

Fotoszintetikus baktériumok szerveződési és működési válaszai a  
környezeti kihívásokra

Ph.D értekezés

Kis Mariann

Témavezető: Dr. Maróti Péter

Fizika Doktori Iskola

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet  
SZTE TTIK

2016

Szeged

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítések .....	4
1. Bevezetés .....	5
1.1 Fotoszintetikus prokarióták .....	5
1.2 Bíborbaktériumok .....	5
1.3 A fotoszintetikus apparátus felépítése.....	6
1.4 A fotoszintetikus energiaátalakítás .....	8
1.5 A fotoszintetikus baktériumok életciklusa .....	10
1.6 A bakteriális biofilm .....	13
1.7 Baktériumok mozgása.....	14
1.8 Nehézfémek és bioremediáció .....	16
2. Célkitűzések.....	21
3. Anyagok és módszerek .....	22
3.1 Sejt tenyészetek.....	22
3.2 Vegyi anyagok .....	23
3.3 A sejtek molekuláris komponenseinek kivonása és meghatározása .....	24
3.4 Állandósult (steady-state) abszorpció- és fluoreszcencia spektrofotometria.....	25
3.5 Fényindukált abszorpcióváltozás .....	25
3.6 Fluoreszcencia indukció és relaxáció.....	26
3.7 Hígany(II) meghatározása dithizonnal.....	26
3.8 Képkalkotó eljárások.....	27
3.9 A diffúziós állandó meghatározása .....	28
3.10 Viskozitás mérés.....	28
4. Membránátalakulások.....	29
4.1 A sejtek növekedése során történő membránátalakulások.....	29
Steady-state abszorpció és fluoreszcencia spektrumok .....	29
Növekedési görbék .....	30
Abszorpció- és fluoreszcencia kinetikák.....	31
Steady-state szinkronizálás.....	34
4.2 Anaerob ↔ aerob átmenetek .....	37

<i>Rhodobacter. sphaeroides</i> 2.4.1 .....	37
<i>Rubrivivax. gelatinosus</i> .....	43
Morfológiai változások.....	43
5. Nehézfémetek .....	46
5.1 Fiziológiai és morfológiai hatásai .....	46
Higany(II) ion.....	46
Króm(VI) ion.....	50
Ólom(II) ion .....	51
5.2 <i>Rubrivivax. gelatinosus</i> sejtek higanyfelvétele .....	52
Kinetika, energetizáció és pH függés .....	52
Sztöchiometria.....	57
6. <i>Rubrivivax. gelatinosus</i> sejtek kollektív süllyedése .....	63
A baktériumok magasság szerinti Boltzmann-eloszlása homogén gravitációs térben .....	64
A baktériumok süllyedését aktív rendszertelen mozgásuk (rángatózásuk) akadályozza meg .....	68
Modell-kísérlet: A baktériumsejtek laterális diffúziós állandójának csökkenése Ficoll 400 polimerben .....	72
Kollektív süllyedés: a biofilm hatása .....	76
7. Összefoglalás .....	82
8. Summary.....	87
Köszönetnyilvánítás.....	92
Irodalomjegyzék .....	93

## Rövidítések

A	abszorpció
AFM	atomierő mikroszkópia
APD	lavina fotodióda
ATP	adenozin trifoszfát
Bkl	bakterioklorofill
BPhe	bakteriofeofitin
Car	karotenoid
Chl	klorofill
CM	citoplazma membrán
cit	citokróm
EPS	extracelluláris polimer
ECS	elektrokróm eltolódás
FCCP	karbonil cianid-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazon
F	fluoreszcencia
F <sub>0</sub>	fluoreszcencia kezdeti szintje
F <sub>max</sub>	fluoreszcencia maximális szintje
F <sub>v</sub>	fluoreszcencia változó része
ICM	intracitoplazma membrán
LH	bíborbaktériumok fénybegyűjtő komplexe
N-Em	N-etilmaleimid
OM	külső membrán
P	bakterioklorofill dimer
PSU	fotoszintetikus egység
PS I	egyes fotokémiai rendszer
PS II	kettes fotokémiai rendszer
RC	reakciócentrum-fehérje
Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub>	elsődleges és másodlagos kinon akceptor
<i>Rba.</i>	Rhodobacter
RC	reakciócentrum
<i>Rsp.</i>	Rhodospirillum
<i>Rvx.</i>	Rubrivivax
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
UQ	ubikinon

# 1. Bevezetés

## 1.1 Fotoszintetikus prokarióták

A baktériumok népes családjából csak viszonylag kevés képes fotoszintetizálni. Ezek öt nagy csoportba sorolhatók: Chloroflexus szubdivízió, zöld kénbaktériumok, cianobaktériumok,  $\alpha$  és  $\beta$ -proteobaktériumok és a heliobaktériumok (Hugenholz és mtsai 1998). A proteobaktériumok közé tartoznak a bíbor nem-kénbaktériumok, amelyekről bővebben szó lesz.

## 1.2 Bíborbaktériumok

A bíborbaktériumok két nagy csoportja közül a bíbor nem-kénbaktériumokról lesz szó részletesen. Széles körben elterjedtek, előfordulnak természetes vizekben, szennyvizekben, üledékben, mocsarakban és nedves talajban is. Általában a mérsékelt hőmérsékletű élőhelyeket kedvelik. Alapvetően fotoheterotróf életmódot folytatnak, vagyis szerves anyagokat használnak elektrondonorként és szénforrásként. Ezen kívül még számos anyagcsereút fenntartására képesek (fotoautotróf, aerob és anaerob légzés). Csoportosításuk morfológiai, filogenetikai, és fiziológiai tulajdonságok alapján történik. Ismert képviselői és a mi laboratóriumunkban is használt törzsek:  $\alpha$ -proteobacteria: *Rhodospirillum rubrum* (spirillum alak, poláris csilló), *Rhodobacter sphaeroides* (ovális majd pálcika alak), *Rhodopseudomonas viridis* (pálcika alak, poláris csilló).  $\beta$ -proteobacteria: *Rubrivivax gelatinosus* (két féle alak, I. típus: spirillum alak, poláros csilló, mozgékony és kis mennyiségű polimer termelés, II. típus: egyenes pálca alak, nagy mennyiségű exopolimer termelés és hosszabb generációs idő).

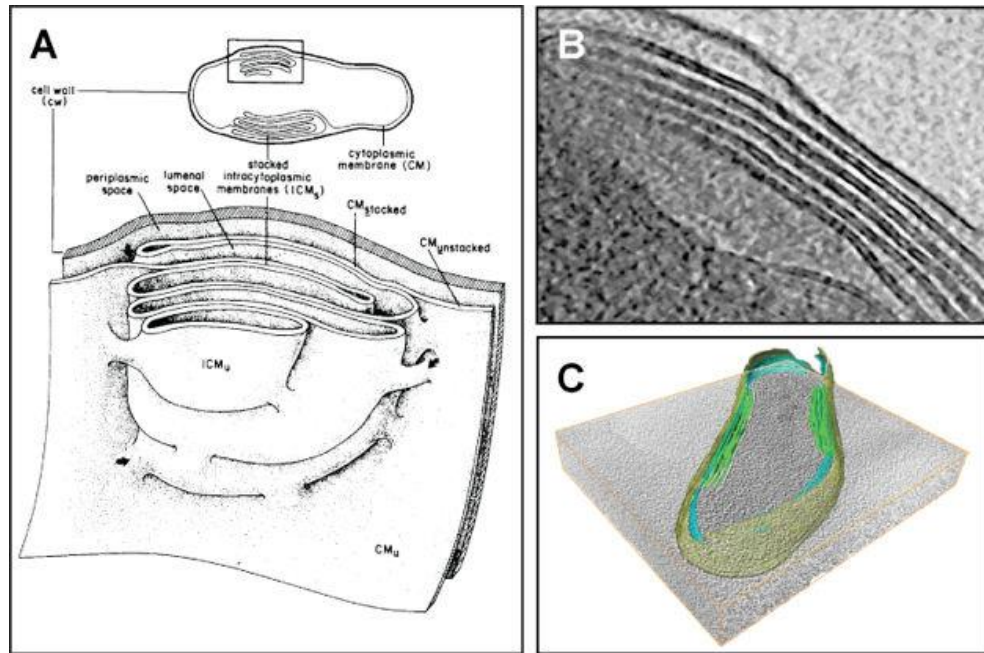


**1.2.1 ábra.** Transzmissziós elektronmikroszkópos hosszanti metszetű felvétel *Rhodospirillum rubrum*-ról (nagyítás 34.000x). Megfigyelhetőek a sejt belsejében lévő lefűződött membránvezikulák (kromatofórák).

Ezek a baktériumok kiváló modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozására, valamint sejtbiológiai, fiziológiai és bioenergetikai vizsgálatokhoz egyaránt.

### 1.3 A fotoszintetikus apparátus felépítése

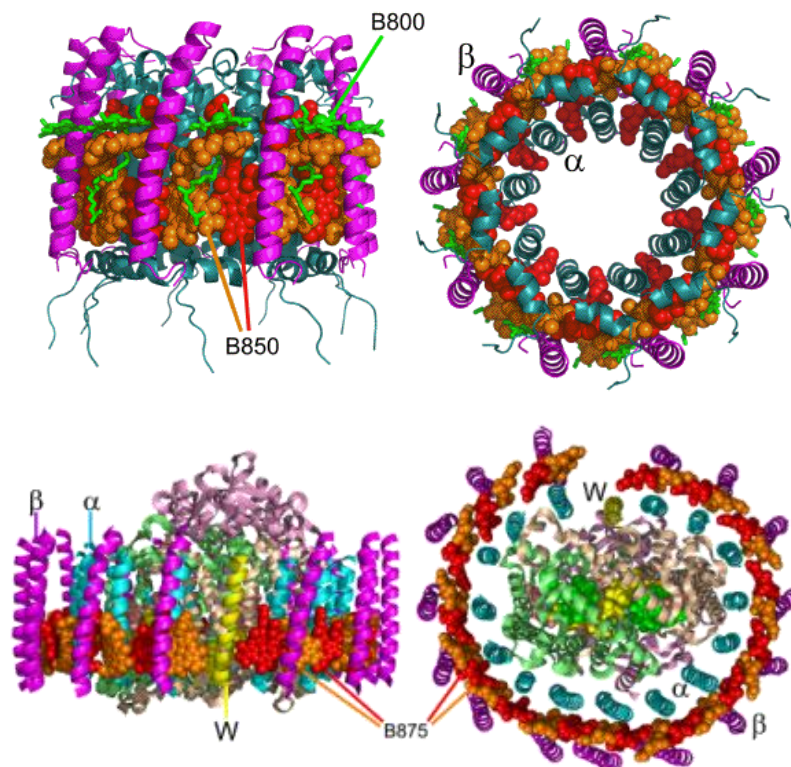
A bíorbaktériumok három membránrendszert tartalmaznak: egy külső membránt (OM), citoplazma membránt (CM) és az intracitoplazma membránt (ICM). Az ICM tartalmazza a fotoszintetikus apparátust. Az ICM mennyisége és összetétele erősen függ a környezeti tényezőktől, mint a fényintenzitás és az oxigén mennyiség (részletesebben lásd később) (Woronowicz és mtsai 2013, Niederman 2013).



**1.3.1. ábra.** (A) *Rba. palustris* ICM sematikus ábrázolása (Varga és Staehelin, 1983). (B) *Rba. palustris* ICM rétegfelvétel (C) *Rba. palustris* ICM rétegfelvétel alapján készült felületi modell. Külső membrán (sárga), CM (kék), ICM (zöld) (B és C, Bill Tivol és Zhuo Li, Caltech).

A fotoszintetikus organizmusok nélkülözhetetlen elemei a pigmentek. Nélkülük nem megy végbe a fény abszorpciója, ezáltal az energia sem tud raktározódni. A bíorbaktériumokban bakterioklorofill *a* (Bkl *a*), (ritkán bakterioklorofill *b*) és karotenoidok vannak. Ezeknek a pigmenteknek köszönhetik színüket, a sejtjeik leggyakrabban bíbor, vörös vagy barna színűek. A klorofill alapú fotoszintetikus organizmusokban fény begyűjtésére alkalmas antenna rendszerek alakulnak ki. A bíorbaktériumok antennarendszere alaposan tanulmányozott. A legtöbb bíorbaktériumban két különböző antenna található: a belső antenna komplex (light harvesting 1 (LH1)) és a perifériális antenna komplex (lightharvesting 2 (LH2)) (Cogdell és mtsai 1999, Jungas és mtsai 1999). Az LH1 antenna és a Puf-X fehérje közvetlenül veszi körül a feofitin-kinon típusú reakció centrumot (RC) (Jamieson és

mtsai 2002; Roszak és mtsai 2003). A RC-LH1-Puf-X komplex dimerként fordul elő (Qian és mtsai. 2008). A perifériális LH2 antennák monomerekként vannak jelen, számuk függ a fényintenzitástól, minél több a fény, annál kevesebb LH2 antenna termelődik (Aagaard és Siström 1972). Az antennák alapvető építőegysége az  $\alpha/\beta$  heterodimér, ami két helikális transzmembrán polipeptid. Mindkét hélix egy-egy Bkl  $a$ -t köt egy konzervált hisztidin pozícióban (Olsen és mtsai. 1997, 2008). A LH2 antennánál a  $\beta$  polipeptid egy második Bkl  $a$ -t is köt (Waltz és mtsai. 1998). A heterodimerek síkbéli gyűrűvé aggregálódnak. Az LH1 antenna 28  $\alpha/\beta$  heterodimérből álló nyitott gyűrű, amihez egy Puf-X fehérje kapcsolódik, és így vesznek körbe egy-egy RC-ot és alkotnak dimér struktúrát. A LH2 antenna esetében 9  $\alpha/\beta$  heterodimér alkot zárt gyűrűt. A kötött bakterioklorofilok az abszorpciós maximumuk szerint kaptak nevet. (LH1: B875, LH2: B850, B800).

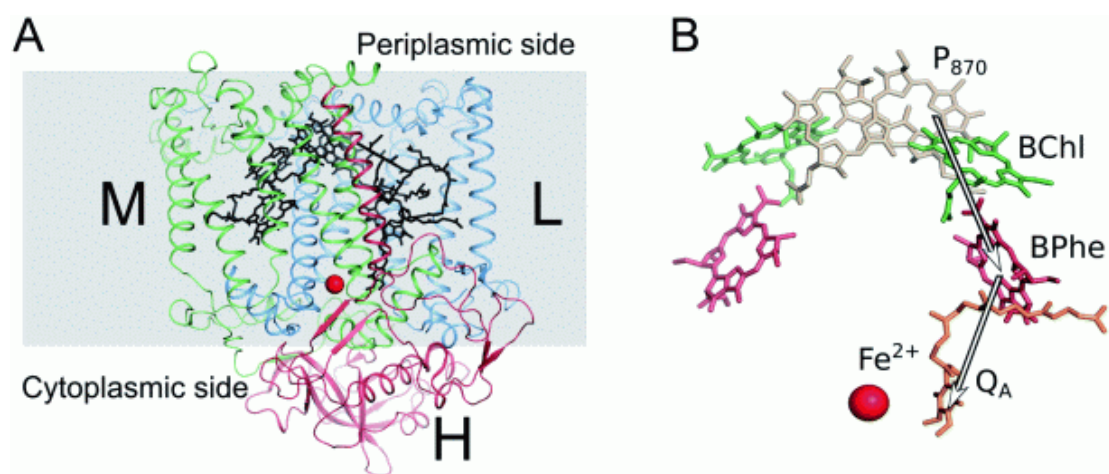


**1.3.2. ábra.** Felső kép: LH2 pigment-protein komplex (*Rhodospseudomonas acidophila*) Protein Data Bank (PDB) file 1NKZ (Papiz és mtsai., 2003). Alsó kép: The RC-LH1 pigment-protein komplex *Rps. palustris*-ból.(Protein Data Bank (PDB) file 1PYH (Roszak et al., 2003)).

### *A bakteriális RC szerkezete*

Az integrális membránfehérjék közül elsőként a múlt század nyolcvanas éveiben a RC fehérjét sikerült kikristályosítani *Rps. viridis*-ből. A RC három alegységből áll 1:1:1

sztochiometriai aránnyal, a teljes molekulatömege 100 kD nagyságrendbe esik. A három polipeptid alegységet L, M és H-val jelölik (tömeg szerinti felosztás alapján). Az L és az M alegységeknek és a hozzájuk kapcsolódó kofaktoroknak 180 fokos forgási szimmetriájuk van, ezen kívül nagyfokú homológiát is mutatnak. A H alegység laza és globuláris szerkezetű. Az aminosavakon (alegységeken) kívül még kofaktorokat, négy Bkl-t, két bakteriofeofitint (BPhe), két kinont (Q), és egy nem hem-típusú vasatomot foglal magában. Ezek az LM polipeptid komplex hidrofób régiójában helyezkednek el egy-egy (A-val ill. B-vel jelölt) ágat alkotva. Az elektrontranszfer fiziológias körülmények közt csak az A-ág mentén megy végbe.



1.3.3 ábra. RC polipeptid alegységei (A), és az elektrontranszferben résztvevő, A-ág menti kofaktorok (B) (Lundholm és mtsai. 2014)

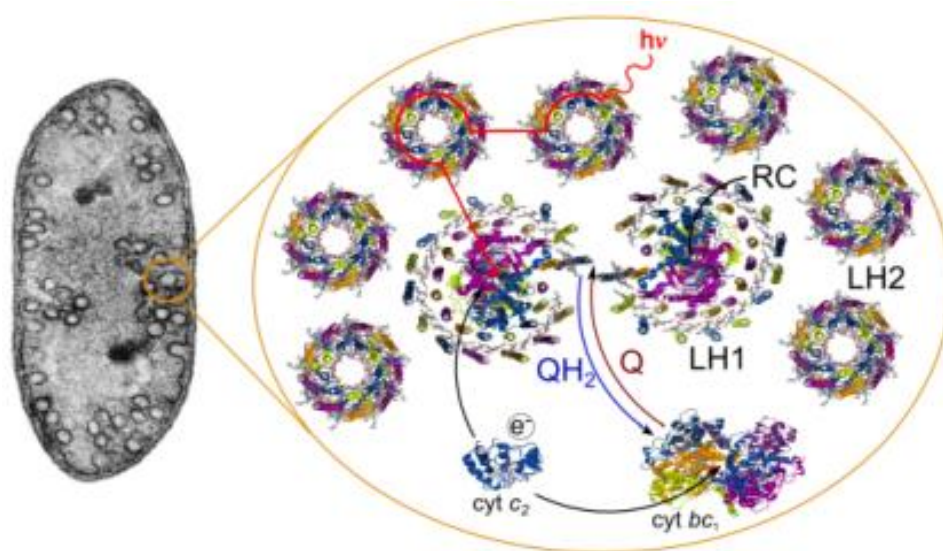
## 1.4 Fotoszintetikus energiaátalakítás

Az élőlények közül a fotoszintetizáló organizmusok képesek a fényenergiát elektrokémiai energiává alakítani. Az elnyelt foton energiája raktározódik, majd szükség esetén a különböző életfolyamatok, mint a növekedés, és az osztódás során felhasználódik (Wraight 2006). A fotoszintézis két fő folyamatra, a fényreakcióra és a sötétreakcióra osztható fel. Bakteriális fotoszintézis primér folyamatainál csak fényreakcióról beszélhetünk. Ide sorolhatók a fotofizikai antennafolyamatok (fényabszorpció, gerjesztési energia vándorlása), a fotokémia (elsődleges töltésszétválasztás), az elektron- és protontranszport (elektrokémiai potenciál alakul ki a membrán két oldalán) és az ATP szintézis.

A fény abszorpciója az antennarendszerekben magas hatásfokkal megy végbe. Az elnyelt gerjesztési energia átvándorol az antennarendszeren és a RC-nak adódik át. Az



elsődleges fotokémiai reakció a RC-ban töltésszétválasztást hoz létre. A töltésszétválasztás hatásfoka baktériumoknál 100%-hoz nagyon közeli érték (98%  $\pm$ 4%). Az elektronok a különböző redox centrumokkal rendelkező fehérjék között mozognak, és hoznak létre redoxi változásokat. A baktériumoknál az elektrontranszportlánc ciklikus. Ciklikus transzfernél a töltéspár rekombinálódik és protongrádiensé alakul, amelyben két membránfehérje a RC és a citokróm  $bc_1$  komplex (cit  $bc_1$ ), a periplazma vízdékony citokróm  $c_2$ -je (cit  $c_2$ ) és a membrán ubikinon (UQ) készlete vesz részt. A RC-ban a másodlagos kinon teljesen redukálódik, a cit  $c_2$  pedig oxidálódik az ismételt fényerjesztések hatására. A cit  $bc_1$  komplexben egy másik töltésszétválasztás is végbemegy. A  $Q_z$  helyen két kinol oxidálódik, a  $Q_c$  helyen pedig egy kinon redukálódik. A kinonmozgás eredménye a RC által létrehozott hidrokion oxidációja.



**1.4.1. ábra.** A fotoszintetikus apparátus szemléletes ábrázolása. A bal oldalon egy intakt egész sejt látható (*Rba. sphaeroides*), amelyből egy membrán vezikulát kiemeltünk, és kinagyítottunk. Ez a szerkezeti egység tartalmazza a fényabszorpció, gerjesztési energia vándorlása, fotokémia és a ciklikus elektrontranszport fő résztvevőit. (RCSB Protein Data Bank)

A komplexek pontos elhelyezkedése és fiziológiája minden részletében máig sem ismert, sok kérdés megválaszolatlan, és jelenleg is széles körben tanulmányozzák különböző biokémiai, fizikai kémiai és spektroszkópiai módszerekkel (Bahatyrova és mtsai.. 2004; Sener és mtsai. 2007; Sener és Schulten 2009; Maróti és mtsai. 2013). Az egyik fontos kérdés a cit  $bc_1$  komplex és az ATP-szintáz membránbeli elhelyezkedése illetve a résztvevők sztöchiometriája. A funkcionális és spektroszkópiai mérések szerint

közöttük gyenge összeköttetés van. A RC-ok és a cit  $bc_1$  komplexek között a kapcsolatot a mobilis redox szereplők tartják fent. *Rba. sphaeroides* bíbor baktériumban a molekuláris résztvevők sztöchiometriája így alakul: 2 dimer RC, 1 cit  $bc_1$  komplex és 1 cit  $c_2$  (Joliot és mtsai.1989; Vermeaglio és Joliot 2014). A nagy felbontású atomerő mikroszkópiának (AFM) köszönhető az a felfedezés, amely szerint, ahol jelen vannak a RC dimerek és az ATP-szintáz, ott nem található cit  $bc_1$  komplex (Scheuring 2009; Sturgis és Niederman 2009). Ez azt jelenti, hogy sem a cit  $bc_1$  komplex sem az ATP-szintáz nem található a RC dimerek közelében. Az AFM vizsgálatok szerint a komplexek között nincsen konnektivitás, ez viszont azt feltételezi, hogy UQ-ok által létrehozott hosszabb távú funkcionális összeköttetés van a RC-ok és a cit  $bc_1$  komplexek között (Comayras és mtsai. 2005). *Rba. sphaeroides* membránjában a LH és RC-ok rendezettsége magas és a RC elektron átfordulási sebessége elég nagy, az UQ diffúziója a RC és a cit  $bc_1$  komplex között viszont igen lassú (Woronowicz és mtsai. 2012). Mindezekből az következik, hogy a komplexek elhelyezkedése és a köztük lévő összeköttetések még távolról sem tekinthető tisztázottaknak. Az újabb keletű vizsgálatok, amelyek AFM, elektronmikroszkópia és tömegspektrometriai méréseken alapulnak, ellentétben állnak a korábbi eredményekkel, vagyis a cit  $bc_1$  komplex és a RC-LH1-PufX komplexek egymás szomszédságában helyezkednek el, de nem sztöchiometrikus kapcsolatban (Cartron és mtsai. 2014).

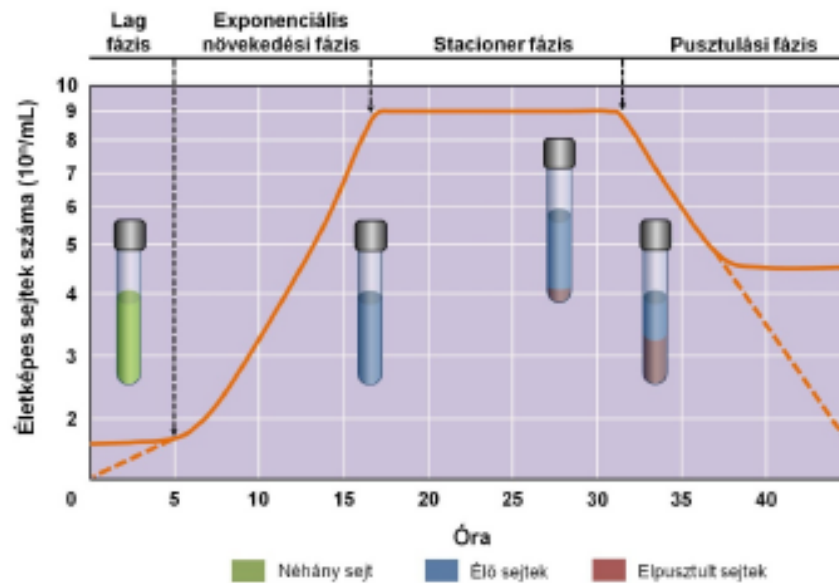
### *Elektrontranszfer a RC-ban*

A bakterioklorofill dimer pillanatszerű gerjesztése ( $P \rightarrow P^*$ ) után létrejön az első redox pár ( $P^+BPhe_A^-$ ). A kialakult töltéspár stabilizálódik, amelynek legfontosabb lépése a  $Q_A$  elsődleges kinon redukciója ( $P^+BPheQ_A^-$ ). Ennél a redox-lépésnél következik be a legnagyobb redoxpotenciál csökkenés, amellyel a töltésszétválasztás nagymértékben irreverzibilissé válik. A töltéspár a  $Q_B$  redukciójával tovább stabilizálódik ( $P^+BPheQ_AQ_B^-$ ). A stabilizálódott végső töltéspár energiája nem alakul át közvetlenül kémiai energiává, hanem a membránon keresztüli protongrádiens kialakulására fordítódik, amely majd az ATP szintézise révén hasznosul.

## **1.5 A fotoszintetikus baktériumok életciklusa**

A baktériumok a természetes élőhelyükön (exponenciális függvénnyel jellemzett módon) korlátlanul növekedhetnek. A sejtek az osztódási idejüknek megfelelően, ami

például a *Rba. sphaeroides* esetében körülbelül 3 óra, folyamatosan megkettőződnek. Zárt tenyésztési körülmények között azonban ez nem így történik, mert a tápanyagok fogyása és a melléktermékek felhalmozódása miatt a szaporodás egy idő után leáll. Ennek megfelelően a sejtek életciklusa az alábbi szakaszokra bontható (1.5.1. ábra): késedelmi (lag), exponenciális, állandósult (stacioner) és pusztulási fázisokra (De Klerk és mtsai. 1969).



1.5.1. ábra Baktériumtenyésztés életciklusa zárt folyadékkultúrában.(Márialigeti és mtsai. 2013).

Ha egy baktériumtenyészetet friss tenyésztő oldatba (médiumba) oltunk át, akkor a szaporodásuk késedelmi fázissal indul. A gyors osztódás késleltetődik, mert a sejteknek előzetesen adaptálódniuk kell az új környezeti tényezőkhöz (fényintenzitás, oxigén atmoszféra, nehézfémek jelenléte, stb). Az eltérő inkubációs körülményekhez való adaptáció (többek között) magában foglalja az új metabolikus útvonalakhoz szükséges enzimek előállítását. A lag fázis hossza igen változó lehet. *Rba. sphaeroides*-nél Hg<sup>2+</sup> ionok jelenléte esetén elérheti a 20 órát is (Asztalos és mtsai. 2010). Mivel a fotoszintetikus baktériumok anaerobok, ezért az oxigén jelenléte és mértéke kritikus. 3% feletti oxigén koncentráció esetén nem csupán a fotoszintézis funkciója áll le, hanem az ICM is bomlásnak indul (Kiley és Kaplan 1988, Tucker és mtsai. 2010). Ezek azonban reverzibilis folyamatok lehetnek, mert ha visszaáll az anaerob állapot, a CM betűrődései újra megjelennek, és elkezdődik a LH-ok és a RC komplexek összeszerelődése. Ezt a bonyolult folyamatot egy kétkomponensű oxigénérzékelő

szignál-transzdukciós rendszer irányítja (Takemoto és Lascelles 1973; Masuda és Bauer 2002; Fedotova és Zeilstra-Ryalls 2014). A különböző növekedési fázisokban a fotoszintetikus membrán felépítése és működése (pl „érettsége”) nagyon eltérő, és megismerésük sok értékes információval szolgálhat (lásd részletesen később). A lag fázist az exponenciális fázis követi, amelyben az osztódási időnek megfelelően a szaporodásnak nincsen korlátja. A sejtek anyagcseréje ekkor a legaktívabb. Zárt rendszerben azonban ez a határtalan növekedés véget ér, és a stacioner fázis következik. A sejtek anyagcseréje továbbra is aktív marad, azonban eltérhet az exponenciális fázisban tapasztaltaktól, például új anyagcsere termékek keletkezhetnek. Ebben a fázisban a sejtek száma állandó, mert vagy új sejtek már nem keletkeznek, vagy mert ugyanannyi sejt keletkezik, mint amennyi elpusztul. Legvégül a tenyészet pusztulási fázisba ér, amelyben intenzíven lecsökken az élő sejtek száma. Ez azonban nem azt jelenti, hogy a teljes populáció elpusztul (Márialigeti és Felföldi 2013).

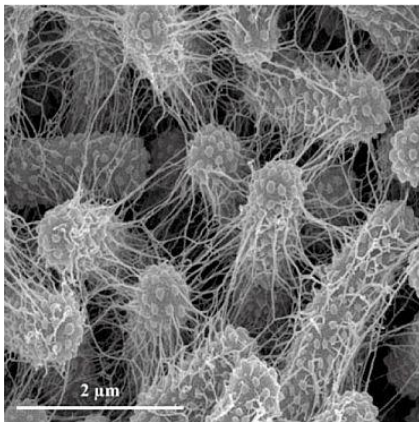
A folyamatos (aszinkron) növekedés mellett a sejt kultúra képes lehet szinkronnövekedésre is. A szinkron növekedésnél a tenyészetben a sejtek a sejt ciklus bármely fázisában lehetnek. A sejtek szinkronizációjával el lehet érni, hogy a tenyészetben lévő sejtek nagy része a sejt ciklus ugyanazon fázisában legyen.

A szinkrontenyészet előállításával, mivel a sejtek ugyanabban a fázisban vannak, ezért a sejtek magasan szervezett struktúrái, mint a fotoszintetikus membránok és azok érése (fejlődése), a sejt ciklust szabályozó mechanizmusok, vagy a makromolekulák bioszintézise könnyebben és alaposabban tanulmányozhatók. A szinkronizációs technikákat két fő csoportra lehet osztani: fizikai szétválasztásra és kémiai blokkolásra. A fizikai szétválasztás a sejtek karakterisztikus tulajdonságain alapszik: sejt méret, tenyészet sűrűsége, fény-sötét átmenet, antitestes jelölés, fluoreszcens jelölés (FACS), stb. A sejtek szétválasztása kémiai blokkolással, mint a növekedési faktornak a médiumból való elvonásával (széruméheztetéssel), vagy a DNS szintézis gátlásával is történhet. Az egyik legegyszerűbb szinkronizálási technika a korai stacioner fázisú tenyészet kihígítása friss médiumba (Cutler és Evans 1966, Leuking és mtsai. 1978). Fotoszintetikus baktériumoknál a fény-sötét periódusok váltakoztatásával lehet elérni az egyidejű osztódást, mert a fény hatására indulnak be a metabolikus folyamatok, ami a sejt osztódást is befolyásolja (Leuking és mtsai. 1981). *Escherichia coli* K12 törzs esetén indukálni lehet a tenyészet szinkronizálódását csupán az inkubációs hőmérséklet lecsökkentésével 12°C-ra (Heliosa és mtsai. 1974). Ha a növekedési faktorokat elvonjuk a tápoldatból, akkor a sejtek a sejt osztódás  $G_0$  fázisába kerülnek, amikor pedig

visszaadagoljuk, egyszerre indul be az egész tenyészetnél a G<sub>1</sub> fázis. Kolhicinnel az osztódási orsó reverzibilisen gátolható, így nincs replikáció. Az eltávolítása után pedig a tenyészet szinkronizáltan osztódik tovább (Szeberényi 2014).

## 1.6 A bakteriális biofilm

A mikroorganizmusok közül számos faj alkothat biofilmet. A biofilm a vizes közegben élő mikrobák aktív sejthalmaza, amelyet az általuk termelt szerves extracelluláris mátrix (extracelluláris polimer, EPS) tart egyben, és segítségével valamilyen szilárd felülethez tapadhat ki (Costerton és mtsai. 1987).



**1.6.1. ábra** A *Klebsiella sp.* biofilmről készült letapogató elektronmikroszkópos felvétel. Jól látható, hogy az exopolimer és az általuk összekötött sejtek sűrű háromdimenziós mátrixot alkotnak (Genetics of Biofilms Laboratory. 2014)

A biofilmek előfordulnak természetes vizekben, élő szervezetben (fogakon) és az iparban is (csövek felületén). Leginkább a patogén mikrobáknál (pl. *Pseudomonas aeruginosa*) elterjedt ez az életmód, de algáknál, cianobaktériumoknál és zöld- és bíborbaktériumoknál (mint például a mi laboratóriumunkban használt *Rvx gelatinosus* esetén) is megtalálható fototróf biofilm (De Philippis és mtsai. 2005; Roeselers és mtsai. 2008). A baktériumok kétféle állapotban vannak jelen: az egyik a planktonikus, vagyis lebegő életmód, a másik pedig a biofilmes, felülethez kitapadt vagy leülepedett állapot (Steonou és mtsai. 2013). A fototróf baktériumok alkotta biofilmek a fénynek kitett felületeken tapadnak ki. Általában stacioner fázisú tenyészet alkot kitapadt biofilmet, amelyben a sejtek morfológiája és anyagcseréje is megváltozik. A *Rvx gelatinosus* sejtek alakja kezdetben spirillum, majd egyenes pálca formát vesz fel, amikor nagy mennyiségben termeli a polimert. A kitapadás vagy lesüllyedés jobb tápanyagellátást biztosít a tenyészetnek és védelmet is nyújt a környezeti hatásokkal szemben (Marshall, 1992). Egy ilyen kialakult bakteriális közösség túlélési potenciálja sokkal magasabb, mint a planktonikusan élő önálló egyedeké. Így a planktonikus lét valójában kedvezőtlenebb életformának tekinthető. Nagyobb eséllyel alakul ki biofilm egy olyan zárt folyadék kultúrában, ahol a tápanyag limitált, és a sejtszám is már elérte a telítési (plató) szintet. Ilyenkor az összetapadt sejtek képesek lesüllyedni, hogy újabb tápanyagforrásban gazdagabb

közegbe kerüljenek. A biofilm növekedése is ugyanazokat a jellegzetes fázisokat mutatja, mint a sejttenyészet (lag, exponenciális és stacioner szakaszokat). A polimert a sejtek ugyanis folyamatosan termelik, és amikor a növekedés eléri a stacioner fázist, akkor a planktonikus sejtek összeállnak háromdimenziós mátrixszá (Steunou és mtsai. 2013). Az érett mátrix legnagyobb részben vizet, baktériumokat, extracelluláris polimert, sejtörmelékét (fehérjéket, DNS-t és szénhidrátokat), valamint kötött és szabad ionokat tartalmaz (Sutherland, 2001). A sejtek által termelt extracelluláris polimer elsődleges funkciója a sejtek összetartása. A tenyészet életciklusa során keletkező új sejtek már a mátrixba kötve osztódnak tovább. Mindezekon kívül a polimerek megkötik a tápanyagokat, illetve a sejtek számára veszélyes anyagokat (antibiotikumokat, nehézfémeket) is. Köszönhetően az általa termelt biofilmnek, a *Rvx gelatinosus* is magas rezisztenciát mutat a nehézfémekkel szemben (Kis és mtsai 2015). Ennek közelfekvő oka az, hogy a mátrix belsejébe, ahol a lelassult anyagcseréjű „éhező” sejtek vannak, csak lassú diffúzióval juthat el bármilyen tápanyag vagy nehézfém. A molekuláris genetika, a genomanalízis és a mikroszkópia rohamos fejlődése miatt sok új ismeret áll a rendelkezésünkre, hogy a biofilmek strukturális és molekuláris folyamat megértsük. A biofilm a fejlődése során különböző komponenseket és molekulákat termel (csillókat, pilusokat, DNS-t és exopoliszacharidokat) (Jarell 2009, Ullrich 2009). A biofilmkutatás számos kapcsolódó genetikai szabályozó mechanizmust felfedezett, ide értve a quorum sensinget, a horizontális génátvitelt és a másodlagos hírvivő molekulákat (An és mtsai. 2010). *Rvx. gelatinosus* esetében egy kétkomponensű (*embR* és *embS* génekből álló) szabályozómechanizmus működik, amely a környezetből érkező ingerekre reagál (Gao és Stock 2009; Krell és mtsai. 2010; Wuichet és Zhulin 2010). Fototróf és anaerob baktériumok esetén ezek az ingerek a fényintenzitás és az oxigén/nitrogén koncentráció. Az a szabályozó mechanizmus, ami a planktonikus életmódból biofilmesre való váltást eredményezi, még nem teljesen ismert. A részletek felderítéséhez biofizikai alapú megközelítést fogunk alkalmazni.

## 1.7 A baktériumok mozgása

A baktériumok több különböző mechanizmust felhasználva mozoghatnak. A folyadékban való úszáshoz flagellumokat, a felületeken történő elmozduláshoz csúszó vagy rángatózó mozgást, vertikális irányú elmozduláshoz pedig gázvezikulákat vesznek igénybe (Bardy és Jarell 2003). Akkor beszélünk úszásról, ha egy baktérium

testhosszának minimum 10-szeresét megteszi másodpercenként, leggyorsabb esetben pedig 100-szorosát (Dusenbery 2009). Csúszó mozgásnál a baktériumok (pl: cianobaktériumok) nem használnak sem flagellumokat, sem csillókat, csak a saját erejüket. A csúszómozgás mechanizmusairól csak részleges ismereteink vannak. A baktériumok a rángatózó mozgásnál egy IV. típusú pílust használnak kampóként, amelyet váltakozva kiengednek, és visszahúznak, és ezzel képesek magukat lehorgonyozni (Merz és Sheetz 2000). Vannak olyan baktériumok (*E. coli*), amelyek mozgásában két különböző mechanizmus is megfigyelhető: az egyik egy előre irányuló úszás, a másik pedig egy hánykolódó mozgás. Ezzel az *E. coli* képes mind folyadékokban, mind szilárd felületen mozogni. Hánykolódás esetén egy háromdimenziós véletlenszerű mozgásról van szó (Wu és mtsai 2006). A baktériumokhoz rengeteg repellens vagy attraktáns stimulus érkezik a környezetükből és a szomszédos baktériumoktól is. Az ezekre való reakciók a taxisok (kemotaxis, fototaxis). A fototaxis pozitív, ha az elmozdulás a fényintenzitás növekedés irányába történik, míg negatív a fototaxis, ha ellentétesen mozdul el (Menzel és Randolph 1979). A pozitív fototaxisnak két típusa figyelhető meg prokariótákban. Az egyik a skotofóbia, ami csak mikroszkóp alatt figyelhető meg. Ilyenkor a baktérium megpróbál kiúszni a megvilágított látómezőből. Ha ezután a baktérium sötét helyre kerül, akkor fordított irányú flagella rotációt indít be, hogy visszakerülhessen a megvilágított területre. A másik típus a valódi fototaxis, amelynek során csak a fényintenzitás növekedés irányába halad a baktérium.

A fototróp baktériumok nem csak a tápanyag források megközelítése vagy a mérgeanyagoktól való eltávolodás érdekében, hanem a változó fényintenzitás miatt is kénytelenek az aktív mozgásra. Sok fajnál vertikális irányú mozgás figyelhető meg. Ez flagellumok és/vagy gáz vezikulák segítségével valósulhat meg. A proteobaktériumok között leggyakoribb a flagellummal való úszás és a csúszómozgás (cianobaktériumok). Az alfa proteobaktériumok nagy része motilisnak tekinthető. Csillók és laterális flagellum csak a *Rhodospirillum rubrum* sp.-re jellemző. A nagyobb méretű sejteknek (*Chromatium* sp.) bipoláris flagellum kötegük van, míg a kisméretűek csak egy ostoruk van. Az úszásra képes sejteknél, ha lecsökken a fényintenzitás, akkor vagy beindul a fordított flagella rotáció (*Rsp. rubrum*) vagy lecsökken az úszást megszakító szünetek gyakorisága (*Rba. sphaeroides*), amivel visszairányítják magukat a magasabb fényintenzitású helyre. A skotofóbia azt eredményezi, hogy a sejtek olyan helyeken halmozódnak fel, ahol a fény hullámhossza (színe) megfelel a fotoszintetikus pigmentek

elnyelésének (Armitage és mtsai 1995). A flagellumok kialakulását befolyásolhatja az alacsony fényintenzitás és az alacsony szulfid koncentráció is.

## **1.8 Nehézfémek és bioremediáció**

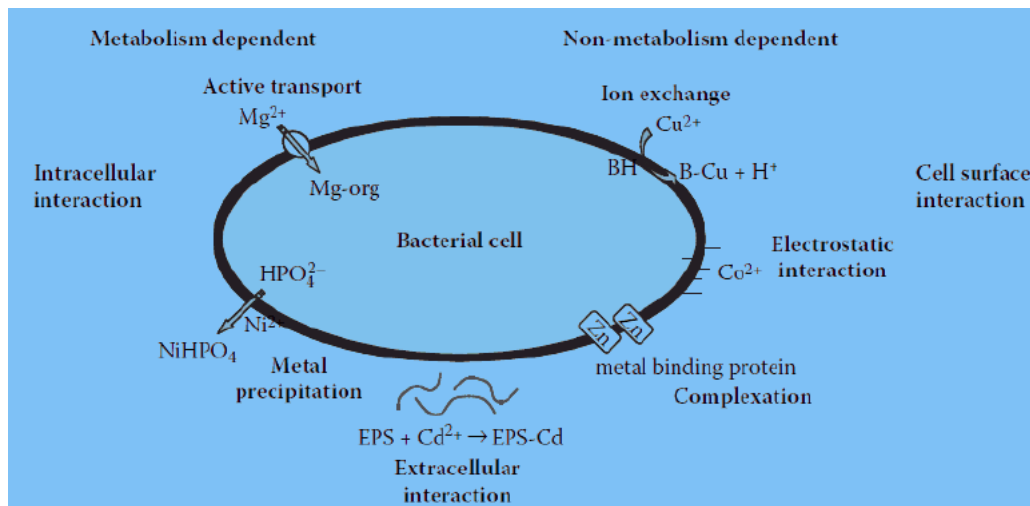
Az élőlényeknek egyes nehézfémekre (vasra, kobaltra vagy cinkre) noha igen kis mennyiségben, de szükségük van. Más nehézfémekre (higanyra, krómra vagy ólomra) az élőlényeknek egyáltalán nincs szükségük, mivel ezeknek nincs ismert élettani funkciójuk. Emiatt felhalmozódásuk súlyos természet- és egészségkárosító hatást válthat ki. Az esszenciális fémionok alacsony koncentrációban központi szerepet játszhatnak mikroorganizmusok életfolyamataiban, mert katalitikus biokémiai folyamatokban vehetnek részt, az ozmotikus nyomás fenntartásában segíthetnek, redox folyamatok fontos alkotóelemei lehetnek (vas, nikkel és réz), enzimek és a DNS stabilizációjához járulhatnak hozzá (magnézium és cink), valamint molekula komplexek részeit képezhetik (magnézium, nikkel és kobalt) (Nies 1992).

Az emberi tevékenységek következtében is feldúsuló potenciális toxikus elemek és nehézfémek meghatározható egészségügyi, biológiai és ökológiai veszélyt jelentenek. Ezért számos tudományterületen előtérbe kerültek a potenciális nehézfémekkel kapcsolatos kutatások. A mi laboratóriumunkban a fotoszintetikus baktériumokat vetettük alá nehézfém kezeléseknél, ugyanis ezek a mikroorganizmusok jól alkalmazkodnak a különböző környezetből érkező stressz faktorokhoz. Mivel egyszerű modellszervezetekről van szó, nehézfémekkel való reakcióik megismerése alkalmassá teheti a fotoszintetikus baktériumokat a környezetük biológiai monitorozására és remediációs eljárásokban való felhasználásra (Borsetti és mtsai. 2009; Gadd, 2000; Giotta és mtsai. 2006; Singh et al. 2009; Glick 2010). Mindezekon kívül képesek a fémeket metabolikus úton felvenni, ami lehetőséget ad az aktív és passzív transzport folyamatok tanulmányozására is.

A nehézfémek nagy része magas koncentrációban toxikus a mikroorganizmusokra is. Valószínű, hogy a nehézfémek a sejtek felületén nem specifikus helyeken kötődnek meg, hanem bioadszorpció segítségével kapcsolódnak a sejtek felületéhez (Ahluwalia és Dinesh 2007; Bakkaloglu és mtsai. 1998, Sloof és mtsai.1995). Ez egy passzív, nem metabolikus és nem specifikus, gyors fémion-felvétel (Bakkaloglu és mtsai. 1998). A sejtek felületén elektronegatív csoportok (karboxil, szulfúr, foszfor, amino és hidroxil) vannak, amelyek prompt és erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki a pozitív



töltésű fémionokkal. Ezek a negatív felületi csoportok nagyrészt peptidoglükánból és lipopoliszaharidokból állnak. Zöld algáknál a száraz tömeg 40% adják (Mehta és Gaur 2015). A sejtfelszíni kötődés után a fémionok transzportfolyamatok segítségével átjutnak a sejtfalon, és a sejt belsejében közvetlen kapcsolatba kerülnek a sejtkomponensekkel.



**1.8.1. ábra** Bakteriális bioszorpció sematikus ábrázolása. Sejtfelszíni kölcsönhatások (elektrosztatika, komplexképződés, csapadék). Intracelluláris kölcsönhatás: metabolizmushoz kötődő (aktív transzport), nem metabolizmus függő (ion-kicszerélődés). Sejten kívüli kölcsönhatás: a fémionok az exopoliszaharidhoz kötődnek (Hassan és mtsai. 2010).

Az aktív fémion-fölvétel lassabb, mint a passzív felületi kötődés, mert a fémionoknak be kell kapcsolódniuk az enzimatis és metabolikus folyamatokba. (Malik, 2004; Munoz and Guieysse, 2006). Ezek nem független események, és valószínű, hogy a fémionok idegen csatornákat és ionpumpákat használnak fel. Versenyre kelnek a transzportmechanizmusok közös használatáért azokkal az ionokkal (különösen a protonokkal), amelyeket a sejtek az életfunkcióik fenntartásához használnak (Gabr 2008; Moore és Kaplan 1994).

Néhány esetben a toxikus fémek felvételének igen nagy a hatékonysága (Asztalos és mtsai. 2012; Puranik és Paknikar 1999). Az esszenciális fémeket kiszorítják a természetes kötőhelyeikről vagy kimozdítják a ligand kapcsolatokból. A toxikus fémek, hasonlóan az esszenciális fémekhez, nagy affinitással kötődnek a tiol-csoportokhoz (Hughes és Poole 1989; Poole és Gadd 1989; Silver 1996). A toxicitás a fehérjékben és a nukleinsavakban konformáció változásokat eredményez, ami kihatással van a nagyobb komplexek működésére (RC, ICM) (Asztalos és mtsai. 2012). Hosszú távú nehézfém kitettség esetén a baktériumokban jól felismerhető rezisztencia alakulhat ki. Számos

nehézfém- felvétel és rezisztencia mechanizmust sikerült már azonosítani (Bruins és Kapil 2000; Nies 1994; Valls és de Lorenzo 2002).

### *Higany(II) ion*

A higany a környezetben elemi állapotban, szervetlen sók formájában vagy szerves módosulatként (metil-higany, etil-higany) fordulhat elő. Mind szárazföldi, mind vízi ökoszisztémákban megtalálható (Ullrich és mtsai. 2001). A Hg(II) ion az egyik legtoxikusabb tényező a természetben. A tengerekben és az édesvizekben élő mikroorganizmusok képesek átalakítani az emberi tevékenységek során a vizekbe kerülő szervetlen higanyvegyületeket metilációval szerves vegyületekké, ezzel létrehozzák az élő szervezetek számára legveszélyesebb metil-higanyt. Leginkább a szulfát-redukáló *Desulfovibrio desulfuricans* képes anaerob körülmények között a Hg(II) metilálására (Compeau és Bartha 1985). Mivel a vizekben alakul ki, és nem rögtön ürül ki az élőlényekből, ezért a baktériumokon és planktonokon keresztül bekerül a táplálékláncba. A tápláléklánc minden lépcsője az élőlényekbe került metil-higany koncentrációját növeli. A maximális szintet a ragadozóknál éri el, ahol a metil-higany koncentrációja akár a vízben mért érték ezerszerese is lehet (Wiener és mtsai. 2003). A higanynak semmiféle biológiailag releváns funkciója nincsen. A sejtbe jutva az organizáció minden szintjén károsodást okoz. Nagy affinitással kötődik a fehérjék szulfhidril-csoportjaihoz, valamint a foszfát és az aktív ADP és ATP csoportokhoz, amiket blokkol, és inaktívál. A higany sötétben és fényben egyaránt képes kifejteni káros hatását a fotoszintetikus apparátusra. Erősen gátolja az elektrontranszportláncot, amelynek a legérzékenyebb célpontja a RC fehérje (Asztalos és mtsai. 2012; Kis és mtsai., 2015). Az akceptor oldalon a gátlás úgy jön létre, hogy az interkinon elektrontranszfer roncsolódik, és megemelkedik a lezárt RC-ok száma. Jelenleg elég kevés információ áll rendelkezésre a fotoszintetikus baktériumokban a higany(II) felvétel mechanizmusainak szabályozásáról, ugyanis a sejt belsejében lévő higany koncentrációt igen bonyolult megállapítani. Valószínűsíthető, hogy a higany felvétele nem csupán passzív úton zajlik le, mint ahogy ezt korábban gondolták (Schaefer és mtsai. 2011), hanem az aktív, energiaigényes transzportmechanizmusnak is meghatározó jelentősége lehet. A fő kérdés az, hogy a higany felvételére vannak-e specifikus mechanizmusok vagy az véletlenszerűen történik, azaz a higany az esszenciális fémek felvételére felállított transzport-mechanizmust veszi-e igénybe. A

higany kötés mechanizmusáról már közöltek vizsgálatokat tengeri baktériumoknál (Deng és Wang, 2012) és genetikailag módosított fotoszintetikus baktériumoknál (Deng és Jia, 2011), de ezek egyike sem megy vissza az alapokig, hanem megelégszik a jelenségszintű leírással. Mi megpróbálkozunk fizikai-kémiai és biofizikai szemléletű elemzéssel.

Azok a mikroorganizmusok, amelyek magas rezisztenciát mutatnak a higannyal szemben, a higany(II) ionok nagy (70%) százalékát már a sejt felszínén megkötik a karboxil csoportok segítségével. A rezisztenciát kiváltó legfőbb mechanizmusok közé sorolható a fémiont erősen megkötő polipeptidek felhalmozódása, és a fémionnak a különböző transzportereken keresztüli és membánpotenciál függő kipumpálása. A sejtek alapvetően is tartalmaznak olyan peptideket, amelyek megkötik a fémeket. Ezek a metallothioneinek és a fitokelatinok, amelyek kis molekulatömegű fehérjék, és nagy affinitással kötnek olyan fémionokat, mint a cink, a réz, a kadmium és a higany (Winklemann és Winge, 1994). A szerkezetükre a Cys-X-Cys motívum hétszeri előfordulása jellemző. Az ismétlődő szekvenciáknak a nehézfém ionok megkötésében van szerepe, és ezeket a fehérje-szekvenciákat használják fel a rezisztens organizmusok előállításához is (Bae és mtsai. 2001).

#### *Króm(VI) ion*

A Cr(III) ion az élő szervezetek számára esszenciális nyomelem. Szerepe van a hormonrendszer működésében, a metabolizmusban, a szénhidrátok és a zsírok raktározásában (Anderson 1997). A Cr(III) biológiailag aktív formája egy oligopeptid (Low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr)), ami az inzulin jelátviteli folyamatokban játszik szerepet (Vincent 2015). Ezzel ellentétben a Cr(VI) belélegezve erősen oxidáló hatású, nagyon mérgező és mutagén (Wise és Wise 2012). Oldata teratogén és karcinogén az élőlények számára (Bagchi 2002; Burg és Liu 1993; Barceloux 1999).

#### *Ólom(II) ion*

Az ólom már nagyon kis koncentrációban is erősen toxikus az élőlények számára. Könnyen kötődik a szulfhidril csoportokhoz (Pearson és Schonfeld 2003). Irreverzibilis károsodást okoz a DNS-ben, a fehérjékben és a lipidekben. Az enzimekből kiszorítja az esszenciális fémeket (cinket, vasat, kalciumot), és beül a helyükre (Dart és mtsai. 2004). Mivel az ólom sói nagyon könnyen és gyorsan abszorbeálódnak, ezért már kis

mennyiségben is akut és krónikus mérgezést okoznak. A nagy mennyiségű kalcium és vas védelmet nyújt az ólommérgezéssel szemben, viszont ezek hiánya még inkább fogékonyá teszi a szervezetet az ólommérzésre (Venogupal 2013). Az ólom ipari mértékű kitermelése, felhasználása jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy felhalmozódhatott a talajban és vizekben, ami potenciális veszélyt jelent az élő szervezetek számára. Szerencsére a mikroorganizmusok között találhatóak olyanok, amelyek nagy hatékonysággal képesek az ólmot felvenni (*Aspergillus versicolor*) és redukálni (*Desulfovibrio sp.* és *Desulfotomaculum sp.*) (Park és mtsai. 2011).

## 2. Célkitűzések

A munkám célja fő tendenciájában az volt, hogy a laboratóriumunkban használt abszorpció és fluoreszcencia mérési módszereket alkalmazzam fotoszintetikus baktériumok vizsgálatára, hogy kideríthessem a fotoszintetikus apparátusban a különböző környezeti tényezők hatására bekövetkező fiziológiai folyamatokat.

Az általános cél eléréséhez az alábbi területek kutatását és a következő kérdések feltevését és megválaszolását tartottam elsődlegesnek:

- A fotoszintetikus membrán funkcionálisan és strukturálisan is eltérően viselkedik a növekedés stacioner és korai exponenciális fázisaiban. Milyen változásokat figyelhetünk meg a fotoszintetikus egységek között kialakuló (térbeli és energetikai) kapcsolatban?
- Szinkrontenyészetek az aszinkronokhoz képest további információt adnak a sejtek magasan szervezett struktúráiról. Mely fotoszintetikus folyamatok függenek és melyek nem a sejteiklustól?
- Aerob-anaerob átmenet hatására drasztikus változások történnek a membránban. Milyen funkcionális és strukturális változások történnek? Lehet-e ebből, és ha igen, hogyan a fotoszintetikus membrán kialakítására következtetni? Hogyan megy végbe a membránnak alkotóelemeiből való összeszerelődése?
- A különböző fotoszintetikus baktérium törzseknek (*Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum*, *Rvx. gelatinosus*) eltérő az érzékenységük a nehézfémekkel (higannyal, ólommal, krómmal) szemben. Kialakulhat-e, és ha igen, milyen mértékben a nehézfémionokkal (elsősorban a higannyal szemben) rezisztencia? Adódnak-e lehetőségek biomonitoring és/vagy remediációs eljárások kidolgozására?
- A *Rvx. gelatinosus* sejtek nagy mennyiségű higany felvételére képesek. Milyen tényezők befolyásolják a bioakkumuláció kinetikáját és sztöchiometriáját?
- A *Rvx. gelatinosus* sejtek kétféle életmódot folytatnak: planktonikus és biofilmes életvitelt. Milyen jelenség vezet az átmenethez, amely a sejtek látványos, a kritikus jelenségekre emlékeztető kollektív leülepedésében nyilvánul meg?

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 Sejt tenyészetek

A fotoszintetizáló bíborbaktériumok (*Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum*, *Rvx. gelatinosus*) Siström médiumban növekednek vagy teljesen teletöltött üvegekben oxigén nélkül (fotoheterotróf és anaerob növekedés) vagy félig töltött Erlenmeyer lombikokban (fotoheterotróf és aerob növekedés) (Siström 1962). Az új tenyészeteket stacioner fázisú sejteknek (általában) 1:100 arányú hígításával indítjuk. A fotoszintetikus növekedés szükséges megvilágításhoz 40 watt (elektromos) teljesítményű, a közeli vörösben gazdagon sugárzó wolfrám szál izzókat használunk, amelyek kb.  $13 \text{ W/m}^2$  fénytelsítményt (fényerősséget) biztosítanak a tenyésztő üvegek felszínén (Maróti és Wraight 1988).

*Aerob-semiaerob növekedés:* A lombikokat levegő és nitrogén meghatározott keverékével buborékolgatjuk. Az oxigén/nitrogén arányt rotaméterrel állítjuk be. A lombikokba jutó oxigén mennyiségét 21% (levegő, aerob növekedés) és 0% (anaerob növekedés) között változtatjuk. Aerob növekedés során (az oxigén koncentráció  $> 3\%$ ) a sejtek intracitoplazma membránja roncsolódik, és a sejtekben lévő pigment-protein komplexek működése leáll. Ezt a folyamatot „fakításnak” nevezzük, amely reverzibilis folyamat, hiszen, ha az oxigén koncentráció 3% alá csökken, akkor újra megindul a citoplazma membrán betűródése, és visszanyeri az eredeti funkcióját. Ezt a folyamatot „zöldítésnek” hívják. A tenyésztés során bekövetkező változásokat az abszorpció és/vagy a fluoreszcencia mérésével követjük nyomon.



**3.1.1.** ábra. Sejttenyészetek a „zöldítés” során. A bal oldali első lombikban a magas oxigén-koncentráció ( $> 3\%$ ) miatt teljesen kifakult tenyészet. A többi lombikban az oxigén koncentráció csökkentése (az aerob  $\rightarrow$

anaerob átmenet után) fokozatosan beindul a pigmentek termelése. A jobb oldali utolsó lombik esetében 3 óra telt el az aerob  $\rightarrow$  anaerob váltás után.

*Anaerob növekedés:* A sejteket teljesen teletöltött üvegekben oxigén nélkül neveljük. A különböző növekedési fázisok megfigyelésével lag (1 óra) és korai stacioner (26 óra) fázisú tenyészeteket használunk.

A sejtek aszinkron vagyis folyamatos növekedésén kívül szinkrontenyészetek jellemzőit is megfigyelhetjük. A sejtek szinkron növekedését vagy többször megismételt hígítással vagy 3.5-3.5 óra (3-szor ismételve) fény-sötét periódusok váltakoztatásával tudjuk előidézni. A szinkrontenyészet előállításához fontos, hogy (általában kései) exponenciális fázisú sejtekből induljunk ki. A tenyészet teljes



sejtszámát fénymikroszkóp alatt Bürker kamra segítségével határoztuk meg.

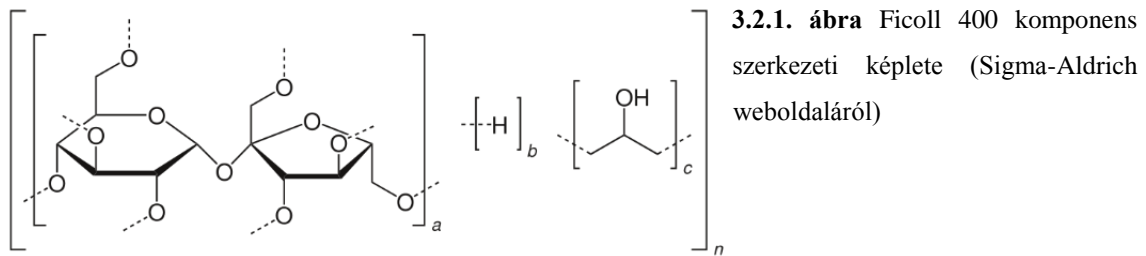
**3.1.2. ábra.** Aszinkron tenyészetek a növekedés különböző fázisaiban teljesen teletöltött üvegekben, ezzel anaerob körülmények között. Balról jobbra haladva a sejtek fejlődésének lag fázisa, exponenciális szakasza és stacioner fázisa figyelhető meg.

## 3.2 Vegyi anyagok

A vegyszerekkel való kezelés előtt a sejteket az exponenciális fázisig neveljük. Mérés előtt a mintákat nitrogénnel 15 percig átbuborékolatjuk. A kemikáliák oldatait használat előtt frissen készítjük el.

*FCCP:* carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone. Széles körben alkalmazott protonofór, amely a kemiozmotikus háztartás összeomlását eredményezi (Armitage 2001, Kelly és Thomas 2001). Ha nem írjuk másként az egyes kísérletekben, akkor általában 20  $\mu$ M koncentrációban adjuk a sejtszuszpenziókhöz.

*Ficoll 400:* nagymértékben szerteágazó polimer, amelyet szukrózból és epiklorohidrinből állítanak elő. Vízben nagyon jól oldódik, mert rengeteg hidroxil csoportot tartalmaz. Alkalmos a sejtek és egyéb molekulák megkötésére és szétválasztására. 1-10 %-os oldatát használjuk (Georgalis et.al 2012).



**3.2.1. ábra** Ficol 400 komponens szerkezeti képlete (Sigma-Aldrich weboldaláról)

*Myxothiazol*: citokróm  $bc_1$  komplex inhibitor. A komplex  $Q_0$  kötőhelyére ül be, és gátolja az elektrontranszferet. A *Myxococcus fulvus* baktérium termeli.  $5 \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazzuk, és 530 nm-nél (ahol maximális az elektrokróm-eltolódás) mérjük az általa előidézett (pontosabban befolyásolt) abszorpcióváltozást.

*Nehéz fémek*:  $\text{HgCl}_2$  (Hg(II)),  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (Cr(VI)) és  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Pb(II)-acetát). Ezekből különböző koncentrációjú friss törzsoldatokat készítünk. A nehézfémkezelés ideje az azonnali hatás megfigyelésétől több óráig tarthat, miközben a mintákat vagy sötétben tartjuk vagy megvilágítjuk.

*N-Em*: N-Ethylmaleimide. Rutinszerűen használt szulfhidril-csoport módosítószer (Gao és Wraight 1990), amelyet a kísérleteinkhez 20 mM koncentrációban használunk.

*Nimodipine*: potenciális L-típusú kalciumcsatorna blokkolószert (Ren és mtsai. 2001).  $10\text{-}100 \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazzuk.

### 3.3 A sejtek molekuláris komponenseinek kivonása és meghatározása

*Bakterioklorofill*: a bakterioklorofillt a sejtekből extrahálással nyerjük ki, mégpedig acetone: metanol (7:2 v/v%) keverékének felhasználásával. Kvantitatív meghatározására  $75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (770 nm-nél mért) extinkciós koefficiens használjuk (Clayton és Clayton 1981).

*Foszfolipidek*: a sejtuszpenzióból a teljes foszfolipid mennyiséget a következő módszer alapján nyerjük ki.  $200 \mu\text{L}$  sejtuszpenzióhoz adunk  $750 \mu\text{L}$  kloroform:metanol (1:2) elegyet, majd vortexeljük 15 percig. Ezután  $250 \mu\text{L}$  kloroformot adunk hozzá, és 1 percig vortexeljük. Végül  $250 \mu\text{L}$  desztillált vizet adunk hozzá, és lecentrifugáljuk (5000 rpm, 5 perc). Az alsó (kloroformos) fázist gyűjtjük össze, ami a foszfolipideket tartalmazza (Bligh and Dyer 1959). A kapott teljes foszfolipid (anorganikus foszfátok) mennyiséget spektrofotométerrel (830 nm



hullámhossznál) kolorimetriás úton határozzuk meg (Bartlett 1959). A mennyiségeket úgy állítjuk be, hogy Eppendorf csövekben végre lehessen hajtani az extrakciót.

*Glükóz:* A *Rvx. gelatinosus* növekedése során különböző időpontokban (az inokulációtól a szedimentációig) mintákat veszünk. Ezekhez 1:1 arányban 95 %-os ethanolt adunk, és rázógépre helyezük. 1 óra után a mintákat 40-45 °C-on leszáritjuk, majd reagens oldatot adunk hozzá. Reagens oldat: 1 mL desztillált víz, 1 mL 2 % fenol és 5 mL tömény kénsav. 10 perc után sárga színű oldatokat fogunk kapni. A kapott teljes glükóz mennyiséget spektrofotométerrel (488 nm-es maximum) kolorimetriás úton határozzuk meg. A kalibrációt ismert koncentrációjú glükóz oldatokkal vesszük fel. A kapott teljes glükóz mennyiségből kivonjuk a sejtekből származó értéket.

*Karotenoidok:* a karotenoidokat szintén extraháljuk a sejtekből acetón:metanol (7:2 v/v%) arányú keverékkel. A karotenoidok extinkciós koefficiensére 484 nm hullámhossznál  $128 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  értéket veszünk (Clayton 1966).

### **3.4 Steady-state abszorpció és fluoreszcencia spektrofotometria**

A sejtek állandósult abszorpciós spektrumait a közeli infravörös tartományban (700-1000 nm) Unicam UV4 (kétsugaras) vagy Helios  $\gamma$  (egysugaras) spektrofotométerrel mérem. A sejtek által keltett fényszórásra korrigáluk a távoli vörös tartományban (ahol már nincs a pigmenteknek számottevő elnyelése) észlelt (látszólagos) abszorpció-csökkenés menetének felhasználásával. A fluoreszcencia spektrumokat Perkin-Elmer MPF 4 spektrofluoriméterrel vesszük fel. Az összetett spektrumokat Gauss-komponensekre bontjuk fel, és az összetevőket a maximumaikhoz tartozó hullámhosszak nm-ben kifejezett számértékével azonosítjuk.

### **3.5 Fényindukált abszorpcióváltozás**

Fényindukált abszorpcióváltozás méréséhez házilag épített spektrofotométert (Maróti és Wraight 1988), gerjesztéséhez Xe flash lámpát vagy lézerdiódát ((Roithner LaserTechnik LD808-2-TO3, 808 nm, 2 W), detektáláshoz Hamamtsu R928 típusú fotoelektron sokszorozót használunk. A mérőfényt stabilizált wolfrám szálal izzó szolgáltatja, amelyből a megfelelő hullámhosszakot monokromátorokkal és/vagy szűrőkkel állítjuk be. Az oxidált bakterioklorofill dimert ( $\text{P}^+$ ) 798 nm-nél, a membrán energetizált állapotára utaló elektrokróm jelet 530 nm-nél (referencia 510 nm)

detektáljuk. Méréskor a sejtek optikai denzitását a szórás és a reabszorpció zavaró hatásának csökkentésére alacsonyan kell tartani ( $OD(808\text{ nm}) < 0.1$ ).

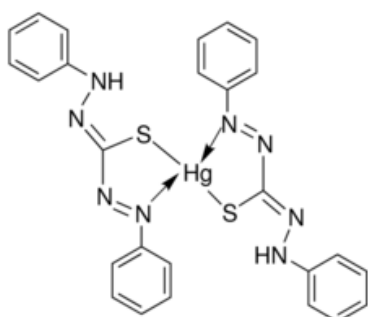
### 3.6 Fluoreszcencia indukció és relaxáció

A Bkl fluoreszcencia indukció gerjesztéséhez 808 nm hullámhosszú lézer diódát használunk (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W), mert ez a hullámhossz nagyon közel van a LH2 antenna 800 nm-es abszorpció maximumához, így optimális a gerjesztés. A detektálást a gerjesztés irányára merőlegesen elhelyezett lavina fotodiódával (APD; model 394-70-72-581; Advanced Photonix, Inc., USA) végezzük. A detektort a lézerfény szórásától 850 nm felett áteresztő szűrővel (Schott RG-850) védjük.

A Bkl fluoreszcencia relaxáció mérését házilag épített készülékkel végezzük (Kocsis és mtsai. 2010). Két flash sorozatot mérünk: az első tapogató flash-ekből áll, ez adja az  $F_0$  szintet, a második sorozat a gerjesztő flash-sel kezdődik, majd ezt követik újra a tapogató fényfelvillanások. A flash-eket szintén lézerdiódák szolgáltatják (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W). A készüléket számítógépről vezéreljük, az áramellátása és az adatok kinyerése USB kábelen keresztül történik.

### 3.7 Higany(II) meghatározása dithizzonnal

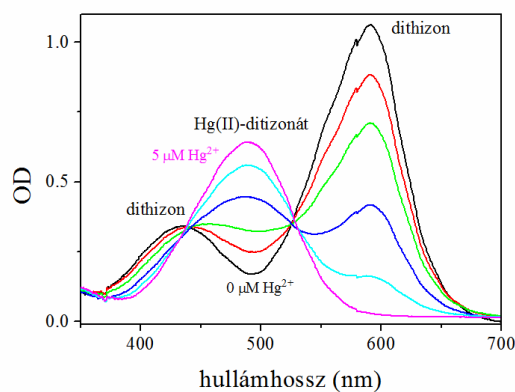
Vizes oldatokban található  $Hg^{2+}$  ionok mennyiségét egy közvetett spektrofotometriás módszerrel határozzuk meg, ami a dithizon (Diphenylthiocarbazon) erős higanykötő képességén alapszik. A létrejött Hg(II)-dithizonát komplex nagyon stabil (Théraulaz és Thomas, 1994).



3.7.1. ábra Hg(II)-dithizonát komplex szerkezeti képlete (Sigma-Aldrich weboldaláról)

A dithizon egy kékesfekete színű anyag, ami abszolút etanolban oldódik. A tökéletes oldódás érdekében az oldatot ultrahangos kádban tartjuk pár percig. Miután elkészült, sötét helyen és  $10^\circ\text{C}$  alatt tároljuk. A mérés előtt célszerű mindig frissen elkészíteni, mert pár óra alatt destruálódik. Tipikusan  $1 \cdot 10^{-4}$  M koncentrációjú oldatot használunk. A minta (sejtszuszpenzió) előkészítése a korai exponenciális fázisú sejtek lecentrifugálásával kezdődik (8000 rpm, 5 perc). Erre azért van szükség, mert a tápoldat fémeket tartalmaz,

amik szintén komplexet képezhetnek a dithizonnal, ezért zavarják a mérést. A sejteket végül 10 mM NaCl oldatban felszuszpendáljuk, majd különböző koncentrációjú HgCl<sub>2</sub> oldattal különböző ideig kezeljük. Ennek befejezése után a mintákat újra lecentrifugáljuk. A felülúszó a szabadon maradt, vagyis a sejtek által nem megkötött higany ionokat tartalmazza, a felvett (megkötött) higany ionok pedig a sejtekkel együtt leülepednek. A spektrofotometriai kvantitatív elemzéshez 200 µL dithizon oldatot és 800 µL mintát használunk. A minta pH-ját 3.1-re kell beállítani, mert ez optimális a dithizon számára. A dithizonnak pH = 3.1 esetén 430 nm-nél és 585 nm-nél két abszorpciós maximuma van, a Hg(II)-dithizonát komplex abszorpciós maximuma pedig 480 nm-nél látható. Az abszorpciós sávok egymásba való átalakulását az izoszbesztikus pontok megjelenése jól demonstrálja (3.7.2. ábra). Ennek megfelelően használhatjuk az  $R=(A_{585}-A_{480})/A_{585}$  összefüggést a szabad Hg<sup>2+</sup> koncentrációjának meghatározásához.



(Greenberg és mtsai. 1992). Minden mérés előtt ismert koncentrációjú HgCl<sub>2</sub> oldattal kalibrációt készítünk.

**3.7.2. ábra.** A dithizon és a Hg(II)-dithizonát komplex abszorpciós spektrumai különböző Hg(II) koncentrációknál (0-5 µM Hg<sup>2+</sup>). Az izoszbesztikus pontok jól felismerhetők.

### 3.8 Képkeltő eljárások

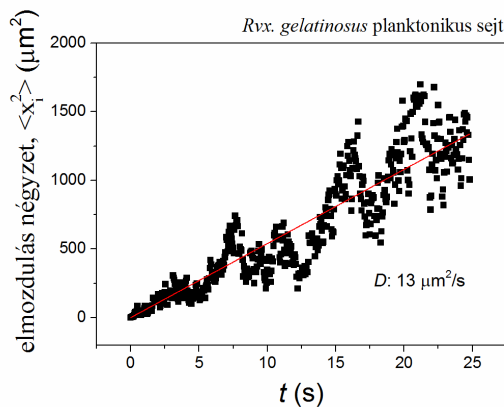
*Transzmissziós elektronmikroszkópia:* a baktériumokat 4%-os glutáraldehiddel szűrőpapírra fixáljuk. A mintákból beágyazódás után (Embed812, EMS, USA) 70 nm vastagságú vékonyrétegeket készítünk (Ultracut S ultra-microtome, Leica, Austria). Uranil-acetát és ólom-citrát festékekkel való festés után a metszetekről transzmissziós elektronmikroszkóp (Phillips CM10, Eindhoven, the Netherlands) segítségével képeket készítünk (Mega-view G2 digital camera and iTEM imaging analysis software, olympus, Münster, Germany).

*Time lapse videók:* A *Rvx. gelatinosus* sejteknek tenyészcsovekben történő aggregációjáról és leülepedéséről webkamera segítségével felvételeket készítettem. Ezen kívül 20 fps (frame-per-secundum) mikroszkópos felvételeket (Olympus Fluoview

FV1000 LSM, Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany) és Nomarski képeket (60x nagyítás, olaj immerzió) készítettünk.

### 3.9 A sejtek diffúziós állandóinak meghatározása

A *Rvx. gelatinosus* sejtek diffúziós állandóit növekedésük közben és Ficoll 400 (1-10 %) polimer hozzáadásával határoztuk meg. ImageJava szoftver segítségével 25 s alatt 500 pontban megjelöltem egy kiválasztott baktérium helyét, majd minden egyes



pontban meghatároztam a kezdőponttól való elmozdulás négyzetét. Véletlenszerű bolyongás esetén a pontok az idő függvényében egy, az origóból kiinduló egyenesre esnek, amelynek meredeksége adja meg a diffúziós állandót. Esetenként 5-10 sejt elmozdulásának az átlagát vettem.

**3.9.1. ábra.** A *Rvx. gelatinosus* planktonikus sejtjei translációs diffúziós állandójának meghatározása.

### 3.10. A viszkozitás mérés

A makroviszkozitás mérésére a Stokes törvényen alapuló Höppler-féle eső-golyós viszkozimétert használom. A kissé ferdén ( $\sim 80^\circ$ ) elhelyezkedő üvegcsőbe, amelyet egyben tenyészcsőként is használunk, az átmérőjéhez jól illeszkedő acélgolyót helyezünk, majd sterilizálás után sejtszuszpenzióval buborékmentesen feltöltjük. Az üvegcsövet megvilágítjuk, hogy a sejtek fejlődhessenek egészen a stacioner állapot kialakulásáig ill. a sejtek leülepedéséig. A golyó lassú esésének idejét a csőre maratott két jel között stopperórával mérjük. Az állandó hőmérséklet biztosítása érdekében az üvegcső körüli vízköpenyt termosztáljuk ( $28^\circ\text{C}$ ). A sejtszuszpenzió viszkozitását az  $\eta = K_g (\rho_g - \rho_{sz}) \cdot t$  összefüggés alapján számoljuk ki, ahol a  $K_g$  golyóállandót ismert viszkozitású oldaton végzett kalibrációval határozzuk meg,  $\rho_g$  és  $\rho_{sz}$  a golyó ill. a szuszpenzió sűrűségét jelenti, és  $t$  a mért esési időt jelöli.

## 4. Membránátalakulások

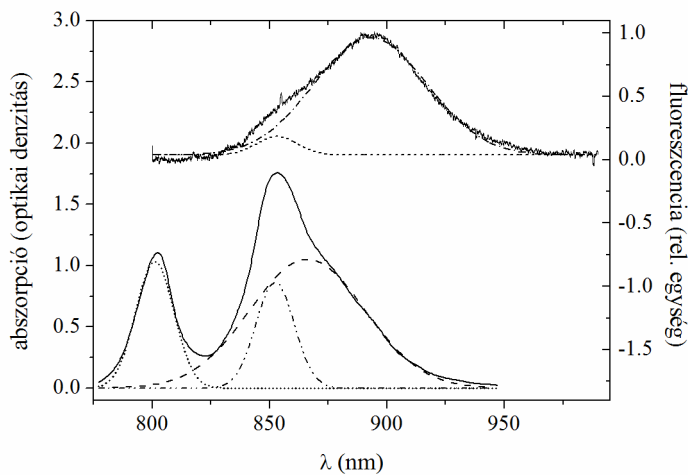
### 4.1 A sejtek növekedése során történő membránátalakulások

#### *Steady-state abszorpció- és fluoreszcencia spektrumok*

A *Rba. sphaeroides* 2.4.1 fotoszintetizáló baktérium állandósult (steady-state) közeli infravörös abszorpciós és fluoreszcencia spektrumait a tenyészet növekedése során óránként vettük fel (4.1.1. ábra). Az abszorpciós spektrumokból hiperbola szerinti viselkedést mutató, a fényszórásból származó háttérrel levontuk, majd a spektrumot, az antennák abszorpciós sávjainak megfelelően (B800, B850, B875) három Gauss-komponensre bontottuk fel:

$$y = \sum_{i=1}^3 \frac{A_i}{w_i \sqrt{\pi/2}} \cdot \exp \left[ -\frac{2 \cdot (\lambda - \lambda_{c,i})^2}{w_i^2} \right], \quad (4.1)$$

ahol  $A_i$ ,  $w_i$  és  $\lambda_{c,i}$  az  $i$ -edik ( $i=1,2$  és  $3$ ) komponens területét, sávszélességét, ill. centrális hullámhosszát jelenti.

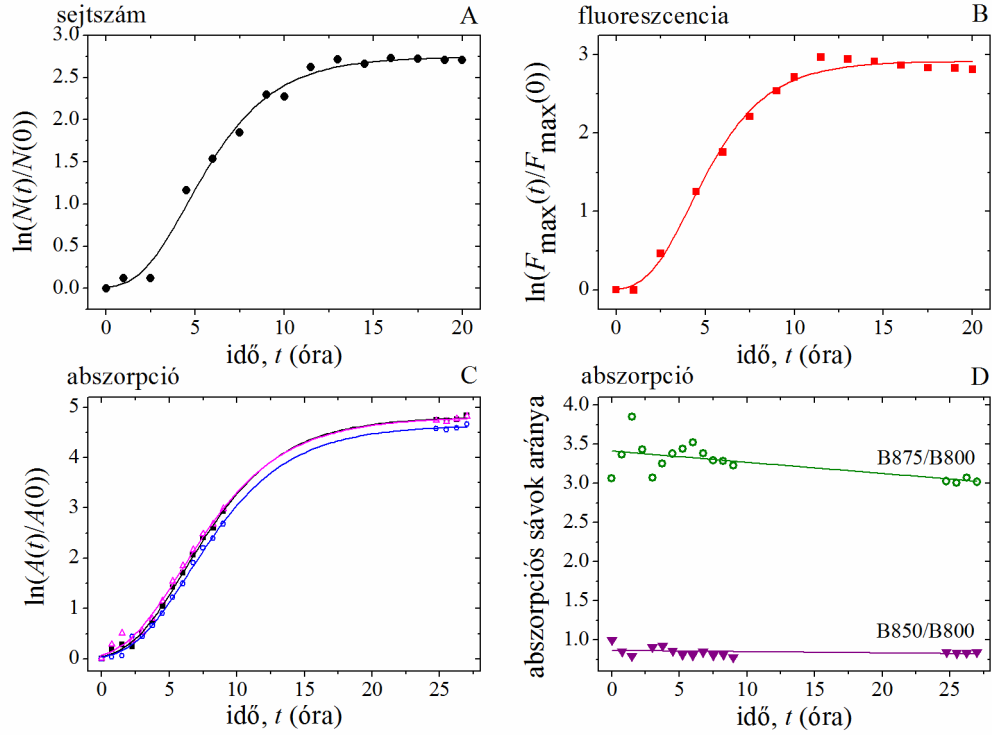


**4.1.1. ábra.** *Rba. sphaeroides* egész sejtek steady-state abszorpciós és fluoreszcencia spektrumai. A színeképet Gauss komponensekre bontottuk. Fluoreszcencia spektrum sávjainak központi hullámhosszai 850 nm (-•-•-) és 895 nm (-•-•). Az abszorpciós spektrum sávjai 800 nm (•••), 850 nm (-••-) és 875 nm (-•-•) körül centráltak.

A Gauss felbontás alapján azt mondhatjuk, hogy az antennák 3 felbontott komponense közül a LH1-es belső antenna 875 nm-es abszorpciós sávja dominál (a területe a jelentős sávszélesség miatt sokkal nagyobb, mint a másik két komponensé), ami első (felbontás nélküli) ránézésre nem szembetűnő. A fluoreszcencia spektrumot két Gauss komponensre bontottuk fel: a fő sáv maximuma 895 nm nagy félértékszélességgel, míg a 850 nm körüli sáv csak kiegészítő sáv a nagyon kis sávszélesség miatt.

## Növekedési görbék

A sejtpopuláció relatív növekedésének természetes logaritmusát,  $\ln(N(t)/N(0))$  az idő függvényében ábrázolva kapjuk a sejtre és a tenyésztési körülményekre jellemző növekedési (fejlődési) kinetikát (4.1.2a ábra).



**4.1.2. ábra** Növekedési görbék kiszámítva a sejtszámból (A●), fluoreszcencia indukció maximumából (B■), és a Gauss komponensekre bontott B800 (□), B850 (●) és B875 (▲) abszorpciós spektrum sávjaiból (C) a módosított Gompertz egyenlet alapján (lásd a (4.2) egyenletet). A kapott értékeket a 4.1.1. táblázat tartalmazza. Az abszorpciós sávok hányadosai B875/B800 (○) és B850/B800 (▼), amelyek az antennarendszerekben lévő változásokat jelzik (D).

A maximális növekedési sebesség ( $\mu_{\max}$ ), a lag fázis időtartama ( $\Delta t_0$ ) és az aszimptotikus populáció mérete ( $N_{\max}$ ) meghatározható a módosított Gompertz egyenlet alapján (Zwietering et al. 1990):

$$\ln \frac{N(t)}{N_0} = N_{\max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{e \cdot \mu_{\max}}{N_{\max}} (\Delta t_0 - t) + 1 \right] \right\}, \quad (4.2)$$

ahol  $N(t)$  a sejtkoncentráció a  $t$ . időpontban,  $N_0$  a kezdeti sejtkoncentráció,  $e$  az Euler szám, és  $t$  a tenyésztés inokulálása óta eltelt idő. Ezt az illesztést alkalmaztuk még a fluoreszcencia maximális szintjére (4.1.2b) és az antennapigmentekre (B800, B850,

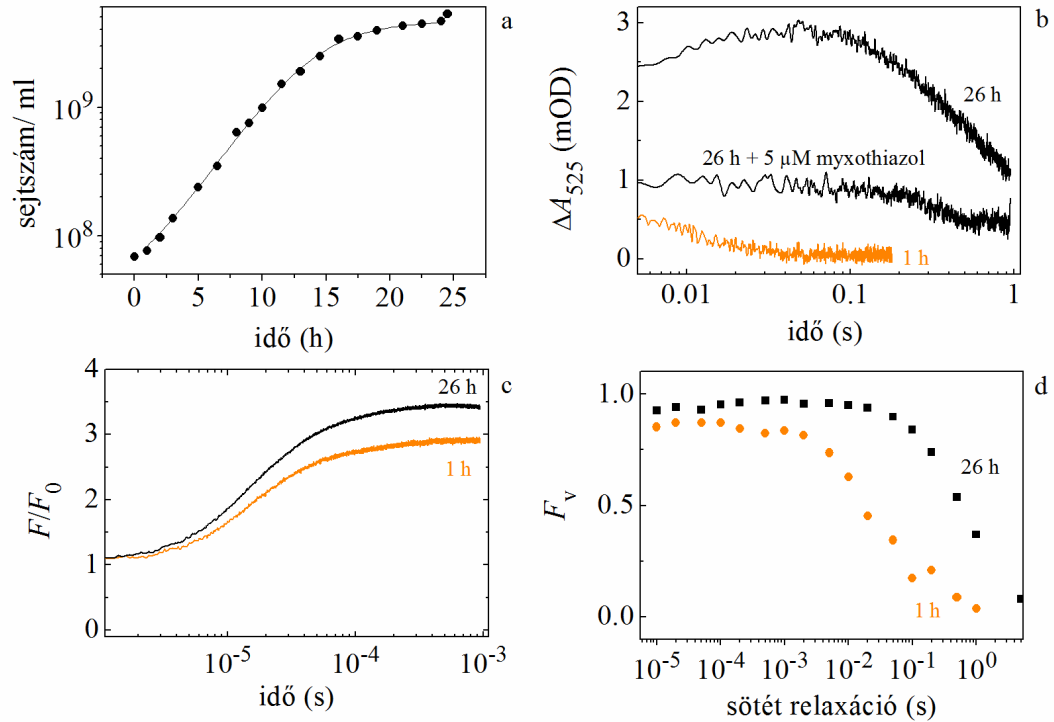
B875) a tenyészet növekedése során (4.1.2c.). Az illesztések által kapott értékeket a 4.1.1. táblázat tartalmazza.

fizikai mennyiségek	kezdő érték	illesztési paraméterek		
		aszimptotikus érték	maximális duplázódási sebesség $\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\Delta t_0$ (h)
sejtszám	$5.5 \cdot 10^8$ sejt/ml	$8.2 \cdot 10^9$ sejt/ml	0.4	1.9
fluoreszcencia, $F_{\max}$ (rel. egység)	1.5	24	0.5	1.8
abszorpciós sávok (rel. egység)				
B800	0.18	23	0.44	2.2
B850	0.18	19	0.42	2.4
B875	0.55	68	0.43	1.8

**4.1.1. táblázat.** A 4.1.2 ábra (a-c) növekedési görbéinek módosított Gompertz egyenlet (4.2. egyenlet) által illesztett értékeit tartalmazza.

### *Abszorpció és fluoreszcencia kinetikák*

A *Rba. sphaeroides* 2.4.1 növekedési görbáját jól definiálható fázisokra lehet bontani: lag, exponenciális és stacioner, ez látható a 4.1.3a. ábrán. A sejtszámokon feltüntettük a hiba határokat (a középérték közepes hibáit), amelyeket a fényintenzitás és a hőmérséklet fluktuációja okozza a tenyésztés során. A különböző növekedési fázisok alatt a baktériumok jelentős kinetikai változást mutatnak a membránenergetizációban (4.1.3b. ábra). Figyelemre méltó a különbség a bakterioklorofill fluoreszcencia változó részében (4.1.3c. ábra) és a relaxációban (4.1.3d. ábra).



**4.1.3. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 növekedési görbe, és kinetikák különböző fiziológiai állapotban lévő egész sejteknél: lag fázis (1 óra), stationer fázis (26 óra). Növekedési görbe, megillesztése a (4.2) egyenlet alapján (a). Fényindukált abszorpcióváltozás (elektrokróm-shift), mérve 530 nm-nél (ref. 510 nm), +5  $\mu\text{M}$  mixotiazol. (b). Fluoreszcencia indukció kinetika (c) és fluoreszcencia sötét relaxáció (d).

A logaritmikus fázis alatt a sejtek aktívan fejlődnek, ezáltal nagy változásokat lehet mérni fényindukált abszorpcióváltozással (4.1.3b). 530 nm-nél (ref. 510 nm) a karotenoid abszorpciós spektrumának eltolódásából jelentős abszorpcióváltozás származik (elektrokróm-eltolódás), amely molekuláris voltmérőként szolgál. Pillanatszerű (flash) fénygerjesztés hatására prompt módon kialakul, majd később lecseng a membrán két oldala között mérhető elektromos potenciál. A fényfelvillanással előidézett elsődleges töltésszétválasztás először elektront, majd később protont juttat át a fotoszintetikus membránon. Ezek eltűnésével (töltés-szivárgás, töltésrekombináció) a membránon keresztüli feszültség csökken, majd meg is szűnik, azaz a membránkondenzátor kisül (Feniouk és Junge 2009). A tenyészet átoltása után 1 órával az elektrokróm jel egy hirtelen kis növekedést mutat, majd egy gyors lecsengést. A 26 órás stationer fázisú sejteknél egy második lassú felemelkedés is látható, ezt pedig egy lassú relaxáció követi. A cit  $bc_1$  komplex szabályozását a membránenergetizációban jól jelzi, ha  $bc_1$  komplex inhibitor, mixotiazolt használunk az érett sejteknél. Viszonylag kis felemelkedés mérhető a gerjesztés után, ami jelzi a RC-ban a

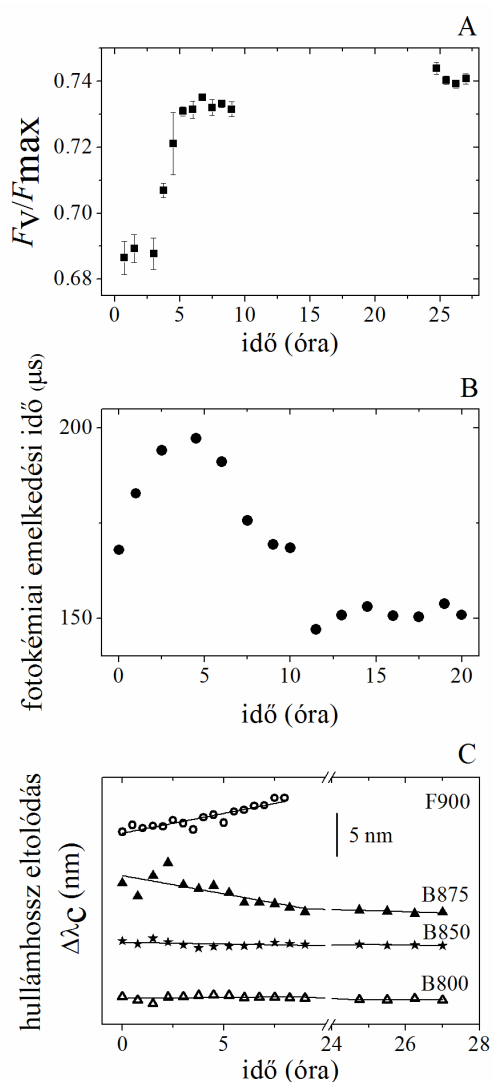


töltésszétválasztást. A membrán nagyon lassú kisülését a gátolt töltésrekombináció vagy a jó membránszigetelés okozhatja. A jel felerősödése az érett sejtekben annak köszönhető, hogy a membrán dielektrikum egyre hatékonyabban szigetel (csökken a szivárgás) a tenyészet korának előrehaladásával.

A bakterioklorofill fluoreszcencia indukció karakterisztikus kinetikát mutat. Fluoreszcencia szintjei:  $F_0$ , kezdeti,  $F_v$ , változó és  $F_{\max}$ , maximum (4.1.3c. ábra). A normált változó fluoreszcencia  $F_v = (F_{\max} - F_0) / F_0$  20 %-kal nagyobb a 26 órás tenyészetnél, mint az 1 órásnál. A változó fluoreszcencia növekedése jelzi a strukturális változásokat a fotoszintetikus apparátusban. A stacioner fázisú sejtek fotoszintetikus egységei (PSU) közelebb helyezkednek el egymáshoz és szorosabb az energetikai kapcsolat, vagyis hatékonyabb az energia átmenet az antennáktól a RC felé. Ez a fotokémiában jelentkező hatékonyság növekedés egy adaptív válasz a fényintenzitás csökkenésére, hiszen egy stacioner fázisú (azaz igen koncentrált) tenyészetnél a sejtekhez már csak nagyon kevés fény jut el.

A fluoreszcencia sötétrelaxációja 1 ms-os megvilágítás után jelentős különbséget jelez az 1 órás és 26 órás tenyészet között (4.1.3d. ábra). Az érett sejteknél magasabb felfutású és hosszabb a fluoreszcencia, mint a lag fázisban. A relaxáció azt az időtartamot határozza meg, amely idő alatt a zárt RC-ok újra kinyitnak. Visszatükrözi a ciklikus elektrontranszfer sebességét a RC és a cit  $bc_1$  komplex között (Koblizek et al. 2005). A stacioner fázisú sejteknél több idő kell az elektronoknak, hogy a komplexekhez eljussanak a mobilis redox elemek közvetítésével (Lavergne et al. 2009), mert a membrán tömörebb és ezért lassabb a diffúzió.

4.1.4. ábrán a sejtek növekedése alatti fluoreszcencia indukció és spektrális változások láthatóak. A változó fluoreszcenciában ( $F_v / F_{\max}$ ) 10 %-os növekedés tapasztalható a tenyészet korának előrehaladtával (4.1.4a ábra). A fotokémiában pedig csekély az ingadozás, amely az antennarendszerek kapcsolódásának mérsékelt változásait jelzi (4.1.4b ábra). Érett sejteknél a belső antenna LH1 kifejezettebb, mint a perifériális LH2 antennák. A fluoreszcencia sáv maximumának 5 nm-es vörös eltolódása van, a LH1 belső antenna B875 abszorpciós sávú pigmentjének pedig 5 nm-es kék eltolódása (4.1.4c ábra).



**4.1.4. ábra** Fluoreszcencia indukció és spektrális változások *Rba. sphaeroides* 2.4.1 tenyésztése alatt. A változó fluoreszcencia 10 %-os növekedést mutat az exponenciális fázisban, majd beáll egy konstans értékre (A). A fotokémia növekedést mutat az exponenciális fázisban, majd lecsökken a kezdő értékre az érett sejteknél (B). Hullámhossz eltolódások a karakterisztikus csúcsoknál. A fluoreszcencia sáv F900 5 nm-es vörös eltolódást mutat, a LH1 antenna B875 abszorpciós sávja, szintén 5 nm-es, de kék eltolódást mutat. Az LH2 antenna sávjai (B800, B850) nem változnak (C).

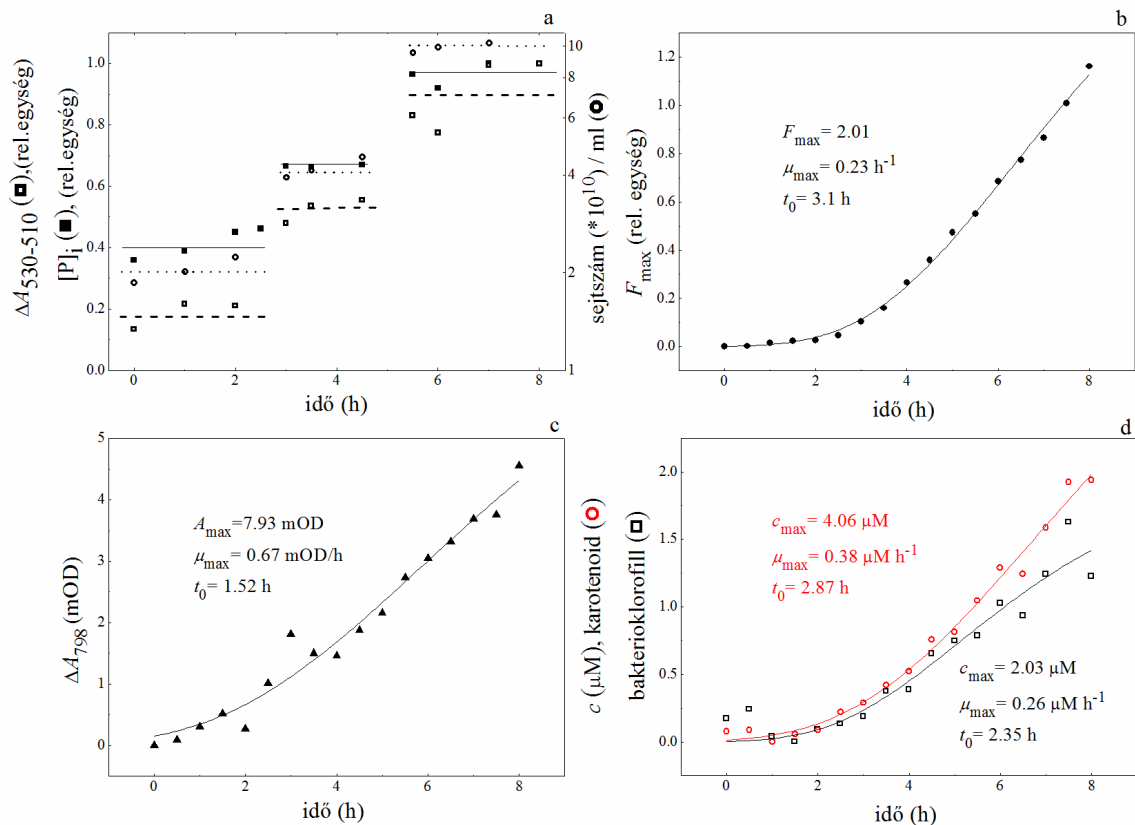
Egy aszinkron kultúrában a sejteknek az inokuláció után alkalmazkodniuk kell a friss médiumban az új környezeti feltételekhez (a megnövelt fényintenzitáshoz és a megemelkedett tápanyagmennyiséghez). Az összes paraméter mutatja a sejtciklus kezdetén lévő lag fázis jelenlétét. Az átmenet után a sejtek gyors osztódásba kezdenek (exponenciális fázis, duplázódási idő 3 óra) és a populáció „megfiatalodik”.

Az az alapmegfigyelésünk, hogy a pigmentek és a fehérjék termelése és beépülése a fehérje komplexekbe (RC és LH) összhangban áll a tenyésztet életciklusával (4.1.2. és 4.1.5b-d ábra). Ezeknek a kezdeti termelődése ugyanolyan lag fázissal indul. A lag fázisok hosszában és az exponenciális fázis maximális növekedési sebességeiben van némi eltérés, ami jelzi, hogy a komponensek kicsit eltérő módon épülnek be, az újonnan képződő struktúrákba (4.1.5b-d ábra). Ezek az elemek még a befejezetlen fotoszintetikus egységekbe épülnek be, más elemek (B800-850) viszont közvetlenül az ICM-ba a membrán fejlődésekor (4.1.2c ábra) (Kiley és Kaplan 1988).

### *Steady-state szinkrontenyésztet*

A jellemzett aszinkron tenyésztet után a szinkronizált sejtek membránátalakulásai következnek (4.1.5. ábra). Néhány generáció után a megfelelő körülmények beállításával a sejt kultúra képes a szinkronnövekedésre. Mivel fotoszintetizáló

baktériumokról van szó, ezért a szinkroniténység létrehozható sötét-fény periódusok váltakoztatásával. Egy steady-state szinkroniténységben a sejtszám nem folyamatosan növekszik, hanem lépcsőzetesen a generációs időnek megfelelően (4.1.5a). A sejtek duplázódási ideje  $\sim 3$  óra volt. A szinkronizáció előnye, hogy közvetlenül követhető a fotoszintetikus apparátus beágyazódása az érett és az újonnan formálódott ICM-ba. Éles ellentét áll fenn a lépcsőzetesen osztódó sejtekkel szemben, ugyanis a fotoszintetikus apparátus elemeinek termelődése és beépülése az ICM-ba, és a fotoszintetikus egységek aktivációja (LH, RC, cit  $bc_1$  komplex) sejtciklus független folyamatok. Vagyis nem követik a lépcsőzetes növekedést, hanem folyamatos emelkedést mutatnak jól meghatározható lag fázissal (4.1.5b-d).



**4.1.5. ábra** Sejtciklus függő (a) és független (b-d) változások szinkronizált *Rba. sphaeroides* 2.4.1 tenyészetnél. A teljes foszfát mennyiség és az elektrokróm abszorpció változás amplitúdója követi a sejtszám lépcsőzetes emelkedését (a). A Bkl fluoreszcencia maximum növekedése, a Bkl dimer (RC) 798 nm-nél mért abszorpció változása és a tenyészet karotenoid és Bkl mennyisége folyamatos (aszinkron) növekedést mutat. A kinetikák illesztése módosított Gompertz egyenlet alapján (4.2. egyenlet). A maximális növekedési sebességre ( $\mu_{\max}$ ) és a lag fázis időtartamára ( $\Delta t_0$ ) illesztéssel kapott értékek az ábrán láthatóak.

A növekedés mennyiségi meghatározásához a már korábban leírt módosított Gompertz egyenletet (4.2. egyenlet) használtuk. Összehasonlítva a kezdeti lag fázisok hosszát, hasonló értékeket kapunk a Bkl (2.35 óra), karotenoidok (2.87) és a Bkl fluoreszcencia maximumára (3.1 óra). Ezeknél kisebb értéket kapunk a RC fehérje Bkl dimer abszorpció változásánál (1.5 óra), mert a Bkl pigmentek szintézise gyorsabb ( $0.23 \mu\text{M h}^{-1}$ ), mint a karotenoidoké ( $0.38 \mu\text{M h}^{-1}$ ). A folyamatos pigment termeléssel ellentétben a membránalkotó foszfolipidek szintézise (Knacker és mtsai. 1985) és a membránenergetizációját jellemző elektrokróm jel (Asztalos és Maróti 2009) követi a lépcsőzetes szinkronizált sejtosztódást (4.1.5a). A foszfolipidek sejtciklus függő termelődése és beépülése a membránba nemcsak a fotoszintetikus baktériumokra jellemző. *Escherichia coli* baktériumoknál is lépcsőzetes emelkedést mutat a teljes lipid mennyiség (Mozharov és mtsai. 1985).

A fotoszintetikus pigmentek folyamatos termelődése és beépülése a komplexekbe nem csak az aszinkron sejt kultúráknál áll fenn, hanem a szinkronizációknál is (4.1.5b-d ábra). Ezzel szemben a szinkronizáció során a sejt teljes foszfolipid mennyisége (Leuking és mtsai. 1978.) és a membránpotenciál sejtciklus függő változást mutat (4.1.5a ábra). A foszfolipidek felhalmozódása az ICM-ban nem folyamatos, hanem összekapcsolódik a sejtciklussal, viszont ha az egyes foszfolipidek szintézisének a sebességét nézzük, az végig állandó marad (Cain és mtsai. 1981). Leegyszerűsítve, ezek a foszfolipidek egyidejűleg kerülnek be az ICM-ba. Sem a termelődés, sem a beépülés nem mutat sejtciklus függést, csak a foszfolipidek teljes mennyisége az, ami összefügg a sejtek osztódásával. Sejtosztódáskor a teljes membránfelület jelentősen megnövekszik, mert a sejteknek a sajátjukon kívül, létre kell hozniuk a leánysejt külső-, citoplazma- és intracitoplazma membránját. Ez nagy energia igényű folyamat, az egész sejt foszfolipid termelésére hatással van. Ezért jelenik meg egy hirtelen nagy mennyiségű foszfolipid felhalmozódás a sejtosztódások körül, amelyeknek majd az újonnan képződő sejtek ICM-ba kell beépülnie. A sejtosztódás idején a foszfolipidek szintézise átmenetileg megszakított, és nem az új foszfolipidek ágyazódnak be az új ICM-okba. Az ICM fehérje/foszfolipid aránya ciklikus hullámmozgáson megy keresztül a szinkronizált sejtekben. Ez a változás közvetlenül befolyásolja a membrán protein komplexek aktivitását és a membrán fiziológiáját, ezt mutatja a fluoreszcencia polarizáció változása a sejtosztódás során (Fralely és mtsai. 1979). A sejtciklus függő specifikus változások a *Rba. sphaeroides* fotoszintetikus apparátus szuperkomplexeinek struktúrájára is befolyással van. 1.) A *Chl a* fluoreszcenciájának teljesítménye érzékeny

a környezet hidrofóbicitására: magas, ha a membránba ágyazódott, alacsony, ha a vizes fázisba különített (Murata és Fork 1975). A membrán fluiditása szabályozza ezt a folyamatot. 2.) A PSU-ek közötti átlagos távolság csökken és a konnektivitás nő, ha a membrán fehérje/foszfolipid aránya növekszik, vagyis a membrán tömörödik. 3.) A membrán tömörödése következtében megnövekedhet a LH2 komplexek lokális koncentrációja. Ezekben a szorosan pakolódott elrendezésekben (pl. ha alacsony fényintenzitás mellett nőnek a sejtek) a kinonok laterális diffúziója a RC és a cit  $bc_1$  komplex között lelassul (Woronowicz és mtsai. 2012). Más szempontból a sűrűn pakolt RC-LH1-PufX és LH2 komplexek a fény begyűjtés hatékonyságának kedvez.

A teljes foszfolipid mennyiség mellett, megfigyeltünk a membránpotenciálban is sejtciklus függő változást. Az 530 nm-nél mért abszorpcióváltozás, ami a membrán energetizált állapotát jelzi, is mutat sejtciklus függő növekedést a szinkronizálás alatt (4.1.5a ábra). A megfigyelt változások egyrészt a diffúzióban bekövetkező távolság csökkenésnek (tömörebb membrán) tulajdonított vagy a növekvő diffúziós koefficiensnek (növekvő membrán fluiditás) vagy mindkettő hatásnak.

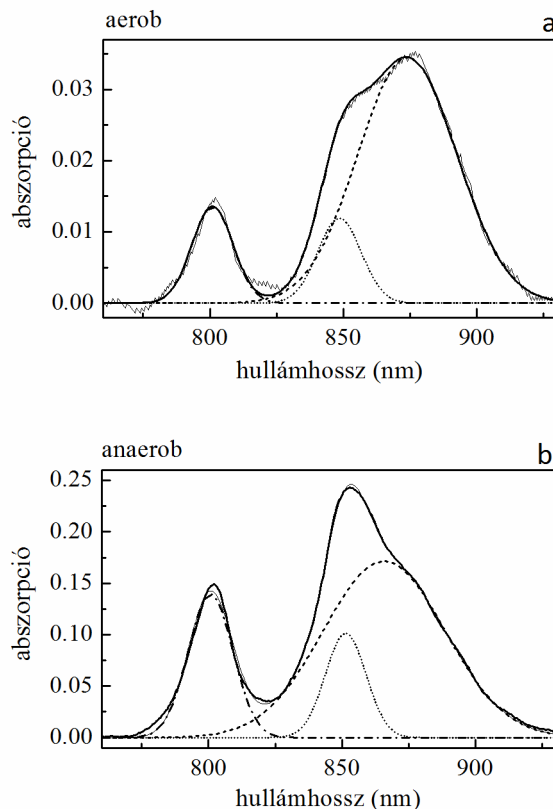
## 4.2 Anaerob $\leftrightarrow$ aerob átmenetek: ICM szétbomlása és képződése

Az ICM képződése és szétbomlása előidézhető néhány alapvető környezeti tényező módosításával. Az egyik ilyen faktor a tenyésztés oxigén-koncentrációja, amelynek szabályozásával membrán-átmenetek idézhetők elő. *Rba. sphaerodes*-nél az ICM képződését és a fotoszintetikus komponensek szintézisét egy két-komponensű oxigénérzékelő szignál transzdukciós rendszer irányítja (Oh és Kaplan 2000, Bauer és mtsai. 2009). Az ICM szétbomlik, ha magas az oxigén koncentráció (fakítás), majd újraképződik, ha eléggé lecsökken (zöldítés) (Takemoto és Lascelles 1973, Tucker és mtsai. 2010, Niederman 2013). A mi kísérleteinkben az alap-tenyésztés anaerob módon nőtt fel, majd átoltottuk aerob környezetbe (20% oxigén), majd újra vissza anaerob viszonyok közé, mindvégig megvilágítás alatt. Ezekkel az átmenetekkel nagy és karakterisztikus változásokat tudunk előidézni az antennák összetételében, az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosításban és a PSU-ek kapcsolódásában.

### *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 fotoszintetikus egységeinek funkcionális átalakulásai

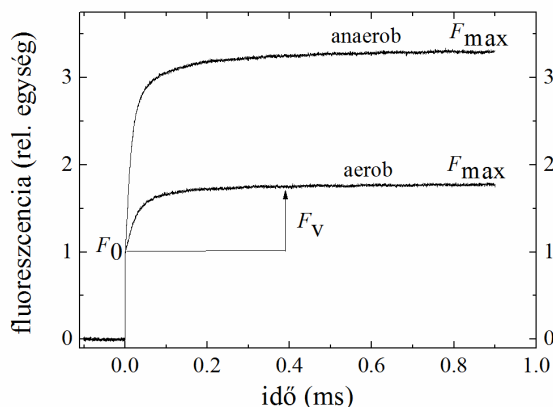
A steady-state abszorpciós spektrumokat az aerob és anaerob tenyésztés során bizonyos időközönként többször felvettük. A mért abszorpciós spektrumokból hiperbola

hátteret vontunk le, majd az antennák abszorpciós sávjainak megfelelően (B800, B850, B875), Gauss görbékkel három komponensre bontottuk fel (4.1. egyenlet). A 4.2.1 ábrán az antennakomplexben bekövetkező változások láthatóak. Aerob körülményekhez való adaptálódás kezdetén (4.2.1a) az LH2 antennák 800 és 850 nm-nél mért sávjában nem látható nagy változás. Ezzel szemben az alapvetően is domináns LH1 belső antenna 875 nm-es sávja még nagyobb területet foglal el.

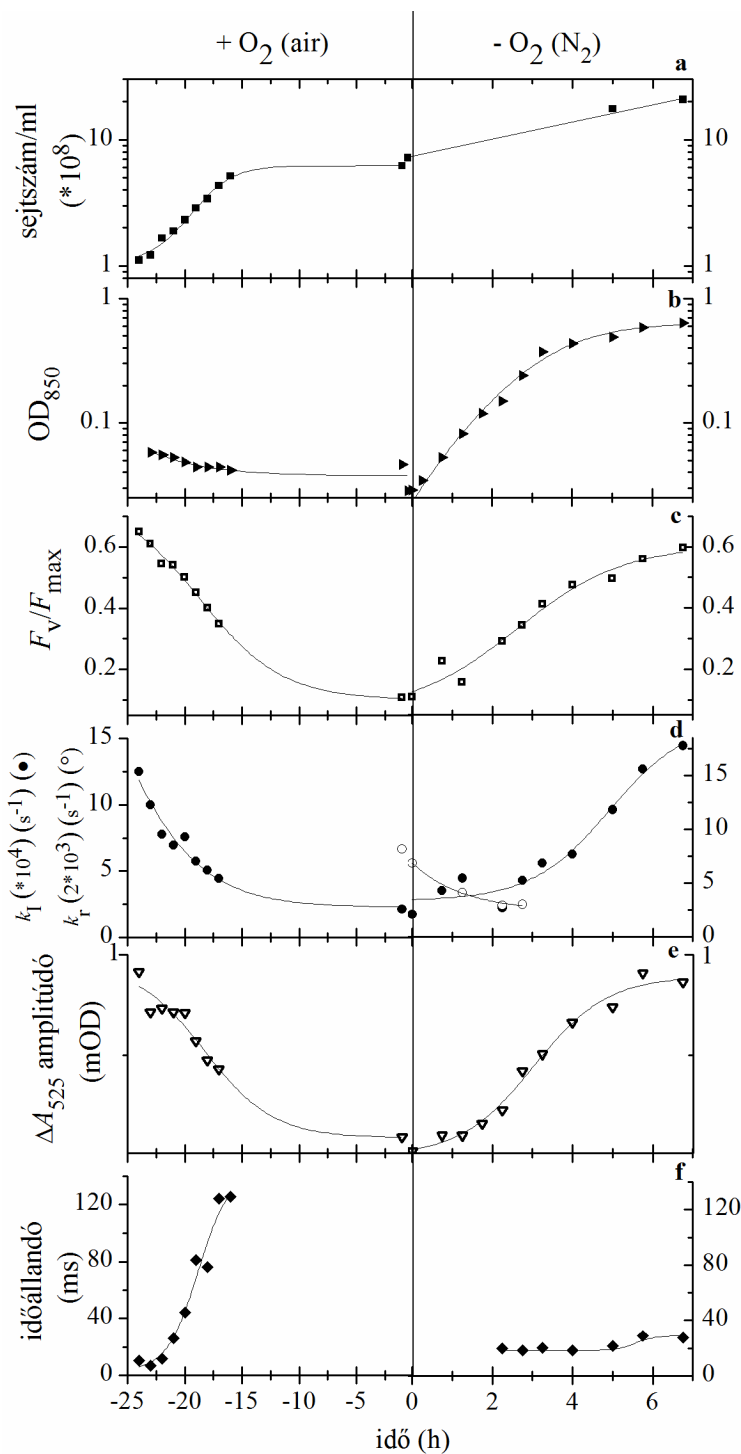


**4.2.1. ábra** Szobahőmérsékleten aerob (a) és anaerob (b) körülmények között nevelt *Rba. sphaeroides* 2.4.1 közeli infravörös, steady-state abszorpciós spektrumai. A spektrumokat három Gauss komponens összegére bontottuk, amelyek centrális hullámhosszaik 800 nm, 850 nm (LH2) és 875 nm (LH1) voltak.

A Bkl fluoreszcencia indukciós kinetikák rendkívül érzékenyek az aerobizálásra. A változó fluoreszcenciában ( $F_v$ ) nagy csökkenés látható. A változó fluoreszcencia szemlélteti a fotoszintetikus apparátusnak az abszorbeált fényenergia fotokémiai hasznosítását. Ha kisebb a változó fluoreszcencia mértéke, akkor a fotokémiai energiaátalakítás is kisebb.



**4.2.2. ábra** Jellegzetes fluoreszcencia indukciós kinetika a lézerdíóda által kibocsátott téglalap alakú fényerjesztés hatására ép *Rba. sphaeroides* 2.4.1 sejteken aerob és anaerob tenyésztési körülményeknél. A fluoreszcenciát a kezdeti  $F_0$  szintre vonatkoztatjuk.

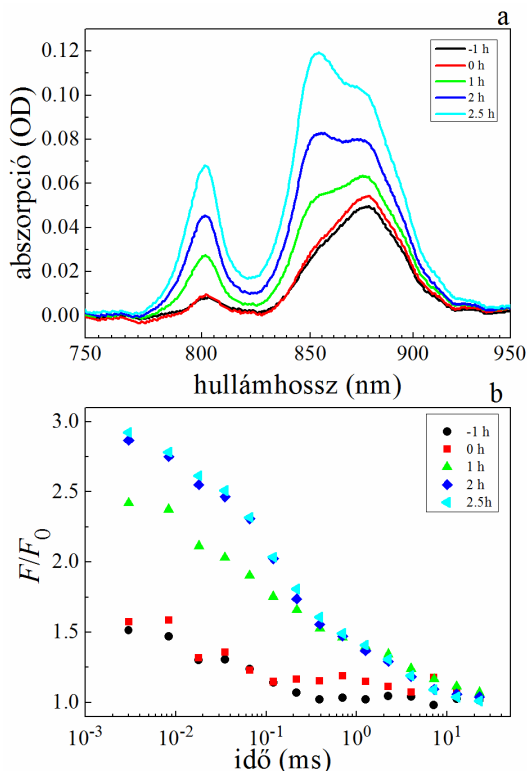


A 4.2.3. ábrán összefoglalva láthatóak a fakítás és zöldítés során a sejtszámban, a fluoreszcencia indukcióban és a relaxációban, antennák összetételében és a membránenergetizációban történő változások. A fakítás alatti membránleépülés lassabban (24 óra) megy végbe, mint a zöldítés alatt bekövetkező újjáépülés (6 óra).

**4.2.3. ábra** Idő-függő strukturális és funkcionális változások a *Rba. sphaeroides* fotoszintetikus membránjában aerob (+O<sub>2</sub>) → anaerob (-O<sub>2</sub>) átmenetnél. Növekvő sejtszám (a). Csökkenő LH2 mennyiség (aerob), majd exponenciális emelkedés (anaerob) (b), hasonló változások láthatóak a  $F_v/F_{max}$  (c), a sebesség konstansokban ( $k_1$ ,  $k_r$ ) (d) és az elektrokróm-eltolódás amplitúdójában. Végül az elektrokróm jel lecsengési ideje látható (f).

A sejtszám növekedése (4.2.3a) az anaerob→aerob váltás után 10 órával beáll egy plató szintre és azután sem mutat jelentős növekedést, miután visszaállt az anaerob feltétel. Az LH2 antenna 850 nm-es sávja nem mutat jelentős változást aerob körülmények között, viszont jelentős növekedésnek indul már az első óra után anaerob viszonyoknál (4.2.3b). A steady-state abszorpciós spektrumok jelentős változásokra hívják fel a figyelmet az antennák összetételében (4.2.1 és 4.2.4a).

A zöldítés során az első 1 órában még a LH1 komplex (875 nm) dominál, majd 2 óra elteltével már a LH2 (800 nm és 850 nm) veszi át ezt a tendenciát. A spektrumokban történő nagy átalakulások háttérben az állhat, hogy jelentős változás következhet be a Bkl sztöchiometriájában és /vagy az antenna komplexek elrendeződésében. A Bkl fluoreszcencia  $F_v/F_{max}$  értékében (4.2.3c) markáns különbségek vannak. Lassú csökkenéssel indul aerob környezetben, és körülbelül 1 nap alatt 0.7-ről 0.1-re esik vissza. Ezután az anaerob atmoszféra mellett 6 óra alatt visszaáll az eredeti magas értékre. A gyors emelkedés háttérében a változó rész ( $F_v$ ) gyors emelkedése áll, mert az  $F_{max}$  értéke közel állandó volt. A fluoreszcencia indukció ( $k_I$ ) és a relaxáció ( $k_r$ ) sebesség konstansai a 4.2.3d ábrán láthatóak. A fluoreszcencia indukció kinetikája, jól megközelíthetően monoexponenciális jellegű. A fluoreszcencia sötét relaxáció összetettebb (multiexponenciális) kinetikát mutat (4.2.4b).



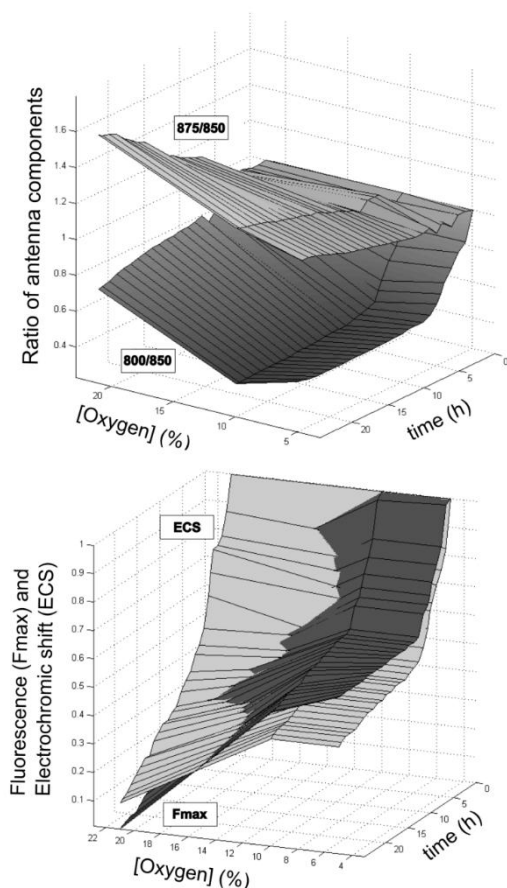
**4.2.4. ábra** Sejtek steady-state abszorpciós spektrumai (a) és a Bkl fluoreszcencia relaxációs kinetikái (b) az ICM képződésekor ( $t = 0$ , aerob  $\rightarrow$  anaerob átmenet). LH1 belső antenna (875 nm) és LH2 perifériális antenna (800 és 850 nm) abszorpciós spektrumai (a). A fluoreszcencia indukciót (itt nincs feltüntetve) gyors sötét relaxáció követi, a kinetikák csak csekély lassulást mutatnak a zöldülés során.

A fluoreszcencia relaxáció sebesség konstansa (4.2.3d) megközelíti a komponensek amplitúdójával súlyozott sebesség konstansok átlagát. A származtatott sebesség konstansok összefüggésben állnak a PSU-ek méretével, kapcsolódásaikkal és az elektrontranszfer sebességével (Koblizek és mtsai. 2005; Rivoyre és mtsai. 2010; Maróti és Asztalos 2012). A fényindukált elektrokróm abszorpcióváltozás amplitúdója (4.2.3e) és a lecsengési ideje (4.2.3f) ellentétes változásokat mutat a fakítás és a zöldítés során. Oxigén hatására drasztikusan lecsökkenő fotoaktív RC száma miatt megnő a membrán tárolási kapacitása. Az újonnan képződő membránban az elektromos potenciál jelentősen gyorsabban sül ki.



Az ICM képződését gátolja a magas oxigén koncentráció. Ha növeljük az oxigén részleges nyomását, akkor bomlást tapasztalunk az ICM-ban és a fotoszintetikus komplexekben. Ezeknek a folyamatoknak a kinetikáját mutatja be a 4.2.5. ábra az oxigén koncentráció függvényében. A pigmentek lebomlása anaerob → aerob váltásnál egyre gyorsabb és kifejezettebb, ha növekszik az oxigén koncentráció. A LH komplexek Bkl komponenseinek lebomlását ábrázolja a 4.2.5a ábra, mégpedig B800/B850 (LH2) és B875/B850 (LH1/LH2) arányban az oxigén koncentráció növekedésének függvényében. A LH2 antenna komplex B800 komponense bomlik el leghamarabb. Néhány óra alatt ~50%-kal esik vissza, viszonylag kevés ~5% oxigén koncentrációnál, viszont a B850 komponensen még nem mutatkozott változás. Ez annak tudható be, hogy a LH2 antenna komplexekben eltérő a két Bkl gyűrű elhelyezkedése (Papiz és mtsai. 1995). A 9 gyengén kapcsolódó B800 sáv Bkl-jei a külső gyűrűt, a 18 erősen kapcsolódó B850 sáv Bkl-jei pedig a belső gyűrűt alkotják a komplexben. Ez okozza a B800 sebezhetőségét. Az elektrokróm-shift kezdeti felemelkedése (töltés szétválasztás a RC-ban) és a fluoreszcencia maximuma ( $F_{max}$ , RC-ok zárva) hasonló csökkenést mutatnak, mint a B800-as ugyanazon feltételek mellett (4.2.5b). Ez azt jelenti, hogy a RC P800 csökkenése is hozzájárul az abszorpcióban megfigyelt 800 nm-en mért

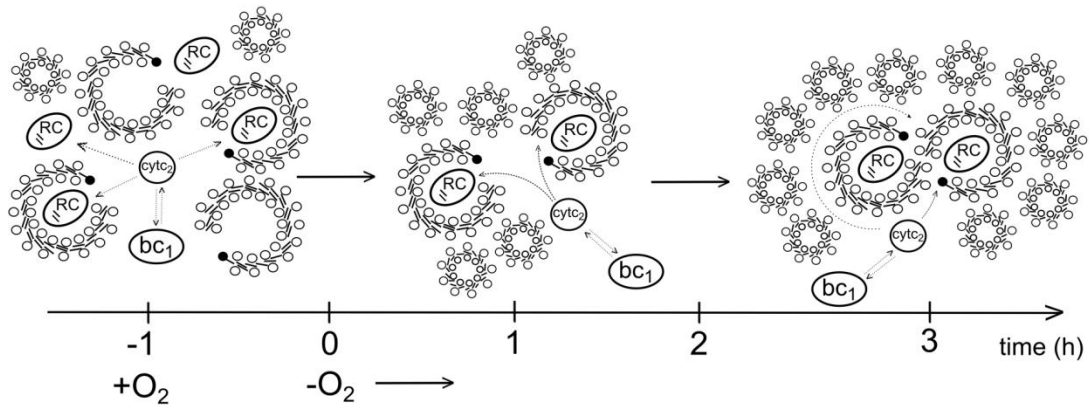
csökkenéshez, de a B800-as csökkenése a meghatározó.



**4.2.5. ábra.** Változások az antennakomplexek felépítésében: B800/B850 (LH2) és B875/B850 (LH1/LH2) (a), a fluoreszcencia indukció maximumában ( $F_{max}$ ) és a fényindukált elektrokróm abszorpcióváltozásban (ECS) (b) az idő és az oxigén koncentráció függvényében (0-21 %). A kinetikák 1-re vannak normálva, a  $t = 0$  időponthoz. Az oxigén elsődleges célpontjai a B800-as pigment és a RC komplex, ami már kevesebb, mint ~5% oxigén koncentráció mellett jelentkezik (az ábrát Sipka Gábor készítette).

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy zöldítés során a fotoszintetikus apparátus egymásra épülő funkcionális egységeként áll újra össze, nem pedig egy lépésben (Koblizek

és mtsai. 2005, Niederman 2006). A főbb eseményeket a 4.2.6. ábra foglalja össze.



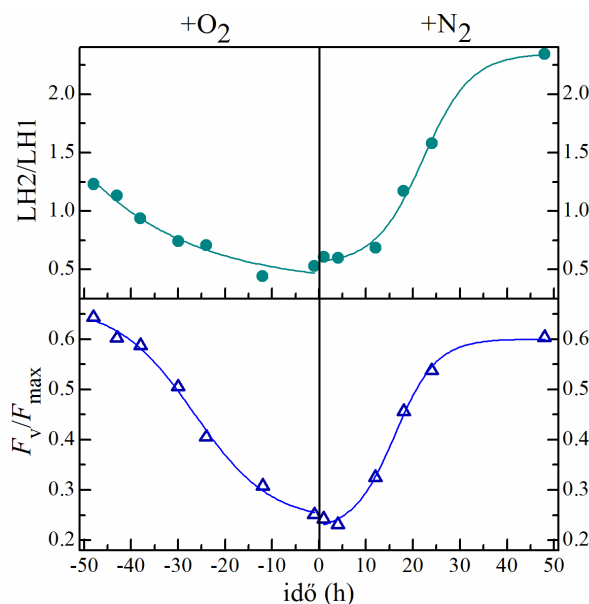
**4.2.6. ábra.** Zöldítés során kialakuló fotoszintetikus apparátus grafikus ábrázolása. Kezdetben az egységek szórtan, kapcsolat nélkül helyezkednek el, ezért a fotokémia teljesítménye és sebessége alacsony, viszont az azonnal elérhető fehérje egységek (RC és cit  $bc_1$ ) között a mobilis redox elemek (cit  $c_2$  és Q) magas elektrontranszfer sebességet hoznak létre. Később a PSU közötti kapcsolódás megnő (1-2 óra) és a struktúra tömörebb lesz, ami gyorsabb fotokémiát eredményez. Végül a perifériális LH2 antennák a RC-LH1 komplex köré szerveződnek és egy zártabb szuperkomplexet hoznak létre. Így a disztálisan elhelyezkedő RC nehezebben elérhető a mobilis redox elemek számára, ami a elektron transzfer sebességében lassulást idéz elő (Cartron és mtsai. 2014).

Aerob körülmények mellett nagyon kevés ép RC-LH1-PufX komplex van és a CM betűródései is megszűntek, a fény befogás és az elektrontranszfer is inaktív. Az anaerob viszonyokhoz való adaptálódás kezdetén a CM elkezd betűródni, és újra kialakul az ICM. A perifériális LH2 antennák a folyamatosan összeálló mag komplex köré csoportosulnak. Ez a kezdeti laza struktúra nagy elektrontranszfer sebességet mutat, mert a cit  $c_2$  számára könnyen hozzáférhetőek a RC és a cit  $bc_1$  komplexek. Az egyre több mag komplex kialakulásával és az azokat körülvevő perifériális antennák felhalmozódásával a membrán egyre tömörebbé válik, a disztális helyzetben lévő RC-LH1-PufX dimerek nehezebben megközelíthetőek a cit  $c_2$  számára. Ezáltal a mobilis redox elemek diffúziója részlegesen akadályozott. 3-4 órával az anaerobizálás után kialakul az ép fotoszintetikus apparátus és az elektrontranszportlánc optimálisan működhet. Ezt a következtetést alátámasztja az ICM kialakulásának nagy fényintenzitáshoz való adaptálódása utáni funkcionális fehérje analízise *Rba. sphaeroides*nél (Woronowicz és mtsai. 2011). Hasonló mechanizmusokat írtak le PSI és PSII-nél cianobaktériumokban (Cline 2003).

## *Rubrivivax gelatinosus* fotoszintetikus egységeinek funkcionális átalakulásai

A *Rba. sphaeroides* után *Rvx. gelatinosus*-on is elvégeztük az anaerob  $\leftrightarrow$  aerob átmeneteket. A *Rvx. gelatinosus* is az anaerob környezetet kedveli, az antennarendszere is hasonló, az életciklusa viszont hosszabb (*vivax*-hosszú életű).

Ha az anaerob tenyészetet átoltjuk aerob (20% oxigén koncentráció) körülmények közé, akkor bomlásnak indul az ICM, és a fotoszintetikus egységek szintézise és összeszerelése is lelassul (4.2.7. ábra). Nem csak a  $F_v/F_{max}$  értékében, hanem az antennák egymáshoz viszonyított arányában is csökkenés tapasztalható a fakítás során. Ez hasonló módon történik, mint a *Rba. sphaeroides*-nél, csak hosszabb ideig tart. Miután a sejtek szinte teljesen elvesztették a fotoszintetikus aktivitásukat, visszaállítottuk az anaerob légkört, és ezzel elindult a CM betűródése, hogy újra visszarendeződhessen a fotoszintetikus apparátus. A körülbelül 2 napos fakítás után, anaerob körülmények között 10 óra után indult be a zöldítési folyamat és szintén 2 napig tartott.

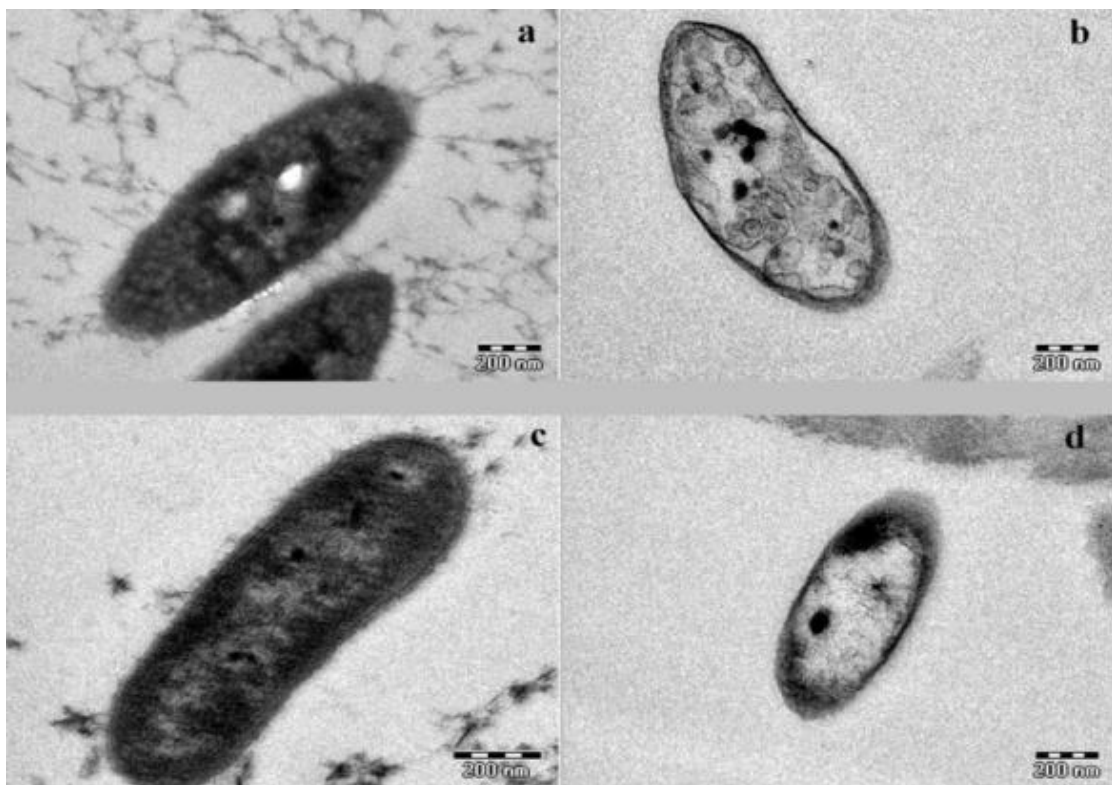


**4.2.7. ábra.** Időfüggő strukturális és funkcionális változások a *Rvx. gelatinosus* fotoszintetikus membránban aerob  $\leftrightarrow$  anaerob váltás során. A membrán lebomlását és újjáépülését jelzi a relatív változó fluoreszcenciában ( $F_v/F_{max}$ ) és a két antennakomplex közti arányban megfigyelhető változás (B850/B875, vagyis LH2/LH1).

## Morfológiai változások *Rhodobacter sphaeroides* és *Rubrivivax gelatinosus* fotoszintetikus apparátusában

A fotoszintetikus apparátusban bekövetkező funkcionális változások mellett jól megfigyelhető strukturális változások is végbemennek a *Rba. sphaeroides* és *Rvx. gelatinosus* baktériumokban, amiket megfigyelhetünk a transzmissziós

elektronmikroszkópos felvételeken. A két baktérium belső membránrendszerében vannak különbségek. *Rba. sphaeroides* belső membránrendszere jól kifejezett, szemmel láthatóak a lefűződött membránvezikulák (kromatofórák) (4.2.8a), míg a *Rvx. gelatinosus* membránrendszerében nincsenek jól kivehető vezikulák, a fotoszintetikus apparátus diffúzan van a membránban (4.2.8c). A fakítási folyamat végén készült felvételek láthatóak a 4.2.8b és d ábrán. A *Rba. sphaeroides* belső membránja teljesen átalakult, a vezikulák szétbomlottak, semmilyen struktúra sem kivehető, csak a sejtfal vonala. Mivel a *Rvx. gelatinosus* belső membránja diffúz, ezért itt nem láthatóak nagyon drasztikus változások.



**4.2.8. ábra.** Elektronmikroszkópos hosszanti irányú felvételek *Rba. sphaeroides* 2.4.1 anaerob (a) és aerob (b) tenyésztés után és ugyanez *Rvx. gelatinosus*-ról (c és d). Nagyítás 46.000x (a, b és d) és 64.000x (c).

A 4. fejezet a következő publikációk alapján készült:

**Mariann Kis**, Emese Asztalos, Gábor Sipka and Péter Maróti (2014) Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells. *Photosynth Res.* 122:261–273.

Emese Asztalos, **Mariann Kis**, Péter Maróti (2013) Oxygen-dependent production and arrangements of the photosynthetic pigments in intact cells of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis: Research for Food, Fuel and Future* 32-36. Springer.

**Mariann Kis**, Emese Asztalos, Péter Maróti (2011) Ontogenesis of photosynthetic bacteria tracked by absorption and fluorescence kinetics, *European Biophysics Journal* with Biophysics letters, Supplement 1. (40): 177

Asztalos Emese, **Kis Mariann**, Maróti Péter (2010) Aging of photosynthetic bacteria monitored by absorption and fluorescence changes. *Acta Biologica Szegediensis* 54:149-154.

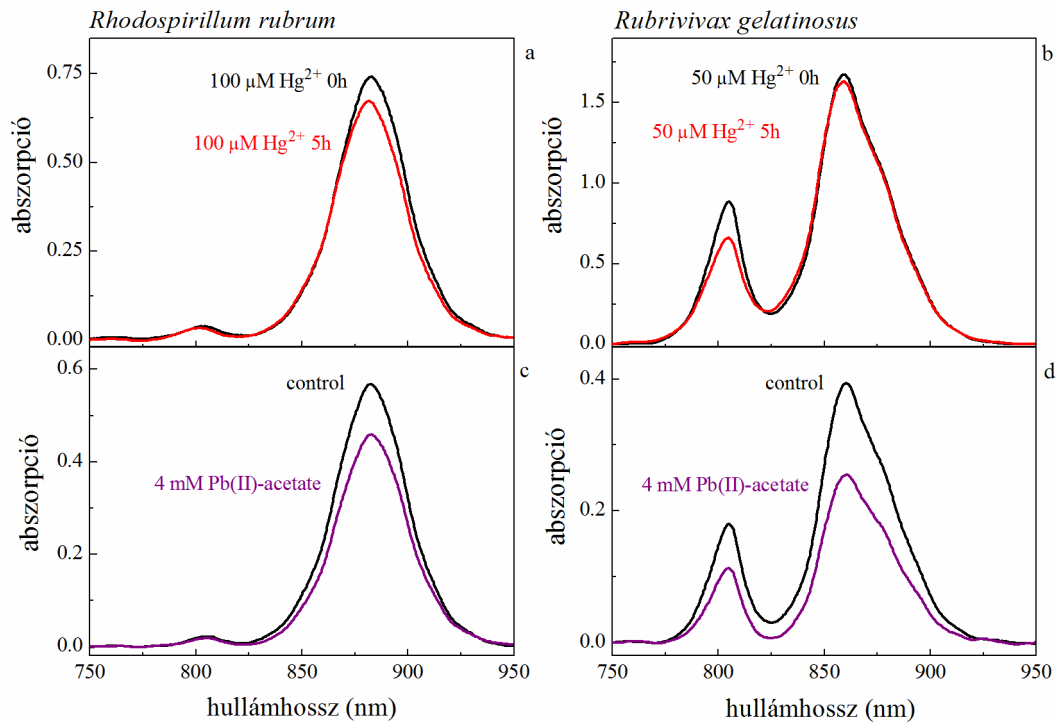
## 5. Nehézfémek

### 5.1 Fiziológiai és morfológiai hatások

Az emberi tevékenységek hatására a környezetbe egyre nagyobb mennyiségű és egyre többféle nehézfém kerül, és dúsul fel mind a vizekben, mind a szárazföldeken. A mikroorganizmusok részt vesznek a környezetükbe található fémek átalakításában a fémionokhoz kapcsolt anyagcsere folyamatok révén. Fontos szerepet játszanak a fémionokhoz kapcsolt transzportfolyamatok felderítésében, illetve a sejtekben akkumulálódó nehézfém ionok toxikus hatásainak megfigyelésében. Több kutatás is irányult már a nehézfémek és a fotoszintetikus mikroorganizmusok (zöld algák, cianobaktériumok és proteobaktériumok) között fellépő kölcsönhatásra. Az általunk használt fotoszintetikus bíborbaktériumok (*Rba. sphaeroides* 2.4.1 (Moore és Kaplan 1992), *Rsp. rubrum* (Watt és Ludden 1995) és *Rvx. gelatinosus*) egymástól eltérő a membrán struktúrájuk, az antenna komplexek összetétele és a RC által szabályozott elektrontranszfer tulajdonságai. Különböző nehézfémekkel (Hg(II), Cr(VI) és Pb(II) ionokkal) való kezeléseknél vetettük alá a baktériumokat, hogy jellemezni tudjuk a fotoszintetikus membránban bekövetkező változásokat.

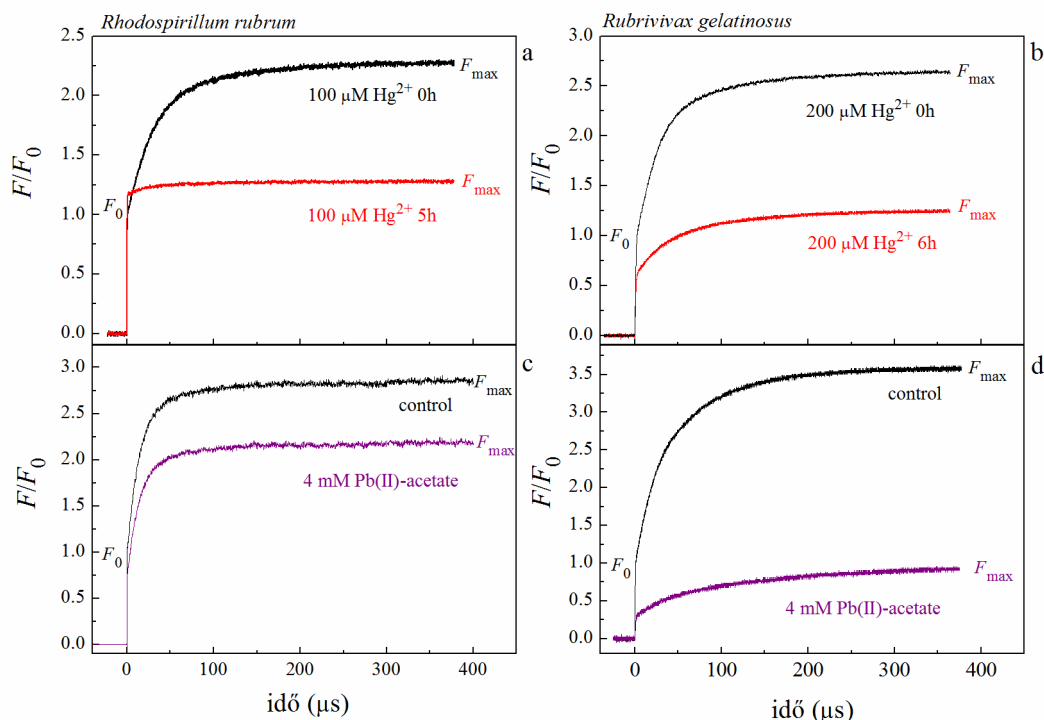
#### *Higany (II) ion*

A Hg(II) ion az egyik legtoxikusabb nehézfém, ami a természetben található. Az általunk rutinszerűen használt vizsgálati módszerek (fényindukált abszorpcióváltozás és Bkl fluoreszcencia indukció) kellően érzékenyek a Hg(II)-ion okozta roncsolás detektálásához. Az antennákban okozott károsodás jól látható a közeli infravörös tartományban mért abszorpciós spektrumokon. A *Rsp. rubrum* perifériális antennái (a sávok abszorpciós maximumai szerint) 800 és 880 nm-nél, a domináns belső antenna pedig 890 nm-nél látható (5.1.1a). A *Rvx. gelatinosus* perifériális antennái 800 és 860 nm-nél, a belső antenna 875 nm-nél helyezkedik el (5.1.1b). Aktív anyagcserejű exponenciális fázisú tenyészeteket vetettünk alá higanykezelésnek, majd 5 óra elteltével figyeltük meg a különbségeket. Az antennák felépítéséből adódik, hogy a belső antenna nehezebben megközelíthető a *Rvx. gelatinosus*-nál, ezért ott enyhébb a károsodás, mint a B800 pigment esetében, ami a LH2 komplex külső gyűrűjét alkotja. A *Rsp. rubrum* esetében, ahol a perifériális antenna nem túl kifejezett, az elsődlegesebb célpont a belső antenna.

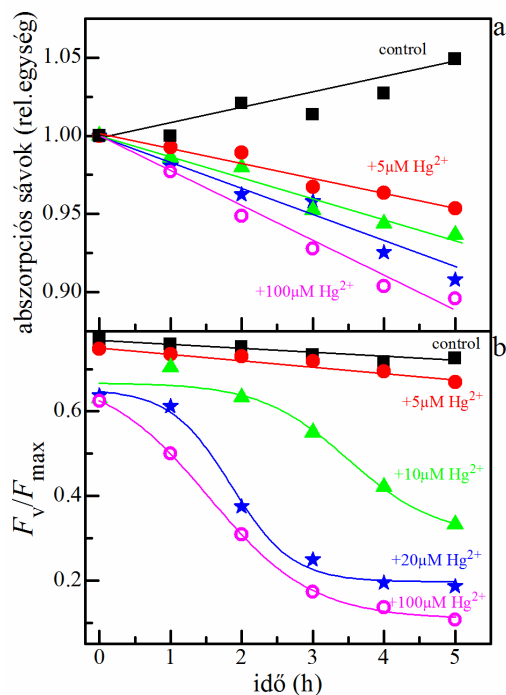


**5.1.1. ábra.** Változások a közeli infravörös tartományban mért *Rsp. rubrum* (bal oldal) és *Rvx. gelatinosus* (jobb oldal) egész sejtek abszorpció spektrumaiban. Az exponenciális fázisú sejtek higany (a és b) és ólom (c és d) kezelést kaptak miközben folyamatosan fényben tartottuk őket. A higany estében lassú időbeli változás tapasztalható (0 és 5 óra összehasonlítva), míg az ólomnál azonnali hatás.

A Bkl fluoreszcencia indukció mérése igen kifinomult mérési módszer a fotoszintetikus kapacitásban történő változások leírására. A fluoreszcencia indukció kinetikája monoton növekedést mutat a kezdeti  $F_0$  szintről a maximális  $F_{\max}$  szintre. A kettő különbsége a változó fluoreszcencia ( $F_v = F_{\max} - F_0$ ). A relatív változó fluoreszcencia ( $F_v / F_{\max}$ ) értéke jól jelzi a RC-nak a fotokémiában betöltött szerepét. Ha ez a szám 0.8 körüli, akkor a RC és az antenna komplexek szorosan kapcsolódnak. Bármilyen változás a RC-LH struktúrában és funkcióban a változó fluoreszcencia ( $F_v$ ) csökkenését eredményezi. A 5.1.2a és b ábrán látható, hogy higany kezelés hatására a struktúrában teljes leépülés következett be.



**5.1.2. ábra.** Változások *Rsp. rubrum* (bal oldal) és *Rvx. gelatinosus* (jobb oldal) egész sejtek fluoreszcencia indukció kinetikáiban. Az exponenciális fázisú sejtek higany (a és b) és ólom (c és d) kezelést kaptak miközben folyamatosan fényben tartottuk őket. A higany estében lassú időbeli változás látható (0 és 5 óra összehasonlítva), az ólom pedig azonnali hatást vált ki. A kinetikákat normáltuk a kezeletlen minta  $F_0$  szintjére.



A 5.1.3. ábrán időfüggésben szerepel a *Rsp. rubrum* abszorpciós spektrumaiban (a) és fluoreszcencia indukcióban (b) történő ronsolódás bemutatása különböző higany koncentrációknál.

**5.1.3. ábra.** Időbeli változások a *Rsp. rubrum* közeli infravörös steady-state abszorpciós spektrumában (a) és a relatív változó fluoreszcencia kinetikáiban (b). A sejtek különböző koncentrációjú higanykezelést kaptak folyamatos megvilágítás mellett. Az abszorpciós spektrumokat Gauss komponensekre bontottuk.

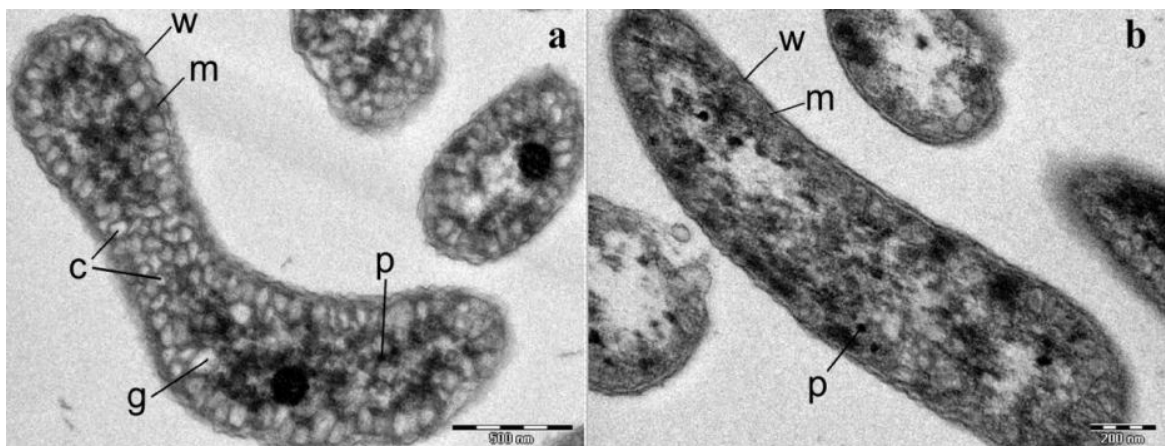
Észrevehető különbség van a kezeletlen (kontrol) és a higany kezelt minták abszorpciós sávjai (B890) között. A higanyal kezelt sejtek abszorpciós sávjában 10 %-os csökkenés látható 5 óra után folyamatos megvilágítás mellett (5.1.3a), míg a



kezeletlen sejteknél 5 %-os növekedés van. A relatív változó fluoreszcenciában ( $F_v/F_{max}$ ) nagy esés következik be (0.6-ról 0.1-re) az 5 óráig tartó 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú  $\text{Hg}^{2+}$  hatására.

A különböző törzsek fotoszintetikus apparátusai eltérően érzékenyek a higanyszennyezésre. A *Rvx. gelatinosus* 860 nm-es abszorpciós sávja nagyobb rezisztenciát mutat, mint a *Rsp. rubrum* 860 nm-es sávja (5.1.1a és b). Ha összehasonlítjuk a RC által létrehozott elsődleges fotokémiákat, akkor megállapíthatjuk, hogy a *Rvx. gelatinosus* sejtek magasabb rezisztenciát mutatnak a higany roncsoló hatásával szemben, mint a *Rsp. rubrum* sejtek (5.1.2a és b). A *Rsp. rubrum* sejtek fotokémiáját már a 20  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  koncentráció 2-3 óra alatt leépíti, a *Rba. sphaeroides* növekedési sebességét már 2  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  lefelezi, viszont a *Rvx. gelatinosus*-ban 200  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  sem okoz nagyobb mértékű károsodást (5.1.2.b). Ezek azt bizonyítják, hogy a *Rsp. rubrum* és a *Rba. sphaeroides* jóval érzékenyebbek a higanyszennyezésre, mint a *Rvx. gelatinosus*.

A higany(II) ionoknak az ICM-ban és a fotoszintetikus apparátusban okozta funkcionális roncsolódásait összefüggésbe állítottuk a struktúrában bekövetkező morfológiai változásokat bizonyító transzmissziós elektronmikroszkópos felvételekkel (5.1.4. ábra). A kezeletlen sejtben jól láthatóak a CM befűződése, az ICM vezikulái és a többi meghatározható sejtalkotó. A membránvezikulák nagy számban fordulnak elő a külső membrán közelében is (5.1.4a). Összhangban az elvesztett fotoszintetikus aktivitással, a 24 órás 10  $\mu\text{M}$ -os  $\text{Hg}^{2+}$  kezelés után a vezikulák és a sejtalkotók már nem kivehetőek a felvételeken (5.1.4b).



**5.1.4. ábra.** Hosszanti és keresztirányú elektronmikroszkópos felvételek *Rsp. rubrum* baktériumnak fényben, anaerob módon növesztett (a) és 24 órás 10  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  kezelést kapott sejtjeiről (b). A képeken

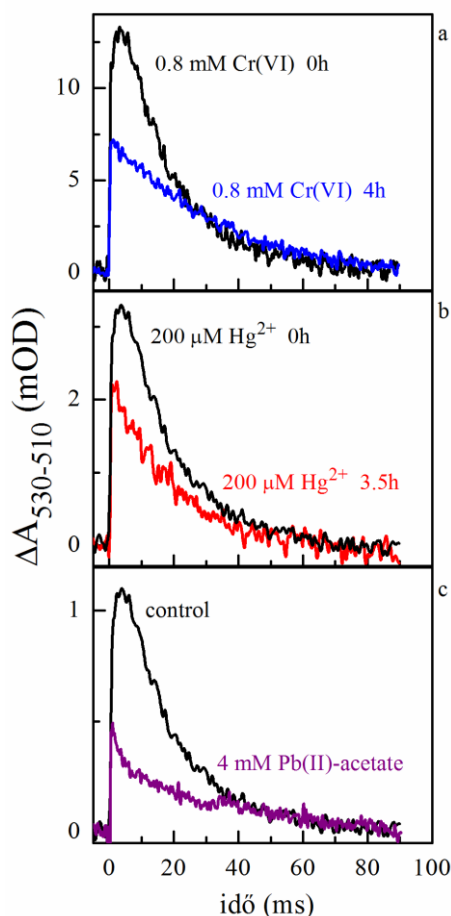
bejelöltük a sejt struktúráit: sejtfa (w), sejtmembrán (m), kromatofórák (c), glikogén szemcsék (g) és polifoszfát szemcsék (p). Nagyítás: 34.000x (a) és 64.000 (b).

A környezetben felhalmozódott  $\text{Hg}^{2+}$  ionok adszorbeálódnak a sejtek felszínén, majd különböző transzportfolyamatokat használva bejutnak a sejt belsejébe, és kifejtik roncsoló hatásukat. A higany ionoknak nincsen fiziológiai funkciója, de egyes baktériumok képesek átalakítani más vegyületekké, szerves kötésbe vinni, ezáltal létrehozva az élőlények számára legmérgezőbb metil-higany vegyületeket. Ezen kívül a sejtek enzimatikusan (higany reduktázzal vagy glutation reduktázzal) detoxifikálják a higany ionok egy részét, amennyiben képesek a Hg kationokat fémes higannyá redukálni (Schiering és mtsai. 1991). Az átalakíthatatlan  $\text{Hg}^{2+}$  ionok passzív diffúzióval elhagyhatják a sejteket (Silver és Phung 1996). A higany ionok a bioakkumuláció során nagy affinitással kötődnek a tiol-csoportokhoz. Bejutva a sejtbe károsítják az alapvető molekulák szintézisének útvonalait és a meglévő komplexeket, köztük a fotoszintetikus apparátust is (5.1.1-5.1.3 ábrák). A fotoszintetikus komplexek közül a RC az elsődleges és egyben a legérzékenyebb célpontja a higany ionok károsító hatásának (Asztalos és mtsai. 2012). Kevésbé érzékenyek a cit  $bc_1$  komplex és a fénybegyűjtő antennák. Ezek mellett figyelemre méltó, hogy a RC fehérje egészen magas higanyion koncentráció mellett még képes egy ideig a fényindukált töltésszétválasztásra ( $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}] < 500$ ), de a belső elektron transzfer már sokkal alacsonyabb koncentráció mellett akadályozott. A legérzékenyebb reakció a  $Q_B$ -hoz kötődő elektrontranszfer, amit már kis higany koncentráció ( $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}] < 50$ ) is blokkolni képes.

### *Króm(VI) ion*

A króm ionok egyrészt esszenciális nyomelemek (Cr(III)), másrészt viszont környezetben előforduló mérgező anyagok is lehetnek. A Cr(III) ionok immobilizáltak fordulnak elő, és kötött állapotban szerves anyagok részeként talajban és vizes közegben teljesen ártalmatlanok. Ezzel szemben a Cr(VI) ionok erősen oxidáló hatásúak, jól oldódnak vízben és mobilisak a környezetben, valamint toxikus, mutagén, teratogén és karcinogén hatással vannak minden élőlényre. A króm oxianionok ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) a sejtek felszínén lévő anion transzportáló csatornákat használják az átjutáshoz. A talajban és a vizekben a Cr(III) oxidációjával keletkeznek a Cr(VI) ionok. Egyes mikroorganizmusok a toxikus Cr(VI) ionokat Cr(III) ionokká képesek redukálni. Ez az

átalakítás gyorsabb és hatékonyabb acidikus vízi környezetben (McGrath és Smith 1990).



A Cr(VI) ionok erősen toxikus hatását mutatja a *Rvx. gelatinosus* sejteknek az 530 nm-en mért fényindukált abszorpcióváltozásában (elektrokrom-eltolódás) bekövetkező csökkenés, amely kevésbé kifejezett, mint a hasonló hatást kiváltó Hg(II) és Pb(II) nehézfémionok keltette abszorpcióváltozás (5.1.5. ábra).

**5.1.5. ábra.** *Rvx. gelatinosus* 530 nm-nél mért (ref. 510 nm) fényindukált abszorpcióváltozásai (elektrokrom-shift). A sejtek 0.8 mM Cr(VI), 200  $\mu$ M Hg(II) és 4 mM Pb(II) kezelést kaptak. A króm (a) és higany (b) estében lassú időbeli változás látható (0 és 4 óra, 0 és 3.5 óra összehasonlítva), az ólomnál (c) pedig azonnali hatás tapasztalható.

Magasabb koncentrációban (20 mM) alkalmazott Cr(III) ionoknak semmilyen hatása sem volt az elektrokrom jel amplitúdójára és kinetikájára (nincs bemutatva). A 0.8 mM koncentrációban

alkalmazott Cr(VI) a gyors felemelkedő fázist a felére csökkenti, megszünteti a felemelkedő fázis lassú komponensét, és elmozdítja a gyors komponensét, de megtartja a lecsengés lassú fázisát. Ezek értelmezésének háttérében a Cr(VI) blokkoló hatása áll, amely jelentékenyen megváltoztatja a RC és cit *bc*<sub>1</sub> komplex között az elektron- és protontranszfert.

### Ólom(II) ion

Az ólom is az egyik legveszélyesebb környezeti szennyezőanyagok közé tartozik. Már nagyon kis koncentrációban erősen toxikus az élőlények számára. Könnyen kötődik a szulfhidril csoportokhoz (Pearson és Schonfeld 2003). Akut és krónikus mérgezés esetén is roncsolja a DNS-t, a fehérjéket és a lipideket, az enzimekből kiszorítja az esszenciális fémeket (cink, vas, kalcium) és beül a helyükre (Dart és mtsai. 2004). Az ólom(II) ionok agresszív viselkedését tükrözik a fentebb bemutatott ábrákon az abszorpciós spektrumokban (5.1.1c és d), a Bkl fluoreszcencia indukcióban (5.1.2c és d)

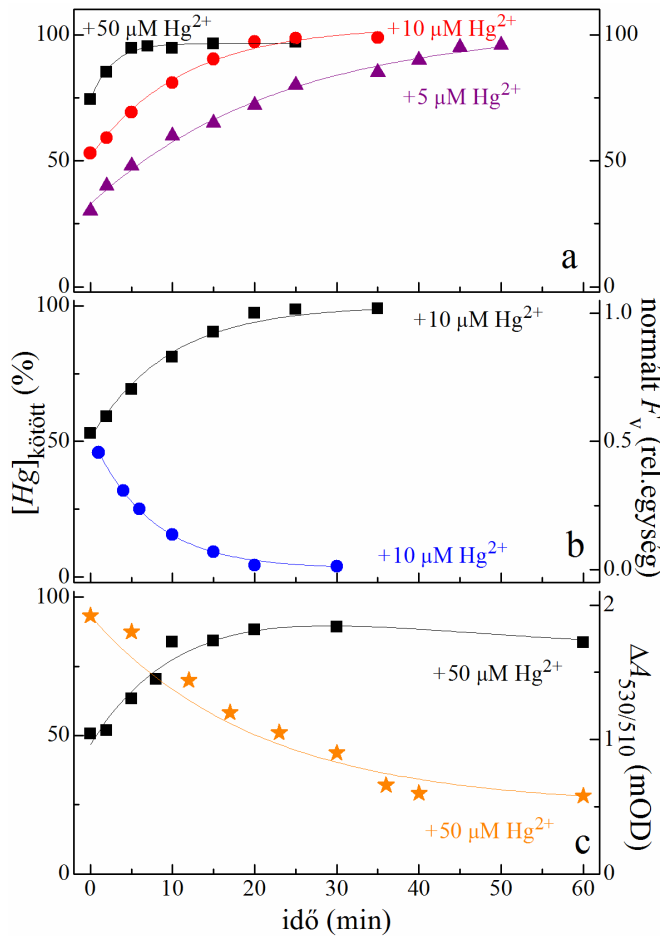
és a fény indukált abszorpcióváltozásban (5.1.5c) megfigyelhető prompt hatások. Az abszorpciós spektrumokban látható csökkenés nem specifikus, hanem általános. Már néhány mM koncentrációban azonnali és jelentős a roncsolás az antennakomplexekben. A Bkl fluoreszcencia indukció kinetikák hasonlóan gyors változást mutatnak. Az ólom kezelés egyaránt csökkenti az  $F_0$  és az  $F_{\max}$  fluoreszcencia szinteket anélkül, hogy a változó fluoreszcencia ( $F_v/F_{\max}$ ) jelentősen módosulna. Ez a hatás ellentétes a higany okozta késői hatással, amikor a változó fluoreszcencia csökken anélkül, hogy a  $F_0$  változna. A fény indukált abszorpcióváltozás amplitúdójának csökkenti, másrészt pedig akadályozza a membrán-kondenzátor kisülésének gyors komponensét. A prompt hatások háttérében az állhat, hogy az ólom nagyon gyorsan átjut a sejtfalon és gyorsan eljut a komplexekhez. Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy a fotoszintetikus baktériumok érzékeny eszközei lehetnek a környezetszennyezés monitorozásának.

## **5.2 *Rubrivivax gelatinosus* sejtek higanyfelvételének kinetikája és sztöchiometriája**

### *Kinetika, energetizáció és pH függés*

A fotoszintetikus baktériumok a higany ionokat két egymástól jól elkülöníthető lépésben veszik fel (5.2.1. ábra). Az első fázis olyannyira gyorsan zajlik le, hogy a felemelkedési idő a mi kísérleti körülményeink között nem feloldható. Ez a lépés visszatükrözi a Hg(II) ionok gyors adszorpcióját a sejtfal felületi csoportjaihoz, és egy olyan nem specifikus passzív diffúziót a sejtmembránon keresztül, amely a higany koncentráció gradiensevel ellentétes irányban hat (Fick 1. törvénye). Ezen kívül megfigyeltünk egy második fázist is, amely kisebb időskálán zajlik (a kinetikája perces nagyságrendű). A második fázis felemelkedésének a nagysága és ideje is függ a Hg(II) koncentrációtól (5.2.1a). A higanyfelvétel gyors fázisa is függ a higany koncentrációtól, mert a függőleges tengelymetszet emelkedik a higany koncentráció növelésével. A gyors higany invázióra a sejten belüli érzékeny sejtalkotók (mint markerek) rövidebb-hosszabb késéssel reagálnak. Ahogy a sejtek felveszik a higanyt, a fotoszintetikus apparátus roncsolódása elkezdődik, amely jelenséget felhasználhatjuk a Hg-transzport jellemzésére. A lassú fázisú higanyfelvétel detektálása mellett, a Bkl fluoreszcencia változó részét (5.2.1b) és a membrán karotenoid elektrokróm shiftjét (5.2.1c) is mérjük. A higany felvétellel párhuzamosan ezek csökkenő kinetikákat mutatnak a kezeletlen

mintával szemben. A lecsengési idők összeegyeztethetőek a higany felvétel lassú fázisának felemelkedési idejével.

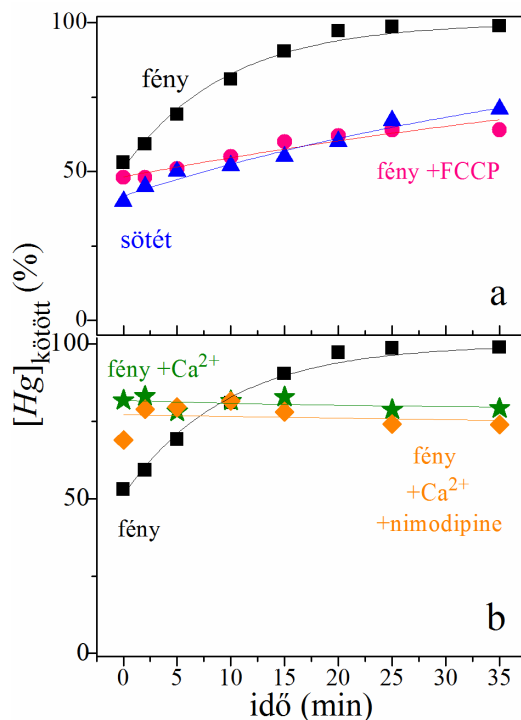


**5.2.1. ábra.** *Rvx. gelatinosus* gyors és lassú higanyfelvételi fázisai különböző higany koncentrációknál (a) és ezek kinetikai összefüggésben állnak a sejt belső fotoszintetikus markereivel, úgy mint a Bkl fluoreszcencia indukció változó részével ( $F_v$ ) (b) és az 530 nm-nél (ref. 510 nm) mért fény indukált abszorpcióváltozással (elektrokrom shift) (c). A sejtek  $\text{HgCl}_2$  kezelése után a kötött  $\text{Hg(II)}$  ionok mennyiségének meghatározása spektrofotometriás úton dithizon próbával történt. A sejteket a higany kezelés során végig fényben tartottuk (sejtszámok:  $1 \cdot 10^6$  (a, b) és  $1 \cdot 10^8$  sejt/mL (c)). A lassú fázis felemelkedési ideje ( $t_{1/2}$ ) függ a higany koncentrációtól ( $\blacksquare 50 \mu\text{M Hg}^{2+}$ ,  $t_{1/2} = 3$  perc;  $\bullet 10 \mu\text{M Hg}^{2+}$ ,  $t_{1/2} = 11$  min;  $\blacktriangle 5 \mu\text{M Hg}^{2+}$ ,  $t_{1/2} = 23$  min) (a).  $10 \mu\text{M Hg}^{2+}$ -nál a Bkl fluoreszcencia változó részét a kezeletlen

esethez viszonyítottuk ( $0 \mu\text{M Hg}^{2+}$ ), amely jól jellemzi a fotoszintetikus apparátus roncsolódását. A féléletidők: 7 perc ( $F_v$ ,  $\bullet$ ) és 10 perc ( $[\text{Hg}]_{\text{kötött}}$ ,  $\blacksquare$ )(b).  $50 \mu\text{M Hg}^{2+}$ -nál a fényindukált elektrokróm változás jelzi az elvesztett fotoszintetikus aktivitást. A féléletidők: 17 perc ( $[\text{Hg}]_{\text{kötött}}$ ,  $\blacksquare$ ) és 20 perc ( $\Delta A_{530/510}$ ,  $\star$ ) (c).

A kinetika lassú fázisa a transzportfolyamatok energia igényét mutatja be. A higanyfelvétel nagysága növekszik, ha megvilágítás hatására a membrán energetizálódik (5.2.2. ábra). Ha a fotoszintetikus baktériumot folyamatos megvilágítjuk, a higanyfelvétel jelentősen megnő ahhoz képest, mintha sötétben tartanánk (5.2.2a). Ha a megvilágított sejteket FCCP-vel kezeljük, ami egy közismert protonofór. Az aktív higanyfelvétel nagysága visszaesik arra a szintre, amit sötétben tartáskor tapasztalunk. Mivel a fotoszintetikus baktériumoknak nincsen eredendően higany csatornájuk, ezért valószínűleg sejt metabolikus folyamataiban résztvevő csatornákat is használják az átjutáshoz a sejt belsejébe. A bivalens kation csatornák

szerepet játszanak a higany transzportban. Ilyenek például az általunk is vizsgált  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák (5.2.2b).



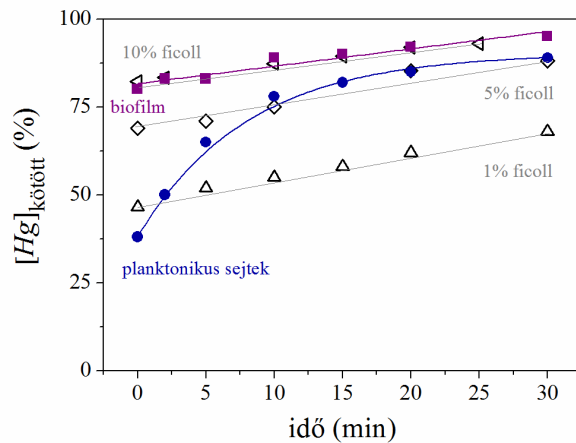
**5.2.2. ábra.** A membrán energetizáció (a) és a  $\text{Ca}^{2+}$  transzport rendszerek (b) összefüggésbe állítása a higanyfelvétel lassú fázisánál *Rvx. gelatinosus*-ban. A sejtek  $10 \mu\text{M}$  koncentrációjú  $\text{Hg}^{2+}$  kezelést kaptak, fényben több higanyt kötött meg (■), mint sötétben (▲) és  $20 \mu\text{M}$  FCCP (●) jelenlétében (a). A  $\text{Ca}^{2+}$  csatornáknak szerepük van a higanyfelvételben: a lassú fázis megszűnik a  $\text{Ca}^{2+}$  ion feleslegtől ( $0.5 \text{ mM}$ , ★) és a nimodipintől ( $10 \mu\text{M}$ , ◆) (b).

Ha a sejteket nimodipinnel kezeljük, ami egy potenciális L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna antagonistája, akkor a transzport lassú fázisa szinte teljesen blokkolódik. Hasonló hatást érünk el, ha a higanykezeléssel párhuzamosan

viszonylag nagy mennyiségben  $\text{Ca}^{2+}$  ionokat adunk a sejteknek. Ez arra utal, hogy ha túltelítjük a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat, akkor lecsökken a sejtek  $\text{Hg}^{2+}$  felvételi kapacitása. Ezzel ellentétben a kinetika gyors fázisának nagysága megnövekszik, mert ezek a kezelések nem befolyásolják a gyors felületi adszorpciót és a membránon keresztüli passzív diffúziót.

Az aktív és passzív higanyfelvételt egyrészt kinetikai alapon, másrészt az aktivációs energiák közti különbség megállapításával el lehet különíteni. A vizes (bulk) fázisból a sejt belseje felé irányuló higanyfelvétel passzív (diffúzió) és aktív komponensei két, egymással sorosan kapcsolt kinetikai reakciónak tekinthető. A  $\text{Hg}^{2+}$  felvétel megfigyelt inverz sebessége ( $k_{\text{obs}}$ ), a passzív ( $k_p$ ) és az aktív ( $k_a$ ) inverz sebességek összege:  $(k_{\text{obs}})^{-1} = (k_p)^{-1} + (k_a)^{-1}$ . A  $k_{\text{obs}}$  megfigyelt sebesség aktivációs energiájának kísérletes meghatározásakor valójában a sebességet meghatározó lépés aktivációs energiáját mérjük, mert ez a (leglassúbb) lépés felelős az eredő sebességért. A *Rvx. gelatinosus* baktérium esetében két szélső esetet vizsgáltunk. A planktonikus életmódnál a passzív lépés (diffúzió) sokkal gyorsabb, mint a membránon való áthaladás ( $k_p \gg k_a$ ). Ezzel szemben a biofilmes életmódnál, amikor a sejtek egy sűrű extracelluláris polimerek által létrehozott mátrixban vannak, a higany ionok diffúziója lassabb, mint a membránon keresztüli transzport.

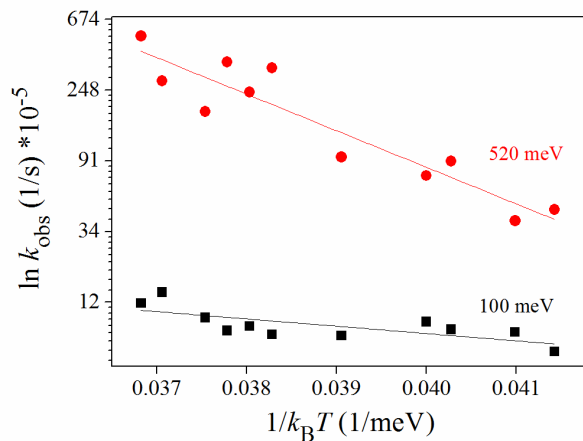
A biofilmben a higany passzív felvétele növekszik, a lassú fázisban pedig jelentős sebesség csökkenés figyelhető meg. Ezt a jelenséget egyszerűen modellezhetjük, ha a planktonikus sejtekhez egy mesterséges hálózatot kialakító anyagot, ficollt adunk (5.2.3. ábra).



**5.2.3. ábra.** Higanyfelvétel összehasonlítása *Rvx. gelatinosus* planktonikus sejteknél (●), természetes biofilm mátrixnál (■) és különböző ficoll koncentrációk (△ 1 %, ◇ 5 % és ◁ 10 %) alkalmazásánál. A sejt koncentráció mindegyik esetben  $1 \cdot 10^8$  sejt/mL és  $50 \mu\text{M Hg}^{2+}$  kezelést kaptak. A ficoll hatására a sejtek hasonló higanyfelvételi kinetikát mutattak, mint a biofilm esetében.

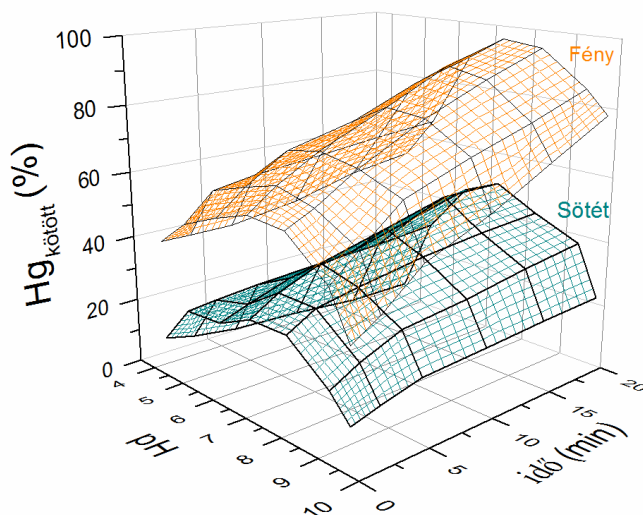
A polimer hálózat (biofilm és ficoll) lecsökkenti az aktív és lassú higanyfelvételt a planktonikus sejteknél, és csak a passzív és gyors fázis mérhető. *Rvx. gelatinosus*nál 10 % ficoll alkalmazása esetén ugyanolyan kinetikát kapunk, mint amit biofilmben tapasztaltunk. Ezáltal egyértelművé válik, hogy a polimer hálózat kémiai tulajdonságai, nem pedig a viszkozitás növekedése eredményezi a sejtek általi higanyfelvétel csökkenését.

Arrhenius ábrázolással mind a planktonikus sejteknél, mind a biofilmnél meghatároztunk az aktivációs energiákat (5.2.4. ábra). A két életformára két különböző egyenest kaptunk. A planktonikus sejtek viszonylag nagy sebességet mutattak meredek hőmérséklet-függéssel, ami 520 meV aktivációs energiának felel meg. Ez az energia szükséges ahhoz, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  ionok áthaladjanak a membránon a sejt belsejébe. Ez a viszonylag nagy aktivációs energia biztosítja a sejtek aktív metabolizmusát a korai exponenciális fázisban. A sejtek biofilmes életmódjánál a mért sebesség lényegesen lecsökken, és az egyenes meredeksége is kicsi marad. Az aktivációs energia 100 meV, ami a diffúziós folyamatokat jellemzi. Így a mi kísérleti eredményeink alapján jól elkülöníthetőek a passzív diffúzió és az aktív transzportfolyamatok aktivációs energiái.



**5.2.4. ábra.** *Rvx. gelatinosus* aktív planktonikus (●) és biofilmes (■) életmódú sejtek higanyfelvételének aktivációs energiái. Az Arrhenius ábrázolással kapott egyenesek meredeksége megadja az aktivációs energiákat, ami planktonikus sejteknél 520 meV, biofilmnél 100 meV.

A higanyfelvételi kinetika lassú fázisa nem csak a membránenergetizációtól (5.2.2. ábra) függ, hanem a közeg pH-jától is. Ettől a két paramétertől (idő és pH) való függést egy kvázi háromdimenziós ábrázolásban mutatjuk be (5.2.5. ábra).



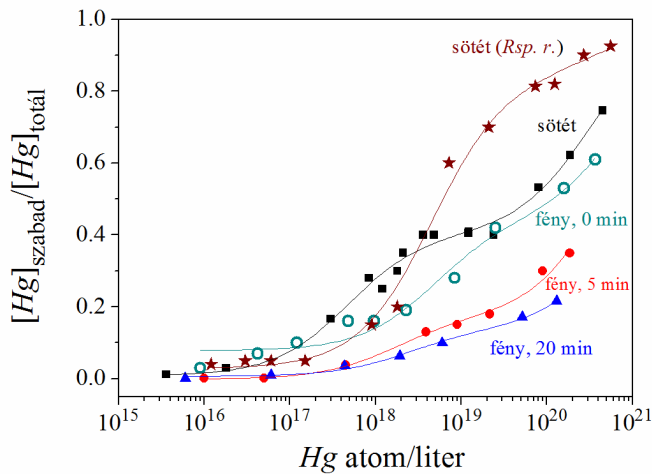
**5.2.5. ábra.** *Rvx. gelatinosus* higanyfelvételének idő és pH függése sötétben és fényben egy kvázi 3D ábrázolásban. Fényben és sötétben is a higanyfelvétel maximuma a neutrális pH tartományban van. A Hg-kötés mértéke visszaesik savas és lúgos pH-nál egyaránt.

A higanyfelvétel maximuma neutrális pH tartományban van. A savas és lúgos tartományban egyaránt mérsékeltebb a  $\text{Hg}^{2+}$  megkötése. Az alulról nézve homorú pH-függés annak tudható be, hogy egyrészt a membrán energetizációja (különösen a savas pH tartományokban) pH-függő lehet, másrészt a  $\text{Hg}^{2+}$  ionoknak versengniük kell (savas közegben) a protonokkal és (lúgos közegben) az oxianionokkal. A kvalitatív szemlélet is meggyőzhet bennünket arról, hogy mindezek eredőjeként adódik a mért pH-függés.



## Sztöchiometria

Egy egész sejten ( $C$ ) a kötőhelyek száma nagyon nagy lehet. Ezek a kötőhelyek könnyen kölcsönhatásba lépnek a kis higany ionokkal ( $Hg$ ). Viszonylag nagy higany koncentráció ( $[Hg] \sim 1 \text{ mM}$ ) kell ahhoz, hogy egy kihígított sejtuszpenzió ( $[C] \sim 1 \cdot 10^5 \text{ sejt/mL}$ ) sejtjeinek kötőhelyei telítődjenek (5.2.6. ábra).



**5.2.6. ábra.** Higanytelítési görbék különböző törzsekre különböző körülmények között. (*Rsp. rubrum*, sötét, ★), (*Rvx. gelatinosus*, sötét, ■), (*Rvx. gelatinosus*, fény, 0 min, ○), (*Rvx. gelatinosus*, fény, 5 min, ●), (*Rvx. gelatinosus*, fény, 20 min, ▲). Az x-tengelyen a mért szabad higany van feltüntetve ( $Hg$  atom/liter). A vékony

vonalak az (5.4) egyenlet által kapott illesztést jelzik. Az illesztési paramétereket a 5.2.1. táblázat foglalja össze.

A magasabb sejtkoncentráció használatát elkerültük a telítési vizsgálatoknál, mert a sejtek aggregálódnak, és elveszhet a linearitás. A sejtek rövid időtartamú higany kezelése alatt  $\sim 1 \text{ mM}$  higany koncentrációval el tudtuk érni a telítettségi szintet a sejtek lizise nélkül. A mért telítési görbe analízise után megkaphatjuk a sejtek kötési állandóját ( $K$ ), a kötőhelyek számát ( $n$ ) és a betöltött kötőhelyek számát ( $\nu$ ). A Hg megkötése révén foglalt kötőhelyek számát a következő egyenlet definiálja:

$$\nu = \frac{[Hg]_{\text{total}} - [Hg]_{\text{free}}}{[C]}, \quad (5.1)$$

ahol a  $[Hg]_{\text{total}}$  és  $[Hg]_{\text{free}}$  az összes és a szabad (= összes - kötött) Hg ionok koncentrációja,  $C$  pedig a baktérium sejtek koncentrációját jelöli.

Ha a sejt minden higany-kötőhelye azonos és egymástól független, akkor a betöltött kötőhelyek számát ki tudjuk számítani:

$$\nu = \frac{n \cdot K \cdot [Hg]_{\text{free}}}{1 + K \cdot [Hg]_{\text{free}}}. \quad (5.2)$$

Általánosítsunk arra az esetre, amelyben a kötőhelyek két különböző csoportba sorolhatók ( $w$ : gyenge,  $s$ : erős higanykötőhelyek), és ezek egymástól továbbra is függetlenek. A két különböző affinitású kötőhelyre vonatkozóan a kötési állandók legyenek  $K_w$  és  $K_s$ , a kötőhelyek száma pedig  $n_w$  és  $n_s$ . A betöltött kötőhelyek száma:

$$v = \frac{n_w \cdot K_w \cdot [Hg]_{\text{free}}}{1 + K_w \cdot [Hg]_{\text{free}}} + \frac{n_s \cdot K_s \cdot [Hg]_{\text{free}}}{1 + K_s \cdot [Hg]_{\text{free}}} \quad (5.3)$$

Összevonva az (5.2) és (5.3) egyenleteket, megkapjuk a kísérletileg meghatározható  $[Hg]_{\text{total}}/[Hg]_{\text{free}}$  arányt a szabad  $[Hg]$  függvényében:

$$\frac{[Hg]_{\text{free}}}{[Hg]_{\text{total}}} = 1 - \frac{n_w \cdot K_w \cdot [C]}{1 + K_w \cdot [Hg]_{\text{free}}} - \frac{n_s \cdot K_s \cdot [C]}{1 + K_s \cdot [Hg]_{\text{free}}} \quad (5.4)$$

A 5.2.1. táblázatban foglaltuk össze a különböző kezeléseknél kitett különböző baktérium törzsekre kapott kötőhelyek számát ( $n$ ) és a kötési állandókat ( $K$ ). A paramétereket a telítési görbékre (5.2.6. ábra) illesztett (5.4) egyenlet alapján számítottuk ki.

	illesztési paraméterek			
	$n_s$	$n_w$	$K_s$	$K_w$
	$\cdot 10^9$	$\cdot 10^{12}$	$(\mu\text{M})^{-1}$	$(\text{mM})^{-1}$
<b>törzsek</b>				
<i>Rsp.rubrum</i>	7.6	0.16	0.13	1
<i>Rba.sphaeroides</i>	0.06	0.03	2.8	30
<i>Rvx.gelatinosus</i>	0.4	0.4	1.25	2
<b>kemikáliák</b>				
	sötét			
Nimodipine	0.7	0.3	0.4	2.7
n-Em	0	0.03	0	26
	fény			
Nimodipine	1	0.4	0.4	1.6
FCCP	0.03	0.07	9	13
<b>idő</b>				
0 min	3.5	0.9	0.12	0.8
5 min	0.6	1	0.34	1
20 min	0.7	2	0.24	0.5

**5.2.1. táblázat.** Az erős és gyenge higanykötőhelyek száma ( $n$ ) és a kötési állandók ( $K$ ) különböző körülmények (kemikáliák, fény és sötét, higany kezelés ideje) között három fotoszintetizáló baktérium törzsnél. A paramétereket a telítési görbékre (5.2.6. ábra) illesztett (5.4) egyenlet alapján határoztuk meg.

A kötőhelyek nagy száma azt jelzi, hogy a fotoszintetikus baktériumok szivacsként szívják magukba a higany ionokat. A felhalmozott Hg(II) mennyisége sokkal nagyobb, mint az azt felvevő sejtek tömege.

Ha a sejtkoncentráció túl nagy ( $[C] \gg 1 \cdot 10^6$  sejt/mL), akkor a használt higany koncentráció nem tudja telítésbe vinni a kötőhelyeket, ezért a higany kötés paramétereit nem lehet a fentebb említettek alapján meghatározni. Más (közelítő) módszerhez kell folyamodnunk. Megoldást jelenthet, hogy ahelyett, hogy az egész telítési görbe analízisét elvégeznénk, csak a higanykötés kezdő értékeit (pontosabban határértékét) határozzuk meg a különböző baktérium törzsekre. A nullához közelítő higanykoncentrációnál a szabad/össz higany-arányt a L'Hospital szabály alkalmazásával nyerhetjük:

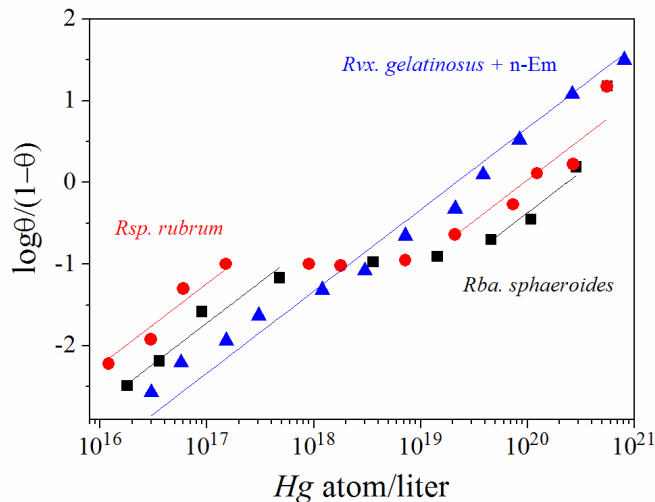
$$\frac{[Hg]_{\text{free}}}{[Hg]_{\text{total}}} = \frac{1}{1 + n \cdot K \cdot [C]}, \quad (5.5)$$

ahol  $n$  a kötőhelyek száma,  $K$  a kötési állandója az erősebb kötőhelynek. Az  $n \cdot K \cdot [C]$  szorzat adja meg a baktérium tenyészet higanykötő kapacitását. Ugyanazt a sejtkoncentrációt ( $[C] = 1 \cdot 10^{13}$  sejt/L) beállítva a különböző törzseknél, a higanykötő kapacitásuk eltérő. A *Rba. sphaeroides*-nek kétszer kisebb a kapacitása, mint a *Rvx. gelatinosus*-nak planktonikus életmódban és ötször kisebb, mint a biofilmes életmódban. A biofilmes esetben a megnövekedett higanyfelvétel az extracelluláris mátrixnak tulajdonítható.

törzsek	$[Hg]_{\text{total}} \lim_{\rightarrow 0} \frac{[Hg]_{\text{free}}}{[Hg]_{\text{total}}}$	$n \cdot K \cdot [C]$	
		abs	rel
<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1	0.18	4.5	1
<i>Rvx. gelatinosus</i>			
planktonikus	0.1	9	2
biofilm	0.02	49	11

**5.2.2. táblázat.** Magas sejtkoncentrációjú ( $[C] = 1 \cdot 10^{13}$  sejt/L) fotoszintetikus baktérium törzsek higanykötő kapacitásainak ( $n \cdot K \cdot [C]$ ) összehasonlítása. A higany telítési görbe kezdő határértéke alapján számolva aa (5.5) egyenlet alapján.

Ha bevezetjük a kötőhelyek telítési mértékét ( $\Theta = v/n$ ), akkor Hill ábrázolást végezhetünk: a  $\log \frac{\Theta}{1-\Theta}$  mennyiséget a szabad higanyion koncentráció  $[Hg]_{\text{free}}$  függvényében ábrázolva értékes következtetéseket vonhatunk le (5.2.7. ábra).



**5.2.7. ábra.** Higanyfelvétel Hill ábrázolásban különböző fotoszintetizáló baktérium törzsekénél: *Rsp. rubrum* (●), *Rba. sphaeroides* (■) és *Rvx. gelatinosus* (+20 mM szulfhidril-csoport módosító, N-etilmaleimid (n-Em), ▲). A meredekségek egységnyiek, mert nincs kooperativitás a kötőhelyek között. A megtört egységnyi

meredekségű egyenesek (kivéve a n-Em-mel kezelt sejteket) az erős és gyenge kötőhelyek bizonyítékai.

Ez az ábrázolás szemléletesen mutatja a független és kooperatív kötőhelyek közti különbséget. Ugyanakkor a Hill-ábrázolás hátránya, hogy elveszítjük a sejtek különböző affinitású kötőhelyeiről ( $n_w$  és  $n_s$ ) nyerhető információt. A higany koncentráció széles tartományán futó két 1-es meredekségű egyenes azt jelzi, hogy nincsen együttműködés a kötőhelyek között. Annak ellenére, hogy a kötőhelyek száma és affinitása hatalmas, a kötőhelyek egymástól függetlenek, vagyis a betöltöttségi állapotuk nem befolyásolja a szomszéd kötőhely kötési tulajdonságait. A gyenge és erős kötőhelyek kötési állandója megkapható az egyenesek tengelymetszetének inverz értékéből ( $\Theta = \frac{1}{2}$ ,  $\log \frac{\Theta}{1-\Theta} = 0$ ). Az erős kötőhelyek kapcsolatba hozhatóak a szulfhidril-csoportokkal. Az N-etilmaleimid, ami egy alapvetően használt szulfhidril módosító, eltünteti azt az egyenest, amelyhez a nagy higanykötő affinitás rendelhető. Feltételezhető, hogy az erős kötőhelynél lehet kooperativitás, de ez elhanyagolható, mert két nagyságrenddel kisebb, mint a gyenge kötőhelyek száma (lásd 5.2.1. táblázat).

Az alkalmazott higany kimutatási módszer alapján, világosan el tudunk különíteni két (egy gyors ill. egy lassú) higanyfelvételi kinetikát (5.2.1. ábra). A gyors fázis egy passzív bioszorpció: ilyenkor az ionok a sejtek külső felszínén lévő csoportokkal lépnek kapcsolatba, illetve passzív diffúzióval átjuthatnak membránon. A passzív felvétel gyors, reverzibilis, nem specifikus a fémekre nézve, és független a sejt metabolizmusától (enzimatis folyamatok) és az olyan fizikai körülményektől, mint a pH vagy az ionerősség. Ezt úgy is el lehet képzelni, mintha egy inaktív vagy élettelen sejtekből álló biomasszának határoznánk meg a higanykötését. A kinetika lassú fázisa

az aktív folyamatokat tükrözi vissza, függ a sejtek metabolizmusától, ezért protonofór hatására a kinetika sebessége kisebb lesz (5.2.2a ábra). A higany ionok különböző energiafüggő transzport rendszereket is használhatnak a bejutáshoz. Ide tartoznak az ion pumpák, ion csatornák, hordozó közvetített transzport, összetett beszivárgás és lipideken keresztüli áteresztés. Bemutattuk, hogy a higany ionok képesek a  $\text{Ca}^{2+}$  transzportereken keresztül is bejutni a sejtbe versengve a  $\text{Ca}^{2+}$  ionokkal (5.2.2b ábra). Elkülönítettük a higanyfelvétel aktív és passzív módját egyrészt a kinetika, másrészt pedig az aktivációs energiák alapján (5.2.4. ábra). A passzív felvételnek alacsony az aktivációs energiája (~100 meV), ami összhangban áll a diffúziós folyamatokkal, az aktív transzport aktivációs energiája ötször nagyobb (~500 meV). Ezt a váltást a sebesség meghatározó lépésekben a *Rvx. gelatinosus* két különböző életmódjával tudtuk magyarázni.

A higany felhalmozódás pH függése egy összetett terület, mert a sok részleges megállapítás és eredmény bonyolulttá teszi az átfogó szemlélést (Kelly és mtsai. 2003; Le Faucheur és mtsai. 2011; Italiano és mtsai. 2009). Megfigyeltük, hogy a higany felhalmozódás pH függő. Neutrális tartományban nagy mennyiségű higanyt vesznek fel a sejtek, az acidikus és alkalikus tartományok felé haladva pedig ez egyre csökkenő tendenciát mutat (5.2.5. ábra). Az egyszerű értelmezés szerint a  $\text{Hg}^{2+}$  ionok acidikus tartományban versengnek a  $\text{H}^+$ -okkal és/vagy  $\text{H}^+/\text{Hg}^{2+}$  antiport is működhet. A sejtek felszínén sokféle protonálható csoport található, így ha csökken a pH, akkor a sejtek felszínén megnő a protonált csoportok száma (Maróti és Wright 1988), vagyis kevesebb  $\text{Hg}^{2+}$  ion kötődik meg, mert a protonok elfoglalják a kötőhelyeket. Ezzel összefüggésben a protonálható csoportok deprotonált formái felelősek lehetnek a higanykötésért (Italiano és mtsai 2009). Hasonló pH hatás tapasztalható az alkalikus tartományban. A higany ionok komplexet képeznek klorid ionokkal, de akár a hidroxilionokkal is. A hidroxil komplexek csapadékot alkotnak vizes oldatokban, vagyis minél alkalikusabb egy közeg, annál több higanyion megy komplexbe a hidroxil ionokkal, ezért egyre kevesebb aktív higanyion marad, amit a sejtek felvehetnének. Acidikus és alkalikus tartományokban is megmarad ez a tendencia fényben és sötétben is. A higanyfelvételi görbe alakja nem változik jelentősen, csak a felvett higany mennyisége nő, ha membrán energetizálódik.

A baktériumok közül számos faj alkothat biofilmet. A biofilm vizes közegben élő mikrobák aktív sejthalmaza, amelyet, az általuk termelt szerves extracelluláris mátrix

(extracelluláris polimer, EPS) tart egyben, és segítségével valamilyen szilárd felülethez tapadhat ki. A biofilmben élő sejtek sokkal nagyobb védelemben részesülnek a környezetből érkező hatásokkal szemben, mint a planktonikus életmódot folytató, egyedi sejtek (Hentzer és mtsai. 2001). A biofilm komponenseiben nagyon sok negatívan töltött foszfát, szulfát és karboxil csoport található (Hunt 1986). A biofilm kiszűri a közegből az antimikrobiális vegyületeket, mérgeanyagokat, nehézfémeket és nem vagy csak kis mennyiségben jutnak el ezek az anyagok a sejtekhez. Ezáltal egy biofilmes sejthalmaz képes nagy mennyiségű nehézfémet megkötni, és eltávolítani a közegből (Liehr és mtsai 1994). Ezekkel összhangban azt tapasztaltuk, hogy a *Rvx. gelatinosus* fotoszintetikus baktérium biofilmes életmódban sokkal nagyobb rezisztenciát mutat a higanyal szemben, mint planktonikus életmódban, egyedi sejtekként. Ez annak köszönhető, hogy a higany ionok nehezebben jutnak el a sejtekhez a biofilmes közegben. Ezt a megfigyelést alátámasztja az a kísérlet, amikor a természetes biofilmet kicseréltük egy mesterséges poliszaharid hálózatra (Ficoll 400). A Ficoll 400 nagyon sok hidroxil csoportot tartalmaz, ezért extrém módon hidrofil és vízdékony. A planktonikus sejtekhez adva a ficollt, megnő a passzív higanyfelvétel szintje, 10 %-ban alkalmazva pedig a természetes biofilm szintjét éri el (5.2.3. ábra). A higanyfelvételi vizsgálatokat főként érett planktonikus tenyészetekkel végeztük, ilyenkor a higany diffúzióval eljut a sejtek felszínéhez, átjut a lipid kettős rétegen, majd bekerül a sejt belsejébe. A természetben ezeknek a baktériumoknak nagy része kitapadt biofilmes közösségben él. A mi modell baktériumunk, a *Rvx. gelatinosus*, biofilmet hoz létre a növekedése során, és így a sejtek hozzáférhetősége megváltozik: 1.) a biofilmben meredek kémiai grádiens alakul ki, 2.) a sejtek köré diffúz réteg képződik, és 3.) a higany adszorbálódik a biofilm mátrixban.

Az 5. fejezet a következő publikációk alapján készült:

**Mariann Kis**, Gábor Sipka, Emese Asztalos, Zsolt Rázga and Péter Maróti (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 151:110–117.

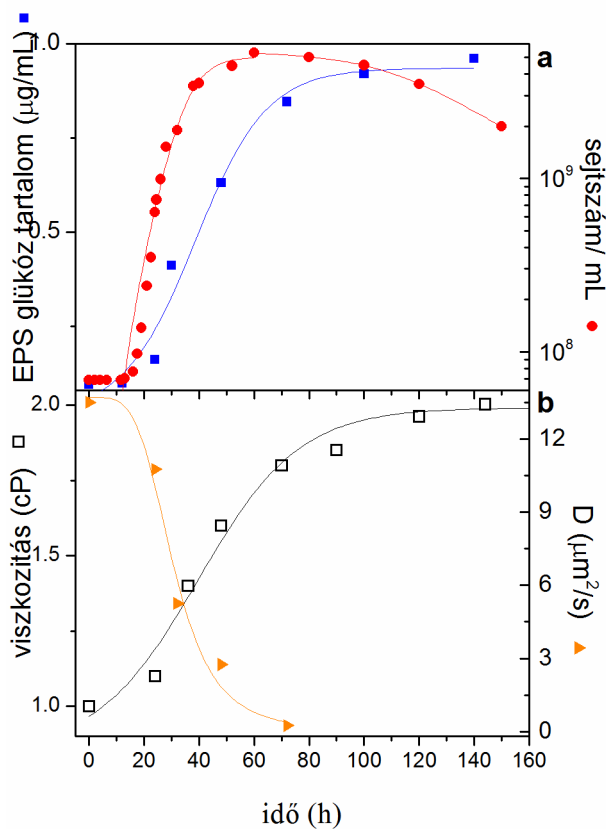
**Mariann Kis**, Gábor Sipka, Péter Maróti (2016) Stoichiometry and kinetics of mercury uptakes by photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* (bírálat alatt). referencia szám: PRES-D-16-00134

## 6. Kritikus jelenség a baktériumok világában: *Rvx. gelatinosus* sejtek kollektív süllyedése

*Alapmegfigyelés.* Lezárt tenyészedényben anaerob körülmények között fényen nevelt *Rvx. gelatinosus* baktérium koncentrációja (a növekedési görbének megfelelően) monoton emelkedik, a tenyészet egyre sűrűbb lesz. A baktérium szuszpenzió a homogenitását még a stacionárius növekedési fázis kezdetén is megtartja, majd a tenyésztés teljes idejéhez (kb. 72 óra) viszonyítva nagyon rövid (kb. fél óra) alatt feltöredezik, heterogénné válik, és a baktériumok az edény aljára ülepednek (Steunou és mtsai 2013). A leülepedés fellépésének időpontja előre nehezen határozható meg, mert a hasonlóan elvégzett kísérletek tanúsága szerint több órás szórást mutat. A folyamat a fizikában sokszor megfigyelt kritikus jelenségre (pl. fázisátalakulásra) emlékeztet, mert hirtelen következik be, és megjelenése nem determinisztikus, hanem statisztikai jellegű.

A kollektív és gyors ülepedésnek valószínűsíthetően fiziológiai előnye van: élő kultúrákban a szaporodó baktérium közvetlen közelében a tápanyag viszonylag gyorsan kimerül, mert a mikroorganizmusok felélik (Marshall, 1992). Az életbenmaradásuk szempontjából meghatározó lehet egy olyan mozgási (helyváltoztatási) stratégia kialakítása, amelynek révén más, tápanyagokban gazdag (még nem kimerült) régiók hozzáférhetővé válnak. Egy ilyen túlélési stratégia részét képezheti a süllyedési mechanizmus, amelynek révén a tengerekben a mélyebben fekvő és tápanyagban gazdag területek felkereshetők.

Mivel ilyen helyváltoztatási mechanizmussal a bíbor fotoszintetizáló baktériumok általában nem rendelkeznek, ezért a *Rvx. gelatinosus* baktérium közöttük különleges tulajdonságú. Ezt elsősorban annak köszönheti, hogy a sejtek (kiváltképp a növekedés stacionárius szakaszában) fokozott polimer termelésre képesek, amelyet a sejten kívüli térrészbe juttatnak (exo-polimer). Teljes polimer térháló (biofilm) alakul ki, amelybe a baktériumok bekerülnek, képesek ebben megkötődni, és mobilitásukat ezzel elvesztik. Kvalitatíve ezek a legfontosabb tényezők, amelyek a kollektív ülepedés kialakulásához vezetnek.



**6.1. ábra.** A *Rvx. gelatinosus* hosszú időtartamú növekedési görbéje (●) és a hozzá kapcsolódó exopolimer (EPS) glükóz tartalma (■) (a), a tenyésztoldat viszkozitása (□) és a sejtek diffúziós állandói (▲) (b).

Feladatunknak tekintjük, az ülepedés jellemzőinek megállapítását, és egy szemléletes, kvantitatív alapokon nyugvó modell kidolgozását. Közelfekvőnek látszana a kritikus kollektív jelenségek statisztikus fizikai módszereinek alkalmazása erre a jelenségkörre, amelyben a perkoláció-elmélet megvalósulásának feltételeit elemeznénk, és Monte-Carlo eljárásokon alapuló számításokat végeznénk. Ez jól illene az ülepedés

kritikus jelenségéhez, ám az analógia feltárása erőnket meghaladó számításokhoz vezetne. Emiatt egy egyszerűbb, könnyebben és közvetlenül számítható, (kvázi) egyensúlyi modellt alkalmazunk.

### *A baktériumok magasság szerinti Boltzmann-eloszlása homogén gravitációs térben.*

Növekedjenek a baktériumaink egy vízszintes helyzetű, vékony,  $h$  hosszúságú tenyészcsőben, amelyben végül  $c_0$  koncentrációt érnek el. Fordítsuk ezután függőleges helyzetbe a csövet, és várjuk meg a gravitáció közreműködésével kialakuló egyensúlyi helyzetet.

A baktériumokra, mint részecskékre érvényes lesz a magasság szerinti exponenciális (Boltzmann-féle) eloszlás (lásd a légkörre gyakran alkalmazott barometrikus magasság-formulát), amely szerint a cső aljától számított  $x$  távolságban mérhető  $c(x)$  baktérium-koncentráció:



$$c(x) = c_0 \cdot \frac{m_{\text{net}} g h}{k_B T} \cdot \frac{\exp\left(-\frac{m_{\text{net}} g x}{k_B T}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{m_{\text{net}} g h}{k_B T}\right)}. \quad (6.1)$$

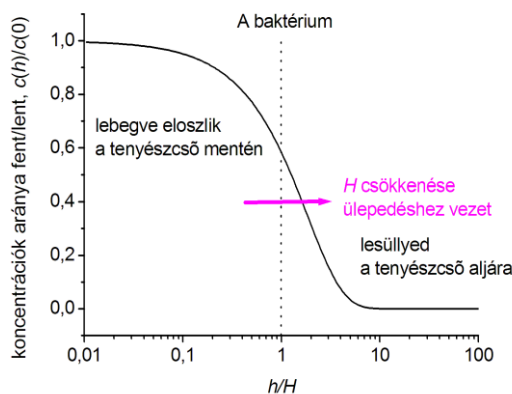
Itt  $m_{\text{net}} = m \cdot (1 - \rho_{\text{víz}} / \rho_{\text{bak}})$  az  $m$  tömegű baktériumnak a felhajtóerő figyelembevételével korrigált netto tömege ( $\rho_{\text{víz}}$  és  $\rho_{\text{bak}}$  a tenyészcsoport ill. a baktérium sűrűségét jelöli),  $g$  a gravitációs gyorsulás állandója ( $g = 9.81 \text{ m/s}^2$ ),  $k_B$  a Boltzmann-állandó ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ ) és  $T$  az abszolút hőmérséklet (300 K). A pre-exponenciális faktort normalizációs feltételből kaptuk: a csőnek vízszintesből függőleges helyzetbe való fordítása nem változtatta meg a csőben a baktérium össz-mennyiségét.

A  $h$  (csőhossz) és  $0 \leq x \leq h$  hosszúság mellett célszerű bevezetni egy másik, hosszúság jellegű mennyiséget:

$$H = \frac{k_B T}{m_{\text{net}} g}, \quad (6.2)$$

amivel a Boltzmann-egyenlet egyszerűbben felírható:

$$c(x) = c_0 \cdot \frac{h}{H} \cdot \frac{\exp\left(-\frac{x}{H}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{h}{H}\right)}. \quad (6.3)$$



**6.2. ábra.** *Rvx. gelatinosus* sejtek ülepedése a  $h$  csőhosszúság függvényében a (6.3) egyenlet alapján számítva. A függőleges tengelyen a cső tetején és alján mért baktérium koncentrációk viszonyát ábrázoltuk.

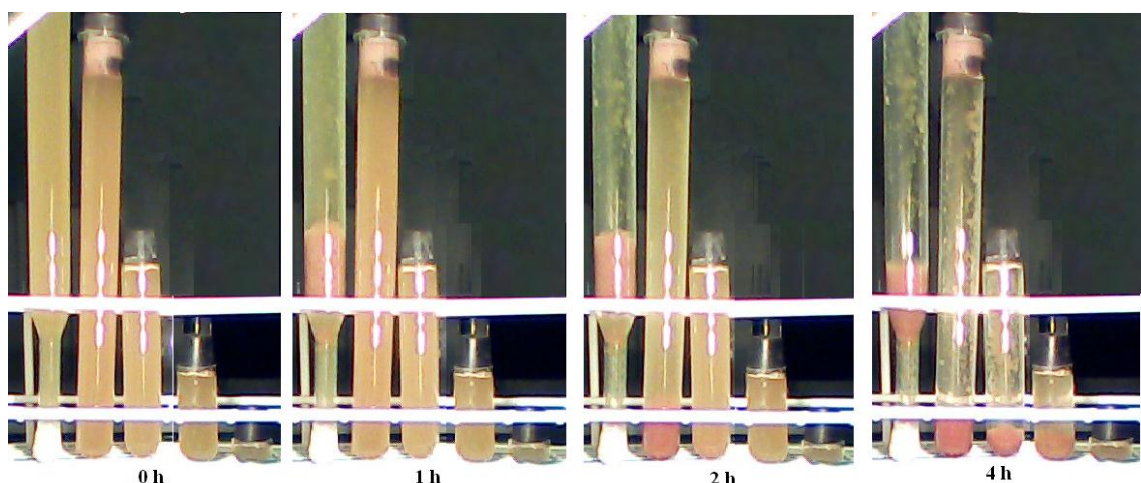
A  $h$  és  $H$  távolságok összehasonlításával a szélsőségesen egyenlőtlen eloszlás (süllyedés) vagy egyenletes eloszlás közötti átmenet könnyebben

megállapítható. A fent ( $x = h$ ) és a lent ( $x = 0$ ) mért koncentrációk aránya:  $c(h)/c(0) = e^{-h/H}$ . Ha  $H \gg h$ , akkor  $c(h) = c(0) = c_0$ , azaz az eloszlás egyenletes marad, a baktériumok nem süllyednek a cső aljára. Ezzel szemben, ha  $H \ll h$ , akkor  $c(h) \ll c(0)$ , azaz a baktériumok a cső aljára ülepednek. Tehát a  $H$  hosszúságnak  $h$  csőhosszhoz való viszonya határozza meg, hogy baktériumok lebegnek-e (noha eloszlásuk nem marad egyenletes a cső mentén, Boltzmann-eloszlást követnek) vagy süllyednek a cső aljára:

$$\begin{array}{l}
 H < h & \text{süllyed} \\
 H \geq h & \text{lebeg}
 \end{array}
 \tag{6.4}$$

Ha  $H = h$ , akkor  $c(h)/c(0) = 1/(e-1)$ . Az ábrán a tenyészcső tetején és alján mért baktérium-koncentrációk viszonyát ábrázoltuk a (6.3) egyenlet alapján számítva a két hossz arányának függvényében. Vegyük figyelembe, hogy az ábra vízszintes tengelyén a hosszak arányának logaritmususa szerepel. Látható, hogy a baktériumok lebegése és a tenyészcső aljára süllyedése közötti átmenet kellően gyors (azaz nagyon érzékeny a  $h/H$  arányra) a Boltzmann-kifejezésben szereplő exponenciális faktorok miatt. A tenyészoldatban lebegő baktérium a  $H$  érték hirtelen csökkenése következtében (az ábrán vízszintes irányban elmozdulva) azonnal lesüllyedhet az edény aljára. Megfordítva, ha  $H$ -t állandó értéken tartjuk, míg a tenyészcső hosszát változtatjuk, akkor a hosszabb tenyészcsőben bekövetkezhet a baktériumok szedimentációja, miközben a rövidebb csőben közel egyenletes marad a baktériumok eloszlása (ebben az esetben is az ábrán a vízszintes tengely mentén balról jobbra történik elmozdulás). A feladatunk annak vizsgálata és megállapítása, hogy mi vezethet a *Rvx. gelatinosus* baktériumok esetén a  $h$ -nál magasabb  $H$  érték kialakulására (lebegés), majd hirtelen csökkenésére (süllyedés).

Meghatározó fontosságú kísérletet és annak eredményét mutatja a 6.3. ábra, amely azt bizonyítja, hogy a (6.4) összefüggésnek megfelelően a sejtek leülepedésének időpontját (egyébként azonos feltételek mellett) a tenyészcső hossza határozza meg: hosszabb csőben hamarabb szedimentálódnak a baktériumok, mint a rövidebb csőben.



**6.3. ábra.** *Rvx. gelatinosus* ülepedése biofilm képződés hatására a tenyészcső hosszúságának függvényében. A kiindulási tenyészet lezárt üvegen fényen nőtt a korai stacioner fázisig (65-70 óra), majd ezután kerültek át a csövekbe és készültek a felvételek. Csőhosszak balról jobbra: 30, 15, 7, 3.5 és 1

cm. (A 30 cm-es csőnek az alsó fele látszik csak a képen). Az ülepedés spontán, a sejtek által létrehozott biofilm hatására történt. Leggyorsabban (1 óra alatt) a leghosszabb csőben történt meg az ülepedés.

A videofelvételt a leülepedés megkezdésétől úgy értékeltük ki, hogy a cső alján felgyülemelő baktérium-réteg vastagságát nyomon követtük az idő függvényében (6.4. ábra). A leülepedő sejtek lazán egymásra rétegződnek a cső alján, hasonlóan ahhoz, mint ahogy a hóesésben a talajon lévő laza hóréteg vastagsága fokozatosan emelkedni kezd. A leülepedő baktérium-réteg vastagságának időbeli növekedése jól jellemzi a szedimentáció kezdetét és sebességét. Jól felismerhetően a tenyészcső hosszától függően a sejtek leülepedése különböző időpontokban kezdődik el, és a teljes baktérium-mennyiségtől függően különböző rétegvastagságok elérése után (kissé különböző időtartamok után) telítődik. Idővel ezek a laza rétegek összenyomódnak, és a később újra meginduló leülepedés során az új rétegek már erre rakódnak.

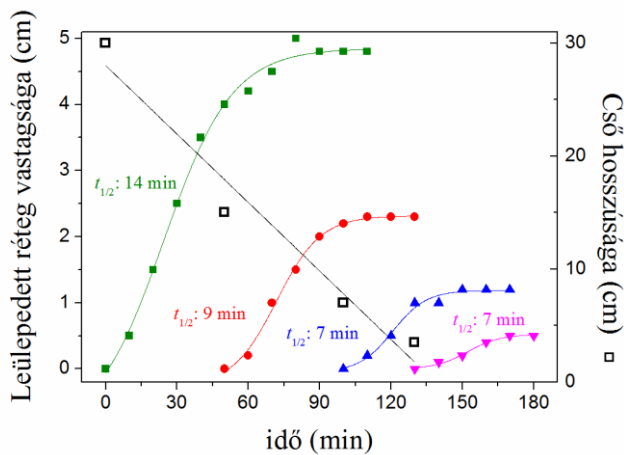
A leülepedett sejt-réteg vastagságának időbeli változását egyszerű modell-számítással közelíthetjük. Feltételezhetjük, hogy a leülepedés megkezdése után valamennyi sejt azonos  $v$  egyenletes sebességgel kezd el süllyedni, és  $t$  idő elteltével a cső alján  $X$  vastagságú laza réteget képez, amelyben a sejtek koncentrációja egyenletesen  $A \cdot c_0$  lesz ( $A$  a sokszorozási faktor). Az eredetileg egyenletes  $c_0$  koncentráció-eloszlás  $t$  idő alatt  $v \cdot t$  távolságot süllyedt, amely „feltöltötte” a lehetséges maximális sejt-koncentrációra az  $X$  hosszúságú réteget:  $(v \cdot t + X) \cdot c_0 = A \cdot c_0 \cdot X$ . Ebből:

$$X(t) = \frac{v \cdot t}{1 + A}, \quad (6.5)$$

azaz a rétegvastagság az idővel lineáris módon emelkedik, és a maximális  $X_{\max} = h/A$  értékét  $t_{1/2} = h/v \cdot (1 - 1/A)$  idő elteltével éri el. Noha az egyenletes eloszlás helyett a (6.3) egyenlettel megadott Boltzmann-eloszlással finomabb, de csak numerikus eljárással kezelhető eredményt kaptunk volna, az egyszerűbb modell is megfelelően tükrözi a kísérletileg kapott eredményeket: mind a maximális rétegvastagság,  $X_{\max}$ , mind annak kialakulásához szükséges időtartam,  $t_{1/2}$  arányosan csökken a  $h$  csőhosszal. A 6.4. ábra szerint valóban a cső hosszával arányosan vastagabb a leülepedő réteg, és a kialakulásához szükséges idő (a görbék felemelkedési ideje, a karakterisztikus szedimentációs idő) enyhén csökken, ha rövidebb csövet veszünk.

A baktérium süllyedésének még egy másik fontos tulajdonsága is megállapítható a 6.4 ábráról. Ha a  $h$  csőhosszakat a szedimentáció megindulási időpontjának függvényében ábrázoljuk, akkor egyenest kapunk, amelynek meredeksége 30 cm/120

perc  $\cong 42 \mu\text{m/s}$ . Mivel a szedimentáció pillanata akkor következik be, amikor  $h \cong H$ , ez a sebességérték egyben a  $H$  távolság csökkenésének sebessége is a szedimentáció megkezdésének időpontjában. A később bevezetésre kerülő (6.12) egyenlet alapján azt is mondhatjuk, hogy ekkora sebességgel kezd a baktériumok diffúziós állandója csökkenni ill. a baktériumok tömege az asszociáció következtében emelkedni, mert ezek vezetnek a  $H$  karakterisztikus távolság rohamos csökkenéséhez, és ebből következően a kritikus ülepedés jelenségéhez.



**6.4. ábra.** *Rvx. gelatinosus* ülepedése biofilm képződés hatására a cső hosszúság és az idő függvényében. Egyébként azonos feltételeket biztosítandó, a kiindulási tenyészet lezárt üvegben fényen nőtt a korai stacioner fázisig (65-70 óra), majd ezután kerültek át a csövekbe. Az ülepedés már ezekben a csövekben történt, amelyet a lesüllyedő baktériumok alkotta laza réteg

vastagságával jellemeztünk. Csőhosszak balról jobbra: 30, 15, 7 és 3.5 cm. Az ülepedés spontán, a sejtek által létrehozott biofilm hatására következett be. A csőhossz és a szedimentált réteg-vastagság aránya állandó (~6).

### *A baktériumok süllyedését aktív rendszertelen mozgásuk (rángatózásuk) akadályozza meg.*

Az aktív mozgást nem végző baktériumokra számítva  $H$  értéke általában sokkal kisebb, mint a gyakorlatban előforduló  $h$  érték. A sűrűség-különbség a legtöbb mikroorganizmusra  $(\rho_{\text{bak}} - \rho_{\text{víz}}) = 80 \text{ kg/m}^3$ , és fototróp sejtekre akár  $10 \text{ kg/m}^3$  értéket is elérhet (Overmann és mtsi 1991). Ha behelyettesítjük  $H$ -nak a (6.2) egyenlet alatti kifejezésébe a baktérium közelítő lineáris méretét ( $1 \mu\text{m}$ ), és a sűrűség-különbségekre ezeket az értékeket, akkor  $H = 5 \mu\text{m}$  ill.  $40 \mu\text{m}$  értékeket kapunk. Mivel ez a távolság (még a minimális sűrűség-különbség esetén is) sokkal kisebb, mint a gyakorlatban előforduló csőhossz ( $H \ll h$ ), ez a (6.4) egyenlet alapján azt jelenti, hogy a mindenféle aktív mozgást (pl. úszómozdulatokat) nélkülöző baktérium gyakorlatilag minden (még a legkisebb méretű) tenyészcsőben is leülepedik. Ezt a feltételt igen jól megközelíti a sötétben és hűtőszekrényben hosszabb ideig (hetekig) tárolt benőtt baktériumtenyészet, amely már elveszíthette az aktív (planktonikus) mozgásra való képességét, és igen lassú

passzív süllyedést mutat. Az egyenletes eloszlásra felrázott tenyészet baktériumai nagyon lassan szedimentálódnak: jól érzékelhető néhány óra múlva a felső szint néhány mm-es csökkenése. A legfelsőbb réteg kitisztulása jól megfigyelhető kontrasztot eredményez, és ebből kb. 0.5  $\mu\text{m/s}$  egyenletes süllyedési sebességet tudunk megállapítani.

Ezekből a vizsgálatokból az az egyértelmű következtetés vonható le, hogy a *Rvx. gelatinosus* baktériumok süllyedését aktív mozgásuk (rángásuk, rángatózásuk, kalimpálásuk, angolul „twitching”) akadályozza meg. Mint ahogy az úszni nem tudó, de kalimpáló mozgást végző egyén is fennmaradhat a víz felszínén, úgy a baktérium is hasonló mozgással megakadályozhatja a lesüllyedését. Az *Rvx. gelatinosus* baktériumnak nincsenek kifejtett, hosszú flagellátumai, amelyek ostoros csapásaival ill. forgásával (hajócsavarként) határozott irányú úszómozdulatokat végezhetne, csupán az apró, sejtfelszíni csillói rendszertelen mozgásával kalimpáló, teljes tömegével rángatózó mozgást tud végezni. Ezzel véletlenszerű elmozdulásra képes, amely a környezetével való hőmérsékleti egyensúlyból származó Brown-mozgással átlapolódik, és annál lényegesen nagyobb átlagos eltávolodást tesz számára lehetővé. Felvetődik a kérdés, hogyan tudjuk a kvalitatív elképzelésen túlmutatóan a baktériumok kalimpáló, rángatózó mozgását kinematikai szempontból leírni, és a süllyedésben betöltött meghatározó szerepét bemutatni.

#### *A rángatózó és Brown mozgások átlapolása.*

*Tétel.* Ha egy részecske (itt baktérium) egyszerre két, egymástól független véletlenszerű bolyongást végez, akkor a megfigyelhető eredő mozgás is véletlenszerű bolyongás. Ha a két összetevő mozgás diffúziós állandója  $D_1$  ill.  $D_2$ , akkor az eredő mozgás diffúziós együtthatója ezek összege lesz, azaz  $D = D_1 + D_2$ .

*Bizonyítás.* Tekintsünk egy egyenes ( $x$  tengely) menti (egydimenziós) és az  $x = 0$  kezdőpontból kiinduló bolyongó mozgást, amelynek valószínűségi sűrűségfüggvénye a  $\sigma$  szórással jellemzett Gauss-függvény:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \exp\left(-\frac{x^2}{2 \cdot \sigma^2}\right). \quad (6.6)$$

Ez a függvény azt mutatja meg, hogy mennyi annak a valószínűsége, hogy a részecske az  $x$  koordinátájú hely körüli  $dx$  intervallumban található. (A függvény 1-re

normált:  $\int_{-\infty}^{+\infty} f(x)dx = 1$ , azaz a részecske valahol az egyenes mentén biztosan fellelhető.)

Ha a részecske egyidejűleg végez  $\sigma_1$  és  $\sigma_2$  szórással jellemzett bolyongást, akkor az eredő mozgás  $F(x)$  sűrűségfüggvényét a két  $f_1(x)$  és  $f_2(x)$  sűrűségfüggvény konvolúciója adja:

$$F(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f_1(x') \cdot f_2(x-x')dx'. \quad (6.7)$$

A konvolúció azt fejezi ki, hogy ha a részecske az első típusú bolyongásból egy tetszőleges  $x'$  helyre jut, akkor a második típusú bolyongásnak kell az  $x$  koordinátájú helyre juttatnia. Természetesen  $x'$  a teljes számegyenest végigpásztázza.

Ha az  $f_1$  és  $f_2$  függvények helyére beírjuk a fenti normált Gauss függvényt, és elvégezzük az integrálást, akkor az eredő  $F$  függvényre szintén normált Gauss függvényt kapunk:

$$F(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}} \exp\left[-\frac{x^2}{2 \cdot (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}\right], \quad (6.8)$$

amelynek szórásnégyzete a két eloszlás szórásnégyzeteinek összege:

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2. \quad (6.9)$$

Folytonos valószínűségi változókra kiterjesztve mondhatjuk, hogy független normális eloszlások összege is normális eloszlás  $\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2$  szórásnégyzettel (és  $m = m_1 + m_2$  várható értékkel, amely itt  $m = m_1 = m_2 = 0$ ).

Mivel  $\sigma^2 = 2D \cdot t$  (síkban való bolyongás esetén  $4D \cdot t$  ill. térben való bolyongás esetén  $6D \cdot t$ , ahol  $t$  a bolyongás idejét jelöli), ezért (a dimenziótól függetlenül) a diffúziós állandók összegződnek:

$$D = D_1 + D_2. \quad (6.10)$$

*Az üledéshoz vezető effektusok: a baktérium netto tömegének emelkedése és diffúziójának csökkenése.*

A  $D$  diffúziós együttható és a  $k_B T$  termikus energia az Einstein-összefüggés alapján egyszerű összefüggésbe hozható:

$$k_B T = D \cdot 6\pi\eta R_s, \quad (6.11)$$

ahol  $\eta$  a tápoldat viszkozitása és  $R_s$  a baktérium hidrodinamikai Stokes-sugara. Ha a (6.10) és a (6.11) egyenleteket  $H$ -nak a (6.2) egyenlettel kifejezett alakjába helyettesítjük, akkor

$$H = \frac{k_B T}{m_{\text{net}} g} \left( 1 + \frac{D_{\text{tw}}}{D_{\text{Br}}} \right), \quad (6.12)$$

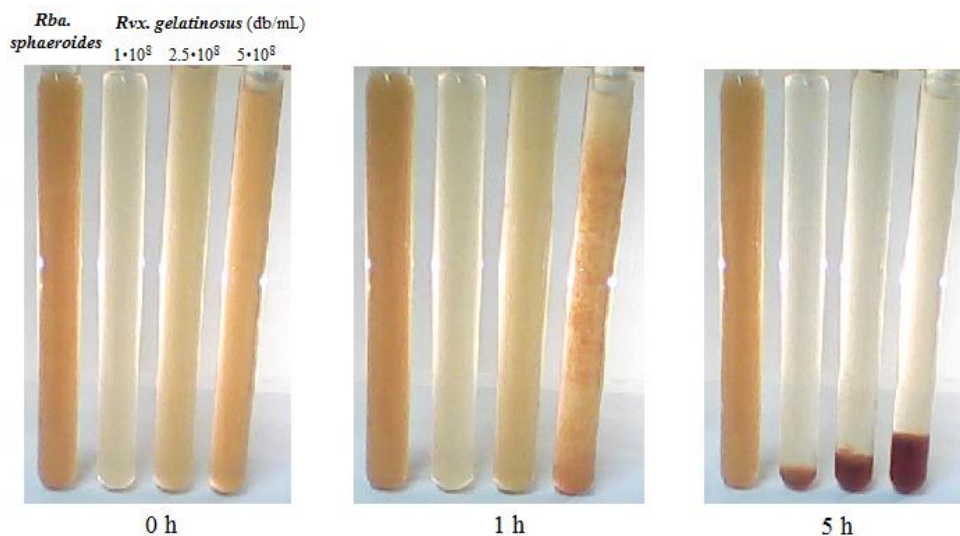
adódik, ahol  $D_{\text{tw}}$  és  $D_{\text{Br}}$  a baktériumnak a rángatózásból ill. a Brown-mozgásból adódó diffúziós állandóit és  $T$  a tápoldat hőmérsékletét jelölik. Ha a baktérium csak passzívan hanykolódik ( $D_{\text{tw}} = 0$ ), azaz csupán Brown bolyongást végez, akkor a baktérium-populáció hőmérséklete (az egyes egyedek kinetikus energiáinak a sokaságra számított átlagos értékének mértéke) a tápoldat hőmérsékletével megegyezik, azaz vele termikus egyensúlyban van. Ha azonban emellett aktív mozgást is végez, amely  $D_{\text{tw}}$  diffúziós együtthatót eredményez, akkor a baktériumok sokaságára számított (lokális) hőmérséklet már nem fog a tápoldat hőmérsékletével megegyezni, annál (lényegesen, a  $D_{\text{tw}}/D_{\text{Br}}$  faktorial) magasabb lesz. Természetesen megindul a hőmérséklet-kiegyenlítődé, de a mozgással befektetett energia mindig biztosítani képes ezt a hőmérséklet-különbséget. Nem jön létre tehát termikus egyensúly a baktérium populáció és a tápoldat (víz) között, és statisztikai értelemben a vízre és a baktériumokra nézve két különböző hőmérsékletről beszélhetünk. Ha leáll az aktív mozgás, akkor már hamarosan létrejön a hőmérséklet-kiegyenlítődé, de ezzel a tápoldat hőmérséklete nem fog számottevően emelkedni, mivel a baktériumok száma és így hőkapacitása elhanyagolható a vízmolekulák számához és hőkapacitásához képest.

Tovább elemezve a (6.12) egyenletet megállapíthatjuk, hogy a karakterisztikus  $H$  távolság változásáért gyakorlatilag két tényező tehető felelőssé: 1) a baktérium rángatózó mozgása (ill az ebből számított  $D_{\text{tw}}$  diffúziós állandó) és 2) a baktérium (netto) tömege. Míg a rángatózó mozgás növeli, addig a baktérium tömegének növekedése csökkenti  $H$  értékét, azaz a tenyészcsőben való, az egyenleteshez közeli eloszlás esélyét. A sejt-populáció növekedése során mindkét mennyiség változhat. A növekedés kezdeti szakaszában kicsiny a sejtkoncentráció, a sejtek nem aggregálódnak (netto tömegük minimális), és az egyedi sejtek szabadon, nagy  $D_{\text{tw}}$  diffúziós állandóval mozoghatnak (planktonikus életmód). A sejtfejlődés kései fázisában a sejtek „besűrűsödnek”, biofilmek hálózata alakul ki, amelyben a sejtek egymással könnyen összetapadnak, asszociátumokat képeznek, és ezáltal a netto tömegük megnő. Ezzel párhuzamosan szabad mozgásukban egyre inkább korlátozottak lesznek, ami formálisan

a  $D_{tw}$  diffúziós állandó csökkenésében fejeződik ki. Két, a süllyedésre meghatározó módon és egyirányba ható tendencia (netto tömegemelkedés és a diffúziós együttható csökkenése) lép fel. Érdekesnek ígérkezik annak kiderítése, hogy melyik hatás lesz a domináns, valamint mikor és milyen kritikus körülmények között sikerül a  $H$  mennyiséget a tenyészcső  $h$  hosszánál kisebbé tenni, ami a (6.4) összefüggés szerint a sejtek kollektív alámerüléséhez vezet.

*Modell-kísérlet: A baktériumsejtek laterális diffúziós állandójának csökkenése Ficoll 400 polimerben.*

A két effektus elkülöníthető, ha viszonylag kis koncentrációjú baktérium-tenyészetbe ( $c < 10^9$  sejt/mL) Ficoll 400 (Sigma) polimert adunk, amely képes a *Rvx. gelatinosus* sejtek megkötésére, és jól modellezi a baktérium által termelt exopolimer tartalmú biofilmnek tulajdonított szedimentációt. Itt azonban nem a sűrűség ill. viszkozitás enyhe növekedése (méginkább nem azok grádiense) miatt következik be a sejtek süllyedése (10% Ficoll oldat sűrűsége csupán 1,035 g/mL), hanem a Ficoll-hoz való kötés eredményeképp előálló nagyfokú mozgékonyosság (diffúzió) csökkenése miatt. Mivel a Ficoll tömege lényegesen kisebb, mint a baktérium tömege, ezért a kötéssel a baktérium (netto) tömegében bekövetkező emelkedés emiatt nem jelentős.



**6.5. ábra.** Különböző sejtkoncentrációjú *Rvx. gelatinosus* sejtek ülepedése 5% Ficoll 400 hatására. Az összehasonlítás kedvéért egy  $5 \cdot 10^8$  db/mL sejt számú *Rba. sphaeroides*-t tartalmazó csövet is betettünk, amely tenyészet ellenben nem ülepedett le a Ficoll hatására. Az első 1 óra után a legnagyobb sejtkoncentrációjú csöben elkezdődött az aggregátumok képződése.

Az alkalmazott viszonylag kis sejtkoncentráció miatt a baktériumok nem tapadnak össze. A mikroszkópikus felvételek is bizonyítják, hogy ilyen körülmények között a



baktériumok nem hoznak létre asszociátumokat, mégis a Ficoll koncentrációjától függően a kezelés után röviddel (néhány óra múlva) a sejtek lesüllyednek. Ennek egyértelmű oka az elágazó Ficollhoz való kötés következtében előálló mobilitás-csökkenés, azaz a baktériumok diffúziós állandójának csökkenése. Ezt a sejtek diffúziós állandójának közvetlen mérésével bizonyítjuk. Állandó sejtszám mellett a növekvő Ficoll koncentrációnál meghatározott diffúziós állandó monoton csökken. Hasonló monoton csökkenést kapunk, ha a Ficoll koncentrációt tartjuk állandó értéken, és a baktériumok koncentrációját emeljük. Ha a diffúziós állandóban megfigyelt csökkenés eléri a (6.12) egyenlet által meghatározott kritikus értéket, akkor a sejtek szedimentálódnak.

Megkíséreljük a fent elmondottaknak kvantitatív háttérrel adni egy egyszerűsített Ficoll-baktérium kötési modellben. Jelölje  $[P]$  és  $[B]$  a poliszacharid (polimer) ill. baktérium koncentrációit. A sejtek a poliszacharidon  $n$  számú, egymástól független helyen, de mindenütt ugyanazon  $K$  kötési állandóval kötődhetnek az alábbi aránnyal (lásd a sejtek  $Hg^{2+}$ -kötésével kapcsolatos korábbi számításokat):

$$\frac{[B_{\text{free}}]}{[B_{\text{tot}}]} = \frac{1 - n \cdot \frac{[P]}{[B_{\text{tot}}]} - \frac{1}{K \cdot [B_{\text{tot}}]} + \sqrt{\left(1 - n \cdot \frac{[P]}{[B_{\text{tot}}]} - \frac{1}{K \cdot [B_{\text{tot}}]}\right)^2 + \frac{4}{K \cdot [B_{\text{tot}}]}}}{2} \quad (6.13)$$

Itt a „tot” és „free” indexek a baktériumok teljes, ill. szabad (nem kötött) mennyiségeire vonatkoznak. Azok a (planktonikus) baktériumok, amelyek nem kötődnek a polimerhez, a szabad laterális mozgásra jellemző  $D_{\text{free}}$  diffúziós állandóval mozognak, míg azok, amelyek a polimerhez kötődnek, lelassulnak, és a mozgásuk diffúziós állandója  $D_{\text{bound}}$  értékre csökken. A megfigyelhető diffúziós állandó ezeknek a megfelelő koncentrációkkal súlyozott értéke lesz:

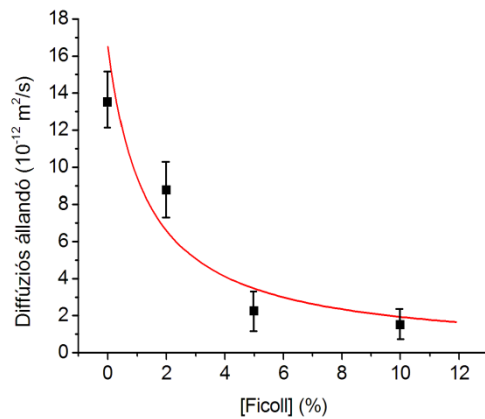
$$D = \frac{D_{\text{free}} \cdot [B_{\text{free}}] + D_{\text{bound}} \cdot [B_{\text{bound}}]}{[B_{\text{free}}] + [B_{\text{bound}}]}, \quad (6.14)$$

vagy, kis átrendezés után (felhasználva, hogy  $[B_{\text{tot}}] = [B_{\text{free}}] + [B_{\text{bound}}]$ )

$$D = D_{\text{bound}} + (D_{\text{free}} - D_{\text{bound}}) \cdot \frac{[B_{\text{free}}]}{[B_{\text{tot}}]}. \quad (6.15)$$

A koncentrációt (és ennek megfelelően a  $K$  kötési állandót) db/térfogat (ill. térfogat/db) egységben mérjük. A baktériumnál ez közvetlenül a Bürker-kamrával való mérésből következik (általában  $[B_{\text{tot}}] = 10^9$ - $10^{12}$  sejt/L tartományba esik), míg Ficoll 400-nál ezt a

molekulatömegeből ( $4 \cdot 10^5$  g/mol) kell átszámítani. Pl. 10% (w/v) Ficoll [ $P$ ] = 0,1 g/mL = 0,25 mM =  $1,5 \cdot 10^{20}$  db molekula/L koncentrációnak felel meg.

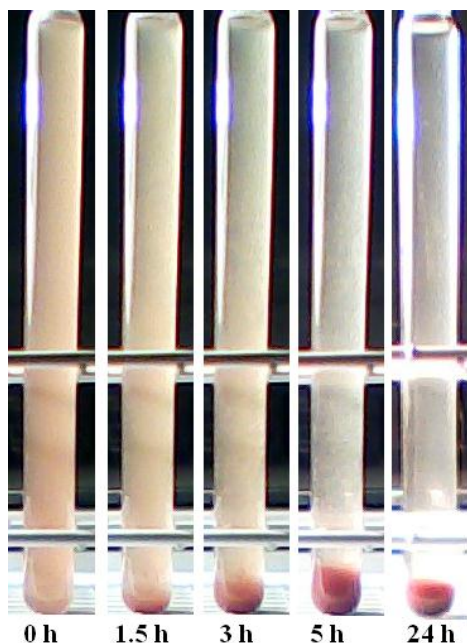


**6.6. ábra.** *Rvx. gelatinosus* sejtek diffúziós állandójának csökkenése a Ficoll 400 koncentrációjának függvényében.

A kísérletünkben [ $B_{\text{tot}}$ ] =  $1 \cdot 10^{11}$  db molekula/L koncentrációjú baktérium-tenyészetet választottunk, és a Ficoll koncentrációját 0%-ról 10%-ra növeltük. A megfigyelt diffúziós állandó monoton csökkent a Ficoll 400

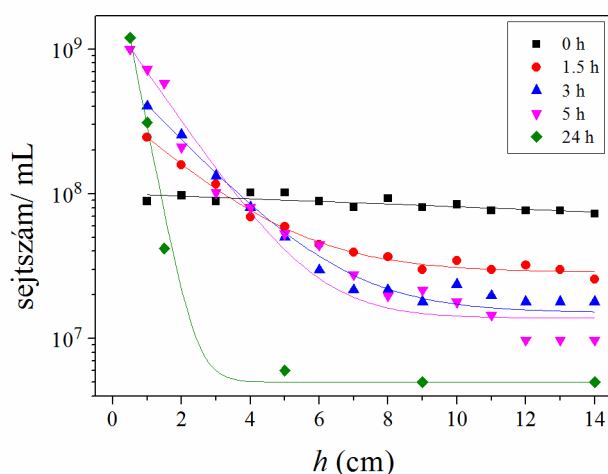
koncentrációjának emelkedésével. Egy nagyságrendű volt a csökkenés 10% Ficoll 400 esetén. A mért pontokra jól illeszthető a fenti modellből kiszámítható görbe. A kötési helyek számának ( $n$ ) és a kötési állandónak ( $K$ ) egyértelmű meghatározására azonban szükség lett volna még ettől független, kiegészítő mérésre, de erre nem terjedt ki az érdeklődésünk. Az  $n = 1$  érték választása jó közelítés, mert az 1  $\mu\text{m}$  lineáris méretű baktérium számára valószínűsíthetően térbeli okokból csak egyetlen kötőhely lesz hozzáférhető a polimeren, amelynek Stokes rádiusza mindössze 10 nm. Ekkor a kötési állandóra  $K = 10^{-19,3}$  L/db molekula értéket, a határoló diffúziós állandókra pedig  $D_{\text{free}} = 16.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ill.  $D_{\text{bound}} \cong 0$  értékek adódnak. Az utóbbi érték lényegében a baktérium Brown mozgásából származó diffúziós állandót közelíti, amely a sejt relatíve nagy méreténél fogva eleve kicsiny érték: 1  $\mu\text{m}$  Stokes rádiuszt feltételezve az  $1 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{s}^2$  viszkozitású vízben a Brown mozgás diffúziós állandójára a (6.11) egyenletből következően  $0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  érték adódik. Ez még tovább csökken, és teljesen elhanyagolhatóvá válik, ha a baktérium a polimerhez kötődik.

Maga a sejtek süllyedése hidrodinamikai probléma, de az ezt megelőző állapot hidrosztatikai. A sejteknek a magasság szerinti eloszlása Boltzmann-eloszlást követ, amelynek várható értéke („súlypontja”) a tenyészcső középmagasságából fokozatosan a cső alja felé kúszik a kritikus süllyedést közvetlenül megelőző egyensúlyi állapotokban. A szedimentáció emiatt nem a cső teljes hosszában egyszerre fog elindulni, azaz nem a „kvázi” egyenletes eloszlást megőrizve fog lefele csúszni, hanem az alsó rétegekben (az ottani valamivel nagyobb sejt koncentráció miatt) fog elkezdődni. A leülepedés első hulláma alulról indul, amelyet a felsőbb rétegek kis késéssel követnek.



**6.7. ábra.** *Rvx. gelatinosus* baktériumok ülepedése 5% Ficoll 400 hatására. Sejtszám:  $10^8$  db/mL. A Ficoll hozzáadása után 1.5 órával kezdődött meg a leülepedés. 5 óra után a cső alján lévő aggregátum tömörödik, és a felülúszóban maradt szabad sejtek pedig tovább osztódnak.

A kritikus állapot elérése utáni süllyedés másik jellemzője az, hogy nem a teljes sejttömeg fog leülepedni, hanem csak azok, amelyek a Ficoll-hoz kötődtek, így elvesztették mobilitásukat. A tenyészet tehát nem fog teljesen kitisztulni a sejtek kollektív süllyedése miatt, hanem mindig megőriz egy halványsárga/barna színt (árnyalatot), ami a visszamaradt (lebegő) sejtállománynak köszönhető. Ebben az állományban a (nem kötődött) sejtek továbbra is szabadon mozognak, és gócként szolgálnak egy másik leülepedési hullám kialakulásához. A sejtek szaporodása miatt ugyanis egy későbbi időpontban hasonló kritikus körülmények fognak bekövetkezni, és a jelenség megismétlődik. A cső alján ilyen módon egymásra rakódó rétegeket lehet megkülönböztetni. A kísérleteink során 3-4 ilyen periódust rutinszerűen meg tudunk figyelni.



**6.8. ábra.** *Rvx. gelatinosus* sejtek ülepedése 14 cm hosszú tenyészcsővekben 5% Ficoll 400 hatására (a 6.7. ábra kiértékelése után). Sejtszám:  $10^8$  db/mL.

A kísérletileg megfigyelhető egyensúlyi sejteloszlások közvetlenül a kritikus süllyedés megjelenése előtt jól mutatják ezt a tendenciát. A kísérleti adatok azzal a legegyszerűbb feltevéssel is jól szimulálhatók, hogy a baktériumok elkülönülő két (szabad és Ficoll-hoz kötött) populációja külön-külön egy-egy Boltzmann eloszlást követ különböző  $c_0$  (teljes szabad, ill. kötött koncentráció) és  $H$  értékekkel (lásd a (6.3) egyenletet). Ez a két populáció, mint két független kémiai identitás jelenik meg a teljes szabadenergia

kifejezésében. A megfigyelt baktérium-eloszlás a két eloszlás összege lesz. Emiatt nem lesz egyetlen Boltzmann-eloszlással leírható a megfigyelt eloszlás, ami jól kivehető a  $\ln c$  vs.  $x$  függvényen, amely láthatóan nem írható le egyetlen egyenessel.

### *Kollektív süllyedés: a biofilm hatása*

A baktérium által termelt exopolimer a tenyésztő előrehaladtával egyre sűrűbb hálót von a sejtek köré, amelynek során mind a baktérium netto tömegének emelkedésével, mind a rángatózásból származó diffúziós állandójának csökkenésével számolnunk kell (lásd a (6.12) egyenletet). Ebben az esetben (szemben a Ficoll 400 polimer alkalmazásával) a két jelenség együttesen lép fel, és az elkülönítésükre csak gondolat kísérletet végezhetünk.

Az egyszerűség kedvéért vizsgáljunk meg egy olyan egydimenziós bolyongási problémát, amelyben  $N$  számú részecske (sejt) összekapcsolódott egyetlen asszociátummá. Arra a kérdésre próbáljunk választ adni, hogy az aggregátum képződésével mennyire csökkenhet a részecskék diffúziós együtthatója. Az összekapcsolódás előtt a (monomerikus) részecskék  $\Delta t_0$  időközönként  $L_0$  hosszúságú lépéseket tettek meg véletlenszerű irányban (vagy jobbra vagy balra). A diffúziós

együtthatót a

$$D = \frac{L_0^2}{2 \cdot \Delta t_0} \quad (6.16)$$

összefüggés alapján számíthatjuk ki. Ha 2 részecske szorosan összekapcsolódik, akkor (egységugrások megtételét feltételezve) csak akkor mozdulhat el, ha mindkét részecske egyszerre egyirányba (vagy mindkettő balra vagy mindkettő jobbra) szeretne éppen lépni. Ennek bekövetkezésének valószínűsége  $\frac{1}{2}$ . Ha  $N$  számú részecske kapaszkodik össze, akkor ennek valószínűsége  $2^{N-1}$ . Az asszociátum tehát ritkábban lép:  $\Delta t = 2^{N-1} \cdot \Delta t_0$ , de ha lép, akkor nagyobb, mint az egyedi részecske, mert  $L = N \cdot L_0$  lesz a lépéshossza. Az ilyen feltételekkel megvalósuló egydimenziós bolyongás diffúziós állandója

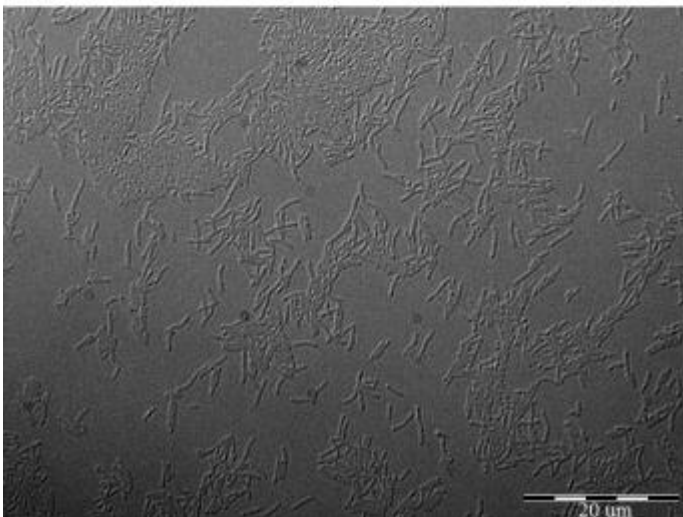
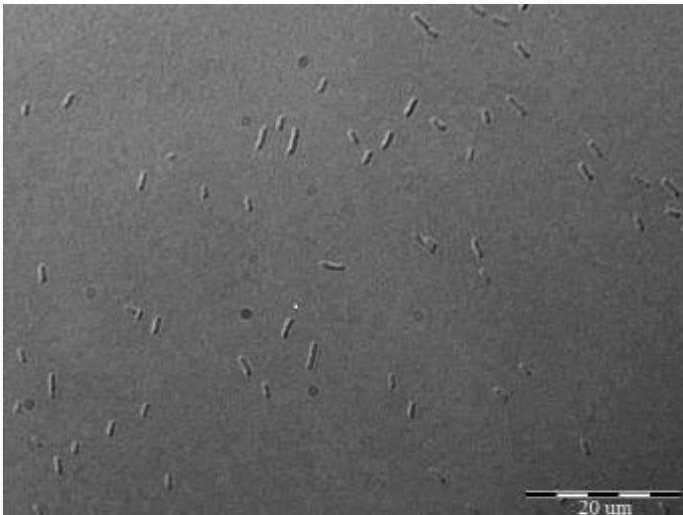
$$D = \frac{L^2}{2 \cdot \Delta t} = \frac{N^2}{2^{N-1}} \cdot D_0 \quad (6.17)$$

lesz, azaz a megfigyelhető diffúziós állandó igen érzékeny az  $N$  aggregáció-számra, mert annak növekedésével  $D$  igen gyorsan (exponenciálisan) csökken. Ha a netto tömegnek és a diffúziós együtthatónak az aggregáció-számmal való közelítő változását beírjuk a (6.12) egyenletbe, akkor

$$H = \frac{k_B T}{N \cdot m_{\text{net}} g} \left( 1 + \frac{\frac{N^2}{2^{N-1}} \cdot D_{\text{tw},0}}{\frac{1}{N} \cdot D_{\text{Br},0}} \right) \quad (6.18)$$

adódik, ahol a 0 index a monomerikus (planktonikus) baktériumok esetén mért értékekre vonatkozik, és feltételeztük, hogy az asszociátum Stokes-rádiusza az egyedi baktériumok Stokes-rádiuszainak összege (azonos baktériumok esetén  $N$ -szerese). Ezzel a közelítéssel azért élhetünk, mert (a biofilm által összekötött) asszociátum tagjai elég távol vannak egymástól, és megőrzik egyedi hidrodinamikai jellemzőiket (így a Stokes-sugaraikat). Az asszociátumra ható (Stokes-féle) belső súrlódási erő az egyes

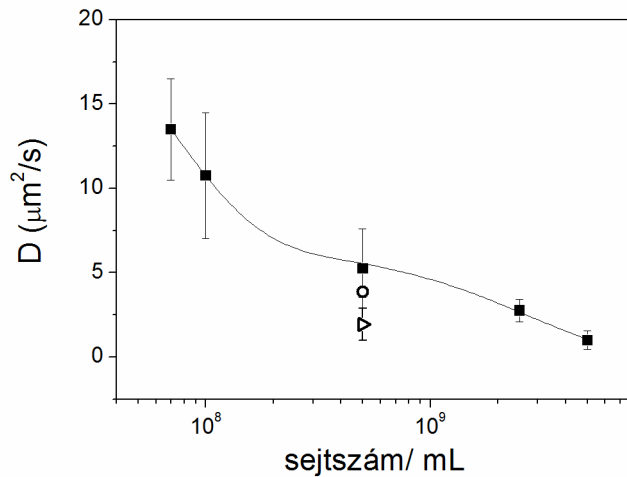
baktériumokra ható súrlódási erők ( $6\pi\eta R_s v$ ) egyszerű algebrai összege lesz, azaz  $N$  számú azonos baktérium esetén  $6\pi\eta(NR_s)v$  (itt  $v$  a baktérium mozgási sebessége).



**6.9. ábra.** Mikroszkópos (Nomarski) felvétel *Rvx. gelatinosus* 4 órás (felső) és 50 órás (alsó) sejtekről. A felső képen a növekedési fázisnak megfelelően csak planktonikus egyedi sejtek láthatók, az alsó képen ellenben monomerek, dimerek és nagyobb asszociátumok is vannak (60x nagyítás, olaj immerzió). A 20  $\mu\text{m}$ -es skála szerint a baktérium tipikus hosszanti mérete 2-4  $\mu\text{m}$ .

Amikor lebeg a baktérium, akkor a rángatózásból származó diffúziós állandó sokkal (nagyságrendekkel) nagyobb, mint a Brown mozgásból származó diffúziós állandó:  $D_{\text{tw},0} \gg D_{\text{Br},0}$ , ezért a hányadosuk mellett 1 elhanyagolható a (6.18) egyenlet számlálójában. Ilyen közelítésben az asszociációs szám ( $N$ ) növekedésével  $H$  egy tisztán exponenciális függvény szerint fog csökkenni:  $H = H_0/2^{N-1}$ , és amikor a tenyészcső  $h$

hosszának közelébe kerül ( $H \cong h$ ), akkor már kezdetét veszi a számottevő kollektív süllyedés.  $N = 10$  átlagos méretű asszociátum létrejöttével  $H$  értéke akár 3 nagyságrendet is csökkenhet a planktonikus állapotban mért értékhez képest, amivel már könnyen megvalósulhat a süllyedés kritikus feltétele.



**6.10. ábra.** *Rvx. gelatinosus* sejtek diffúziós állandójának (■) csökkenése a tenyészet növekedése során. Az x-tengelyen a tenézsűrűség megfelelő sejtkoncentráció van feltüntetve. A 3-4 sejtől (○) és 10-15 sejtől álló asszociátum (▷) csökkenő diffúziós állandóit is feltüntettük.

A 6.10. ábrán bemutatjuk, hogy mennyire érzékenyen változik (csökken) a mért diffúziós állandó az asszociátum növekedésével. A nagyobb sejtkoncentrációjú mintában egyaránt megtalálhatók planktonikus és különböző mértékben aggregálódott sejtek. Ezeket külön-külön kiválasztva meghatároztuk a diffúziós együtthatókat. Azt találtuk, hogy már a dimér ( $N = 2$ ) diffúziós állandója is jelentősen csökkent a monomeréhez ( $N = 1$ ) képest, és (az exponenciális csökkenés jellegének megfelelően) már kisebb rendű asszociátumok ( $N = 3-5$ ) esetén is nagyon lecsökkent diffúziós állandókat mértünk. Az ennél is nagyobb aggregátumok diffúziós együtthatói annyira lecsökkentek, hogy nem tudtuk meghatározni, mert az általunk alkalmazott felbontásban már mozdulatlanoknak tűntek.

*A Boltzmann-eloszlástól való eltérés nagy sejt- (ill. biofilm) koncentráció esetén.*

Szigorúan véve már Ficoll 400 polimer alkalmazása esetén is megfigyelhettük, hogy a sejtek magasság szerinti eloszlása nem egyetlen Boltzmann-eloszlást követett. Ez a megfigyelés abból származott, hogy legalább két sejtpopulációt különíthettünk el (szabad és Ficoll-hoz kötött sejteket), és ezekre külön-külön ugyan érvényes volt a Boltzmann eloszlás, de a baktériumok összességére nézve már természetesen nem. Most megmutatjuk, hogy nagyobb sejtkoncentrációk esetén már a homogén sejtpopulációkra nézve sem lesz szigorúan érvényes a magasság szerinti Boltzmann-eloszlás. Korábban a Boltzmann-eloszlásba a hőmérsékleten keresztül intuitív módon vittük be azt a

korrekciót, amely a Brown mozgás mellett a rángatózó mozgásból származó bolyongást is figyelembe veszi (lásd a (6.12) egyenletet). Most ennek jogosultságát szilárd elvi (termodinamikai) alapról kiindulva bizonyítjuk. Ennek révén a sejteknek a gravitációs térben való eloszlásáról nyerhetünk további érdekes értelmezési és (esetleg ebből kiindulva később) gyakorlati alkalmazási lehetőséget.

Vizsgáljuk meg, mekkora szabadenergia-változást szenved egy baktérium, miközben (vákuumból) vizes oldatba visszük! Egyrészt a víz molekuláival való keveredés miatt entropikus energiára tesz szert („entropy of mixing”), másrészt a gravitációs térben helyzeti energiát nyer:

$$\Delta G = \Delta G^0 + k_B T \cdot \ln c + m_{net} g \cdot x, \quad (6.19)$$

ahol  $\Delta G^0$  a standard szabadenergia-változás,  $T$  az a hőmérséklet, amely a baktérium teljeskörű véletlenszerű mozgását figyelembe veszi: a Brown-mozgáshoz  $T_0$  (szoba)hőmérséklet, a rángatózáshoz pedig  $T_{tw}$  hőmérséklet rendelhető. Az ezekből a véletlenszerű mozgásokból származó energia-járulékok összegződnek. Feltételezzük, hogy a rángatózó mozgás, így az ennek tulajdonított  $T_{tw}$  hőmérséklet növekvő sejtkoncentrációval fokozatosan csökken, majd egy  $c_{cr}$  kritikus értéknél nagyon meredeken (exponenciálisan) zuhan, végül eltűnik:

$$T = T_0 + T_{tw} \cdot \exp\left(-\frac{c}{c_{cr}}\right). \quad (6.20)$$

Az ezt kiváltó ok a sejtek tömegelése és/vagy az általuk termelt biofilm mennyiségének fokozott (exponenciális) emelkedése. Az itt szereplő mértékegység nélküli  $c$  mennyiség a baktérium részecske-szám frakcióját jelöli a vizes oldatban:

$$c = \frac{n_{bak}}{n_{bak} + n_{v\acute{z}}}, \quad (6.21)$$

ahol  $n_{bak}$  és  $n_{v\acute{z}}$  az ugyanabban a térfogatban levő baktériumok ill. vízmolekulák számát jelentik. Mivel 1 mL vízben  $n_{v\acute{z}} = 3,3 \cdot 10^{22}$  vízmolekula (vízrészecske) van, ezért ha például  $1 \cdot 10^{10}$  1/mL sűrűségű a sejtenyészet, akkor az ennek megfelelő baktérium részecske-szám frakció a (6.21) definíció alapján  $c = 3 \cdot 10^{-13}$  lesz.

A baktériumok a függőleges csőben akkor vannak egyensúlyi helyzetben, ha mindenütt ugyanakkora szabadenergiával bírnak, vagyis a szabadenergiájuk a helykoordinátától ( $x$ -től) függetlenül mindenhol azonos:  $\partial(\Delta G)/\partial x = 0$ . A  $\Delta G$ -nek a (6.19) egyenlettel megadott függvényének  $x$  szerinti parciális hányadosának felírásakor vegyük figyelembe, hogy  $c$  közvetlenül,  $T$  pedig közvetve ( $c$ -n keresztül, lásd a (6.20)

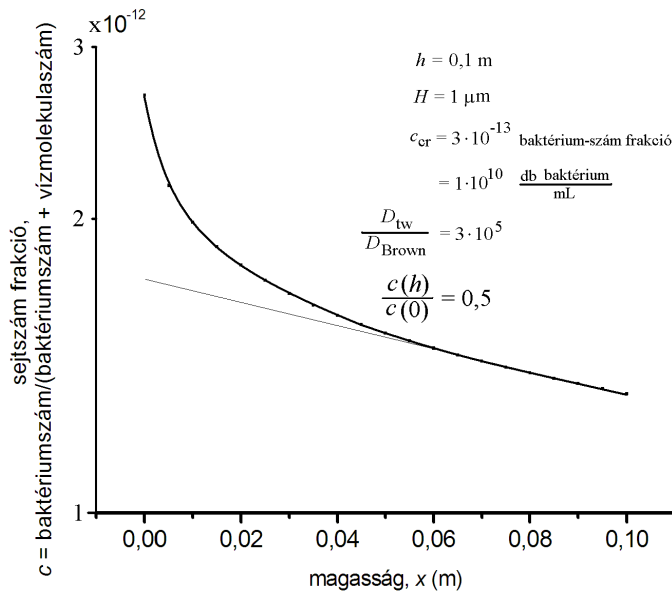
egyenletet) függ  $x$ -től. Az ilyen módon felírható differenciál-egyenlet szerencsére analitikus módon (zárt alakban) megoldható:

$$\ln c + \frac{T_{tw}}{T_0} \cdot e^{-\frac{c}{c_{cr}}} \cdot \ln c = -\frac{x}{H} + const. \quad (6.22)$$

Az integrációs konstans értékét a tenyészcsőben fellelhető baktériumok megadott számából (így a  $\bar{c}$  átlagos koncentrációból) lehet meghatározni:

$$\bar{c} = \frac{\int_0^h c(x) dx}{h} \quad (6.23)$$

A (6.22) egyenlet speciális esetekben visszaadja a korábban kapott egzakt (Boltzmann-eloszlás) és intuitív módon (rángatással kiegészített Boltzmann-) egyenleteket. Ha a baktérium nem végez semmiféle véletlenszerű aktív mozgást (nincs rángatózás,  $T_{tw} = 0$ ), akkor visszakapjuk a szokásos Boltzmann-eloszlást a (6.2) egyenlettel megadott  $H$  ( $\ll h$ ) magassággal. Ha van rángatózás ( $T_{tw} \neq 0$ ), de a sejttenyészet sűrűsége messze a kritikus koncentráció alatt van ( $c \ll c_{kr}$ ), akkor újra csak Boltzmann-eloszlást kapunk, ám megemelkedett  $H(\geq h)$  magassággal, amelyet a (6.12) egyenlettel már korábban megadtunk. (Az egyes mozgástípusoknak megfelelő  $T_0$  (Brown) ill.  $T_{tw}$  (rángatási) hőmérsékletek arányát megfeleltethetjük a (6.11) alatti Einstein összefüggés alapján a megfelelő diffúziós állandók arányával).

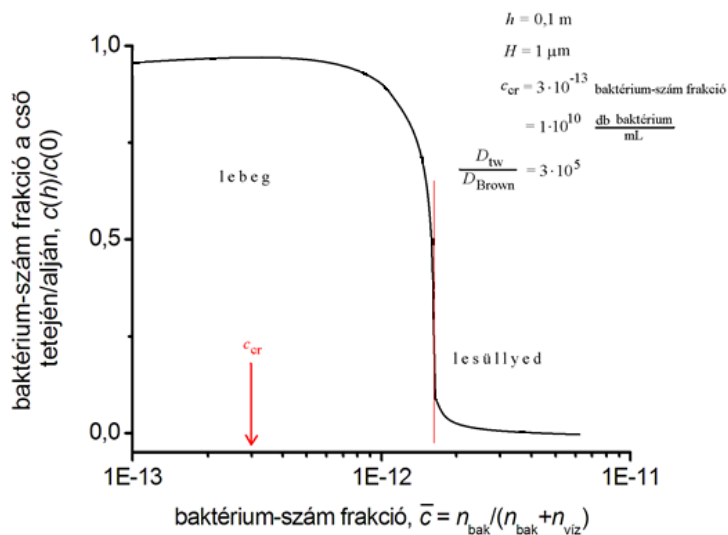


**6.11. ábra.** A sejtszám frakció magasság szerinti eloszlása  $h = 10$  cm hosszú függőleges tenyészcsőben a (6.22) egyenlet alapján az ábrán megadott adatokkal számolva. A függőleges tengely logaritmikus beosztása egyértelművé teszi a Boltzmann-eloszlástól való eltérést.

Ha a rángatózó mozgást a sejttenyészet magas koncentrációja a (6.20) egyenlet szerint exponenciálisan fékezi, akkor a baktériumok már nem Boltzmann-eloszlás szerint helyezkednek el a tenyészcsőben, hanem a cső alja felé haladva a Boltzmann-eloszlás által megadottnál gyorsabban (meredekebben) sűrűsödnek. Erre mutatjuk be a 6.11 ábrát, amelyet a (6.22)



és (6.23) egyenletek numerikus megoldásából kaptunk az ábrán feltüntetett paraméterek esetén. Mivel a függőleges lépték logaritmikus, ezért az egyenestől (azaz a Boltzmann-eloszlástól) való eltérés nagyon meggyőző.



**6.12. ábra.** A (6.22) és (6.23) egyenletekkel szimulált éles átmenet a sejtek lebegése (sejtszuszpenzió) és süllyedése (szedimentáció) között. A sejtszám-frakció növekedésével hirtelen következik be a változás, amely a kritikus jelenségekre jellemző.

Ennél a sejtkoncentrációnál (ahol a baktériumszám-frakció  $\bar{c} = 1,6 \cdot 10^{-12}$ ) nem

csak a sejtek magasság szerinti eloszlása változik látványos módon, hanem a sejtek lebegésének/süllyedésének állapota is rendkívüli érzékenységgel. Ennél a koncentrációnál a cső alján már kétszer nagyobb a sejtsűrűség, mint a tetején ( $c(h)/c(0) = 0,5$ ), és ha tovább növeljük a sejtek koncentrációját a tenyészetben, akkor szinte azonnal, a kritikus jelenségkörre jellemző hirtelenséggel fog a süllyedés bekövetkezni. A 6.12 ábrán jól láthatóan ebben a tartományban szinte függőleges az eloszlást jellemző  $c(h)/c(0)$  görbe meredeksége, amely az exponenciális függvényénél lényegesen meredekebb változást takar.

A 6. fejezet a következő kézirat alapján készült:

**Mariann Kis**, Gábor Sipka, Péter Maróti (2016) Critical phenomena in the world of bacteria: collective sinking of *Rubrivivax gelatinosus* cells. *Eu Biophys Journal* (kézirat).

## 7. Összefoglaló

Eredményeim az alábbi pontokban foglalom össze:

1.) A növekedés stacioner fázisában a sejtek fotoszintetikus egységei közelebb kerülnek egymáshoz, és az energetikai kapcsolódásuk is szorosabb, mint a fejlődésük korai exponenciális szakaszában.

A *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 fotoszintetikus membránjának fejlődését fényindukált abszorpciós spektroszkópiával, bakterioklorofill fluoreszcencia indukció és relaxációval követtem nyomon a tenyészet korai exponenciális és késői stacioner fázisai alatt. 1.) A stacioner fázisú sejteknél a belső antennakomplex kifejezettebb, mint a perifériális (LH1/LH2~1.5). 2.) A fluoreszcencia sáv maximumának 5 nm-es vörös eltolódását, és a LH1 belső antenna B875 abszorpciós sávú pigmentjének 5 nm-es kék eltolódását figyeltem meg. 3.) A változó fluoreszcencia ( $F_v/F_{max}$ ) 10 %-os növekedését tapasztaltam a tenyészet korának előrehaladtával. A fotokémiai folyamatok csekély mértékű gyorsulást mutattak (a félemelkedési idő 200  $\mu$ s-ról 140  $\mu$ s-ra csökkent), amely az antennarendszerek erősebb csatolódásának jele. A stacioner fázisú sejtek fotoszintetikus egységei (PSU) közelebb helyezkednek el egymáshoz, és szorosabb az energetikai kapcsolat alakul ki köztük, vagyis hatékonyabb lesz az energiaátmenet az antennától a RC felé. 4.) A stacioner fázisú sejtek hosszabb ideig tartó, stabilabb membránpotenciált mutatnak (1. ábra). Az elektrokrómikus jel felerősödése (0.5 mOD-ról 3 mOD-ra) annak köszönhető, hogy a membránbeli veszteségi folyamatok csökkennek, azaz a rekombinálandó elektromos töltések egymástól jobban elszigetelődnek. 5.) A Bkl fluoreszcencia sötétrelaxációja (1 ms) megvilágítás után tízszer hosszabb ideig tartja a magas fluoreszcencia szintet. A stacioner fázisú sejteknél lassabban jutnak el az elektronok a komplexekhez, mert a membrán tömörebb és ezért lassabb a diffúzió.

2.) A lépcsőzetesen kialakított sejtciklus (szinkrontenyészet) körülményei között kimutattam, hogy a pigmentek termelése és aktivációja független és időben folyamatos (aszinkron), a teljes foszfolipid-termelés és a membrán energetizációja ellenben a sejtciklussal szinkronban áll.

A *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 szinkrontenyészet fotoszintetikus membránjának jellegzetességeit fényindukált abszorpció spektroszkópiával, bakterioklorofill fluoreszcencia indukcióval és a sejtek molekuláris komponenseinek (foszfolipidek, karotenoidok és bakterioklorofill) meghatározásával jellemeztem. Amíg a

bakterioklorofill ( $0.26 \mu\text{M h}^{-1}$ ) és a karotenoid ( $0.38 \mu\text{M h}^{-1}$ ) pigmentek termelése, valamint a fénybegyűjtő ( $F_{\text{max}}: 0.23 \text{ h}^{-1}$ ) és a RC komplexek aktivációja ( $\Delta A_{798}: 0.67 \text{ mOD/h}$ ) sejtciklus-független és időben folyamatos növekedést mutat karakterisztikus lag fázissal ( $\sim 3$  óra), addig a teljes foszfolipid mennyiséget és a membrán energetizációját (elektrokromizmus) lépcsőzetes sejtciklus szabályozott növekedés jellemez. A sejtosztódáskor a teljes membrán felület jelentősen megnövekszik, mert a sejteknek a sajátjukon kívül létre kell hozni a leánysejtek membránját is. Ezért jelenik meg hirtelen nagy mennyiségű foszfolipid felhalmozódás a sejtosztódások körül (3-4 óra között  $[P]_i: 0.4 \rightarrow 0.7$  (rel. egység)), amelyeknek majd az újonnan képződő sejtek ICM-ba kell beépülnie. A membrán energetizációjában megfigyelt növekedést ( $\Delta A_{530-510}: 0.2 \rightarrow 0.5$  (rel. egység)) vagy a diffúzióban bekövetkező távolság-csökkenés (tömörebb a membrán) vagy a diffúziós állandó emelkedése (növekszik a membrán fluiditása, esetleg mindkettő) eredményezi.

3.) Az aerob- anaerob átmenet (zöldítés) során a fotoszintetikus apparátus funkcionális egységeként áll újra össze.

A *Rhodobacter sphaeroides* és *Rubrivivax gelatinosus* fotoszintetikus membránjának lebomlását és visszaépülését fényindukált abszorpció spektroszkópiával, bakterioklorofill fluoreszcencia indukció és relaxációval, az ezeket alátámasztó morfológiai változásokat pedig transzmissziós elektronmikroszkópiával követtem nyomon. Az intracitoplazma membrán képződését gátolja a 3% feletti oxigén koncentráció. 20%-os oxigén koncentráció mellett a belső LH1-es antenna lesz a domináns, mivel a LH2 perifériás antennakomplex B800 komponense teljesen lebomlik, és a B850 csak kismértékű változást szenved. A fotokémiai folyamatok teljesítménye ( $F_v/F_{\text{max}} 0.7 \rightarrow 0.1$ ) és sebessége ( $1.2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \rightarrow 2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ) is jelentősen csökken. Ezzel szemben az elektrontranszfer kissé felgyorsul ( $6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \rightarrow 1.5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ), mert a fotoszintetikus egységek közti kapcsolat fellazul, a cit  $c_2$  és kinon számára azonnal elérhetőek a fehérje komplexek (RC és cit  $bc_1$ ). A zöldítés során megfigyelhető gyors bakterioklorofill szintézis (0-4 óra) mellett megfigyelhető a perifériális fénybegyűjtő antennák domináns (LH2/LH1 $\sim 2.5$ ) szerepe, a fotokémiai folyamatok jelentősen megemelkedett sebessége ( $\sim 7 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ) és teljesítménye ( $F_v/F_{\text{max}} \sim 0.7$ ), valamint az elektrontranszfer sebességének mérsékelt csökkenése ( $\sim 6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ). Az anaerob viszonyokhoz való adaptálódás kezdetén a perifériális LH2 antennák a folyamatosan összeálló mag-komplex köré csoportosulnak. Az egyre több mag-komplex

kialakulásával és az azokat körülvevő perifériális antennák felhalmozódásával zártabb szuperkomplexek alakulnak ki. Így a disztálisan elhelyezkedő RC nehezebben elérhető a mobilis redox elemek számára (cit  $c_2$ , kinonok), ami az elektrontranszfer sebességének csökkenését idézi elő. Eszerint a fotoszintetikus egységek funkcionális komplexenként állnak össze, a perifériális fénybegyűjtő antennák tömörödése növekvő konnektivitást és teljesítményt eredményez.

4.) A fotoszintetizáló baktériumok legsérülékenyebbek az ólom hatására, gyenge toleranciát mutatnak a higany iránt és igen ellenállónak bizonyulnak a krómmal szemben. A biofilmes életmódjának köszönhetően a *Rubrivivax gelatinosus* magasabb rezisztenciát mutat a nehézfémekkel szemben.

A nehézfémzennyezés az egyik legfőbb környezeti kockázat a vízi környezetben élő baktériumok számára. Három különböző baktérium törzset (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* és *Rubrivivax gelatinosus*) kezeltünk három különböző nehézfémrel, mikromólos (Hg(II)), szubmillimólos (Cr(VI)) és millimólos (Pb(II)) koncentrációkban. A membrán funkcionális változásait fényindukált abszorpcióváltozással és bakterioklorofill fluoreszcencia indukcióval, az ezeket alátámasztó morfológiai változásokat pedig transzmissziós elektronmikroszkópiával követtem nyomon. A baktériumok eltérő érzékenységgel reagáltak. Az ólom hatására azonnali és jelentős a roncsolás az antennakomplexekben, amelyre a Bkl fluoreszcencia drasztikusan megváltozott indukciójából (4. ábra, ahol csökken az  $F_0$  és az  $F_{max}$  szint is anélkül, hogy a változó fluoreszcencia ( $F_v/F_{max}$ ) jelentősen módosulna) és a fény indukált abszorpcióváltozás kinetikájából (a gyors felemelkedés amplitúdója megfelelődik) következtethetünk. A magasabb koncentrációban (20 mM) alkalmazott Cr(III) ionoknak semmilyen hatásuk sincs, ellenben a 0.8 mM koncentrációjú Cr(VI) már jelentősen megváltoztatja a RC és cit  $bc_1$  komplex között az elektron- és protontranszfert. A *Rsp. rubrum* sejtek fotokémiáját a 20  $\mu$ M koncentrációjú  $Hg^{2+}$  2-3 óra alatt leépíti, a *Rba. sphaeroides* növekedési sebességét pedig már 2  $\mu$ M  $Hg^{2+}$  lefelezi, viszont a *Rvx. gelatinosus*-ban 200  $\mu$ M  $Hg^{2+}$  sem okoz nagyobb mértékű károsodást. A *Rvx. gelatinosus* fotoszintetikus baktérium biofilmes életmódban még nagyobb rezisztenciát mutat a higannyal szemben, mint planktonikus életmódban, egyedi sejteként, mert a biofilm akár ötszörösére is megnöveli a higanykötés kapacitását. Biofilmben a sejtek hozzáférhetősége megváltozik, mert 1) a biofilmben meredek kémiai gradiens alakul ki, 2) a sejtek köré diffúz réteg képződik, és 3) a higany

adszorbeálódik a biofilm mátrixban. Megvilágított körülmények között élő *Rubrivivax gelatinosus* biofilmes tenyészet szivacsként szívja magába a higanyt, ezen tulajdonsága alapján egyszerű és olcsó eszköze lehetne a biomonitorozó és bioremediációs rendszereknek vizes élőhelyeken.

5.) A higanyfelvétel kinetikailag egy gyors passzív adszorpció és egy lassabb aktív metabolikus lépésből áll, neutrális pH-n a leghatékonyabb és aktiválható fénnel. Két, jól elkülönülő affinitású  $\text{Hg}^{2+}$  kötőhelyet azonosítottam:  $1 (\mu\text{M})^{-1}$  (erős kötés) és  $1 (\text{mM})^{-1}$  (gyenge kötés) egyensúlyi kötési állandókkal.

A higany bioakkumulációjának fizikai-kémiai tulajdonságait a *Rubrivivax gelatinosus* fotoszintetizáló baktériumban kémiai analitikai módszerrel (dithizon), fényindukált abszorpcióváltozással és bakterioklorofill fluoreszcencia indukcióval vizsgáltam. A higanyfelvételtől a következőket állapítottam meg. 1.) Kinetikailag egy gyors (perc alatti időskála) és egy lassabb (1-30 min) lépésből áll. A gyors fázis passzív bioszorpció, amely reverzibilis, nem specifikus a fémekre nézve és független a sejt metabolizmusától. A lassú fázis az aktív folyamatokat tükrözi, és függ a sejtek metabolizmusától. 2.) A higanyionok kation csatornákat is használnak az átjutáshoz, ami gátolható magas ( $0.5 \text{ mM}$ )  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációval és  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna blokkolóval. 3.) Neutrális pH-n a leghatékonyabb (acidikus tartományban a protonokkal, alkalikus tartományban pedig a hidroxil ionokkal versenyeznek). 4.) Energiafüggő, ami aktiválható fénnel és gátolható protonofórral. Ezek a baktériumok képesek felhalmozni saját tömegüknél jóval nagyobb mennyiségű ( $10^5$ ) higanyt. Két eltérő kötőhelyet figyeltem meg: egy erőset és egy gyengét  $1 (\mu\text{M})^{-1}$  ill.  $1 (\text{mM})^{-1}$  egyensúlyi kötési állandókkal. Az erős kötőhely a szulfhidril csoportoknak tulajdonítható, amelyek blokkolhatók szulfhidril módosító szerekkel, de ezeknek a száma jóval (két nagyságrenddel) kisebb, mint a gyenge kötőhelyek száma. Annak ellenére, hogy a kötőhelyek száma és affinitása hatalmas, a kötőhelyek egymástól függetlenek, vagyis a betöltöttségi állapotuk nem befolyásolja a szomszéd kötőhely kötési tulajdonságait.

6.) *Rubrivivax gelatinosus* sejtek kollektív süllyedése háttérben az általuk létrehozott biofilm mátrix miatti diffúziós állandó csökkenés és magasabb rendű sejt-asszociátumok képződése áll.

A *Rvx. gelatinosus* sejtek (kiváltképp a növekedés stacionárius szakaszában) fokozott polimer termelésre képesek, amelyet a sejten kívüli térrészbe juttatnak. Teljes polimer térháló (biofilm) alakul ki, amelybe a baktériumok bekerülnek, képesek ebben

megkötődni (aggregálódnak), és mobilitásukat ezzel elvesztik. Ezek a legfontosabb tényezők, amelyek a kollektív ülepedés kialakulásához vezetnek. Korai exponenciális fázisban az egyedi planktonikus baktériumok süllyedését aktív rendszertelen mozgásuk (rángatózásuk) akadályozza meg. A baktérium által termelt exopolimer a tenyésztő előrehaladtával egyre sűrűbb hálót von a sejtek köré, amelynek során mind a baktérium nettó tömegének emelkedésével, mind a rángatózásból származó diffúziós állandójának ( $D$ ) csökkenésével számolni kell. A nagyobb sejtkoncentrációjú mintában egyaránt megtalálhatók planktonikus ( $D = 13.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) és különböző mértékben aggregálódott sejtek. Az asszociátum növekedésével érzékenyen változik (csökken) a mért diffúziós állandó. Azt találtam, hogy már a dimér ( $N = 2$ ) diffúziós állandója is jelentősen csökkent a monomeréhez ( $N = 1$ ) képest, és (az exponenciális csökkenés jellegének megfelelően) már kisebb rendű asszociátumok ( $N = 3-5$ ) esetén is nagyon lecsökkent diffúziós állandókat ( $D = 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) mértem. A nagyobb 10-15 sejtből álló asszociátum pedig a stacioner fázisú sejtek diffúziós állandóját közelíti meg ( $D = 1.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Modell-kísérletként kis koncentrációjú ( $c < 10^9$  sejt/mL) baktérium-tenyészethez Ficoll 400 polimert adtam (1-10%), hogy a baktériumsejtek laterális diffúziós állandójának csökkenését meghatározzam (5%-nál már  $D = 2.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). A Ficoll 400 jól modellezi a baktérium által termelt exopolimer tartalmú biofilmnek tulajdonított szedimentációt. Állandó sejtszám mellett a növekvő Ficoll koncentrációnál meghatározott diffúziós állandó monoton csökken. Hasonló monoton csökkenést kaptam, ha a Ficoll koncentrációt tartottam állandó értéken, és a baktériumok koncentrációját emeltem.

## 8. Summary

The summary of my results are listed as the followings:

1.) Photosynthetic bacteria in the stationary phase of growth demonstrated closer packing and tighter energetic coupling of the photosynthetic units (PSU) than in their early logarithmic stage of development.

The development of photosynthetic membranes of intact cells of *Rhodobacter sphaeroides* was tracked by light-induced absorption spectroscopy, induction and relaxation of the bacteriochlorophyll fluorescence. 1) The dominance of the core light harvesting complex LH1 compared to the peripheral complex LH2 was stronger in old cells, than in young cells. 2) The fluorescence maximum of the old cells showed red shift of about 5 nm and similar size but blue spectral shift was observed for the B875 pigment. 3) The variable fluorescence was larger by 10% in old bacteria than in young bacteria and the photochemical rise time showed also slight variation (200→140 ms) indicating moderate changes of the size or connectivity of the antenna system during aging. 4) The old cells performed more stable membrane potential after flash excitation than the younger cells. 1 h after inoculating a fresh culture, the cells have a small abrupt increase of electrochromism followed by fast decay. The intact cells in stationary phase of growth (26 h) have additionally a second and slower increase followed by a much slower relaxation. 5.) The dark decay of the fluorescence after relatively long (1 ms) illumination shows marked difference between the cells at different growth phases. The mature (26 h) cells keep the high level of fluorescence longer (ten times) than the lag phase (1 h) cells. In stationary phase cells, the shuttle time of the electrons via mobile redox species between the complexes becomes longer probably due to rearrangement of the membrane resulting in slower diffusion.

2.) While the production of the bacteriochlorophyll and carotenoid pigments and the activation of light harvesting and reaction center complexes showed cell-cycle independent and continuous increase, the accumulation of phospholipids and the energetization of the membrane exhibited stepwise increase controlled by cell division.

Photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides* steady-state synchronised culture were characterized by light-induced absorption spectroscopy, induction of bacteriochlorophyll fluorescence and molecular components of cells (phospholipids, carotenoids and bacteriochlorophyll). In steady-state synchronous culture, the number of cells increases stepwise as all of the cells are in the same stage of their development.

The production and insertion of bacteriochlorophyll ( $0.26 \mu\text{M h}^{-1}$ ) and carotenoid ( $0.38 \mu\text{M h}^{-1}$ ) pigments into the ICM and activation of the photosynthetic complexes (light harvesting ( $F_{\text{max}}$ :  $0.23 \text{ h}^{-1}$ ), RC ( $\Delta A_{798}$ :  $0.67 \text{ mOD/h}$ ) and cytochrome  $bc_1$  complex) are cell-cycle independent processes. They do not follow a stepwise but rather a continuous process with well-defined lag phase ( $\sim 3 \text{ h}$ ) at the beginning. In contrast to the continuous production of the pigments and the RC protein, the phospholipid synthesis and the electrochromic signal due to the cytochrome  $bc_1$  complex showed clear cell-cycle dependence. Upon division of the cell, the area of the total membrane surface of the cell should increase significantly due to the resulting daughter cells with their own outer, cytoplasmic and ICM membrane systems. This is why a burst of phospholipid synthesis occurs prior to cell division (between 3-4 hours [ $P$ ]<sub>i</sub>:  $0.4 \rightarrow 0.7$  (rel. units)) and the phospholipids will be inserted into the replicating ICM as it is being partitioned to daughter cells. The electrochromic change that is connected to the energization of the membrane, demonstrates cell-cycle-dependent increase ( $\Delta A_{530-510}$ :  $0.2 \rightarrow 0.5$  (rel. unit)) upon cultivation. The changes observed during the cell cycle can be attributed either to shorter distance of diffusion (membrane bilayer crowding) or to increased diffusion coefficient (increased fluidity of the membrane) or to both effects.

3.) The photosynthetic apparatus during aerob-anaerob transition (greening) is assembled in functional unit.

The disintegration and assembly of photosynthetic membrane of intact cells of *Rba. sphaeroides* and *Rvx. gelatinosus* were tracked by light-induced absorption spectroscopy and induction and relaxation of the bacteriochlorophyll fluorescence. The morphological changes were recognized in electron micrographs. As the ICM formation is repressed by high oxygen tension, increasing the oxygen partial pressure results in disruption of ICM assembly together with disintegration of the photosynthetic complexes. The B800 component of the LH2 complex exhibits fast drop at 20 % oxygen tension, while no loss of the B850 component is observed, i.e. RC-LH1 core (875 nm) dominates. The ratio of Bkl variable fluorescence to maximum fluorescence (from 0.70 to 0.10) and the photochemical rate constant (from  $1.2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  to  $2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ) exhibits marked decreases. The rate of fluorescence relaxation showed slight increase from  $6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$  to  $1.5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ , because the protein complexes (RC and cyt  $bc_1$ ) are readily accessible to the mobile redox species (cyt  $c_2$  and Q) that assures high electron transfer rate. The greening resulted in rapid (within 0–4 h) induction of Bkl synthesis



accompanied with a dominating role for the peripheral light harvesting system (up to LH2/LH1~2.5), significantly increased rate ( $\sim 7 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ) and yield ( $F_v/F_{\max} \sim 0.7$ ) of photochemistry and modest ( $\sim 2.5$ -fold) decrease of the rate of electron transfer ( $6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ). At the beginning of adaptation to the anaerobic conditions, the peripheral light harvesting antenna (LH2) starts to surround the core complex that improves the yield and rate of photochemical conversion. The initially loose structure of the supercomplex facilitates the access of cyt  $c_2$  to the RC and cyt  $bc_1$  complexes that makes fast cyclic electron transfer available. Upon synthesis and insertion of more and more LH2 complexes, the membrane becomes more densely packed and the diffusion of mobile redox species will be partially hindered. After 3–4 h, the regular anaerobic photosynthetic competence is achieved with optimal organization of the cyclic electron transport chain.

4.) The photosynthetic bacteria were vulnerable to the prompt effect of  $\text{Pb}^{2+}$ , showed weak tolerance to  $\text{Hg}^{2+}$  and proved to be tolerant to  $\text{Cr}^{6+}$ . Due to the biofilm lifestyle *Rubrivivax gelatinosus* shows higher resistance to heavy metals than strains with planktonic lifestyle.

Heavy metal ion pollution is major environmental risks for microorganisms in aqueous habitat. The potential of purple non-sulfur photosynthetic bacteria for biomonitoring and bioremediation was assessed by investigating the photosynthetic capacity in heavy metal contaminated environments. Cultures of bacterial strains *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* and *Rubrivivax gelatinosus* were treated with heavy metal ions in micromolar ( $\text{Hg}^{2+}$ ), submillimolar ( $\text{Cr}^{6+}$ ) and millimolar ( $\text{Pb}^{2+}$ ) concentration ranges. Functional assays (flash-induced absorption changes and bacteriochlorophyll fluorescence induction) and electron micrographs were taken to specify the harmful effects of pollution and to correlate to morphological changes of the membrane. The aggressive nature of Pb(II) is expressed by severe prompt effects on near IR steady state absorption spectra and Bkl fluorescence induction. The lead treatment decreases both the initial ( $F_0$ ) and the maximum ( $F_{\max}$ ) fluorescence levels without modifying the variable fluorescence (the  $F_v/F_{\max}$  value) significantly. Besides Pb(II) decreases the magnitude of light-induced electrochromism, it prohibits the fast component of discharge of the energized membrane. Addition of Cr(III) ion of high (up to 20 mM) concentration to the culture, the kinetics will be not modified to that of the intact cells (control) and supports the harmless nature of the trivalent form of chromium. The treatment with 0.8 mM Cr(VI) modify of electron and

proton transfer between RC and cyt *bc*<sub>1</sub> complexes. While 20  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  bleaches the cells of *Rps. rubrum* within 2–3 h and the rate of growth of *Rba. sphaeroides* culture is halved at 2  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  concentration, in cells of *Rvx. gelatinosus* orders of magnitude larger concentration (200  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ ) does not cause significant damage. *Rvx. gelatinosus* with biofilms were more resistant to  $\text{Hg}^{2+}$  than planktonic cells (without biofilms) because the biofilm increases the mercury binding capacity further by a factor of about five. *Rvx. gelatinosus* is able to evolve biofilm during the growth and is expected to affect mercury availability in several ways, including 1) changes in mercury speciation with steep chemical gradients within the biofilm, 2) the formation of an additional diffusive layer surrounding cells, and 3) adsorption of mercury by the biofilm.

5.) The mercury uptake by photosynthetic bacteria consists of a rapid passive adsorption and a slower active metabolic step. It is most effective at neutral pH and can be activated by light. Two distinct binding sites were identified with 1 ( $\mu\text{M}$ )<sup>-1</sup> (strong) and 1 (mM)<sup>-1</sup> (weak) equilibrium binding constants.

Mercury bioaccumulation is studied in intact cells of *Rvx. gelatinosus* by use of analytical (dithizone) assay and physiological photosynthetic markers (pigments, fluorescence induction and membrane potential) to determine the amount of mercury ions bound to the cell surface and taken up by the cell. The Hg(II) uptake 1.) has two kinetically distinguishable components. The prompt (subminute time scale) uptake is passive, reversible, relatively nonspecific with respect to the metal species and independent of cellular metabolisms. The slow (1-30 minutes) kinetic phase, however, reflects active processes and depends on the cellular metabolism. 2.) It includes co-opted influx through heavy metal transporters since the slow component is inhibited by high  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers. 3.) It describes complex pH-dependence demonstrating the competition of ligand binding of Hg(II) with  $\text{H}^+$  ions (low pH) or hydroxyl ions (high pH). 4.) It is energy dependent as evidenced by light-activation and inhibition by protonophore. Photosynthetic bacteria can accumulate Hg(II) in amounts much (about 10<sup>5</sup>) greater than their own masses by strong and weak binding sites with equilibrium binding constants in the range of 1 ( $\mu\text{M}$ )<sup>-1</sup> and 1 (mM)<sup>-1</sup>, respectively. The strong binding sites are attributed to sulfhydryl groups as the uptake is blocked by use of sulfhydryl modifying agents and their number is much (two orders of magnitude) smaller than the number of weak binding sites.

It is a remarkable experimental conclusion that despite of the large number of binding sites and their large affinity of mercury ions, the binding sites are independent, i.e. their binding status does not influence the binding properties of the neighbors.

6.) The main factors of sudden and collective sinking of *Rubrivivax gelatinosus* cells upon biofilm formation are the significant decrease of the diffusion coefficient and the aggregation of the bacteria.

*Rvx. galatinosus* cells (particularly in the stationary phase of growth) are able to increased polymer production that excrete the extracellular compartment. Full polymer network (biofilm matrix) is formed, that will embed the cells. The integration of the bacteria into the dense matrix will increase the net mass via aggregation and decrease the diffusion coefficient ( $D$ ) of the cells. Both factors lead to significant reduction of the mobility of the bacterium. These are the main factors resulting in a sudden and collective sinking that shows up physiological significance: it is a form of bacterial motility to search for new sources of food. The bacteria perform active random movements (twitching) that prevent the individual planktonic bacteria (in the early exponential phase) from sinking. In stationary phase, however, the cell can be found both in planktonic ( $D = 13.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) and biofilm ( $D < 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) lifestyles. In biofilm, not only the diffusion of the cells is reduced but its aggregation number is increased, as well. It was found, that even a relatively small ( $< 5$ ) aggregation number can decrease the diffusion coefficient below the limit of measurement. The behavior of the cells in natural biofilm can be modeled by planktonic cells in Ficoll 400 polymer solution. In low concentration of bacteria ( $c < 1 \cdot 10^9$  cells/mL), the lateral diffusion coefficient of the cells ( $D = 2.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$  at 5% Ficoll) decreased in a similar manner as in biofilm under natural conditions. It can be concluded that not the slight increase of the viscosity but rather the strong connectivity of the components can be made responsible for the sudden and collective sinking of the bacteria.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Maróti Péternek, hogy önálló tudományos munkára ösztönzött, valamint az iránymutatást és a sok segítséget, amit az évek alatt nyújtott.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Bari Ferencnek az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet vezetőjének és az összes munkatársnak.

Köszönettel tartozom doktorandusztársaimnak, Asztalos Emesének, Sipka Gábornak, Hajdu Katának és Szabó Tibornak a kutatómunka során nyújtott segítségért, továbbá a csoporton belüli kiváló légkörért.

Köszönöm Laskayné Tóth Juditnak, hogy laboránsi munkaköre ellátásával és barátságával gördülékenyebbé tette a munkát számomra, valamint az

A transzmissziós elektronmikroszkópos képek megvalósulásáért pedig az SZTE-ÁOK Pathológia Intézetből Dr. Rázga Zsoltnak és Németh Erikának.

A *Rubrivivax gelatinosus*ról készült mikroszkópos videók és fotókért pedig Ayaydin Ferhannak az SZBK Növénybiológiai Intézetből.

Végül köszönöm édesanyámnak és barátaimnak, hogy támogattak és mellettem álltak, amíg ez a munka készült.

## **Irodalomjegyzék**

An S. et al. (2010) The Impact and Molecular Genetics of Bacterial Biofilms. Environmental Molecular Microbiology. Caister Academic Press, 11–26.

Aagaard J., Sistrom WR. (1972) Control of synthesis of reaction center bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria. Photochem Photobiol 15:209–225.

Ahluwalia SS., Dinesh G. (2007) Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresour. Technol. 98 (12):2243–2257.

Anderson RA. (1997) "Chromium as an Essential Nutrient for Humans". Regulatory Toxicology and Pharmacology. 26 (1 Pt 2):35–41.

Armitage, JP, Kelly, DJ, Sockett, RE . (1995) . Flagellate motility, behavioral responses and active transport in purple non- sulfur bacteria . In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (Ed s.) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria . Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 1005–1028

Asztalos E., Italiano F., Milano F., Maróti P., Trotta M. (2010) Early detection of mercury contamination by fluorescence induction of photosynthetic bacteria. Photochem. Photobiol. Sci. 9:1218–1223.

Asztalos E., Maróti P. (2009) Export or recombination of charges in reaction centers in intact cells of photosynthetic bacteria. Biochim Biophys Acta 1787:1444–1450.

Asztalos E., Sipka G., Kis M., Trotta M., Maróti P. (2012) The reaction center is the sensitive target of the mercury(II) ion in intact cells of photosynthetic bacteria. Photosynth. Res. 112:129–140.

Bae W., Mehra RK., Mulchandani A., Chen W. (2001) Genetic Engineering of Escherichia coli for Enhanced Uptake and Bioaccumulation of Mercury. Applied and Environmental Microbiology. 67(11): 5335–5338.

Bahatyrova S., Frese RN., Siebert CA., Olsen JD., van der Werf KO., van Grondelle R., Niederman RA., Bullough PA., Otto C., Hunter CN. (2004) The native architecture of a photosynthetic membrane. Nature 430:1058–1062.

Bailleul B, Cardol P, Breyton C, Finazzi G (2010) Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis. Photosynth Res 106:179-189.

Barceloux DG (1999) Chromium. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 37:173–194.

Bardy S, Ng S, Jarrell K (2003). "Prokaryotic motility structures". Microbiology. 149 (Pt 2): 295–304.

- Bauer CE, Setterdahl A, Wu J, Robinson BR (2009) Regulation of gene expression in response to oxygen tension. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *Advances in photosynthesis and respiration: the purple phototrophic bacteria*. Springer, Dordrecht 707–725.
- von Burg R, Liu D (1993) Chromium and hexavalent chromium. *J. Appl. Toxicol.* 13:225–230.
- Bakkaloglu I, Butter TJ, Evison LM, Holland FS, Hancock C (1998) Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. *Water Sci. Technol.* 38 (2–3):114–122.
- Bartlett GR (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234:466–468.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917.
- Borsetti F, Martelli PL, Casadio R, Zannoni D (2009) Metals and metalloids in photosynthetic bacteria: interactions, resistance and putative homeostasis revealed by genome analysis, in: *The Purple Phototrophic Bacteria*, Springer, Dordrecht, The Netherlands 655–689.
- Bryant DA, Frigaard NU (2006). "Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated". *Trends Microbiol.* 14 (11): 488–96
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45:198–207.
- Cain BD, Deal CD, Fraley RT, Kaplan S (1981) In vivo intermembrane transfer of phospholipids in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Bacteriol* 145(3):1154–1166
- Cartron ML, Olsen JD, Sener M, Jackson PJ, Brindley AA, Qian P, Dickman MJ, Leggett GJ, Schulten K, Hunter CN (2014) Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbabi
- Cline K (2003) Biogenesis of green plant thylakoid membranes. In: Green BR, Parson WW (eds) *Light-harvesting antennas in photosynthesis (advances in photosynthesis and respiration)*, vol 13. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 353–372
- Comayras F, Jungas C, Lavergne J (2005) Functional consequences of the organization of the photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides*: I. Quinone domains and excitation energy transfer in chromatophores and reaction center antenna complexes. *J Biol Chem* 280:11203–11213
- Compeau, G. C.; Bartha, R. (1985). "Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sediment". *Applied and Environmental Microbiology.* 50 (2): 498–502.

- Clayton RK (1966) Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol* 5:669–688
- Clayton RK, Clayton BJ (1981) B850 pigment–protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(9):5583–5587
- Costerton, J. W., Lappin-Scott, H. M. (1989) Behavior of bacteria in biofilms. *Am. Soc. Microbiol. News* 55, 650–654.
- Cutler RG, Evans JE (1966) Synchronization of bacteria by a stationary-phase method. *J Bacteriol* 91(2):469–476
- Dart, R.C.; Hurlbut, K.M.; Boyer-Hassen, L.V. (2004). "Lead". In Dart, RC. *Medical Toxicology* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-7817-2845-2. p. 1426.
- Deng X, Jia P (2011) Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg<sup>2+</sup> uptake. *Bioresource Technology* 102:3083–3088
- Deng X, Wang P. (2012) Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Bioresour Technol* 121:342-7
- Dusenbery DB. (2009). *Living at Micro Scale*, p. 136. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- De Philippis R, Faraloni C, Sili C, Vincenzini M. (2005) Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago) *Sci. Total Environ.* 353:360–368.
- Fedotova J, Zeilstra-Ryalls J (2014) Analysis of the role of PrrA, PpsR, and FnrL in intracytoplasmic membrane differentiation of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 using transmission electron microscopy. *Photosynth Res* 119:283–290
- Feniouk BA, Junge W (2009) Proton translocation and ATP synthesis by the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>–ATPase of Purple bacteria. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *Advances in photosynthesis and respiration: the purple phototrophic bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 475–493
- Fraley RT, Yen GSL, Lueking DL, Kaplan S (1979) The physical state of the intracytoplasmic membrane of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and its relationship to the cell division cycle. *J Biol Chem* 254(6):1987–1991
- Gabr RM, Hassan SHA, Shoreit AAM (2008) Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 62:195–203.

- Gadd GM (2000) Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:271–279.
- Gao JL, Wraight CA (1990) Sulfhydryl modifying reagents inhibit QA<sup>-</sup> oxidation in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* and *Capsulatus*, but not *Rhodospseudomonas viridis*, *Photosynthesis Research* 26(3):171-179.
- Gao R, Stock AM. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:133–154
- Genetics of Biofilms Laboratory. (n.d.). Retrieved October 14, 2014, from <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Ggb/recherchResults.html>
- Georgalis Y, Philipp M, Aleksandrova R, Krüger J.K (2012) Light scattering studies on Ficoll PM70 solutions reveal two distinct diffusive modes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 386, (1):141-147
- Giotta L, Agostiano A, Italiano F, Milano F, Trotta M (2006) Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*, *Chemosphere* 62: 1490–1499.
- Glick BR. (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374.
- Hassan S, Awad YM, Kabir MH, Joo JH (2010) Bacterial biosorption of heavy metals. In book: *Biotechnology Cracking New Pastures*, Chapter: Four, Publisher: MD Publications PVT LTD New Delhi, 79-110.
- Heliosa BM, Wolosker, De Almeida DF (1975) Two-step Doubling of Synchronous Cultures of *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology* 88: 381-383
- Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR (2001) Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 183:5395–5401
- Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K., Pace NR (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180:366–376
- Hunt S (1986) Diversity of biopolymer structure and its potential for ionbinding applications, pp 15–46. In H. Eccles and S. Hunt (ed.), *Immobilisation of ions by bio-sorption*. Ellis Horwood Ltd., West Sussex, United Kingdom.
- Hughes MN, Poole RK (1989) *Metals and Microorganism*, Chapman and Hall, London, 280–285.
- Italiano F, Buccolieri A, Giotta L, Agostiano A, Valli L, Milano F, Trotta M (2009) Response of the carotenoidless mutant *Rhodobacter sphaeroides* growing cells to cobalt and nickel exposure. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1-10.



- Jamieson SJ, Wang P, Qian P, Kirkland KY, Conroy MJ, Hunter CN, Bullough PA (2002) Projection structure of the photosynthetic reaction centre antenna complex of *Rhodospirillum rubrum* at 8.5 Å resolution. *EMBO Journal*, 21(15):3927-3935.
- Jarrell K. (2009) *Pili and Flagella: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, 173–206.
- Joliot P, Verméglio A, Joliot A (1989) Evidence for supercomplex between reaction centers, cytochrome c2 and cytochrome bc1 complex in *Rhodobacter sphaeroides* whole cells. *Biochim Biophys Acta* 975:336–345
- Jungas C, Ranck J, Rigaud J, Joliot P, Verméglio A. (1999) Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO Journal* 18(3):534-542.
- Kelly CA, Rudd JW, Holoka MH (2003) Effect of pH on mercury uptake by an aquatic bacterium: implications for Hg cycling. *Environ Sci Technol* 37(13):2941-6
- Kiley PJ, Kaplan S (1988) Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Rev* 52(1):50–69
- Kis M, Asztalos E, Sipka G, Maróti P (2014) Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells. *Photosynth Res.* 122:261–273.
- Kis M, Sipka G, Asztalos E, Rázga Z, Maróti P (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 151:110–117.
- De Klerk H, Govindjee, Kamen MD, Lavorel J (1969) Age and Fluorescence Characteristics in some Species of *Athiorhodaceae*. *Proc Nat Acad Sci* 62:972-978.
- Knacker T, Harwood JL, Hunter CN, Russell NJ (1985) Lipid biosynthesis in synchronized cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem J* 229: 701–710
- Koblizek M, Shih JD, Breitbart SI, Ratcliffe EC, Kolber ZS, Hunter CN, Niederman RA (2005) Sequential assembly of photosynthetic units in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by fast repetition rate analysis of variable bacteriochlorophyll a fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1706:220–231
- Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jimenez H, Guazzaroni ME, Ramos JL. (2010) Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:539–559
- Le Faucheur S, Tremblay Y, Fortin C, Campbell PGC (2011) Acidification increases mercury uptake by a freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Chemistry* 8(6): 612-622

- Lavergne J, Vermeglio A, Joliot P (2009) Coupling between RC and cytochrome bc<sub>1</sub> complex. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *Advances in photosynthesis and respiration: the purple phototrophic bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 509–536
- Liehr SK, Chen H-J, Lin S-H (1994) Metals removal by algal biofilms. *Water Sci Technol* 30:59–68
- Lueking DR, Fraley RT, Kaplan S (1978) Intracytoplasmic membrane synthesis in synchronous cell populations of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Biol Chem* 253(451–457):17
- Lueking DR, Campbell TB, Burghardt RC (1981) Light- induced division and genomic synchrony in phototrophically growing cultures of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Bacteriol* 146(2): 790–797
- Lundholm, I, Wahlgren, WY, Piccirilli, F, Di Pietro, P, Duelli, A, Berntsson, O, Lupi, S, Perucchi, A, Katona, G. (2014) Terahertz absorption of illuminated photosynthetic reaction center solution: a signature of photoactivation? *Rsc Advances* 4:25502–25509
- Malik A (2004) Metal bioremediation through growing cells, *Environ. Int.* 30:261–278.
- Marshall KC. (1992) Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Am. Soc. Microbiol. News* 58: 202–207.
- Masuda S, Bauer CE (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antipresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* 110:613–623
- Maróti P, Wraight CA (1988) Flash-induced H<sup>+</sup> binding by bacterial photosynthetic reaction centers: comparison of spectrometric and conductometric methods. *Biochim Biophys Acta* 934:314–328
- Maróti P, Asztalos E (2012) Calculation of connectivity of photosynthetic units in intact cells of *Rhodobacter sphaeroides*. In: Lu C (ed) *Research for food, fuel and future—15th international conference on photosynthesis*, pp 27–31
- Maróti P, Asztalos E, Sipka G (2013) Fluorescence assay for photosynthetic capacity of bacteria. *Biophys J* 104(2):545a
- Márialigeti Károly, Borsodi Andrea, Felföldi Tamás, Jáger Katalin, Makk Judit, Márialigeti Károly, Romsics Csaba, Tóth Erika, Bánfi Renáta, Pohner Zsuzsanna, és Vajna Balázs (2013) *Bevezetés a prokarióták világába, Eötvös Loránd Tudományegyetem*
- McGrath SP, Smith S (1990) Chromium and nickel, in: B.J. Alloway (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, Wiley, New York. 125–150.
- McLean J, Beveridge TJ (2001) Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1076–1084.

- Mehta SK, Gaur JP (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Crit Rev Biotechnol* 25:113-152.
- Menzel, Randolph (1979), "Spectral Sensitivity and Color Vision in Invertebrates", in H. Autrum (editor), *Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates- A: Invertebrate Photoreceptors*, Handbook of Sensory Physiology, VII/6A, New York: Springer-Verlag, 503–580.
- Merz A, So M, Sheetz M (2000). "Pilus retraction powers bacterial twitching motility". *Nature*.407(6800): 98–102.
- Moore MD, Kaplan S (1994) Members of the family Rhodospirillaceae reduce heavy metal oxyanions to maintain redox poise during photosynthetic growth, *ASM News* 60: 17–23.
- Moore MD, Kaplan S (1992) Identification of intrinsic high level resistance to rareearth oxides and oxyanions in members of the class proteobacteria: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol.* 174:1505–1514.
- Mozharov AD, Shchipakin VN, Fishov IL, Evtodienko YV (1985) Changes in the composition of membrane phospholipids during the cell-cycle of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 186:103–106
- Murata N, Fork DC (1975) Temperature dependence of chlorophyll a fluorescence in relation to the physical phase of membrane lipids in algae and higher plants. *Plant Physiol* 56:791–796
- Munoz R, Guiey B (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, *Water Res.* 40 (15):2799–2815.
- Murata N, Fork DC (1975) Temperature dependence of chlorophyll a fluorescence in relation to the physical phase of membrane lipids in algae and higher plants. *Plant Physiol* 56:791–796
- Niederman R (2013) Membrane development in purple photosynthetic bacteria in response to alterations in light intensity and oxygen tension. *Photosynth Res* 116:333–348
- Nies DH (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes, *Plasmid* 27:17–28.
- Nies DH (1994) Microbial heavy-metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730–750.
- Oh JI, Kaplan S (2000) Redox signaling: globalization of gene expression. *EMBO J* 19:4237–4247
- Olsen JD, Sturgis JN, Westerhuis WH, Fowler GJS, Hunter CN, Robert B. (1997) Site-directed modification of the ligands to the bacteriochlorophylls of the light-harvesting LH1 and LH2 complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 36 (41):12625-12632.
- Olsen JD, Tucker JD, Timney JA, Qian P, Vassilev C, Hunter CN (2008) The Organization of LH2 Complexes in Membranes from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem.* 283(45):30772–30779.
- Overmann J and Garcia-Pichel F (2006) The Phototrophic Way of Life *Prokaryotes* 2:32–85.

- Papiz MZ, Cogdell RJ, Isaacs NW (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* 374:517–521
- Jin Hee Park; Nanthi Bolan; Mallavarapu Meghara; Ravi Naidu; Jae Woo Chung (2011). "Bacterial-Assisted Immobilization of Lead in Soils: Implications for Remediation" (PDF). *Pedologist*: 162–174.
- Pearson H, Schonfeld D (2003) "Lead". In Rudolph, C.D. *Rudolph's Pediatrics* (21st ed.). McGraw-Hill Professional. 369.
- Poole RK, Gadd GM (1989) *Metals: Microbe Interactions*, IRL Press, Oxford 137.
- Puranik PR, Paknikar KM (1999) Biosorption of lead, cadmium, and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181: characterization studies, *Biotechnol. Prog.* 15:228–237.
- Qian P, Bullough PA, Hunter CN (2008) Three-dimensional reconstruction of a membrane-bending complex: the RC–LH1–PufX core dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* 283:14002–14011
- Ren D, Navarro B, Xu H, Yue L, Shi Q, Clapham DE (2001) A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science*. 294(5550):2372-5.
- Rivoyre M, Ginet N, Bouyer P, Lavergne J (2010) Excitation transfer connectivity in different purple bacteria: a theoretical and experimental study. *Biochim Biophys Acta* 1797:1780–1794
- Roeselers G, Loosdrecht MC, Muyzer G. (2008) Phototrophic biofilms and their potential applications. *J. Appl. Phycol.* 20:227–235.
- Roszak AW, Howard TD, Southall J, Gardiner AT, Law CJ, Isaacs NW, Cogdell RJ (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. *Science* 302(5652):1969-1972.
- Sener MK, Schulten K (2009) From atomic-level structure to supramolecular organization in the photosynthetic unit of purple bacteria. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *Advances in photosynthesis and respiration: the purple phototrophic bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 275–294
- Sener MK, Olsen JD, Hunter CN, Schulten K (2007) Atomic-level structural and functional model of a bacterial photosynthetic membrane vesicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15723–15728
- Singh A, Kuhad RC, Ward OP (2009) Biological remediation of soil: an overview of global market and available technologies. *Advances in Applied Bioremediation*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schaefer JK, Rocks SS, Zheng W, Gu B, Liang L, Morel FMM (2011) Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 8714-8719.
- Scheuring S (2009) The supramolecular assembly of the photosynthetic apparatus of purple bacteria investigated by high-resolution atomic force microscopy. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty

- JT (eds) *Advances in photosynthesis and respiration: the purple phototrophic bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 941–952
- Schiering N, Kabsch W, Moore MJ, Distefano MD, Walsh CT, Pai EF (1999) Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607, *Nature* 352:168–172.
- Silver S (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions—a review, *Gene* 179:9–19.
- Silver S, Phung LT (1996) Bacterial heavy metal resistance. New surprises, *Ann. Rev. Microbiol.* 50:753–789.
- Siström WR (1962) The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* 28:607–616
- Sloof JE, Viragh A, Vanderveer A (1995) Kinetics of cadmium uptake by green-algae, *Water Air Soil Pollut.* 83 (1–2):105–122.
- Steunou AS, Astier C, Ouchane S (2004) Regulation of photosynthesis genes in *Rubrivivax gelatinosus*: transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control, *J. Bacteriol.* 186:3133–3142.
- Steunou AS, Liotenberg S, Soler MN, Briandet R, Barbe V, Astier C, Ouchane S (2013) EmbRS a new two-component system that inhibits biofilm formation and saves *Rubrivivax gelatinosus* from sinking. *Microbiologyopen.* 2(3):431–46.
- Sutherland IW (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology.* 9 (5):222–227.
- Sturgis JN, Niederman RA (2009) Organization and assembly of light-harvesting complexes in the purple bacterial membrane. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *Advances in photosynthesis and respiration: the purple phototrophic bacteria*. Springer, Dordrecht, pp 253–273
- Szeberényi József, (2014) *Molekuláris sejtbológia Dialóg Campus Kiadó*
- Takemoto J, Lascelles J (1973) Coupling between bacteriochlorophyll and membrane protein synthesis in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:799–803
- Théraulaz F, Thomas OP (1994) Complexometric Determination of Mercury(II) in Waters by Spectrophotometry of its Dithizone Complex, *Mikrochim. Acta* 113: 53–59.
- Tucker JD, Siebert CA, Escalante M, Adams PG, Olsen JD, Otto C, Stokes DJ, Hunter CN (2010) Membrane invagination in *Rhodobacter sphaeroides* is initiated at curved regions of the cytoplasmic membrane, then forms both budded and fully detached spherical vesicles. *Mol Microbiol* 76:833–847
- Ullrich M. (1999) *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press, 159–262.

- Ullrich, Susanne; Tanton, Trevor; Abdrashitova, Svetlana (2001). "Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 31 (3): 241–293
- Valls M, de Lorenzo V (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution, *FEMS Microbiol. Rev.* 26:327–338.
- Varga AR, Staehelin LA. (1983) Spatial differentiation in photosynthetic and non-photosynthetic membranes of *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol.* 154(3):1414-30.
- Venugopal, B. (2013). *Physiologic and Chemical Basis for Metal Toxicity*. Springer. 177–8
- Vermeglio A, Joliot P (2014) Modulation of the redox state of quinines by light in *Rhodobacter sphaeroides* under anaerobic conditions. *Photosynth Res* 120:237–246.
- Walz T, Jamieson SJ, Bowers CM, Bullough PA, Hunter CN (1998) Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC-LH1 at 25 Å. *J Mol Biol* 282(4):833-845.
- Wiener JG., Krabbenhoft DP., Heinz GH., Scheuhammer AM (2003) "Ecotoxicology of mercury," Chapter 16 in Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton, Jr., and J. Cairns, Jr., eds., *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd edition.: Boca Raton, Florida, CRC Press, 409-463.
- Vincent, JB (2015) "Is the Pharmacological Mode of Action of Chromium(III) as a Second Messenger?". *Biological trace element research*. 166 (1): 7–12.
- Watt RK, Ludden PW (1999) Ni<sup>2+</sup> transport and accumulation in *Rhodospirillum rubrum*, *J. Bacteriol.* 181:4554–4560.
- Wise S (2012) "Chromium and genomic stability". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 733 (1–2): 78–82.
- Woronowicz K, Sha D, Frese RN, Niederman RA (2011) The accumulation of the light-harvesting 2 complex during remodeling of the *Rhodobacter sphaeroides* intracytoplasmic membrane results in a slowing of the electron transfer turnover rate of photochemical reaction centers. *Biochemistry* 50(22):4819–4829.
- Woronowicz K, Olubanjo OB, Sung HC, Lamptey JL, Niederman RA (2012) The effects of protein crowding in bacterial photosynthetic membranes on the flow of quinone redox species between the photochemical reaction center and the ubiquinol–cytochrome c<sub>2</sub> oxidoreductase. *Photosynth Res* 111(1–2):125–138.
- Woronowicz K, Harrold JW, Kay JM, Niederman RA (2013) Structural and functional proteomics of intracytoplasmic membrane assembly in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 23:48–62

Wraight CA (2006) Chance and design—proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757:886–912

Wu M, Roberts J, Kim S, Koch D, DeLisa M (2006). "Collective bacterial dynamics revealed using a three-dimensional population-scale defocused particle tracking technique". *Appl Environ Microbiol.* 72 (7): 4987–94.

Wuichet K, Zhulin IB. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci. Signal.*;3:ra50

Zwietering MH, Rombouts FM, van't Riet K (1992) Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J Appl Bacteriol* 72 (139–145):20.