

Rast nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu inhibitora

Vekić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:900861>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Vekić

7508/BT

Rast nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu inhibitora

ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt: *"Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (HRZZ-9717)*

Mentor: doc.dr.sc. Mario Novak

Zagreb, 2020.

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu znanstveno – istraživačkih projekata „Bioprospecting Jadranskog mora BioProCro“ (KK.01.1.1.01.0002) i „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717) pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka te uz pomoć asisenta Nenada Marđetka, mag.ing.bioproc.

Željela bih se zahvaliti svojem mentoru doc.dr.sc Mariu Novaku na svim korisnim savjetima i pomoći te uloženom vremenu prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriju kao i pri pisanju završnoga rada.

Upućujem zahvale i Nenadu Marđetku, mag.ing. kao i doc.dr.sc. Antoniji Trontel koji su mi također pomagali prilikom rada u laboratoriju.

Zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška u svim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju
piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Rast nesumporne ljubičaste bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu inhibitora

Lucija Vekić, 0058211431

Sažetak: Ljubičaste nesumporne bakterije su skupina bakterija koje imaju veliki potencijal u raznim područjima primjene, od industrijskog u kojem se najviše ističe proizvodnja biovodika do područja medicinske primjene za proizvodnju biokemikalija. U ovome radu je proveden uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u kojem je ispitivano na koji će način pojedini inhibitor i u kojoj koncentraciji utjecati na rast te bakterije. Kao inhibitori su korištene octena i mravlja kiselina, a rezultati su pokazali da do inhibicije dolazi bez obzira je li dodana octena ili mravlja kiselina te u kojoj je koncentraciji (1, 2, 3, 4 ili 5 g/L) dodana. Također, praćena je i sinteza pigmenata, s naglaskom na bakterioklorofil *a* koji se sintetizirao u bitno nižoj koncentraciji nego što je to bez dodatka inhibitora. Najveći prinos biomase zabilježen je kod koncentracije octene kiseline od 1 g/L te je iznosio 0.4279 g/L, a bakterioklorofil *a* se u najvećoj koncentraciji sintetizirao dodatkom 1 g/L mravlje kiseline te je njegova koncentracija iznosila 1.6589 mg/L.

Ključne riječi: ljubičaste nesumporne bakterije, *Rhodovulum adriaticum*, inhibicija, bakterioklorofil

Rad sadrži: 47 stranica, 10 slika, 11 tablica, 77 literaturnih navoda, 5 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: Nenad Marđetko, mag.ing

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Growth of purple non sulphur bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 in the presence of inhibitors

Lucija Vekić, 0058211431

Abstract: Purple non-sulphur bacteria are a group of bacteria that have great potential in various fields of application, from industrial in which the most prominent one being production of biohydrogen to the field of medical application in production of biochemicals. In this thesis cultivation of the bacterium *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 was performed, in which it was investigated how a particular inhibitor and in what concentration will affect the growth of this bacterium. Acetic and formic acid were used as inhibitors and the results showed that inhibition occurs regardless of which acid (acetic or formic) was added and in what concentration (1, 2, 3, 4 or 5 g/L). Also, the synthesis of pigments was monitored, with emphasis on the bacteriochlorophyll *a* that was synthesized in a significantly lower concentration than in the absence of inhibitors. Biomass yield was shown to be highest at the mass concentration of acetic acid 1 g/L and was 0.4279 g/L while the highest concentration of bacteriochlorophyll *a* was synthesized by addition of 1 g/L of formic acid and its concentration was 1.6589 mg/L.

Keywords: purple non sulphur bacteria, *Rhodovulum adriaticum*, inhibition, bacteriochlorophyll

Thesis contains: 47 pages, 10 figures, 11 tables, 77 references, 5 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Mario Novak, Assistant Professor

Technical support and assistance: MA Nenad Marđetko

Defence date:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Fotosintetske bakterije.....	2
2.1.1. Zelene bakterije.....	2
2.1.1.1. Zelene sumporne bakterije.....	2
2.1.1.2. Zelene nesumporne bakterije.....	3
2.1.2. Ljubičaste bakterije.....	3
2.1.2.1. Ljubičaste sumporne bakterije.....	3
2.1.2.2. Ljubičaste nesumporne bakterije.....	3
2.2. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji.....	4
2.2.1. Biotehnološka proizvodnja 5-aminolevulinske kiseline pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija.....	5
2.2.2. Biotehnološka proizvodnja biopolimera pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija.....	6
2.2.3. Biotehnološka proizvodnja vodika pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija.....	7
2.2.4. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biološkoj obradi otpadnih voda.....	8
2.3. Sintaza pigmenata kod ljubičastih nesumpornih bakterija.....	8
2.4. Uvjeti i specifičnosti uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali.....	11
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	11
3.1.2. Sastav hranjivih podloga i ostale kemikalije.....	11
3.1.3. Oprema i uređaji.....	13

3.1.3.1. Vage.....	13
3.1.3.2. Spektrofotometar.....	13
3.1.3.3. Centrifuga.....	14
3.1.3.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC).....	14
3.1.3.5. Ostali uređaji i oprema.....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema inokuluma.....	15
3.2.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781.....	15
3.2.3. Praćenje uzgoja bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781.....	16
3.2.4. Određivanje optičke gustoće.....	16
3.2.5. Određivanje i ekstrakcija pigmenata.....	16
3.2.6. Priprema uzoraka za UPLC – analizu.....	17
3.2.7. Određivanje pokazatelja uspješnosti uzgoja.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u prisustvu octene kiseline kao inhibitora.....	20
4.2. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline kao inhibitora.....	27
4.3. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781 u prisustvu mravlje i octene kiseline kao inhibitora i bez prisustva inhibitora (kontrola).....	34
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41
7. PRILOZI.....	48

1. UVOD

U ovome su istraživanju kao radni mikroorganizam korištene ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri čemu se istraživao njihov rast u prisustvu različitih inhibitora te različitim koncentracijama istih. Uzgoj je proveden na hranjivim podlogama koje su sadržavale glukozu, ksilozu i arabinozu kao izvore ugljika, u mikroaerofilnim uvjetima te pri stalnom osvjetljenju.

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju važnu ulogu u proizvodnji raznih proizvoda kao što su određene plastike i enzimi korišteni u farmaceutskoj i tekstilnoj industriji kao i u industriji detergenata. Proizvodnja kemikalija korištenjem bakterija i ostalih mikroorganizama nije samo ekonomski isplativa već je također i ekološki prihvatljiva. Bakterija *Rhodovulum adriaticum* pripada skupini ljubičastih fotosintetskih bakterija te rodu bakterija *Rhodobacter*. Ove bakterije uglavnom rastu kao fotoheterotrofi koristeći organske spojeve kao elektron-donore tijekom fotosintetske aktivnosti. Sadrže visok proteinski udio s većim količinama esencijalnih aminokiselina, vitamina i bioloških kofaktora te s manjim količinama nukleinskih kiselina (Sasikala i Ramana, 1995; Merugu i sur., 2008). Ljubičaste nesumporne bakterije pokazale su se kao dobar izvor SCP-a (single cell protein), za industrijski uzgoj riba i peradi (Salma i sur., 2007), vitamina B₁₂ (Sasikala i Ramana, 1995), ubikinona Q₁₀ korištenog u kliničkoj medicini (Sasaki i sur., 2002) i terapijski korištenim biokemikalijama (Nagumo i sur., 1991), od kojih je primjerice istražen bakteriohopan-32-ol. Istraživanja su pokazala da bi neki sojevi fotosintetskih bakterija mogli biti ekonomičan izvor ugljika u bakterijski posredovanoj proizvodnji metana (Mitsui, 1985). Ljubičaste nesumporne bakterije su najraznovrsnije i svestranije od svih fotosintetskih bakterija s velikim potencijalom primjene. Stoga, gledajući njihove sposobnosti u proizvodnji biovodika, bioplastike, bioherbicida, fitohormona i industrijski važnih enzima mogu biti iskorištene za industrijsku proizvodnju ovih proizvoda.

U ovom istraživanju provodio se uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u podlozi koja je kao izvor ugljika sadržavala glukozu, ksilozu i arabinozu te se pratio utjecaj inhibitora (mravlje i octene kiseline) na njezin rast kao i na proizvodnju ukupnih pigmenata te bakterije. Istraživanje je pokazalo da dolazi do inhibicije rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 te da nema velike razlike u odnosu na korištenu koncentraciju inhibitora. Nakon ekstrakcije pigmenata te analize na spektrofotometru pokazalo se da je proizvodnja pigmenta bakterioklorofila *a* u prisustvu inhibitora manja u odnosu na kulturu koja je rasla na istoj hranjivoj podlozi, ali bez prisustva inhibitora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Fotosintetske bakterije

Fototrofne bakterije, uključujući anoksigenične i oksigenične bakterije mogu transformirati svjetlosnu energiju u metabolički iskoristivu kemijsku energiju procesima koji su posredovani klorofilom ili bakterioklorofilom. Glavna razlika između oksigeničnih i anoksigeničnih fototrofnih bakterija odnosi se na njihove fotosintetske pigmente te na strukturu i kompleksnost fotosintetskog aparata (Stanier i sur., 1981). Za fotosintezu anoksigeničnih fototrofnih bakterija potrebno je okruženje bez kisika jer je sinteza fotosintetskih pigmenata reprimirana kisikom, a za razliku od fotosinteze u biljaka ili cijanobakterija, kisik se ne proizvodi. Također, za razliku od cijanobakterija i eukariotskih algi, anoksigenične fototrofne bakterije ne mogu koristiti molekule vode kao elektron-donor. U tu svrhu koriste sulfide i ostale reducirane sumporne spojeve, vodik te brojne male organske molekule. Kao posljedica, ekološke niše anoksigeničnih fototrofnih bakterija su anoksični dijelovi voda i sedimenta koji dobivaju dovoljnu količinu svjetlosti koja omogućava fototrofni razvoj. Ova skupina bakterija široko je rasprostranjena u prirodi. Nalazimo ih u slatkovodnim i morskim vodama, svim vrstama stajaćih voda, u jezerima, mjestima s otpadnom vodom, obalnim lagunama, stratificiranim jezerima i ostalim vodenim staništima, ali i u obalnim morskim sedimentima, vlažnom tlu te neobrađenim poljima (Imhoff, 1992).

Anoksigenične fototrofne bakterije su izrazito heterogena skupina kako strukturno tako i fiziološki. Taksonomski se dijele u različite porodice, a razlikuju se i filogenetski. Različite vrste ovih bakterija sadrže nekoliko tipova bakterioklorofila i raznih karotenoida kao pigmenata koji se koriste u pretvorbi svjetlosne u kemijsku energiju i daju staničnim kulturama različita obojenja koja variraju ovisno o sadržaju pigmenata, od različitih nijansi zelene, žućkasto-zelene, smeđe-zelene, smeđe, crvenosmeđe, crvene, ružičaste, ljubičaste pa čak i do plave (mutanti bez karotenoida koji sadrže bakterioklorofil I) (Imhoff, 1992).

Dvije su glavne skupine ovih bakterija, fototrofne zelene i ljubičaste bakterije. One se razlikuju na osnovu sastava i strukture pigmenata u fotosintetskom aparatu.

2.1.1. Zelene bakterije

2.1.1.1. Zelene sumporne bakterije

Zelene sumporne bakterije (porodica *Chlorobiaceae*) su anoksigene fototrofne bakterije koje rastu samo u strogo anoksičnim uvjetima. Oni su obligatni anaerobni fotolitotrofi koji koriste

sulfide ili elementarni sumpor, a neke vrste i tiosulfat, molekularni vodik ili reducirano željezo kao donor elektrona za anoksienu fotosintezu. Elektroni iz reduciranog sumpornog spoja koriste se za asimilacijsko smanjenje CO₂ putem ciklusa limunske kiseline. Oksidacija sulfida rezultira stvaranjem sumpornih globularnih struktura koje se nakupljaju izvan stanice (Camacho, 2009).

2.1.1.2. Zelene nesumporne bakterije

Ova skupina bakterija nekada je bila poznata kao skupina sluzavih vlaknastih bakterija sposobnih za anoksienu fotosintezu, no sada su zelene nesumporne bakterije (red *Chloroflexi*) također poznate jer sadrže brojne kemotrofne bakterije različite fiziologije i filogenije. Najznačajniji predstavnici su termofilne bakterije narančaste ili zelene boje koje na vrućim staništima formiraju guste mikrobne slojeve. Uglavnom su fotoorganoheterotrofi te su prilagodljivi promjenjivom okruženju zbog svojeg načina kretanja i raznovrsne fiziologije. Članovi reda *Chloroflexi* koji nemaju sposobnost fotosinteze, nastanjuju slatkovodna staništa, tla i raspadajuće organske tvari, kao i metanogeni zrnasti mulj i druge sustave za pročišćavanje otpadnih voda gdje moguće pridonose stvaranju granula i transportu ugljikohidrata (Overmann, 2008).

2.1.2. Ljubičaste bakterije

2.1.2.1. Ljubičaste sumporne bakterije

U skupinu sumpornih bakterija se osim zelenih ubrajaju i ljubičaste sumporne bakterije. Zajednička karakteristika im je sposobnost oksidacije molekula sumpornih spojeva kao što je sumporovodik koji služi kao donor elektrona. Ljubičaste sumporne bakterije imaju crveni pigment te uglavnom obitavaju u stajaćim vodama. Ponekad se nalaze u velikim nakupinama pa voda ili blato poprime crvenu boju. Najčešće su striktni anaerobi, a vitamin B₁₂ je jedini potreban faktor rasta (Skene, 1914).

2.1.2.2. Ljubičaste nesumporne bakterije

Ljubičaste nesumporne fotosintetske (PNS) bakterije čine netaksonomsku skupinu raznovrsnih mikroorganizama, a karakterizira ih velika raznolikost u morfološkim i fiziološkim karakteristikama. Izraz „nesumporne“ je nastao jer se smatralo da ljubičaste nesumporne

bakterije ne mogu koristiti sumporovodik kao donor elektrona za fotoautotrofni rast. Međutim, pokazalo se da one ipak mogu koristiti sulfide kao donor elektrona, ali ne u tako visokim koncentracijama kao sumporne bakterije (Brock i sur. 2003). Proizvode ljubičasti do tamno crveni pigment u fakultativno anaerobnim uvjetima dok se u aerobnim uvjetima pigment ne može primijetiti (Basak i Das, 2007). Njihov metabolizam je jedinstven jer mogu rasti različitim načinima kultivacije (Imhoff, 2006): svoju energiju mogu dobiti iz svjetlosti (fototrofne) u anaerobnim uvjetima, kao i iz kemijskih molekula (kemotrofne) u aerobnim uvjetima, pri čemu je njihov izvor ugljika CO₂ (autotrofni) ili organski ugljik (heterotrofni). Heterotrofni način rasta rezultira višim stopama rasta (1.6–13 dan⁻¹) (Madigan i Gest, 1979; Rey i sur., 2006.) u usporedbi s autotrofnim (1.0–8.0 dan⁻¹) (Madigan i Gest, 1979; Colbeau i sur., 1980.), a infracrveno svjetlo može potaknuti fototrofni način rasta (Hülsem i sur., 2014). Metabolička fleksibilnost kao i njihova tolerancija prema ekstremnim uvjetima omogućuje im rast na raznim staništima kao što su (Imhoff, 2006): vode stajačice (jezera, obalne lagune, ribnjaci s otpadnim vodama, eutrofični ribnjaci) (Kantha i sur., 2015); sedimenti, vlažna tla (Kantachote i sur., 2016; Sakpirom i sur., 2017); neobrađena polja (Kantachote i sur., 2016; Sakpirom i sur., 2017); morsko okruženje, hipersalinske sredine (Kantachote i sur., 2016; DasSarma i DasSarma, 2017); termalni izvori i hladna polarna staništa. Dakle, one su široko rasprostranjene u različitim okruženjima, pri čemu se najčešće susreću rodovi *Rhodobacter* i *Rhodopseudomonas* (Holguin i sur., 2001). Brojni sojevi čistih kultura ljubičastih nesumpornih bakterija imaju neke zajedničke morfološke karakteristike, one su gram-negativne bakterije, nemaju mogućnost stvaranja endospora te se pokreću polarnim bičem. Sve bakterije koje pripadaju skupini ljubičastih nesumpornih bakterija mogu rasti u strogo anaerobnim uvjetima ako primaju dovoljnu količinu svjetlosti. Neki predstavnici mogu se razvijati i u tami, no to je moguće samo u aerobnim uvjetima pa je to svojstvo karakteristično samo za predstavnike koji nisu strogi anaerobi.

2.2. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biotehnološkoj proizvodnji

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju široku primjenu u biotehnološkoj proizvodnji. Pokazalo se da su dobri producenti 5-aminolevulinske kiseline (Sasaki i sur. 1991) koja se koristi kao herbicid. Fotobiotransformacija indolne octene kiseline pomoću nekih nesumpornih ljubičastih bakterija pokazuje njihovu ulogu u proizvodnji fitohormona (Sasikala i Ramana, 1995). Anoksigene fototrofne bakterije glavne su skupine mikroorganizama koji se nalaze na neobrađenom tlu i znatno doprinose njegovoj plodnosti (Hable i Alexander, 1980). Poli β-hidroksibutirat (PHB) je unutarstanični polimerni materijal koji se akumulira u neuravnoteženim

uvjetima rasta u velikom broju bakterija. Kako bi se akumulirala što veća količina PHB korištene su kombinacije različitih izvora ugljika i dušika. Noparatnaraporn (2001) je izvijestio o proizvodnji polihidroksialkanoata iz octene kiseline pomoću *Rb. sphaeroides* i *Rb. sphaeroides* IL 106. Lorrungruang (2006) smatra da je fotosintetska bakterija, koja može proizvesti PHA i dobro raste na 37-40° C u aerobnim uvjetima i u mraku, idealna za ovu svrhu. Od različitih metoda proizvodnje vodika poput elektrolize vode, fotoelektrolize, fotokatalize i biofotolize, fototrofna proizvodnja vodika pokazala se najboljom. Takva proizvodnja vodika ne zagađuje okoliš (Melis, 2002) kao što je to u slučaju rafinerije fosilnih goriva. Iskorištavanje otpadne vode za fotobiološko stvaranje vodika pomoću fotosintetskih ljubičastih nesumpornih bakterija (Sunita i Mitra, 1993; Thangaraj i Kulandaivelu, 1994; Melis, 2002; Lee i sur., 2002; Hoekema i sur., 2002; Vasavi i sur., 2008; Merugu i sur., 2008) poželjna je jer ne čini samo proces fotobiološke proizvodnje vodika operativno izvedivim već se postiže i djelomično pročišćavanje vode redukcijom organskih materijala (Ramchander i sur., 2007; Vasavi i sur., 2008). Istraživanja su pokazala da bakterije *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter sphaeroides* NR-3 i *Rhodopseudomonas palustris* imobilizirane na poroznoj keramici uklanjaju fosfate, nitrata i sumporovodik iz sintetičke otpadne vode (Nagadomi i sur., 2000). Takeno i sur. (2005) izvijestili su o pročišćavanju otpadnih voda onečišćenih uljem pomoću imobiliziranih fotosintetskih bakterija. Kao što je vidljivo iz navedenih primjera ljubičaste nesumporne bakterije imaju različite uloge u biotehnološkoj proizvodnji te imaju veliki potencijal za daljnja istraživanja.

2.2.1. Biotehnološka proizvodnja 5-aminolevulinske kiseline pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija

5-aminolevulinska kiselina (ALA) je intermedijer u biosintezi tetrapirola koji se nalazi u vitaminu B₁₂, hemu i porfirinima. Rebeiz i sur. (1984) pokazali su da se ALA može koristiti kao selektivni i biorazgradivi herbicid i insekticid (Rebeiz i sur. 1988). Donedavno je veća proizvodnja ALA bila otežana zbog mnogobrojnih kompliciranih koraka koji su bili potrebni za njezinu kemijsku sintezu (Takeya i sur. 1997) jer je njezina akumulacija u bakterijama i algama bila slaba te je time isključivala njihovu praktičnu primjenu (Sasikala i Ramana, 1995). Međutim, uočene su velike količine ekstracelularno nakupljene ALA isprekidanim dodatkom levulinske kiseline (LA) korištenjem fotosintetske bakterije *Rhodobacter sphaeroides*, koja sintetizira tetrapirole spojeve u većim količinama (Sasaki i sur. 1987, 1990). Slijedeći ovaj pristup uspostavljena je proizvodnja ALA korištenjem mutiranih sojeva fotosintetskih bakterija (Nishikawa i sur. 1999; Kamiyama i sur. 2000).

Biološka sinteza ALA odvija se pomoću dva različita biokemijska puta. Jedan od ta dva biokemijska puta je Shemin put ili C-4 put koji kreće iz sukcinil-CoA i glicina, a drugi je C-5 put koji počinje od glutamata. Sukcinil-CoA potreban za odvijanje C-4 puta dobiven je ciklusom limunske kiseline. ALA sintetaza (ALAS) je enzim koji ograničava brzinu biosinteze tetrapirola te je i sam dobro reguliran (Sasikala and Ramana, 1995) povratnom regulacijom gena Hem A ili Hem T (Ellen i Kaplan, 1993) (Lascelles, 1978). Glutamat je izvor ALA u C-5 metaboličkom putu, a geni Hem A i Hem M koji kodiraju izoenzime glutamil-tRNA odgovorni su za regulaciju (Ilag i sur. 1991). Anoksigene fotosintetske bakterije najčešće koriste Shemin put za sintezu ALA. Trostrukim dodatkom LA s razmacima u kulturu *R. sphaeroides* primijećena je velika količina ekstracelularno nastale ALA u anaerobnim uvjetima u prisustvu izvora svjetlosti. Nastala količina ALA bila bi dovoljna za primjenu (16mM), ali je nedostatak bila potreba osvjetljenja u posebnom biorektorskom sustavu čime bi cijena takve proizvodnje bila relativno visoka. Zbog toga su razvijeni mutirani sojevi *R. sphaeroides* (Tanaka i sur. 1994; Nishkawa i sur. 1999), a komercijalna proizvodnja je uspostavljena 1998. korištenjem aerobnog sustava bez prisustva svjetla (Kamiyama i sur., 2000).

ALA je višestruko primjenjiv u poljoprivredi te se, osim kao herbicid, insekticid i faktor rasta, koristi za povećanje tolerancije biljaka na sol i niske temperature. ALA ima primjenu i u medicini gdje se koristi u liječenju karcinoma te u dijagnostici trovanja teškim metalima.

2.2.2. Biotehnološka proizvodnja biopolimera pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija

Polihidroksialkanoat (PHA) je biopolimer koji služi kao intracelularna molekula za pohranu ugljika i energije te također pomaže smanjenju redoks potencijala (Senior i sur., 1972; Anderson i Dawes, 1990). PHA je postao zanimljiv jer se pojavio kao alternativa plastici zbog svoje biorazgradivosti (Numata i sur., 2009). Izvori ugljika kao što su šećeri ili biljna ulja bili su potrebni za veću proizvodnju PHA, a ti izvori su bili preskupi u odnosu na plastiku dobivenu naftnom industrijom. Kako bi se riješio problem visoke cijene PHA istraživači su pokušali naći rješenje direktnom fiksacijom CO₂ do PHA procesom fotosinteze. Pokazalo se da, osim viših biljaka i cijanobakterija, i anoksigene fotosintetske bakterije proizvode PHA (Fuller, 1995). Za razliku od viših biljaka i cijanobakterija, anoksigene fotosintetske bakterije kao donore elektrona koriste organske spojeve te spojeve sa sumporom i vodikom. Većinom mogu rasti kao fotoautotrofi ili fotoheterotrofi na svjetlu, a neki članovi ove skupine mogu rasti i kao kemoheterotrofi u mraku.

Proizvodnja PHA istraživana je na ljubičastim nesumpornim bakterijama poput *Rhodospirillum rubrum* (Brandl i sur., 1989), *Rhodobacter sphaeroides* (Brandl i sur., 1991) i *Rhodopseudomonas palustris* (Carlozzi i Sacchi, 2001) pri čemu su se najviše pratili prinos PHA, izvor ugljika te uvjeti uzgoja. Pokazalo se da *Rhodospirillum rubrum* proizvodi 50%, *Rhodobacter sphaeroides* 60-70%, a *Rhodopseudomonas palustris* 4% mase PHA po masi suhe biomase (Brandl i sur., 1989; Brandl i sur., 1991; Carlozzi i Sacchi, 2001). Morska ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum sulfidophilum* može sintetizirati poli[(R)-3-hidroksibutirat] (PHB) do 50% mase po masi biomase (Chowdhury i sur., 1996). Morske su bakterije privukle pažnju kao novi biotehnološki resurs te se očekuje da će one biti izvor mnoštvu novih bioaktivnih spojeva (Numata i Doi, 2012; Numata i Morisaki, 2015; Numata i sur. 2013). Iako su još uvijek premalo istražene, uzgoj morskih bakterija mogao bi imati brojne prednosti u pogledu komercijalne primjene. Ljubičaste nesumporne bakterije sintetizirale su PHA pod normalnim uvjetima rasta, a pri uvjetima gdje je izvor dušika bio ograničavajući faktor sinteza PHA bila je još i veća.

2.2.3. Biotehnološka proizvodnja vodika pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija

S obzirom na sve veću potrebu za gorivom te time i povećanom potrošnjom fosilnih goriva, koja nisu obnovljiv izvor energije, biogoriva se smatraju izvorom energije koji će u budućnosti biti sve više korišten. Među biogoriva spada i biološki proizveden vodik koji je dobiven pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija. Korištenje biovodika kao goriva prednost je zbog činjenice da ne zagađuje okoliš te je obnovljiv, ali se još uvijek malo koristi zbog trostruko veće cijene u odnosu na cijenu fosilnih goriva. Postupci biološke proizvodnje vodika vode se pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi (Benemann 1997; Sasikala i sur. 1993) te su time ekološki prihvatljiviji u odnosu na termokemijske i elektrokemijske procese. Proces proizvodnje biovodika mogu se ugrubo podijeliti na fotofermentaciju i fermentaciju u tami. Najvažniji enzimi u proizvodnji biovodika su nitrogenaze i hidrogenaze. Ljubičaste nesumporne bakterije tijekom fotosinteze ne proizvode kisik, koji negativno utječe na hidrogenaze i nitrogenaze te su one zbog toga aktivne u bakterijskoj membrani. [Fe]-hidrogenaza ima bitnu ulogu u fermentativnoj proizvodnji vodika (Woodward i sur. 2000) te su njen utjecaj, kao i utjecaj glukoza-dehidrogenaze u proizvodnji vodika iz glukoze kao supstrata Woodward i sur. (2000) detaljno proučeni. Hidrogenaze su najvažniji enzimi za proizvodnju vodika i organskih kiselina u procesu fermentacije u tami. Iako su one prisutne u ljubičastim nesumpornim bakterijama, glavnu ulogu u fotoproizvodnji vodika imaju nitrogenaze.

Fotofermentacija pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija je najvažniji dio istraživanja kojim se može postići povećanje ukupnog prinosa biovodika kroz optimizaciju uvjeta uzgoja te imobilizaciju stanica. Međutim, odgovarajući procesni parametri kao što su omjer ugljika i dušika, intenzitet osvjetljenja, izbor bioreaktora i starost inokuluma također mogu utjecati na veći prinos proizvedenog vodika pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija (Basak i Das, 2007).

2.2.4. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u biološkoj obradi otpadnih voda

Ljubičaste nesumporne bakterije našle su svoju primjenu i u obradi otpadnih voda što je vidljivo iz primjera obrade otpadne vode s farmi svinja (Kim i sur., 2004). Svinjske otpadne vode primarni su izvor onečišćenja slatkovodne vode, uključujući površinske i podzemne vode. Odlaganje takve vode dugo je bio problem zbog visoke potrebe na O₂ kao i potrebi za nutrijentima poput dušika i fosfora te su time glavni uzrok eutrofikacije. Također, hlapljivi organski spojevi, poput organskih kiselina u svinjskim otpadnim vodama odgovorne su za vrlo neugodne mirise nastale tijekom skladištenja i obrade. Razvijeni su mnogi postupci za obradu takvih voda, ali je to i dalje ostao ekološki problem. Za pročišćavanje otpadnih voda svinja koriste se samo anaerobne lagune te su mnogi istraživači opisali odnos između smanjenog intenziteta neugodnog mirisa u anaerobnim lagunama i fototrofnih ljubičastih bakterija koje se koriste za pročišćavanje (Chen i sur., 2003; Do i sur. 2003).

Provedeno je istraživanje u kojem je ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodopseudomonas palustris* uzgojena u svinjskoj otpadnoj vodi te se nakon sedam dana uzgoja pokazalo da je uklonjeno 170 mg/L hlapljivih organskih kiselina, 180 mg/L fosfata te da je kemijska potrošnja kisika (KPK) 10 000 mg/L (Kim i sur., 2004).

2.3. Sinteza pigmenata kod ljubičastih nesumpornih bakterija

Pigmenti koje, ovisno o uvjetima uzgoja, sintetiziraju ljubičaste nesumporne bakterije su karotenoidi i bakterioklorofil. Karotenoidi su izoprenoidni pigmenti koji se nalaze u svim poznatim fototrofnim organizmima kao i u mnogim nefototrofnim vrstama. Linearni sustav konjugiranih dvostrukih veza, kromofora, daje karotenoidima izvanrednu sposobnost da apsorbiraju svjetlosnu energiju i rasprše je kao toplinu. Bakterioklorofil je struktura u bakterija koja omogućava provođenje fotosinteze bez proizvodnje kisika. Razne vrste bakterija mogu sadržavati različite vrste bakterioklorofila (a, b, c, d, e, g). Oni čine osnovu antena za

prikupljanje svjetlosti te su dio fotosintetskog reakcijskog centra. Reakcijski centar (RC) i svjetlosno sakupljanje (LH) ili antenski kompleksi glavni su pigmentni proteini fotosintetskog aparata nesumpornih ljubičastih bakterija i nalaze se na intracitoplazmatskim membranama. LH-kompleksi služe za prikupljanje svjetlosne energije i usmjeravanje do fotokemijskog RC-a, gdje se energija pobuđenja prenosi u stanje razdvajanja naboja i redoks-razliku potencijala. To su oligomeri osnovnih podjedinica koji se sastoje od dva mala različita polipeptida α i β koji vežu pigmente, a imaju molekulsku masu od 5000 do 7000 Da. Dva ili tri bakterioklorofila (Bchl) i jedna ili dvije karotenoidne molekule nekovalentno se vežu na α i β polipeptide (Tadros i Drews, 1990).

U fotosustavu I ljubičastih nesumpornih bakterija karotenoidi i bakterioklorofil važne su strukture za prikupljanje i pretvorbu svjetlosne energije u biokemijsku energiju koju bakterije koriste za svoj metabolizam. Stoga su glavni čimbenici uzgoja vezani uz svjetlosne uvjete poput izvora svjetlosti, intenziteta svjetla te fotoperioda svjetlosti (Cheirsilp i Torpee, 2012; Kuo i sur., 2012; Zhou i sur., 2015a b). Zhou i sur. (2014.) utvrdili su da je za optimalnu proizvodnju karotenoida i bakterioklorofila bakterije *Rhodospseudomonas palustris* optimalan intenzitet svjetlosti 240 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$ i 30 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$ te da je proizvodnja karotenoida i bakterioklorofila bila najniža na 60 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$. Osim toga, najveća učinkovitost pretvorbe svjetlosti postignuta je na 15 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$. Zbog toga intenzitet svjetlosti ima razne utjecaje na biokemijske reakcije ljubičastih nesumpornih bakterija, uključujući biosintezu pigmenta i učinkovitost pretvorbe svjetlosti. Neke studije su također pokazale da izmjene ciklusa svjetla i tame nisu utjecali samo na rast mikroorganizama, nego su i značajno promijenili proizvodnju ključnih pigmenta (George i sur., 2014; Lee i sur., 2015; Zhou i sur., 2015a; Zhi i sur., 2019).

Općenito, bakterijski su pigmenti sigurni za ljudsku upotrebu i stoga imaju široku primjenu u farmaceutskoj, tekstilnoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Terapijska priroda bakterijskih pigmenta moguća je zbog odličnih antimikrobnih, antikancerogenih, citotoksičnih i antioksidativnih svojstava (Numan i sur., 2018).

2.4. Uvjeti i specifičnosti uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija

Ljubičaste nesumporne bakterije provode tri vrlo važne reakcije: fiksiraju dušik, CO_2 i provode pretvorbu svjetlosne energije. One mogu rasti u raznim uvjetima, većinom su fotoautotrofi i fotoheterotrofi, a neki sojevi mogu rasti aerobno u mraku kao kemoheterotrofi. Zbog svega navedenog, ljubičaste nesumporne bakterije imaju široku primjenu, a pokazuju i potencijal u

proizvodnji vodika, proizvodnji vitamina i bioremedijaciji (Sasikala i Ramana, 1995; Levin i sur., 2004; Idi i sur., 2015). Trenutna istraživanja se rade u zatvorenim fotobioreaktorima (PBR) kao što su anaerobni membranski bioreaktori (Hulsen i sur., 2016), anaerobni cijevni PBR (Alloul i sur., 2019; Carlozzi i sur., 2006) i osvjetljeni anaerobni šaržni bioreaktor (Chitapornpan i sur. 2012). U ovakvim zatvorenim fotobioreaktorskim sustavima mogu rasti samo fototrofi i anaerobni kemotrofi. Fototrofni uzgoj se uglavnom provodi u zatvorenim staklenim bioreaktorima koji omogućuje veću apsorpciju svjetlosti (Lien i sur., 2018). Produktivnost u fotobioreaktorima je uvelike određena svjetlošću te omjerom površine i volumena bioreaktora. Potrebno je da se svjetlost što bolje rasporedi u što veći volumen bioreaktora što se obično postiže intenzivnim miješanjem (Akkerman i sur., 2002). Nedostatak fotobioreaktora je velika potrošnja energije između ostalog i zbog umjetnih izvora svjetlosti, no troškove je moguće smanjiti upotrebom učinkovitijih izvora svjetlosti. Svjetleće diode (LED) dobra su alternativa jer imaju dug životni vijek te troše manje energije, a osim toga mogu se prilagoditi rasponu valnih duljina koje odgovaraju fotosintetskim apsorpcijskim spektrima (Kuo i sur., 2012). Moguće su i primjene fotobioreaktora koji koriste prirodnu sunčevu svjetlost, no problem kod takvog način uzgoja predstavlja regulacija bioprocasa (Carlozzi i sur., 2001; Lien i sur., 2018; Kuo i sur., 2012). Kemotrofni uzgoj se provodi bez prisustva svjetla te zahtjeva aerobne uvjete za dobivanje potrebne energije (Keppen i sur., 2013). Najčešće su korišteni bioreaktor s miješalom i vertikalna air-lift/barbotirajuća kolona (Yen i Shih, 2009; Watanabe i sur., 1998).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam korišten za ovo istraživanje je ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva.

3.1.2. Sastav hranjivih podloga i ostale kemikalije

U ovome eksperimentu su za uzgoj inokuluma te za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 korištene kemijski definirane podloge. U Tablici 1. se nalaze izvori ugljika i dušika korištenih za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije. Sastav soli i faktora rasta za kemijski definirane podloge prikazan je u Tablici 2. Izvori ugljika i dušika u podlogama za uzgoj inokuluma ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 nalaze se u Tablici 3 dok su inhibitori rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 prikazani u Tablici 4. Osim uzgoja s inhibitorima, proveden je i uzgoj bez inhibitora, kao kontrola. Tablica 5. sadrži ostale kemikalije korištene u ovome eksperimentu.

Tablica 1. Izvori ugljika i dušika u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	KONCENTRACIJA (g/L)	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Glukoza	C ₆ H ₁₂ O ₆	5	≥99%	Kemika
Ksiloza	C ₅ H ₁₀ O ₅	20	≥99%	Kemika
Arabinoza	C ₅ H ₁₀ O ₅	3	≥99%	Kemika
CSL	/	5	za biotehnologiju	Kemika

Tablica 2. Sastav soli i faktora rasta u kemijski definiranim hranjivim podlogama za uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	KONCENTRACIJA (g/L)	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Diamonijev sulfat heptahidrat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.8	≥99%	Zorka
Kalijev dihidrogenfosfat	KH_2PO_4	0.5	≥99%	Kemika
Kalijev hidrogenfosfat	K_2HPO_4	0.5	≥99%	Kemika
Magnezijev sulfat heptahidrat	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.2	≥99%	Kemika
Kalcijev klorid dihidrat	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.053	≥99%	Kemika
Manganov sulfat heptahidrat	$\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1.2×10^{-3}	≥99%	Kemika
Tiamin klorid	/	1.0×10^{-3}	/	Sigma
Nikotinska kiselina	/	1.0×10^{-3}	/	Sigma
Cijanokobalamin	/	1.0×10^{-3}	/	Sigma
Biotin	/	1.0×10^{-3}	/	Sigma

Tablica 3. Izvori ugljika i dušika u podlogama za uzgoj inokuluma ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	KONCENTRACIJA (g/L)	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Malat	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	2	≥99%	Kemika
Natrijev glutamat	$\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$	2	≥99%	Kemika
Kvaščev ekstrakt	/	1.5	za biotehnologiju	Kemika

Tablica 4. Inhibitori rasta ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	KONCENTRACIJE (g/L)
Mravlja kiselina	HCOOH	1; 2; 3; 4; 5
Octena kiselina	CH ₃ COOH	1; 2; 3; 4; 5
Mravlja i octena kiselina	/	3, 3; 5, 5

Tablica 5. Ostale kemikalije

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Aceton	C ₃ H ₆ O	≥99%	Kemika
Etanol	C ₂ H ₅ OH	≥99%	Kemika
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika
Sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	≥99%	Kemika
Cinkov sulfat heptahidrat	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	≥99%	Kemika

3.1.3. Oprema i uređaji

3.1.3.1. Vage

Za vaganje kemikalija do 0.5 g korištena je tehnička vaga „Tehtnica ET – 1211“. Za vaganje kemikalija mase manje od 0.5 g korištena je analitička vaga „Acculab ALC210.4“.

3.1.3.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar „Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies“ korišten je za snimanje apsorpcijskog spektra biomase tijekom uzgoja („scan“) ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 te za snimanje apsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenata u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm. Uzorci su analizirani u kvarcnim kivetama promjera 10 mm proizvođača „Agilent Technologies“.

3.1.3.3. Centrifuga

Za centrifugiranje uzoraka odnosno odvajanja taloga bakterijske biomase od hranjive podloge korištena je centrifuga „Thermo Scientific SL 8R“, a radila je pri 8000 o min⁻¹. Centrifuga korištena za pripremu uzoraka za UPLC je „CF-10 High-Performance“ pri 7500 o min⁻¹.

3.1.3.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti (UPLC)

Uređaj korišten za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti je „UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II“ te smo ga koristili za određivanje koncentracije supstrata te inhibitora. Sastoji se od nekoliko važnih komponenti, a to su crpka (G7104A 1290 Flexible Pump) i otplinjač, injektor (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnica, analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) s pretkOLONAMA, detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalni programa za analizu (OpenLAB CDS).



Slika 1. Uređaj „UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II“

3.1.3.5. Ostali uređaji i oprema

Osim laboratorijskog posuđa i pribora, od ostalih uređaja u laboratoriju korišteni su:

- Autoklav
- Vorteks miješalica („LLG – uniTEXTER 1“)

- Plamenici
- Hladnjak i zamrzivač za čuvanje uzoraka
- Sušionik („Instrumentaria ST-50“)
- pH metar („Hanna Instruments HI 9125“)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema inokuluma

Inokulum bakterijske kulture pripremljen je na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi čiji je sastav prikazan u Tablici 2. i Tablici 3. U Tablici 2. je naveden sastav soli i faktora rasta, a u Tablici 3. izvori ugljika i dušika za održavanje kulture i inokuluma te pripadajuće koncentracije. Nakon što su navedeni sastojci hranjive podloge otopljeni u deioniziranoj vodi, pH vrijednost je podešena između 6.8 i 7 dodatkom natrijevog hidroksida te je podloga prebačena u tikvice s pripadajućim brušenim čepom. Pripremljena hranjiva podloga je stavljena u autoklav na temperaturu od 121°C na 20 minuta te su u nju nakon hlađenja sterilno dodani termosenzibilni sastojci (vitamini i elementi u tragovima) pomoću šprice s filterom promjera pora 0.2 µm.

3.2.2. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Kemijski definirana hranjiva podloga za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pripremljena je tako da su u određeni volumen deionizirane vode dodane tvari navedene u Tablici 2. i izvori ugljika i dušika iz Tablice 1. Otopina je zatim regulirana na pH vrijednost između 6.8 i 7 dodatkom natrijevog hidroksida, a nakon toga je prenesena u staklene tikvice tako da je u svaku tikvicu stavljeno 150 mL otopine. Tikvice su zatvorene brušenim ili vatenim čepom te su sterilizirane u autoklavu 20 minuta na temperaturi od 121°C. Nakon hlađenja, u tikvice su sterilno dodane otopine vitamina i elemenata u tragovima pomoću šprice s filterom (promjer pora 0.2 µm) na vrhu.

U tako pripremljene podloge su u 2 seta eksperimenata dodavane kiseline u različitim koncentracijama. U prvom setu eksperimenata, u tikvice su dodane koncentracije od 1, 2, 3, 4, 5 g/L octene kiseline te kombinacija octene i mravlje kiseline, obje u koncentracijama od 5 g/L. U drugom setu eksperimenata pratio se uzgoj u 7 tikvica. U prvih pet tikvica dodana je mravlja kiselina u koncentracijama od 1, 2, 3, 4 i 5 g/L, dok je u šestoj tikvici je bila kombinacija

octene i mravlje kiseline (3+3 g/L), a sedma tikvica služila je kao kontrola u koju nije dodana kiselina (inhibitor).

Nakon dodatka inhibitora, tikvice su inokulirane s bakterijskom kulturom ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

3.2.3. Praćenje uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

Uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 provoden je u mikroaerofilnim uvjetima, pri stalnom osvjetljenju te bez miješanja. Praćenje uzgoja vršilo se svaki dan tako da su iz svake tikvice sterilno izuzimani uzorci od 5 mL te je pH-metrom mjerena pH vrijednost suspenzije. Uzorci su analizirani na spektrofotometru u kvarcnim kivetama tako da se radio „scan“ odnosno određivanje apsorpcijskih minimuma i maksimuma biomase u području valnih duljina od 300 do 900 nm. Nakon toga su uzorci centrifugirani 10 minuta pri 8000 o/min. Supernatant je odvojen i spremljen u zamrzivač kako bi se očuvao za potrebe UPLC analitike, a nastala biomasa (talog) se više nije koristila za analizu. Ovaj postupak se radio i nulti (0.) dan, odnosno odmah nakon inokulacije.

Nakon 48 i 96 sati uzgoja radilo se i određivanje količine nastalog bakterioklorofila *a*. Nakon centrifugiranja talog bakterijske biomase je sačuvan te je napravljena ekstrakcija u smjesi aceton:etanol u omjeru 7:2. Bilo je vrlo važno provoditi ekstrakciju u mraku te držati uzorke na hladnom odnosno u ledu. Nakon ekstrakcija su uzorci ponovo centrifugirani te je supernatant odvojen kako bi se na spektrofotometru napravio scan u području valnih duljina od 300 do 900 nm.

3.2.4. Određivanje optičke gustoće

Optička gustoća uzoraka određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 660 nm. Napravljen je „scan“ uzoraka u području valnih duljina od 300 do 900 kako bi se odredili apsorpcijski minimumi i maksimumi za biomasu ljubičastih nesumpornih bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

3.2.5. Određivanje i ekstrakcija pigmenata

Pigmenti su, kako je već prethodno navedeno, određivani nakon 48 i 96 sati uzgoja. Iz tikvice je sterilno izuzet uzorak od 10 mL bakterijske kulture. Uzorak je centrifugiran pri 8000 o/min

15 minuta. Supernatant se koristio za UPLC analitiku, a u talog biomase dodana je smjesa acetona i etanola u omjeru od 7:2 (vol/vol) radi ekstrakcije pigmenata. Potom je dodano 4 g staklenih kuglica te su kivete omotane aluminijskom folijom i stavljene u led. Osim što su kivete bile omotane aluminijskom folijom, ekstrakcija se dodatno odvijala u mraku kako bi se spriječila degradacija fotosenzibilnih pigmenata. Nakon toga uslijedilo je po tri puta naizmjenično intenzivno miješanje te zatim hlađenje u ledu tokom 2 minute. Uzorci su zatim ponovo centrifugirani 10 minuta na 8000 o/min te je supernatant izdvojen kako bi se ukupni pigmenti analizirali spektrofotometrijski („scan“), a staklene kuglice su isprane u vodi i stavljene u sušionik na sušenje. Apsorbancija bakterioklorofila *a* određuje se spektrofotometrijski u kvarcnoj kiveti u spektru valnih duljina od 300 do 900 nm. Nakon toga se iz dobivenih vrijednosti apsorbancije pri određenim valnim duljinama računa koncentracija bakterioklorofila *a* prema sljedećem izrazu (Ritchie, 2018):

$$P = 0,348209 * (A_{648} - A_{850}) - 0,16583 * (A_{665} - A_{850}) + 12,11114 * (A_{775} - A_{850}) \text{ [mg/L]}$$

3.2.6. Priprema uzoraka za UPLC – analizu

Nakon završenog uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 sačuvani supernatanti su iskorišteni za UPLC analizu. Automatskom pipetom izuzeto je 750 µL supernatanta i 750 µL 10%-tne otopine cinkovog sulfata (ZnSO₄). Cinkov sulfat dodan je kako bi vezao proteine i eventualne nečistoće nastale tijekom uzgoja. Sadržaj je zatim homogeniziran, a uzorci su ostavljeni 20 minuta da miruju. Nakon toga, uslijedilo je centrifugiranje tokom 15 minuta pri 7500 o/min. Zadnji korak prije UPLC analize bio je filtracija uzorka kroz mikrobiološki filter (0.2 µm, Sartorius) u staklenu vialu.

3.2.7. Određivanje pokazatelja uspješnosti uzgoja

Nakon uzgoja i dobivenih rezultata potrebno je izračunati pokazatelje uspješnosti procesa.

1. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \quad \text{[g/L]}$$

gdje je S_0 - koncentracija supstrata na početku uzgoja, a S – koncentracija supstrata na kraju uzgoja.

2. Prinos biomase (Y_x)

$$Y_x = X - X_0 \quad [\text{g/L}]$$

gdje je X – koncentracija biomase na kraju uzgoja, a X_0 – koncentracija biomase na početku uzgoja.

3. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} = Y_x / \Delta S \quad [\text{g/g}]$$

4. Specifična brzina rasta (μ)

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X}{X_0} \quad [\text{h}^{-1}]$$

gdje je Δt vremenski interval od početka do kraja uzgoja.

5. Produktivnost proizvodnje biomase (Pr)

$$Pr = Y_x / t_u \quad [\text{g/Lh}]$$

Gdje je t_u – ukupno vrijeme trajanja uzgoja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju proveden je uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, a cilj je bio proučiti utjecaj inhibitora na rast bakterije. Kao inhibitori su korištene različite koncentracije mravlje i octene kiseline kao i njihove međusobne kombinacije. Korišteni izvori ugljika, (glukoza, ksiloza i arabinoza) kao i inhibitori, izabrani su jer se istražuje mogućnost upotrebe lignoceluloznih sirovina kao jeftinijeg izvora ugljika. Naime, lignocelulozne sirovine se sastoje od celuloze, hemiceluloze i lignina. Kemijskom predobradom lignoceluloznih sirovina dolazi do hidrolize navedenih polimera u jednostavne šećere (glukoza, ksiloza, arabinoza), koje mikroorganizmi mogu iskoristiti za rast pri čemu mogu nastati octena i mravlja kiselina kao nusprodukti (Marđetko i sur., 2018).

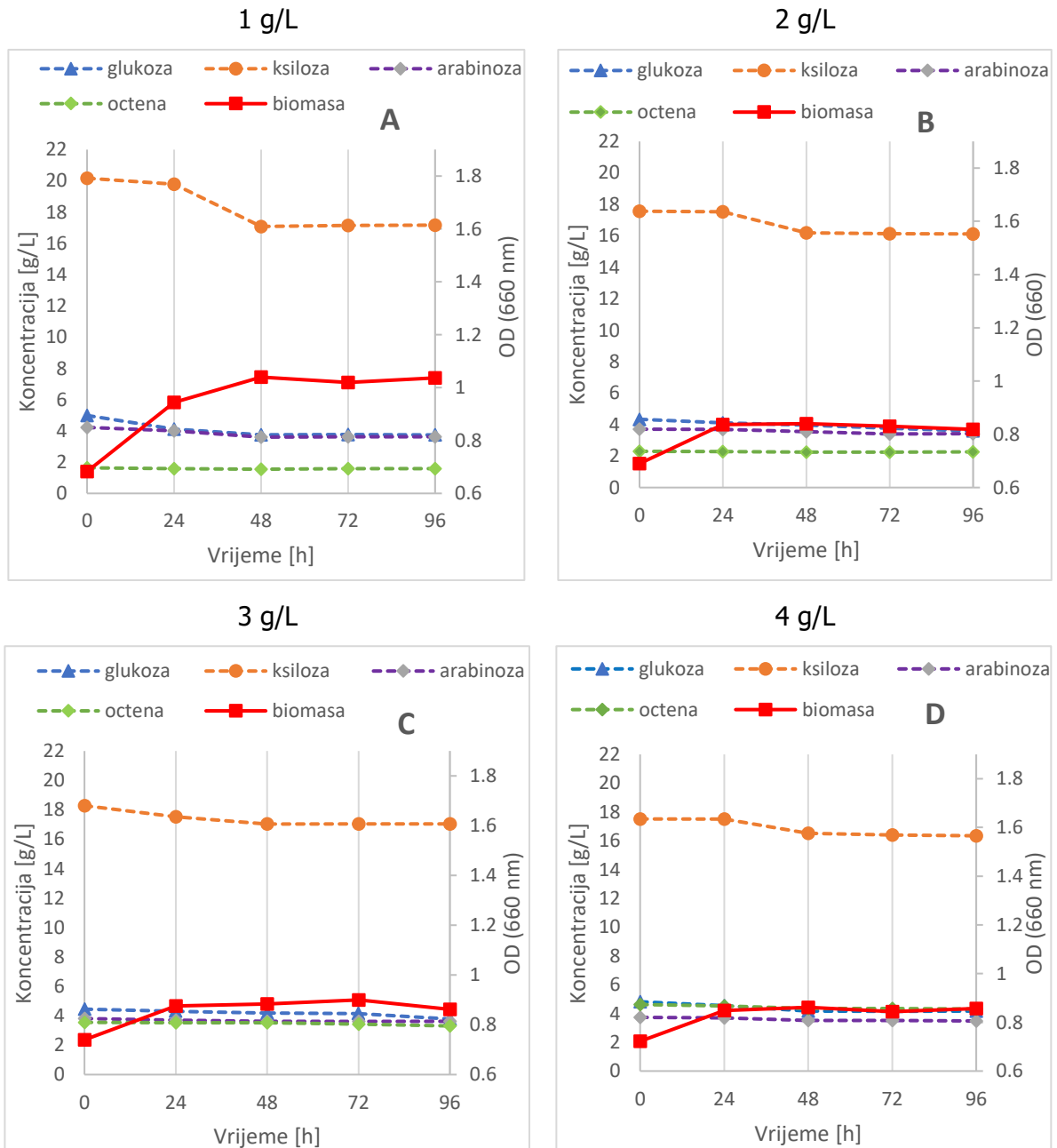
Poglavlje 4.1. sadrži rezultate vezane uz uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu različitih koncentracija octene kiseline kao inhibitora. Prikazani su izračunati parametri uspješnosti uzgoja (Tablica 6.), grafički prikaz promjene koncentracija supstrata, inhibitora i biomase tijekom uzgoja (Slika 2.), apsorpcijski spektri biomase (Slika 3.), apsorpcijski spektri pigmenta bakterioklorofila *a* nakon 48 odnosno 96 sati u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm (Slika 4.) te koncentracije bakterioklorofila *a* (Tablica 7.).

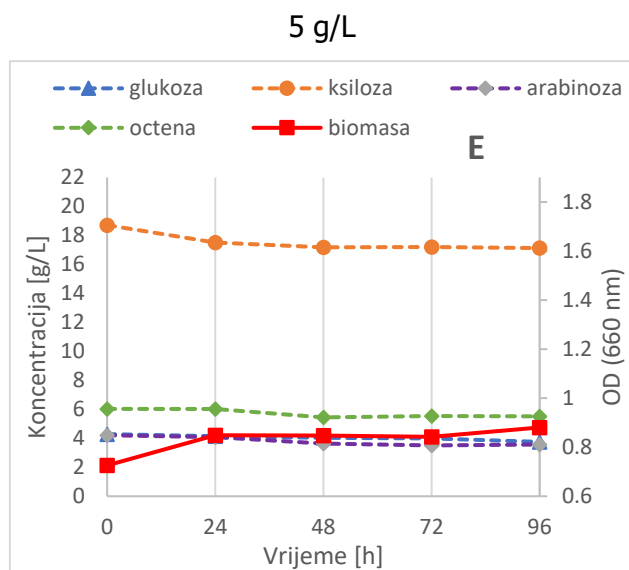
U Poglavlju 4.2. nalaze se rezultati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu različitih koncentracija mravlje kiseline kao inhibitora. Prikazani su izračunati parametri uspješnosti uzgoja (Tablica 8.), grafički prikaz promjene koncentracija supstrata, inhibitora i biomase tijekom uzgoja (Slika 5.), apsorpcijski spektri biomase (Slika 6.), apsorpcijski spektri nastalog pigmenta bakterioklorofila *a* nakon 48 odnosno 96 sati u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm (Slika 7.) te koncentracije bakterioklorofila *a* (Tablica 9.).

Rezultati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu kombinacije octene i mravlje kiseline te uzgoja bez inhibitora (kontrola) nalaze se u Poglavlju 4.3. Prikazani su izračunati parametri uspješnosti uzgoja (Tablica 10.), grafički prikaz promjene koncentracija supstrata, inhibitora i biomase tijekom uzgoja (Slika 8.), apsorpcijski spektri biomase (Slika 9.), apsorpcijski spektri bakterioklorofila *a* u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm nakon 48 i 96 sati (Slika 10.) i Tablica 11. s koncentracijama bakterioklorofila *a*.

4.1. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline kao inhibitora

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri čemu je kao inhibitor korištena octena kiselina (koncentracije 1, 2, 3, 4 i 5 g/L). Uzgoj se provodio 96 sati, bez miješanja, na svjetlosti u mikroaerofilnim uvjetima.





Slika 2. Prikaz promjene koncentracije supstrata i octene kiseline (inhibitor) tijekom uzgoja te krivulja rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

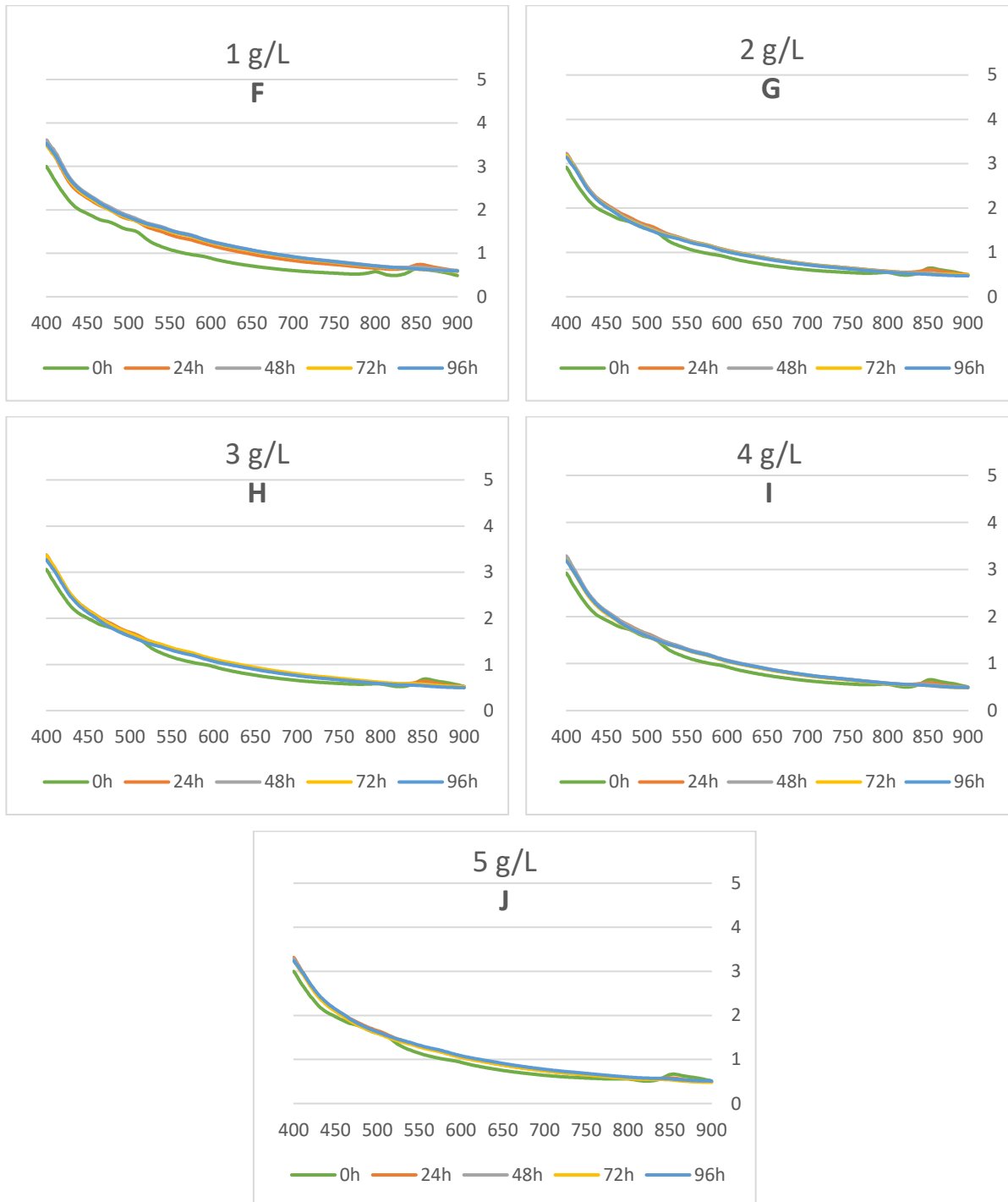
Na Slici 2. prikazani su dijagrami potrošnje supstrata i octene kiseline te krivulja rasta biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom 96 sati uzgoja. Pri uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline koncentracije 1 g/L ukupna potrošnja supstrata (glukoza, ksiloza, arabinoza) iznosila je 4.8497 g/L. Prinos biomase iznosio je 0.4279 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0882 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0051 h^{-1} , a ukupna produktivnost procesa 0.0045 g/Lh . Sve vrijednosti parametara uzgoja su najveće uz dodatak octene kiseline masene koncentracije 1 g/L. Uzgojem bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline koncentracije 2 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 2.4736 g/L. Prinos biomase iznosio je 0.1553 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0628 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0021 h^{-1} , a ukupna produktivnost procesa 0.0016 g/Lh . Iz navedenih je rezultata vidljiv pad vrijednosti svih parametara u usporedbi s vrijednostima parametara uzgoja s 1 g/L octene kiseline. Pri uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline u koncentraciji 3 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 2.0899 g/L, prinos biomase iznosio je 0.1480 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0708 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0019 h^{-1} , a ukupna produktivnost procesa 0.0015 g/Lh . U eksperimentu s bakterijom *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline koncentracije 4 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 2.0714 g/L. Prinos biomase iznosio je 0.1632 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0788 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0021 h^{-1} , a ukupna produktivnost procesa 0.0017 g/Lh . Prilikom uzgoja bakterije

Rhodovulum adriaticum DSM 2781 u prisustvu octene kiseline koncentracije 5 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 2.7572 g/L. Prinos biomase iznosio je 0.1869 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0678 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0024 h⁻¹, a ukupna produktivnost procesa 0.0019 g/Lh. Pokazatelji uspješnosti u eksperimentima s dodatkom octene kiseline u rasponu od 2-5 g/L su vrlo slični. Na svim prikazanim grafovima na Slici 2. vidljivo je da je velika većina supstrata u tikvicama ostala neiskorištena. Povećanjem koncentracije octene kiseline vidljiv je blagi pad vrijednosti parametara uzgoja, osim pri koncentraciji octene kiseline od 5 g/L. Što se krivulje rasta tiče, na svim je grafovima (Slika 2.) vidljivo da u prva 24 sata dolazi do najvećeg prirasta biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, a nakon toga rast uglavnom stagnira.

Tablica 6. Pokazatelji uspješnosti uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi u prisustvu octene kiseline (HAc) kao inhibitora

PODLOGE S RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA OCTENE KISELINE	ΔS [g/L] Glukoza; Ksiloz; Arabinoza	Y_x [g/L]	Y_{x/s} [g/g]	μ [h⁻¹]	Pr [g/Lh]
1 g/L HAc	1.2459 2.9984 0.6054	0.4279	0.0882	0.0051	0.0045
2 g/L HAc	0.7411 1.4456 0.2869	0.1553	0.0628	0.0021	0.0016
3 g/L HAc	0.6702 1.2315 0.1882	0.1480	0.0708	0.0019	0.0015
4 g/L HAc	0.6528 1.1687 0.2499	0.1632	0.0788	0.0021	0.0017
5 g/L HAc	0.5341 1.5847 0.6384	0.1869	0.0678	0.0024	0.0019

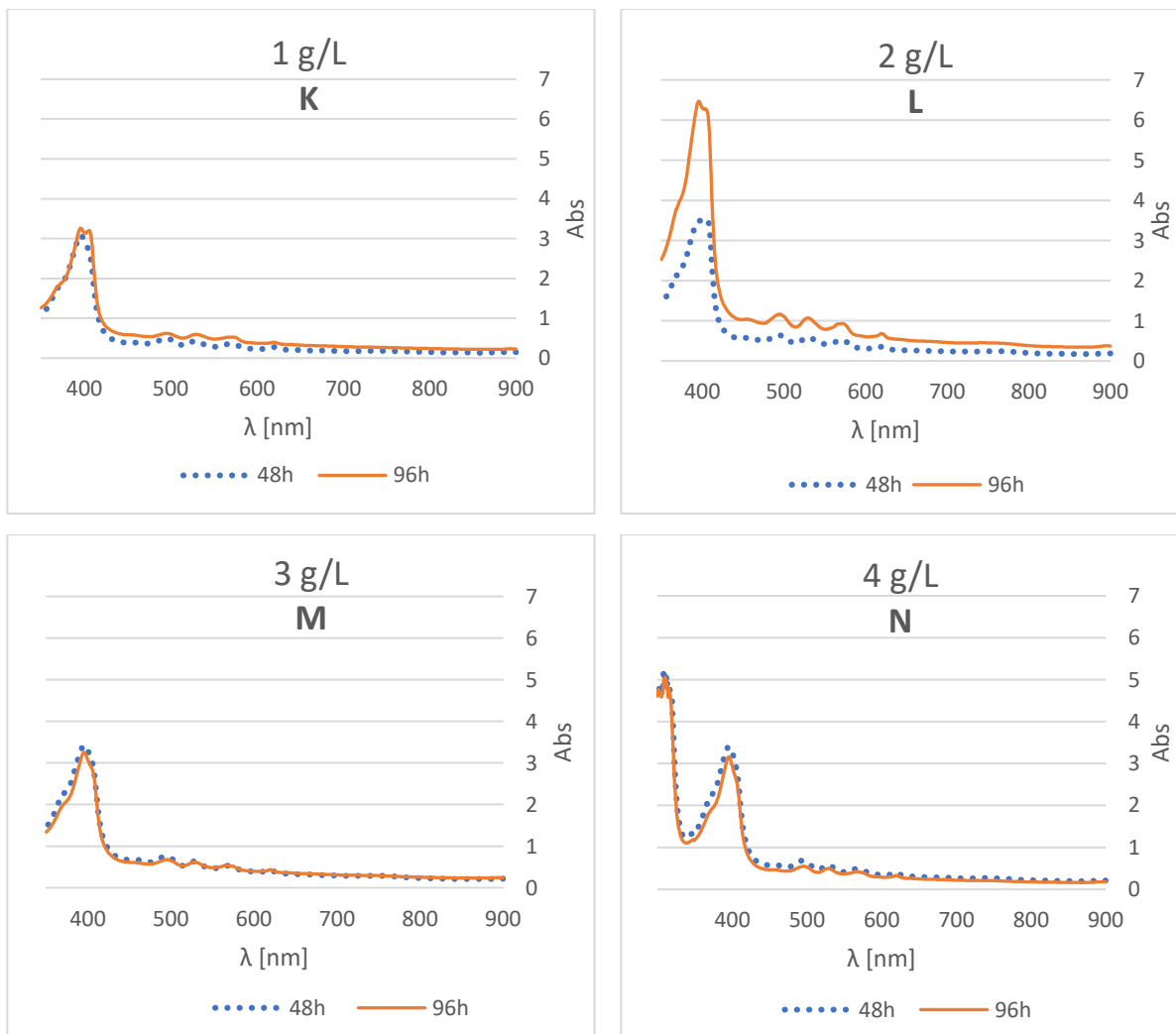
Osim prikazanih dijagrama (Slika 2.) za rast biomase i potrošnju inhibitora i supstrata, u nastavku su prikazani apsorpcijski spektri biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja u prisustvu octene kiseline (Slika 3.). Oni su dobiveni spektrofotometrijskim scan-om uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm.

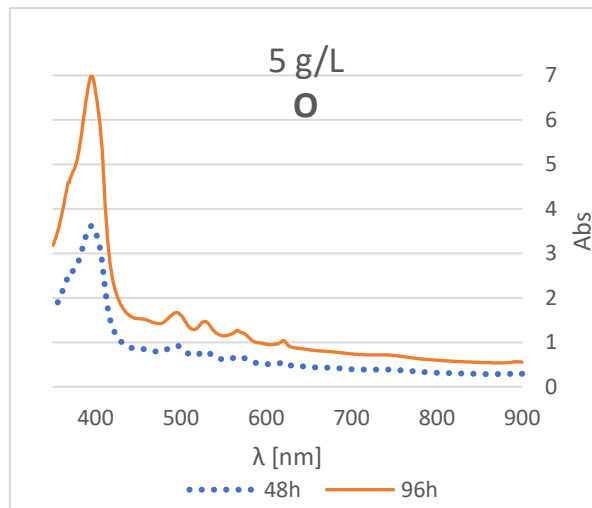


Slika 3. Apсорpcijski spektri biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja, u prisustvu octene kiseline kao inhibitora

Na Slici 3. koja prikazuje apsorpcijske spektre biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 vide se apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* pri 800 i 850 nm za uzgoj u kojem je korištena octena kiselina masene koncentracije 1 g/L (F) koji su vidljivi samo na početku uzgoja (0 h). Na ostalim dijagramima (G, H, I, J) je slabo vidljiv apsorpcijski maksimum samo pri valnoj duljini od 850 nm, također samo na početku uzgoja (0 h).

Tijekom eksperimenta rađena je ekstrakcija ukupnih pigmenata te scan supernatanta u području valnih duljina od 300 do 900 nm radi praćenja koncentracije bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi. Slika 4. prikazuje apsorpcijske spektre ekstrahiranih pigmenata nakon 48 odnosno 96 sati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri različitim koncentracijama octene kiseline.





Slika 4. Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata nakon 48 i 96 sati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline

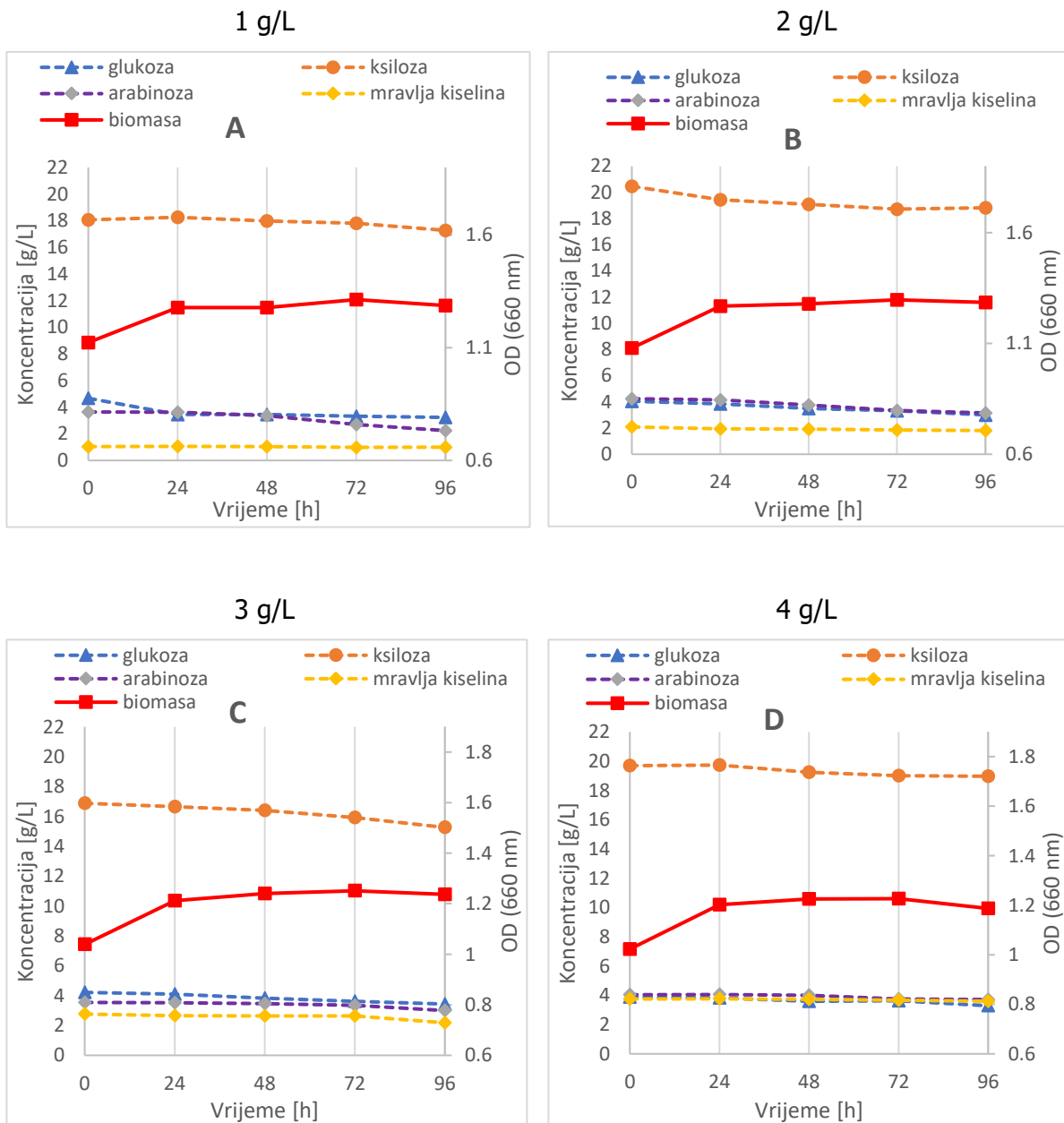
Na apsorpcijskim spektrima (Slika 4.) očekivani su apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* na valnoj duljini od 775 nm. Apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* nalaze se u područjima valnih duljina od 850 do 910 nm no ekstrakcijom pigmenata organskim otapalima dolazi do promjene njihovog kemijskog okruženja pa dolazi do pomaka apsorpcijskih maksimuma na valnu duljinu od 775 nm (Oren, 2011). S obzirom na niske koncentracije sintetiziranog bakterioklorofila *a* (Tablica 7.) apsorpcijski se maksimumi na apsorpcijskim spektrima ne uočavaju što je posljedica inhibicije octenom kiselinom. Octena kiselina inhibirala je rast bakterija te također utječe na sintezu bakterioklorofila što je doprinijelo jako niskoj koncentraciji tog pigmenta. U Tablici 7. prikazane su koncentracije bakterioklorofila *a* nakon 48 i 96 sati iz čega je vidljivo da s vremenom dolazi do smanjenja koncentracije zbog razgradnje pigmenata i djelovanja octene kiseline. Najviša koncentracija pigmenta ostvarena je uz dodatak inhibitora od 2 g/L te iznosi 0.7422 mg/L, a najniža koncentracija dodatkom kiseline u koncentraciji 1 g/L te iznosi 0.3691 mg/L.

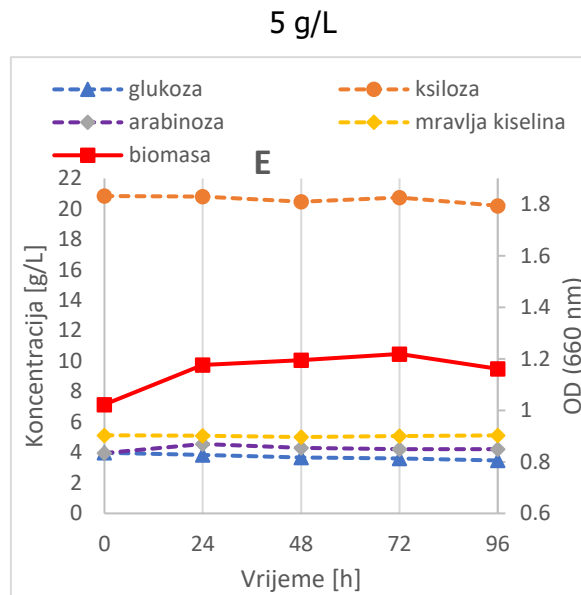
Tablica 7. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene kiseline

Koncentracija octene kiseline [g/L]	Koncentracija Bchl <i>a</i> nakon 48h [mg/L]	Koncentracija Bchl <i>a</i> 96h [mg/L]
1	0.369083045	0.399969045
2	0.742198668	0.310206121
3	0.636894558	0.465334005
4	0.534839588	0.309532008
5	0.672212481	0.502396926

4.2. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline kao inhibitora

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri čemu je kao inhibitor korištena mravlja kiselina (koncentracije 1, 2, 3, 4 i 5 g/L). Uzgoj se provodio 96 sati na svjetlosti u mikroaerofilnim uvjetima, bez miješanja.





Slika 5. Prikaz promjene koncentracije supstrata i mravlje kiseline (inhibitor) tijekom uzgoja te krivulja rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

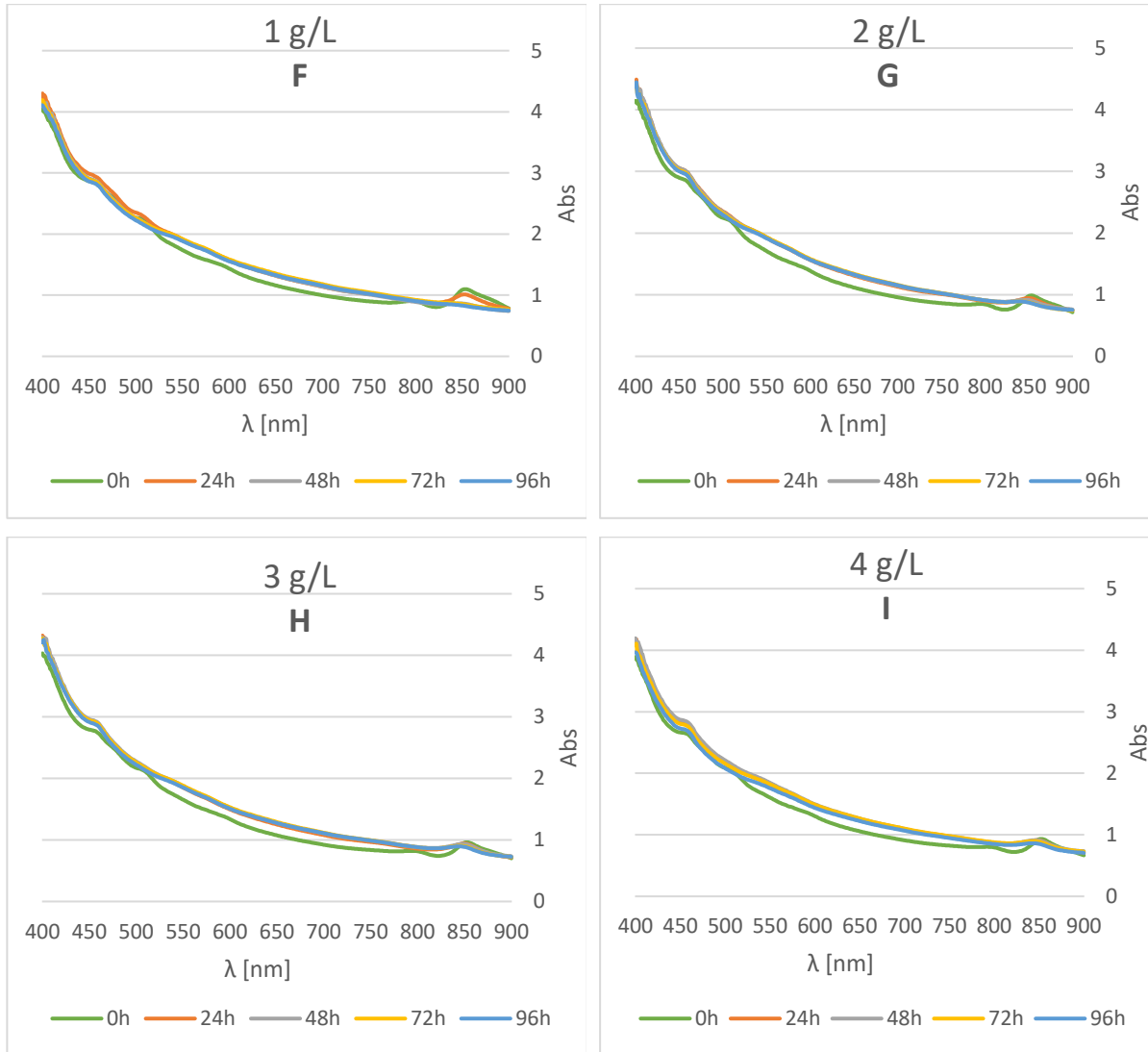
Grafovi na Slici 5. prikazuju promjenu koncentracije supstrata i mravlje kiseline korištene kao inhibitora te prirast biomase prilikom uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Krivulja rasta pokazuje najveći rast u prva 24 sata uzgoja. Koncentracije supstrata na svim grafovima jednoliko padaju, no ukupna potrošnja je mala. Uzgojem bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline koncentracije 1 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 3.6308 g/L, a prinos biomase iznosio je 0.1982 g/L uz stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0546 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0016 h^{-1} dok je ukupna produktivnost procesa iznosila 0.0021 g/Lh. Pri uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline koncentracije 2 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 3.7734 g/L. Prinos biomase iznosio je 0.2498 g/L uz stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0662 g/g. Specifična brzina rasta bakterija u ovom slučaju iznosila je 0.0020 h^{-1} . Ukupna produktivnost procesa bila je 0.0026 g/Lh. U slučaju uzgoja ove bakterije u prisustvu mravlje kiseline koncentracije 3 g/L ukupna potrošnja supstrata iznosila je 2.9460 g/L. Prinos biomase bio je 0.2388 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.0811 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0020 h^{-1} dok je ukupna produktivnost procesa iznosila 0.0025 g/Lh. Uzgojem bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline koncentracije 4 g/L ΔS je iznosio je 1.6511 g/L. Y_x iznosio je 0.1986 g/L pri čemu je stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.1203 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0018 h^{-1} dok je ukupna produktivnost procesa bila 0.0021 g/Lh. Nadalje, pri uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline koncentraciji od 5 g/L

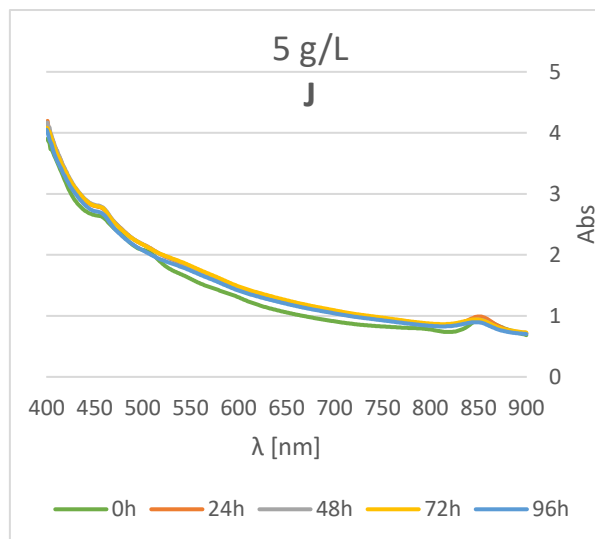
ukupna potrošnja supstrata iznosila je 1.1435 g/L, prinos biomase 0.1677 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.1196 g/g. Potrošnja supstrata se povećanjem koncentracije mravlje kiseline smanjuje, dok se vrijednosti konverzije supstrata u produkt povećavaju. Specifična brzina rasta te produktivnost procesa pri svim koncentracijama mravlje kiseline (1, 2, 3, 4, 5 g/L) vrlo su slični. Ovako niske vrijednosti parametara uspješnosti pokazuju da je dodatak mravlje kiseline negativno utjecao na uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781. Vrijednosti za prinos biomase i produktivnost najveće su dodatkom 2 g/L mravlje kiseline, a koeficijent konverzije supstrata u biomasu pri koncentraciji od 4 g/L.

Tablica 8. Pokazatelji uspješnosti uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi u prisustvu mravlje kiseline (HCOOH) kao inhibitora

PODLOGE S RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA OCTENE KISELINE	ΔS [g/L] Glukoza; Ksiloz; Arabinoza	Y_x [g/L]	$Y_{x/s}$ [g/g]	μ [h⁻¹]	Pr [g/Lh]
1 g/L HCOOH	1.4386 0.7929 1.3993	0.1982	0.0546	0.0016	0.0021
2 g/L HCOOH	1.0430 1.6443 1.0861	0.2498	0.0662	0.0020	0.0026
3 g/L HCOOH	0.7815 1.6195 0.5450	0.2388	0.0811	0.0020	0.0025
4 g/L HCOOH	0.5897 0.7324 0.3290	0.1986	0.1203	0.0018	0.0021
5 g/L HCOOH	0.5072 0.6363 0	0.1677	0.1196	0.0015	0.0017

Kao i u setu eksperimenata s octenom kiselinom, i u ovom slučaju je spektrofotometrom napravljen „scan“ uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm te su pritom dobiveni apsorpcijski spektri biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.

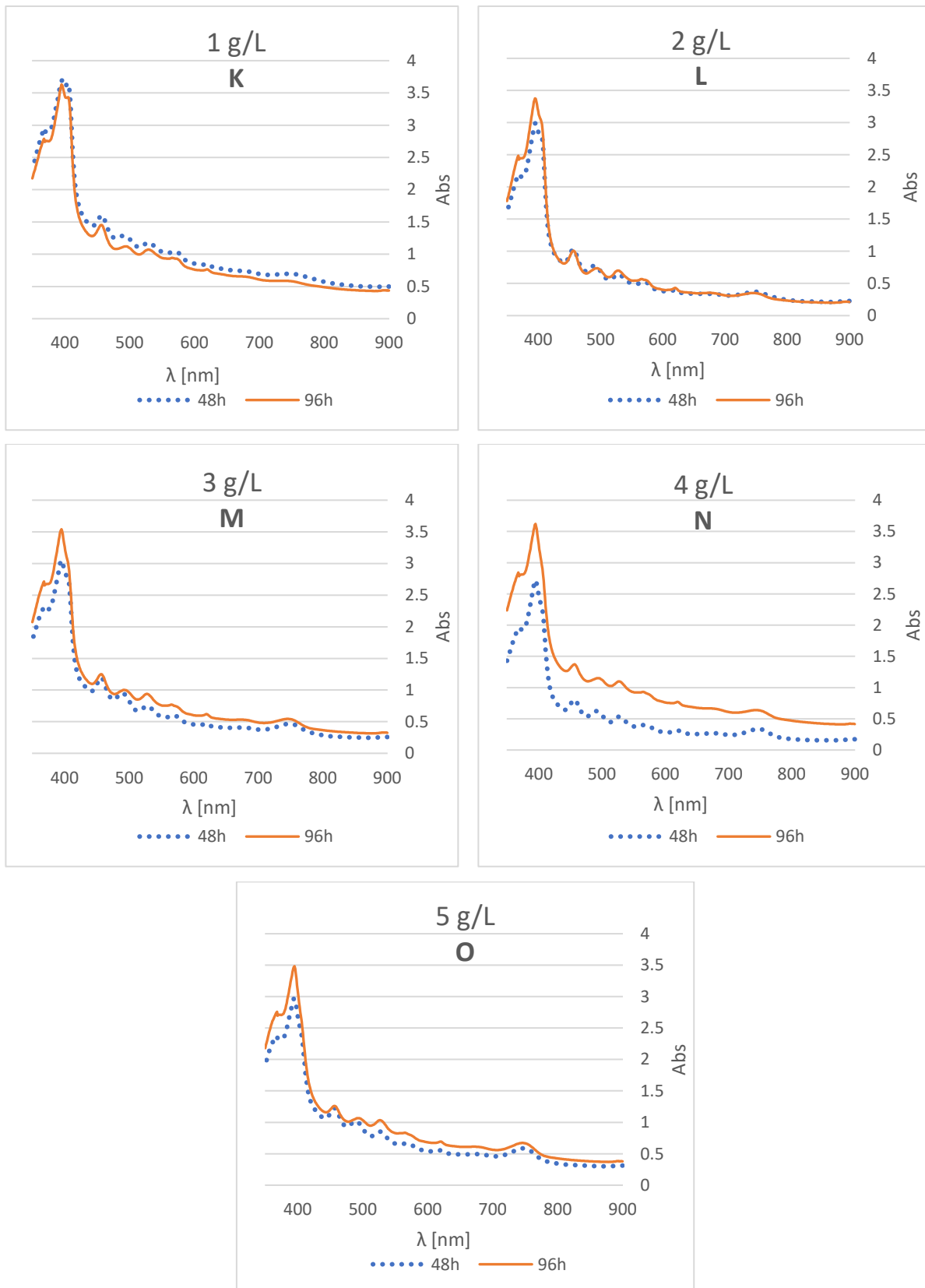




Slika 6. Apsorpcijski spektri biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, tijekom uzgoja u prisustvu mravlje kiseline kao inhibitora

Karakteristični apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* nalaze se na valnim duljinama od 800 i 850 nm. Na prikazanim su spektrima apsorpcijski maksimumi bakterioklorofila *a* vidljivi pri 800 i 850 nm samo na početku uzgoja (0 h) te su najbolje vidljivi pri koncentracijama mravlje kiseline od 1 i 2 g/L (F, G). Na ostalim spektrima (H, I, J) apsorpcijski maksimum je pri 850 nm slabo vidljiv, dok se pri valnoj duljini od 800 nm uopće ne vidi. Slabo vidljivi apsorpcijski maksimumi pokazatelj su vrlo niske koncentracije bakterioklorofila *a* u biomasi.

Osim spektrofotometrijskog određivanja biomase pomoću scan-a, a kako bi odredili koncentraciju bakterioklorofila *a* u biomasi, napravljena je ekstrakcija ukupnih pigmenata te je nakon ekstrakcije supernatant izdvojen za spektrofotometriju, odnosno scan u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm. Na Slici 7. prikazani su apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata nakon 48h te nakon 96h uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781.



Slika 7. Apсорpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata nakon 48 i 96 sati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mравlje kiseline

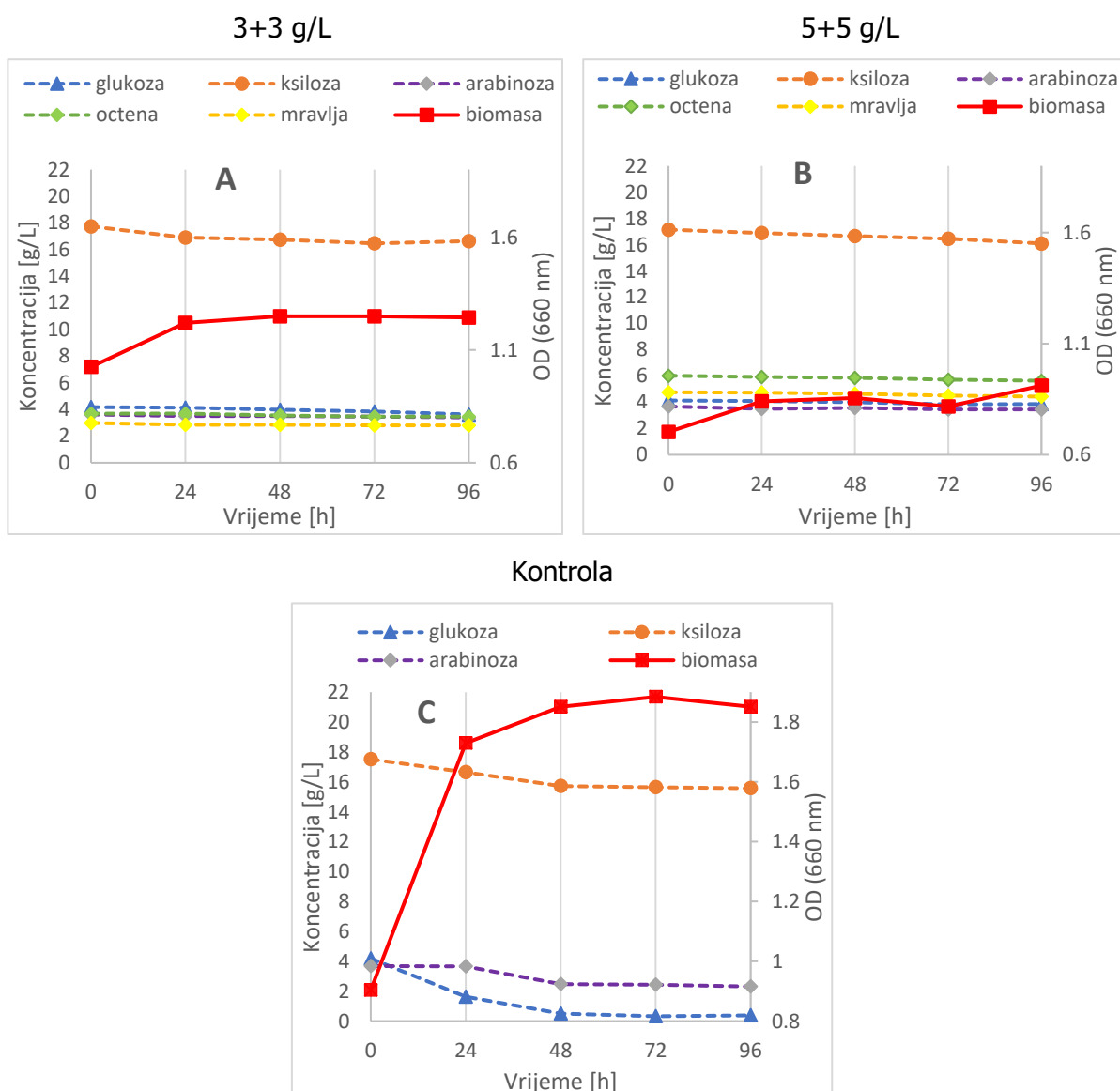
Kao što je već prethodno napisano, ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 sintetizira pigment bakterioklorofil *a* koji ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 775 nm. Budući da je u ovom eksperimentu napravljen uzgoj u prisustvu mravlje kiseline, koja inhibira rast bakterije, to posljedično znači i nisku koncentraciju pigmenta. Tako je na apsorpcijskim spektrima (Slika 7.) karakteristični apsorpcijski maksimum bakterioklorofila *a* uglavnom slabo vidljiv, osim na spektrima N i O gdje su maksimumi uočljiviji. Koncentracije bakterioklorofila *a* (Tablica 9.) su niske i kreću se od 0.76 (koncentracija mravlje kiseline 4 g/L) do 1.65 mg/L (koncentracija mravlje kiseline 1 g/L), ali su u usporedbi s uzgojem gdje je korištena octena kiselina kao inhibitor koncentracije ipak veće. Koncentracija bakterioklorofila kod koncentracija mravlje kiseline od 1, 2 i 3 g/L tijekom uzgoja smanjuje, dok se pri koncentracijama od 4 i 5 g/L povećava.

Tablica 9. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje kiseline

Koncentracija mravlje kiseline [g/L]	Koncentracija Bchl <i>a</i> nakon 48h [mg/L]	Koncentracija Bchl <i>a</i> nakon 96h [mg/L]
1	1.658850319	1.07005071
2	1.016549576	0.7888057
3	1.260521099	1.114243473
4	0.763447277	1.193727628
5	1.321087418	1.352891296

4.3. Uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje i octene kiseline kao inhibitora i bez prisustva inhibitora (kontrola)

U ovom su poglavlju prikazani rezultati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri čemu su kao inhibitori korištene octena i mravlja kiselina (koncentracije 3+3 g/L i 5+5 g/L) te također uzgoj bez prisustva inhibitora. Uzgoj se provodio u mikroaerofilnim uvjetima na svjetlosti, bez miješanja te se provodio 96 sati.



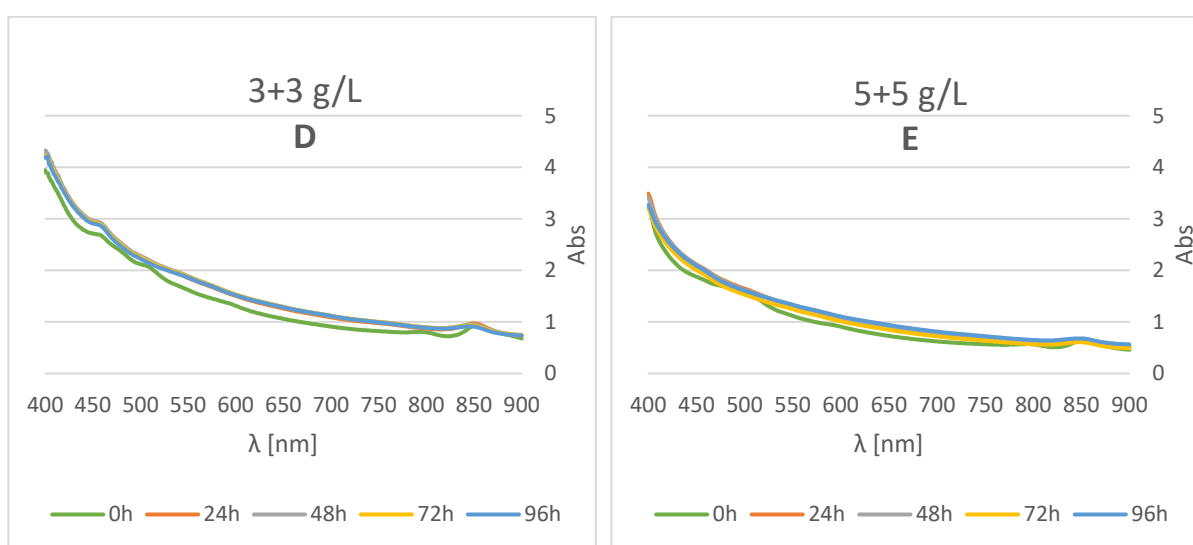
Slika 8. Prikaz promjene koncentracije supstrata (kontrola), odnosno supstrata i inhibitora (mravlja i octena kiselina) tijekom uzgoja te krivulja rasta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781

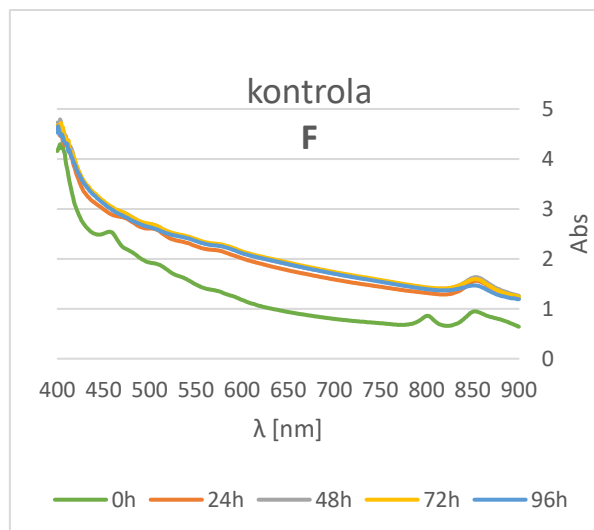
Na Slici 8. prikazan je rast biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 te promjena koncentracije supstrata i inhibitora u vremenu. Uzgojem bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje i octene kiseline u koncentracijama od 3 g/L (3 g/L HAc i 3 g/L HCOOH) ukupna potrošnja supstrata iznosila je 1.8812 g/L, prinos biomase 0.2647 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.1407 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0023 h^{-1} , a ukupna produktivnost procesa 0.0028 g/Lh . Pri uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje i octene kiseline u koncentracijama od 5 g/L (5 g/L HAc i 5 g/L HCOOH) ukupna potrošnja supstrata iznosila je 1.5443 g/L. Prinos biomase u ovom slučaju bio je 0.2518 g/L uz stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.1631 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0032 h^{-1} što je u usporedbi s dodatkom 3 g/L octene te 3 g/L mravlje kiseline malo veća vrijednost iako je ukupna produktivnost procesa malo manja (0.0026 g/Lh). Pri uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 bez dodatka inhibitora ΔS iznosio je 7.1246 g/L, prinos biomase 1.1453 g/L, a stupanj konverzije supstrata u biomasu 0.1608 g/g. Specifična brzina rasta bakterija iznosila je 0.0083 h^{-1} , a ukupna produktivnost procesa 0.0119 g/Lh . Kao što je bilo i za pretpostaviti, pokazatelji uspješnosti poprimaju najveće vrijednosti kod uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 bez dodatka inhibitora (kontrola). Na Slici 8. na grafu koji prikazuje uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 bez prisustva inhibitora (C) vidljiv je veliki porast koncentracije biomase posebno nakon 24h uzgoja. Također, potrošnja supstrata je puno veća što se posebno vidi za glukozu. Na grafovima u prisustvu octene i mravlje kiseline vidljivo je da je prirast biomase veći pri nižim koncentracijama mravlje i octene kiseline (A). Što se tiče potrošnje izvora ugljika, ona je u oba slučaja niska, što se vidi na Slici 8. (A, B) gdje su krivulje u jedva zamjetnom padu.

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na kemijski definiranoj podlozi u prisustvu mravlje (HCOOH) i octene kiseline (HAc) kao inhibitora te bez inhibitora (kontrola)

PODLOGE S RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA OCTENE KISELINE	ΔS [g/L] Glukoza; Ksilozna; Arabinoza	Y_x [g/L]	$Y_{x/s}$ [g/g]	μ [h⁻¹]	Pr [g/Lh]
3+3 g/L (HCOOH + HAc)	0.5436	0.2647	0.1407	0.0023	0.0028
	1.1102				
	0.2274				
5+5 g/L (HCOOH + HAc)	0.2634	0.2518	0.1631	0.0032	0.0026
	1.0533				
	0.2276				
KONTROLA	3.8136	1.1453	0.1608	0.0083	0.0119
	1.9409				
	1.3701				

Nadalje, svaka 24 sata provodila se spektrofotometrija uzoraka, pri čemu je napravljen „scan“ uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm te su dobiveni apsorpcijski spektri biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 prikazani na Slici 9.

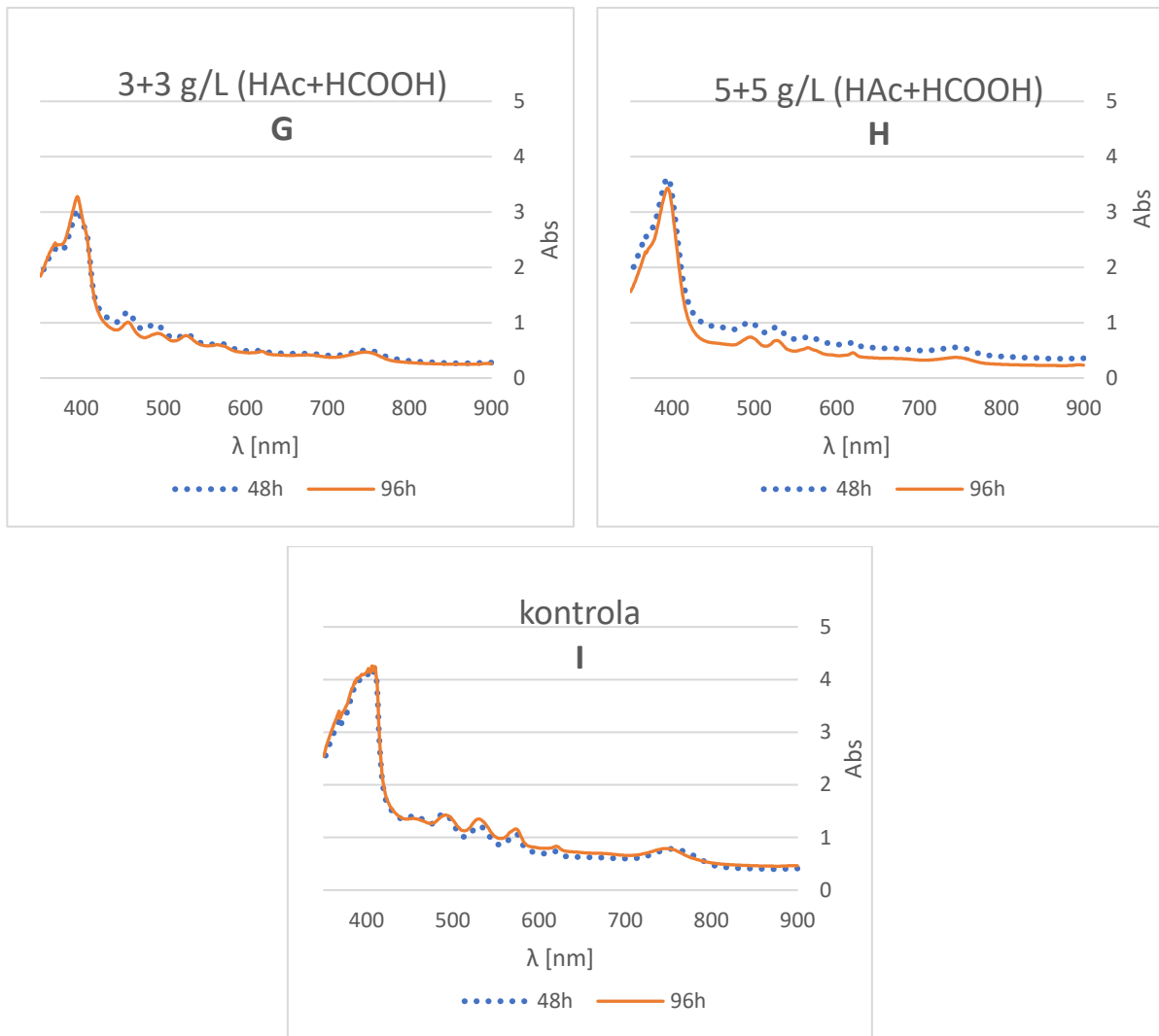




Slika 9. Apsorpcijski spektri biomase ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 tijekom uzgoja u prisustvu octene i mravlje kiseline te bez njihovog prisustva (kontrola)

Apsorpcijski spektri biomase pokazuju apsorpcijske maksimume za bakterioklorofil *a* pri valnim duljinama 800 nm i 850 nm. Na spektru D (Slika 9.) apsorpcijski maksimumi na 800 i 850 nm su vidljivi samo na početku uzgoja (0 h), a na spektru E apsorpcijski maksimum se vidi samo na valnoj duljini od 850 nm, također samo na početku uzgoja. Takav rezultat i u ovom slučaju ukazuje na slabiju sintezu pigmenta pri većoj koncentraciji inhibitora. Uzgoj koji je služio kao kontrola, odnosno koji se provodio bez dodatka inhibitora, pokazuje spektar (F) na kojem su apsorpcijski maksimumi puno jasnije vidljivi, pogotovo na početku uzgoja (0 h). Apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 850 nm vidljiv je na svim krivuljama, odnosno tijekom cijelog uzgoja (F), a apsorpcijski maksimum na 800 nm je vidljiv samo na početku uzgoja.

Također, napravljena je ekstrakcija ukupnih pigmenata te „scan“ supernatanta u rasponu valnih duljina od 300 do 900 nm radi praćenja koncentracije bakterioklorofila *a* u bakterijskoj biomasi. Slika 4. prikazuje apsorpcijske spektre ekstrahiranih pigmenata nakon 48 odnosno 96 sati uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 pri različitim koncentracijama octene i mravlje kiseline te bez inhibitora (kontrola).



Slika 10. Apsorpcijski spektri ekstrahiranih pigmenata nakon 48 i 96 sati uzgoja bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu mravlje i octene kiseline te bez njihova prisustva inhibitora (kontrola)

U ovom setu eksperimenata napravljeni su uzgoji s kombinacijom mravlje i octene tako da su u jednom uzgoju dodane obje kiseline u koncentraciji od 3 g/L, a u drugom uzgoju obje u koncentraciji od 5 g/L. Treći uzgoj je proveden bez korištenja inhibitora kao kontrola. Apsorpcijski maksimumi na 775 nm su slabije vidljivi (Slika 10.) što je posljedica niskih koncentracija bakterioklorofila *a*. U Tablici 11. prikazane su koncentracije bakterioklorofila *a* koje su ponovno niske, osim za uzgoj bez inhibitora, gdje koncentracija iznosi 3.46 mg/L pa je i apsorpcijski maksimum na spektru I bolje uočljiv. U sva je tri uzgoja koncentracija bakterioklorofila *a* manja nakon 96h u odnosu na koncentraciju nakon 48h što ukazuje na razgradnju pigmenta. Usporedbom uzgoja s kombiniranom mravljom i octenom kiselinom vidi se da je pri koncentracijama 3+3 g/L nastala veća koncentracija bakterioklorofila *a*, u odnosu

na dodatak mravlje i octene kiseline masene koncentracije 5 g/L (Tablica 11.) što se vidi i na apsorpcijskom spektru (G).

Tablica 11. Koncentracija bakterioklorofila *a* tijekom uzgoja ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u prisustvu octene i mravlje kiseline te uzgoj bez prisustva inhibitora (kontrola)

Koncentracija mravlje i octene kiseline [g/L]	Koncentracija Bchl <i>a</i> nakon 48h [mg/L]	Koncentracija Bchl <i>a</i> nakon 96h [mg/L]
3+3	1.224506165	0.964605189
5+5	0.979561915	0.620854576
KONTROLA	3.463408246	2.02697072

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja mogu se donijeti slijedeći zaključci:

- 1) Uzgojem ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u podlozi gdje je octena kiselina dodana kao inhibitor, najbolji su rezultati dobiveni s koncentracijom od 1 g/L, a za ostale koncentracije parametri su sličnih vrijednosti. U usporedbi parametara uspješnosti za uzgoj u kojem je korištena octena kiselina s kontrolom (uzgoj bez inhibitora) vidljiva je značajna razlika što pokazuje da octena kiselina inhibira rast bakterija.
- 2) U eksperimentima s bakterijom *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 gdje je dodana mravlja kiselina kao inhibitor dobivene su slične vrijednosti parametara uzgoja kao što su bile kod uzgoja s octenom kiselinom. Najbolji rezultati dobiveni su dodatkom 2 g/L mravlje kiseline, osim stupnja konverzije supstrata u biomasu (0.1203 g/L), koji je najbolji pri 4 g/L mravlje kiseline. Usporedbom s parametrima uspješnosti kod uzgoja bez inhibitora također je, kao i kod octene kiseline, vidljiva velika razlika u eksperimentalnim rezultatima te je rast bakterije inhibiran.
- 3) Uzgoji bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 s kombinacijom mravlje i octene kiseline pokazuju sličan rast pri vrijednostima koncentracija od 3 g/L i 5 g/L. Kontrola (uzgoj bez inhibitora) i u ovom slučaju pokazuje puno bolje parametre uspješnosti uzgoja, osim za stupanj konverzije supstrata u biomasu gdje su vrijednosti slične.
- 4) Korištenje mravlje i octene kiseline negativno utječe i na sintezu pigmenta bakterioklorofila *a*. Koncentracije bakterioklorofila *a* (Bchl *a*) ipak su nešto više kod uzgoja u kojima je korištena mravlja kiselina te je najveća koncentracija postignuta kod koncentracije 1 g/L mravlje kiseline (1.6589 mg/L). Kombiniranom inhibicijom mravljom i octenom kiselinom koncentracije Bchl *a* su više od uzgoja korištenjem samo octene kiseline kao inhibitora, a niže od onih kod uzgoja u prisustvu mravlje kiseline. U kontrolnom uzgoju bez korištenja inhibitora nastala je najveća koncentracija bakterioklorofila *a* (3.46 mg/L).

6. LITERATURA

- Acién F. G., Fernández J. M., Magán J. J., Molina E. (2012) Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology advances*, 30(6): str. 1344-1353.
- Akkerman I., Janssen M., Rocha J., Wijffels R. H. (2002) Photobiological Hydrogen Production: Photochemical Efficiency and Bioreactor Design. *Int. J. Hydrogen Energy* 27: 1195 - 1208. doi: 10.1016/S0360-3199(02)00071-X
- Alloul A., Cerruti M., Adamczyk D., Weissbrodt D. G., Vlaeminck S. E. (2020) Control tools to selectively produce purple bacteria for microbial protein in raceway reactors. *bioRxiv*.
- Alloul A., Wuyts S., Lebeer S., Vlaeminck S. E. (2019) Volatile fatty acids impacting phototrophic growth kinetics of purple bacteria: Paving the way for protein production on fermented wastewater. *Water research*, 152: str. 138-147.
- Basak N., Das, D. (2007) The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1): str. 31-42.
- Benemann J. R. (1997) Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *International journal of hydrogen energy*, 22(10-11): str. 979-987.
- Camacho, A. (2009) Sulfur Bacteria. *Encyclopedia of Inland Waters*, Academic Press.
- Carlozzi P., Pushparaj B., Degl'Innocenti A., Capperucci A. (2006) Growth characteristics of *Rhodospseudomonas palustris* cultured outdoors, in an underwater tubular photobioreactor, and investigation on photosynthetic efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(4): str. 789-795.
- Carlozzi P., Sacchi A. (2001) Biomass Production and Studies on *Rhodospseudomonas palustris* Grown in an Outdoor, Temperature Controlled, Underwater Tubular Photobioreactor. *J. Biotechnol.* 88: str. 239 – 249.
- carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresour.*
- Cheirsilp B., Torpee S. (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*, 110: str. 510-516.
- Chen T., Schulte D. D., Koelsch R. K., Parkhurst A. M. (2003) Characteristics of phototrophic and non-phototrophic lagoons for swine manure. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 46: str. 1285–1292.

- Chitapornpan S., Chiemchaisri C., Chiemchaisri W., Honda R., Yamamoto K. (2012) Photosynthetic bacteria production from food processing wastewater in sequencing batch and membrane photo-bioreactors. *Water Science and Technology*, 65(3): str. 504-512.
- Choorit W., Thanakoset P., Thongpradistha J., Sasaki K., Noparatnaraporn N. (2002) Identification and cultivation of photosynthetic bacteria in wastewater from a concentrated latex processing factory. *Biotechnology Letters*, 24(13): str. 1055-1058.
- Colbeau A., Kelley B. C., Vignais P. M. (1980) Hydrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata*: relationship with nitrogenase activity. *Journal of bacteriology*, 144(1): str. 141-148.
- DasSarma S., DasSarma P. (2017) Halophiles. In *Encyclopedia Of Life Sciences*. U.K. Chichester (ed). John Wiley & Sons Ltd, str. 1– 13.
- Do Y. S., Schmidt T. M., Zahn J. A., Boyd E. S., Mora A., DiSpirito A. A. (2003) Role of *Rhodobacter* sp. strain PS9, a purple non-sulfur photosynthetic bacterium isolated from an anaerobic swine waste lagoon, in odor remediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: str. 1710–1720.
- George B., Pancha I., Desai C., Chokshi K., Paliwal C., Ghosh T., Mishra S. (2014) Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource technology*, 171: str. 367-374.
- Habte M., Alexander M. (1980) Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria in lowland rice culture. *Applied and environmental microbiology*, 39(2): str. 342-347.
- Higuchi-Takeuchi M., Morisaki K., Toyooka K., Numata K. (2016) Synthesis of high-molecular-weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria. *Plos one*, 11(8): e0160981.
- Higuchi-Takeuchi M., Numata K. (2019) Acetate-inducing metabolic states enhance polyhydroxyalkanoate production in marine purple non-sulfur bacteria under aerobic conditions. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7: str 118.
- Hiraishi A., Masamune K., Kitamura H. (1989) Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4): str. 897-901.
- Hoekema S., Bijmans M., Janssen M., Tramper J., Wijffels R. H. (2002) A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic

photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12): str. 1331-1338.

- Holguin G., Vazquez P., Bashan Y. (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and fertility of soils*, 33(4): str. 265-278.
- Hülsen T., Barry E. M., Lu Y., Puyol D., Keller J., Batstone D. J. (2016) Domestic wastewater treatment with purple phototrophic bacteria using a novel continuous photo anaerobic membrane bioreactor. *Water research*, 100: str. 486-495.
- Hülsen T., Batstone D. J., Keller, J. (2014) Phototrophic bacteria for nutrient recovery from domestic wastewater. *Water Res*, 50: str. 18– 26.
- Ilag L. L., Jahn D., Eggertsson G., Söll D. (1991) The *Escherichia coli* hemL gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Journal of bacteriology*, 173(11): str. 3408-3413.
- Imhoff J. F. (1992) Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic bacteria. In *Photosynthetic prokaryotes*. Springer, Boston, MA, str. 53-92
- Imhoff J. F. (2006) The Phototrophic Alpha – Proteobacteria. U: The Prokaryotes, vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, str. 41 – 64.
- Kantachote D., Nunkaew T., Kantha T., Chairapat S. (2016) Biofertilizers from *Rhodopseudomonas palustris* strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. *Applied Soil Ecology*, 100: str. 154-161.
- Kantha T., Kantachote D., Klongdee N. (2015) Potential of biofertilizers from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains to assist rice (*Oryza sativa* L. subsp. indica) growth under salt stress and to reduce greenhouse gas emissions. *Annals of microbiology*, 65(4): str. 2109-2118.
- Keppen O. I., Krasil'nikova E. N., Lebedeva N. V., Ivanovskii R. N. (2013) Comparative Study of Metabolism of the Purple Photosynthetic Bacteria Grown in the Light and in the Dark under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Microbiology* 82(5): str. 547 – 553.
- Kim M. K., Choi K. M., Yin C. R., Lee K. Y., Im W. T., Lim J. H., Lee S. T. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnology letters*, 26(10): str. 819-822.
- Kuo F. H., Chien Y. H., Chen C. J. (2012) Effects of light sources on growth and

- Lee C. M., Chen P. C., Wang C. C., Tung Y. C. (2002) Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12): str. 1309-1313.
- Lee C. S., Lee S. A., Ko S. R., Oh H. M., Ahn C. Y. (2015) Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. *Water research*, 68: str. 680-691.
- Levin David B., Lawrence Pitt, Murray Love. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International journal of hydrogen energy* 29(2): str. 173-185.
- Lien D. T., Thi D., Uyen T., Thi L., Cong N., Ha H. P., Ngoc C. T. (2018) Optimization Production Conditions of Photosynthetic Purple Bacteria Biomass at Pilot Scale to Remove Sulphide from Aquaculture Pond. *J. Viet. Env.* 9 (2): str. 112 – 117. doi: 10.13141/jve.vol9.no2.pp112-117
- Liu S., Daigger G. T., Kang J., Zhang G. (2019) Effects of light intensity and photoperiod on pigments production and corresponding key gene expression of *Rhodospseudomonas palustris* in a photobioreactor system. *Bioresource technology*, 294: str. 122-172.
- Lorrungruang C., Martthong J., Sasaki K., Noparatnaraporn N. (2006) Selection of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for polyhydroxyalkanoate production with two-stage aerobic dark cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(2): str. 128-131.
- Madigan M. T., Gest H. (1979) Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H₂ as the energy source. *Journal of bacteriology*, 137(1): str. 524-530.
- Marđetko N., Novak M., Trontel A., Grubišić M., Galić M., Šantek B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 32 (4): str. 483 – 499.
- Markov S. A., Weaver P. F. (2008) Bioreactors for H₂ Production by Purple Nonsulfur Bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 145(1-3): str. 79-86.
- Melis A. (2002) Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11): str. 1217-1228.
- Melis A., Melnicki M. R. (2006) Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(11): str. 1563-1573.

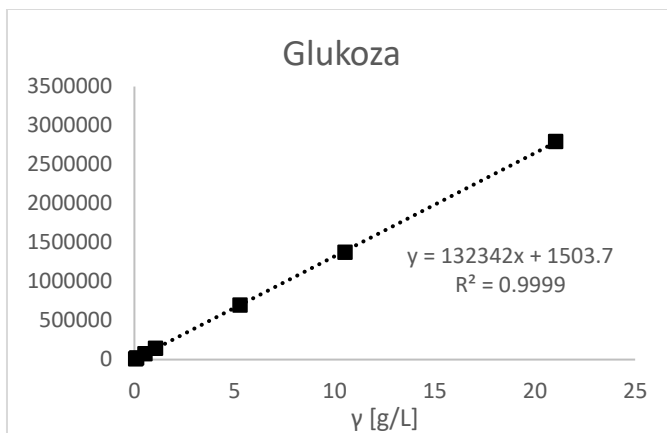
- Merugu R., Rudra M. P., Girisham S., Reddy S. M. (2012) Biotechnological applications of Purple Non Sulphur Phototrophic bacteria: a minireview. *International Journal of Applied biology and Pharmaceutical technology*, 3(1).
- Nagadomi H., Hiromitsu T., Takeno K., Watanabe M., Sasaki K. (1999) Treatment of aquarium water by denitrifying photosynthetic bacteria using immobilized polyvinyl alcohol beads. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(2): str. 189-193.
- Nagadomi H., Kitamura T., Watanabe M., Sasaki K. (2000) Simultaneous removal of chemical oxygen demand (COD), phosphate, nitrate and H₂S in the synthetic sewage wastewater using porous ceramic immobilized photosynthetic bacteria. *Biotechnology Letters*, 22(17): str. 1369-1374.
- Neidle E. L., Kaplan S. (1993) 5-Aminolevulinic acid availability and control of spectral complex formation in hemA and hemT mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* 175(8): str. 2304-2313.
- Noparatnaraporn N., Takeno K., Sasaki K. (2001) Hydrogen and poly-(hydroxy) alkanoate production from organic acids by photosynthetic bacteria. *Biohydrogen II*. Pergamon, str. 33-40.
- Norsker N. H., Barbosa M. J., Vermuë M. H., Wijffels R. H. (2011) Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnology advances*, 29(1): str. 24-27.
- Numan M., Bashir S., Mumtaz R., Tayyab S., Rehman N. U., Khan A. L., ... Al-Harrasi A. (2018) Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *3 Biotech*, 8(4): str. 207.
- Oren A. (2011) Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. *Methods Microbiol.* 28: str. 261 – 282.
- Overmann J. (2008) Green nonsulfur bacteria. *eLS*.
photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light intensity. *Bioresour.*
- Rebeiz C. A., Montazer-Zouhour A., Hopen H. J., Wu S. M. (1984) Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme and microbial technology*, 6(9): str. 390-396.
- Rey F. E., Oda Y., Harwood C. S. (2006) Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol*, 188: str. 6143– 6152.
- Rippka R., Waterbury J. B., Stanier R. Y. (1981) Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. In *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 212-220.

- Sakarika M., Spanoghe J., Sui Y., Wambacq E., Grunert O., Haesaert G., ... Vlaeminck S. E. (2019) Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microbial Biotechnology*.
- Sakpirom J., Kantachote D., Nunkaew T., Khan E. (2017) Characterizations of Purple Non-Sulfur Bacteria Isolated from Paddy Fields, and Identification of Strains with Potential for Plant Growth-Promotion, Greenhouse Gas Mitigation and Heavy Metal Bioremediation. *Res. Microbiol.* 168 (3): str. 266 – 275. doi: 10.1016/j.resmic.2016.12.001
- Salma U., Miah A. G., Tareq K. M. A., Maki T., Tsujii H. (2007) Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on egg-yolk cholesterol and laying hen performance. *Poultry Science*, 86(4): str. 714-719.
- Sasaki K., Watanabe M., Tanaka T. (2002) Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(1): str. 23-29.
- Sasikala C., Ramana C. V. (1995) Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. I. Production of single-cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones, and enzymes and use in waste treatment. In *Advances in applied microbiology*. Academic Press, 41: str. 173-226.
- Skene, M. (1914) A contribution to the physiology of the purple sulphur bacteria. *New Phytologist*, 13(1): str. 1-17.
- Sunita M., Chanchal K. M. (1993) Photoproduction of hydrogen by photosynthetic bacteria from sewage and waste water. *Journal of biosciences* 18(1): 155-160.
- Suwan D., Chitapornpan S., Honda R., Chiemchaisri W., Chiemchaisri C., Suwan D., ... Chiemchaisri C. (2014). Conversion of organic carbon in food processing wastewater to photosynthetic biomass in photo-bioreactors using different light sources. *Environmental Engineering Research*, 19(3): str. 293-298.
- Tadros M. H., Drews G. (1990) Pigment-proteins of antenna complexes from purple non-sulfur bacteria: localization in the membrane, alignments of primary structure and structural predictions. In *Molecular biology of membrane-bound complexes in phototrophic bacteria*. Springer, Boston, MA, str. 181-192. *Technol.* 113: str. 315–318. *Technol.* 171: str. 330–335.)
- Thangaraj, A., Kulandaivel G. (1994) *Bioresource Technology*, 49: str. 9-12.
- Tusé D., Miller M. W. (1984) Single-cell protein: Current status and future prospects. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 19(4): str. 273-325.

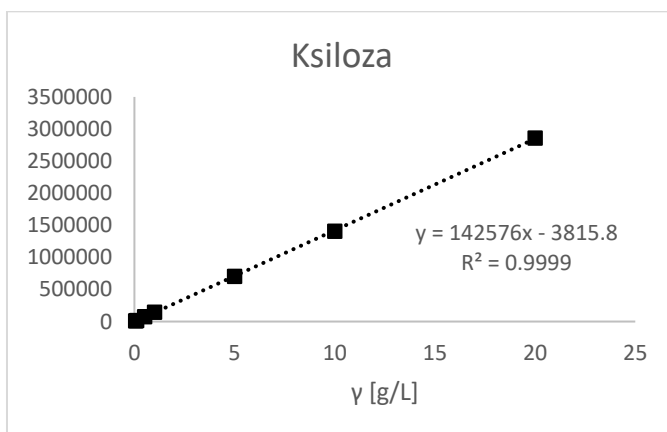
- van Niel C. B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological Reviews*, 8(1): str. 1.
- Watanabe M., Sasaki K., Nakashimada Y., Nishio N. (1998) High Density Cell Culture of a Marine Photosynthetic Bacterium *Rhodovulum* sp. With Self - Flocculated Cells. *Biotechnol. Lett.* 20 (12): str. 1113 – 1117.
- Woodard S.I., Dailey H.A. (1995) Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316: str. 110–115.
- Yen H. W., Shih T. Y. (2009) Coenzyme Q10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in Stirred Tank and in Airlift Bioreactor. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* 32 (6): str. 711 – 716. doi: 10.1007/s00449-008-0294-5
- Yurkov V. V., Beatty J. T. (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): str. 695-724.
- Zhang Q., Zhang Z. (2018) Biological Hydrogen Production From Renewable Resources by Photofermentation. In *Advances in Bioenergy*. Elsevier, 3: str. 137-160.
- Zhi R., Yang A., Zhang G., Zhu Y., Meng F., Li X. (2019) Effects of light-dark cycles on photosynthetic bacteria wastewater treatment and valuable substances production. *Bioresource technology*, 274: str. 496-501.
- Zhou Q., Zhang P., Zhang G. (2014) Biomass and carotenoid production in
- Zhou Q., Zhang P., Zhang G. (2015b) Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: effects of light sources. *Bioresource technology*, 179: str. 505-509.
- Zhou Q., Zhang P., Zhang G., Peng M. (2015a) Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: effects of photoperiod. *Bioresource Technology*, 190: str. 196-200.

7. PRILOZI

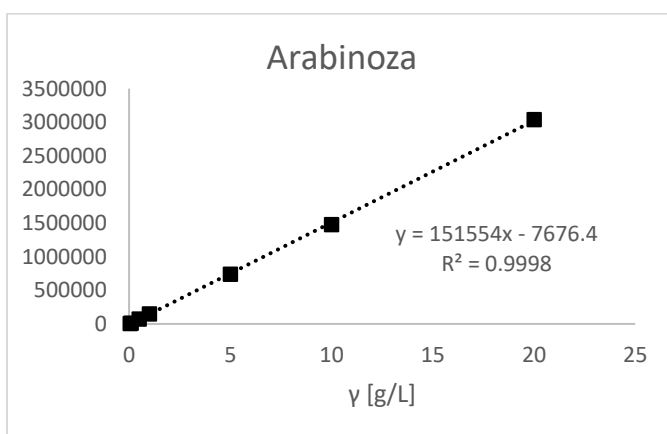
Prilog 7.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze na UPLC-u



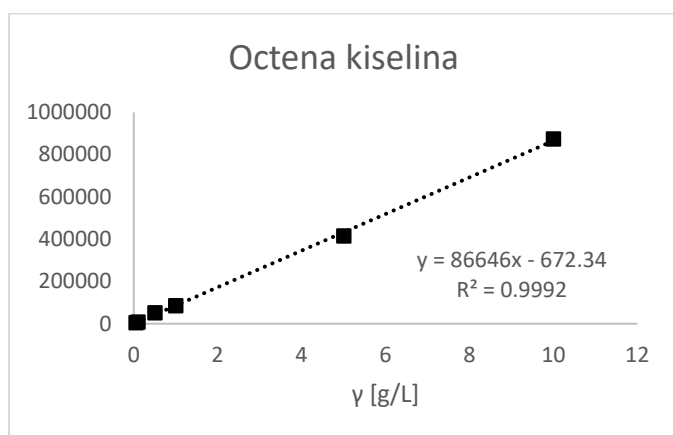
Prilog 7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze na UPLC-u



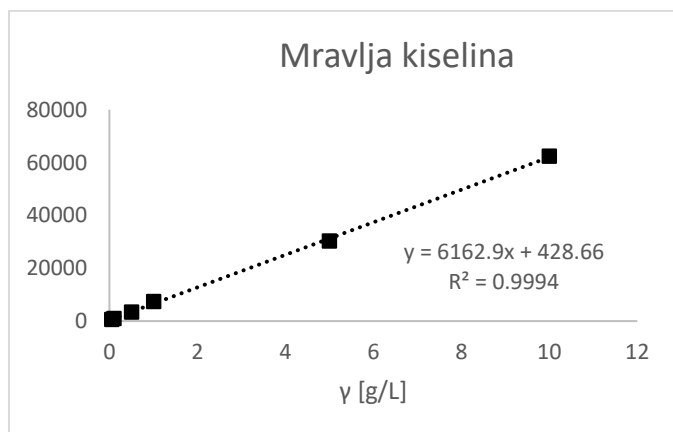
Prilog 7.3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije arabinoze na UPLC-u



Prilog 7.4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije octene kiseline na UPLC-u



Prilog 7.5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mravlje kiseline na UPLC-u



Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lucija Vekić

ime i prezime studenta