

## Vplyv ťažkých kovov na pôdnu mikroflóru

Igor Štyriak<sup>1</sup>, Terézia Szabová<sup>2</sup>, Andrea Alačová<sup>3</sup>, Mária Koščová<sup>2</sup>, Iveta Štyriaková<sup>3</sup>

### *The influence of heavy metals on soil microflora*

*The aim of our contribution was to ascertain an influence of heavy metals on quantitative and qualitative composition of soil microflora. Our experiment was directed to quantitative isolation of culturable bacteria from individual soil samples and to the comparison of the amounts and colony morphology of the isolates from various soil samples. These soil samples were characteristic by a difference in pH, heavy metals and humus contents. Despite the differences between individual soil samples, the most of bacterial isolates were represented by Bacillus genus (especially Bacillus cereus and Bacillus mycoides) which belongs to the heavy metal resistant bacterial kinds.*

**Key words:** Bacillus, soil microflora, heavy metals, chromium, cadmium, nickel, cuprum, zinc, lead.

### Úvod

Pôda je, popri ovzduší a vode, tretia najdôležitejšia zložka životného prostredia. V ekologickom systéme zaujíma pôda významné miesto ako jeden z nenahraditeľných prírodných zdrojov a ako základ potravinového reťazca človeka. Neoddeliteľnou súčasťou pôdy je organický podiel, ktorý významne ovplyvňuje pôdne vlastnosti. Organickú hmotu tvorí živá zložka, tzv. pôdny edafón a neživá – pôdny humus. Prítomnosť obidvoch zložiek je navzájom podmienená, pretože živé organizmy formujú organickú hmotu a táto je nevyhnutným zdrojom energie a živín pre živé organizmy. Humus má význam pri formovaní chemických vlastností, zvyšovaní pufracej schopnosti pôd a tiež na vytvorení zásob biogénnych prvkov.

V dôsledku antropogénnej činnosti sa dostáva do pôd veľké množstvo kontaminantov, z ktorých najvýznamnejšie sú ťažké kovy, ktoré kontaminujú rastlinnú produkciu, ale pôsobia aj na kvalitatívne a kvantitatívne zloženie pôdneho edafónu. Tým, že pôdne mikroorganizmy citlivo reagujú na prítomnosť toxických prvkov v prostredí, môžu slúžiť aj ako indikátor jeho znečistenia.

Cieľom práce bolo zistiť vplyv ťažkých kovov na kvantitatívne a kvalitatívne zloženie pôdnej mikroflóry.

### Materiál a metodika

Vzorky pôd kontaminovaných ťažkými kovmi po aplikácii čistiarenských kalov, ako aj pôdne vzorky zo stredného Spiša, kde sa prejavuje kontaminácia ťažkými kovmi v dôsledku antropogénnej činnosti, sme vysušili, preosiali cez sito o priemere ok 2 mm. Takto pripravené vzorky sme použili na stanovenie pH, obsahu humusu a ťažkých kovov. Ťažké kovy sme stanovili podľa platnej metodiky vo výluhu 2 M HNO<sub>3</sub>.

Na izoláciu kultivovateľných baktérií z jednotlivých pôd a ich kvantitatívne stanovenie sme použili živný agar č.2 (Imuna, Šarišské Michaľany), ktorý je bohatý na organické živiny a je vhodnou živnou pôdou pre mnohé heterotrofné bakteriálne druhy. Pri izolácii baktérií sme postupovali nasledovným spôsobom: navážili sme 0,5 g z každej pôdnej vzorky a pridali sme 5 ml fyziologického roztoku s obsahom 0,1 % želatíny. Takto zriedené vzorky pôd sme nechali stáť dve hodiny, počas ktorých sme vzorky niekoľkokrát intenzívne premiešali. Po dvoch hodinách sme vzorky scentrifugovali a supernatant sme naočkovali na povrch agarových platní (po 0,4 ml na každú agarovú platňu). Po kvantitatívnom naočkovaní supernatantu na jednotlivé agarové platne a 24. hodinovej kultivácii platní pri izbovej teplote sme spočítali vyrastené bakteriálne kolónie. Podľa počtu narastených kolónií sme zistili celkový počet kultivovateľných baktérií (okrem anaeróbov) na 1 g príslušnej pôdy. Na rozdelenie mikroorganizmov sme použili farbenie podľa Grama. Týmto farbením je možné zistiť okrem morfológie bakteriálnych buniek aj to, či sa jedná o grampozitívne alebo gramnegatívne baktérie, čo je veľmi dôležité pre identifikáciu jednotlivých baktérií.

Na druhovú identifikáciu sme vybrali tri morfológicky rozdielne bakteriálne kolónie, ktoré sme identifikovali na základe výsledku 30 biochemických reakcií pomocou identifikačných panelov firmy Becton-Dickinson (Cockeysville, USA) po ich kultivácii na Columbia agare (Becton-Dickinson) podľa inštrukcií výrobcu.

Následne sme zisťovali, aké baktérie sa nám podarilo z jednotlivých pôdnych vzoriek vykultivovať. Vychádzali sme pritom z rozdielnej morfológie bakteriálnych kolónií narastených na agarových platniach. Z každého druhu bakteriálnej kolónie sme urobili preparát, ktorý sme zafarbili metódou podľa Grama.

<sup>1</sup> MVDr. Igor Štyriak, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej ul. 21, Košice

<sup>2</sup> Doc. Ing. Terézia Szabová, CSc. a RNDr. Mária Koščová, Katedra mineralurgie a environmentálnych technológií F BERG Technickej univerzity v Košiciach, Letná 9, 042 00 Košice

<sup>3</sup> Ing. Andrea Alačová a Ing. Iveta Štyriaková, PhD., Ústav geotechniky SAV, Watsonova 45, Košice  
(Recenzované 16.7.2002)

## Výsledky a diskusia

Obsahy ťažkých kovov v pôdach, pH/KCl a obsah humusu uvádzame v tabuľke 1 a počty jednotlivých druhov bakteriálnych kolónií po kultivácii na živnom agare č.2 v tabuľke 2. Z uvedených údajov je tiež vidieť, že nám narástlo sedem morfológicky rozličných druhov kolónií. Na základe farbenia podľa Grama sme zistili, že sa nám podarilo vykultivovať prevažne grampozitívne baktérie, ktoré sú všeobecne odolnejšie voči vyšším koncentráciám ťažkých kovov v prostredí ako gramnegatívne bakterie. Spomedzi grampozitívnych baktérií veľkú väčšinu tvorili baktérie rodu *Bacillus*.

Tab.1. Agrochemické charakteristiky a obsahy ťažkých kovov v pôdach.  
Tab.1. Agrochemical properties and heavy metal contents in soils.

Číslo vzorky	Množstvo ťažkých kovov v pôde [mg.kg <sup>-1</sup> ]						Σ baktérií na 1 g pôdy	pH/KCl	Obsah humusu [%]
	Cr	Cd	Ni	Cu	Zn	Pb			
1.	2,70	-	08,00	13,9	052,00	062,10	3505	6,80	3,60
2.	4,30	0,20	10,40	22,9	129,00	260,00	3090	6,65	5,14
3.	5,50	-	11,20	28,8	157,00	348,10	0955	6,40	4,45
4.	3,80	0,70	08,70	15,7	093,00	236,80	1180	6,30	3,36
5.	4,40	0,20	15,50	21,3	090,00	185,90	1995	5,40	3,96
6.	4,20	0,30	15,70	22,3	146,90	026,50	2765	6,40	3,50
7.	4,50	0,40	10,50	49,6	454,00	046,90	4125	6,20	3,50
8.	7,10	0,70	10,10	49,6	846,00	072,50	1850	6,30	4,36
9.	7,50	0,60	11,30	65,8	876,50	103,40	2670	6,55	3,24
10.	2,60	-	07,10	10,5	023,00	017,20	5455	5,85	3,34
11.	2,45	0,15	02,60	30,4	007,65	015,35	2590	4,95	2,30
12.	3,05	0,10	02,10	23,5	007,85	014,15	2595	4,10	1,90
13.	3,35	0,15	02,65	21,8	007,15	015,40	0965	4,40	2,00
14.	4,20	0,10	04,85	30,7	030,00	020,05	0600	4,00	1,80

Legenda: Σ - celkový počet - nebolo detekované

Tab.2. Počty bakteriálnych kolónií po kultivácii na živnom agare č.2.  
Tab.2. The amounts of bacterial colony after cultivated on agar 2.

Por. číslo	Počet jednotlivých druhov bakteriálnych kolónií							Σ baktérií na 1 g pôdy
	naj <	malá	veľká	naj >	rozvetvená	tuhá	nepravidelná	
1.	0	1976	1345	0	185	0	0	3505
2.	0	1550	0805	0	435	0	0	3090
3.	0	0700	0235	0	020	0	0	0955
4.	270	0355	0370	180	005	0	0	1180
5.	640	0795	0445	070	045	0	0	1995
6.	0	1730	0935	0	100	0	0	2765
7.	0	2400	1515	0	210	0	0	4125
8.	0	0825	0935	0	090	0	0	1850
9.	0	1120	1335	0	215	0	0	2670
10.	0	4255	0800	0	400	0	0	5455
11.	0	1445	1035	0	070	0	040	2590
12.	0	1665	0540	0	035	15	340	2595
13.	0	0605	0285	0	015	0	060	0965
14.	0	0400	0160	0	015	10	015	0600

Legenda: Σ - celkový počet naj < - najmenšia naj > - najväčšia

Tri morfológicky rozdielne kolónie (s najväčším zastúpením v našich vzorkách) sme identifikovali pomocou diagnostického systému Becton-Dickinson (USA) a zistili sme, že väčšinu narastených baktérií (tvoriace dva druhy kolónií označené ako malé a veľké, ktoré mali najväčšie zastúpenie v našich vzorkách) predstavoval druh *Bacillus cereus* a rozvetvené kolónie boli identifikované ako druh *Bacillus mycoides*.

Pri hodnotení účinku ťažkých kovov na populáciu mikroorganizmov v prírodných podmienkach je potrebné sledovať účinky ťažkých kovov na počty mikroorganizmov a rozmanitosť druhov. Táto druhová rozmanitosť sa dá najmä u baktérií veľmi dobre sledovať na základe morfológie bakteriálnych kolónií, čo sme využili aj v našich experimentoch, kde sme porovnávali mikrobiálne populácie z kontrolných pôd oproti pôdam s výraznejšou kontamináciou ťažkými kovmi. Druhou možnosťou, ktorá sa dá pri takomto hodnotení využiť, je porovnanie určitej aktivity, či už metabolickej alebo enzymatickej, ktorá indikuje zastúpenie mikrobiálnych

druhov vyznačujúcich sa príslušnou aktivitou v sledovaných pôdach (Beneš, Fabiánová, 1987). Najpresnejšou a v poslednom období najrozšírenejšou metódou detekcie mikroorganizmov v pôdach je detekcia pomocou PCR (polymerázovej reťazovej reakcie), pretože bolo dokázané, že menej ako 1% baktérií nachádzajúcich sa v pôde môže narásť na bežných kultivačných médiách (Amann a kol., 1995).

Rovnaká koncentrácia kovu môže v rôznych prípadoch pôsobiť na pôdne mikroorganizmy odlišne. Podobná tendencia sa prejavila aj v našich výsledkoch, kde pri približne rovnakej kontaminácii pôd ťažkými kovmi je vidieť rozdielne zastúpenie množstva baktérií na 1 g pôdy. Vysvetlenie možno hľadať v agrochemických vlastnostiach pôd, hlavne pH a obsahu humusu, ktoré významne ovplyvňujú kvantitatívne a kvalitatívne zloženie pôdneho edafónu. U vzoriek 11 – 14 (Stredný Spiš) sme zaznamenali iba 965, resp. 600 baktérií na 1 g pôdy, ale pôdy sú veľmi kyslé s nízkym obsahom humusu. Naproti tomu vo vzorkách pôd aj s vyšším zastúpením ťažkých kovov, pri priaznivom pH a obsahu humusu, pozorujeme niekoľkonásobne vyššie množstvo baktérií na 1 g pôdy.

Vplyv ťažkých kovov na vývoj a aktivitu pôdnej mikroflóry popísali MALLISEWSKA a kol. (1985). Uvedení autori zistili, že zmes ťažkých kovov znižovala mikrobiálnu aktivitu omnoho viac ako sledované prvky jednotlivo. Relatívna toxicita použitých zlúčenín klesala v poradí:

Hg (kovová) > CuSO<sub>4</sub> > HgCl<sub>2</sub> > HgO > As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> > ZnSO<sub>4</sub> > NaHSO<sub>4</sub> > Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Zo sledovaných organizmov boli najodolnejšie voči všetkým použitým kovom huby a aktinomycéty.

Podľa (Konopka a kol., 1999), krátkodobá odozva na kontamináciu ťažkými kovmi sa prejavuje veľkou redukciou mikrobiálnej aktivity, avšak aj dlhodobá odozva poukazuje na nižšie počty mikroorganizmov ako aj zníženú mikrobiálnu aktivitu v kontaminovaných pôdach. Autori sa zamerali najmä na pôdy kontaminované olovom, z ktorých sa im podarilo vyizolovať iba Pb-rezistentné grampozitívne baktérie rodu *Bacillus*, koryneformné baktérie a aktinomycéty. Celkové množstvo mikrobiálnej biomasy, metabolický potenciál a druhové zastúpenie boli výrazne nižšie v oboch kontaminovaných pôdach než v nekontaminovanej pôde. Pôvodne sa predpokladalo, že rezistencia získaná pre jeden kov sa neuplatňuje voči inému kovu (Whitton, Shehata, 1982). V súčasnej dobe však bolo zverejnených veľa dôkazov o tom, že jeden a ten istý organizmus môže byť rezistentný k olovu, prípadne i viacerým kovom. U pôdnych mikroorganizmov je častá rezistencia na kombinácie (Cd + Pb), (Zn + Pb), (Zn + Cd).

Vplyv Zn, Ni a Cu (v koncentráciách 400, 150 a 3 mg.kg<sup>-1</sup>) na pôdne mikroorganizmy a ich činnosť uvádza (Podlešáková a kol., 1998). Stanovené počty mikroorganizmov poukázali na vplyv a kvalitu pôdnych typov na počty mikroorganizmov. Výrazné zníženie počtu baktérií a aktinomycét zo sledovaných prvkov vyvolala aplikácia zinku na regozemi, luvizemi, kambizemi a gleji. U mikromycét pôsobila inhibične aplikácia zinku a niklu na nevápnené regozeme a aplikácia Cd a Ni na vápnené a nevápnené kryptopodzoly. Nepriaznivý vplyv na počty *Azotobacteria* mala hlavne aplikácia zinku u regozeme. Vápnenie má na zvýšenie počtu aeróbných baktérií a aktinomycét výrazný vplyv najmä u regozemí, kryptopodzolov a glejov, teda u pôd s nízkou pufrácnou schopnosťou a kyslým pH, ktoré ovplyvňuje zloženie pôdneho edafónu.

Obsahy ťažkých kovov sa môžu v pôdach postupne kumulovať, a preto množstvo a aktivita mikroorganizmov môže byť v dôsledku toho veľmi závažne ovplyvnené. Aplikáciou organických hnojív a pravidelným vápnením možno tento vplyv čiastočne eliminovať.

### Záver

Z našich experimentálnych výsledkov možno urobiť nasledovné závery:

1. Počty bakteriálnych kolónií potvrdili negatívny vplyv zvýšenej koncentrácie ťažkých kovov na kvalitu a druhové zastúpenie kultivovateľnej mikroflóry.
2. Väčšinu kultivovateľných baktérií v hodnotených pôdach predstavujú bacily, najmä druhy *Bacillus cereus* a *Bacillus mycoides*.

### Literatúra

- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol.Rev.* 59, 1995, p. 143-169.
- BENEŠ, S., FABIÁNOVÁ, J.: Pôrodné obsahy distribuce prvků v půdách. *Monogr. VSŽ Praha*, 1987, 121-149.
- KONOPKA, A., ZAKHAROVA, T., BISCHOFF, M., OLIVER, L., NAKATSU, C., TURKO, R.F.: Microbial Biomass and Activity in Lead-Contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5), 1995, p. 2256-2259.
- MALLISEWSKA, W., DEC, S., WIERZBICKA, H., WOZNAKOWSKA, A.: The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil microorganisms. *Environm. Poll.*, 37, 1985.
- PODLEŠÁKOVÁ, E., NEMEČEK, J., MACUROVÁ, H.: Indikace zátěží půd rizikovými prvky pomocí mikrobiologických a biochemických metod. *Rostlinná výroba*, 44(9), 1998, s. 409-417.
- WHITTON, B., SHEHATA, F.H.A.: Influence of cobalt, nickel, copper and cadmium on the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Environm. Poll.*, 27, 1982, p. 275-281.