

Dora Ilić^{1*}, Danka Radić², Vera Karličić², Jelena Jovičić-Petrović², Dragan Kiković³, Blažo Lalević², Vera Raičević²

¹CMEPIUS (Center Republike Slovenije za evropske programe izobrazovanja in usposabljanja), Ljubljana, Slovenija, ²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet Beograd-Zemun, Srbija, ³Univerzitet u Prištini, Prirodno-matematički fakultet, Kosovska Mitrovica, Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC:631.46

doi:10.5937/ZasMat1603383I



Zastita Materijala 57 (3)
383 - 387 (2016)

Mikrobni diverzitet zemljišta kontaminiranog visokim sadržajem teških metala

IZVOD

Mnogobrojne industrijske aktivnosti, osim koristi za ljudsku populaciju, imale su za posledicu povećanje sadržaja teških metala i promene diverziteta živih organizama u životnoj sredini. Cilj ovog rada bio je ispitivanje uticaja visokih koncentracija teških metala na mikrobni diverzitet zemljišta. Istraživanja su obavljena na području bivše fabrike "Rog" (Ljubljana, Republika Slovenija), gde su uzeta četiri uzorka kontaminiranog zemljišta, dok je kontrolni uzorak predstavljao nekontaminirano zemljište. Ispitivanje mikrobnog diverziteta (brojnost bakterija, gljiva i aktinomiceta) obavljeno je primenom standardnih metoda. Rezultati istraživanja ukazuju da je brojnost mikroorganizama zavisila od lokacije i prisustva/odsustva kontaminacije. U kontrolnoj varijanti brojnost svih ispitivanih grupa mikroorganizama bila je veća u odnosu na ostale uzorke. Brojnost bakterija u kontaminiranim uzorcima iznosila je od $1,21-6,88 \times 10^6$ CFU/g, gljiva $1,08-30,30 \times 10^3$ CFU/g i aktinomiceta $302,15-381,82 \times 10^3$ CFU/g. U kontrolnoj varijanti broj bakterija iznosio je $17,45 \times 10^6$ CFU/g, gljiva $54,02 \times 10^3$ CFU/g i aktinomiceta $481,91 \times 10^3$ CFU/g. Ovi rezultati ukazuju na značaj ispitivanja mikrobnog diverziteta na kontaminiranim lokacijama i predstavljaju osnovu za potencijalne aplikacije bioremedijacionih tehnologija na području bivše fabrike "Rog".

ključne reči: mikrobni diverzitet, kontaminacija, teški metali, bakterije, gljive, aktinomicete.

1. UVOD

Metali su značajna komponenta ekosistema, čije koncentracije uglavnom zavise od geoloških i bioloških procesa [1]. U podgrupi teških metala nalaze se uglavnom elementi neophodni za živa bića (mikroelementi) i elementi sa nepoznatom fiziološkom ulogom [2]. Efekat teških metala na žive organizme zavisi od njihove koncentracije u ćelijama. Neki od njih su u malim koncentracijama značajni za metaboličke procese u ćelijama, dok su u visokim koncentracijama toksični [3]. Međutim, osim u ćelijama, teški metali izazivaju ozbiljne posledice po životnu sredinu a među njima jedni od najčešćih su olovo i hrom [4].

Mnoga istraživanja ukazuju da višegodišnja kontaminacija zemljišta teškim metalima ima negativne efekte na mikrobiološku aktivnost zemljišta a posebno na mikrobnu respiraciju [5-6].

*Autor za korespondenciju: Dora Ilić

E-mail: ilic.dora@gmail.com

Rad primljen: 10. 02. 2016.

Rad prihvaćen: 13. 03. 2016.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

Štetno delovanje teških metala na aktivnost mikroorganizama u zemljištu praćeno je i smanjenim intenzitetom transformacije organskih materija, redukcijom zemljišnog disanja i inhibicijom nekih enzima u zemljištu [7]. Promene takođe mogu nastati i u morfološkim osobinama mikroorganizama, kruženju hranljivih materija i pigmentaciji [8]. Hemijske analize ukazuju na stepen kontaminacije nekog lokaliteta teškim metalima, ali ne odslikavaju posledice njihovog prisustva za ključne metaboličke procese u zemljištu [9]. Biološkim metodama se, sa druge strane, dolazi do podataka o uticaju kontaminacije na organizme u zemljištu, što se manifestuje kroz inhibiciju rasta i njihove aktivnosti u uslovima stresa [10].

Cilj ovog rada bio je ispitivanje mikrobnog diverziteta u zemljištu u uslovima višegodišnje kontaminacije teškim metalima.

2. MATERIJAL I METODE

Uzorci za ova istraživanja uzeti su u julu 2010. godine sa lokacije Pogona za galvanizaciju fabrike "Rog" (Ljubljana, Republika Slovenija), iz površinskog dela zemljišta (0-15 cm). U ovom Pogonu su sve proizvodne aktivnosti vezane za hromiranje ra-

movu bicikala u galvanizacionim kadama obustavljene 1994. godine. Od tada se galvanizaciona tečnost nakupljala u kadama a zatim izlivala iz njih van objekta i tekla ka reci Ljubljanici. Analize uzoraka uzetih oko objekta pokazale su visok sadržaj teških metala [11]. Iz neposredne blizine Pogona uzeta su 4 uzorka, dok je kontrolni uzorak predstavljao nezagađeno zemljište.

Ispitivanje mikrobnog diverziteta obavljeno je primenom standardne metodologije. U uzorcima je ispitan ukupan broj bakterija na podlozi 0,1xTSA, gljiva na podlozi roze bengal streptomycin agar [12] i aktinomiceta na podlozi skrobno-amonijačni agar [13]. Sve analize obavljene su u tri ponavljanja. Brojnost mikroorganizama je izražena brojem kolonija po gramu vazdušno suvog uzorka (CFU/g). Vlažnost uzoraka određena je nakon sušenja u sušnici na temperaturi od 105°C u trajanju od 2 časa.

Dobijeni rezultati su analizirani neparametarskim statističkim Kruskal-Wallis ANOVA testom.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

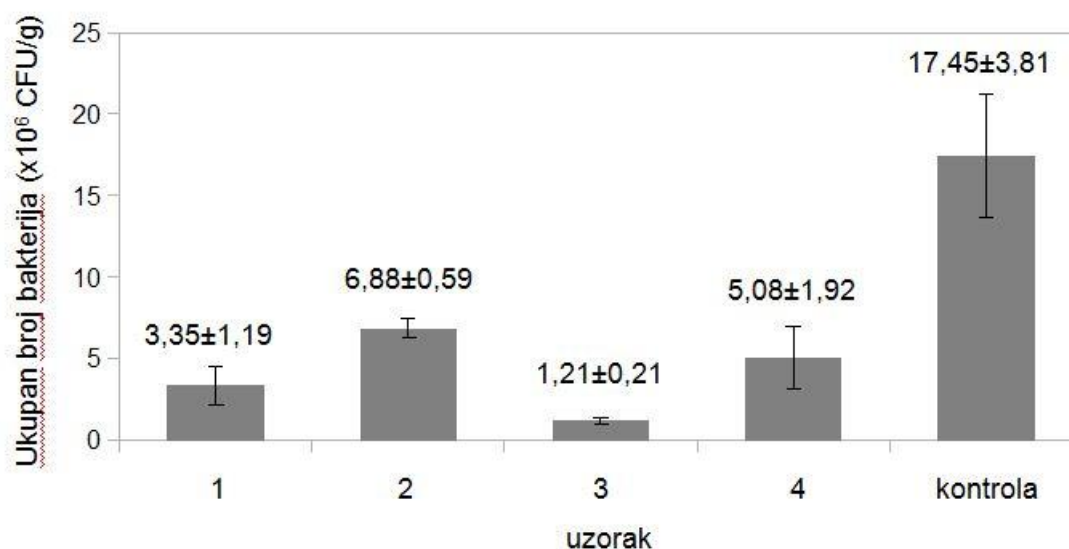
Mnoga istraživanja ukazuju da čak i male količine teških metala u životnoj sredini imaju štetan efekat na sve žive organizme, transformaciju organskih materija i kruženje hranljivih elemenata [4]. Međutim, metabolički procesi kod mikroorganizama su više ili manje osetljivi na prisustvo teških metala, odnosno povećanje njihove koncentracije dovodi do selektivne inhibicije mikrobiološke aktiv-

nosti [14]. Zbog toga, mikroorganizmi imaju veoma važnu ulogu u biogeochemijskim ciklusima teških metala u životnoj sredini [2] a istraživanja mikrobnog diverziteta imaju poseban značaj i za potencijalnu primenu remedijacionih tehnika na kontaminiranim lokalitetima [15].

Rezultati istraživanja ukazuju da je mikrobni diverzitet ispitivanih lokacija zavisio od lokacije i prisustva/odsustva kontaminacije (grafici 1, 2, 3).

Ukupan broj bakterija je važan parametar biogenosti zemljišta [16]. U ovim istraživanjima ukupan broj bakterija bio je najveći u kontrolnom uzorku ($17,45 \times 10^6$ CFU/g), dok je u kontaminiranim uzorcima broj bakterija znatno manji (grafik 1). Ovi rezultati obrađeni su deskriptivnom statistikom i ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika između lokacija ($H=12,433(4, N=15), p>0.05$).

Razlike u brojnosti bakterija u ispitivanim uzorcima mogle bi se povezati sa karakteristikama zemljišta. Prethodna istraživanja ukazuju da je, u zavisnosti od mehaničkog sastava zemljišta, ukupan broj bakterija uglavnom bio veći u nekontaminiranom zemljištu u odnosu na kontaminirano [17]. Kontaminacija teškim metalima utiče na smanjenje intenziteta respiracije zemljišta i mikrobne biomase [18]. Osim toga, u prethodnim istraživanjima potvrđena je pozitivna korelacija između kontaminacije teškim metalima i usporavanja procesa transformacije organske materije [19], što svakako dovodi i do redukcije mikrobiološke aktivnosti zemljišta.



Grafik 1 - Ukupan broj bakterija u ispitivanim uzorcima ($\times 10^6$ CFU/g)

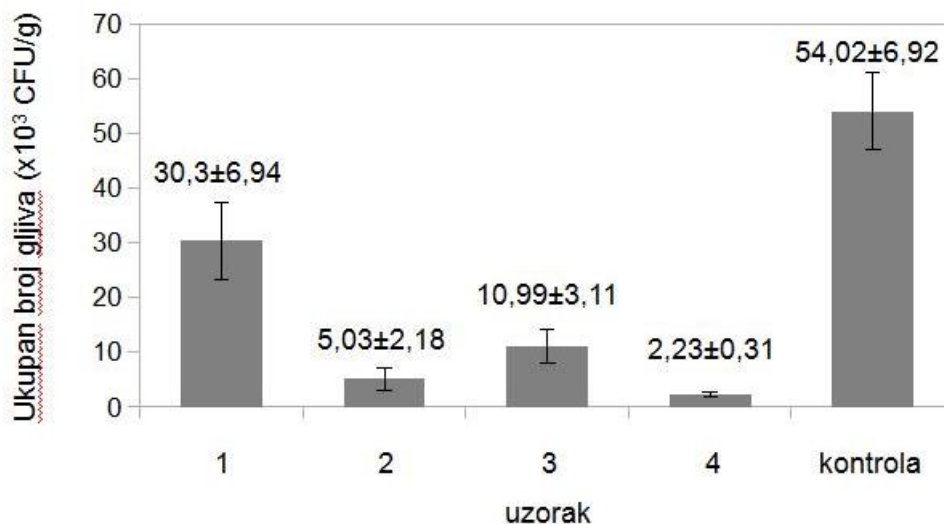
Gljive su sistematska grupa mikroorganizama koja, pomoću enzima, aktivno učestvuje u razlaganju organskih jedinjenja i usvajanju hranljivih elemenata, odnosno poboljšavanju ishrane biljaka [20]. Od kontaminiranih lokacija, najveća brojnost gljiva bila je u uzorku 1 ($30,3 \times 10^3$ CFU/g). Kruskal-

Wallis test pokazuje da postoje statistički značajne razlike između lokacija u ukupnom broju gljiva ($H=15,1665(4, N=15), p>0.05$).

Slično kao i kod ukupnog broja bakterija, najveća brojnost među uzorcima konstatovana je u kontrolnoj varijanti (grafik 2). I drugi autori su utvrdili da

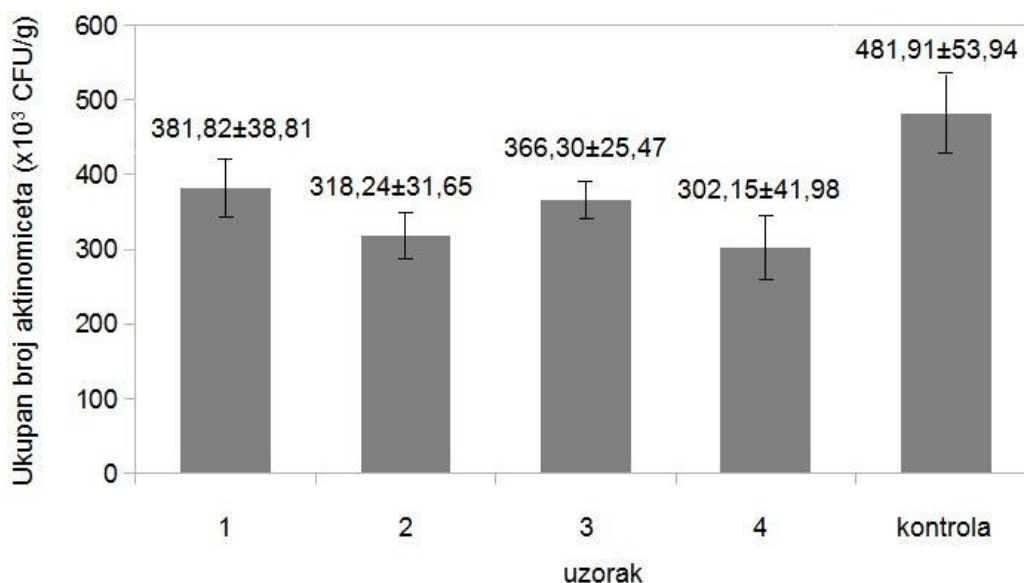
je ukupan broj gljiva bio manji u kontaminiranom zemljištu u odnosu na nekontaminirano [17]. Takođe, istraživanja ukazuju i da promena broja plesni u zemljištu zavisi od koncentracije i vrste metala [21]. Brojnost gljiva takođe zavisi i od udaljenosti od izvora kontaminacije i sezone uzorkovanja. U prethodnim istraživanjima utvrđena je negativna korelacija između broja gljiva i udaljenosti od izvora

kontaminacije, pri čemu je broj gljiva bio najveći u proleće a najmanji u jesen [22]. Isti autori su takođe utvrdili da je zastupljenost gljiva povezana sa vrstom teških metala u zemljištu. Međutim, drugi autori [23] opisuju rezistenciju nekih filamentoznih gljiva na prisustvo kadmijuma i nikla, što ukazuje na mogućnost njihove primene u bioremedijaciji kontaminiranih lokacija.



Grafik 2 - Brojnost gljiva u ispitivanim uzorcima

Osim gljiva, važnu ulogu u degradaciji organskih materija imaju i aktinomicete [24], koje nepristupačna jedinjenja transformišu do pristupačnih hranljivih materija [25].



Grafik 3 - Brojnost aktinomiceta u ispitivanim uzorcima

Brojnost aktinomiceta je, slično prethodnim rezultatima, najveća u kontrolnoj varijanti (grafik 3), što je potvrđeno i u istraživanjima drugih autora [26]. I kod ove sistematske grupe mikroorganizama prisutne su statistički značajne razlike u brojnosti između ispitivanih lokacija ($H=10.83(4, N=15), p>0.05$).

Kao i kod brojnosti gljiva, u uzorku sa lokacije jedan broj aktinomiceta bio je najveći, što se može povezati sa karakteristikama zemljišta.

Ukupna smanjenja zastupljenosti mikrobnih populacija u kontaminiranim uzorcima u odnosu na kontrolni iznosila su 60,6-93,0% za bakterije, 43,9-98,0% za gljive i 20,8-37,3% za aktinomicete. U

prethodnim istraživanjima konstatovana je redukcija broja aerobnih heterotrofnih bakterija za 47-67% u odnosu na nekontaminirano zemljište [27]. Isti autori ukazuju na manju osetljivost aktinomiceta prema prisustvu teških metala u zemljištu (stepen redukcije 20,2-31,3%), što je u skladu i sa našim istraživanjima.

4. ZAKLJUČAK

U ovim istraživanjima ispitan je uticaj višegodišnje kontaminacije teškim metalima na mikrobni diverzitet zemljišta u fabrici "Rog" (Slovenija). Rezultati ukazuju na smanjenje mikrobnog diverziteta u odnosu na kontrolnu lokaciju, a razlike u brojnosti bakterija, gljiva i aktinomiceta su statistički značajne. U narednom periodu ciljevi istraživanja biće usmereni ka detaljnijoj karakterizaciji mikrobnog diverziteta, uključujući i primenu molekularnih metoda za identifikaciju mikrobnih populacija.

Zahvalnica

Ova istraživanja su finansijski podržana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (TR 31080) i projekta EU Komisije AREA, ugovor br. 316004.

5. REFERENCE

- [1] H.L.Ehrlich (2002) Geomicrobiology. Forth edition. Marcel Dekker, New York.
- [2] A.Lenart-Boron, P.Boron (2014) The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils - a review, book "Environmental Risk Assessment of Soil Contamination", Editor M.C. Hernandez-Soriano, Intech open science, p. 759-784.
- [3] K.J.Appenroth (2010) Definition of "heavy metals" and their role in biological systems, book "Soil heavy Metals, Soil Biology", Editors I.Sherameti, A.Varma, Springer, Berlin, p. 19-29.
- [4] Q.Hu, H.Y.Qi, J.H.Zeng, H.X.Zhang (2007) Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine, *Journal of Environmental Sciences*, 19, 74-79.
- [5] P.Doelman, L.Haanstra (1984) Short-term and long-term effects of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn on microbial respiration in relation to abiotic soil factors, *Plant and Soil*, 79, 317-321.
- [6] D.Sobolev, M.F.T.Begonia (2008) Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(5), 450-456.
- [7] G.Tyler (1974) Heavy metal pollution and soil enzymatic activity, *Plant and Soil*, 41, 303-311.
- [8] G.Hafeburg, E.Kothe (2007) Microbes and metals: interactions in the environment, *Journal of Basic Microbiology*, 47, 453-467.
- [9] A.Lenart, K.Wolny-Kolacka (2013) The effect of heavy metal concentration and soil pH on the abundance of selected microbial groups within ArcelorMittal Poland steelworks in Cracow, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1), 85-90.
- [10] M.Šmejkalova, O.Mikanova, L.Boruvka (2003) Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms, *Plant Soil and Environment*, 49, 321-326.
- [11] S.Pavlin, L.Nevada, D.Ilić (2010) Studija sanacije bivše fabrike Rog. Nacrt upravljanja građevinskim otpadom, E-Net Okolje d.o.o. i Ekologija d.o.o.
- [12] I.L.Peper, C.P.Gerba, J.W.Brendencke (1995) *Environmental Microbiology*. Acad. Press, San Diego, p 11-33.
- [13] I.S.Andreeva, B.D.Belan, A.I.Borodulin, G.A.Buryak, V.A.Zhukov, M.V.Panchenko, V.V.Penenko, V.A.Petrishchenko, S.A.Safatov (2001) Variability of the content of 22 live microorganisms in the atmospheric aerosol in southern regions of western Siberia, *Doklady Biological Sciences*, 318(1-6), 530-534.
- [14] E.Fulladosa, J.C.Murat, M.Martínez, I.Villaescusa (2005) Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri*, *Chemosphere*, 60, 43-48.
- [15] F.Gremion, A.Chatzinotas, K.Kaufmann, W.V.Sigler, H.Harms (2004) Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment, *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 273-283.
- [16] L.Mandić, D.Djukić, V.Stevović (2005) The number of microorganisms in the soil under different grass-leguminous mixtures, *Biotechnology in animal husbandry*, 21(5-6), 175-179.
- [17] J.H.Chen, F.He, X.H.Zhang, X.Sun, J.F.Zheng, J.W.Zheng (2014) Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil, *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 164-181.
- [18] E.Baath, M.Diaz-Ravina, A.Frostegard, C.D.Campbell (1998) Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 238-245.
- [19] B.Berg, G.Ekbohm, B.Soderstrom, H.Staaf (1991) Reduction of decomposition rates of scots pine needle litter due to heavy-metal pollution, *Water Air Soil Pollution*, 59, 165-177.
- [20] J.J.Hoorman (2011) The role of soil fungus. Agriculture and natural resources, SAG-14-11. The Ohio State University, 1-6.
- [21] Đ.Ilić-Baus, V.Ilić, M.Karaman (2015) Uticaj Ni, Cu i Cd na brojnost filamentoznih gljiva u zemljištu sa zasadima klonova topole M1, PE19/66 i B229, *Zaštita materijala*, 56(4), 447-456.
- [22] D.Pečiulyte, V.Dirginčiute-Volodkiene (2009) Effect of long-term industrial pollution on microorganisms in soil of deciduous forests situated along a pollution gradient next to a fertilizer factory. 2. Abundance and diversity of soil fungi, *Ekologija*, 55(2), 133-141.

- [23] S.Akhtar, M. Mahmood-ul-Hassan, R. Ahmad, V. Suthor, M. Yasin (2013) Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent, *Soil and Environment*, 32(1), 55-62.
- [24] C.N.Seong, J.H.Choi, K.S.Baik (2001) An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil, *The Journal of Microbiology*, 39(1), 17-23.
- [25] Z.Miletić, Z.Radulović (2005) Biogenost organske prostirke različitih šumskih kultura na deposolima REIK "Kolubara", *Šumarstvo* 4, 11-20.
- [26] M.Vitezova (2013) Characterisation of actinomycetes community from the heavy metals-polluted soil, *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 61(5), 1471-1478.
- [27] A.Oliveira, M.E.Pampulha (2006) Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(3), 157-161.

ABSTRACT

MICROBIAL DIVERSITY OF SOIL CONTAMINATED WITH HIGH CONTENT OF HEAVY METALS

Except of benefits for human population, several industrial activities have a negative consequences i.e. increasing of heavy metal content and changes in diversity of living organisms in environment. The aim of this work was to examined the influence of high content of heavy metals on microbial diversity of soil. Researches was conducted at locations of former factory "Rog" (Ljubljana, Republic of Slovenia), by taking of four samples of contaminated soil, while the control was uncontaminated soil sample. Determination of microbial diversity (abundance of bacteria, fungi and actinomycetes) was performed using the standard methodology. The results of research showed that abundance of microorganisms depends on location and presence/absence of contamination. In control treatment abundance of all examined groups of microorganisms was higher compared with other samples. The bacterial number in contaminated samples was from 1.21 to 6.88×10^6 CFU/g, the number of fungi was from $1,08$ to $30,30 \times 10^3$ CFU/g, while actinomycetes number from $302,15$ to $381,82 \times 10^3$ CFU/g. In control treatment, bacterial number was $17,45 \times 10^6$ CFU/g, fungi number $54,02 \times 10^3$ CFU/g and actinomycetes number $481,91 \times 10^3$ CFU/g. These results confirms the importance of microbial diversity research on contaminated locations and potential applications of bioremediation technologies on locations of former factory "Rog".

Keywords: *microbial diversity, contamination, heavy metals, bacteria, fungi, actinomycetes*

Scientific paper

Paper received: 10. 02. 2016.

Paper accepted: 13. 03. 2016.

Paper is available on the website: www.idk.org.rs/journal