

# Morfološka i fenotipska karakterizacija ljubičastih nesumpornih bakterija (*Rhodobacter capsulatus* i *Rhodobacter azotoformans*)

---

Zrile, Antonija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:272532>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Antonija Zrile**  
0058212694

**Morfološka i fenotipska karakterizacija ljubičastih  
nesumpornih bakterija (*Rhodobacter capsulatus* i  
*Rhodobacter azotoformans*)**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija

**Mentor:** dr. sc. Iva Čanak

**Zagreb, 2023.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Morfološka i fenotipska karakterizacija ljubičastih nesumpornih bakterija (*Rhodobacter capsulatus* i *Rhodobacter azotoformans*)**

**Antonija Zrile, 0058212694**

**Sažetak:** Ljubičaste nesumporne bakterije su fotosintetski prokarioti koji svjetlosnu energiju pretvaraju u kemijsku procesom anoksiogene fotosinteze. Najčešće se izoliraju iz otpadnih voda i ekstremnih staništa. Njihova prisutnost dovodi do biorazgradnje organskih i anorganskih spojeva, kao i do biosinteze visokovrijednih nusprodukata. Biomasa ljubičastih nesumpornih bakterija sadrži visoku koncentraciju proteina, esencijalnih aminokiselina, pigmenata i vitamina. Najvažnija primjena ove skupine bakterija je u obradi otpadnih voda prehrambene industrije te u biotehnološkoj proizvodnji biopolimera. U ovom radu su određene morfološke i fenotipske karakteristike dviju vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija-*Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 i *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340. Rezultati istraživanja pokazali su da se radi o gram-negativnim, pokretnim bakterijama, koje prilikom rasta na krutoj hranjivoj podlozi stvaraju glatke okrugle kolonije. Tijekom duljeg uzgoja u tekućoj hranjivoj podlozi došlo je do sinteze pigmenta i obojenja podloge u crvenu boju. Fenotipskom identifikacijom koristeći SDS elektroforezu, dobiven je prikaz ukupnih i površinskih proteina, koji se međusobno razlikuju ovisno o periodu inkubacije bakterija. Dobiveni rezultati daju važan doprinos za buduće karakterizacije i primjenu ljubičastih nesumpornih bakterija.

**Ključne riječi:** ljubičaste nesumporne bakterije, morfologija, fenotipska analiza, fotosintetske bakterije

**Rad sadrži:** 25 stranica, 12 slika, 28 literaturnih navoda

**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:** dr. sc. Iva Čanak

**Datum obrane:** 8. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of biochemical engineering  
Laboratory for microbiology and food microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

Morphological and phenotypic characterization of purple non-sulfur bacteria (*Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter azotoformans*)

Antonija Zrile, 0058212694

**Abstract:** Purple non-sulfur bacteria are photosynthetic prokaryotes that convert light energy into the chemical energy through the process of anoxygenic photosynthesis. They are most often isolated from wastewater and extreme habitats. Their presence leads to the biodegradation of organic and inorganic compounds, as well as to the biosynthesis of high-value byproducts. The biomass of purple non-sulfur bacteria contains a high concentration of proteins, essential amino acids, pigments and vitamins. The most important use of this type of bacteria is in the treatment of wastewater from the food industry and in the biotechnological production of biopolymers. In this research, the morphological and phenotypic characteristics were determined of two strains of purple non-sulfur bacteria-*Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 and *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340. The results of the research showed that they are gram-negative, motile bacteria which create smooth round colonies when growing on a solid nutrient substrate. During the long cultivation in the liquid nutrient medium, pigment synthesis occurred and the medium was colored red. By phenotypic identification using SDS electrophoresis, a display of total and surface proteins was obtained, which differ from each other depending on the period of bacterial incubation. The obtained results provide an important contribution to the future characterization and application of purple non-sulfur bacteria.

**Keywords:** purple non-sulfur bacteria, morphology, phenotypic analysis, photosynthetic bacteria

**Thesis contains:** 25 pages, 12 figures, 28 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Iva Čanak, PhD

**Thesis defended:** 8<sup>th</sup> September 2023.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. FOTOSINTETSKE BAKTERIJE .....	2
2.1.1. PRIMJENA FOTOSINTETSKIH BAKTERIJA.....	4
2.2. LJUBIČASTE BAKTERIJE .....	5
2.2.1. LJUBIČASTE NESUMPORNE BAKTERIJE.....	5
2.2.2. LJUBIČASTE SUMPORNE BAKTERIJE.....	7
2.3. PRIMJENA LJUBIČASTIH BAKTERIJA .....	7
2.3.1. PRIMJENA LJUBIČASTIH NESUMPORNIH BAKTERIJA .....	7
2.4. ZELENE BAKTERIJE.....	9
2.4.1. ZELENE NESUMPORNE BAKTERIJE .....	9
2.4.2. ZELENE SUMPORNE BAKTERIJE.....	10
2.5. PRIMJENA ZELENIH BAKTERIJA.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. SOJEVI BAKTERIJA.....	12
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE .....	12
3.1.3. PRIBOR I OPREMA .....	12
3.1.4. KEMIKALIJE .....	13
3.2. METODE.....	14
3.2.1. ČUVANJE I UZGOJ LJUBIČASTIH NESUMPORNIH BAKTERIJA .....	14
3.2.2. BOJANJE PO GRAMU.....	14
3.2.3. ODREĐIVANJE POKRETLJIVOSTI BAKTERIJA .....	14
3.2.4. IZOLACIJA POVRŠINSKIH PROTEINA S BAKTERIJSKIH STANICA.....	14
3.2.5 IZOLACIJA UKUPNIH STANIČNIH PROTEINA .....	15
3.2.6. ELEKTROFOREZA NA SDS-POLIAKRILAMIDNOM GELU (SDS-PAGE) .....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>16</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>21</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>22</b>

## 1. UVOD

Ljubičaste nesumporne bakterije široko su rasprostranjene u prirodnim staništima, osobito u onima s velikom količinom otopljenih organskih tvari poput otpadnih voda, močvara mangrova, laguna i jezera. S obzirom na način prehrane, klasificirane su kao fotoautotrofi, fotoheterotrofi i kemoheterotrofi, a imaju sposobnost rasta u ekstremnim uvjetima temperature (od 0 °C do 57 °C), pH (od 3 do 11) i saliniteta (do 32 ‰). (Soon i sur., 2014; Madigan i Jung, 2009).

Ljubičaste nesumporne bakterije su jedni od prvih fotosintetskih organizama koji su se pojavili na zemlji. Fotosintetske bakterije se dijele na oksigene i anoksigene te su najčešće crvene ili ljubičaste boje. U oksigene bakterije spadaju cijanobakterije, a u anoksigene bakterije spadaju ljubičaste sumporne i nesumporne bakterije te zelene sumporne i nesumporne bakterije (Lu i sur., 2021). Najpoznatiji rodovi ljubičastih nesumpornih bakterija su *Rhodopseudomonas* i *Rhodobacter* (Sundar i sur., 2022). Pri obradi otpadnih voda u prehrambenoj industriji koriste se i ljubičaste nesumporne bakterije iz roda *Rhodospirillum* (Lu i sur., 2021). Dosadašnja istraživanja o ljubičastim nesumpornim bakterijama su proučavala njihovu primjenu u procesima pročišćavanja tla i obradi otpadnih voda iz raznih prehrambenih industrija (otpadne vode od prerade šećera, limunske kiseline, soje te otpadne vode iz riblje industrije) (Sakarika i sur., 2020). Također, ispitan je i dokazan njihov potencijal u bioremedijaciji, odnosno detoksikaciji kontaminiranog okoliša te u proizvodnji vodika, polihidroksialkanoata (PHA) i izvanstaničnih nukleinskih kiselina (Higuchi-Takeuchi i Numata, 2019; Adessi i sur., 2017; Kis i sur., 2015).

Biomasa ovih bakterija bogata je esencijalnim vitaminima i karotenoidnim pigmentima (Alloul i sur., 2021), a također mogu akumulirati i korisne nusproizvode, kao što su jednostanični proteini, biopolimeri, pantotenska kiselina i antimikrobna sredstva, koja se mogu koristiti u akvakulturi i poljoprivredi (Wen i sur., 2016).

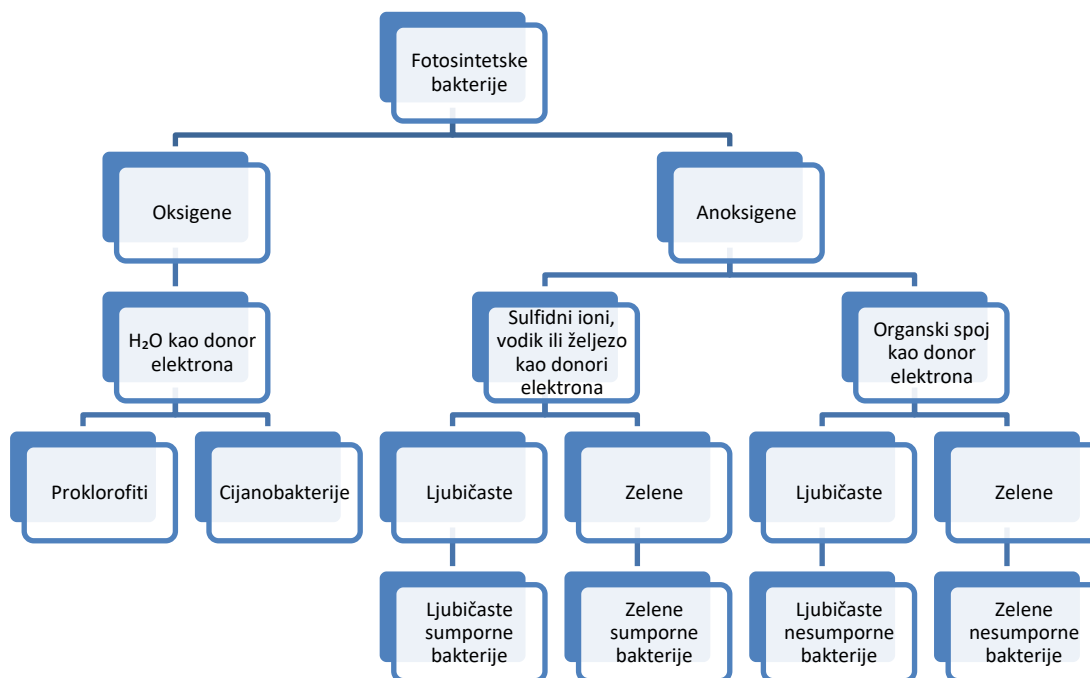
Obzirom na niz korisnih primjena i mogućnost sinteze različitih proizvoda, cilj ovog rada bio je ispitati morfološke i fenotipske karakteristike dviju vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090. Dobiveni rezultati biti će osnova za buduća istraživanja primjene ovih bakterija u biotehnološkim procesima.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FOTOSINTETSKE BAKTERIJE

Fotosintetske bakterije predstavljaju raznoliku skupinu mikroorganizama koji imaju pigmente te mogu apsorbirati svjetlost i pretvarati je u metaboličku energiju. Fotosintetske bakterije imaju bakterioklorofil za proizvodnju energije. Iako su klorofil i bakterioklorofil vrlo slični, bakterioklorofil može apsorbirati svjetlost većih valnih duljina (Talaiekhzani i Rezania, 2017).

Fotosintetske bakterije se mogu se podijeliti u dvije skupine: oksigene i anoksiogene bakterije (slika 1). U oksigene bakterije pripadaju cijanobakterije i proklorofiti, dok anoksiogene bakterije uključuju ljubičaste sumporne bakterije (*Ectothiorhodospiraceae*, *Chromatiaceae*), ljubičaste nesumporne bakterije (*Rhodospirillaceae*), zelene sumporne bakterije (*Chlorobiaceae*) i zelene nesumporne bakterije (*Chloroflexaceae*) (Lu i sur., 2021).



**Slika 1.** Klasifikacija fotosintetskih bakterija (prilagođeno prema Talaiekhzani i Rezania, 2017)

Anoksigene fotosintetske bakterije većinom su zastupljene u vodi i mogu rasti u anoksičnim uvjetima. Kod ovih bakterija fotosinteza se odvija pri nedostatku kisika budući da prisutnost kisika suzbija sintezu fotosintetskih pigmenata i nastanak fotosintetskog aparata. Razni fotosintetski pigmenti koji sudjeluju u transformaciji svjetlosne u kemijsku energiju daju stanicama drugačiju obojenost (Hell i sur., 2008). Bakterije porodice *Ectothiorhodospiraceae* predstavljaju skupinu halofilnih ljubičastih sumpornih bakterija koje tijekom oksidacije sulfida skladište elementarni sumpor izvan svojih stanica. Za razliku od njih, bakterije porodice *Chromatiaceae* obuhvaćaju one fototrofne ljubičaste sumporne bakterije koje skladište elementarni sumpor unutar stanica. Ljubičaste nesumporne bakterije mogu provoditi anoksigenu fotosintezu s bakterioklorofilima i karotenoidima kao fotosintetskim pigmentima. Članovi ove skupine bakterija široko su rasprostranjeni u prirodi i pronađeni su u slatkovodnim, morskim i hiperslanim područjima koja su izložena svjetlosti. Prisutni su u vodenim staništima sa značajnim količinama topljive organske tvari, niskom koncentracijom kisika i umjerenom temperaturom, ali i u termalnim izvorima i alkalnim područjima (Hell i sur., 2008).

Zelene sumporne bakterije sadrže bakterioklorofil c, d ili e u klorosomima. Fototrofne su, zahtijevaju striktno anoksične uvjete za rast, imaju nisku sposobnost asimilacije organskih spojeva te se mogu pronaći u morskim i hiperslanim sredinama. Zelene sumporne bakterije i ljubičaste sumporne bakterije ključne su u biološkom ciklusu sumpora i formiraju masivna cvjetanja pod uvjetima da obje reduciraju spojeve sumpora uz prisustvo svjetlosti i manjak kisika (Hell i sur., 2008). Bakterije porodice *Chloroflexaceae* su anoksigeni fototrofi, sadrže bakterioklorofil c ili d u klorosomima, kreću se klizanjem, tolerantne su na kisik i rastu kao fotoheterotrofi. Neki predstavnici ovih bakterija su prilagođeni vrućim slatkovodnim okruženjima, a neki imaju sposobnost oksidacije reduciranih spojeva sumpora (Hell i sur., 2008).

Među svim fotosintetskim prokariotima, ljubičaste bakterije su metabolički najraznolikije. Za razliku od nekih drugih fototrofa, kao što su cijanobakterije ili zelene sumporne bakterije gdje su sve vrste sposobne provoditi fotosintezu, ljubičaste bakterije su fotoautotrofi i fotoheterotrofi koje imaju mogućnost rasti u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U gotovo svim slatkovodnim i morskim anoksičnim okruženjima, zelene i ljubičaste sumporne bakterije (*Chlorobiaceae* i *Chromatiaceae*) predstavljaju dominantne anoksigene fototrofe, dok *Ectothiorhodospiraceae* dominiraju u slanim staništima (Hunter i sur., 2009).



### **2.1.1. Primjena fotosintetskih bakterija**

Fotosintetske bakterije imaju veliku ulogu u zaštiti okoliša, bitne su za tretiranje otpadnih voda te bioremedijaciju sedimentnog mulja onečišćenog organskim tvarima. Također, imaju ulogu u proizvodnji velikih količina fiziološki aktivnih tvari, kao što su vitamin B12, ubikinon (koenzim Q10), 5-aminolevulinska kiselina, porfirini i RNK (Sasaki i sur., 2005).

Fotosintetske bakterije mogu poslužiti kao „alat“ za proizvodnju visokovrijednih spojeva. Mogu se primijeniti za pročišćavanje otpadnih voda te za proizvodnju kvalitetnih proizvoda, kao što su biodizel i vodik. Imaju visoku sposobnost uklanjanja teških metala, boja i makrozagađivača iz otpadnih voda. Neke od prednosti korištenja fotosintetskih bakterija u pročišćavanju otpadnih voda su: korištenje ugljikovog dioksida s ciljem smanjenja efekta staklenika i stvaranje proizvoda s dodanom vrijednošću tijekom obrade otpadnih voda. Također, potrebe za hranjivim tvarima su minimalne jer ove bakterije mogu iskoristiti sunčevu energiju te nema potrebe za dodavanjem izvora ugljika tijekom obrade otpadnih voda pa su i troškovi rada smanjeni (Talaiekhosani i Rezania, 2017).

Fotosintetske bakterije mogu koristiti dva metabolička puta, ovisno o izvoru energije, a uključuju aerobne uvjete u tami i anaerobne uvjete uz prisutnost svjetlosti. Neke od njih mogu iskoristiti sulfid kao svoj jedini elektron donor što dovodi do smanjenja neugodnih mirisa pri obradi otpadnih voda. Koriste se za pročišćavanje otpadnih voda iz industrije šećera, prerade hrane, klaonica pilića, industrije mliječnih i fermentiranih proizvoda. Fotosintetske bakterije su otporne na sol te se njima mogu tretirati otpadne vode sa visokom koncentracijom organskih tvari. Neke skupine fotosintetskih bakterije mogu lučiti enzim hidrogenazu zbog čega imaju dobar potencijal za proizvodnju biovodika (Talaiekhosani i Rezania, 2017).

Proizvode biomasu bogatu karotenoidima, vitaminima i proteinima koja se može koristiti kao hrana za životinje. Proizvodnja biomase fotosintetskih bakterija ovisi o temperaturi, intenzitetu svjetlosti i količini hranjivih tvari u okolišu. Osim navedenih prednosti korištenja, postoje i neki nedostaci, kao što su spora stopa rasta nekih vrsta, a mnoge ljubičaste sumporne i nesumporne bakterije su osjetljive na kisik koji može inhibirati sintezu fotosintetskog pigmenta. Iako je objavljeno mnogo članaka o iskorištavanju fotosintetskih bakterija pri obradi otpadnih voda, nema literature u kojoj je dokazano uklanjanje boje, teških metala te mikrozagađivača, kao što su fosfor i dušik, iz otpadnih voda. Unatoč tome, korištenje fotosintetskih bakterija je obećavajuća tehnologija za učinkovitu i ekonomičnu obradu različitih vrsta otpadnih voda (Talaiekhosani i Rezania, 2017).

## **2.2. LJUBIČASTE BAKTERIJE**

Anoksigene ljubičaste bakterije su glavna skupina široko rasprostranjenih fotosintetskih mikroorganizama u prirodi, prvenstveno u vodenim staništima, a poznato je oko 50 rodova (Madigan i Jung, 2009). Relativno ih je lako uzgojiti u laboratoriju, najčešće je potreban anoksični mineralni medij u koji su dodani sulfid i bikarbonat za fotoautotrofni rast ili organski spoj za fotoheterotrofni rast. Zbog navedene činjenice i zbog činjenice da je anoksigena fotosinteza jednostavniji proces nego fotosinteza uz prisustvo kisika, ljubičaste bakterije su se pokazale kao idealni modeli za proučavanje fiziologije, biokemije i molekularne biologije procesa fotosinteze (Hunter i sur., 2009). Ljubičaste bakterije su se izvorno razlikovale na temelju fizioloških svojstava, odnosno na temelju njihove tolerancije na sulfid. Navedeno je da su ljubičaste sumporne bakterije tolerirale milimolarne razine oksidiranog sulfida i sulfida pohranjenog unutar stanica, a ljubičaste nesumporne bakterije to nisu bile u mogućnosti. Daljnja istraživanja dokazala su da ovi kriteriji nisu dovoljni. Pri niskim razinama sulfida, većina ljubičastih nesumpornih bakterija će rasti i oksidirati sulfid te će se on taložiti izvan stanica. Naknadno provedena istraživanja u kojima su se izolirale ljubičaste nesumporne bakterije iz staništa bogatih sulfidima su pokazala da su mnoge vrste ove skupine prilično tolerantne na ovu vrstu soli (Hunter i sur., 2009). Ljubičaste sumporne bakterije razlikuju se od ljubičastih nesumpornih bakterija na metaboličkoj i filogenetskoj osnovi, no obje skupine često koegzistiraju u osvjetljenim anoksičnim staništima u prirodi. Ljubičaste sumporne bakterije su fotoautotrofi, ali imaju i slabiju mogućnost fotoheterotrofije te slabo rastu u mraku. S druge strane, ljubičaste nesumporne bakterije su istaknuti fotoheterotrofi u prirodi, sposobne su i za fotoautotrofiju te posjeduju različite sposobnosti za metabolizam i rast bez prisutnosti svjetla. Neke od ljubičastih bakterija nastanjuju ekstremna okruženja, uključujući široki raspon temperature (od 0 °C do 57 °C), pH (od 3 do 11) i saliniteta (do 32 ‰). Bitni su fototrofi u prirodi jer troše otrovni sumporovodik, a kao fotoheterotrofi troše organske spojeve, prvenstveno nefermentirajuće organske spojeve (Madigan i Jung, 2009).

### **2.2.1. Ljubičaste nesumporne bakterije**

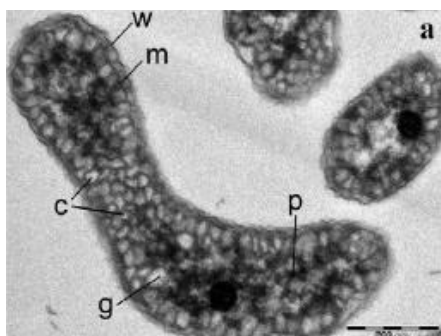
Ljubičaste nesumporne bakterije (slika 2) pripadaju anoksigenoj skupini fotosintetskih bakterija, a glavne vrste predstavljaju *Rhodospseudomonas palustris* i *Rhodobacter sphaeroides*. Prirodno su prisutne u otpadnim vodama, lagunama, jezerima, močvarama, vlažnom tlu, hiperslanim i morskim ekosustavima (Madigan i Jung, 2009).

Mogu rasti kao fotoheterotrofi, fotoautotrofi ili kemoheterotrofi te mogu prelaziti s jednog načina rasta na drugi ovisno o uvjetima u kojima se nalaze. Neki od tih uvjeta su: stupanj anaerobioze (nedostupnost molekularnog kisika), prisutnost izvora ugljika (ugljikov dioksid za autotrofni rast ili organski spojevi za heterotrofni rast) i prisutnost izvora svjetlosti koji je potreban za fototrofni rast (Basak i Das, 2007).

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju mogućnost fototrofnog rasta i rasta u tami. Rast nekih bakterija, poput *Rhodobacter capsulatus*, moguć je pri fototrofnim uvjetima uz prisustvo ugljikovog dioksida ili organskog ugljika. Nasuprot tome, rast u mraku potaknut je respiracijom, fermentacijom ili kemolitotrofijom. Upravo to čini *R. capsulatus* metabolički najzanimljivijom od svih poznatih bakterija (Hunter i sur., 2009).

Zbog jedinstvenog metabolizma ljubičastih nesumpornih bakterija, svjetlost i kisik su glavni čimbenici koji utječu na njihov rast. Prisutnost svjetlosti inducira fotosintezu, koja daje energiju potrebnu za rast i metabolizam ovih bakterija. Glavni metabolički putevi ovih bakterija uključuju Calvin–Bensonov ciklus, ciklus glioksilne kiseline, Embden - Meyerhof - Parnasov ciklus i ciklus trikarboksilne kiseline (Lu i sur., 2021). Ciklus glioksilatne kiseline je metabolički put jedinstven za ljubičaste nesumporne bakterije i značajno utječe na razgradnju hlapljivih masnih kiselina i sintezu biomase. Također se smatra jednim od najvažnijih puteva koji ovoj skupini bakterija daje sposobnost tolerancije visokih organskih opterećenja i razgradnje zagađivača. Glavni metabolički putevi uključuju fotofosforilaciju i oksidativnu fosforilaciju (Lu i sur., 2021).

Uz tiamin, nikotinsku kiselinu i biotin, ekstrakt kvasca čest je dodatak medijima koji se koriste za uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija. Bogat je izvor vitamina B, koji je poželjan za rast ljubičastih nesumpornih bakterija i može potaknuti fotoheterotrofni rast (Hunter i sur., 2009).



**Slika 2.** Prikaz ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodospirillum rubrum* dobiven elektronskom mikrofotografijom (w-stanična stijenka, m-stanična membrana, c-kromatofori, g-granule glikogena, p-polifosfat) (povećanje 34000×) (Kis i sur., 2015)

### **2.2.2. Ljubičaste sumporne bakterije**

Ljubičaste sumporne bakterije su najčešće anaerobi ili mikroaerofili. Najčešće koriste sumporovodik kao donor elektrona dok metaboliziranje sulfida rezultira nakupljanjem elementarnog sumpora unutar stanica (Talaiekhosani i Rezaia, 2017). Fiziologija ljubičastih sumpornih bakterija je povezana sa sulfidom i većinom su u prirodi uočene samo u osvjetljenim okruženjima u kojima je prisutan sulfid. To implicira da je rast ljubičastih sumpornih bakterija u prirodi prvenstveno fototrofan. Neke ljubičaste sumporne bakterije mogu rasti u tami kao kemoorganotrofi ili kemolitotrofi kada je koncentracija kisika značajno smanjena (Hunter i sur., 2009). Istraženo je oko 25 rodova ljubičastih sumpornih bakterija koji se morfološki razlikuju. Većina tih bakterija skladišti sumpor unutar stanica, npr. porodica *Chromatiaceae*, no postoje i porodice koje skladište sumpor izvan stanica, npr. *Ectothiorhodospiraceae* (Hunter i sur., 2009).

Anoksigene fototrofne sumporne bakterije predstavljaju skup pretežito vodenih bakterija koje mogu rasti u anoksičnim uvjetima fotosintezom, bez proizvodnje kisika. Fotosinteza kod anoksigenih fototrofnih bakterija ovisi o uvjetima sa smanjenom koncentracijom kisika jer je sinteza fotosintetskih pigmenata potisnuta kisikom. Anoksigene fototrofne sumporne bakterije rastu tamo gdje svjetlost dopire do sulfidnih vodenih slojeva ili sedimenata (Hell i sur., 2008).

## **2.3. PRIMJENA LJUBIČASTIH BAKTERIJA**

Ljubičaste bakterije su jedni od najprikladnijih mikroorganizama za industrijsku proizvodnju. Zabilježeno je da postoje ljubičaste fotosintetske bakterije koje proizvode polihidroksialkanoate (PHA), izvanstanične nukleinske kiseline i vodik. PHA je biopolijester kojeg sintetiziraju različiti mikroorganizmi kao materijali za pohranu ugljika i energije, a nedavno je privukao pozornost kao alternativa konvencionalnoj plastici na bazi nafte (Higuchi-Takeuchi i Numata, 2019).

### **2.3.1. Primjena ljubičastih nesumpornih bakterija**

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju iznimno bitnu ulogu u obradi otpadnih voda pri čemu nastaje biomasa koja sadrži bioresurse sa dodanom vrijednošću (pigmente, jednostanične proteine, koenzim Q10 i 5-aminolevulinu kiselinu). Ti se bioresursi mogu koristiti kao sirovine u poljoprivredi, prehrambenoj i medicinskoj industriji. Budući da ljubičaste

nesumporne bakterije pokazuju toleranciju na visoko organsko opterećenje, prethodna obrada nije potrebna. U usporedbi s tradicionalnom obradom otpadnih voda, ova tehnologija može smanjiti emisiju ugljikovog dioksida, povećati iskorištenje dušika i spriječiti stvaranje zaostalog mulja (Lu i sur., 2021). Ljubičaste nesumporne bakterije se koriste pri obradi otpadnih voda koje su bogate hranjivim tvarima, kao npr. otpadne vode nastale u industriji prerade soje, graha, šećera, mliječnih proizvoda, u poljoprivrednoj industriji, svinjogojstvu, preradi ribe te pivovarama. Također se koriste pri obradi otpadnih voda visokog saliniteta, visokog sadržaja sulfata i teških metala (Lu i sur., 2021).

Budući da se u industriji za preradu peradi troši puno vode, veća prerada pilećeg mesa dovodi do problema povezanih s klaoničkim otpadnim vodama. Ova vrsta otpadnih voda onečišćena je značajnim sadržajem organskih tvari, kao što su suspendirane krute tvari i biljna hranjiva. Pročišćena otpadna voda mora zadovoljavati standardnu granicu ispuštanja kako bi se spriječili štetni učinci na okoliš (Bunraksa i sur., 2020). U provedenom istraživanju, između 46 sojeva ljubičastih nesumpornih bakterija izoliranih iz jedinice za obradu otpadnih voda klaonice pilića, samo su četiri soja dobro narasla u nesterilnom efluentu (tekućina koja istječe iz postrojenja) u mikroaerobnim uvjetima uz svjetlost i aerobnim tamnim uvjetima. Dva soja su odabrana kao inokulanti za sljedeće pokuse budući da su otpustili visoke razine 5-aminolevulinske kiseline, *Rhodopseudomonas faecalis* i *Rhodopseudomonas palustris* (Bunraksa i sur., 2020). Pročišćavanjem otpadnih voda ljubičastim nesumpornim bakterijama dolazi do nastanka tehnoloških otpadnih voda bogatih tvarima koje potiču rast biljaka poput 5-aminolevulinske kiseline. Svi elementi u tragovima otkriveni u efluentu bili su puno niži od preporučenih maksimalnih koncentracija za vodu za navodnjavanje (Bunraksa i sur., 2020).

Ljubičaste nesumporne bakterije mogu tretirati i izvlačiti resurse iz prehrambenog otpada za proizvodnju proteinskih dodataka stočnoj hrani te većinu nutrijenata kojima se hrane mogu inkorporirati u proizvedenu biomasu. One mogu ujediniti procese gospodarenja otpadom hrane i proizvodnje proteinskih suplemenata u ekonomične i ekološki prihvatljive procese. Ljubičaste nesumporne bakterije asimiliraju ugljik i hranjive tvari pod različitim uvjetima svjetla ili tame i anaerobnim uvjetima, uklanjaju zagađivače i razvijaju svoju biomasu, a nakon uzgoja, biomasa se odvaja od vodenog medija (LaTurner i sur., 2020).

Uzgoj biomase ljubičastih nesumpornih bakterija može zamijeniti proizvodnju sojine sačme ili proizvodnju ribljeg brašna i karotenoida te anaerobnu digestiju. Sojina sačma je jedan od glavnih sastojaka stočne hrane, a njena proizvodnja zahtjeva velike resurse te uzrokuje značajne gubitke dušika. Budući da su nesumporne ljubičaste bakterije okarakterizirane kao

SCP (eng. *single cell protein*) mikroorganizmi, koji veliki dio hranjivih tvari ugrađuju upravo u svoju biomasu, nametnula se ideja zamjene sojine sačme biomasom ove vrste bakterija, čime bi se dobio jednako hranjiv proizvod, ali s manjim utjecajem na okoliš. Tome u prilog idu rezultati istraživanja koji pokazuju kako navedena zamjena ima bolji utjecaj na okoliš, tj. primjenom bakterijske biomase dolazi do manjeg utjecaja na eutrofikaciju, odnosno starenje vodenih ekosustava (LaTurner i sur., 2020).

## **2.4. ZELENE BAKTERIJE**

Glavna podjela zelenih bakterija je na zelene sumporne i zelene nesumporne bakterije. Za razliku od fototrofnih ljubičastih bakterija, zelene bakterije nemaju sustav intracitoplazmatske membrane. One sadrže klorosome koji su vezani za unutarnju stranu citoplazmatske membrane i nosači su pigmenata koji služe za prikupljanje svjetlosti. Sve zelene sumporne bakterije imaju vrlo slične fiziološke sposobnosti, striktni su anaerobi i obligatorni fototrofi. Fotoautotrofi su te im je ugljikov dioksid jedini izvor ugljika (Blankenship i sur., 1995). Važna karakteristika zelenih sumpornih bakterija je njihova sposobnost oksidacije anorganskih spojeva sumpora za fotoautotrofni rast (Gregersen i sur., 2011). Zelene nesumporne bakterije roda *Chloroflexi* imaju sposobnost obavljanja anoksigene fotosinteze te obuhvaćaju brojne kemotrofne bakterije različite ekofiziologije i filogenije. Najpoznatiji predstavnici su termofilne bakterije zelene ili narančaste boje koje u toplim izvorima stvaraju guste mikrobne podloge (Overmann, 2008).

### **2.4.1. Zelene nesumporne bakterije**

Zelene nesumporne bakterije (slika 3) su tipični fotoheterotrofi i dobro prilagođeni promjenjivoj okolini (Overmann, 2008). Stabilan izotopski sastav ugljika u lipidima zelenih nesumpornih bakterija sugerira njihov fotoautotrofni rast. *Chloroflexus aurantiacus* je najbolje proučeni predstavnik zelenih nesumpornih bakterija dostupnih u čistim kulturama. Može rasti heterotrofno - aerobnim disanjem, fotoheterotrofno - koristeći svjetlost za ugradnju prethodno reduciranih organskih spojeva i fotoautotrofno - koristeći svjetlost za fiksiranje anorganskog ugljika (Van Der Meer i sur., 2005).

*C. aurantiacus* je jedini anoksigeni fototrof koji je sposoban rasti na temperaturama do 74° C te nastanjuje vruće izvore vode. Skoro sve zelene nesumporne bakterije (razred *Chloroflexi*) pripadaju gram-negativnim, filamentoznim bakterijama. Unutar razreda *Chloroflexi*, red *Chloroflexales* obuhvaća sve poznate anoksigene fototrofne predstavnike. Pripadnici ovog reda

su obligatni ili fakultativni fototrofi ili filamentozne bakterije koje sadrže bakterioklorofil a (Overmann, 2008).



**Slika 3.** Prikaz anaerobne fotosintetske zelene nesumporne bakterije na svjetlosnom mikroskopu (vrijednost skale: 0,5  $\mu\text{m}$ ) (Mezzari i Da Silva, 2013)

#### **2.4.2. Zelene sumporne bakterije**

Zelene sumporne bakterije filogenetski su izolirana skupina striktno anaerobnih i pretežno vodenih bakterija koje se pojavljuju tamo gdje svjetlost dopire do anoksičnih slojeva vode. Obuhvaćaju četiri roda: *Chlorobium*, *Chlorobaculum*, *Prosthecochloris* i *Chloroherpeton* (Imhoff, 2003). Obično se nalaze u anoksičnim i slatkovodnim okruženjima koja su bogata sulfidima. Sve zelene sumporne bakterije imaju jedinstvene organele za prikupljanje svjetla - klorosome (Hell i sur., 2008). Stanice rastu anoksigenom fotosintezom, koristeći reducirane sumporne spojeve kao donore elektrona za asimilaciju ugljikovog dioksida (Overmann, 2001). Gotovo sve zelene sumporne bakterije su sposobne oksidirati sulfide i elementarni sumpor u sulfat. Imaju visoki afinitet prema sulfidu, koji je obično preferirani supstrat čak i ako su drugi sumporni supstrati dostupni (Hell i sur., 2008).

#### **2.5. PRIMJENA ZELENIH BAKTERIJA**

Uklanjanje neugodnih, korozivnih i toksičnih spojeva te sulfida iz tekućeg otpada je problem s kojim se suočavaju mnoga industrijska postrojenja. Zato se takav otpad tretira fotosintetskim bakterijama, a većinom se koriste zelene sumporne bakterije kao biološki agensi. Zelene sumporne bakterije oksidiraju sulfid u izvanstanični intermedijer koji se može obnoviti kao

elementarni sumpor. Njihova sposobnost asimilacije organskih spojeva je ograničena na nekoliko jednostavnih hlapljivih masnih kiselina i ovisi o asimilaciji ugljikovog dioksida i oksidaciji reduciranog anorganskog spoja, kao što je sulfid. Također, zelene sumporne bakterije se mogu koristiti za tretiranje vrućih sulfidnih otpadnih voda (Hell i sur., 2008).

Jedna od prednosti upotrebe zelenih sumpornih bakterija je stvaranje proizvoda s dodanom vrijednošću, poput vodika, vitamina, karotenoida i biopolimera tijekom obrade otpadnih voda. U mogućnosti su iskoristiti anorganski elektron donor te su zato troškovi rada smanjeni jer nema potrebe za dodavanjem izvora ugljika (Talaiekhosani i Rezaia, 2017).



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Sojevi bakterija

U ovom radu korištene su dvije vrste ljubičastih nesumpornih bakterija: *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090. Obje bakterije pripadaju zbirci mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1.2. Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija:

- GM (glutamat-malat) bujon: ekstrakt kvasca 1,5 g/l; malat 2,7 g/l; glutamat 2,0 g/l; amonijev sulfat heptahidrat 0,8 g/l; kalijev dihidrogen fosfat 0,5 g/l; dikalijev fosfat 0,5 g/l; manganov sulfat heptahidrat 0,2 g/l; kalcijev klorid dihidrat 0,053 g/l; manganov sulfat heptahidrat  $1,2 \times 10^{-3}$  g/l. pH vrijednost podloge podesiti između 6.8-7 pomoću natrijeve lužine; sterilizacija pri 121 °C/15min.

Nakon što se podloga ohladi sterilno se dodaje otopina vitamina (1 kap) sljedećeg sastava: biotin 10,0 mg/100ml; niacin 35,0 mg/100ml; tiamin-hidroklorid 30,0 mg/100ml; para-aminobenzojeva kiselina 20,0 mg/100ml; piridoksin hidroklorid 10 mg/100ml; kalcijev pantotenat 10,0 10 mg/100ml; vitamin B<sub>12</sub> 5,0 10 mg/100ml.

GM agar - istog sastava kao GM bujon, samo uz dodatak agara (20 g/l). Sterilizacija pri 121 °C/15 min. Sadržaj je dobro promiješan, ohlađen, te nakon dodataka vitaminske otopine razliven u Petrijeve zdjelice.

#### 3.1.3. Pribor i oprema

- automatske pipete Research Plus (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Latvija)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Njemačka)

- analitička vaga, Entris (Sartorius, Njemačka)
- mikroskop (Olympus, Japan)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Švicarska)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Njemačka)
- magnetska miješalica, Lab Stir (Gilson, SAD)
- vertikalna elektroforeza (Cleaver Scientific Ltd, UK)
- centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga, Centric 150 (Tehtnica, Slovenija)

### 3.1.4. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

- standardna puferka otopina pH 4 (Mettler-toledo, Švicarska)
- standardna puferka otopina pH 7 (Mettler-toledo, Švicarska)
- octena kiselina (J.T. Baker, SAD)
- natrijev hidroksid (Gram-mol, Hrvatska)
- etanol, 96 % (Gram-mol, Hrvatska)
- standardi za proteinsku elektroforezu, 2-212 kDa (BioLabs, Engleska)
- amonijev persulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Njemačka)
- N,N'- metilenbisakrilamid (Fluka, Švicarska)
- akrilamid (Fluka, Švicarska)
- $\beta$ -merkaptotanol (Merck, Njemačka)
- natrijev dodecilsulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Njemačka)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (Serva, Njemačka)
- glicin (Kemika, Hrvatska)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Njemačka)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Čuvanje i uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija**

Ljubičaste nesumporne bakterije čuvaju se na 4 °C u GM bujonu. *R. capsulatus* i *R. azotoformans* uzgajane su tijekom dva tjedna u GM bujonu pri 30 °C prije početka pokusa. Inicijalni inokulum iznosio je 10 % ukupnog volumena hranjive podloge u koju se naciepljivao.

### **3.2.2. Bojanje po Gramu**

Prvi korak bojanja po Gramu uključio je fiksiranje predmetnice s ciljem odmašćivanja provlačenjem tri puta kroz plamen. Na ohlađenu predmetnicu nanescena je bakterijska kulutra u tankom sloju. Osušeni preparat je fiksiran provlačenjem kroz plamen s donje strane predmetnice te je na ohlađenu predmetnicu nanesceno prvo bojilo - kristal violet. Nakon 1 minute na postojeću boju je dodana lugolova otopina te je nakon jedne minute sva boja isprana s preparata. Idući korak je uključivao lagano ispiranje s 96 %-tnim etanolom kako bi se uklonio višak nevezane boje, nakon čega je uslijedilo ispiranje pod laganim mlazom vodovodne vode. Na vlažni preparat je nanesceno kontrastno bojilo - safranin koje je stajalo na preparatu 3-5 min. Nakon proteklog vremena safranin je ispran s preparata pod mlazom vodovodne vode, a višak tekućine pokupljen je staničevinom. Na tako pripremljeni preparat je stavljena kap imerzijskog ulja te je provedeno mikroskopiranje pomoću imerzijskog objektiva pri povećanju 1000×.

### **3.2.3. Određivanje pokretljivosti bakterija**

Pokretljivost bakterijskih vrsta određena je ubodom u epruvetu s dubokim agarom. Sterilnom i ohlađenom mikrobiološkom iglom bakterijska kultura nanescena je okomitim ubodom u agar do dna podloge, a potom je igla istim putem izvučena iz podloge. Naciepljena podloga inkubirana je tijekom 24-48 h pri sobnoj temperaturi (25 °C). Pozitivan rezultat je bakterijski rast koji se širi od mjesta uboda prema stijenkama epruvete.

### **3.2.4. Izolacija površinskih proteina s bakterijskih stanica**

Bakterijske kulture koncentrirane su centrifugiranjem pri 10 000 rpm tijekom 5 min i dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom. Resuspendirane su u 50 µl 1 %-tne otopine SDS-a. Tako resuspendirane stanice prokuhane su 10 min te ponovno centrifugirane pri 9 000 rpm tijekom

5 min, a supernatant je podvrgnut SDS-poliakrilamidnoj gel-elektroforezi (SDS-PAGE).

### **3.2.5 Izolacija ukupnih staničnih proteina**

Bakterijske kulture centrifugirane su pri 9 000 rpm tijekom 15 min. Stanice su isprane sterilnom otopinom natrijeva klorida (0,9 %), ponovno centrifugirane i resuspendirane u 100 µl sterilne otopine natrijeva klorida kojoj je dodan 1 g staklenih kuglica (r=2 mm). Suspenzija je izmiješana na vibromješaču tijekom 4 min (30 s miješanja – 30 s hlađenja u ledu), a zatim tretirana s 1 ml 10 % otopine SDS-a. Uzorci su prokuhani 10 min, ohlađeni u ledu (3-4 min) i centrifugirani pri 9 000 rpm tijekom 15 min. Nakon što je određena koncentracija proteina u supernatantu, provedena je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).

### **3.2.6. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)**

Uzorci ukupnih i površinskih proteina ljubičastih nesumpornih bakterija pripremljeni su tako da je volumenima od 15 µl SDS ekstrakata proteina dodano 5 µl pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-u (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM EDTA III; 2 % SDS; 10 % glicerol; 0,001 % bromfenol plavo i 5 % -merkaptotanol). Uzorci su prokuhani 2-3 min te nanieseni na 10 %-tne poliakrilamidne ploče za elektroforezu. Poliakrilamidne ploče za elektroforezu sastoje se od gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje. Sastav gela za sabijanje je: 4,5 % akrilamida, 0,12 % N, N' - metilenbisakrilamida, 0,1 % SDS-a, 0,075 % N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) i 7.5 % amonijevog persulfata (APS) u 0,5 M Tris-HCl puferu pH 6,8. Sastav 10 %-tnog gela za razdvajanje je: 10 % akrilamida, 0,3 % N, N' - metilenbisakrilamida, 0,1 % SDS-a, 0,05 % TEMED i 5 % APS u 1,5 M Tris-HCl puferu pH 8,8. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25 mM TRIS-glicin) a zaustavljena je kada je boja dosegla rub ploče. Bojanje gela na proteine provedeno je u 0,1 %-tnoj Coomassie Brilliant Blue G-250 s 50 % etanola i 7 % octene kiseline kroz 20 minuta. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 7 %-tnoj octenoj kiselini do obezbojenja pozadine.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti morfološka i fenotipska svojstva dvije vrste ljubičastih nesumpornih bakterija - *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090. Nakon uzgoja u semi-anaerobnim uvjetima na sobnoj temperaturi zabilježena je promjene boje hranjive podloge kao posljedica sinteze pigmenta (slika 4).



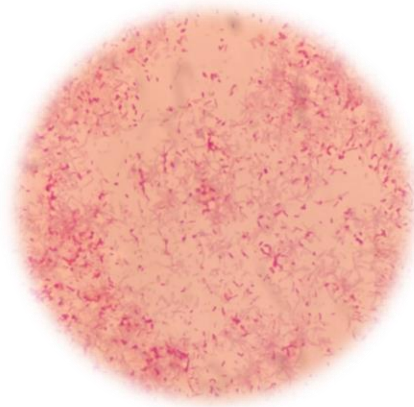
**Slika 4.** *Rhodobacter capsulatus* (lijevo) i *Rhodobacter azotoformans* (desno) (vlastita fotografija)

Uzgojem na krutoj hranjivoj podlozi, makroskopski je zabilježen porast jednolikih glatkih kolonija, kremaste boje i okruglog oblika (slika 5.)

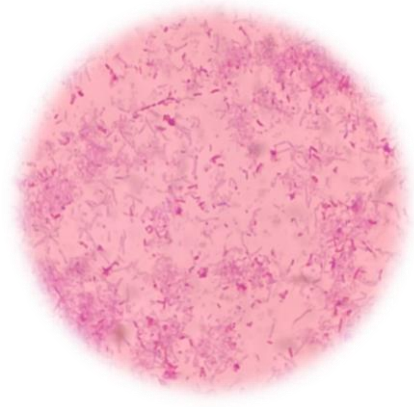


**Slika 5.** *Rhodobacter capsulatus* (lijevo) i *Rhodobacter azotoformans* (desno) (vlastita fotografija)

Kao sljedeći korak identifikacije napravljeno je bojanje po Gramu kako bi se dobio uvid u oblik stanica i sastav stanične stijenke. Bojanje je pokazalo da se radi o gram-negativnim bakterijama štapićastog oblika što je u skladu s dosadašnjim istraživanja ove skupine bakterija (Soon i sur., 2014). Usljed tanjeg sloja peptidoglikana, stanice nisu zadržale prvu korištenu boju kristal violet koja je isprana etanolom i vodom, već su obojane sekundarnom bojom - crvenim safraninom (slika 6 i slika 7). Bojanje po Gramu predstavlja metodu kojom se brzo može dobiti uvid u oblik i grupiranost stanica.



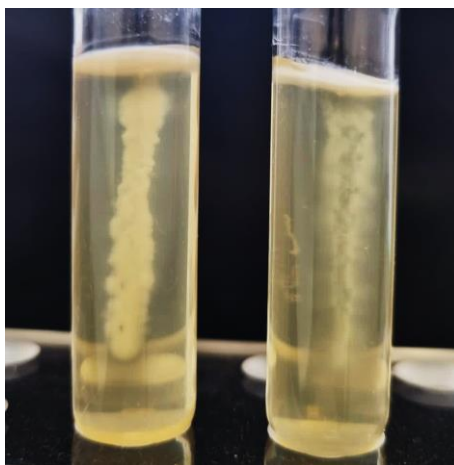
**Slika 6.** Prikaz bakterije *Rhodobacter capsulatus* (povećanje 1000×) (vlastita fotografija)



**Slika 7.** Prikaz bakterije *Rhodobacter azotoformans* (povećanje 1000×) (vlastita fotografija)

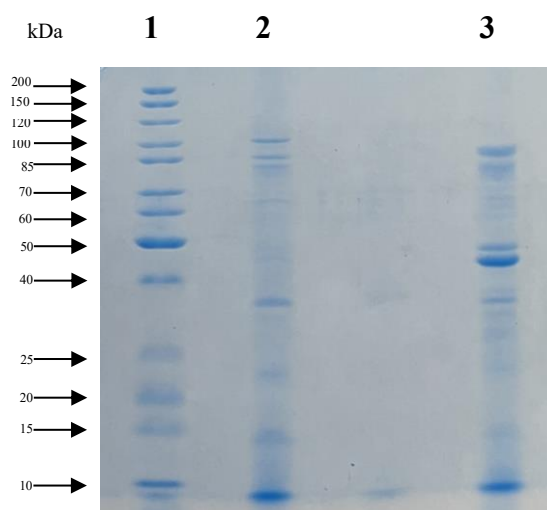
Sljedeći korak karakterizacije uključivao je određivanje pokretljivosti bakterija ubodom u duboki agar. Prema rezultatima vidljivima na slici 8 može se uočiti rast u širinu, tj. od mjesta uboda u agar prema stijenkama epruvete što implicira pokretljivost stanica djelovanjem flagela. Dosadašnja istraživanja navode iste rezultate za ljubičaste bakterije izolirane iz šuma

mangrova, vrućih izvora, vodenog sedimenta i rižinog polja (Novak i sur., 2017; Soon i sur., 2014; Mae i sur., 2013; Aion, i sur., 2006).

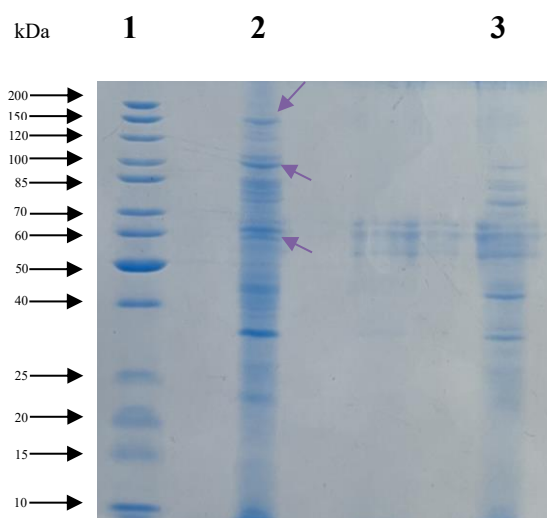


**Slika 8.** Pokretljivost bakterijskih vrsta *Rhodobacter capsulatus* (lijevo) i *Rhodobacter azotoformans* (desno) (vlastita fotografija)

Kako bi se vizualno dobio uvid u raznolikost i veličinu proteina napravljena je SDS-PAGE elektroforeza ukupnih i površinskih proteina. Bojanjem Coomassie Blue bojom proteinski bendovi se lako vizualiziraju, a usporedbom s proteinskim standardom se može odrediti približna molekulska masa proteina u kilodaltonima (kDa). Debljina benda tj. vrpce je proporcionalna količini proteina. Proteinski profil je određen nakon 7 i 14 dana uzgoja jer je prema literaturnim navodima ljubičastim nesumpornim bakterijama potrebno dulje vremena kako bi ušle u logaritamsku fazu rasta tj. kako bi krenula sinteza bitnih enzima, proteina i ostalih metaboličkih tvari (Novak i sur., 2020). Rezultati analize proteinskog profila ukupnih i površinskih proteina *R. azotoformans* prikazani su na slikama 9 i 10. Usporedbom površinskih proteina može se uočiti veći broj bendova i njihov jači intenzitet nakon 14 dana uzgoja u odnosu na uzorak uzgajan 7 dana, čime je potvrđena gore navedena tvrdnja o dužoj lag fazi rasta. Kod analize ukupnih proteina situacija je slična, iako postoje neki proteini čiji bendovi su prisutni nakon 7 dana uzgoja međutim nakon 14 dana uzgoja nisu vidljivi na gelu (označeno strelicom). Ti proteini mogu biti važni za prvu, tj. lag fazu rasta te se kasnije tokom rasta više ne eksprimiraju.



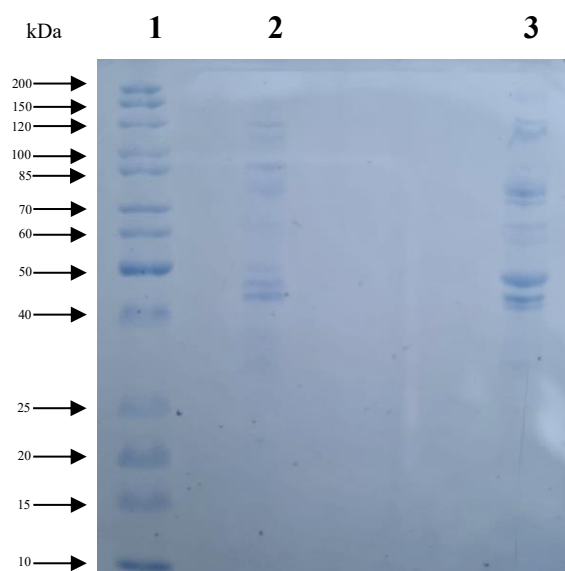
**Slika 9.** Analiza površinskih proteina *R. azotoformans*: 1. standard proteina poznatih molekulskih masa, 2. *R. azotoformans* nakon 7 dana uzgoja u tekućoj podlozi, 3. *R. azotoformans* nakon 14 dana uzgoja u tekućoj podlozi (vlastita fotografija)



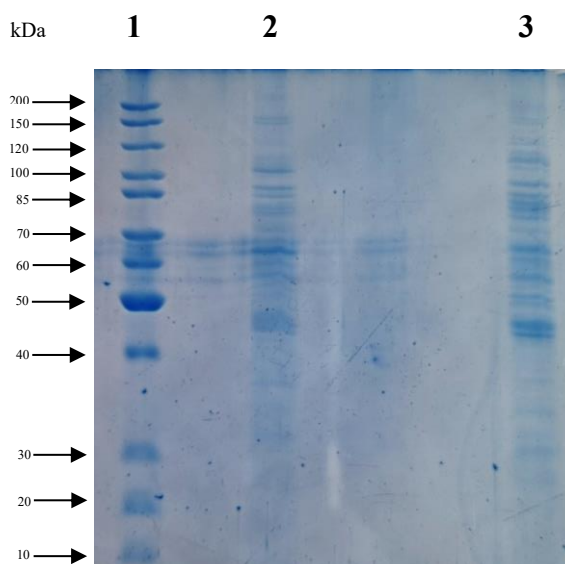
**Slika 10.** Analiza ukupnih proteina *R. azotoformans*: 1. standard proteina poznatih molekulskih masa, 2. *R. azotoformans* nakon 7 dana uzgoja u tekućoj podlozi, 3. *R. azotoformans* nakon 14 dana uzgoja u tekućoj podlozi (vlastita fotografija)

Analiza površinskih i ukupnih proteina *R. capsulatus* prikazana je na slikama 11 i 12. Kod ovog bakterijskog soja analizom površinskih i ukupnih proteina vidljiva je veća brojnost i jačina proteinskih vrpce nakon 14 dana u odnosu na analizu nakon 7 dana uzgoja, što je u skladu s istraživanjima provedenim na drugim vrstama ove skupine bakterija (Novak i sur., 2020; Novak i sur., 2017).





**Slika 11.** Analiza površinskih proteina *R. capsulatus*: 1. standard proteina poznatih molekulskih masa, 2. *R. capsulatus* nakon 7 dana uzgoja u tekućoj podlozi, 3. *R. capsulatus* nakon 14 dana uzgoja u tekućoj podlozi (vlastita fotografija)



**Slika 12.** Analiza ukupnih proteina *R. capsulatus*: 1. standard proteina poznatih molekulskih masa, 2. *R. capsulatus* nakon 7 dana uzgoja u tekućoj podlozi, 3. *R. capsulatus* nakon 14 dana uzgoja u tekućoj podlozi (vlastita fotografija)

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Bakterijske vrste *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 su gram-negativne, pokretne bakterije.
2. Na krutim podlogama rastu u obliku kremastih glatkih kolonija okruglog oblika, dok u tekućoj podlozi s vremenom poprimaju crvenkastu boju uslijed sinteze pigmenta.
3. Analizom ukupnih i površinskih proteina ustanovljeno je da se većina proteina kod oba soja počinje sintetizirati u većoj količini nakon 14 dana uzgoja što je vidljivo iz brojnosti i intenziteta proteinskih vrpca na SDS elektroforezi.

## 6. POPIS LITERATURE

- Adessi A, Corneli E, Philippis R De (2017) Photosynthetic purple non sulfur bacteria in hydrogen producing systems: New approaches in the use of well known and innovative substrates. U: Hallenback PA (ured.) Modern topics in the phototrophic prokaryotes: environmental and applied aspects, 1 izd., Springer Cham, Švicarska, str. 321–350.
- Ainon H, Tan CJ, Vikineswary S (2006) Biological characterization of *Rhodomicrobium vannielii* isolated from a hot spring at Gadek, Malacca, Malaysia. *Malays J Microbiol* **2**(1), 15-21. <https://doi.org/10.21161/MJM.210603>
- Alloul A, Wille M, Lucenti P, Bossier P, Van Stappen G, Vlaeminck SE (2021) Purple bacteria as added-value protein ingredient in shrimp feed: *Penaeus vannamei* growth performance and tolerance against *Vibrio* and ammonia stress. *Aquaculture* **530**, 735788. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735788>
- Basak N, Das D (2007) The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 31–42. <https://doi.org/10.1007/S11274-006-9190-9/METRICS>
- Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (1995) Anoxygenic photosynthetic bacteria, 1.izd., Kluwer Academic Publishers, New York.
- Bunraksa T, Kantachote D, Chaiprapat S (2020) The potential use of purple nonsulfur bacteria to simultaneously treat chicken slaughterhouse wastewater and obtain valuable plant growth promoting effluent and their biomass for agricultural application. *Biocatal Agric Biotechnol* **28**, 101721. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101721>
- Gregersen LH, Bryant DA, Frigaard NU (2011) Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. *Front Microbiol* **2**, 116. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00116>

- Hell R, Dahl C, Knaff D, Leustek T (2008) Sulfur metabolism in phototrophic organisms, 1. izd., Springer, Dordrecht.
- Higuchi-Takeuchi M, Numata K (2019) Marine purple photosynthetic bacteria as sustainable microbial production hosts. *Front bioeng biotechnol* **7**, 258. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00258>
- Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (2009) The purple phototrophic bacteria, 1. izd., Springer, Dordrecht.
- Imhoff JF (2003) Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 941–951. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.02403-0>
- Kis M, Sipka G, Asztalos E, Rázga Z, Maróti P (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses. *J Photochem Photobiol B Biol* **151**, 110–117. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2015.07.017>
- LaTurner ZW, Bennett GN, San KY, Stadler LB (2020) Single cell protein production from food waste using purple non-sulfur bacteria shows economically viable protein products have higher environmental impacts. *J Clean Prod* **276**, 123114. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.123114>
- Lu H, Zhang G, He S, Zhao R, Zhu D (2021) Purple non-sulfur bacteria technology: a promising and potential approach for wastewater treatment and bioresources recovery. *World J Microbiol Biotechnol* **37**, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03133-Z/METRICS>
- Madigan, MT, Jung DO (2009) An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats. U: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer C, Beatty JT (ured.) The purple phototrophic Bacteria, 1. izd., Springer, Dordrecht, str. 1–15.

- Mae M, Socorro L Del, Mehid JB, Lou W, Ladion B, Teves FG (2013) Purple nonsulfur bacteria (PNSB) isolated from aquatic sediments and rice paddy in Iligan City, Philippines. *J Multidiscip* **1**, 2350–7020. <https://doi.org/10.7828/JMDS.V1I1.394>
- Novak M, Pavlečić M, Harutyunyan B, Goginyan V, Horvat P, Šantek B (2017) Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Cro J Food Technol Biotechnol Nutr* **12**, 113–119.
- Novak M, Trontel A, Marđetko N, Matoković V, Sarić M, Pavlečić M, i sur. (2020) Fotoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. *Cro J Food Technol Biotechnol Nutr* **15**, 115–123. <https://doi.org/10.31895/HCPTBN.15.3-4.5>
- Mezzari MP, Da Silva MLB (2013) Sulfide removal from biogas by sulfur-oxidizing bacteria. U: Proceedings of III simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais, São Pedro, str. 1-4.
- Overmann J (2001) Green sulfur bacteria.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/npg.els.0000458>. Pristupljeno 25. srpnja 2023.
- Overmann J (2008) Green Nonsulfur Bacteria  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000457>. Pristupljeno 25. srpnja 2023.
- Sakarika M, Spanoghe J, Sui Y, Wambacq E, Grunert O, Haesaert G, i sur. (2020) Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb Biotechnol* **13**, 1336–1365. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13474>
- Sasaki K, Watanabe M, Suda Y, Ishizuka A, Noparatnaraporn N (2005) Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *J Biosci Bioeng* **100**, 481–488. <https://doi.org/10.1263/JBB.100.481>

- Soon TK, Al-Azad S, Ransangan J (2014) Isolation and characterization of purple non-sulfur bacteria, *Afifella marina*, producing large amount of carotenoids from mangrove microhabitats. *J Microbiol Biotechnol* **24**, 1034–1043. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08072>
- Sundar LS, Chao YY, Shiva Sundar L, Chao YY (2022) Potential of purple non-sulfur bacteria in sustainably enhancing the agronomic and physiological performances of rice. *Agronomy* **12**, 2347. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12102347>
- Talaiekhosani A, Rezania S (2017) Application of photosynthetic bacteria for removal of heavy metals, macro-pollutants and dye from wastewater: A review. *J Water Proc Eng* **19**, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.09.004>
- Van Der Meer MTJ, Schouten S, Bateson MM, Nübel U, Wieland A, Kühl M, i sur. (2005) Diel variations in carbon metabolism by green nonsulfur-like bacteria in alkaline siliceous hot spring microbial mats from Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3978–3986. [10.1128/AEM.71.7.3978-3986.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3978-3986.2005)
- Wen S, Liu H, He H, Luo L, Li X, Zeng G i sur. (2016) Treatment of anaerobically digested swine wastewater by *Rhodobacter blasticus* and *Rhodobacter capsulatus*. *Bioresour Technol* **222**, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.102>

## **Izjava o izvornosti**

Ja Antonija Zrile izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis