

## Uticaj kiselih kiša i povećane koncentracije mineralnih materija na rast *Azotobacter*

---

*Ispitivan je uticaj kiselih kiša i zagađenja zemljišta na kolonije Azotobacter. Azotobacter, izolovan iz zemljišta blizu Istraživačke stanice Petnica, tretiran je sumpornom kiselinom, natrijum-fosfatom, kalcijum-hloridom i natrijum-hloridom. Konstatovan je i pozitivan i negativan uticaj svih ispitivanih jedinjenja na broj kolonija i rast Azotobacter, u zavisnosti od koncentracije.*

---

### Uvod

Azot je jedan od najvažnijih nutrijenata od kojih zavisi rast biljaka i njihov prinos (Sarić 1991). Većini biljaka je nedostupan molekularni azot (N<sub>2</sub>), koji se nalazi u atmosferi, te ga zato usvajaju iz zemljišta u obliku nitrata (Sarić 1991). Transformacija azota iz molekularnog azota u oblik nitrata dešava se u složenom procesu azotofiksacije, koji se odigrava u bakterijama rodova *Azotobacter*, *Clostridium* i *Rhizobium* (*ibid.*).

*Azotobacter* je zemljišna bakterija. Mlade ćelije *Azotobacter* su štapići, kasnije se transformišu u krupne koke. Kokoidne ćelije su obično obavijene kapsulom. Štapičaste ćelije imaju treplje koje su pokretne, a pri prelaženju u stadijum koka treplje se gube. Sve vrste *Azotobacter* su aerobne. Aktivne kulture fiksirau 15-20 mg azota po gramu organske supstance (Volk & Wheeler 1988).

Opstanak *Azotobacter* može zavistiti i od koncentracije hemijskih elemenata koji su potrebni za opstanak i od koncentracije drugih hemijskih elemenata poput fosfora, kalcijuma, natrijuma, kalijuma, sumpora, azota i drugih elemenata, koji se u zemljištu nalaze u malim koncentracijama (Parker 1984).

Kisele kiše posledica su zagađenja atmosfere i sadrže sumpornu, azotnu, hlorovodoniču i neke organske kiseline. pH vrednost kiselih kiša je oko 4. Kisele kiše uništavaju biljne kulture na području na kom se javljaju (Lakušić 2002).

**Cilj** ovog rada je ispitivanje uticaja razblažene sumporne kiseline, natrijum-fosfata, kalcijum-hlorida i natrijum-hlorida na brojnost *Azotobacter*.

### Materijal i metode

Uzorkovano je zemljište u blizini Istraživačke stanice Petnica u cilju izolovanja sojeva vrste *Azotobacter* sp. Sa njive površine 100 m<sup>2</sup> uzeta su 4 uzorka i pomešana. Po grudvica zemlje iz ove mešavine zasejavana je u tečnu podlogu i ostavljena da inkubira 24-48 h na temperaturi 37°C. Metodom iscrpljivanja prekonocne kulture bakterija su zasejane na selektivne čvrste podloge radi dobijanja pojedinačnih kolonija. Pojedinačne kolonije su zasejane u tečnu podlogu i ponovljen je postupak prečišćavanja kulture.

Nakon što je čista kultura *Azotobacter* izolovana iz uzorka zemljišta, bakterija je zasejavana u tečne podloge. U svaku podlogu dodata je H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 4) ili jedna od tri soli (CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl). Napravljen su četiri grupe od po tri epruvete. Prva grupa je tretirana razblaženom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u koncentracijama od 5, 10 i 15 procenata. Druga grupa je tretirana rastvorom CaCl<sub>2</sub> u istim koncentracijama. Treća grupa je tretirana rastvorom Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a četvrta rastvorom NaCl, takođe u koncentracijama od 5, 10 i 15 procenata. Kao kontrola korišćen je uzorak bakterija zasejan u LB podlogu. Nakon 48-72 časa napravljena su decimalna razblaženja radi dobijanja prebrojivog broja kolonija. U Petri šolje su zasejavane suspenzije bakterija u razblaženjima od od 10<sup>-6</sup>

---

Vera Jovanović (1992), Čačak, *Kuželjeva 24/6*, učenica 1. razreda Gimnazije u Čačku

MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog

ili  $10^{-10}$  na hranljive LA podloge. Potom je određivan ukupan broj živih mikroorganizama indirektnom metodom prema obrascu (Knežević & Simić 2006):

$$\text{broj bakterija} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{razblaženje} \times \text{zapremina supstrata}}$$

Sve hranljive podloge pripremane su po recepturama iz udžbenika Knežević & Simić (2006).

## Rezultati i diskusija

Na kontrolnom uzorku je izraslo 5 kolonija. Na podlogama na kojima su zasejane tretirane bakterije dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 1, a preračunavanjem je dobijen broj bakterija dat u tabeli 2.

Tabela 1. Broj bakterijskih kolonija

	razblaž.	5%	10%	15%
kontrola	$10^{-6}$	5	5	5
CaCl <sub>2</sub>	$10^{-6}$	1	190	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$10^{-6}$	176	136	120
NaCl	$10^{-6}$	8	17	5
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	$10^{-6}$	n.p.	164	516
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	$10^{-10}$	0	8	11

Tabela 2. Broj bakterijskih ćelija po mL (u milijardama,  $10^9$ )

	5%	10%	15%
kontrola	0.05	0.05	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.01	1.9	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.76	1.36	1.2
NaCl	0.08	0.17	0.05
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	n.p.	1.64	5.16
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0	0.08	0.11

Najveći broj kolonija je izrastao na podlozi koja je bila tretirana 15% rastvorom Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (tabela 1). Najmanji broj kolonija je izrastao na podlozi koja je bila tretirana 15% rastvorom CaCl<sub>2</sub>. Natrijum-fosfat je pozitivno uticao na rast i razmnožavanje te je

izraslo 516 kolonija. Na podlozi koja je bila tretirana 15% CaCl<sub>2</sub> nije izrasla nijedna kolonija, a u Petri šolji sa 10% CaCl<sub>2</sub> izraslo je 190 kolonija (tabela 1). Sumporna kiselina je dovela do povećanja broja bakterijskih kolonija.

## Efekat kiselih kiša

Petoprocentna koncentracija sumporne kiseline ("kisela kiša") pozitivno je delovala na bakteriju budući da je izraslo je 176 kolonija. Na hranljivoj podlozi na kojoj je zasejan uzorak tretiran 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> izraslo je 136 kolonija. Uzorak koji je tretiran sa 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dao je 120 kolonija. Dakle, povećanjem koncentracije H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> opada broj kolonija. Dodavanje rastvora sumporne kiseline u podlogu dovelo je do povećanja broja kolonija jer je pH vrednost rastvora iznosila 4 tako da se pH čitave podloge kretala od 6 do 8, što je optimalna pH za *Azotobacter*.

## Efekat različitih koncentracija mineralnih materija

Uzorak tretiran 5% rastvorom natrijum-fosfata na zasejanju bakterijske suspenzije razblaženja  $10^{-6}$ , stvorio je tepih na čvrstoj podlozi, verovatno usled neuspešnog zasejavanja. Uzorci koji su tretirani sa 10% i 15% natrijum-fosfatom bili su prebrojivi; na hranljivim podlogama izrasle su 164, odnosno 516 kolonija. Na uzorku razblaženja  $10^{-10}$  koji je bio tretiran sa 5% natrijum-fosfatom nije izrasla nijedna kolonija, verovatno usled velikog razblaženja. Na hranljivoj podlozi, na kojoj je zasejan  $10^{-10}$  uzorak tretiran sa 10% natrijum-fosfatom, izraslo je 8 kolonija. Uzorak tretiran sa 15% Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dao je 11 kolonija. Broj kolonija je manji nego u prvom slučaju, jer je razblaženje veće. Natrijum-fosfat je pozitivno uticao na broj kolonija, jer, osim u kruženju azota, *Azotobacter* učestvuje i u kruženju fosfora.

Uzorak tretiran 5% NaCl dao je 8 kolonija; uzorak tretiran 10% NaCl dao je 17 kolonija a uzorak tretiran 15% NaCl dao je 5 kolonija. Natrijum-hlorid je u ovom slučaju uticao na povećanje broja kolonija, tj. delovao je pozitivno na rast bakterija.

Zasejavanjem uzorka koji je bio tretiran sa 5% CaCl<sub>2</sub> na hranljivoj podlozi je izrasla 1 kolonija, tj. 5% rastvor CaCl<sub>2</sub> je delovao negativno na *Azotobacter*. Uzorak tretiran 10% rastvorom je omogućio rast 190 kolonija. Dakle, kalcijum-hlorid je u ovom slučaju veoma pozitivno uticao na *Azotobacter*.

15-postotni rastvor kalcijum-hlorida inhibitorno je uticao na bakterije; zasejavanjem uzorka na hranljivoj podlozi nije se razvila nijedna kolonija.

## Zaključak

Zagađenje zemljišta je posledica niza međusobno povezanih faktora. U eksperimentu nisu stvarani uslovi kakve bi bakterije imale u zagađenom zemljištu, već je testiran uticaj pojedinih supstanci čija je povećana koncentracija karakteristična za zagađena zemljišta ili za zemljišta pod uticajem kiselih kiša. Povećanje koncentracije kalcijum-hlorida i natrijum-hlorida pokazuje efekat stopiranja rasta ispitivanog soja *Azotobacter*.

---

## Literatura

Jemen V., Dukić D. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojno-istraživački centar.

Knežević J., Simić D. 2006. *Metode u mikrobiologiji*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.

Lakušić D. 2002. *Biologija za sedmi razred osnovne škole*. Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika.

Parker M. T. 1984. *Principes of bacteriology, virology and immunity*. London: Butler and Tarnier.

Sarić Z. 1991. *Opšta biologija*. Beograd: Nauka.

Volk W., Wheeler M. 1988. *Basic Mikrobiology* (6. izdanje). New York: Harpwe and Row.

---

Vera Jovanović

## Influence of Acid Rains and Polluted Soil on Growth of *Azotobacter*

Soil on colonies of *Azotobacter* were tested upon effects of acid rains and pollution. *Azotobacter*, isolated from soil near Petnica Science Center, was treated with sulfonic acid, Na-phosphate, Ca-chloride and Na-chloride. Effect of all the tested substances on the number and the growth of colonies varied, and was dependent of the concentration used.

