

NATALIA BALICKA, TERESA WĘGRZYN, EDYTA TEICHERT

PRZYKŁAD OBNIŻENIA TOKSYCZNOŚCI PYŁU
ZAWIERAJĄCEGO METALE CIĘŻKIE
PRZEZ BAKTERIĘ GLEBOWĄ¹

Katedra Mikrobiologii Rolniczej Akademii Rolniczej we Wrocławiu

WSTĘP

Drobnoustroje są zdolne do transformowania i zmiany aktywności metali ciężkich obecnych w emisjach przemysłowych. Metabolity drobnoustrojowe wydzielane pozakomórkowo wpływają pośrednio i bezpośrednio na ruchliwość związków metali w glebie. Funkcje życiowe drobnoustrojów są związane ze zmianą odczynu i potencjału oksydoredukcyjnego środowiska, co jest bardzo istotne dla połączeń metali, ich wartościowości i aktywności biologicznej [1, 2, 5, 6, 11, 12].

Metabolity drobnoustrojowe mogą być również powodem wielu innych zjawisk związanych bezpośrednio z oddziaływaniem na związki metali, jak: precypitacja, kompleksowanie, interakcja jonowa, wiązanie z materią organiczną [6]. Ważnym elementem dla ruchliwości metali jest zjawisko sorpcji o charakterze chemicznym i biologicznym, co prowadzi najczęściej do okresowego unieruchomienia metali [7, 8].

Tematem niniejszej pracy było sprawdzenie możliwości obniżania toksyczności pyłu przemysłowego o dużej zawartości metali ciężkich przez wybraną bakterię glebową oraz analiza mechanizmu tego zjawiska.

MATERIAŁ I METODYKA

Źródłem metali był pył emitowany przez hutę żelazo-chromu, zawierający duże ilości metali ciężkich: 12,0 Cu, 130,0 Ni, 150,0 Pb, 8100 Fe, 9100 Mn, 25 000 Cr, 50 000 Mg ppm. Są to wartości zmienne, zależne od natężenia emisji; liczby podają rząd wielkości. Odczyn pyłu jest alkaliczny, wynosi około 10,0.

Do badania zmiany toksyczności pyłu został wybrany szczep *Myc-*

¹ Praca wykonana w ramach umowy MR.II.17.5.4.1.

bacterium 5a, wyizolowany z gleby zapyłonej przez hutę. Szczep ten obniżał odczyn pożywki hodowlanej do 5,5—6,0, a więc zgodnie z założeniem o wpływie odczynu na rozpuszczalność związków metali mógł powodować wzrost toksyczności pyłu [3].

Frakcję metabolitów o odczynie kwaśnym wydzielano z kultury bakterii namnożonej w pożywce mineralnej o składzie: 10,0 g glukozy, 2,0 g KNO_3 , 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g NaCl , ślad FeSO_4 . Po oddzieleniu komórek przez wirowanie zagęszczano supernatant, a następnie rozdzielano na kationicie IR-120 i anionicie IRA-400. Kwasy oddzielano od peptydów, cukrów i pozostałych substancji przez wymywanie z anionitu 4-procentowym NH_4CO_3 . Uzyskane w ten sposób sole kwasów przepuszczano ponownie przez kationit w celu uzyskania czystych kwasów. Rozdzielano je następnie na bibule Whatman 3 w układzie etanol: amoniak: woda, w stosunku 40 : 2 : 8, dwukrotnie po 24 godziny. Chromatogram wywoływano 0,04-procentowym roztworem zieleni bromkrezolowej w 95-procentowym etanolu, ftalanu aniliny oraz 1-procentowym żelazocyjanku potasu z FeCl_3 [10]. Następujące kwasy zostały użyte jako standardy: octowy, cytrynowy, szczawiowy, winowy, alfa-ketoglutaryny, bursztynowy, jabłkowy, masłowy, glukoronowy, syryngowy, wanilinowy, benzoesowy, glutaminowy i asparaginowy.

W płynie pochodzonym oznaczano również ilość magnezu rozpuszczalnego, co wskazywało na efekt obniżenia odczynu podłoża przez bakterie.

Zmianę aktywności pyłu pod wpływem bakterii określano w jej kulturze płynnej, inkubowanej w obecności 1, 3, 5, 7, 10 g pyłu na litr pożywki. Po upływie 3, 5, 7 dni inkubacji sprawdzano inokulum szczepu grzyba z rodzaju *Penicillium*. Szczep ten został wybrany jako testowy dzięki swojej wrażliwości na metale ciężkie w podłożu [3]. Na podstawie intensywności jego wzrostu i ciężaru suchej masy grzybni wnioskowano o aktywności metali w kulturze bakterii.

Zaobserwowano, że pod wpływem kultury bakterii pył zmieniał strukturę, która z drobno pylistej stawała się kłaczkowata. Zakładano, że zjawisko to zależy od ilości, wieku komórek i czasu kontaktu z pyłem. Po stwierdzeniu, że najwyraźniejsze skłaczenie występuje w obecności komórek młodych, tylko takie kultury używano w dalszych doświadczeniach.

Do pożywki płynnej o składzie jak wyżej i zawierającej 7 g na litr pyłu dodawano zawiesinę bakterii w ilości: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10 ml na 50 ml pożywki, co odpowiadało około 0,14, 0,28, 0,50, 0,85, 1,10, 1,42, 2,80 mg suchej masy komórek. Zjawisko skłaczenia występowało prawie natychmiast. Dla określenia zmian w toksyczności pyłu stosowano stale testowy szczep *Penicillium*.

Zjawisko skłaczenia pyłu przez kulturę bakterii obserwowano tylko w obecności fosforanów znajdujących się w pożywce; po ich usunięciu

nie zachodziła zmiana struktury pyłu. Ponieważ sugerowało to udział fosforanów w tym zjawisku, oznaczano ich ilość w płynie pohodowlanym i w osadzie oddzielonym z kultury przez sedymentację. Użyto do tego celu metody z zastosowaniem chlorku cynawego [13].

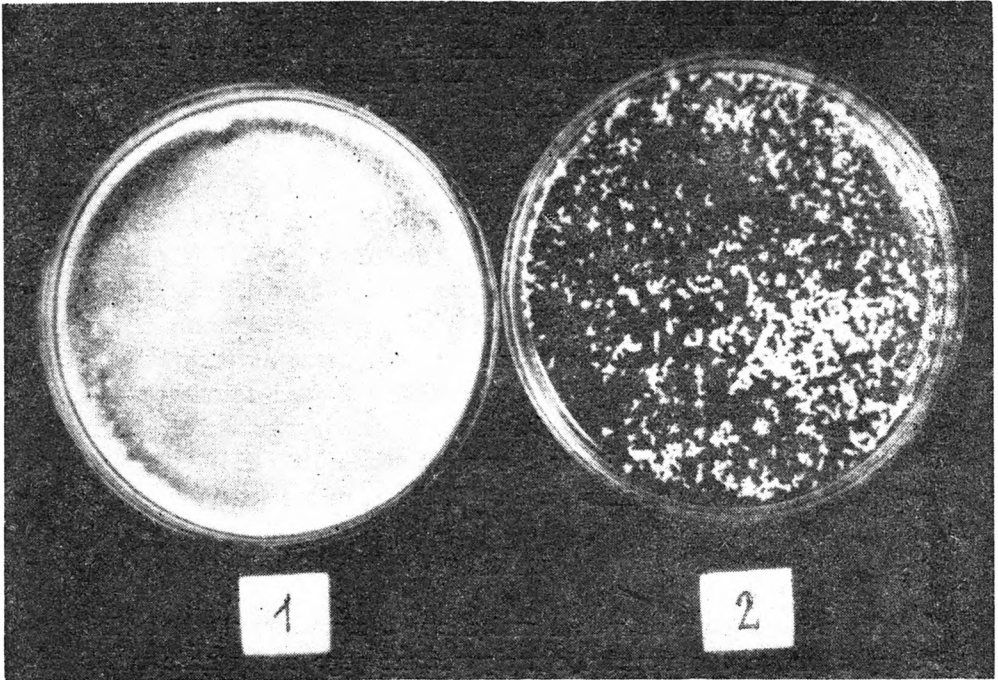
Próbie zmiany aktywności pyłu przez kulturę szczepu *Mycobacterium* 5a przeprowadzono również w glebie, w doświadczeniu mikrowazonowym. W tym celu do gleby sterylnej w ilości 150 g (mąda średnia) dodawano: pył w dawkach 5,0; 7,0; 10,0 g, ponadto po 1 g KH_2PO_4 i K_2HPO_4 , 25 ml zawiesiny kultury szczepu *Mycobacterium* 5a o pH 5,0 i zmętnieniu 0,58, co odpowiadało około 14,7 mg suchej masy komórek. Do gleby dodawano jednocześnie zawiesinę grzybni szczepu testowego *Penicillium*. Kontrolę stanowiła gleba bez dodatku pyłu i zainfekowana tylko przez szczep *Penicillium*. Po dziesięciu i trzydziestu dniach inkubacji oznaczano wzrost grzybni. Glebę z rozcieńczenia 10^{-4} i 10^{-6} wysiewano na pożywkę stałą Martina [9], na której liczono kolonie grzyba.

WYNIKI

Oprócz zmian chemicznych i związanej z nimi przyswajalności metali z pyłu, mogą drobnoustroje wpływać na jego aktywność przez oddziaływanie na strukturę; bardzo istotne bowiem znaczenie ma możliwość sorpcji i kumulowania pyłu na powierzchni komórek. Wskutek tego obniża się toksyczność pyłu; taki efekt uzyskano ze szczepem *Mycobacterium* 5a.

Zaobserwowano, że po połączeniu kultury bakterii z pyłem zmieniał on swoją strukturę z pylistej na kłaczkowatą (ryc. 1). Zjawisko to zachodziło jednak tylko w obecności fosforanów w podłożu. Mechanizm tego zjawiska przedstawia się prawdopodobnie następująco: kwaśny fosforan z pożywki tworzy trudno rozpuszczalne sole z metalami z pyłu i w tej postaci jest on sorbowany przez komórki bakterii. Dzięki temu zawartość fosforu zmniejszała się w supernatancie, natomiast zwiększała się w osadzie, który składał się z masy komórek bakterii i związanego z nimi pyłu. Poziom fosforu w osadzie wzrastał przy podnoszeniu dawki pyłu (ryc. 2). Pomiędzy liczbą komórek bakterii a ilością fosforu istniała więc prosta zależność, co potwierdziło założenie o sorpcji pyłu skompleksowanego z fosforanami.

Przy zmianie struktury pyłu zmieniały się też jego właściwości: tracił on zdolność przywierania do szkła, która zaznaczyła się bardzo silnie w kontroli oraz w przypadku inkubowania z bakteriami, które nie powodowały zjawiska skłacznania pyłu. Równocześnie ze zmianą struktury pyłu spadała jego toksyczność mierzona testem biologicznym *Penicillium* (ryc. 3). Stopień skłacznania zależał od liczby komórek bakterii; zaczynając od 1,0 ml zawiesiny, zawierającej komórki w ilości odpowiadającej około 0,28 mg suchej masy, zachodziła wyraźna zmiana struktury



Ryc. 1. Oddziaływanie szczepu *Mycobacterium* 5a na strukturę pyłu w pożywce płynnej

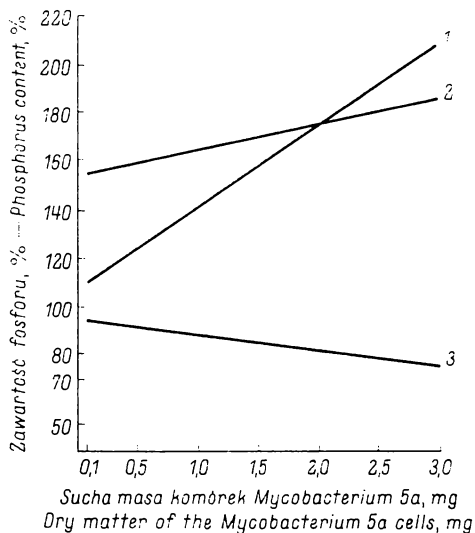
1 — kontrola — zawiesina pyłu w pożywce bez komórek bakteryjnych, 2 — zawiesina pyłu w pożywce płynnej po dodaniu kultury bakterii

Fig. 1. Effect of *Mycobacterium* 5a strain on the dust structure in the liquid medium

1 — dust suspension in the medium without bacterial cells, 2 — dust suspension in the medium after introduction of bacterial culture

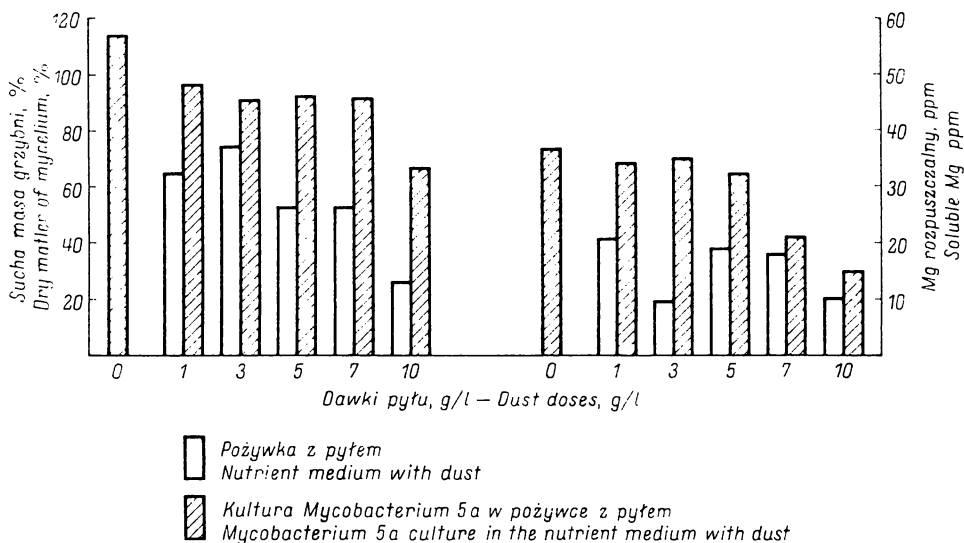
pyłu w ilości 7 g na litr pożywki. Stwierdzono zależność tego zjawiska od wieku kultury bakterii, które najwyraźniej wystąpiło po trzech dniach inkubacji, a po siedmiu kłaczkę zaczynały się rozpadać (ryc. 4). 3-dniowa kultura bakterii, inkubowana bez pyłu i dodawana do pożywki z pyłem, również zmieniała jego strukturę po kilku minutach kontaktu. Najwyraźniejszy efekt dawała cała kultura, natomiast same komórki działały słabiej. Płyn pochodzący również wykazywał tendencję do tworzenia kłaczek, ale w mniejszej ilości i mało trwałych.

Szczep *Mycobacterium* 5a zakwaszał środowisko i zwiększał rozpuszczalność metali mierzoną ilością rozpuszczalnego magnezu. Ilość ta wzrosła w czasie inkubacji bakterii (ryc. 5), ale nie miało to ujemnego wpływu na wzrost grzyba *Penicillium*. Przyczyną był prawdopodobnie fakt, że substancje o charakterze kwaśnym, produkowane przez szczep bakterii, nie były związkami pokarmowymi pobieranymi przez komórki grzyba, nie chelatowały z metalami i nie przenikały do komórek grzy-



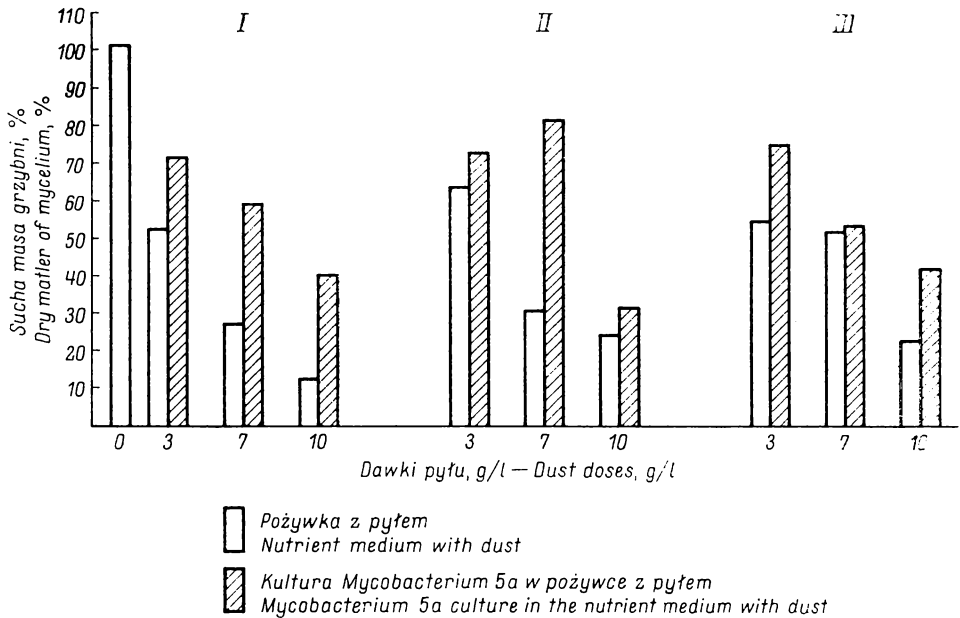
Ryc. 2. Zawartość fosforu w komórkach bakterii szczepu *Mycobacterium 5a*
 1 — sucha masa grzybni *Penicillium*, 2 — fosfor w osadzie, 3 — fosfor w supernatancie

Fig. 2. Phosphorus content in the culture of *Mycobacterium 5a*
 1 — dry matter of *Penicillium* mycelium, 2 — phosphorus in the sediment, 3 — phosphorus in the supernatant



Ryc. 3. Wpływ szczepu *Mycobacterium 5a* na rozpuszczalność Mg w pożywce płynnej

Fig. 3. Effect of *Mycobacterium 5a* strain on the solubility of Mg in the medium with dust



Ryc. 4. Wpływ szczepu *Mycobacterium 5a* na toksyczność pyłu zależnie od wieku komórki

I — bezpośrednio po wprowadzeniu inokulum, II — po trzech dniach inkubacji, III — po siedmiu dniach inkubacji

Fig. 4. Effect of *Mycobacterium 5a* on the dust toxicity depending on its incubation time

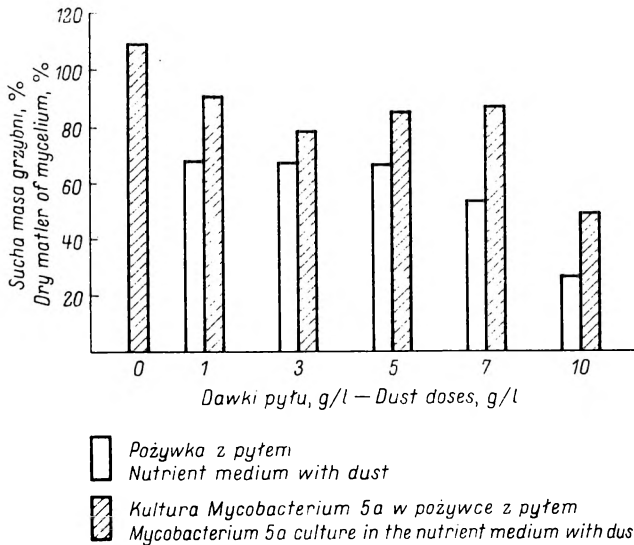
I — after introduction of the inoculum, II — after 3 days of incubation, III — after 7 days of incubation

ba *Penicillium* [4]. Nie udało się jednak oznaczyć metabolitów o odczynie kwaśnym produkowanym przez *Mycobacterium 5a*.

Wynik próby obniżenia toksyczności pyłu przez szczep *Mycobacterium 5a* w glebie był podobny jak w pożywce płynnej, tzn. spadała jego toksyczność dla testowego grzyba (ryc. 6). Zjawisko to było wyraźniejsze po dziesięciu dniach inkubacji niż po upływie trzydziestu dni; po tym okresie zanikanie toksyczności obniżyło się i było widoczne tylko przy najwyższej dawce pyłu (ryc. 7). Należy jednak zaznaczyć, że używano gleby sterylizowanej, o obniżonej biologicznej konkurencyjności w stosunku do inkubowanej w niej kulturze *Mycobacterium 5a*.

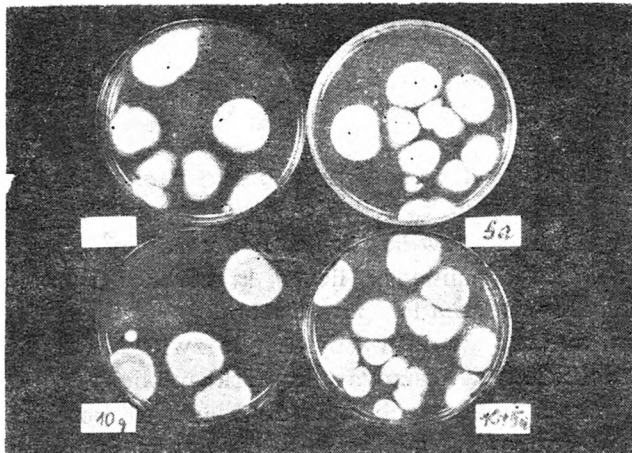
Podsumowując wyniki stwierdzono co następuje:

— Szczep bakterii *Mycobacterium 5a* zakwaszał środowisko hodowlane i zwiększał rozpuszczalność metali zawartych w pyłe; nie przyczyniło się to jednak do zwiększenia ich toksyczności dla testowego szczepu *Penicillium*, ponieważ kwaśne metabolity bakteryjne nie stanowiły źródła pokarmu dla jego komórek i nie powodowały niespecyficznego pobierania metali.



Ryc. 5. Wpływ szczepu *Mycobacterium 5a* na toksyczność pyłu w pożywce płynnej; kontrolę bezwzględną stanowił wzrost grzybni w pożywce (100%)

Fig. 5. Effect of *Mycobacterium 5a* on the dust toxicity in the liquid medium; as control (100%) was used the growth of the mycelium in the medium

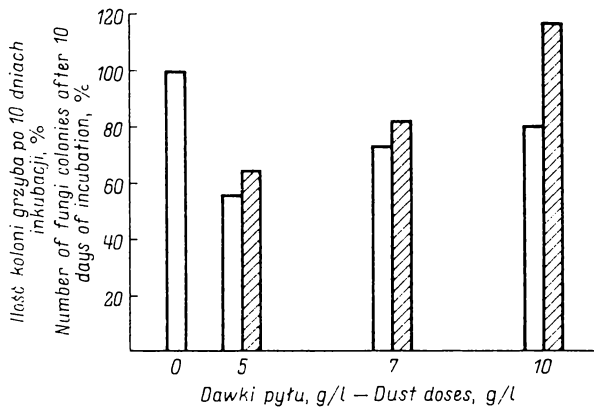


Ryc. 6. Wpływ pyłu na wzrost szczepu testowego *Penicillium* w glebie

K — gleba + *Penicillium*, 5a — gleba + *Mycobacterium* + *Penicillium*, 10g — gleba + 10 g pyłu + *Penicillium*, 10 + 5a — gleba + 10 g pyłu + *Mycobacterium* + *Penicillium*

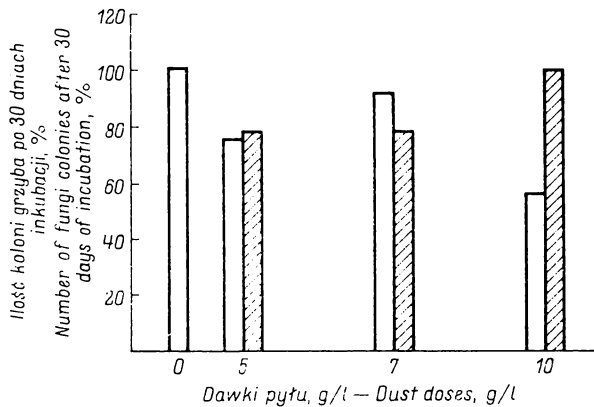
Fig. 6. Effect of the dust on the growth of *Penicillium* strain in the soil

K — soil + *Penicillium*, 5a — soil + *Mycobacterium* + *Penicillium*, 10g — soil + 10 g of the dust + *Penicillium*, 10 + 5a — soil + 10 g of the dust + *Mycobacterium* + *Penicillium*



Ryc. 7. Wpływ szczepu *Mycobacterium 5a* na toksyczność pyłu w glebie; kontrolę bezwzględną stanowił wzrost grzybni w glebie

Fig. 7. Effect of *Mycobacterium 5a* on the dust toxicity in the soil; as control (100%) was used the growth of the mycelium in the soil



□ Gleba z pyłem
Soil with dust

▨ Kultura *Mycobacterium 5a* w glebie z pyłem
Mycobacterium 5a culture in the soil with dust

— Zmiana struktury fizycznej pyłu dzięki skompleksowaniu z fosforanami i sorpcji na komórkach bakteryjnych przyczyniła się do unieruchomienia pyłu i stanowiła czynnik obniżający jego toksyczność. Stwierdzono zależność pomiędzy liczbą komórek i ilością pyłu, która mogła być zaadsorbowana na ich powierzchni.

— Zjawisko zmiany struktury pyłu było związane z wiekiem komórek bakterii; zdolność tę wykazywały komórki młode.

— W warunkach glebowych opisane zjawisko przebiega podobnie, komórki bakterii zachowały zdolność do redukcji toksyczności pyłu.

*

Diagnostyka użytego szczepu bakterii została przeprowadzona przez doc. dr hab. Zofię Krężek, za co autorki składają podziękowanie.

LITERATURA

- [1] Babich H., Stotzky G. Physiochemical factors of natural reservoirs effect the transformation and exchange of heavy metals toxic to microbe. Environ. Biogeochemistry Ecol. Bull. (Stockholm) 1983 t. 35 s. 315—325.
- [2] Badura L. Rozważania nad stopniem zanieczyszczenia gleb emisjami przemysłowymi i wynikającymi stąd implikacjami ekologicznymi. Post. Mikrob. 1984 t. 23 nr 2 s. 31—62.
- [3] Balicka N., Węgrzyn T., Teichert E., Strojek Z. Biotransformation of some pollutants by soil bacteria. IXth Meetings of Soil Biology and Soil Conservation, Sopron, 27—30 August 1985 (w druku).
- [4] Chmielowski J., Kłapcińska B. Mechanizm pobierania metali przez drobnoustroje. Post. Mikrob. 1984 t. 23 nr 2 s. 61—90.
- [5] Erhrich H. L. How microbes cope with heavy metals, arsenic and antimony in their environment. Chapter 10. Microbial life in extreme environment, ed. D. J. Kusher, Acad. Press. London 1987.
- [6] Gadd G. M., Griffiths A. Y. Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecology 1978 No. 4 p. 303—317.
- [7] Griffiths A. Y., Hughes M. A., Thomas D. Some aspects of microbial resistance to metal pollution. Int. Symp. Minerals and the Environ. London 1974 Paper 24 p. 1—8.
- [8] Lester N., Perry R., Gadd A. H. The influence of heavy metals on a mixed bacterial population on sewage origin in the chemostat. Water Research, Pergamon Press LTD, Great Britain 1979 Vol. 13 p. 1055—1063.
- [9] Martin J. P. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate. Soil Sci. 1950 Vol. 69 p. 215—233.
- [10] Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H. Zarys chromatografii cienkowarstwowej. PWRiL, Warszawa 1971.
- [11] Sterritt R. M., Lester J. N. Interactions of heavy metals with bacteria. Sci. Total Environ. 1980 Vol. 14 p. 5—17.
- [12] Tyler G. Heavy metals in soil biology and biochemistry. w: Soil Biochemistry, ed E. A. POUL, J. W. LADD, M. DEKKER, New York, Basel 1981 Vol. 5 p. 317—414.
- [13] Zgirski A. Pol. Tyg. Lek. 1965 t. 5 s. 171. W: Ćwiczenia z biochemii, red. W. Leyko, rozdz.: Oznaczanie fosforu nieorganicznego w surowicy krwi metodą chlorku cynawego.

Н. БАЛИЦКА, Т. ВЕНГЖИН, Э. ТЕЙХЕРТ

СНИЖЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПЫЛЕЙ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Кафедра агромикробиологии Сельскохозяйственной академии
во Вроцлаве

Резюме

Рассматривается способность почвенных бактерий снижать токсичность промышленных пылей содержащих большие количества тяжелых металлов, а также механизм этого явления. Такой способностью отличается штамм *Mycobacterium 5a*, который изолировали

из загрязненной указанными пылями почвы. Снижение токсичности пылей в питательной среде и в почве определяли на основании интенсивности роста штамма *Penicillium* с высокой восприимчивостью к металлам. Штамм *Mycobacterium* 5a снижал pH почвы до 5,5–6,0, в связи с чем повышалась растворимость тяжелых металлов, токсичность которых при этом не повышалась. Причина этого заключалась в том, что кислые бактериальные метаболиты не усваивались клетками гриба и таким образом не вводили в них металлов, даже в случае их комплексования.

Бактерийные культуры *Mycobacterium* 5a изменяли пылеватую структуру на хлопьевидную. Это явление наблюдалось только при наличии фосфатов в среде. Комплекс фосфатов с металлами абсорбировался клетками бактерий, вследствие чего снижалась токсичность пылей. Молодые бактериальные культуры (3-дневные) были более эффективными, чем старшие (7–10-дневные), а число клеток показывало связь с количеством пылей.

Штамм *Mycobacterium* 5a удерживал свою способность снижать токсичность пылей в условиях почвенной среды.

H. BALICKA, T. WĘGRZYN, E. TEICHERT

REDUCTION OF TOXICITY OF INDUSTRIAL DUSTS UNDER THE SOIL BACTERIA EFFECT

Department of Agricultural Microbiology, Agricultural University of Wrocław

Summary

The ability of soil bacteria to reduce the toxicity of industrial dusts containing great amounts of heavy metals, is presented and analyzed in the paper. It was *Mycobacterium* 5a strain isolated from soil contaminated with industrial dusts, which distinguished itself with such an ability. The toxicity reduction of dusts in the nutrient medium and soil was determined on the basis of the growth intensity of a *Penicillium* strain highly susceptible to metals. The *Mycobacterium* 5a strain lowered the pH value of soil to 5.5–6.0 and thus increased the solubility of heavy metals without any increase of their toxicity. This was caused probably by the fact that acid metabolites of bacteria were not taken up by the fungus cells and thus did not introduce the metals with them, even in case of their complexation.

Bacterial cultures of *Mycobacterium* 5a strain changed the dusty structure into flaky one. This phenomenon was observed only at the presence of phosphates in the medium. The complex of phosphates with metals was absorbed by the bacterial cells, in consequence of which the toxicity of dusts decreased. The young (3-day) cultures appeared to be more effective than older (7–10-day) ones, while the number of cells was related to the amount of dusts.

The *Mycobacterium* 5a strain maintained its ability to reduce the toxicity of industrial dusts under soil medium conditions.

Prof. dr Natalia Balicka
Katedra Mikrobiologii
Rolniczej AR
Wrocław, ul. Norwida 25