

Ispitivanje uticaja bakterije *Escherichia coli* na proces biosinteze hlorofila a i b kod klica pšenice (*Triticum vulgare* L.)

Klice pšenice (*Triticum Vulgare* L.) tretirane su različitim koncentracijama bakterijske kulture *Escherichia coli* radi utvrđivanja uticaja ove bakterije na proces biosinteze hlorofila i rast i razvoj klica. U eksperimentu je korišćena metoda decimalnog razblaženja radi određivanja početne brojnosti bakterija u eksperimentalnim grupama. Korišćena je i spektrofotometrijska metoda za utvrđivanje koncentracije sintetisanog hlorofila u tretiranim uzorcima. Rezultati su pokazali da sa porastom koncentracije bakterijske kulture kojom su klice tretirane raste i koncentracija sintetisanog hlorofila, kao i masa nadzemnih, zelenih delova klica. Pretpostavlja se da pozitivan uticaj bakterije potiče od njene sposobnosti da sintetiše vitamine K i B, no ta pretpostavka ovim eksperimentom nije dokazivana i to može biti tema za neko naredno naučno istraživanje. Pokazano je da se eventualnim tretiranjem zemljišta đubrivom koje sadrži ovu bakterijsku kulturu može povećati njegova plodnost i omogućiti bolji biljni prinos.

Uvod

Najvažnija svojstva zemljišta, prvenstveno struktura i plodnost, uslovljena su aktivnim radom mikroorganizama u njemu. Bez njihovog prisustva, zemljište nikad ne bi dobilo organske materije, postalo plodno i sposobno da snabdeva biljni svet (Đukić i Jemcević 2000).

U zemljištu su od svih mikroorganizama kvantitativno najzastupljenije bakterije. One sa biljkama stupaju u najrazličitije vrste simbiotskih odnosa. Osim

što omogućavaju proces kruženja materije, bakterije isto tako mogu sprečiti razvoj fitopatogena, stvarajući mnoga jedinjenja antibiotskog efekta. Prisustvo bakterija takođe može imati negativan efekat na biljni organizam (Đukić i Jemcević 2000).

Bakterija *Escherichia coli* prirodni je stanovnik digestivnog trakta životinja (Simić 1988). Stajsko đubrivo doprinosi plodnosti zemljišta, a u njemu su prisutne mnoge bakterije digestivnog trakta, pa postoji verovatnoća da ova bakterija može aktivno uticati na životne procese biljaka. Jedna od bitnih jedinjenja koje ova bakterija može sintetisati i oslobađati u spoljašnju sredinu su vitamini K i B, jedinjenja neophodna u životu kako životinja, tako i biljaka (Simić 1988).

Cilj ovog istraživanja je da se odredi kakav efekat bakterija *E. coli* ima na razvoj pšeničnih klica, odnosno kakav je njen uticaj na proces biosinteze hlorofila a i b.

Materijal i metode

Semena pšenice (*Triticum vulgare* L.), proizvođača Floridabel, starost tri godine isključavana su u mraku, a potom su klice tretirane različitim koncentracijama bakterijske suspenzije *Escherichia coli*. Klice su raspoređene u četiri eksperimentalne grupe, gde je prva tretirana sa 1 mL, druga sa 2 mL, treća sa 4 mL, a četvrta sa 8 mL bakterijske suspenzije. Praćen je uticaj bakterije na rast i koncentraciju sintetisanog hlorofila. Merena je zelena biljna masa nadzemnih delova klica. Koncentracija sintetisanog hlorofila a i b određena je spektrofotometrijski.

Tretiranje klica bakterijskom kulturom. Seme-
na su isključavana u mraku, na temperaturi $25 \pm 2^\circ\text{C}$, na vlažnoj vati u termostatu. Nakon isključavanja, u 10

Iva Atanasković (1993), Beograd, Kneza Miloša 64, učenica 1. razreda gimnazije „Sveti Sava“ u Beogradu

MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog,
XII beogradska gimnazija

Petrijevih šolja stavljeno je po 20 klica na sterilnu vatu. Transport semena iz termostata u Petrijeve šolje vršen je u odsustvu Sunčeve svetlosti. Time je sprečen proces biosinteze hlorofila pre tretiranja klica bakterijskom kulturom.

Prekonoćna kultura *E. coli* razređena je metodom decimalnih razblaženja. Bakterijska suspenzija je koncentrovana tako što je iz epruveta sa razblaženjem 10^{-6} sterilno pipetirano po 1 mL kulture u Petri šolje prve grupe, po 2 mL u drugu grupu, po 4 mL u treću grupu i po 8 mL u četvrtu grupu. Peta grupa je kontrolna i nije tretirana bakterijskom suspenzijom. Brojnost bakterija u kulturi kojom su klice tretirane takođe je određena metodom decimalnih razblaženja (Knežević-Vukčević i Simić 1997).

Tokom noći klice su ostavljene na podlozi sa bakterijskom kulturom i tako izložene uticaju bakterija. Ukupno trajanje tretmana je 72 h. Ujutru su izložene Sunčevoj svetlosti da bi se podstakla biosinteza hlorofila. Svakodnevno su zalivane česmenskom vodom, i to sa po 5 mL po Petri šolji. Vata i voda kojom su semena tretirana sterilisane su u autoklavu ($T = 121^{\circ}\text{C}$, $P = 1.2$ bar), radi sigurnosti da su klice izložene samo uticaju bakterije *Escherichia coli*.

Određivanje koncentracije hlorofila a i b u pšeničnim klicama. Kada su se listovi pšenice dovoljno razvili i ozeleneli pristupilo se određivanju koncentracije hlorofila a i b metodom spektrofotometrije iz dva koraka (Ćulafić *et al.* 1992). U prvom koraku izvršena je acetonska ekstrakcija hlorofila iz uzoraka svake grupe. Zatim je pomoću spektrofotometra određena apsorbanca acetonskog ekstrakta klica iz svih pet grupa. Apsorbance su merene na 663 nm, 645 nm i 720 nm. Merenja su ponovljena po dva puta za svaki uzorak i izračunata je srednja vrednost za svaku talasnu dužinu. Hlorofil ne apsorbuje svetlost na talasnoj dužini od 720 nm, pa je merenjem na toj talasnoj dužini određena apsorbanca svih drugih pigmenata i nečistoća prisutnih u ekstraktu. Oduzimanjem te apsorbanice od one na 663 nm dobijena je apsorbanca hlorofila a, dok je oduzimanjem od apsorbanice na 645 nm dobijena apsorbanca hlorofila b (Sarić 1979). Korišćenjem formule: $C_a = 14.92A_{663} - 2.9A_{645}$ dobijena je koncentracija hlorofila a, dok je koncentracija hlorofila b dobijena korišćenjem formule: $C_b = 25.21A_{645} - 5.15A_{663}$ (Ćulafić *et al.* 1992). Sabiranjem vrednosti C_a i C_b dobijena je ukupna koncentracija hlorofila u uzorku.

Rezultati i diskusija

Početna brojnost živih bakterijskih ćelija *E. coli* u uzorcima kojim su eksperimentalne grupe tretirane data je u tabeli 1. U tabeli 2 data je masa nadzemnih delova klica izmerena u eksperimentalnim grupama. Iz grafikona prikazanog na slici 1 vidi se porast biljne mase sa porastom intenziteta tretmana bakterijskom suspenzijom. Kontrola je imala manje biljne mase od eksperimentalnih grupa, svega 0.08 g. Najviše biljne mase izmereno je u IV grupi, gde je bilo oko 5 puta više biljne mase nego u kontroli.

Tabela 1. Početni broj živih bakterijskih ćelija

Eksperimentalna grupa	Zapremina bakterijske kulture [mL]	Broj bakterija [10^9 mL^{-1}]
I	1	0.218
II	2	0.437
III	4	0.874
IV	8	1.748

Tabela 2. Masa nadzemnih delova klica u eksperimentalnim grupama

Eksperimentalna grupa	m [g]
K1	0.068
K2	0.083
K srednja vrednost	0.075
I1	0.233
I2	0.161
I srednja vrednost	0.197
II1	0.292
II2	0.242
II srednja vrednost	0.267
III1	0.306
III2	0.254
III srednja vrednost	0.280
IV1	0.394
IV2	0.367
IV srednja vrednost	0.380

Tabela 3. Koncentracija hlorofila a i b u eksperimentalnim grupama. C_a – koncentracija hlorofila a, C_b – koncentracija hlorofila b, C_{a+b} – ukupna koncentracija hlorofila.

Eksp. grupa	A645	A663	C_a [$\mu\text{mol/L}$]	C_b [$\mu\text{mol/L}$]	C_{a+b} [$\mu\text{mol/L}$]
K1	0.07	0.17	2.46	0.85	3.31
K2	0.11	0.23	3.11	1.58	4.69
K srednja vrednost	0.09	0.2	2.78	1.21	4
I1	0.23	0.62	8.58	2.83	11.42
I2	0.17	0.56	7.85	1.5	9.36
I srednja vrednost	0.2	0.59	8.21	2.16	10.39
II1	0.37	0.85	11.67	4.89	16.57
II2	0.28	0.75	10.42	3.29	13.72
II srednja vrednost	0.32	0.8	11.04	4.09	15.14
III1	0.39	1.04	14.39	4.69	19.07
III2	0.41	1.07	14.8	4.91	19.71
III srednja vrednost	0.4	1.05	14.59	4.8	19.39
IV1	0.57	1.51	20.93	4.91	25.84
IV2	0.62	1.63	22.53	7.25	29.78
IV srednja vrednost	0.59	1.57	21.73	6.09	27.81

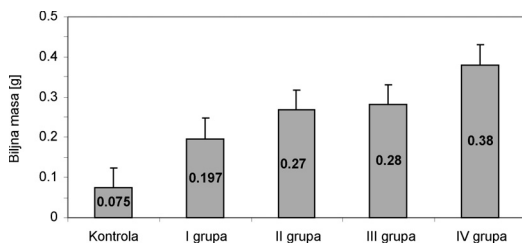
U tabeli 3 date su koncentracije sintetisanog hlorofila a i b u eksperimentalnim grupama. Iz grafikona prikazanog na slici 2 vidi se porast koncentracije sintetisanog hlorofila sa porastom koncentracije bakterijske suspenzije korišćene u tretmanu. Kontrola je imala manje koncentracije hlorofila od eksperimentalnih grupa, svega 4 $\mu\text{mol/L}$. Najveća koncentracija hlorofila izmerena je u IV grupi, gde je sintetisano oko sedam puta više hlorofila nego u kontroli.

Takođe su zapaženi crveni regioni na stabacima klica u eksperimentalnim grupama (slika 3C), dok u kontroli pojave crvenila nije bilo. Zato se pretpo-

stavlja da je ova pojava upravo posledica tretmana bakterijskom kulturom.

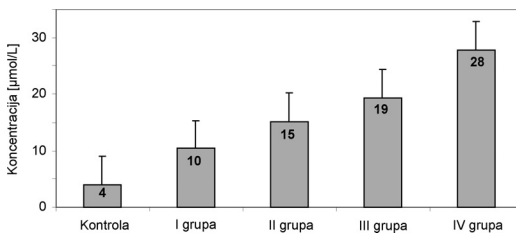
Na koji način je bakterijska kultura pomogla proces fotosinteze hlorofila ovim eksperimentom nije utvrđivano, ali možemo pretpostaviti koji bi mogli biti uzroci povoljnog ishoda tretmana:

1. Vitamin K je jedinjenje prisutno u svim zelenim delovima biljke. No, njegova funkcija u biljnom organizmu nije još potpuno jasna i određena. Ovaj vitamin znatno je zastupljeniji u zelenim nego u ostalim delovima biljke. On se bolje sintetiše u klicama izloženim svetlosti, nego u onima koje su rasle u



Slika 1. Masa nadzemnih delova klica

Figure 1. Overall mass of seedling's green parts (control followed by groups I-IV)



Slika 2. Ukupna koncentracija hlorofila a i b

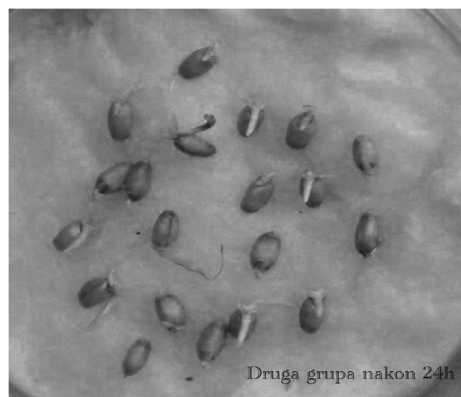
Figure 2. Concentration of chlorophyll a and b (control followed by groups I-IV)



K



I



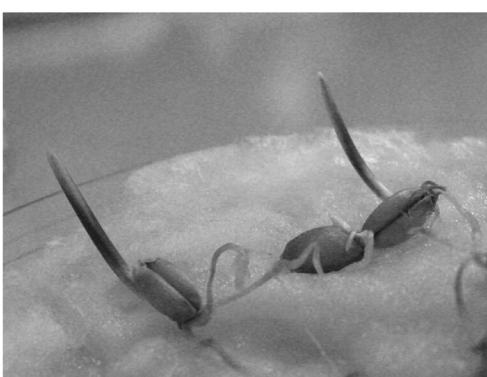
II



III



IV



C

Slika 3. Kontrola (K), I, II, III i IV grupa 24 časa nakon tretmana. Na posljednjem snimku (C) primećuju se crveni regioni na klicama (ovde izraženi tamnom nijansom)

Figure 3. Control (K) and treated samples (I, II, III and IV) 24 h after the treatment. Red regions of the seedlings can be noticed on photo C (seen as a darker shade)

mraku i nisu sintetisale hlorofil. Zato se pretpostavlja da je njegova funkcija povezana sa procesom biosinteze hlorofila (Dam i Glavind 1938). Postoji i funkcija ovog vitamina u procesu fotosinteze, no ona nije još potpuno definisana i određena (Bishop 1958). Bakterija *Escherichia coli* je sposobna da sintetiše ovaj vitamin u svojim metaboličkim procesima (Simić 1988) i mogla je pospešiti proces biosinteze hlorofila upravo ovim jedinjenjem.

2. Vitamin B je jedinjenje koje se uglavnom skladišti u listovima biljke, jedinjenje koje biljka može i sama sintetisati, ali u ekstremno stresnim uslovima, kao prilikom presađivanja, uzimaće ga iz spoljašnje sredine. Dokazano je da je ovaj vitamin bitan simulator rasta korena i često se dodaje različitim vrstama đubriva (Bonnet i Greene 1939). Bakterija *Escherichia coli* sposobna je da sintetiše i oslobađa u spoljašnju sredinu ovaj vitamin (Dempsey 1971), pa je i ovom sposobnošću mogla doprineti razvitku pšeničnih klica. Tokom izvođenja eksperimenta klice su prenošene sa podloge na kojoj su isključivale na podlogu sa bakterijskom suspenzijom. Tada je verovatno došlo do mehaničkih oštećenja već isključivih korenčića. Moguće je da su klice u eksperimentalnim grupama bolje prošle kroz ovu vrstu stresa i da su se bolje primile na novu podlogu nego one u kontrolnoj grupi, upravo zbog prisustva vitamina B u spoljašnjoj sredini.

3. U hranljivom medijumu nalaze se mnoge organske materije koje su bakterije mogle razložiti do nivoa neorganskih jedinjenja, koje su potom biljke mogle iskoristiti u svojim metaboličkim procesima. Što je više hranljivih čestica, to biljka proizvede više energije, pa samim tim može brže da raste i da sintetiše više hlorofila. U kontroli jedini izvor neorganskih čestica bili su oni joni dostupni u česmenskoj vodi kojom su klice zalivane, te su se zato one slabije razvile od klica u eksperimentalnim grupama. Već nakon 24 h tretmana primećuje se razlika u količini biljne mase; naročito je uočljiva razlika između kontrolne i četvrte grupe (slika 3).

Zaključak

Ovim ispitivanjem utvrđeno je da sa porastom koncentracije bakterijske suspenzije kojom su klice tretirane raste i koncentracija sintetisanog hlorofila, kao i količina biljne mase u eksperimentalnim grupama. Najviše biljne mase i sintetisanog hlorofila izmereno je u četvrtoj grupi, gde je tretman bio najintenzivniji. Pretpostavlja se da je ovakav uticaj

bakterije uslovljen njenom sposobnošću da sintetiše vitamine K i B, no ovim eksperimentom ta pretpostavka nije dokazivana. Pretpostavljamo da se dodavanjem ove bakterije u đubrivo može poboljšati plodnost zemljišta i omogućiti bolji rast biljaka.

No da bi se ovo saznanje zaista moglo primeniti u proizvodnji đubriva, neophodno je uraditi detaljnija istraživanja. Bitno je utvrditi pri kojim koncentracijama bakterijske suspenzije njen uticaj postaje štetan bo biljku. Osim ispitivanja uticaja bakterije na biljku, treba se svakako usredsrediti i na njene odnose sa drugim stanovnicima složenog zemljišnog ekosistema, tako da možemo biti sigurni da đubrivo obogaćeno kulturom *E. coli* neće narušiti mikroravnotežu zemljišta.

Literatura

Bishop N. I. 1958. Vitamin K, an essential factor for the photochemical activity of isolated chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **44**: 501.

Bonnet J., Greene J. 1938. Vitamin B1 and the growth of green plants. *Bot. Gaz.*, **100**: 226

Čulafić Lj., Cerović Z., Naunović G., Konjević R. 1992. *Fiziologija biljaka – praktikum*. Beograd: Naučna knjiga

Dam H., Glavind J. 1938. Vitamin K in the plant. *Biochem. J.*, **32**: 1018

Dempsey W. B. 1971. Role of Vitamin B6 Biosynthetic Rate in the Study of Vitamin B6 Synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **108**: 1001.

Đukić D. A., Jemcev V. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojna knjiga

Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji – prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Sarić M. 1979. *Fiziologija biljaka*. Beograd: Naučna knjiga

Simić D. 1988. *Mikrobiologija*. Beograd: Naučna knjiga

Vukićević J. K., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji – prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet

Impact of *Escherichia coli* on the Process Of Chlorophyll Biosynthesis and Growth and Development of Wheat (*Triticum vulgare* L.) Seedlings

In this research wheat seedlings were treated with different concentrations of *Escherichia coli* bacterial culture to determine the impact of the bacteria on the process of chlorophyll biosynthesis and growth and development of seedlings. The experiment used the decimal dilution method to determine the initial number of bacteria in the experimental groups, and a spectrophotometer for determining the concentration of chlorophyll in treated samples. The results showed that the chlorophyll concentration in seedlings increases with increasing concentrations of bacterial cultures. This increasing pattern has also been found in the overall mass of seedlings' green parts. It is assumed that the positive impact of the bacteria comes from its ability to synthesize vitamins K and B. It was shown that the possible treatment of soils with fertilizer containing this bacterial culture can increase its fertility and enable better plant yield.

