

Prace oryginalne

WPŁYW NIKLU NA WZROST DROBNOUSTROJÓW NA PODŁOŻACH STAŁYCH

Edyta Boros, Jadwiga Wyszowska, Jan Kucharski

Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Abstrakt

W doświadczeniu laboratoryjnym testowano wpływ niklu na wzrost i rozwój w hodowlach stałych bakterii: *Azotobacter* spp., *Arthobacter* spp., *Bradyrhizobium* sp. (lupini) i *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, promieniowców: *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces fumosus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces odoriver* i grzybów: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. Badania każdego gatunku wykonano na 10 izolatach, w trzech powtórzeniach. W doświadczeniu wykorzystano dwa rodzaje podłoży mikrobiologicznych: standardowe oraz wzbogacone w dodatkowe źródło węgla. Nikiel zastosowano w postaci dwóch związków: $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w następujących dawkach: 2, 10, 50, 100, 250 mg $\text{Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$.

W badaniach jednoznacznie wykazano, że bakterie były bardziej wrażliwe na wprowadzany do podłoża nikiel niż promieniowce i grzyby. Spośród badanych bakterii największą wrażliwością na nikiel charakteryzowały się *Azotobacter* spp. i *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, a następnie *Arthobacter* spp. i *Bradyrhizobium* sp. (lupini). Spośród promieniowców najbardziej negatywnie na nikiel dyfundujący z krążka do podłoża reagował *Streptomyces odoriver*. Pod względem negatywnej reakcji na nikiel grzyby można uszeregować następująco: *Rhizopus* spp. < *Penicillium* spp. < *Fusarium* spp. < *Aspergillus* spp.

Słowa kluczowe: nikiel, bakterie, promieniowce, grzyby.

prof. dr hab. Jan Kucharski, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pl. Łódzki, 10 -727 Olsztyn, tel. 089-49-38, e-mail: jan.kucharski@uwm.edu.pl.; Chair of Microbiology, University of Warmia and Mazury, pl. Łódzki, 10-727 Olsztyn, Poland, phone 089-49-38, e-mail: jan.kucharski@uwm.edu.pl.

INFLUENCE OF NICKEL ON THE GROWTH OF MICROORGANISMS IN SOLID MEDIA

Abstract

In laboratory experiments, the influence of nickel on the growth and development of cultures in solid media was tested. The experiments were carried out on bacteria: *Azotobacter* spp., *Arthobacter* spp., *Bradyrhizobium* sp. (lupini) and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, actinomyces: *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces fumosus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces odoriver*, and fungi: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. The experiments were conducted on ten isolates of each species in three replications. Two types of microbiological media were used: standard and enriched with an additional carbon source. Nickel was applied in the form of two compounds: $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, in the following doses: 2, 10, 50, 100, 250 mg $\text{Ni}^{2+} \cdot \text{disc}^{-1}$.

The results of the experiment explicitly indicate that the bacteria proved to be more sensitive to nickel applied to the media than the actinomyces and fungi. Among the tested bacteria *Azotobacter* spp. and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* were the most vulnerable to nickel. Following them were *Arthobacter* spp. and *Bradyrhizobium* sp. (lupini). Among the actinomyces, *Streptomyces odoriver* showed the most negative reaction to nickel diffusing from the disc into the substrate. As regards negative reaction to nickel, fungi can be put in the following order: *Rhizopus* spp. < *Penicillium* spp. < *Fusarium* spp. < *Aspergillus* spp.

Key words: nickel, bacteria, actinomyces, fungi.

WSTĘP

Badania GRABOWSKIEGO i in. (1997) dowodzą, że metale ciężkie mogą obniżać aktywność metaboliczną mikroorganizmów związaną z intensywnością oddychania i szybkością wzrostu. Według tych autorów, oddziaływanie toksyczne metali na drobnoustroje można uszeregować następująco: $\text{Cu} < \text{Pb} < \text{Zn} < \text{Cd} < \text{Hg} < \text{Ni} < \text{Co} < \text{Cr}_{(\text{VI})}$.

Drobnoustroje mogą tolerować obecność ksenobiotyków w zależności od wrodzonych właściwości fizjologicznych. Niektóre mikroorganizmy, cechujące się dużą odpornością, wytworzyły różne mechanizmy obronne, np. zdolność wytwarzania siarkowodoru umożliwiającą wytrącanie niektórych metali ciężkich w postaci trudno rozpuszczalnych siarczków, w wyniku których stężenie jonów rozpuszczonego metalu zmniejsza się do poziomu, który nie wpływa na metabolizm komórki (WHITE i in. 1997). Poza tym różnice w składzie metabolitów drobnoustrojów mają wpływ na reakcje obronne mikroorganizmów, które mogą tworzyć z metalem chelaty lub trwałe osady (BADURA 1999). Ta dezaktywacja może zachodzić zarówno wewnątrz komórek drobnoustrojów, jak i na jej powierzchni. Mechanizm obronny komórki przed metalami ciężkimi może być związany z obecnością odpowiednich plazmidów „R” oraz z oddziaływaniem na zmianę wartościowości jonu metalu (CHMIEŁOWSKI, KŁAPCIŃSKA 1984, BARABASZ i in. 1997). Mikroorganizmy mogą unieszkodliwiać metale ciężkie, zmieniając ich sto-

pień utlenienia lub przeprowadzając je w postać lotną w wyniku metylacji, lub wytwarzając otoczki śluzowe, które zawierając w swoim składzie grupy fosforanowe kwasów obdarzone są ładunkiem ujemnym (CHMIEŁOWSKI 1991, BOSECHER 1997). Przenikanie metali ciężkich do komórek lub adsorpcja na ich powierzchni wpływa na liczebność i aktywność drobnoustrojów.

Celem było określenie wpływu wzrastających dawek dwóch związków niklu wprowadzanych do podłoża na wzrost różnych grup drobnoustrojów.

MATERIAŁ I METODYKA

W doświadczeniu badano wpływ niklu na rozwój drobnoustrojów na podłożach stałych, określając wielkość średnicy stref zahamowania wzrostu (w mm) wokół krążka nasyconego tym metalem. Testowano następujące drobnoustroje: bakterie (*Azotobacter* spp., *Arthobacter* spp., *Bradyrhizobium* sp. (lupini) i *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*), grzyby (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp.), promieniowce (*Streptomyces intermedius*, *Streptomyces fumosus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces odoriver*). Hodowlę drobnoustrojów przeprowadzono na następujących podłożach:

- bakterie: *Azotobacter* spp.: K_2HPO_4 – 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3 g, NaCl – 0,3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2 mg, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2 mg, $CaCO_3$ – 3,0 g, sacharoza – 15,0 g, H_2O – 1 dm³, agar – 7 g, pH – 7–8 (podłoże FENGLEROWEJ 1965), *Arthobacter* spp.: $Ca(H_2PO_4)_2$ – 0,25 g, K_2HPO_4 – 1,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25 g, $(NH_4)_2SO_4$ – 0,25 g, kazeina – 1,0 g, ekstrakt drożdżowy – 0,7 g, glukoza – 1,0 g, agar – 15 g, pH – 7,0 (pożywka MULDERA, ANTHEUMISSE 1963), *Bradyrhizobium* sp. (lupini) i *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: mannitol – 10 g, KH_2PO_4 – 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 g, NaCl – 0,1 g, $CaCO_3$ – 3,0 g, ekstrakt drożdżowy – 0,4 g, H_2O – 1 dm³, agar – 15 g, pH – 6,8 (pożywka YEMB – VINCENT 1970);
- grzyby: KH_2PO_4 – 1,0 g, glukoza – 10 g, pepton – 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 g, róż bengalski – 3,3 cm³ (1% roztwór wodny, agar – 20,0 g, H_2O – 1 dm³, pH – 5,9 (pożywka MARTINA 1950);
- promieniowce: skrobia rozpuszczalna – 10 g, kazeina – 0,3 g, KNO_3 – 2,0 g, NaCl – 2,0 g, KH_2PO_4 – 2,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05 g, $CaCO_3$ – 0,02 g, $FeSO_4$ – 0,01 g, agar – 20,0 g, H_2O – 1 dm³, pH – 7,0 (podłoże Kustera i Willamsa wg PARKINSON i in. 1971).

Badania każdego gatunku (rodzaju) wykonano na 10 izolatach, w trzech powtórzeniach. Doświadczenie przeprowadzono wykorzystując standardowy skład pożywek oraz pożywki o zwiększonym o 50% źródle węgla. Testowane drobnoustroje: *Azotobacter* spp. i grzyby hodowano na skosach agarowych w temp. 28°C przez 48 h, bakterie – 72 h, a promieniowce – 168 h. Nastę-

nie uzyskane hodowle przeszczepiono na skosy z odpowiednią pożywką i ponownie inkubowano w identycznych warunkach. Zmyw ze skosów wykonano za pomocą 5 cm³ 0,85-procentowego wodnego roztworu NaCl. Następnie zmyw w ilości 5 cm³ dodano do schłodzonych właściwych pożywek. Pożywki ze zmywami rozlano na płytki Petriego w ilości 15 cm³. Nikiel w postaci NiCl₂ · 6H₂O i NiSO₄ · 7H₂O umieszczano na krążku bibułowym o średnicy 6 mm pipetą automatyczną w następujących dawkach: 2, 10, 50, 100, 250 µg Ni²⁺ · krążek⁻¹. Na 1 krążek наносono 5 mm³ roztworu.

Na płytki Petriego wraz z odpowiednią pożywką zawierającą testowany izolat drobnoustrojów nakładano po 3 krążki. Hodowlę poddano inkubacji w temp. 28°C. Grzyby hodowano 24 h, promieniowce – 72 h, a bakterie – 48 h. Następnie mierzono średnice stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów przez dyfundujący do podłoża nikiel.

Wyniki opracowano statystycznie posługując się wielokrotnym testem rozstępu Duncana, z wykorzystaniem analizy wariancji trzyczynnikowej. Analizę statystyczną wykonano pakietem Statistica (StatSoft, Inc. 2003).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Z badań wykonanych w warunkach in vitro wynika, że reakcja bakterii: *Azotobacter* spp., *Arthobacter* spp., *Bradyrhizobium* sp. (lupini), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; grzybów: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp.; promieniowców: *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces fumosus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces odoriver* na wzrastające dawki niklu była zróżnicowana w zależności od stopnia zanieczyszczenia podłoża tym metalem, od rodzaju związku chemicznego, w którym on występował, oraz rodzaju podłoża (tab. 1–3). Drobnoustroje wykazały zróżnicowaną wrażliwość na nikiel dyfundujący z krążka do podłoża.

Spośród badanych drobnoustrojów bakterie charakteryzowały się największą wrażliwością na stosowane związki niklu (tab. 1). Wśród nich *Azotobacter* spp. i *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, u których już dawka 2 mg Ni²⁺ · krążek⁻¹ powodowała pojawienie się strefy zahamowania wzrostu. U pozostałych bakterii (*Arthobacter* spp. i *Bradyrhizobium* sp. (lupini)) zahamowanie wzrostu stwierdzono dopiero pod wpływem dawki 10 mg Ni²⁺ · krążek⁻¹. Badania GILLER i in. 1998, GUIBAUD i in. 2005, LOPES i in. 2005, SCHMIDT i in. 2005, DOSANJH, MICHEL 2006, LIHOR i in. 2006 potwierdzają uzyskane wyniki, że nikiel wywołuje duże zmiany w populacji bakterii.

Negatywny wpływ niklu (niezależnie od rodzaju związku chemicznego, w którym on występował) na bakterie, mierzony średnicą stref zahamowania wzrostu, nasilał się wraz ze wzrostem dawki niklu na krążek. Zjawisko takie obserwowano w przypadku podłoży standardowych i wzbogaconych

Tabela 1

Table 1

Średnica stref zahamowania wzrostu bakterii w zależności od związku niklu,
jego dawki i rodzaju podłoża (mm)
Diameters of the zones of inhibited growth of bacteria in relationship to the nickel compound,
its dose and the type of medium (mm)

Dawka Ni ($\mu\text{g} \cdot \text{kra}\ddot{\text{z}}\text{ek}^{-1}$) Ni dose ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (lupini)		<i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		<i>Azotobacter</i> spp.		<i>Arthrobacter</i> spp.	
	rodzaj podłoża – type of medium							
	S	S + C	S	S + C	S	S + C	S	S + C
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$								
2	0	0	10	6	26	30	0	0
10	14	17	17	16	43	37	12	12
50	26	26	28	24	61	52	19	21
100	32	30	33	29	69	58	25	27
250	41	38	40	38	73	64	30	32
<i>r</i>	0.86	0.82	0.88	0.90	0.79	0.86	0.84	0.83
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$								
2	0	0	11	0	32	27	0	0
10	15	16	19	15	45	40	12	12
50	28	26	28	26	62	52	19	21
100	33	31	34	31	69	57	23	26
250	40	37	40	36	72	64	29	33
<i>r</i>	0.82	0.81	0.88	0.80	0.79	0.84	0.84	0.85
NIR _{0.01} LSD _{0.01}	<i>a</i> – 1.01; <i>b</i> – 0.64; <i>c</i> – 0.64; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.43; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.43; <i>b</i> · <i>c</i> – 0.91; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.03		<i>a</i> – 1.34; <i>b</i> – 0.85; <i>c</i> – 0.85; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.89; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.89; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.20; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.68		<i>a</i> – 1.48; <i>b</i> – 0.94; <i>c</i> – 0.94; <i>a</i> · <i>b</i> – 2.09; <i>a</i> · <i>c</i> – 2.09; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.32; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.96		<i>a</i> – 1.13; <i>b</i> – 0.71; <i>c</i> – 0.71; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.59; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.59; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.01; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.25	

S – podłoże standardowe (standard medium),

S + C – podłoże wzbogacone w dodatkowe źródło węgla (medium enriched with an additional carbon source);

NIR dla (LSD for): *a* – dawki Ni (Ni dose), *b* – związku niklu (nickel compound),

c – rodzaju podłoża (type of medium);

r – współczynnik korelacji istotny dla (coefficient of correlation significant at): $p < 0.01$;

$n = 270$

Średnica stref zahamowania wzrostu promieniowców w zależności od związku niklu, jego dawki i rodzaju podłoża (mm)
Diameters of the zones of inhibited growth of actinomycetes in relationship to the nickel compound, its dose and the type of medium (mm)

Dawka Ni ($\mu\text{g} \cdot \text{kra\zka\kern-0.25ex / 1}$) Ni dose ($\mu\text{g} \cdot \text{disc-1}$)	<i>Streptomyces intermedius</i>		<i>Streptomyces odoriver</i>		<i>Streptomyces longisporoflavus</i>		<i>Streptomyces fumosus</i>	
	rodzaj podłoża – type of medium							
	S	S + C	S	S + C	S	S + C	S	S + C
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$								
2	0	0	8	0	0	0	0	10
10	16	12	15	11	16	14	12	14
50	26	21	27	21	28	26	19	24
100	30	25	30	26	32	30	21	30
250	35	32	35	30	38	35	28	35
<i>r</i>	0.78	0.85	0.84	0.81	0.80	0.79	0.83	0.89
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$								
2	0	0	9	0	0	0	0	0
10	15	13	16	13	17	15	14	14
50	26	24	26	23	26	26	20	24
100	30	27	31	25	31	30	23	30
250	36	34	36	31	36	34	28	34
<i>r</i>	0.80	0.82	0.86	0.80	0.78	0.77	0.79	0.80
NIR _{0.01} LSD _{0.01}	<i>a</i> – 1.31; <i>b</i> – 0.83; <i>c</i> – 0.83; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.86; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.86; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.18; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.63		<i>a</i> – 1.53; <i>b</i> – 0.97; <i>c</i> – 0.97; <i>a</i> · <i>b</i> – 2.17; <i>a</i> · <i>c</i> – 2.17; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.37; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 3.07		<i>a</i> – 1.40; <i>b</i> – 0.88; <i>c</i> – 0.88; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.98; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.98; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.25; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.80		<i>a</i> – 1.22; <i>b</i> – 0.77; <i>c</i> – 0.77; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.73; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.73; <i>b</i> · <i>c</i> – 1.10; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 2.45	

S – podłoże standardowe (standard medium),

S + C – podłoże wzbogacone w dodatkowe źródło węgla (medium enriched with an additional carbon source);

NIR dla (LSD for): *a* – dawki Ni (Ni dose), *b* – związku niklu (nickel compound),

c – rodzaju podłoża (type of medium);

r – współczynnik korelacji istotny dla (coefficient of correlation significant at):

$p < 0.01$; $n = 270$

Tabela 3

Table 3

Średnica stref zahamowania wzrostu grzybów w zależności od związku niklu,
jego dawki i rodzaju podłoża (mm)
Diameters of the zones of inhibited growth of fungi in relationship to the nickel compound,
its dose and the type of medium (mm)

Dawka Ni ($\mu\text{g} \cdot \text{krążek}^{-1}$) Ni dose ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$)	<i>Rhizopus</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.		<i>Aspergillus</i> spp.		<i>Fusarium</i> spp.	
	rodzaj podłoża – type of medium							
	S	S + C	S	S + C	S	S + C	S	S + C
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$								
2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	15	15	15	15
100	12	12	16	15	21	19	20	19
250	20	19	24	22	28	27	27	24
<i>r</i>	0.95	0.95	0.94	0.93	0.90	0.90	0.89	0.86
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$								
2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	11	16	14	16	15
100	13	15	15	15	22	19	21	20
250	20	21	24	22	28	25	26	26
<i>r</i>	0.94	0.92	0.95	0.92	0.88	0.89	0.86	0.88
NIR _{0.01} LSD _{0.01}	<i>a</i> – 0.76; <i>b</i> – 0.48; <i>c</i> – 0.48; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.07; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.07; <i>b</i> · <i>c</i> – 0.68; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 1.51		<i>a</i> – 0.65; <i>b</i> – 0.41; <i>c</i> – 0.41; <i>a</i> · <i>b</i> – 0.93; <i>a</i> · <i>c</i> – 0.93; <i>b</i> · <i>c</i> – 0.59; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 1.31		<i>a</i> – 0.91; <i>b</i> – 0.57; <i>c</i> – 0.57; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.28; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.28; <i>b</i> · <i>c</i> – 0.81; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 1.81		<i>a</i> – 0.74; <i>b</i> – 0.47; <i>c</i> – 0.47; <i>a</i> · <i>b</i> – 1.05; <i>a</i> · <i>c</i> – 1.05; <i>b</i> · <i>c</i> – 0.67; <i>a</i> · <i>b</i> · <i>c</i> – 1.49	

S – podłoże standardowe (standard medium),

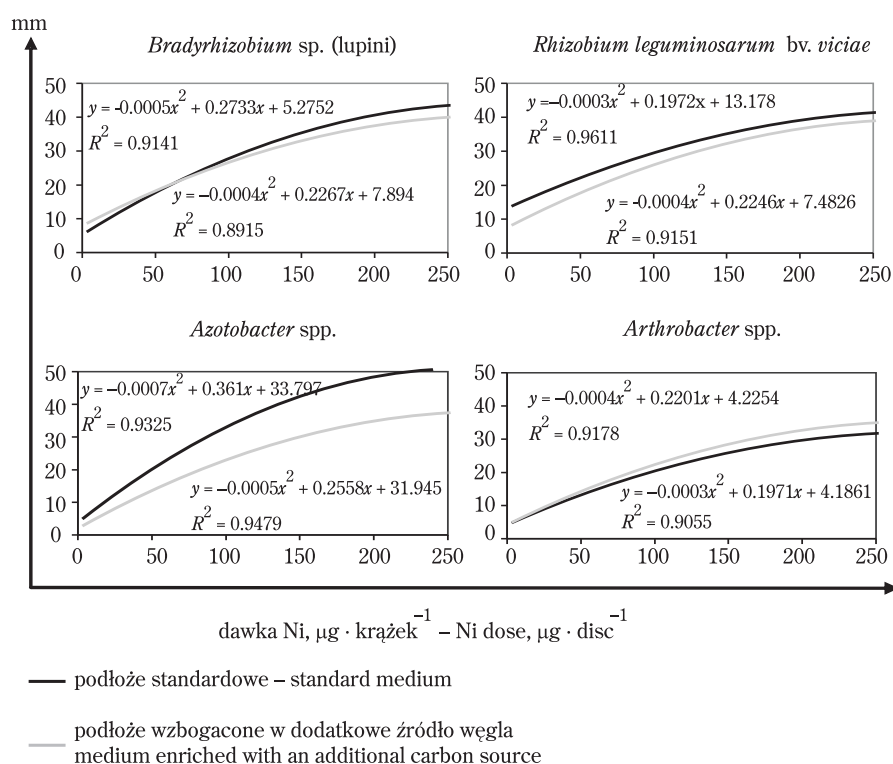
S + C – podłoże wzbogacone w dodatkowe źródło węgla (medium enriched with an additional carbon source);

NIR dla (LSD for): *a* – dawki Ni (Ni dose), *b* – związku niklu (nickel compound),

c – rodzaju podłoża (type of medium);

r – współczynnik korelacji istotny dla (coefficient of correlation significant at):

$p < 0.01$; $n = 270$

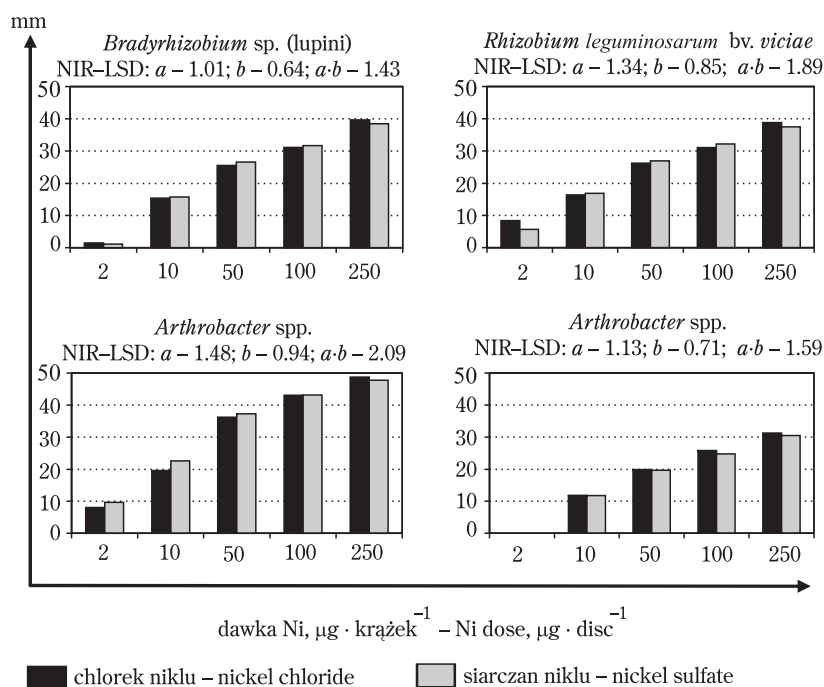


Rys. 1. Średnica stref zahamowania wzrostu bakterii w zależności od rodzaju podłoża i dawki niklu (mm)

Fig. 1. Diameters of the zones of inhibited growth of bacteria in relationship to the type of medium and the dose of nickel (mm)

w dodatkowe źródło węgla (rys. 1). Po aplikacji najwyższej dawki chlorku niklu ($250 \text{ mg Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$), średnice stref zahamowania wzrostu bakterii wynosiły: *Bradyrhizobium* sp. (lupini) – 39,5 mm, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* – 39 mm, *Azotobacter* spp. – 68,5 mm, *Arthrobacter* spp. – 31 mm, a w przypadku siarczanu niklu odpowiednio: 38,5 mm, 38 mm, 68 mm i 31 mm (rys. 2).

Promieniowce, podobnie jak bakterie, okazały się również wrażliwe na nadmierne ilości niklu (tab. 2). Najbardziej negatywnie na nikiel dyfundujący do podłoża z krążka reagował *Streptomyces odoriver*, gdyż już najniższa dawka chlorku i siarczanu niklu ($2 \text{ mg Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$) w przypadku pożywki optymalnej wpływała na nie inhibycyjnie. Na pozostałe promieniowce istotnie negatywnie oddziaływało dopiero stężenie $10 \text{ mg Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$, i w miarę zwiększania dawki niklu pogłębiało się jego toksyczne działanie. Reakcje promieniowców na zanieczyszczenie niklem była negatywna zarówno w hodowlach na podłożu standardowym, jak i wzbogaconym

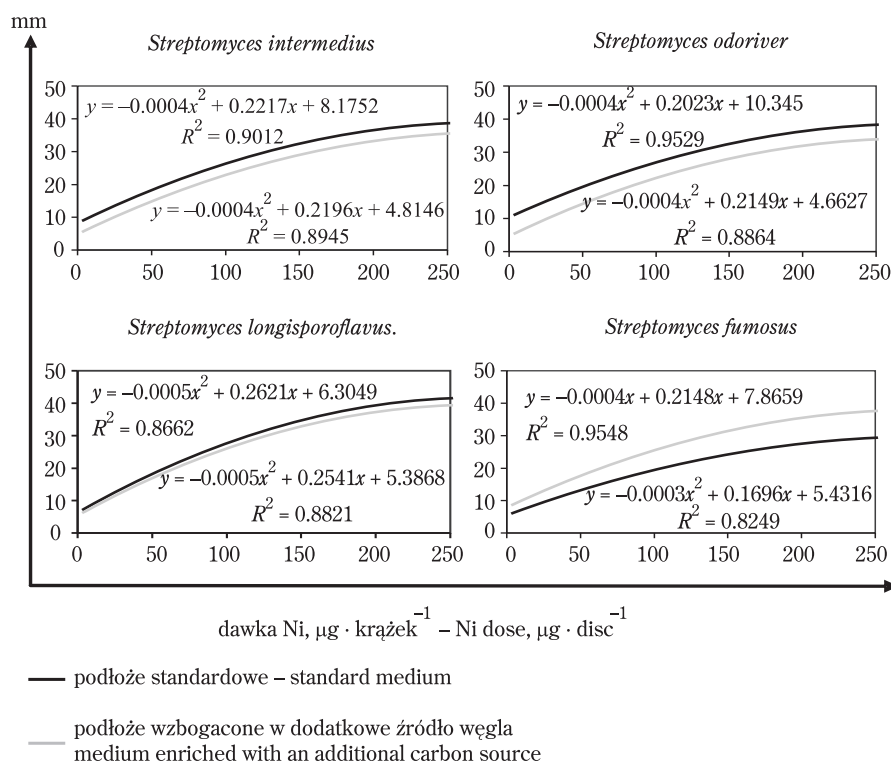


Rys. 2. Średnica stref zahamowania wzrostu bakterii w zależności od związku niklu i jego dawki (mm)

Fig. 2. Diameters of the zones of inhibited growth of bacteria in relationship to the of nickel compound and its dose (mm)

w dodatkową ilość węgla (rys. 3). Przy czym *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces longisporoflavus* oraz *Streptomyces odoriver* nieco lepiej znosiły zanieczyszczenie niklem, gdy rosły na podłożu wzbogaconym w węgiel, natomiast *Streptomyces fumosus* reagował odwrotnie. Jego wzrost był bardziej hamowany przez nikiel dyfundujący z krążka do podłoża wzbogaconego. Na poszczególne gatunki promieniowców, w przeciwieństwie do bakterii, rodzaj dyfundującego związku niklu miał wpływ niewielki (rys. 4). Na *Streptomyces odoriver* i *Streptomyces fumosus* praktycznie nie oddziaływał, natomiast wzrost *Streptomyces intermedius* nieco silniej hamował chlorek niklu, a *Streptomyces longisporoflavus* – siarczan niklu.

Spośród badanych mikroorganizmów grzyby okazały się najmniej wrażliwe na zanieczyszczenie podłoża niklem (tab. 3). Ujemne działanie niklu dyfundującego do podłoża na *Aspergillus* spp. i *Fusarium* spp. zaobserwowano dopiero pod wpływem $50 \text{ mg Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$, a *Rhizopus* spp. i *Penicillium* spp. – $100 \text{ mg Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$. Zależności takie wystąpiły zarówno w przypadku podłoży standardowych, jak i wzbogaconych w węgiel, niezależnie od rodzaju związku niklu. Rodzaj podłoża w niewielkim

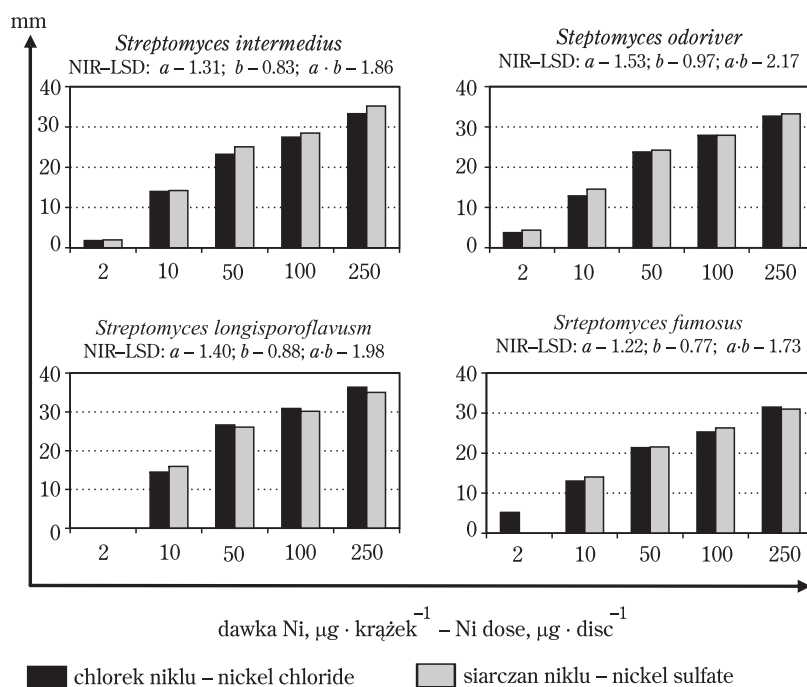


Rys. 3. Średnica stref zahamowania wzrostu promieniowców w zależności od rodzaju podłoża i dawki niklu (mm)

Fig. 3. Diameters of the zones of inhibited growth of actinomyces in relationship to the type of medium and the dose of nickel (mm)

stopniu modyfikował wielkość stref zahamowania wzrostu grzybów (rys. 5). Nieco lepiej wyższe dawki niklu znosiły grzyby (*Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*), rozwijające się na podłożu z obfitszą ilością węgla niż w pożywce standardowej. Pod względem negatywnej reakcji na nikiel grzyby można uszeregować następująco: *Rhizopus* spp. < *Penicillium* spp. < *Fusarium* spp. < *Aspergillus* spp. (rys. 6), przy czym ich wzrost w zasadzie nie zależał od rodzaju związku niklu, lecz przede wszystkim od dawki $\text{Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$.

Według BURGSTALLERA, SCHINNERA (1993), GALUS (1997) oraz MICHALCEWICZ, ŚWIATŁY (2003), grzyby lepiej tolerują zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi niż bakterie. Ich oporność związana jest z wieloma mechanizmami, do których należy m.in. zdolność do biernego lub aktywnego wydalania metali z komórki oraz produkcji znacznej ilości melaniny (SKŁODOWSKA 2000). Według GALUS (1997), niektóre z metali ciężkich mogą stymulować wzrost grzybni (Al, Fe, Mo, Pb), a inne (Cd, Co, Ni, Se) ją hamować.



Rys. 4. Średnica stref zahamowania wzrostu promieniowców w zależności od związku niklu i jego dawki (mm)

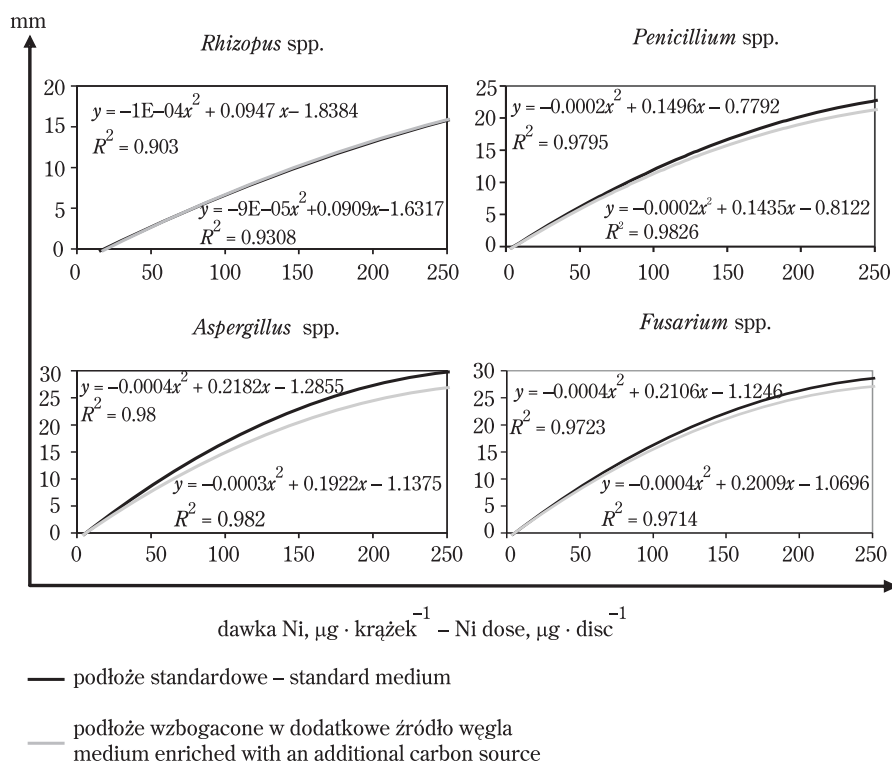
Fig. 4. Diameters of the zones of inhibited growth of actinomycetes in relationship to the nickel compound and its dose (mm)

Z badań jednoznacznie wynika, że bakterie okazały się bardziej wrażliwe na nikiel niż promieniowce i grzyby. Do podobnych wniosków doszła w swoich badaniach WYSZKOWSKA (2002). Stwierdziła, że także chrom(VI) silnie ogranicza wzrost i rozwój bakterii niż promieniowców i grzybów.

WNIOSKI

1. Na podłożach stałych najbardziej wrażliwe na wzrastające dawki chlorku i siarczanu niklu ($2, 10, 50, 100, 250 \text{ mg Ni}^{2+} \cdot \text{krążek}^{-1}$) okazały się bakterie, nieco mniej promieniowce, a najmniej grzyby.

2. Nikiel stosowany zarówno w postaci chlorku, jak i siarczanu niklu wykazał podobne negatywne działanie na wzrost badanych drobnoustrojów. Bakterie okazały się bardziej wrażliwe na chlorek niklu, natomiast w

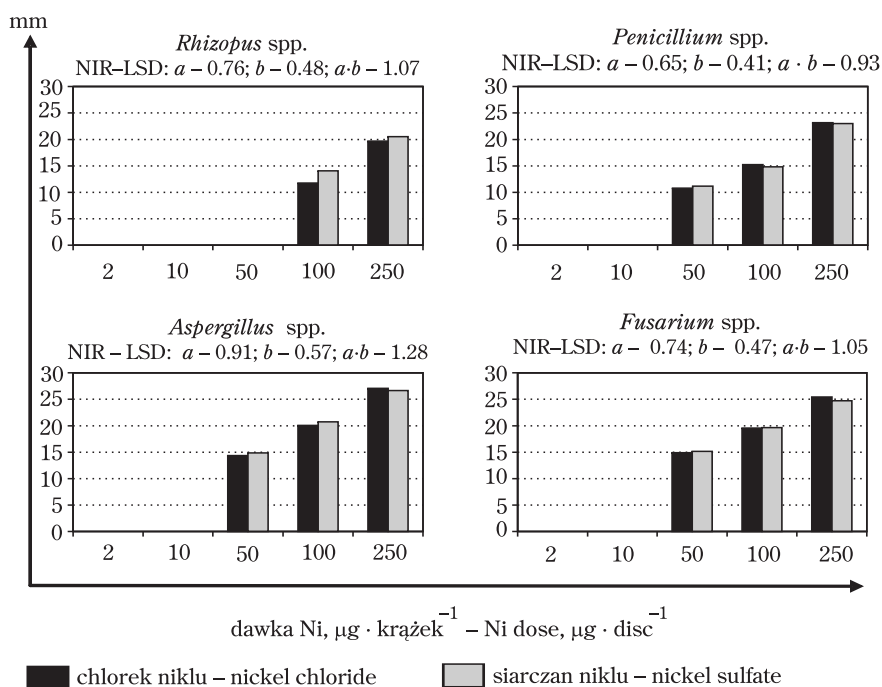


Rys. 5. Średnica stref zahamowania wzrostu grzybów w zależności od rodzaju podłoża i dawki niklu (mm)

Fig. 5. Diameters of the zones of inhibited growth of fungi in relationship to the type of medium and the dose of nickel (mm)

przypadku promieniowców rodzaj dyfundującego do podłoża związku niklu miał niewielki wpływ na *Streptomyces odoriver* i *Streptomyces fumosus*, z kolei wzrost *Streptomyces intermedius* nieco silniej hamował chlorek niklu, a *Streptomyces longisporoflavus* – siarczan niklu. Wzrost grzybów w zasadzie nie zależał od rodzaju związku niklu, lecz zależał, przede wszystkim, od jego dawki.

3. Rodzaj podłoża w niewielkim stopniu modyfikował wielkość stref zahamowania wzrostu bakterii i grzybów. Promieniowce: *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces longisporoflavus* oraz *Streptomyces odoriver* nieco lepiej znosiły zanieczyszczenie niklem, gdy rosły na podłożu wzbogaconym w dodatkową ilość węgla, w porównaniu z podłożem standardowym, natomiast *Streptomyces fumosus* reagował odwrotnie.



■ chlorek niklu – nickel chloride □ siarczan niklu – nickel sulfate

NIR dla (LSD for): a – dawki Ni (Ni dose), b – rodzaju podłoża (nickel compound)

Rys. 6. Średnica stref zahamowania wzrostu grzybów w zależności od związku niklu i jego dawki (mm)

Fig. 6. Diameters of the zones of inhibited growth of fungi in relationship to the nickel compound and its dose (mm)

PIŚMIENNICTWO

- BADURA L. 1999. Czy znamy wszystkie uwarunkowania toksycznego oddziaływania metali ciężkich na bakterie. Na pograniczu chemii i biologii. T. III, ss. 57-66.
- BARABASZ W., GALUS A., OPALIŃSKA-PISKORZ J., SEPIÓŁ J., TOMASIK P. 1997. Wpływ jonów metali na wzrost oraz akumulację Cd, Ni i Li w biomacie grzybnia *Aspergillus flavus* LINK. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 448a: 15-20.
- BOSECKER K. 1997. Biorecovery: metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiol. Rev., 30: 591-604.
- BURGSTALLER W., SCHINNER F. 1993. Leaching of metals with fungi. J. Biotech, 27: 91-116.
- CHMIEŁOWSKI J. 1991. Mechanizmy ługowania i akumulacji metali przez drobnoustroje. Biotechnologia, 3/4: 13-14.
- CHMIEŁOWSKI J., KŁAPCIŃSKA B. 1984. Mechanizmy pobierania metali przez drobnoustroje. Post. Mikrobiol., 23(2): 63-87.
- DOSANJH N.S., MICHEL S.L.J. 2006. Microbial nickel metalloregulation: *NikRs* for nickel ions. Curr. Opin. Chem. Biol., 10:123-130.
- FENGLEROWA W. 1965. Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. Acta Microbiol. Pol., 14(2): 203-206.

- GALUS A. 1997. Wpływ chromu(III) i (VI) oraz jego interakcji z innymi metalami na wzrost biomasy grzybni *Aspergillus flavus*. W: *Drobnoustroje w środowisku, występowanie, aktywność i znaczenie*. Red. W. BARABASZ, AR Kraków, ss. 169-180.
- GRABOWSKI J., SCULLY P.P., EDWARDS R., SAADAWY S.E., LATOSIŃSKA M. 1997. Toksyczność metali dla mikroorganizmów – badania metodą fluorogennego substratu. *Biotechnologia*, 1(36): 25-36.
- GILLER K.E., WITTER E., MCGRATH S.P. 1998. *Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review*. *Soil Biol. Biochem.*, 30(10/11): 1389-1414.
- GUIBAUD G., COMTE S., BORDAS F., DUPUY S., BAUDU M. 2005. *Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel*. *Chemosphere*, 59: 629-638.
- LIHOR O., ABRAHAM, YANJIE LI, DEBORAH B. ZAMBIE. 2006. *The metal- and DNA-binding activities of Helicobacter pylori NikR*. *J. Inorg. Biochem.*, 100: 1005-1014.
- LOPES F.A., MORIN P., OLIVEIRA R., MELO L.F. 2005. *The influence of nickel on the adhesion ability of Desulfovibrio desulfuricans*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46: 127-133.
- MARTIN J. 1950. *Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi*. *Soil Sci.*, 69: 215-233.
- MICHALCEWICZ W., ŚWIATŁY E. 2003. *Wpływ jonów miedzi oraz ołowiu na wzrost i rozwój wybranych grzybów glebowych*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 492: 197-204.
- MULDER E.G., ANTHEUMISSE J. 1963. *Morphologie, physiologie et ecologie des Arthrobacter*. *Ann. de Institut Pasteur*, 105: 46-74.
- PARKINSON D., GRAY F.R.G., WILLIAMS S.T. 1971. *Methods for studying the ecology of soil microorganism*. Blackweel Scientific Publications Oxford and Edinburgh, IBP Handbook 19.
- SCHMIDT A., HAFERBURG G., SENERIZ M., MERTEN D., BUCHEL G., KOTHE E. 2005. *Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils*. *Chemie der Erde*, 65 SI: 131-144.
- SKŁODOWSKA A. 2000. *Biologiczne metody ługowania metali ciężkich – biohydrometalurgia*. *Post. Mikrobiol.*, 39: 73-89.
- Statsoft, Inc. 2003. *Statistica (data analysis software system), version 6.0*. www.statsoft.com.
- VINCENT J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. IBP Handbook, 15 Blackweel, Oxford.
- WHITE C., SAYER J.A., GADD G.M. 1997. *Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 20: 503-516.
- WYSZKOWSKA J. 2002. *Biologiczne właściwości gleby zanieczyszczonej chromem sześciowartościowym*. *Wyd. UWM, Rozpr. i Monogr.*, 65: 1-134.