

Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
Katedra Mikrobiologii Rolniczej Akademii Rolniczej w Lublinie

LESŁAW BADURA, GRZEGORZ KRZUŚ, ELŻBIETA WIELGOSZ

*Oddziaływanie kadmu na bakterie glebowe i ryzosferowe
pomidorów w różnych fazach rozwojowych*

Toxic Influence of Cadmium on Soil and Rhizospheres of Tomato
in Different Phases of Plant Growth

Mikroorganizmy występujące w ekosystemach pełnią nie tylko funkcję destruktorów, organizmów rozkładających substancje organiczne do wody i dwutlenku węgla, lecz biorą również udział w przemianach materii organicznej, prowadzących do powstania związków humusowych, jak również uwalniają z jednej strony - pierwiastki biogenne, z drugiej strony - substancje biologicznie czynne. Nadto wraz z korzeniami roślin i gleby przykorzeniowej tworzą określone układy zwane ryzosferą i mikoryzą. Taki typ współżycia uwarunkowany jest wzajemnymi korzyściami i regulowany jest zarówno przez określone wydzieliny korzeniowe, jak i produkty wtórnego metabolizmu. Oba procesy kontrolowane są przez określone geny współtowarzyszących organizmów. Procesy zachodzące w ryzosferze zależą od określonych zespołów mikroorganizmów budujących daną ryzosferę, która zależy od gatunku rośliny i stadium rozwojowego tej rośliny. Układ taki może być zaburzony różnymi czynnikami, między innymi obecnością pierwiastków metali ciężkich, dostających się do gleby w wyniku oddziaływań antropogenicznych (5, 7, 8, 9).

Jednym z takich metali ciężkich dostających się do gleby jest kadm, który zaliczany jest do czarnej strefy, jako pierwiastek o wysokich oddziaływaniach toksycznych w bardzo małych stężeniach i nieznanej biologicznej funkcji. Jego

obecność w glebie może prowadzić do selekcji mikroorganizmów, w której wyniku pewne szczepy adaptują się, stając się niewrażliwymi i pozostają, inne natomiast, wrażliwe, giną i wypadają z układu. Wśród tych niewrażliwych mogą być patogeny, które stanowią szczególne niebezpieczeństwo (1, 2, 3).

Toksyczność kadmu w glebach i ryzosferach zależy od wielu czynników abiotycznych i biotycznych. Abiotycznymi czynnikami są gleby ze swoimi właściwościami fizykochemicznymi: pH i Eh , właściwościami sorpcyjnymi koloidów nieorganicznych i organicznych, pojemnością wymiennych kationów i anionów, zawartością substancji odżywczych, strukturą gleby, warunkami wodnymi gleby, powietrzem glebowym i temperaturą. Natomiast czynniki biotyczne są genetycznie uwarunkowaną wrażliwością roślin i mikroorganizmów, nadającą im zdolność do adaptacji (4, 6). Ostateczny toksyczny efekt kadmu jest grą sił pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi gleb a wrażliwością roślin i mikroorganizmów współtwarzyszących.

Celem badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, jakie są różnice w oddziaływaniu związków kadmu na bakterie glebowe i ryzosferowe pomidorów w różnych fazach rozwojowych roślin, rosnących w różnych glebach. Aby wyjaśnić ów problem, postanowiono odpowiedzieć szczegółowiej na następujące pytania: 1. Jak kształtowała się kinetyka wzrostu kolonii bakterii pod wpływem kadmu w glebach i ryzosferach pomidorów, wyznaczana metodą Hattorie'go? 2. Jak różnicowały się pod wpływem kadmu bakterie glebowe i ryzosferowe, zaliczane do grup morfologicznych - gramujemnych i gramodatnich oraz do grup fizjologicznych - nityfikatorów i denityfikatorów? 3. Jaki wpływ wywierał kadm na aktywność enzymów glebowych i ryzosferowych: celulazy C_x i proteazy? 4. Jaki wpływ wywierał kadm na długość faz rozwojowych pomidorów? 5. Jaki był stan i kondycja korzeni roślin pod wpływem kadmu?

MATERIAŁY I METODY

Badania długoterminowe nad oddziaływanie kadmu w glebach i ryzosferach roślin w fazach rozwojowych, rosnących w różnych rodzajach gleb: glinie piaszczystej, piasku gliniastym, „ziemi ogrodowej”, prowadzono metodą wazonową, w warunkach szklarniowych. Ze względu na obfity rozwój systemu korzeniowego i łatwość hodowli obiektem badań były pomidory odmiany karłowatej (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Nasiona roślin wysiewano do gleb kontrolnych i gleb skażonych związkami kadmu, wprowadzanymi w postaci dobrze rozpuszczalnego azotanu i trudniej rozpuszczalnego siarczanu, w dawkach od 10 ppm do 160 ppm, w przeliczeniu na metal. Poszczególne dawki kadmu ustalono doświadczalnie, tak aby stężenie kadmu w glebie nie wywoływało natychmiastowej śmierci roślin, a one same mogły przejść przez trzy fazy rozwojowe, tj. kiełkowanie, kwitnienie, owocowanie. Kontrolę stanowiły gleby i ryzosfery roślin rosnących w glebach analogicznych, nie poddanych oddziaływaniu kadmu.

Próbki do badań pobierano w fazach: kiełkowania, kwitnienia (faza kwitnienia przypadała w momencie pojawienia się przynajmniej trzech kwiatów na roślinie) i owocowania (faza owocowania przypadała w momencie pojawienia się przynajmniej trzech zawiązków owoców).

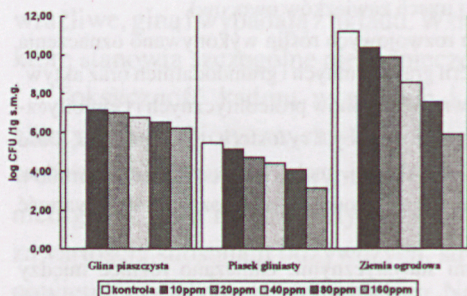
W próbkach gleby i ryzosfery w różnych fazach rozwojowych roślin wykonywano oznaczenia mikrobiologiczne: ogólną liczbę bakterii, liczbę bakterii gramujemnych i gramododatnich oraz aktywność bakterii nitrifikujących i denitrifikujących, aktywność enzymów proteolitycznych i celuloitycznych. Jednocześnie oznaczano parametry fizykochemiczne gleby i ryzosfery, takie jak: *pH*, ilość kadmu wymywanego wodą, zawartość substancji organicznej, maksymalną pojemność wodną, pojemność wody higroskopowej, pojemność wymiennych kationów. Nadto oznaczano zawartość kadmu w częściach vegetatywnych pomidorów.

Uzyskane wyniki badań analizowano metodami statystycznymi. Obliczano różnice między wartościami średnimi, przeprowadzając analizę wariancji i obliczając najmniejsze istotne różnice (LSD – *Least significant differences*) przy $p < 0,05$, korzystając z programu EXCEL 5.0. Natomiast obliczenia kinetyki wzrostu kolonii bakterii metodą Hattorie'go dokonano posługując się programem opracowanym przez Pachę (1988).

WYNIKI

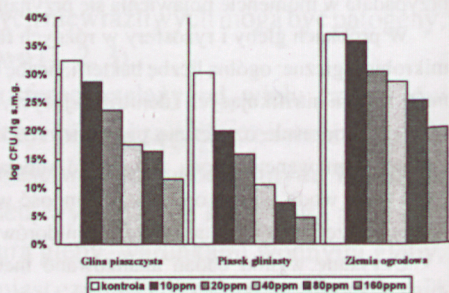
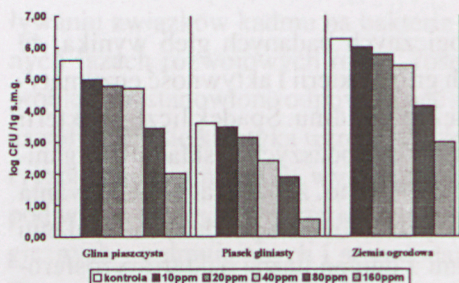
Z przeprowadzonych analiz mikrobiologicznych badanych gleb wynika, że liczba wszystkich izolowanych na podłożach grup bakterii i aktywność enzymatyczna spadała wyraźnie wraz ze wzrostem stężenia kadmu. Spadek liczby bakterii i aktywności enzymatycznej był wyższy w glebach uboższych w składniki organiczne (ryc. 1-6). Natomiast w ryzosferach stwierdzono, że w fazach kiełkowania i owocowania roślin ogólna liczba bakterii ryzosferowych poddanych działaniu kadmu była znacznie mniejsza w porównaniu z ogólną liczbą bakterii ryzosferowych roślin występujących w fazach kwitnienia (ryc. 7). Ogólna liczba bakterii obrazuje wyłącznie te grupy bakterii, które wyizolowano na danym podłożu, natomiast nie ona nie mówi o poszczególnych populacjach, które mogą wykazywać zróżnicowaną wrażliwość na toksyczne oddziaływanie kadmu. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zastosowano model FOR (H a t t o r i 1983 a). Zastosowana metoda wykazała jednoznacznie, iż w badanym materiale kadm nie oddziaływał jednakowo na wszystkie populacje. Pojedyncze osobniki danej populacji oraz całe populacje podlegały selekcji, co prowadziło do wypadania pewnych osobników w obrębie określonej populacji i populacji wrażliwych z jednej strony - i adaptacji mniej wrażliwych z drugiej strony. Wykazano, że w glebach traktowanych kadmem bakterie były przeważnie w fazach pośredniej i spoczynku, natomiast w ryzosferach były w fazach spoczynku i intensywnych podziałów. Z analizy poszczególnych parametrów FOR wynika nadto, iż oprócz liczbowo dużych populacji wrażliwych na kadm mogą występować populacje liczbowo małe, słabo wrażliwe, które mogą mnożyć się i zajmować lokum populacji wypadających. Taki stan pozwalał na przeżycie mikroorganizmów w niesprzyjających warunkach, wywołanych wprowadzaniem metali ciężkich do środowisk glebowych. Analiza FOR pozwala na

Zmiany liczby bakterii glebowych pod wpływem kadmu



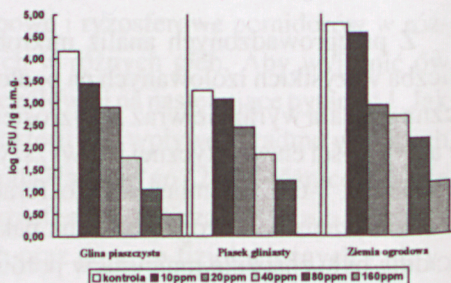
Ryc. 1. Ogólna liczba bakterii w glebach poddanych działaniu kadmu

The total number of bacteria in the soil treated with cadmium

Ryc. 2. Wartości procentowe bakterii gramujemnych w glebach, poddanych działaniu kadmu
Percentage values of Gram-negative bacteria in the soils treated with cadmium

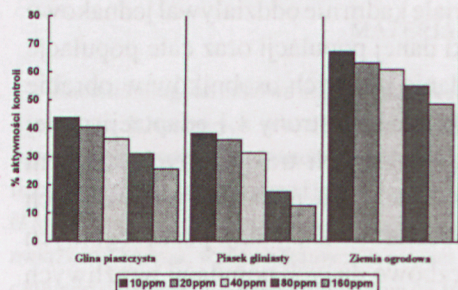
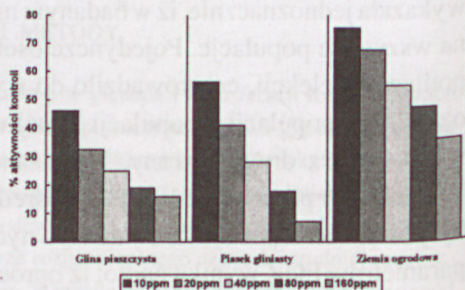
Ryc. 3. Liczba bakterii nityfikujących w glebach, poddanych działaniu kadmu

The number of nitrifying bacteria in the soils treated with cadmium



Ryc. 4. Liczba bakterii denityfikujących w glebach, poddanych działaniu kadmu

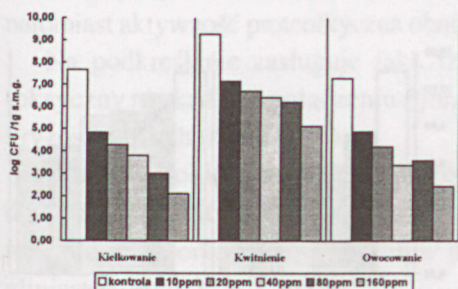
The number of de-nitrifying bacteria in the soils treated with cadmium

Ryc. 5. Aktywność celulozy C_x w glebach poddanych działaniu kadmuThe activity of cellulase C_x in the soils treated with cadmium

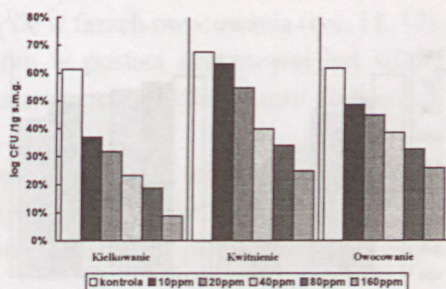
Ryc. 6. Aktywność proteolityczna w glebach poddanych działaniu kadmu

Proteolytic activity in the soils treated with cadmium

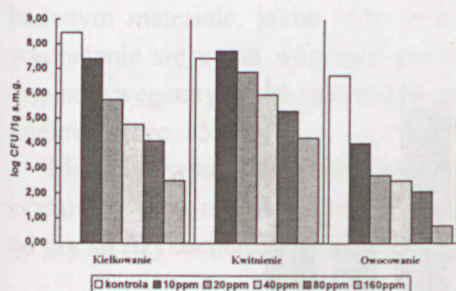
Zmiany liczby bakterii ryzosferowych pod wpływem kadmu



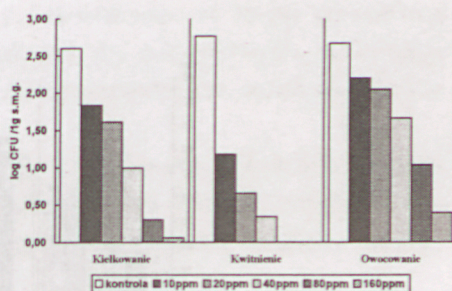
Ryc. 7. Ogólna liczba bakterii w ryzosferach, poddanych działaniu kadmu
The total number of bacteria in rhizospheres treated with cadmium



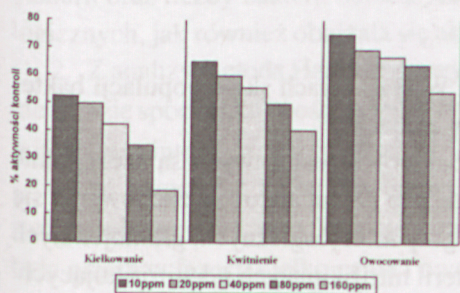
Ryc. 8. Wartości procentowe bakterii gramujemnych w ryzosferach, poddanych działaniu kadmu
Percentage values of Gram-negative bacteria in rhizospheres treated with cadmium



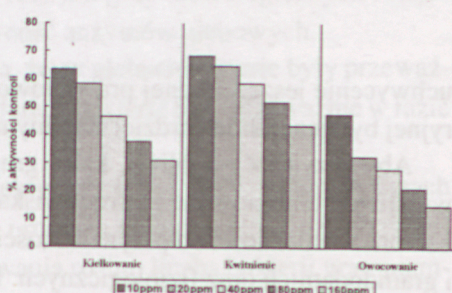
Ryc. 9. Liczba bakterii nityfikujących w ryzosferach, poddanych działaniu kadmu
The number of nitrifying bacteria in rhizospheres treated with cadmium



Ryc. 10. Liczba bakterii denityfikujących w ryzosferach, poddanych działaniu kadmu
The number of de-nitrifying rhizospheres treated with cadmium

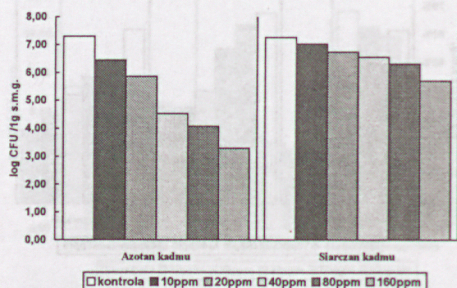


Ryc. 11. Aktywność celulozy C_x w ryzosferach, poddanych działaniu kadmu
The activity of cellulase C_x in rhizospheres treated with cadmium

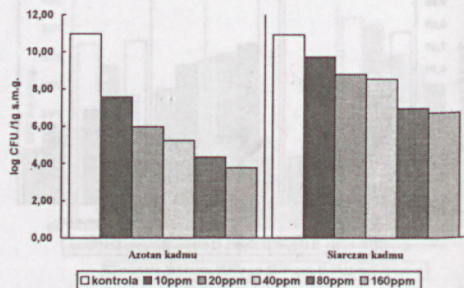


Ryc. 12. Aktywność proteolityczna w ryzosferach, poddanych działaniu kadmu
Proteolytic activity in rhizospheres treated with cadmium

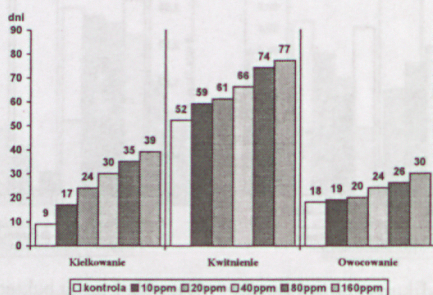
Różnice w oddziaływaniu związków kadmu na bakterie glebowe i ryzosferowe oraz rośliny



Ryc. 13. Ogólna liczba bakterii glebowych, poddanych działaniu azotanu i siarczanu kadmu
The total number of soil bacteria treated with cadmium nitrate and sulphate



Ryc. 14. Ogólna liczba bakterii ryzosferowych, poddanych działaniu azotanu i siarczanu kadmu
The total number of rhizosphere bacteria treated with cadmium nitrate and sulphate



Ryc. 15. Czas wegetacji pomidorów, poddanych działaniu kadmu
Vegetation period of tomatoes treated with cadmium

uchwycenie jeszcze jednej prawidłowości. W ryzosferach skład populacji bakteryjnej był generalnie bardziej stabilny niż w glebach.

Aby przyrzeć się bliżej, które grupy bakterii ryzosferowych są szczególnie wrażliwe i eliminowane ze środowiska, należało przeanalizować zachowanie się bakterii w zależności od przynależności do grup morfologicznych: gramujemnych i gramododatnich oraz fizjologicznych: bakterii nitrifikujących i denitrifikujących. Stwierdzono, że w fazach kiełkowania nastąpił największy procentowy spadek liczby bakterii gramujemnych. Natomiast liczby bakterii ryzosferowych z grup nitrifikujących były najniższe w fazach owocowania, przeciwnie zaś z grup denitrifikujących były najwyższe (ryc. 8, 9, 10).

Aktywność enzymatyczna zmieniała się wyraźnie w ryzosferach w zależności od faz rozwojowych roślin: celulazy Cx obniżała się znacznie w fazach kiełkowania, natomiast aktywność proteolityczna obniżała się w fazach owocowania (ryc. 11, 12).

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż kadm w postaci azotanowej był silniej toksyczny niż kadm w połączeniu z jonem siarczanowym dla bakterii glebowych i ryzosferowych (ryc. 13, 14).

Wpływ na toksyczność kadmu ma również rodzaj gleby, w których prowadzono doświadczenia. Stwierdzono, że „ziemia ogrodowa” stwarzała lepsze warunki dla rozwoju mikroorganizmów i roślin w porównaniu z gliną piaszczystą i piaskiem gliniastym (ryc. 1, 2, 3, 4).

Metale ciężkie wywołują również efekty toksyczne w samych roślinach. Mimo pewnych barier wytwarzanych przez rośliny, które mają chronić je przed wnikaniem metali ciężkich, zawsze jednak pewna ilość metali będzie wnikała do tkanek roślin. Wraz z rozwojem roślin ilość kadmu akumulowanego w tkankach na jednostkę masy będzie się zwiększała i efekt zatrucia będzie się pogłębiał. W badanym materiale, jakim były pomidory, stwierdzono, że kadm powodował wydłużanie się czasu wegetacji poszczególnych faz rozwojowych, deformację organów wegetatywnych i generatywnych, wczesne więdnienie, opadanie organów i nekrozy (ryc. 15).

Można przyjąć, że końcowy efekt oddziaływania kadmu na bakterie glebowe i ryzosferowe w różnych fazach rozwojowych roślin jest w istocie swojej zależny od gry sił fizykochemicznego i fizjologicznego układu: roślina - bakterie - gleba.

PODSUMOWANIE

1. Traktowanie gleb związkami kadmu w pierwszych dniach doświadczenia powodowało, niezależnie od dawki i rodzaju gleby, zmniejszanie się ogólnej liczby bakterii oraz liczby bakterii należących do różnych grup morfologicznych i fizjologicznych, jak również obniżała się aktywność enzymów glebowych.

2. Z analizy metodą Hattorie'go wynika, że: w glebach bakterie były przeważnie w fazie spoczynku i pośredniej, w ryzosferach bakterie były przeważnie w fazie pośredniej i intensywnych podziałów.

3. W ryzosferze kadm powodował efekty toksyczne w określonych fazach rozwojowych roślin, niezależnie od dawki i rodzaju gleby: ogólna liczba bakterii była niższa w fazach kiełkowania i owocowania roślin, liczba bakterii gramujemnych była niższa w fazie kiełkowania roślin, liczba bakterii nitrifikujących była niższa w fazie owocowania roślin, liczba bakterii denitrifikujących była niższa w fazach kiełkowania i kwitnienia roślin, aktywność enzymów celololitycznych była niższa w fazie kiełkowania, natomiast proteolitycznych w fazie owocowania roślin.

4. W ryzosferach roślin rosnących w glebach glinie piaszczystej i piasku gliniastym efekty toksyczne kadmu były bardziej widoczne w poszczególnych fazach rozwojowych roślin.

5. Azotan kadmu, zarówno w glebach, jak i w ryzosferze, był bardziej toksyczny w porównaniu z postacią siarczanową.

PIŚMIENNICTWO

1. Badura L.: Heavy Metals in Ecosystem. W: Polish Journal Of Environmental Studies 6, 235-243, Supplement 1997.
2. Depledge M. H., Weeks J. M., Bjerregaard P.: Handbook of Ecotoxicology, Chemicals Categories. W: CALOW P., Heavy Metals. Blackwell Scientific Publications, New York 1993.
3. Insam H., Hutchinson T. C., Reber H. H.: Effects of Heavy Metal Stress on the Metabolic Quotient of the Soil Microflora. Soil Biol. Biochem., 28/4, 691-694, 1996.
4. Krishnamurti G. S. R., Huang P. M., Van Rees K. C. J., Kozak L. M., Rostad H. P. W.: Microwave Digestion Technique for the Determination of Total Cadmium in Soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 25/5i6, 615-625, 1994.
5. Lynch J. M.: The Rhizosphere. Ed. J. Wiley & Sons, Chichester, New York 1990.
6. Pardo M. T., Guadalix M. E.: Cadmium Sorption by Two Acid Soils as Affected by Clearing and Cultivation. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 26/1i2, 289-302, 1995.
7. Szember A.: Zarys mikrobiologii rolniczej. AR Lublin. 2001.
8. Wielgosz E.: Dynamika rozwoju różnych grup drobnoustrojów w osadach ścieków komunalnych pod obsadą niektórych roślin. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E, vol. 55, Lublin 2000.
9. Wielgosz E.: Aktywność biochemiczna w osadach pościekowych poddanych czteroletniej transformacji roślinnej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E, vol. 55, Lublin 2000.

SUMMARY

The paper presents results of toxic influence of cadmium on soil and rhizosphere bacteria in different phases of plants growth. Cadmium, independently of concentration of the proper type of salt and soil, has a negative influence on the amount, the kind of the soil and rhizosphere bacteria. All these differences may be deeper or smaller but it depends on the phases of plants growth. The most sensitive were rhizosphere bacteria in the phase of fructification of plants.