

# Uticaj olova i nikla na brojnost i rast gram pozitivnih i gram negativnih bakterija

---

*Primenom spektrofotometrijskog i metoda razređenja ispitan je uticaj olova i nikla na rast i brojnost sojeva gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. U ispitivanju su korišćeni sojevi Bacillus thuringiensis i Escherichia coli SY252. Dobijeni rezultati pokazuju da nikl i olovo deluju negativno na rast i brojnost ispitivanih sojeva. Negativan uticaj ovih metala se ogleda u dužoj lag fazi u odnosu na kontrolne uzorke. Sa smanjenjem koncentracija ovih metala raste otpornost na njihovo dejstvo. Poredeći toksičnost nikla i olova zaključuje se da nikl toksičnije deluje na ispitivane sojeve. Soj E. coli je otporniji od soja B. thuringiensis, što ide u prilog tvrdnji da su gram negativne bakterije otpornije na dejstvo teških metala u odnosu na gram pozitivne bakterije.*

---

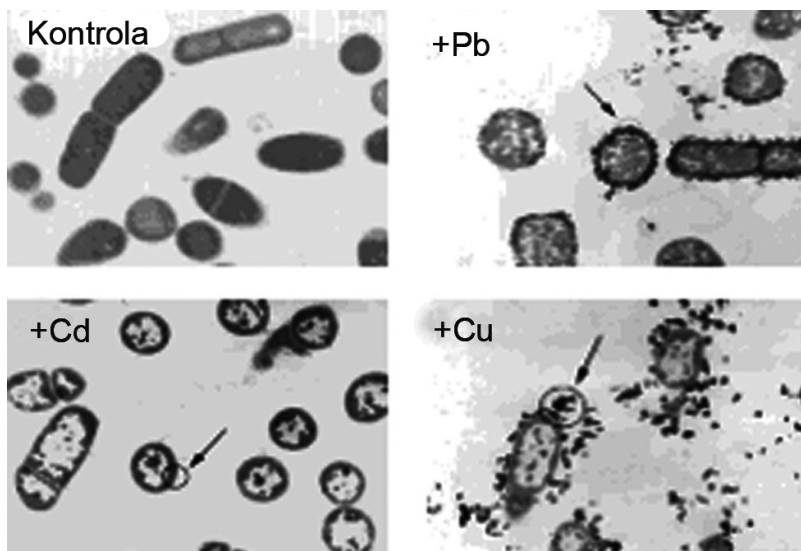
## Uvod

Teški metali spadaju među najopasnije zagađivače biosfere. U izuzetno malim koncentracijama imaju veoma bitnu ulogu u funkcionisanju mnogih organizama. Međutim, u povećanim količinama mogu biti toksični (Fellenberg 1990). Ugrađuju se u biomasu bakterija i biljaka, a zatim lancem ishrane dospevaju u organizam životinja i čoveka, delujući negativno na njihovu životnu aktivnost. Toksično dejstvo teških metala na mikroorganizme se ispoljava u inhibiranju njihovog metabolizma i rasta, kao i u izmenama u morfologiji. Njihova toksičnost zavisi od njihove lokalizacije i morfoloških karakteristika bakterijske ćelije (Jemcev i Đukić 2000). Mehanizmi koji obezbeđuju otpornost mikroorganizama na uticaj teških metala su biološka transformacija i delimična detoksikacija određenih teških metala. Ovi mehanizmi su često genetički uslovljeni (Jemcev i Đukić 2000). Utvrđeno je da ćelijski zidovi i membrane gram pozitivnih i gram negativnih bakterija apsorbuju veliku količinu teških metala (slika 1, Kim *et al.* 2007). Gram negativne bakterije su tolerantnije na teške metale od gram pozitivnih bakterija (Barkay *et al.* 1985). Neki teški metali lokalizuju samo na ćelijskim zidovima i membranama, dok se neki apsorbuju i lokalizuju unutar ćelije (Hausinger 1987).

---

*Marjan Biočanin  
(1991), Beograd, Ilije  
Stojadinovića 8,  
učenik 3. razreda XIII  
beogradske gimnazije*

*MENTOR:  
Jelena Savić,  
dipl. biolog*



Slika 1.  
Kontrolni mikroskopski preparat *Bacillus* spp. i mikroskopski preparati *Bacillus* spp. sa teškim metalima (Pb, Cd i Cu) na ćelijskim zidovima (Kim *et al.* 2007)

Figure 1.  
Control microscopic sample *Bacillus* spp. and microscopic samples with heavy metal ions (Pb, Cd and Cu) (Kim *et al.* 2007)

**Cilj** ovog rada je ispitivanje uticaja različitih koncentracija nikla i olova na gram pozitivne i gram negativne bakterije. Definisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

- utvrđivanje preživljavanja određenih sojeva gram pozitivnih i gram negativnih bakterija pri različitim koncentracijama nikla i olova u hranljivim podlogama;
- praćenje rasta i brojnosti sojeva pri različitim koncentracijama olova i nikla u hranljivim podlogama;
- poređenje dužina lag faza ispitivanih sojeva;
- utvrđivanje zavisnosti dužine lag faze od koncentracije teških metala;
- međusobno poređenje dobijenih rezultata.

## Materijal i metode

Ispitivanje uticaja nikla i olova na gram pozitivne i gram negativne bakterije se sastoji iz dva dela. U prvom delu ispitan je uticaj pet različitih koncentracija olova i nikla na preživljavanje sojeva *B. thuringiensis* i *E. coli*. U epruvete sa hranljivim podlogama dodati su rastvori teških metala koncentracija 50 mg/L, 5 mg/L, 0.5 mg/L, 0.05 mg/L i 0.005 mg/L. Pored teških metala u LB podlogu su dodati sojevi *B. thuringiensis* i *E. coli*. Kao negativna kontrola korišćena je LB podloga bez dodatka teških metala sa datim sojevima. Epruvete su ostavljene u termostatu na temperaturi od 37°C narednih 12 h. Nakon 12 h na spektrofotometru su očitane apsorbance bakterijskih suspenzija. Apsorbance su očitavane na talasnoj dužini od 600 nm. Na osnovu dobijenih rezultata prvog dela istraživanja odabrane su dve koncentracije za praćenje rasta i brojnosti

ispitivanih sojeva. U drugom delu ispitivanja je spektrofotometrijskom i metodom razređenja praćen je rast i brojnost ispitivanih sojeva. U erlenmajerima sa LB podlogom su pomešani  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  koncentracija od 50 mg/L i 0.05 mg/L. U iste erlenmajere dodati su sojevi bakterija *E. coli* i *B. thuringiensis*. Kao negativna kontrola i u ovom delu ekperimenta korišćena je LB podloga bez dodatka teških metala, sa zasejanim sojevima. U određenim vremenskim intervalima (0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minuta) na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 600 nm očitavana je apsorbanca suspenzija. Pored toga, metodom razređivanja su zasejani ispitivani sojevi. Nakon 12 h izbrojane su kolonije. Broj kolonija je iskoršćen za računanje broja ćelija po mL podloge. Broj živih ćelija po mL podloge dobijen je deljenjem broja kolonija proizvodom razređenja  $r$  i zasejanom zapreminom razređenja,  $V$  (Knežević-Vukčević i Simić 1997):

$$\text{Broj živih ćelija/mL} = \text{broj kolonija} / (r \cdot V)$$

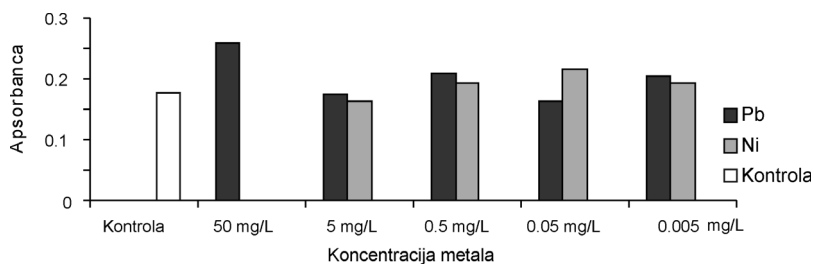
Numeričke vrednosti dobijene očitavanjem podataka sa spektrofotometra i računanjem broja ćelija po mL podloge upotrebljene su za konstruisanje krive rasta.

## Rezultati i diskusija

Rezultati prvog dela istraživanja, u kojem je ispitivan uticaj različitih koncentracija olova i nikla na preživljavanje sojeva *B. thuringiensis* i *E. coli*, prikazani su na slikama 2 i 3. Visoke vrednosti apsorbance pri koncentraciji olova od 50 mg/L mogu se objasniti time što je olovo, nakon akumulacije od strane bakterijskih ćelija, omogućilo veću apsorpciju svetlosti. Apсорpcija nikla u ćelije, i smrt velikog broja ćelija, imala je za rezultat apsorbancau jednaku nuli. Od pet datih koncentracija za dalje ispitivanje su odabrane koncentracije od 50 i 0.05 mg/L.

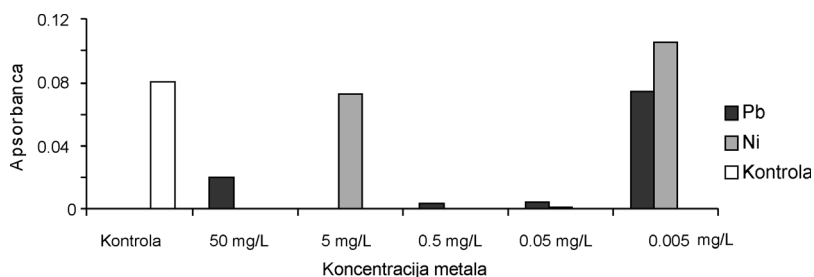
Na slikama 4a – 4d prikazani su rezultati drugog dela istraživanja, tj. početni deo krive rasta ispitivanih sojeva. Kod oba soja tretirana teškim metalima zapaža se duža lag faza u odnosu na kontrolu (slika 4a). Sa smanjenjem koncentracije metala lag faza je kraća. Uticaj teških metala na rast i brojnost bakterija se ogleda u dužini lag faze jer se u toj fazi ispitivani sojevi adaptiraju na uslove sredine (Tumanov i Krest'yaninov 2004). Pri poređenju ispitivanih sojeva može se zaključiti da je pri višim koncentracijama teških metala lag faza kraća kod soja *E. coli*. Pri nižim koncentracijama teških metala dužine lag faza su slične.

Poredeći dejstvo nikla i olova vidi se da nema razlike u dužinama lag faze. Kod ispitivanih sojeva brojnost živih ćelija se povećava sa smanjenjem koncentracije teških metala u podlozi. Brže metaboličke aktivnosti mogu dosta značiti u prilagođavanju i toleranciji na dejstvo teških metala iz spoljašnje sredine. Takođe, razlike u građi ćelijskih zidova kod sojeva



Slika 2.  
Apsorbance suspenzija *E. coli* pri različitim koncentracijama nikla i olova

Figure 2.  
Absorbance of suspensions of *E. coli* at different concentrations of nickel and lead ions

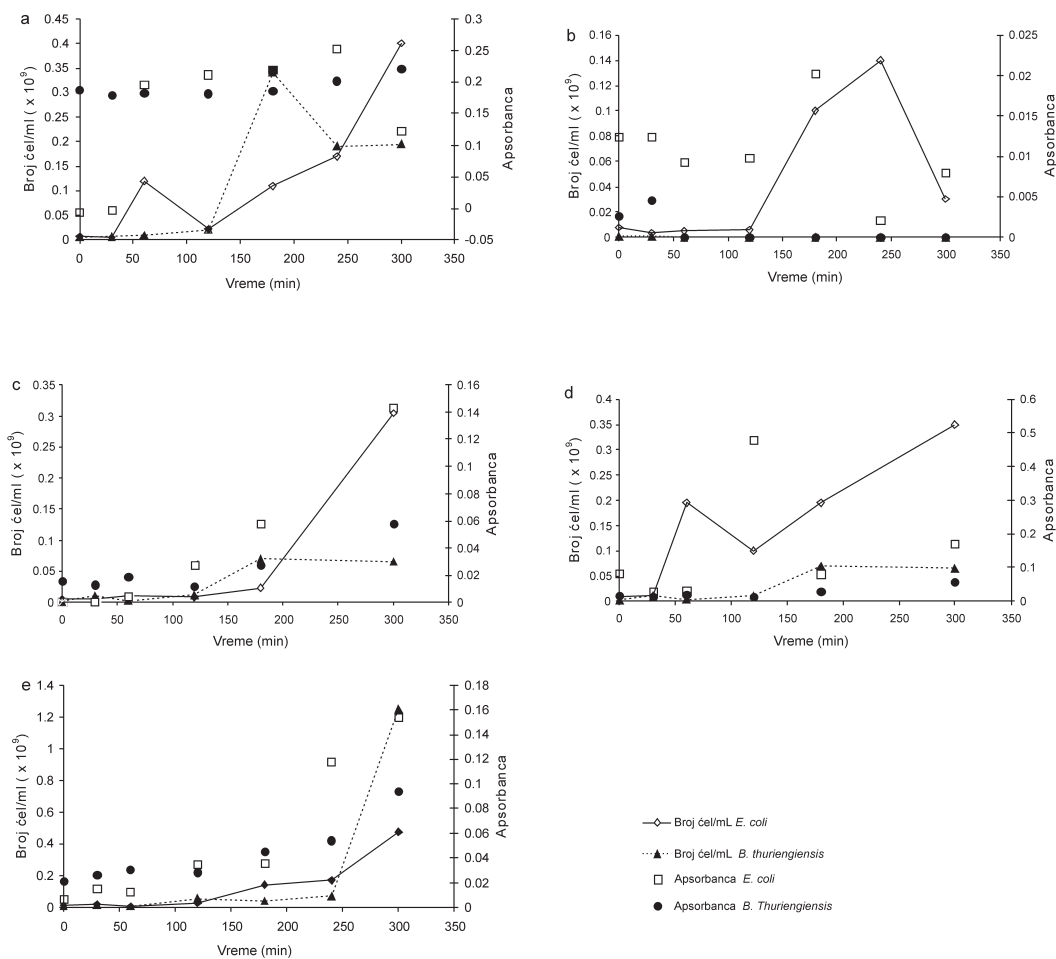


Slika 3.  
Apsorbance suspenzija *B. thuringiensis* pri različitim koncentracijama nikla i olova

Figure 3.  
Absorbance of suspension of *B. thuringiensis* at different concentrations of nickel and lead ions

*E. coli* i *B. thuringiensis* su odgovorne za različitu rezistentnost na dejstvo teških metala. Pored toga, olovo i nikel različito reaguju i različito se lokalizuju u ćeliji. Nikel se ne zadržava samo na ćelijskom zidu, već se pomoću energetske zavisnih sistema transportuje u ćeliju (Hausinger 1987). Prema podacima iz literature, sporiji transport nikla u ćeliju smanjuje njegovu toksičnost (Campbell i Smith 1986). Pri visokoj koncentraciji od 50 mg/L transport se ubrzava. Apsorbance jednaka nuli je posledica apsorpcije nikla od strane ćelije, kao i smrti velikog broja ćelija. S druge strane, olovo ne prodire u toj meri u ćeliju, već se većim delom zadržava na i u ćelijskom zidu i ćelijskoj membrani. Delujući spolja, ono onemogućava normalan metabolizam odnosno život ćelije. Nikel deluje negativnije na ćelije u odnosu na olovo, posebno pri koncentraciji od 50 mg/L. Pri koncentraciji od 0.05 mg/L razlika u negativnom dejstvu ova dva metala je manja.

Poredeći dejstvo teških metala na brojnost i rast sojeva *E. coli* i *B. thuringiensis* može se zaključiti da je *E. coli* otpornija. Razlika u otpornosti je najvidljivija pri koncentraciji nikla od 50 mg/L (slika 4b). Razlike u strukturi ćelijskog zida su, verovatno, jedan od razloga veće otpornosti soja *E. coli* zbog kompleksnije građe ćelijskog zida. Te razlike nisu jedini razlog veće otpornosti *E. coli* u odnosu na *B. thuringiensis*. Brži rast (slika 4a) soja *E. coli* u odnosu na soj *B. thuringiensis*, je, takođe, razlog veće otpornosti soja *E. coli*.



Slika 4. Krive rasta: u kontrolnim uzorcima (a) i pri koncentracijama nikla 50 mg/L (b), nikla 0.05 mg/L (c), olova 50 mg/L (d), i olova 0.05 mg/L (e)

Figure 4. Growth curves: in control samples (a), and at nickel concentrations of 50 mg/L (b) and 0.05 mg/L (c), and at lead concentrations of 50 mg/L (d) and 0.05 mg/L (e)

## Zaključak

Nikl i olovo deluju negativno na rast i brojnost sojeva *E. coli* i *B. thuringiensis*. Negativan uticaj ovih metala se ogleda u dužoj lag fazi u odnosu na kontrolne uzorke. Sa smanjenjem koncentracije teških metala raste otpornost ispitivanih sojeva na toksično dejstvo teških metala. Poredeći toksičnost nikla i olova zaključuje se da nikl toksičnije deluje na ispitivane sojeve. Soj *E. coli* je otporniji na dejstvo nikla i olova od soja

*B. thuringiensis*, što ide u prilog tvrdnji da su gram negativne bakterije otpornije na dejstvo teških metala u odnosu na gram pozitivne bakterije. U budućim istraživanjima bilo bi interesantno proučavati kombinovano, kao i dejstvo nižih koncentracija ovih metala na brojnost i rast gram pozitivnih i gram negativnih bakterija.

---

## Literatura

- Barakay T., Tripp S. C., Olson B. H. 1985. Effect of metal rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 333.
- Campbell P. M., Smith G. D. 1986. Transport and accumulation of nickel ions in the cyanobacterium *Anabaena cylindrical*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 244: 470
- Fellenberg G. 1990. *Chemie der Umweltbelastung*. Stuttgart: Teubner Studienbücher
- Hausinger R. P. 1987. Nickel Utilization by Microorganisms. *Microbiological Reviews*, 51: 22
- Jemcević V., Đukić D. A. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojna knjiga
- Kim S. U., Cheong Y. H., Seo D. C., Hur J. S., Heo J. S., Cho J. S. 2007. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp). *Water Science and Technology*, 55: 105
- Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji*, prvi deo. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Tumanov A. A., Krest'yaninov P. A. 2004. Combined Effects of Heavy Metal Ions on Bacteria and the Determination of Heavy Metals by Bioassay. *Journal of Analytical Chemistry*, 59: 788.

---

*Marjan Biočanin*

## Lead and Nickel Effects on Number and Growth of Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Influence of nickel and lead ions on growth and number of Gram-positive and Gram-negative bacteria was researched using spectrophotometry and pour-plate technique. In this research *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* SY252 strains were used. Nickel and lead ions inhibited growth and number of this bacteria. Negative impact of these metals is reflected in a longer lag phase than in the control samples. Nickel is more toxic than lead on the examined strains. Gram-negative bacteria showed more resistance than Gram-positive bacteria as well.

