

¹Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland

²Katedra Mikrobiologii Rolniczej, Akademia Rolnicza w Lublinie

Małgorzata Adamska¹, Lesław Badura¹, Aleksandra Smyła¹,
Elżbieta Wielgosz²

*Wrażliwość konidii promieniowców w różnych fazach kiełkowania
na jony kadmu i miedzi*

Sensitivity of *Streptomyces* conidia at different germination phases
to cadmium and copper ions

ABSTRACT. The effect of heavy metals on microorganisms was studied considering various aspects. Although the effect of heavy metals belonging to the grey and black groups on the vegetation forms is commonly known, the knowledge of their effect on germinating conidia is insufficient. The studies aimed to determine the effect of cadmium (5 µg/ml) and copper (200 µg/ml) ions on the germination process of streptomyces conidia. A wild type strain was selected, and the germination process of the conidia was observed using a light microscope and measuring absorbency by a nephelometer. The results are presented in tables and figures. Given the data one may find that cadmium ions inhibited germination of conidia when they were added to a medium after 0 or 2 hours of the incubation time. The later introduction of cadmium ions to the medium did not show significant effect on the germination process. In contrast, copper ions introduced at the tested concentration did not affect this process.

KEY WORDS: *Streptomyces* conidia, ions of cadmium and copper

Współczesny rozwój cywilizacji pociąga za sobą negatywne oddziaływanie na środowisko, w szczególności gdy emituje do niego związki o długotrwałym stopniu retencji. Do takich związków należą przede wszystkim metale ciężkie. Zalegają one, zwłaszcza w podsystemach glebowych ekosystemów, dziesiątki, a nawet setki lat, wywierając różne, nie zawsze przewidywalne, oddziaływania na organizmy bytujące i pełniące ważne funkcje w ekosystemach [Babich, Stotzky 1977; Badura 1997; Badura 1999; Badura, Piotrowska-Seget 2002].

Z prac Abbasa i Edwardsa [1989] wynika na przykład, że promieniowce z rodzaju *Streptomyces* wykazują zróżnicowaną wrażliwość na różne jony. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż na oddziaływanie toksyczne tego pierwiastka na wzrost *Streptomyces* mają istotny wpływ występujące w podłożu związki azotu [Smyła 1995; Smyła 1995]. Z licznych badań nad oddziaływaniem metali ciężkich na mikroorganizmy wynika, że w dużej mierze wśród bakterii, promieniowce cechują się zróżnicowaną wrażliwością, odróżniając się od innych bakterii właściwych ze względu na specyficzną morfologię (wzrost w postaci pseudogrzebni) i sposób rozmnażania (formą konidialną).

Jak można przypuszczać, ich wrażliwość na metale ciężkie, w zależności od tego czy dany pierwiastek należy do szarej strefy (będąc w niskich koncentracjach biogenem, jak np. miedź), czy też czarnej strefy (niepełniającej żadnej funkcji w organizmie, jak np. kadm), może być zależna od fazy rozwojowej promieniowców – vegetatywnej czy generatywnej, zwłaszcza że kiełkujące formy konidialne przechodzą skomplikowane przemiany morfogenetyczne [Hardison, Salas 1981; Huber i in. 1987; Srinivasan i in. 1991]. Z badań np. Smyły i Mroczkowskiej-Bender [1991] jednoznacznie wynika, że formy vegetatywne badanych gatunków z rodzaju *Streptomyces* charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na kadm niż ich kiełkujące konidia.

Wyłoniło się więc dość istotne pytanie, jak metale ciężkie, zarówno ze strefy szarej (miedź) jak i strefy czarnej kadm oddziałują na proces kiełkowania artrospor.

METODY

Badania nad oddziaływaniem kadmu i miedzi na kiełkowanie konidii promieniowców prowadzono na dzikim szczepie bezpośrednio wyizolowanym z gleby. Z hodowli prowadzonej na podłożu maltozowo-drożdżowym sflukiwano konidia roztworem soli fizjologicznej z dodatkiem 0,1% Tween 80 na pożywkę mineralną w składzie: Na_2HPO_4 – 880 μmol , Na_2SO_4 – 1790 μmol , NH_4Cl – 5980 μmol , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 884 μmol , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 730 μmol , FeCl_3 – 148 μmol , MES – 5460 μmol , HEPES – 5640 μmol , H_2O dest. – 100 ml, Mannitol – 10 g i stabilizowanego pH na poziomie 6,6 [Angle, Chaney 1989]. Do podstawowej pożywki wprowadzano nadto CuCl_2 oraz CdCl_2 w końcowym stężeniu metalu: 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} i 5 $\mu\text{g/ml}$ Cd^{2+} . Doświadczenia prowadzono w następującym układzie: 1. Kontrola. 2. Do podstawowej pożywki wprowadzano 5 μg Cd^{2+}/ml w pierwszej oraz po upływie drugiej i piątej godziny trwania kiełkowania konidii. 3. Do podstawowej pożywki wprowadzano 200 μg Cu^{2+}/ml w pierwszej oraz po upływie drugiej i piątej godziny trwania kiełkowania konidii.

Czasy wprowadzania kationów określono doświadczalnie, biorąc pod uwagę zmiany morfologiczne zachodzące w kiełkujących konidiach. Obserwacje kiełkujących konidii prowadzono na preparatach podbarwionych 0,5% roztworem safraniny w mikroskopie świetlnym w odstępach jednogodzinnych, zaczynając od momentu wprowadzenia inokulum konidialnego do doświadczalnych układów. Równoległe z tymi obserwacjami dokonywano pomiarów wzrostu mętności, stosując długość fali 580 nm, wobec płynnego wzorca mętności przygotowanego wg skali McFarlanda, przy użyciu spektrofotometru (Specol 11 Carl Zeiss Jena z przystawką nefelometryczną typu TR).

WYNIKI

Z przeprowadzonych obserwacji w mikroskopie świetlnym wynikało, że proces geminacji konidii badanego szczepu promieniowców nie jest zsynchronizowany i konidia nie kiełkują równocześnie. Jedne pozostawały jeszcze w stadium spoczynkowym, a inne już wykazywały się daleko posuniętymi zmianami. W związku z tym jednoznaczne uchwycenie w mikroskopie świetlnym momentów przejść w kolejne stadia było utrudnione. W uchwyceniu zachodzących zmian w kiełkujących konidiach pomocne okazały się dodatkowe pomiary nefelometryczne mętności. Wyniki obserwacji mikroskopowych ilustrują tabele 1 i 2.

Tabela 1. Obserwacje w mikroskopie świetlnym zmian faz kiełkowania konidii promieniowców poddanych działaniu kadmu

Table 1. Light microscope observations of changes of germination phases of *Streptomyces* conidia treated with cadmium ions

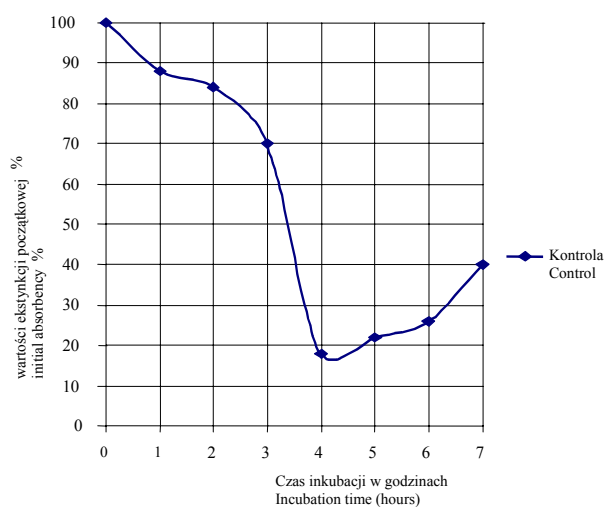
Godzina Hour	Kontrola Control	5 µg/ml Cd ²⁺ 5 µg/ml of Cd ²⁺		
	Faza Phase	W godzinie 0 At 0 h	W godzinie 2 At 2 h	W godzinie 5 At 5 h
0	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black
1	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black
2	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black
3	Ciemna i jasna Black and light	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna i jasna Black and light
4	Jasna Light	Ciemna Black	Ciemna Black	Jasna Light
5	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Ciemna i jasna Black and light	Jasna Light	Jasna i kiełkująca Light and germinating
6	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna Light	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating
7	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating

Tabela 2. Obserwacje w mikroskopie świetlnym zmian faz kiełkowania konidii promieniowców poddanych działaniu miedzi

Table 2. Light microscope observations of changes of germination phases of *Streptomyces* conidia treated with copper ions

Godzina Hour	Kontrola Control	200 µg/ml Cu ²⁺ 200 µg/ml of Cu ²⁺		
	Faza Phase	W godzinie 0 At 0 h	W godzinie 2 At 2 h	W godzinie 5 At 5 h
0	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black
1	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black
2	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black	Ciemna Black
3	Ciemna i jasna Black and light	Ciemna i jasna Black and light	Ciemna i jasna Black and light	Ciemna i jasna Black and light
4	Jasna Light	Jasna	Jasna Light	Jasna Light
5	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating
6	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating
7	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating	Jasna i kiełkująca Light and germinating

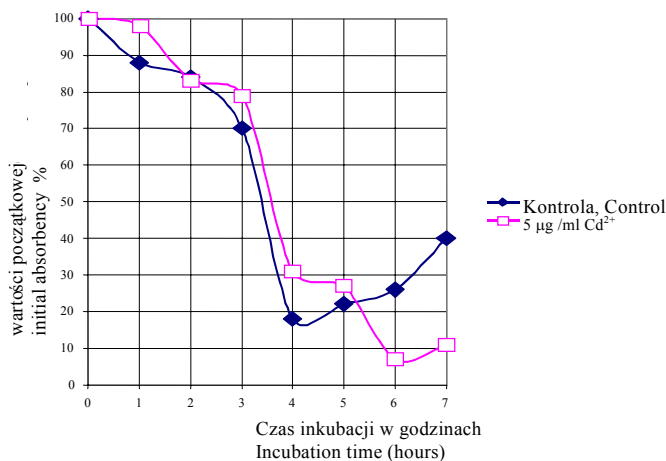
Z tabel tych, a przede wszystkim z pomiarów nefelometrycznych mętności, można jednoznacznie odczytać przebieg zmian zachodzących w kiełkujących konidiach promieniowców. W próbie kontrolnej (ryc. 1) do czwartej godziny inkubacji obserwowano spadek wartości ekstynkcji, a następnie jej wzrost. Spadek ten powodo-



Rycina 1. Zmiany wartości ekstynkcji podczas kiełkowania konidii promieniowców w pożywce mineralnej z mannitolem – kontrola

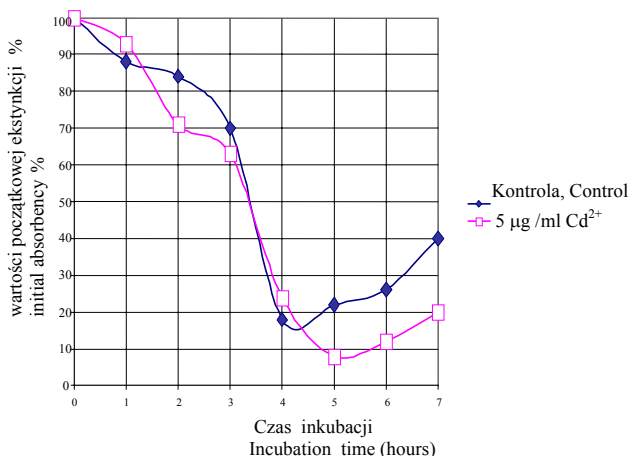
Figure 1. Changes in absorbency values during germination of *Streptomyces* conidia in a mineral medium with mannitol – control

wany był przechodzeniem większości konidii z fazy ciemnej do jasnej, co obserwowano w preparatach mikroskopowych. Ponowny wzrost ekstynkcji uwarunkowany był następną fazą kiełkowania – fazą tworzenia się przewodów.



Rycina 2. Zmiany ekstynkcji podczas kiełkowania konidii promieniowców w pożywce mineralnej z mannitolem z dodatkiem 5 µg Cd²⁺/ml w godzinie 0

Figure 2. Changes in absorbency values during germination of *Streptomyces* conidia in a mineral medium with addition of 5 µg Cd²⁺/ml at 0 hour

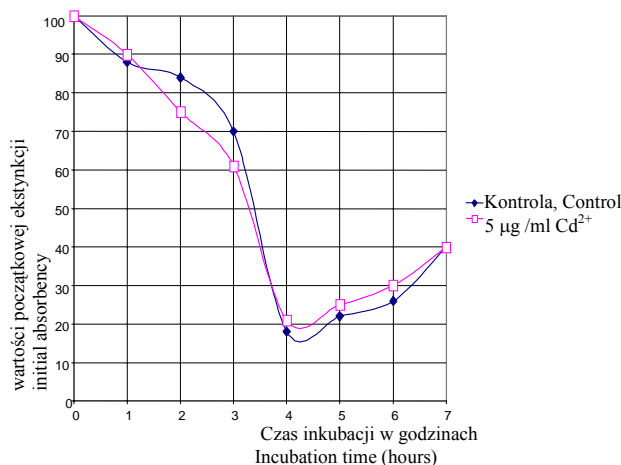


Rycina 3. Zmiany ekstynkcji podczas kiełkowania konidii promieniowców w pożywce mineralnej z mannitolem z dodatkiem 5 µg Cd²⁺/ml w godzinie 2

Figure 3. Changes in absorbency values during germination of *Streptomyces* conidia in a mineral medium with mannitol with addition of 5 µg Cd²⁺/ml at 2 hour

Wprowadzanie do pożywki kadmu w godzinie 0 powodowało wydłużenie trwania fazy ciemnej do około 2 godzin (ryc. 2). Jeszcze wyraźniej uwidaczniało się to, gdy dodawano kadm w drugiej godzinie trwania eksperymentu (ryc. 3).

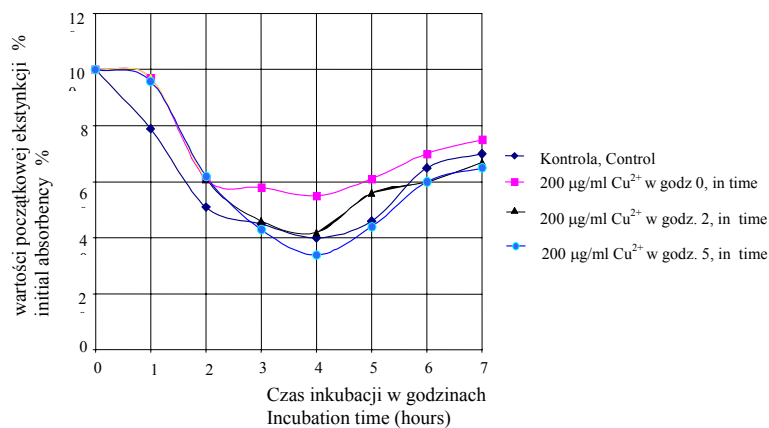
Jednak wprowadzenie takiej samej ilości kadmu w piątej godzinie inkubacji nie spowodowało już dalszych istotnych zmian w tempie kiełkowania konidii (ryc. 4).



Rycina 4. Zmiany ekstynkcji podczas kiełkowania konidii promieniowców w pożywce mineralnej z mannitolem z dodatkiem 5 µg Cd²⁺/ml w godzinie 5

Figure 4. Changes in absorbency values during germination of *Streptomyces* conidia in a mineral medium with mannitol and 5 µg Cd²⁺/ml at 5 hour

W przypadku wprowadzenia miedzi, zarówno w drugiej, jak i piątej godzinie trwania doświadczenia, nie stwierdzono istotnych różnic w stosunku do kontroli w szybkości kiełkowania konidii (ryc. 5).



Rycina 5. Zmiany ekstynkcji podczas kiełkowania konidii promieniowców w pożywce z mannitolem, z dodatkiem 200 µg Cu²⁺/ml w godzinach 0, 2, 5

Fig. 5. Changes in absorbency values during germination of *Streptomyces* conidia in a medium with mannitol with addition of 200 µg Cu²⁺/ml at 0, 2, and 5 hours

W badaniach nad wpływem miedzi i kadmu na proces kiełkowania konidii promieniowców stwierdzono zróżnicowanie w oddziaływaniach badanych pierwiastków. Obserwowany brak wpływu miedzi na proces kiełkowania może wynikać z faktu, że pierwiastek ten jest mikroelementem i odgrywa ważkie funkcje w metabolizmie, zwłaszcza że w podstawowej pożywce pierwiastek ten mógł występować w minimum. Na szczególne uwzględnienie zasługuje fakt, iż miedź jest nieodzowna w oksydazie cytochromowej, której ilość znacznie wzrasta w jasnej fazie kiełkowania [Hardisson, Salas 1981]. Brak wpływu miedzi na proces kiełkowania promieniowców może także wynikać z określonej budowy osłon komórkowych bakterii Gram dodatnich, charakteryzujących się warstwą peptydoglikanową oraz obecnością kwasów teichonowego i teichuronowego. Związki te charakteryzują się zdolnością do kompleksowego wiązania kationów i ich unieruchamiania [Doyle 1987; Markiewicz 1993].

Odmienne działanie wykazuje kadm. Wyraźnie hamuje on przechodzenie jednej fazy kiełkowania w drugą. Działanie to można tłumaczyć tym, iż kadm może hamować procesy oddechowe w komórkach promieniowców. Między innymi bowiem wykazano, że u bakterii *Staphylococcus aureus* pierwiastek ten wiąże się z grupami –SH białek łańcucha oddechowego, w wyniku czego ulega zakłóceniu elektrochemiczny transport błonowy. Może też zachodzić inne zjawisko. Kadm jako dwuwartościowy pierwiastek może być antagonistą w stosunku do jonów wapnia czy magnezu i blokować ich dostępność dla konidii, zwłaszcza znajdujących się w ciemnej fazie kiełkowania. Hipotezę tę potwierdza fakt, iż w przypadku zastosowania 10 µg/ml kadmu faza ciemna przedłużyła się o 6 godzin oraz fakt braku ujemnego wpływu kadmu dodawanego w 5 godzinie kiełkowania, gdy konidia przeszły ponownie w fazę jasną, związaną teraz z wytwarzaniem nowych strzępek.

WNIOSKI

1. Kadm hamował kiełkowanie konidii promieniowców, gdy był wprowadzony do pożywki w momencie wyjściowym (0) i w drugiej godzinie (2).
2. Dodawanie kadmu do pożywki w późniejszym terminie nie miało już istotnego wpływu na kiełkowanie konidii promieniowców
3. Wprowadzanie miedzi w badanym stężeniu nie miało istotnego wpływu na proces kiełkowania konidii promieniowców.

PIŚMIENNICTWO

- Abbas A., Edwards C. 1989. Effects of metals on range of *Streptomyces* specis. Applied & Environmental Microbiology, 55, 8, 2030-2034.
- Angle J.S., Chaney R.L. 1989. Cadmium resistance screening in nitrilo-triacetate buffered minimal media. Applied & Environmental Microbiology, 55, 8, 2101-2104.

- Babich H., Stotzky G. 1977. Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Applied & Environmental Microbiology*, 38, 3, 681-695.
- Badura L. 1997. Metale ciężkie w ekosystemach lądowych a ekotoksykologia. W: *Drobnoustroje w środowisku*. Ed. W. Barabasz, Katedra Mikrobiologii AR w Krakowie.
- Badura L. 1999. Polityka ekologiczna – szanse i zagrożenia. W: *Chemia, dydaktyka, ekologia, metrologia IV*, 1-2, 12-1.
- Badura L., Piotrowska-Seget Z. 2002. Heavy metals in the environment and their impact on soil microorganisms. *Chem. i Inż. Ekol.* 7, 11, 1136-1142.
- Badura L., Rusecka J., Smyła A. 1979. Oddziaływanie soli cynku i miedzi na drobnoustroje gleby, Cz. II. Reakcja promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. *Acta Biologia*, 7, 100-104.
- Doyle R.I. 1989. How cell walls of Gram-positive bacteria interact with metal ions. *Metal ions and bacteria*, Ed. T. I. Beveridge, R.I. Doyle; A. Wiley – Interscience Publ., New York–Singapore.
- Hardisson C., Salas J. 1981. Early biochemical events during the germination of *Streptomyces* spores. *Biological, biochemical and biomedical aspect of Actinomycetes*, Acad. Press, Inc.
- Huber F., Pieper R., Mertz F. 1987. Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Indust. Microbiol.* 2, 235-241.
- Markiewicz Z. 1993. *Struktura i funkcja osłon komórkowych*. PWN, Warszawa.
- Smyła A. 1995. Comparison of reaction of *Streptomyces* strains to cadmium and copper ions. *Polish J. Environ. Sci.* 4/4, 71-73.
- Smyła A. 1995. Effects of selected heavy metals ions on *Streptomyces* in presence of various nitrogen sources. *Archiwum Ochrony Środowiska*, 3/4, 191-196.
- Smyła A., Mroczkowska-Bender E. 1991. Influence of cadmium ions on *Streptomyces* strains, *Acta Microbiol. Pol.* 1/2, 51-58.
- Srinivasan M.C., Laxman R.S., Deshpande M.V. 1991. Physiology and nutritional aspects of *actinomycetes* on overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 171-184.