'
3	Walcownia Slabing	N 50°03.956' E 20°05.090'
4	Algomerownia	N 50°04.305' E 20°06.047'
5	Koksownia	N 50°04.537' E 20°06.042'

Liczebność promieniowców w glebach oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń. Mikroorganizmy hodowano na podłożu Gauze'a w 28°C przez 7 dni. Po upływie czasu inkubacji odczytano liczbę jednostek tworzących kolonie i przeliczono na 1 g suchej masy gleby ( $\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Następnie z każdej próbki gleby do dalszych analiz wyselekcjonowano po 2 izolaty promieniowców, które po wykonaniu obserwacji makroskopowych, mikroskopowych (preparaty barwione metodą Grama) i wykonaniu próby na katalazę wstępnie zaklasyfikowano jako należące do rodzaju *Streptomyces*. Izolację czystych kultur wykonano metodą posiewu redukcyjnego po wieloboku. Wyizolowanym szczepom nadano kolejne numery, zgodne z numeracją próbek gleb, a izolaty pochodzące z tej samej próbki gleby rozróżniono, nadając im symbole - kolejno A i B.

W celu potwierdzenia przynależności wybranych izolatów promieniowców do rodzaju *Streptomyces* wykonano sekwencjonowanie rejonu 16S rDNA. Wykonano izolację DNA z 15 mg pseudogrzebni promieniowców przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem załączonym do produktu. Po izolacji zmierzono stężenie DNA za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND 1000. W następnej kolejności wykonano reakcję PCR w celu amplifikacji konserwatywnego rejonu 16S rDNA. Mieszanina reakcyjna ( $25 \text{ mm}^3$ ) zawierała 10 · bufor Taq, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,3  $\mu\text{M}$  każdego z primerów, 0,2 mM deoksynukleotydów, 1U Polimerazy Taq (Fermentas) oraz 25 ng matrycowego DNA. Primery użyte w reakcji PCR w celu amplifikacji rejonu 16S rDNA to: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') [14]. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) z zastosowaniem następującego profilu temperaturowego: denaturacja wstępna 5 min w 94°C, 30 cykli denaturacji (94°C przez 30 s), przyłączania primerów (62,5°C przez 30 s) i wydłużania (72°C przez 1 min), końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 min. Produkty reakcji PCR uwiadczniano w świetle UV po elektroforezie w 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydy. Produkty reakcji PCR o odpo-

wiedniej długości wycinano z żelu i oczyszczano przy użyciu zestawu Gel Out (A&A Biotechnology). Oczyszczone produkty poddano sekwencjonowaniu (MacroGen Europe), a uzyskane sekwencje porównywano przy użyciu narzędzia BLAST z bazą danych sekwencji nukleotydowych NCBI GenBank.

Test wrażliwości badanych 10 izolatów *Streptomyces* spp. na wybrane metale ciężkie wykonano metodą studzienkową. Test wykonano, posiewając powierzchniowo promieniowce pobrane z jednej kolonii wcześniej oczyszczonych izolatów. Sporządzono roztwory soli siarczanu(VI): miedzi ( $\text{CuSO}_4$ ), kadmu ( $\text{CdSO}_4$ ) i cynku ( $\text{ZnSO}_4$ ) oraz azotanu(V) ołowiu:  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Stężenia soli metali ciężkich użyte do badań zostały wyznaczone doświadczalnie. Początkowo wyznaczone stężenia soli cynku i ołowiu (100, 200, 400, 800  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) nie spowodowały zahamowania wzrostu badanych izolatów. Zwiększono je stopniowo, aż do określenia stężenia hamującego (tab. 2).

Tabela 2. Stężenia metali ciężkich zastosowane w analizie

Table 2. Heavy metal concentrations applied in the analysis

Jon metalu	Stężenia, $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$			
$\text{Cu}^{2+}$	100	200	400	800
$\text{Cd}^{2+}$	100	200	400	800
$\text{Zn}^{2+}$	3000	6000	9000	12000
$\text{Pb}^{2+}$	8000	10 000	12 000	14 000

Na szalkach Petriego w warunkach jałowych rozlano po 20  $\text{cm}^3$  podłoża Gauze'a z dodatkiem nystatyny w celu zahamowania wzrostu grzybów. Badane promieniowce zostały namnożone metodą murawową. Następnie w każdym podłożu wykonano po pięć studzienek o średnicy 10 mm. Do czterech studzienek dodano pipetą automatyczną z jałowymi końcówkami po 60  $\text{mm}^3$  kolejnych stężeń badanej soli metalu ciężkiego, a do piątej, jako kontrolę, taką samą ilość 0,9% soli fizjologicznej. Do badania wykorzystano wcześniej wyznaczone i przygotowane roztwory soli metali:  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Inkubację prowadzono 7 dni w temp. 28°C. Po zakończeniu hodowli dokonano pomiaru stref zahamowania wzrostu miarą z dokładnością do milimetra. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki podano jako średnie z powtórzeń.

Analizy statystyczne wykonano z użyciem programu Statistica (StatSoft), obliczając współczynnik korelacji Pearsona (r) pomiędzy stężeniem badanych metali ciężkich w glebach a średnicą stref zahamowania wzrostu oraz pomiędzy stężeniem metali ciężkich w glebie a liczebnością badanych mikroorganizmów.

## 2. Wyniki badań i ich interpretacja

Wyniki analiz fizykochemicznych gleb oraz liczebność promieniowców w badanych próbkach podano w tabeli 3 [12]. Liczebność promieniowców jest wartością średnią z 3 powtórzeń.

Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne oraz liczebność promieniowców w badanych glebach

Table 3. Physico-chemical properties and the number of actinomycetes in the examined soils

	Numer analizowanej próbki gleby				
	1	2	3	4	5
Liczebność, jtk · g <sup>-1</sup>	6700	46 440	247 730	58 480	20 260
pH	8,60	7,70	8,59	8,63	8,22
Sucha masa, g	8,508	8,168	8,776	8,059	8,516
Wilgotność, %	14,92	18,32	12,24	19,41	14,84
Zaw. subst. org., %	9,08	6,62	5,31	16,50	22,31
Cu, mg · g <sup>-1</sup>	56,23	120,13	29,11	99,74	<b>891,40</b>
Cd, mg · g <sup>-1</sup>	1,31	<b>16,07</b>	0,09	1,47	1,50
Zn, mg · g <sup>-1</sup>	46,17	<b>11 658,20</b>	37,46	262,64	408,93
Pb, mg · g <sup>-1</sup>	25,75	275,80	8,63	129,55	<b>1073,99</b>

Pogrubiona czcionka zaznacza wartości stężeń metali ciężkich przekraczające dopuszczalne normy stężenia zawarte w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r.

Values in bold type mark the heavy metal concentrations exceeding the limits given by the regulation of the Minister of Environment from September 9<sup>th</sup> 2002

Liczebność promieniowców w badanych próbkach gleb jest bardzo zróżnicowana. Największą wartość - 247 730 jtk · g<sup>-1</sup> otrzymano dla próbki gleby numer 3 (pobranej z rejonu Walcowni Slabing), a najmniejszą 6700 jtk · g<sup>-1</sup> - dla gleby numer 1 (pobranej z okolic Bramy nr 2). W pozostałych trzech testowanych próbkach gleb liczebność kształtowała się na podobnym poziomie. Analizowane gleby mają odczyn alkaliczny, a najwyższe pH odnotowano dla gleb nr 1, 3 i 4 (tab. 3). Jedyne w przypadku gleby numer 2 zaobserwowano odczyn obojętny - pH = 7,7. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują, że podwyższona zawartość metali ciężkich w glebie nie jest jedynym czynnikiem ograniczającym liczebność i namnażanie promieniowców w glebach. Występowanie oraz liczebność tych mikroorganizmów może być regulowana także przez odczyn gleb, zawartość substancji organicznej czy zawartość azotu i fosforu w glebach [3]. Ponadto, toksyczność metali ciężkich w stosunku do mikroorganizmów glebowych zależy także od ich formy i biodostępności, co może być również warunkowane m.in. odczynem gleb [15]. Siła toksycznego działania metali ciężkich na mikroflorę glebową może również być uwarunkowana obecnością innych metali ciężkich w glebie, które mogą zarówno wzmacniać, jak i neutralizować efekt [16]. W analizowanej próbce numer 2 wykryto dużo wyższe stężenie kadmu i cynku niż jest to dopuszczalne przez obowiązujące normy. Zaobserwowano małą liczebność badanych drobnoustrojów, której przyczyną może być toksyczny wpływ tych metali ciężkich na mikroorganizmy. Natomiast w glebie numer 5 stwierdzono znacznie przekroczone wartości stężenia miedzi i ołowiu, co mogło mieć szkodliwy wpływ na wzrost promieniowców, gdyż zaobserwowano niską ich liczebność. W pozostałych próbkach gleb nie stwierdzono przekroczonej normy zawartości metali ciężkich. Gleba numer 3 charakteryzowała się najwyższą liczebnością badanych w doświadczeniu mikroorganizmów, otrzymano wynik 247 730 jtk · g<sup>-1</sup>. Jednak pomimo niskich stężeń metali

ciężkich w próbkach gleb numer 1 i 4 zaobserwowano obniżoną liczebność *Streptomyces* w porównaniu do gleby numer 3. Przyczyną tak zróżnicowanych wyników doświadczenia może być obecność gatunków promieniowców, które charakteryzują się większą wrażliwością na stężenie analizowanych metali w glebie. Uzyskane wyniki badań różnią się od wyników uzyskanych przez Górską i in. [17], która w swoich doświadczeniach wykazała brak wpływu dodatku metali ciężkich do gleby na liczebność promieniowców w okresie wegetacji. Z kolei wyniki badań prowadzonych przez Wyszowską i Kucharskiego [4] nie potwierdzają tych obserwacji. Według ich doświadczeń, negatywny wpływ na rozwój promieniowców wykazano w przypadku podwyższonych zawartości miedzi, cynku i ołowiu. Jedynie kadm stymulował rozwój tych mikroorganizmów.

Na podstawie analizy molekularnej opartej na sekwencjonowaniu rejonu 16S rDNA potwierdzono przynależność badanych izolatów do rodzaju *Streptomyces*. Wyizolowane sekwencje 16S rDNA porównano przy użyciu narzędzia BLAST z bazą danych sekwencji nukleotydowych NCBI GenBank. Uzyskane wyniki pozwoliły jednoznacznie określić rodzaj *Streptomyces* dla 10 badanych izolatów. Rodzaj *Streptomyces* jest najczęściej izolowany spośród promieniowców, ponad 66% izolatów promieniowców glebowych należy do tego rodzaju. Potwierdzają to wyniki badań z wykorzystaniem technik tradycyjnych oraz metody inżynierii genetycznej [18].

W przypadku miedzi najniższą średnią strefę zahamowania wzrostu odnotowano dla izolatu nr 5B, pozyskanego z próbki gleby, w której stwierdzono najwyższe, przekraczające dopuszczalne, stężenie tego metalu. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku kadmu - tutaj najniższą średnią strefę zahamowania wzrostu odnotowano dla izolatu nr 2B (próbka, w której stwierdzono najwyższą, przekraczającą dopuszczalną, zawartość tego pierwiastka). Podobnych zależności nie stwierdzono dla pozostałych dwóch metali - w przypadku cynku najniższą średnią zahamowania wzrostu zaobserwowano dla izolatu pobranego z próbki nr 3, w której stężenie cynku było najniższe ze wszystkich badanych gleb.

Obliczono korelację między zahamowaniem wzrostu badanych promieniowców przez poszczególne metale ciężkie a zawartością odpowiednich metali w analizowanych próbkach gleb (tab. 4) w celu zbadania, czy skażenie gleb metalami ciężkimi mogło spowodować selekcję szczepów opornych, tym samym zmniejszając ich bioróżnorodność w badanych glebach. Na podstawie przeprowadzonej analizy uzyskano słabą ujemną korelację między zawartością w glebach miedzi i cynku a zahamowaniem wzrostu badanych promieniowców. Zaobserwowano także słabą dodatnią korelację między zawartością ołowiu a zahamowaniem wzrostu promieniowców przez działanie tego metalu ciężkiego. Z kolei w przypadku kadmu odnotowano bardzo wysoką ujemną korelację między średnicą stref zahamowania wzrostu a zawartością tego pierwiastka w glebach, co może świadczyć o tym, że skażenie gleby kadmem w sposób istotny zmodyfikowało bytującą tam populację promieniowców w taki sposób, że szczepy wrażliwe wyginęły, natomiast w glebach przetrwały szczepy o ograniczonej wrażliwości na ten toksyczny metal ciężki.

Tabela 4. Wpływ metali ciężkich na wzrost promieniowców z rodzaju *Streptomyces* spp. wyizolowanych z terenu huty ArcelorMittal w KrakowieTable 4. The growth inhibition of *Streptomyces* spp. isolates derived from the area of ArcelorMittal steelworks by the examined heavy metals

Metal	Stężenie metalu $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	Strefy zahamowania wzrostu izolatów <i>Streptomyces</i> spp., mm									
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
I	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11
Cu	100	17,7	24,0	18,7	21,3	16,3	19,3	21,0	25,3	22,7	13,5
	200	19,7	24,3	20,0	22,3	17,3	21,3	23,0	28,0	23,3	14,0
	400	21,3	25,3	22,0	22,7	18,0	22,0	24,6	29,0	25,3	15,0
	800	30,0	26,0	22,7	25,3	20,7	24,3	27,3	33,3	27,7	20,7
Średnia		22,2	24,9	20,9	22,9	18,1	21,7	24,0	28,9	24,8	15,8
Stężenie metalu w glebie		56,23		120,13		29,11		99,74		891,4	
Współczynnik korelacji - metale, (r)*		-0,27									
Współczynnik korelacji - materia organiczna, (r)**		0,112									
Cd	100	22,0	17,0	13,0	13,7	25,7	24,7	25,3	32,5	24,3	18,7
	200	25,5	18,0	15,3	14,0	26,3	25,7	26,7	33,0	24,7	19,7
	400	27,0	18,6	17,0	14,6	26,7	26,3	27,0	34,5	26,3	21,3
	800	29,0	25,7	26,0	16,7	28,7	29,0	27,3	36,0	28,3	23,3
Średnia		25,9	19,8	17,8	14,8	26,9	26,4	26,6	34,0	25,9	20,8
Stężenie metalu w glebie		1,31		16,07		0,09		1,47		1,5	
Współczynnik korelacji - metale, (r)*		-0,72									
Współczynnik korelacji - materia organiczna, (r)**		0,285									
Zn	3000	12,3	12,0	12,7	12,0	12,3	13,3	12,7	13,7	13,0	15,3
	6000	15,3	14,3	17,3	14,0	14,0	14,3	16,0	17,3	17,0	16,3
	9000	19,3	18,3	19,3	17,5	15,3	15,7	18,3	22,3	22,0	17,7
	12 000	21,3	20,3	20,7	19,3	16,7	18,0	19,7	26,7	26,7	19,3
Średnia		17,1	16,2	17,5	15,7	14,6	15,3	16,7	20,0	19,7	17,2
Stężenie metalu w glebie		46,17		11658,2		37,46		262,64		408,93	
Współczynnik korelacji - metale, (r)*		-0,1									
Współczynnik korelacji - materia organiczna, (r)**		0,706									
Pb	8000	13,0	13,3	14,3	13,7	13,0	13,0	13,7	13,7	14,3	14,0
	10 000	15,7	14,3	17,3	15,3	14,0	14,0	14,0	15,7	14,7	14,7
	12 000	17,0	17,0	18,7	16,3	16,0	15,7	15,3	16,7	16,7	15,3
	14 000	17,7	17,7	19,3	18,3	16,7	17,3	16,7	19,3	18,3	17,3

cd. tab. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Średnia	15,9	15,8	17,4	15,9	14,9	15,0	14,9	16,4	16,0	15,3
Stężenie metalu w glebie	25,75		275,8		8,63		129,55		1073,99	
Współczynnik korelacji - metale, (r)*	0,12									
Współczynnik korelacji - materia organiczna, (r)**	-0,053									

\* korelacja między zahamowaniem wzrostu badanych promieniowców przez poszczególne metale ciężkie a zawartością odpowiednich metali w analizowanych próbkach gleb ( $p < 0,05$ )

\* correlation between the growth inhibition of the examined actinomycetes by each heavy metal and the concentration of metals in the soil samples ( $p < 0.05$ )

\*\* korelacja pomiędzy zahamowaniem wzrostu badanych promieniowców przez poszczególne metale ciężkie a zawartością materii organicznej w próbkach gleb ( $p < 0,05$ )

\*\* correlation between the growth inhibition of the examined actinomycetes by each heavy metal and the organic matter content in soil samples ( $p < 0.05$ )

Na podstawie przeprowadzonego badania stwierdzono, że promieniowce wyizolowane z gleb z terenu huty ArcelorMittal charakteryzują się zróżnicowaną tolerancją na podwyższone zawartości metali ciężkich. Największą wrażliwość badane promieniowce prezentowały w stosunku do miedzi, następnie dla kadmu, a potem odpowiednio mniejszą dla cynku i ołowiu. Wyznaczone minimalne stężenia hamujące (MIC) wyniosły - dla miedzi i kadmu  $100 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , dla cynku -  $3000 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  oraz dla ołowiu  $8000 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Otrzymane wyniki różnią się od badań Junga [19], który stwierdza, że wrażliwość promieniowców pod wpływem metali ciężkich rośnie odpowiednio dla ołowiu, kadmu, cynku i miedzi. Również Abbas i Edwards [5] uzyskali inne wyniki, ponieważ wykazali, że promieniowce z rodzaju *Streptomyces* charakteryzują się wąskimi profilami zahamowania wzrostu i największe toksyczne działanie ma kadm, następnie cynk i miedź. Kadm i cynk powodowały wrażliwość *Streptomyces* na działanie tych metali, ale nie hamowały całkowicie ich wzrostu. Natomiast wyższe stężenia cynku spowodowały zahamowanie sporulacji. Uzyskane wyniki dla miedzi i ołowiu są zgodne z badaniami Mocek-Płóćniak i Sawickiej, które potwierdziły ujemny wpływ tych metali na wzrost promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. Podwyższone stężenia miedzi istotnie hamują wzrost i namnażanie promieniowców, jednak zależność ta nie jest proporcjonalna, zależy od badanego szczepu. W badanych próbach zawartość ołowiu ograniczała liczebność mikroorganizmów w mniejszym stopniu [20]. Otrzymane wyniki różnią się od innych badań, ponieważ na ostateczny efekt ma wpływ wiele czynników, takich jak miejsce pobrania próbek gleby, źródło zanieczyszczenia gleby substancjami toksycznymi, a także stosunek ilości mikroorganizmów należących do gatunków mniej i bardziej tolerancyjnych na metale ciężkie.

Badane izolaty, nawet pochodzące z tej samej próbki gleby, charakteryzowały się zróżnicowanym zahamowaniem wzrostu pod wpływem określonego stężenia metalu ciężkiego, szczególnie miedzi. Przyczyną tego zjawiska może być inna tole-



rancja na substancje toksyczne, która zależy od gatunku. Wpływ mogą mieć też czynniki fizykochemiczne środowiska, w którym znajdowały się promieniowce. Badania Adamskiej i innych [6], wykazały, że miedź i kadm mają zróżnicowane działanie na proces kiełkowania konidiów promieniowców. Miedź nie wpływa na proces kiełkowania, ponieważ pierwiastek ten jest mikroelementem, który pełni istotne funkcje w metabolizmie, jest nieodzowny w oksydazie cytochromowej, której ilość znacznie wzrasta w jasnej fazie kiełkowania. Odmienne działanie ma kadm, ponieważ wyraźnie hamuje on przechodzenie jednej fazy kiełkowania w drugą. Jest to wynikiem hamowania przez kadm procesów oddechowych w komórkach promieniowców, w wyniku czego zostaje zaburzony elektrochemiczny transport błonowy. Kadm jako pierwiastek dwuwartościowy może działać antagonistycznie w stosunku do jonów magnezu czy wapnia i blokować ich dostępność dla konidiów, zwłaszcza znajdujących się w fazie ciemnej kiełkowania. Wykazano, że formy wegetatywne *Streptomyces* charakteryzują się mniejszą wrażliwością na kadm niż ich kiełkujące konidia [6].

## Podsumowanie

Wyniki niniejszych badań potwierdziły, że huta ArcelorMittal przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska glebowego w Krakowie metalami ciężkimi. Wykazano, że próbki gleb z terenu huty mają podwyższone zawartości metali ciężkich, a dla dwóch gleb wartości te przekraczają dopuszczalne normy. Zmiany te nie są obojętne dla obecnych w glebie promieniowców, ponieważ metale mogą wpływać na ich liczebność w zależności od ich stężenia w glebie. Zaobserwowano zależność między stężeniem metali ciężkich w glebach a tolerancją promieniowców na ich działanie, przyczyną tego stanu może być obecność gatunków przystosowanych do występowania toksycznych metali w glebie. Niektóre promieniowce pod wpływem wysokich stężeń metali ciężkich mogą nabywać oporność, dzięki czemu przeżywają w tych niekorzystnych warunkach. Pośrednim skutkiem ograniczenia różnorodności promieniowców może być wyginięcie szczepów ważnych pod względem funkcjonalnym dla środowiska, zubożenie mikroflory gleby, a także zmiany właściwości fizykochemicznych gleby. Niniejsza praca pokazuje, że skażenie środowiska metalami ciężkimi jest poważnym problemem środowiskowym. Zjawisko to należy monitorować i kontrolować, aby zapobiec nieodwracalnym zmianom w ekosystemie.

## Literatura

- [1] Seńczuk W., Toksykologia współczesna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
- [2] Alvarez A., Catalano S.A., Amoroso M.J., Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny, *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012, 66, 1083-1088.
- [3] Mocek-Płóćiniak A., Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym, *Nauka Przyroda Technologie* 2010, 4, 1-10.

- [4] Wyszowska J., Kucharski J., Liczebność drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 2003, 492, 427-433.
- [5] Abbas A., Edwards C., Effects of metals on a range *Streptomyces* species, *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 2030-2035.
- [6] Adamska M., Badura L., Smyła A., Wielgosz E., Wrażliwość konidii promieniowców w różnych fazach kiełkowania na jony kadmu i miedzi, *Annales UMCS* 2002, 57, 139-146.
- [7] Bereza-Boruta B., Wybrane właściwości enzymatyczne promieniowców z rodzaju, *Streptomyces* wyizolowanych spod uprawy ziemniaka, *Acta Sci. Pol. Ser. Agricultura* 2002, 1(1), 27-36.
- [8] PN-ISO 10381-6:1998 Jakość gleby - Pobieranie próbek - Zasady dotyczące pobierania, postępowania z próbkami i przechowywania próbek gleby przeznaczonych do badania tlenowych (aerobowych) procesów mikrobiologicznych w warunkach laboratoryjnych.
- [9] PN-ISO 10390:1997 Jakość gleby - Oznaczanie pH.
- [10] PN ISO 11465:1999 Jakość gleby - Oznaczanie zawartości suchej masy gleby i wody w glebie w przeliczeniu na suchą masę gleby - Metoda wagowa.
- [11] Akoto O., Ephraim J.H., Darko G., Heavy metals pollution in surface soils in the vicinity of abundant railway servicing workshop in Kumasi, Ghana, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2008, 2, 359-364
- [12] Lenart A., Wolny-Koładka K., The effect of heavy metal concentration and soil ph on the abundance of selected microbial groups within ArcelorMittal Poland steelworks in Cracow, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2013, 90, 85-90.
- [13] Oleksynowa K., Tokaj J., Jakubiec J., Komornicki T., Przewodnik do ćwiczeń z gleboznawstwa i geologii. Część II. Metody laboratoryjne analizy gleby, Wydawnictwo AR, Kraków 1993.
- [14] Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.* 1991, 173, 697-703.
- [15] Fijałkowski K., Kacprzak M., Grobelak A., Placek A., Wpływ wybranych parametrów gleby na mogilność metali ciężkich, *Inż. Ochr. Środ.* 2012, 15, 81-92.
- [16] Wyszowska J., Kucharski J., Borowik A., Boros E., Response of bacteria to soil contamination with heavy metals, *J. Elementol.* 2008, 13, 443-453.
- [17] Górka E.B., Maciejewska A., Jakubiak I., Russel S., Wpływ obornika, torfu, węgla brunatnego i preparatu Rekulter na występowanie promieniowców w glebie, *Zesz. Nauk. UP Wrocław* 2006, 546, 81-86.
- [18] Parthasarathi S., Sathya S., Bupesh G., Samy R.D., Mohan M.R., Kumar G.S., Manikandan M., Kim C. J., Balakrishnan K., Isolation and characterization of antimicrobial compound from marine *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49, *World Journal of Fish and Marine Science* 2012, 4, 268-277.
- [19] Jung M.C., Heavy metal concentrations in soils and factors affecting metal uptake by plants in the vicinity of a Korean Cu-W mine, *Sensors* 2008, 8, 2413-2423.
- [20] Mocek-Płóćiniak A., Sawicka A., Wpływ miedzi i ołowiu na liczebność mikroorganizmów w glebach w pobliżu huty miedzi „Legnica”, *Zesz. Nauk. UP Wrocław* 2006, 546, 261-270.

### **The Effect of the Selected Heavy Metals on the Growth and Proliferation of *Streptomyces* spp. Isolated from Soils**

People have changed their environment since the beginning of the civilization - it is an inevitable process. However, this phenomenon is accompanied by emission of many harmful chemicals to the environment, and recently there has been an increase in the amount of pollution. Having regard to the increase in environmental contamination with heavy metals due to the expanding industry and its impact on soil microorganisms, this study attempted to determine the effect of the selected heavy metals: cadmium, copper, lead and zinc, on the

growth of actinobacteria (belonging to the genus *Streptomyces*) isolated from soils of ArcelorMittal steelworks in Cracow. Five soil samples were selected for the analysis, from which 2 isolates of *Streptomyces* spp. were selected for further analyses.

The number of *Streptomyces* spp. in the soil samples was determined using the serial dilutions method. The systematic affiliation of microorganisms was confirmed by macroscopic as well as microscopic observations of Gram-stained smears, catalase reaction test and the sequencing of 16S rDNA region. Additionally, soil physical and chemical properties were examined - pH, moisture and heavy metal content - using atomic spectrometry. The heavy metal resistance of the examined *Streptomyces* spp. strains was analyzed using a well method with increasing concentrations of cadmium, copper, lead and zinc. After the incubation results were recorded as the growth inhibition zones (diameters) and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the heavy metals were determined.

The conducted analyses revealed that heavy metal concentrations in two out of five examined soils exceeded the admissible values given by the Regulation of the Minister of Environment on soil quality standards. The number of actinobacteria in soils was varied (from 6700 to almost 250 thousand CFU per gram of soil dry weight). There was a negative correlation between the heavy metal concentrations in soils and the number of the studied microorganisms. The analyzed soils were alkaline - the lowest pH value was 7.7. Regarding the heavy metal resistance of the analyzed *Streptomyces* spp. strains, diverse *in vitro* susceptibility was recorded. The bacterial reactions differed even between strains isolated from the same soil samples. Minimum inhibitory concentrations of the examined heavy metals were as follows: Cd and Cu -  $100 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , Zn -  $3000 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  and Pb -  $8000 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . There was a negative correlation between the concentration of heavy metals in soils and the growth inhibition zones (in the case of cadmium this correlation was high), indicating that the soil contamination with cadmium may have modified the soil population of *Streptomyces* spp., causing extinction of the susceptible strains while the ones with reduced sensitivity survived.

The results of the presented research indicated that the ArcelorMittal steelworks contaminates the soil environment, which may affect the microbial community of soils, not only by reducing the population, but also by decreasing biodiversity of soil microorganisms, which was particularly visible in the case of cadmium - a strongly toxic heavy metal. This study demonstrates that the heavy metal contamination is a serious environmental problem. This phenomenon needs to be monitored and controlled to prevent irreversible changes to the ecosystem.

**Keywords:** *Streptomyces* spp., actinobacteria, soils, heavy metals, industrial areas, environmental pollution