

Preživljavanje ljubičastih nesumpornih bakterija (Rhodobacter azotoformans JCM 9340 i Rhodobacter capsulatus JCM 21090) pri različitim koncentracijama soli

Vadoc, Ana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:468891>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Ana Vadoc
0058218287**

**Preživljavanje ljubičastih nesumpornih bakterija
(*Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter
capsulatus* JCM 21090) pri različitim koncentracijama soli**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Iva Čanak

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Preživljavanje ljubičastih nesumpornih bakterija (*Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090) pri različitim koncentracijama soli

Ana Vadoc, 0058218287

Sažetak: Ljubičaste bakterije velika su podgrupa fotosintetskih mikroorganizama i provode fotosintezu bez proizvodnje kisika. Dijele se na ljubičaste sumporne i nesumporne bakterije. Izoliraju se iz vodenih staništa poput jezera, ribnjaka ili otpadnih voda te iz sedimenata i vlažnog tla. Ove bakterije važne su u biotehnološkoj proizvodnji zbog svog ekološkog i ekonomskog značaja. Njihova primjena zabilježena je u proizvodnji biokemikalija, biopolimera, biogoriva, kod sinteze pigmenta, obrade otpadnih voda i bioremedijacije tla. Ljubičaste bakterije poznati su halofili te je cilj ovog istraživanja bilo ispitati kako dvije vrste ljubičastih nesumpornih bakterija, *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090, preživljavaju uz dodatak NaCl-a, te kako dodatak soli utječe na ekspresiju ukupnih proteina.

Rezultati su pokazali kako obje vrste uspješno preživljavaju u velikom broju stanica pri svim ispitanim koncentracijama soli, i to *R. azotoformans* u rasponu od 10^5 - 10^8 CFU/ml, a *R. capsulatus* od 10^5 - 10^7 CFU/ml. Analizom na proteinskoj razini pomoću SDS elektroforeze utvrđeno je da dodatak NaCl smanjuje ekspresiju proteina što je vidljivo iz odsustva proteinskih vrpca u uzorcima s dodanom soli. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo koji je mehanizam točno odgovoran za preživljavanje ljubičastih nesumpornih bakterija u ekstremnim uvjetima.

Ključne riječi: ljubičaste nesumporne bakterije, inhibicija rasta, sol

Rad sadrži: 21 stranica, 4 slike, 37 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: 14. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Title of the undergraduate thesis

Ana Vadoc, 0058218287

Abstract: Purple bacteria are a large subgroup of photosynthetic microorganisms and carry out photosynthesis without the production of oxygen. They are divided into purple sulfur and non-sulfur bacteria. They are isolated from aquatic habitats such as lakes, ponds or wastewater, as well as from sediments and moist soil. These bacteria are important in biotechnological production due to their ecological and economic importance. Their application has been noted in the production of biochemicals, biopolymers, biofuels, in the synthesis of pigments, wastewater treatment and soil bioremediation. Purple bacteria are known halophiles, and the aim of this research was to examine how two types of purple non-sulfur bacteria - *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 and *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090 survive with the addition of NaCl, and how the addition of salt affects the expression of total proteins.

The results showed that both species successfully survive in a large number of cells at all tested salt concentrations, *R. azotoformans* in the range of 10^5 - 10^8 CFU/ml and *R. capsulatus* in the range of 10^5 - 10^7 CFU/ml. Analysis at the protein level using SDS electrophoresis revealed that the addition of NaCl reduces protein expression, which is evident from the absence of protein bands in samples with added salt. Further research is needed to determine exactly what mechanism is responsible for the survival of purple non-sulfur bacteria in extreme conditions.

Keywords: purple non-sulfur bacteria, growth inhibition, salt

Thesis contains: 21 pages, 4 figures, 37 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: September 14, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LJUBIČASTE BAKTERIJE	2
2.1.1. Ljubičaste sumporne bakterije.....	3
2.1.2. Ljubičaste nesumporne bakterije	4
2.2. PRIMJENA LJUBIČASTIH NESUMPORNIH BAKTERIJA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI	5
2.2.1. Biotehnoška proizvodnja biokemikalija	5
2.2.2. Primjena u biološkoj obradi otpadnih voda	6
2.2.3. Biotehnoška proizvodnja biopolimera	6
2.2.4. Biotehnoška proizvodnja biogoriva	7
2.2.5. Primjena u bioremedijaciji tla	7
2.2.6. Sinteza i primjena pigmenata	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. Bakterijski sojevi.....	10
3.1.2. Hranjive podloge	10
3.1.3. Pribor i oprema.....	11
3.1.4. Kemikalije	11
3.2. METODE	12
3.2.1. Čuvanje i uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija	12
3.2.2. Preživljavanje ljubičastih bakterija pri različitim koncentracijama soli	12
3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	12
3.2.4. Izolacija ukupnih staničnih proteina	12
3.2.5. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
5. ZAKLJUČCI	18
6. POPIS LITERATURE	19

1. UVOD

Fotosintetske bakterije prokarioti su koji imaju sposobnost provođenja fotosinteze. Kategorizirane su u dvije velike skupine: oksigene fotosintetske bakterije koje mogu proizvoditi kisik tijekom fotosinteze jer koriste vodu kao donora elektrona, i anoksiogene fotosintetske bakterije koje ne proizvode kisik tijekom fotosinteze i ne koriste vodu kao donora elektrona već asimiliraju dušik i ugljikov dioksid (Idi i sur., 2015). Jednu od većih podgrupa fotosintetskih bakterija čine ljubičaste bakterije. Ljubičaste bakterije mala su skupina gram-negativnih eubakterija koja se sastoji od svega 30-ak vrsta. Dijele se na ljubičaste sumporne i ljubičaste nesumporne bakterije (Novak i sur., 2017b).

Ljubičaste bakterije vrlo su jednostavne za uzgoj u laboratorijskoj kulturi. Uz jednostavnost uzgoja prednost im je i anoksiogeno provođenje fotosinteze. Ovakve prednosti dovele su do toga da su ljubičaste bakterije postale modelni sustav za proučavanje fotosinteze na fiziološkoj, biokemijskoj te molekularnoj razini. Anoksiogena fotosinteza prethodila je fotosintezi kisikom na Zemlji milijardama godina dok su anoksiogeni fototrofi poput ljubičastih bakterija pridonijeli boljem razumijevanju evolucije fotosinteze (Madigan i Jung, 2009). Danas je zabilježena primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u mnogim industrijama. Znanstvenici Kim i sur. (2004) govore o primjeni u obradi otpadnih voda iz raznih područja proizvodnje poput poljoprivrede, proizvodnje lateksa, spominje se i upotreba za pročišćavanje otpadne vode iz akvarija te iz kanalizacije. Primjena ovih bakterija zabilježena je i u proizvodnji intracelularnog polihidroksialkanoata (PHA), izvanstanične nukleinske kiseline te plinovitog vodika (Higuchi- Takeuchi i Numata, 2019). Ove bakterije imaju potencijal za proizvodnju vitamina i enzima (Kar Soon i sur., 2014). Unaprijeđena je i proizvodnja 5-aminolevulininske kiseline pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija (Sasaki i sur., 2002).

Ljubičaste bakterije moguće je izolirati iz raznih staništa poput jezera, ribnjaka, otpadnih voda, obalnih laguna te ih se može pronaći u sedimentima i vlažnom tlu (Novak i sur., 2017a).

U ovom istraživanju kao radni mikroorganizmi korištene su dvije vrste ljubičastih nesumpornih bakterija: *Rhodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rhodobacter capsulatus* JCM 21090. Cilj rada bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija soli na rast i razmnožavanje navedenih bakterija te na sastav ukupnih proteina bakterijskih stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJUBIČASTE BAKTERIJE

Ljubičaste bakterije pripadaju skupini anoksigenih fototrofnih bakterija koje su glavna skupina fotosintetskih mikroorganizama. Anoksigeni fototrofi rastu u uvjetima bez kisika i moguće ih je podijeliti u pet podskupina: ljubičaste sumporne bakterije, ljubičaste nesumporne bakterije, heliobakterije, zelene sumporne bakterije te zelene nesumporne bakterije (Asao i sur., 2011). Ove bakterije su gram-negativni prokarioti koji procesom anoksigene fotosinteze svjetlosnu energiju pretvaraju u kemijsku (Madigan i Jung, 2009).

Napredovanjem istraživanja mijenjala se i taksonomska klasifikacija međutim, danas se zna da ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju razredima α - i β -proteobakterija, a ljubičaste sumporne pripadaju razredu γ -proteobakterija (Imhoff i sur., 2005).

Poznato je da su široko rasprostranjene u prirodi, pretežito u vodenim staništima poput jezera, ribnjaka, otpadnih voda, kanalizaciji te obalnim lagunama (Novak i sur., 2017a). Određene vrste ljubičastih bakterija mogu nastanjivati područja ekstremnih temperatura, pH ili saliniteta.

Nekoliko vrsta ekstremofilnih ljubičastih bakterija su halofilne ili haloalkalofilne. Od ljubičastih sumpornih bakterija u ovu skupinu ubrajaju se rodovi *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Halochromatium*, *Marichromatium* i *Thiohalocapsa*. Rodovi *Rhodovibrio*, *Rhodothalassium*, *Rhodobium*, *Rhodovulum*, i *Roseospira* pripadaju ljubičastim nesumpornim bakterijama. Ti rodovi bakterija rastu pri koncentracijama soli koje se kreću i iznad 20 % natrijevog klorida (Madigan i Jung, 2009).

Fotosintetske pigmente u bakterijama čine bakterioklorofili a ili b te karotenoidi poput likopena, sferoidena, okenona, rodopinala te spiriloksantina (Imhoff i sur., 2005). Ti pigmenti zaslužni su za boju ljubičastih bakterija. Fotosinteza kod ljubičastih bakterija ovisi o prisutnosti kisika jer je sinteza fotosintetskih pigmenata i kloroplasta potisnuta prisutnošću tog plina (Imhoff i sur., 2005). Iz ovog proizlazi da kompetitivni uspjeh ljubičastih bakterija u prirodi ovisi o uvjetima svjetlosti i količini kisika (Madigan i Jung, 2009).

Karakteristično za ove bakterije je da ne mogu koristiti vodu kao donor elektrona već koriste sulfid i reducirane spojeve sumpora, vodik i druge male organske molekule te željezo

(Imhoff i sur., 2005).

Ljubičaste sumporne i ljubičaste nesumporne bakterije izvorno su se razlikovale na fiziološkoj osnovi na temelju tolerancije i iskorištenja sulfidnih spojeva. Ljubičaste sumporne bakterije su vrste koje toleriraju milimolarne koncentracije sulfida te ga oksidiraju i pohranjuju elementarni sumpor u obliku globula unutar stanice. Ljubičaste nesumporne bakterije ne posjeduju ove karakteristike i pohranjuju elementarni sumpor izvan stanice, stoga je vrlo lako razlikovati ove dvije vrste bakterija pod mikroskopom s obzirom na formirane globule. Dokazano je kako ipak neke vrste ljubičastih nesumpornih bakterija mogu rasti pri koncentracijama sulfida manjim od 0,5 mM (Madigan i Jung, 2009).

2.1.1. Ljubičaste sumporne bakterije

Fototrofne sumporne bakterije za svoj rast zahtijevaju vodena područja s optimalnom koncentracijom sulfata i sunčeve svjetlosti. U takvim sredinama sulfid proizvode sulfid reducirajuće bakterije s kojima fototrofne sumporne bakterije ponekad stvaraju manje ili više stabilne višestanične nakupine. Sulfidi ne moraju nužno biti reducirani iz kompleksnijih spojeva već mogu biti i geološkog ili antropogenog podrijetla. Dijelimo ih na zelene sumporne bakterije i ljubičaste sumporne bakterije (Dahl i Friedrich, 2008).

Vrste ljubičastih sumpornih bakterija mogu se podijeliti u dvije obitelji. Bakterije koje pohranjuju elementarni sumpor unutar stanice pripadaju obitelji *Chromatiaceae* (Madigan i Jung, 2009). Ovu obitelj karakterizira vezikularni tip citoplazmatskih membrana, mnoge vrste pokreću se pomoću flagela, a oko jedne trećine vrsta imaju plinske vezikule i kao takve većinom koloniziraju okuženja slabog osvjetljenja (Frigaard i Dahl, 2008). Vrste koje elementarni sumpor pohranjuju izvan stanice pripadaju obitelji *Ectothiorhodospiraceae* (Madigan i Jung, 2009). Karakteriziraju ih lamelarne citoplazmatske membrane, značajna je razlika u polarnom lipidnom sastavu u odnosu na obitelj *Chromatiaceae* te uvjeti rasta ovise o koncentraciji i alkalnim uvjetima okoline (Frigaard i Dahl, 2008). Mnoge vrste ljubičastih sumpornih bakterija najbolje rastu u ekstremnim uvjetima kao što su visoke koncentracije soli ili ekstremni pH (Madigan i Jung, 2009).

2.1.2. Ljubičaste nesumporne bakterije

Ljubičaste nesumporne bakterije široko su rasprostranjene u prirodnim staništima, osobito u onim staništima u kojima je prisutna velika količina topljive organske tvari kao što su močvare, bazeni otpadnih voda, obalne i otpadne lagune. Posjeduju sposobnost rasta u fotoautotrofnim, fotoheterotrofnim i kemoheterotrofnim uvjetima što im zapravo i omogućava rast na različitim staništima. Karakteristike rasta u smislu težine suhe stanice i ukupnoj proizvodnji karotenoida ovise o pH, temperaturi, otopljenom kisiku, dostupnosti hranjivih tvari te o intenzitetu svjetla. Od svih navedenih uvjeta, intenzitet svjetla ipak ima najveći utjecaj na rast bakterija. Pokazalo se kako biomasa nesumpornih ljubičastih bakterija doseže maksimalnu vrijednost pri većem intenzitetu svjetlosti dok se najviša koncentracija pigmenata obično postiže pri slabijem osvjetljenju (Kar Soon i sur., 2014).

Znanstvenici Madigan i Jung (2009) objasnili su na primjeru bakterije *Rhodobacter capsulatus* kako je rast moguć pod fototrofnim uvjetima s CO₂ ili organskim ugljikom ili u tami respiracijom, fermentacijom ili kemolitotrofijom. Ovo čini *R. capsulatus* metabolički najsvestranijom od poznatih ljubičastih nesumpornih bakterija. U fototrofnim uvjetima ljubičaste nesumporne bakterije mogu rasti fotoautotrofno s H₂ ili niskim razinama sulfida kao donorom elektrona, dok nekoliko vrsta može koristiti S₂O₃²⁻ ili Fe²⁺ kao fotosintetske donore elektrona. Kvašćev ekstrakt čest je dodatak medijima formuliranim za rast ljubičastih nesumpornih bakterija. Izvor je vitamina B skupine kao što su tiamin, nikotinska kiselina, biotin te p-aminobenzojeva kiselina. Kvašćev ekstrakt također potiče rast ljubičastih nesumpornih bakterija zbog organskih spojeva koji mogu potaknuti fotoheterotrofni rast. Kemolitotrofni rast u tami pojedinih vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija moguć je pomoću H₂ odnosno S₂O₃²⁻ kao donora elektrona. Mnogi od istih organskih spojeva koje fotoasimiliraju ljubičaste nesumporne bakterije također mogu biti donori elektrona i izvor ugljika za respiratorne uvjete rasta u tami. Tolerancija kisika za respiratorni rast razlikuje se od vrste do vrste, dok se neke vrste mogu uzgajati uz snažnu aeraciju (Madigan i Jung, 2009).

Ljubičaste nesumporne bakterije dijelimo u dvije velike skupine, alfaproteobakterije i betaproteobakterije. Njihova raznolikost vidljiva je u vrlo varijabilnoj staničnoj morfologiji, strukturi unutarnje membrane, sastavu karotenoida, korištenju izvora ugljika te o vrsti donora elektrona koji se koriste za fotosintezu. Većina ljubičastih nesumpornih bakterija je metabolički vrlo fleksibilna i mogu lako prelaziti između anoksigene fotosinteze, fermentacije i aerobne ili

anaerobne respiracije pomoću nitrata, dimetil sulfoksida ili trimetilamin-N- oksida kao akceptora elektrona. Fototrofne betaproteobakterije ne koriste reducirane spojeve sumpora kao donore elektrona te sulfidi inhibiraju rast čak i pri niskim koncentracijama. Za razliku od betaproteobakterija unutar sve tri taksonomske skupine alfavroteobakterija (*Rhodospirillales*, *Rhizobales*, *Rhodobacterales*) pronađene su vrste koje mogu koristiti reducirane spojeve sumpora (Frigaard i Dahl, 2008).

2.2. PRIMJENA LJUBIČASTIH NESUMPORNIH BAKTERIJA U BIOTEHNOLOŠKOJ PROIZVODNJI

Ljubičaste nesumporne bakterije u biotehnologiji poznate su zbog svoje široke primjene. Mnoge ljubičaste nesumporne bakterije uspijevaju u prisutnosti raznih toksičnih tvari te igraju važnu ulogu u sanaciji mjesta kontaminiranih teškim metalima. Ova skupina bakterija ima veliki potencijal u proizvodnji biovodika što je korak bliže eri „zelene tehnologije“. Također služe kao potencijalni izvor jednostaničnih proteina (eng. *SCP-single cell protein*), enzima, karotenoida i hormona koji potiču rast biljaka (Asif i sur., 2021).

Kar Soon i sur. (2014) navode kako ljubičaste nesumporne bakterije imaju potencijal za bioremedijaciju otpadnih voda, za proizvodnju biogoriva, enzima, vitamina i biopolimera.

Otkrivena je i primjena ljubičastih nesumpornih bakterija u proizvodnji 5-aminolevulinske kiseline čiji je proizvodni proces vrlo zahtjevan zbog opsežnog puta kemijske sinteze (Sasaki i sur., 2002).

2.2.1. Biotehnološka proizvodnja biokemikalija

Najpoznatija biokemikalija koju proizvode ljubičaste nesumporne bakterije je 5-aminolevulinska kiselina (5-ALA). Dobro je poznato da je 5-ALA prekursor za proizvodnju klorofila, vitamina B12 i drugih metabolita koji štite stanicu od abiotičkog stresa kao što je visoke koncentracije soli. Komercijalna 5-ALA vrlo je skupa za primjenu u poljoprivredi radi velikog broja koraka prilikom kemijske sinteze pa je osmišljen put izravne proizvodnje 5-aminolevulinske kiseline korištenjem mikroorganizma. Ljubičaste nesumporne bakterije dobri su kandidati za proizvodnju 5-aminolevulinske kiseline jer su svestrani organizmi koji mogu rasti fototrofno pod svjetlosnim uvjetima ili heterotrofno u tami (Nunkaew i sur., 2015).

Postoje dva različita puta proizvodnje 5-ALA, C4 put ili Shemin put koji je prisutan u

ljubičastim bakterijama, kvascima i stanicama sisavaca, te C5 put koji je prisutan u mnogim biljkama i nekim mikroorganizmima. Danas se 5-aminolevulinska kiselina proizvodi mikrobnom fermentacijom fotosintetskim bakterijama zbog složene kemijske sinteze i manjeg prinosa proizvoda. Zabilježen je veći prinos 5-ALA korištenjem divljih sojeva bakterija i njihovih mutanata te se zbog toga ova vrsta proizvodnje pokazala kao puno prikladnijom (Novak i sur., 2017b).

5-aminolevulinska kiselina ima različite primjene u poljoprivredi kao herbicid, insekticid te za poticanje rasta. Ima sposobnost da daje biljkama otpornost na sol i niske temperature. Njena primjena potvrđena je i u medicini u dijagnozi i liječenju tumora (Sasaki i sur., 2002).

2.2.2. Primjena u biološkoj obradi otpadnih voda

Količina proizvedene otpadne vode u svijetu neprestano raste. Danas više od 90 % metoda pročišćavanja otpadnih voda uključuje biološku obradu čija je velika mana nastajanje viška biomase aktivnog mulja. Posljedica toga je nastajanje sekundarnih onečišćenja što dovodi do visokih troškova zbrinjavanja takvog otpada (Lu i sur., 2021). Korištenje ljubičastih nesumpornih bakterija u pročišćavanju otpadnih voda pokazalo se kao pozitivno rješenje jer bakterije učinkovito uklanjaju zagađivače te obnavljaju resurse (Lu i sur., 2011). Tome u prilog ide istraživanje Wada i sur. (2022) gdje je korišten soj *Rhodobacter sphaeroides*, uzgojen u farmaceutskoj otpadnoj vodi koja je sadržavala organske spojeve poput heptakozana, oktadekana i benzotiazola, pri čemu je ovaj soj bakterije imao mogućnost razgraditi navedene organske spojeve. Ljubičaste nesumporne bakterije smanjile su potrebu za kisikom za više od 80 % istovremeno proizvodeći biomasu s više od 50 % proteina (Wada i sur., 2022). Biomasa dobivena obradom otpadnih voda sadrži bioresurse s dodanom vrijednošću poput pigmenata, jednostaničnih proteina, 5-ALA i koenzima Q10 (Lu i sur., 2021).

2.2.3. Biotehnološka proizvodnja biopolimera

Polihidroksialkanoati (PHA) skupina su biopolimera koje prirodno proizvode mikroorganizmi, odnosno biorazgradiva plastika načinjena na biološkoj bazi koja ima kratko vrijeme razgradnje nakon odlaganja u različite vrste okoliša (Sali i Mackey, 2021). PHA imaju svojstva slična polietilenu i sposobnost proizvodnje mikrobnom pretvorbom iz širokog raspona organskog otpada. Ta svojstva čine ih obećavajućim za budućnost i očuvanje okoliša (Sathya i sur., 2018).

Ljubičaste nesumporne bakterije imaju sposobnost nakupljanja PHA, polifosfata i polisaharida kao i mnogih drugih spojeva (Imhoff i sur., 2005). Koriste različite vrste ugljikovih supstrata za svoj rast, a njihov višak uzrokuje akumulaciju PHA (Sali i Mackey, 2021).

Proizvodnja PHA pomoću ljubičastih nesumpornih bakterija ovisi o mikrobnjoj kulturi, izvoru ugljika, omjeru ugljika i dušika u hranjivoj podlozi, koncentraciji fosfora i sumpora, o mikroelementima, pH te o razini osvjetljenja. Ljubičaste nesumporne bakterije mogu akumulirati visoke postotke PHA. Poznata je činjenica da *R. capsulatus* akumulira do 90 % suhe težine stanice PHA koristeći heptanoat kao jedini izvor ugljika (Montiel-Corona i Buitrón, 2021).

2.2.4. Biotehnološka proizvodnja biogoriva

Plinoviti vodik potpuno je čisto gorivo, međutim najveći dio vodika proizvodi se iz konvencionalnih fosilnih goriva (zemni plin, nafta i ugljen) kroz različite fizikalno kemijske procese (Ghosh i sur., 2017; Holladay i sur., 2009). Alternativno, vodik se može proizvesti različitim biološkim sredstvima iz brojnih obnovljivih izvora bez izazivanja opasnosti od onečišćenja (Ghosh i sur., 2017).

Ljubičaste nesumporne bakterije najintenzivnije su proučavani anoksigeni fototrofi koji proizvode H₂. Vodik nastaje kao produkt reakcije koju katalizira enzim nitrogenaza, redukcijom atmosferskog dušik u amonijak (McKinlay i Harwood, 2010).

Održivost proizvodnje biovodika uvelike ovisi o isplativosti proizvodnje H₂ i dostupnosti supstrata. Jedan od obećavajućih načina da se to postigne je spajanje proizvodnje vodika s obradom otpada biomase i otpadnih voda. Otpadni prehrambeni materijali i otpadne vode nastale u industriji prerade hrane i pića mogu biti pouzdan izvor sirovina za fotofermentativnu proizvodnju H₂ (Ghosh i sur., 2017).

2.2.5. Primjena u bioremedijaciji tla

Procesi bioremedijacije istražuju upotrebu bioloških mehanizama za uništavanje, transformaciju ili imobilizaciju zagađivača s ciljem zaštite okoliš (Merugu i sur., 2014).

Esencijalni metalni ioni u niskim koncentracijama igraju sastavnu ulogu u životnim

procesima mikroorganizama, djeluju kao katalizatori biokemijskih reakcija, održavaju osmotsku ravnotežu, stabiliziraju razne enzime i DNK, također su dio složenih molekula sa širokim spektrom funkcija. Međutim, metali su u visokim koncentracijama toksični za mikroorganizme, a kao posljedica javljaju se promjene u konformacijskoj strukturi nukleinskih kiselina, proteina i citoplazmatskih membrana te se time ometa funkcija ključnih molekula, oksidativne fosforilacije i osmotske ravnoteže (Kis i sur., 2015).

Neke bakterije, a tu se ubrajaju i ljubičaste nesumporne bakterije, imaju sposobnost korištenja metalnih spojeva kao donora elektrona za prijenos energije i time pretvaraju toksične spojeve u druge manje toksične (Merugu i sur., 2014).

Mehanizmi koje ljubičaste nesumporne bakterije koriste za uklanjanje metalnih čestica bisorpcijski i bioakumulacijski su procesi. Neke bakterije mogu koristiti i više od jednog mehanizma za uklanjanje, a vrsta mehanizma koja se koristi ovisi o svojstvima metalnog iona koji se uklanja (Talaiekhozania i Rezanian, 2017).

2.2.6. Sinteza i primjena pigmenata

Ljubičaste nesumporne bakterije posjeduju karakteristične fotosintetske pigmente, bakterioklorofile a ili b te karotenoide. Ovi pigmenti daju kolonijama specifičnu boju u rasponu između ljubičaste, crvene, smeđe i narančaste (Novak i sur., 2017a; Madigan i Jung, 2009).

Karotenoidi se nalaze unutar reakcijskog centra (RC) te unutar antenskih kompleksa koji prikupljaju svjetlost LH1 i LH2, imaju uloge prikupljanja svjetla i/ili fotozaštite te strukturnu ulogu (Takaichi, 2009). Antenski kompleksi nazivaju se i pigmentno-proteinski kompleksi čija je uloga prikupljanje fotona koji pogađaju membranu te prijenos nastale energije u RC. Sastoje se od integralnih membranskih proteina koji nekovalentno vežu pigmente koji apsorbiraju svjetlost (Gabrielsen i sur., 2009). Takav jedan sustav koji čine svi pigmentno-proteinski kompleksi nazivaju se fotosintetski aparat.

Ljubičaste bakterije stvaraju bakterioklorofile za fotosintetski način rasta. Ti pigmenti sastoje se od jednostavnih prekursora glicina i sukcinil-koenzima A, a početni koraci biosinteze bakterioklorofila dijele se s biosintetskim putevima vitamina B12 i hema. S obzirom na sposobnost proizvodnje bakterioklorofila ljubičaste bakterije mogu se podijeliti u dvije skupine. U prvu skupinu ubrajaju se *R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, i *Rhodospirillum rubrum*, koje fotosintetiziraju i tako anaerobno na svjetlu stvaraju bakterioklorofile, iako mogu

sintetizirati značajne količine pigmenta u mraku ali samo u uvjetima niske aeracije. Drugu skupinu čine *Rhodovulum sulfidophilum*, *Roseobacter sp.* i *Rubrivivax gelatinosus*. Mogu sintetizirati pigmente i fotosintetizirati u anaerobnim i aerobnim uvjetima na svjetlu. Razlike ove dvije skupine su u nizu enzima u biosintetskom putu bakterioklorofila (Willows i Kriegel, 2009).

Dobro je poznato da biosinteza bakterioklorofila i karotenoida varira ovisno o intenzitetu svjetlosti, koncentraciji kisika, o fazi rasta te o soju bakterije. Lin i sur. (2014) istraživanjem su dokazali da anaerobno uz prisutnost svjetlosti bakterioklorofili i karotenoidi čine gotovo polovicu ukupnih pigmenata, a bakteriofeofitin prisutan je u malim količinama prilikom uzgoja *R.capsulatus*. U aerobnim uvjetima na svjetlu bakterioklorofil a i bakteriofeofitin nakupili su se u većim količinama, dok je karotenoida bilo samo u tragovima.

Zhou i sur. (2014) utvrdili su da optimalni intenziteti svjetlosti za proizvodnju karotenoida i bakterioklorofila kod bakterije *Rhodopseudomonas palustris* iznose 240 i 30 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$. Pri 60 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$ proizvodnja bakterioklorofila i karotenoida bila je najniža. Najveća učinkovitost pretvorbe svjetlosti zabilježena je pri 15 $\mu\text{mol-fotona/m}^2/\text{s}$ (Liu i sur., 2019).

Karotenoidi su bojila koja služe kao zaštita protiv stanica raka, poboljšavaju proizvodnju antitijela i funkcionalni su suplementi. Njihova primjena zabilježena je u prehrambenoj i kemijskoj industriji te u medicini. U fotosustavu ljubičastih nesumpornih bakterija, karotenoidi i bakterioklorofili imaju značajnu ulogu u hvatanju i prijenosu svjetlosne energije koju onda prevode u biokemijsku energiju koju koriste za metabolizam stanice (Chen i sur., 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu korištene su dvije vrste ljubičastih nesumpornih bakterija: *Rodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rodobacter capsulatus* JCM 21090. Obje bakterije dio su zbirke 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/ 15 min. 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 B₁₂ 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

- analitička vaga, Entris (Sartorius, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- automatske pipete Research Plus (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga, Centric 150 (Tehtnica, Slovenija)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Njemačka)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- magnetska miješalica, Lab Stir (Gilson, SAD)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Švicarska)
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Njemačka)
- vertikalna elektroforeza (Cleaver Scientific Ltd, UK)
- vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Latvija)

3.1.4. Kemikalije

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

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

3.2. METODE

3.2.1. Čuvanje i uzgoj ljubičastih nesumpornih bakterija

Vrste ljubičastih nesumpornih bakterija čuvaju se na +4 °C u GM bujonu. *R. capsulatus* i *R. azotoformans* uzgojene su tijekom dva tjedna u GM bujonu pri 30 °C u semiaerobnim uvjetima prije početka pokusa. Inicijalni inokulum bakterija iznosio je 10 % ukupnog volumena hranjive podloge u koju se naciepljivao.

3.2.2. Preživljavanje ljubičastih bakterija pri različitim koncentracijama soli

Ljubičaste bakterije naciepljene su u GM bujon i uzgojene pri različitim koncentracijama soli (0 g/l (kontrola), 5 g/l, 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 100 g/l, 200 g/l i 300 g/l) tijekom deset dana. Broj poraslih kolonija određen je indirektnom metodom.

3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzoraka koji su sadržavali bakterijske stanice pripremljena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj vodi i naciepljena na Petrijeve zdjelice sa selektivnom podlogom. Nakon 48 sati inkubacije pri 30 °C, izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.4. Izolacija ukupnih staničnih proteina

Bakterijske kulture porasle pri odabranim koncentracijama soli 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 kroz 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).

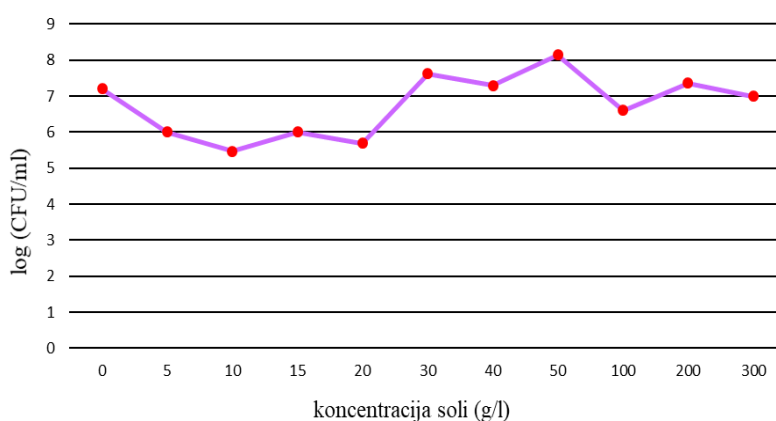
3.2.5. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Uzorci ukupnih proteina ljubičastih nesumpornih bakterija pripremljeni su tako da je volumenima od 15 μ l SDS ekstrakata proteina dodano 5 μ l 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 nanjeni na 10 % 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 % 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 provedena je u puferu za elektroforezu (25mM TRIS-glicin), a zaustavljena je kada je boja dosegla rub ploče. Bojenje 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

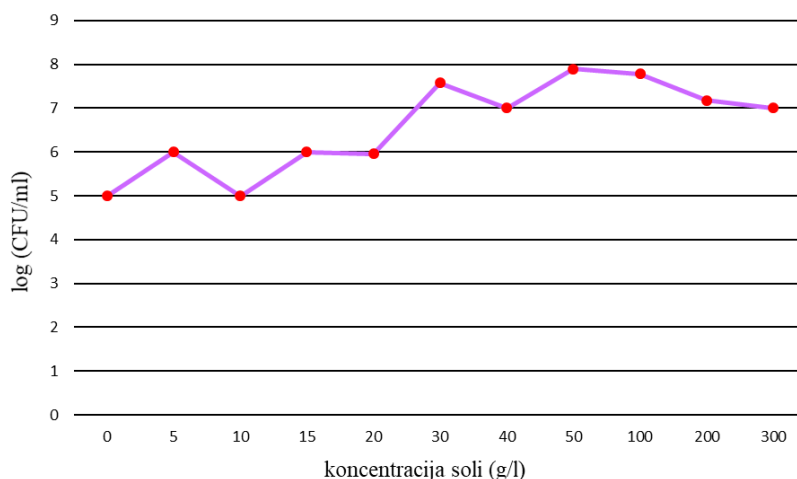
U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja dvije vrste ljubičastih nesumpornih bakterija, *Rodobacter azotoformans* JCM 9340 i *Rodobacter capsulatus* JCM 21090, uz dodatak različitih koncentracija soli. Cilj ovog istraživanja bilo je odrediti kakav utjecaj različite koncentracije soli imaju na rast ljubičastih nesumpornih bakterija, dolazi li do inhibicije ili aktivacije rasta te mogu li uopće rasti pri tako nepovoljnim uvjetima. Prvi dio istraživanja temeljio se na provjeri sposobnosti rasta ljubičastih nesumpornih bakterija uz dodatak različitih koncentracija soli, dok je u drugom dijelu istraživanja provedena izolacija ukupnih staničnih proteina s ciljem provjere učinka dodatka soli na ekspresiju proteina.

Rezultati uzgoja *R. azotoformans* i *R. capsulatus* prikazani su grafički na slikama 1 i 2. Rast *R. azotoformans* ne prikazuje veća odstupanja pri svim koncentracijama soli iz čega se može zaključiti da ne dolazi do intenzivnog umnažanja bakterijskih stanica već da su stanice žive, ali u stacionarnoj fazi rasta. Najmanji broj stanica zabilježen je kod koncentracije NaCl od 10 g/l i iznosio je 5×10^5 CFU/ml što je i dalje dobra brojnost čak i u usporedbi s kontrolnim uzorkom bez dodatka soli u kojemu je broj stanica nakon 24 sata iznosio $1,6 \times 10^7$ CFU/ml. Pri najvećoj koncentraciji soli od 300 g/l, broj bakterijskih stanica postigao je zavidnu koncentraciju od 1×10^7 CFU/ml.



Slika 1. Preživljavanje *R. azotoformans* pri različitim koncentracijama NaCl nakon 10 dana uzgoja.

Slična situacija zabilježena je kod vrste *R. capsulatus* (slika 2). Broj bakterijskih stanica u kontrolnom uzorku iznosio je 1×10^5 CFU/ml, dok je pri najvišoj koncentraciji od 300 g/L NaCl broj stanica iznosio 1×10^7 CFU/ml. Iz navedenog može se pretpostaviti kako obje bakterije dobro toleriraju osmotski stres na stanicu pri vrlo visokim koncentracijama soli.



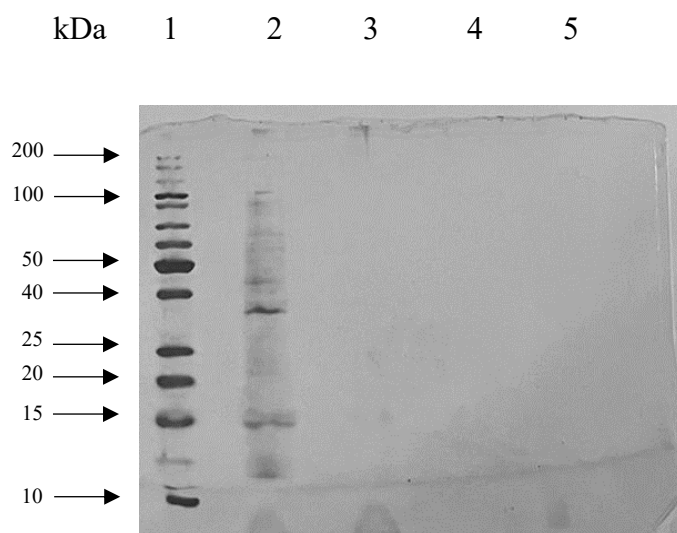
Slika 2. Preživljavanje *R. capsulatus* pri različitim koncentracijama NaCl nakon 10 dana uzgoja.

Kao što je već spomenuto u teorijskom dijelu, neke vrste ljubičastih bakterija mogu se ubrojiti u halofilne mikroorganizme. Halofilni mikroorganizmi koriste dvije strategije za osmotsko uravnoteženje svoje citoplazme s medijem u kojem se nalaze. Moguća su dva mehanizma koja omogućuju da halofili prežive pri visokom salinitetu. Prva mogućnost je takozvana „salt-out“ strategija koja omogućuje izjednačavanje osmotskog tlaka izazvanog gradijentom soli na staničnoj membrani te je uobičajena za halotolerantne bakterije. Dolazi do nakupljanja kompatibilnih organskih otopljenih tvari poput glicin-betaina, L-prolina i ektoina koji omogućuju toleranciju na visoke koncentracije soli. Druga strategija prilagodbe moguća je izvođenjem horizontalnog prijenosa gena. *R. capsulatus* intenzivno je proučavan upravo zbog svoje sposobnosti izvanstaničnog horizontalnog prijenosa gena putem čestica sličnih fagima nazvanih rcGTA (eng. *Rhodobacter Capsulatus* Gene Transfer Agents). Maksimalna proizvodnja ovih čestica postiže se kada *R. capsulatus* dosegne stacionarnu fazu rasta. Ova brza razmjena genetskih informacija mogla bi opisati prilagodbu *R. capsulatus* na promjenjivi okoliš (Gaffney i sur., 2020; Grattieri i sur., 2019). Također, pokazalo se da dostupnost izvora dušika igra ključnu ulogu u mogućnosti rasta *R. capsulatus* pri visokim koncentracijama soli. Mogućnost prilagodbe stanice na visoke koncentracije soli upućuje da dolazi do promjena u

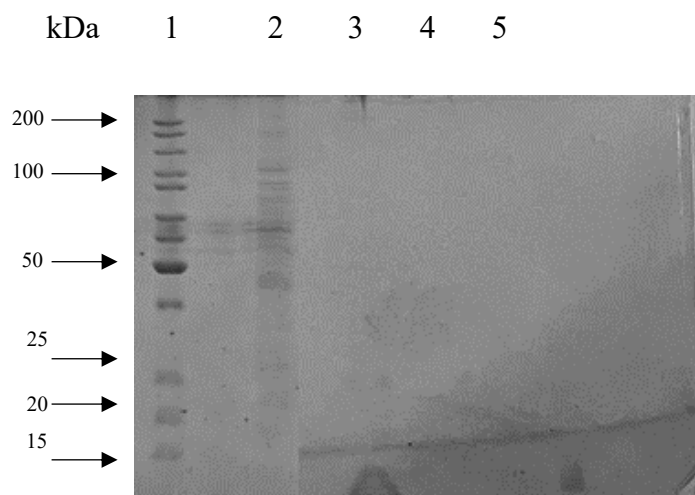
metabolizmu stanice kako bi preživljavanje bilo moguće (Gaffney i sur., 2020; Grattieri i sur., 2019).

Nadalje, obje vrste ljubičastih bakterija korištene u ovom radu morskog su porijekla te su već adaptirane na osmotski stres i puno lakše se mogu prilagoditi daljnjim povećanjima koncentracije soli.

U drugom dijelu istraživanja cilj je bilo ispitati utjecaj dodatka soli tijekom uzgoja na ekspresiju proteina. Ukupni proteini obje vrste ljubičastih bakterija analizirani su SDS elektroforezom, a rezultati su prikazani na slikama 3 i 4. Bendovi predstavljaju proteinske vrpce i njihova jačina, odnosno debljina proporcionalna je količini proteina. Uz ekstrahirane uzorke proteina korišteni su i proteinski standardi poznatih molekulskih masa kako bi se stekao dojam o veličini proteina ljubičastih bakterija u kilodaltonima (kDa). Za analizu nisu korišteni svi uzgoji, već samo oni sa sljedećim koncentracijama NaCl: 0 g/l (kontrola), 10 g/l, 50 g/l te 100 g/l.



Slika 3. SDS elektroforeza ukupnih proteina *Rhodobacter azotoformans*: 1. standard proteina poznatih molekulskih masa, 2. *R. azotoformans*+0 g/l NaCl (kontrola), 3. *R. azotoformans*+10 g/l NaCl, 4. *R. azotoformans*+50 g/l NaCl, 5. *R. azotoformans*+100 g/l NaCl.



Slika 4. SDS elektroforeza ukupnih proteina *Rodobacter capsulatus*: 1. standard proteina poznatih molekulskih masa, 2. *R. capsulatus*+0 g/l NaCl (kontrola), 3. *R. capsulatus* +10 g/l NaCl, 4. *R. capsulatus* +50 g/l NaCl, 5. *R. capsulatus* +100 g/l NaCl.

Na obje slike ekstrahiranih uzoraka vidljivi su samo kontrolni uzorci (2. jažica), odnosno uzorci bez dodatka soli. Ostale analizirane koncentracije nisu se mogle vizualno detektirati. Ovakav rezultat elektroforeze upućuje kako određena koncentracija soli ima utjecaj na stanice ljubičastih nesumpornih bakterija. Iako su stanice preživjele i nalaze se u stacionarnom stanju, smanjen je udio proteina jer ih nije bilo moguće detektirati elektroforezom.

Varijacije u funkcionalnim proteinima i mikrobnoj zajednici otkrile su da su α - i γ -proteobakterije bile neproporcionalno aktivne, a da je metabolička aktivnost β -proteobakterija bila inhibirana povećanjem saliniteta (Wang i sur., 2017). Budući da ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju u skupinu β -proteobakterija, ovakvi literaturni podaci mogu objasniti dobivene rezultate preživljavanja ljubičastih bakterija odnosno smanjenu ekspresiju proteina.

Zaključno, Corsino i sur. (2017) otkrili su da povećane koncentracije soli mijenjaju sastav izvanstaničnih polimernih tvari, uzrokujući postupno smanjenje sadržaja proteina.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Vrste *R. azotoformans* i *R. capsulatus* uspješno su preživjele uz dodatak NaCl u rasponu od 10 g/l do 300 g/l.
2. Analizom dobivenih podataka uočava se minimalno umnažanje bakterijskih stanica, ali uspješno održavanje brojnosti čak i kod maksimalne koncentracije od 300 g/l NaCl.
3. Analiza ukupnih proteina obje vrste bakterije potvrđuje navedene navode, odnosno odsustvo proteinskih vrpca u uzorcima s dodanim NaCl-om potvrđuje dosadašnje literaturne navode o smanjenju sadržaja proteina uslijed dodatka soli.
4. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio točan mehanizam pomoću kojeg ljubičaste nesumporne bakterije mogu preživljavati ekstremne uvjete.

6. POPIS LITERATURE

Asao M, Pinkart HC, Madigan MT (2011) Diversity of extremophilic purple phototrophic bacteria in Soap Lake, a Central Washington (USA) Soda Lake. *Environ Microbiol* **13**(8), str. 2146-2157. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02449.x>

Asif A, Mohsin H, Rehman Y (2021) Recent Advancement in Microbial Biotechnology, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 309-337.

Chen D, Han Y, Gu Z (2006) Application of statistical methodology of the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc Biochem* **41**, str. 1773-1778. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.023>

Corsino SF, Capodici M, Torregrossa M, Viviani G (2017) Physical properties and extracellular polymeric substances pattern of aerobic granular sludge treating hypersaline wastewater. *Bioresource technol* **229**, str. 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.024>

Dahl, C, Friedrich CG (2008) Microbial sulfur metabolism, Springer, Berlin, str. 101-113.

Frigaard NU, Dahl C (2008) Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv Microb Physiol* **54**, str. 103-200. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00002-7)

Gabrielsen M, Gardiner AT, Cogdell RJ (2009) The purple phototrophic bacteria, Springer Netherlands, Dordrecht, str. 135-153.

Gaffney EM, Grattieri M, Beaver K, Pham J, McCartney C, Minteer SD (2020) Unveiling salinity effects on photo-bioelectrocatalysis through combination of bioinformatics and electrochemistry, *Electrochim Acta* 2020, **337**, 135731. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135731>

Ghosh S, Dairkee UK, Chowdhury R, Bhattacharya P (2017) Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using purple non-sulfur bacteria (PNSB)—A review. *Energ Convers Manage* **141**, str. 299-314. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.001>

Grattieri M, Beaver K, Gaffney EM, Minteer SD (2019) Tuning purple bacteria salt-tolerance for photobioelectrochemical systems in saline environments. *Faraday Discuss* **215**, 15. <https://doi.org/10.1039/C8FD00160J>

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>

Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y (2009) An overview of hydrogen production technologies. *Cata today* **139**(4), str. 244-260. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.08.039>

Idi A, Md Nor M H, Abdul Wahab MF, Ibrahim Z (2015) Photosynthetic bacteria: an eco-friendly and cheap tool for bioremediation. *Rev Environ Sci Bio* **14**, str. 271-285. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-014-9355-1>

Imhoff JF, Hiraishi A, Süling J (2005) Anoxygenic phototrophic purple bacteria. U: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (ured.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, Boston, MA, str. 119-132.

Kar Soon T, 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 Biotechn* **24(8)**, str. 1034-1043. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1308.08072>

Kis M, Sipka G, Asztalos E, Rázga Z, Maróti P (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses. *J Photoch Photobio B* **151**, str. 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.017>

Lin Z, Cui X, Zhao C, Yang S, Imhoff JF (2014) Pigments accumulation via light and oxygen in *Rhodobacter capsulatus* strain XJ-1 isolated from saline soil. *J Basic Microb* **54(8)**, str. 828-834. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200565>

Liu S, Daigger GT, 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 technol* **294**, 122172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122172>

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 Microb Biot* **37(9)**, 161. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03133-z>

Lu H, Zhang G, Wan T, Lu Y (2011) Influences of light and oxygen conditions on photosynthetic bacteria macromolecule degradation: different metabolic pathways. *Bioresource Technol* **102**, str. 9503–9508. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.114>

Madigan MT, Jung DO (2009) An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats. U: Neil Hunter C, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (ured.) *The Purple phototrophic bacteria*, Springer, The Netherlands, str. 1-15.

McKinlay JB, Harwood CS (2010) Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Curr Opin Biotech* **21(3)**, str. 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.012>

Merugu R, Prashanthi Y, Sarojini T, Badgu N (2014) Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *Int J Res Environ Sci Technol* **4(1)**, str. 16-19.

Montiel-Corona V, Buitrón G (2021) Polyhydroxyalkanoates from organic waste streams using purple non-sulfur bacteria. *Bioresource Technol* **323**, 124610. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124610>

Novak M, Pavlečić M, Harutyunyan B, Goginyan V, Horvat P, Šantek B (2017b) Characteristic and selection of culture of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr* **12 (3-4)**, str. 113 - 119. <https://hrcak.srce.hr/197800>

Novak M, Trontel A, Marđetko N, Matoković V, Sarić M, Šantek B (2017a) Fotoheterotrofni

uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr* **15 (3-4)**, str. 115-123. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.15.3-4.5>

Nunkaew T, Kantachote D, Nitoda T, Kanzaki H (2015) Selection of salt tolerant purple nonsulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation. *Appl Soil Ecol* **86**, str. 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.005>

Oren A (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Aquat Biosyst* **4**, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>

Sali S, Mackey HR (2021) The application of purple non-sulfur bacteria for microbial mixed culture polyhydroxyalkanoates production. *Rev Environ Sci Bio*, str. 1-25. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09597-7>

Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T, Tanaka T(2002) Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biot*, **58**, str. 23-29. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0858-7>

Sathya AB, Sivasubramanian V, Santhiagu A, Sebastian C, Sivashankar R (2018) Production of polyhydroxyalkanoates from renewable sources using bacteria. *J Polym Environ* **26**, str. 3995-4012. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1259-7>

Takaichi S (2009) Distribution and biosynthesis of carotenoids. U: Neil Hunter C, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (ured.) *The purple phototrophic bacteria*, Springer, The Netherlands, str. 97-117.

Talaiekhazani A, Rezanian S (2017) Application of photosynthetic bacteria for removal of heavy metals, macro-pollutants and dye from wastewater: A review. *J Water Process Eng* **19**, str. 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.09.004>

Wada OZ, Vincent AS, Mackey HR (2022) Single-cell protein production from purple non-sulphur bacteria-based wastewater treatment. *Rev Environ Sci Bio* **21(4)**, str. 931-956. <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09635-y>

Wang X, Yang T, Lin B, Tang Y (2017) Effects of salinity on the performance, microbial community, and functional proteins in an aerobic granular sludge system. *Chemosphere* **184**, str. 1241-1249. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.047>

Willows RD, Kriegel AM (2009) Biosynthesis of bacteriochlorophylls in purple bacteria. U: Neil Hunter C, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (ured.) *The purple phototrophic bacteria*, Springer, The Netherlands, str. 57-79.

Zhou Q, Zhang P, Zhang G (2014) Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: effects of light intensity. *Bioresour technol* **171**, str. 330-335.

Izjava o izvornosti

Ja Ana Vadoc 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.

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink that reads "Vadoc Ana".

Vlastoručni potpis