

DOKTORI (PH.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Fotoszintetikus baktériumok szerveződési és működési válaszai a
környezeti kihívásokra

Kis Mariann

Témavezető: Dr. Maróti Péter
egyetemi tanár

Fizika Doktori Iskola
SZTE TTIK és ÁOK Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Szeged

2016

Bevezetés és kutatási háttér

A fotoszintetizáló bíorbaktériumok alapvetően fotoheterotróf életmódot folytatnak, ezen kívül még számos anyagcsereút fenntartására képesek (fotoautotróf, aerob és anaerob légzés). Ezek a baktériumok kiváló modellszervezetek a fotoszintézis tanulmányozására, valamint sejtbiológiai, fiziológiai és bioenergetikai vizsgálatokhoz egyaránt. Zárt tenyésztési körülmények között a tápanyagok fogyása és a melléktermékek felhalmozódása miatt a szaporodás egy idő után leáll. Ennek megfelelően a sejtek életciklusa szakaszokra bontható: késleltetési (lag), exponenciális és állandósult (stationer) fázisokra (Frankhauser 2004). A tenyészet fejlődésének korai exponenciális és késői stationer fázisai során jól leírható funkcionális és strukturális változások történnek a fotoszintetikus apparátusban. A folyamatos (aszinkron) növekedés mellett a sejt kultúra (megfelelő körülmények mellett) képes szinkronnövekedésre is. A szinkrontenyészetnek az az előnye, hogy a sejtek ugyanabban a fázisban vannak, könnyebben tanulmányozhatóak a sejtek magasán szervezett strukturái (fotoszintetikus membrán érésének modellezése), sejtciklus szabályozó mechanizmusok, makromolekulák bioszintézise. A bíorbaktériumoknak három membránrendszerük van, úgy mint külső membrán (OM), citoplazma membrán (CM) és intracitoplazma membrán (ICM). Az ICM tartalmazza a fotoszintetikus apparátust, és mennyisége valamint összetétele erősen függ a környezeti tényezőktől, elsősorban a fényintenzitástól és az oxigén mennyiségétől (Woronowicz és mtsai. 2013, Niederman 2013). Aerob növekedés során (oxigén koncentráció > 3%) a sejtek ICM-ja roncsolódik, a sejtekben lévő pigment-protein komplexek működése leáll, és bomlásnak indulnak. Ez a folyamat azonban reverzibilis, hiszen, ha az oxigén koncentráció 3% alá csökken, akkor újra megindul a citoplazma membrán betűródése, és visszanyeri eredeti funkcióját (Koblizek és mtsai. 2005). A komplexek fiziológiája, kapcsolódásuk módjai és sztöchiometriája a legújabb kutatások fókuszában állnak (Cartron és mtsai. 2014), és a különböző biokémiai, fizikai kémiai és spektroszkópiai módszerrel végzett vizsgálatok több kérdést vetnek fel, mint amennyire választ tudnak adni.

A baktériumok a mozgásukhoz több különböző mechanizmust használhatnak. A folyadékban való úszáshoz flagellumokat, a felületeken csúszó vagy rángatózó mozgást alkalmaznak, a vertikális irányú elmozduláshoz pedig kollektív süllyedéshez vagy gázvezikulák létrehozásához folyamodnak (Bardy és Jarell 2003). A fototróp planktonikus baktériumok nemcsak a tápanyag források megközelítése vagy a mérgezőanyagoktól való eltávolodás érdekében, hanem a változó fényintenzitás miatt is kénytelenek, az aktív mozgásra. A baktériumok kétféle életmódot folytathatnak, az egyik a planktonikus, vagyis

egyedi sejtekként lebegő életmód, a másik pedig a biofilmes állapot (Steonou és mtsai. 2004). Biofilmes életmódnál a sejtek felületekre kitapadnak vagy kollektíven összetapadva lesüllyedhetnek optimális környezeti viszonyokat keresve. A baktériumok közül számos faj alkothat biofilmet. A fototróf baktériumok alkotta biofilmek a nagyobb fényintenzitású helyeket kedvelik. A biofilmet alkotó sejtek morfológiája és anyagcseréje is megváltozik (Steonou és mtsai. 2013). A biofilm képzése jobb tápanyagellátást biztosít a tenyészetnek, és védelmet is nyújt az olyan környezeti hatásokkal szemben, mint az antimikrobiális anyagok, toxinok, hőingadozás vagy nehézfémek. Az a szabályozó mechanizmus, ami a planktonikus életmódból biofilmesre való váltást eredményezi, még nem teljesen ismert. *Rubrivivax*.(*Rvx*) *gelatinosus* esetében vélhetően egy kétkomponensű szabályozómechanizmus áll fenn, ami a környezetből érkező ingerekre reagál (Wuichet és Zhulin 2010). A biofilm alapvetően befolyásolja az egészségügyet és az ipari termelést. Azonban nagyon fontos rámutatni arra, hogy a biofilm szerves részét képezi a környezetnek és szolgálhat nagyon hasznos célokat, mint például az ivóvíz és szennyvíz tisztítása és a veszélyes hulladékok méregtelenítése.

Az élőlényeknek egyes nehézfémekre bizonyos mennyiségben szükségük van, ilyenek például a vas, kobalt és cink. Más nehézfémek, mint a higany, a króm vagy az ólom, melyeknek nincs ismert élettani funkciójuk, felhalmozódásuk súlyos természet és egészségkárosító lehet. Az emberi tevékenységek következtében, a feldúsuló potenciális toxikus elemek és nehézfémek jól meghatározható egészségügyi, biológiai és ökológiai veszélyt jelentenek. Ezért számos tudományterületen előtérbe kerültek a potenciális nehézfémekkel kapcsolatos kutatások. Mivel a fotoszintetikus baktériumok egyszerű modellszervezetek, ezért nehézfémekre való reakcióik megismerése alkalmassá teszi a fotoszintetikus baktériumokat környezetük monitorozására és remediációs felhasználásra (Giotta és mtsai. 2006). Hosszú távú nehézfém kitettség esetén kialakulhat a baktériumokban bizonyos rezisztencia. Különböző nehézfém- felvételi és rezisztencia mechanizmusokat már sikerült azonosítani (Bruins és Kapil 2000). A baktériumok a felületi nehézfém adszorpció mellett (Mehta és Gaur 2005) képesek a fémeket metabolikus úton is felvenni, ami lehetőséget ad az aktív és passzív transzport folyamatok tanulmányozására is. Jelenleg elég kevés információ áll rendelkezésre a higany felvétel mechanizmusainak szabályozásáról fotoszintetikus baktériumoknál. Tengeri baktériumoknál (Deng és Wang, 2012) és genetikailag módosított fotoszintetikus baktériumoknál (Deng és Jia, 2011) már részletesebb vizsgálódások is történtek, de a higanyfelvétel mechanizmusára nem sikerült érdemi megállapítást tenni, elsősorban azért, mert a sejt belsejében lévő higany koncentrációt bonyolult megállapítani. A kísérleteink megalapozzák azt a feltételezést, hogy a higany

transzport aktív (energiaigényes) folyamat lehet, és a Hg-felvétel nem csupán passzív úton történhet, mint ahogy azt korábban gondolták (Schaefer és mtsai. 2011). Lényegi kérdés, hogy a higany felvétele specifikus vagy véletlenszerű folyamat, azaz az esszenciális fémek helyett pumpálja-e be a sejt.

Célkitűzések:

- 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?
- Szinkronizációs jelek az aszinkronokhoz képest további információt adnak a sejtek magasan szervezett struktúráiról. Mely fotoszintetikus folyamatok függenek és melyek nem a sejtciklustól?
- 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 (*Rhodobacter (Rba) sphaeroides*, *Rhodospirillum.(Rsp) rubrum*, *Rvx. gelatinosus*) eltérő az érzékenyséjük 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?

Alkalmazott módszerek

Sejt tenyészetek

A fotoszintetizáló bíborbaktériumok *Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum*, *Rvx. gelatinosus* Siström médiumban növekedtek. A megvilágításhoz (fotoszintetikus növekedéshez) 40 watt

teljesítményű wolfram szál izzókat használtunk, amelyek 13 W/m^2 fényerőséget biztosítottak a tenyészcsővekben.

Aerob-szemiaerob növekedés: A lombikokat levegő és nitrogén meghatározott keverékével buborékoltattuk. Az oxigén és nitrogén arányt rotaméterrel állítottuk be. A lombikokba jutó oxigén mennyiségét 21% (levegő, aerob növekedés) és 0% (anaerob növekedés) között változtattuk.

Szinkrontenyésztés: A sejteket teletöltött üvegekben, anaerob módon neveltük. A szinkron növekedését 3.5-3.5 óra (3-szor ismételve) fény-sötét periódusok váltakoztatásával tudtuk előidézni.

A teljes sejtszámot fénymikroszkóp alatt Bürker kamra segítségével határoztam meg

Steady-state abszorpciós és fluoreszcencia spektrofotometria

A sejtek abszorpciós spektrumait a közeli infravörös tartományban (700-1000 nm) Unicam UV4 (kétsugaras) vagy Helios γ (egysugaras) spektrofotométerrel mértük. A sejtek által keltett fényszórást korrigáltuk. A fluoreszcencia spektrumokat Perkin-Elmer MPF 4 spektrofluoriméterrel vettük fel. A spektrumokat a hullámhossz maximumoknak megfelelően Gauss-komponensekre bontottuk fel.

Fényindukált abszorpcióváltozás

Fényindukált abszorpcióváltozás méréséhez házilag épített spektrofotométert, gerjesztéséhez Xe flash lámpát vagy lézerdiódát (Roithner LaserTechnik LD808-2-TO3, 808 nm, 2 W), detektáláshoz Hamamtsu R928 típusú fotoelektron sokszorozót használtunk (Maróti és Wraight 1988). A megfelelő hullámhosszúságú mérőfényt wolfram szál izzóból monokromátorokkal és szűrőkkel állítottuk elő. Az oxidált bakterioklorofill dimert (P^+) 798 nm-nél, a membrán energetizált állapotára utaló elektrokróm jelet 530 nm-nél (referencia 510 nm) detektáltuk. Méréskor a sejtszuszpenziók optikai denzitását alacsony szinten ($OD(808 \text{ nm}) < 0.1$) tartottuk.

Fluoreszcencia indukció és relaxáció

A fluoreszcencia indukció gerjesztéséhez 808 nm hullámhosszú lézer diódát (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W) használtunk, amely hullámhossz megfelelt a LH2 antenna 800 nm-es abszorpciós sávjának, így optimális volt a gerjesztés. A detektálást a gerjesztés irányára merőlegesen elhelyezett lavina fotodiódával (APD; model 394-70-72-581; Advanced Photonix, Inc., USA) végeztük. A lézerfény szórásától a detektort 850 nm felett áteresztő szűrővel (Schott RG-850) védtük.

A fluoreszcencia relaxáció mérését házilag épített készülékkel végeztük (Kocsis és mtsai., 2010) Két flash sorozatot mértünk: az első tapogató flash-ekből állt, ez adta az F_0 szintet, a második a gerjesztő flash-el kezdődött, majd ezt követték újra a tapogatók. A flash-eket szintén lézerdiodák szolgáltatták. A készüléket számítógépről vezéreltük, az áramellátása és az adatok kinyerése USB kábelon keresztül történt.

Sejtek molekuláris komponenseinek kivonása és meghatározása

A bakterioklorofill és karotenoid tartalmat aceton:metanol (7:2 v/v%), a foszfolipid tartalmat kloroform:metanol (1:2 v/v%), a glükóz mennyiséget pedig sejtszuszpenzió: etanol (1:1 v/v%) extrakcióval nyertem ki. A mennyiségi meghatározásuk spektrofotométerrel, az abszorpciós maximumuknak megfelelően (bakterioklorofill: 770 nm, karotenoidok: 484 nm, glükóz: 488 nm és foszfolipidek: 830 nm) kolorimetriás úton történt.

Higany(II) meghatározása dithizonnal

A vizes oldatokban található Hg^{2+} ionok mennyiségét egy közvetett spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg, ami a dithizon (Diphenylthiocarbazon) erős higanykötő képességén alapszik. A létrejött Hg(II)-dithizonát komplex nagyon stabil. A dithizonnak pH=3.1-nél két abszorpciós maximuma van, 430 és 585 nm-nél. A Hg(II)-dithizonát komplex abszorpciós maximuma pedig 480 nm-nél látható. A szabad Hg^{2+} meghatározásához az $R=(A_{585}-A_{480})/A_{585}$ arányt használtuk megfelelő kalibrálás után (Greenberg és mtsai.1992).

Képalkotó eljárások

Az oxigén és nehézfémek okozta strukturális változások bemutatásához transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeket használtam. A baktériumokat 4%-os glutáraldehiddel szűrőpapírra fixáltuk. A mintákból beágyazódás után 70 nm-es vékonyrétegek készültek (Ultracut S ultra-microtome, Leica, Austria). Festés után (uranil-acetát és ólom-citrát) a metszetekről transzmissziós elektronmikroszkóp (Phillips CM10) segítségével képek készültek (Mega-view G2 digital camera és iTEM imaging analysis software, olympus, Münster, Germany).

A *Rvx. gelatinosus* sejtek aggregációját webkamera segítségével (time lapse módban) rögzítettem.

A *Rvx. gelatinosus* sejtekről 20 fps (frame per secundum) videók és Nomarski képek (60x nagyítás, olaj immerzió) (Olympus Fluoview FV1000 LSM, Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany) készültek.

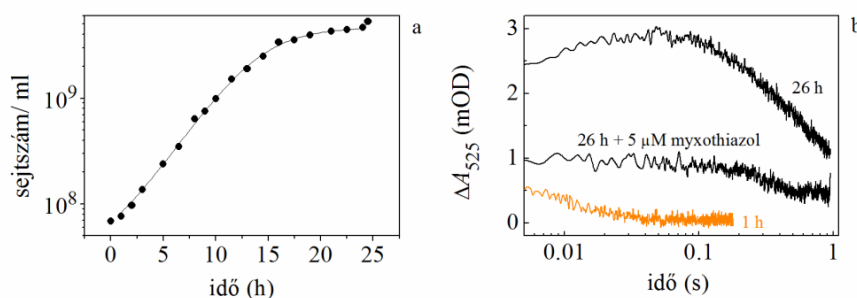
Diffúziós állandók meghatározása

Rvx. gelatinosus sejtek diffúziós állandóit növekedésük közben és Ficoll 400 (1-10 %) polimer hozzáadásával statisztikai módszerekkel határoztam meg. ImageJava szoftver segítségével 25 s alatt 500 pontban jelöltem a kiválasztott baktérium helyét. Esetenként 5-10 sejt elmozdulásának az átlagát vettem. Az elmozdulás négyzetek átlagát az idő függvényében ábrázoltam, és a kapott pontokra nullából induló egyenest illesztettem. A kapott meredekség negyede adta meg a síkbeli diffúzió állandóját.

Eredmények, tézispontok

1.) A növekedés stacioner fázisában a sejtek fotoszintetikus egységei közelebb kerülnek egymáshoz, és az energetikai kapcsolódásuk is szorosabb, mint a fejlődésük korai exponenciális szakaszában. [1],[4]

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. ábra. *Rba. sphaeroides* 2.4.1 növekedési görbe, és membrán energetizáció 1órás (lag fázis) és 26 órás (korai stacioner fázis) egész sejteknél.

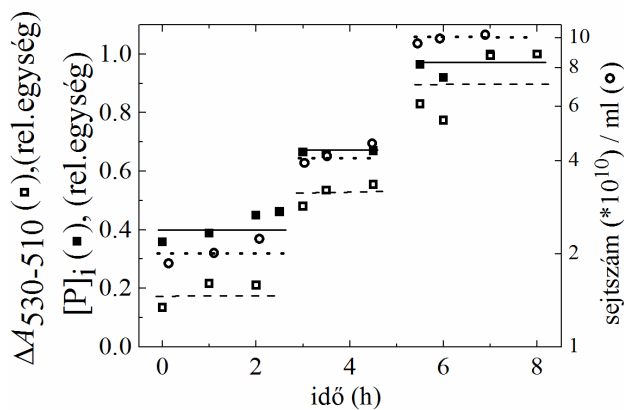
1.) A stacioner fázisú sejteknél a belső

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 μ s-ról 140 μ 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 antennáktól 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 bakterioklorofill 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. [2],[4]

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 (~ 3 óra), addig a teljes foszfolipid mennyiséget és a membrán energetizációját (elektrokromizmus) lépcsőzetes sejtciklus szabályozott növekedés jellemez.



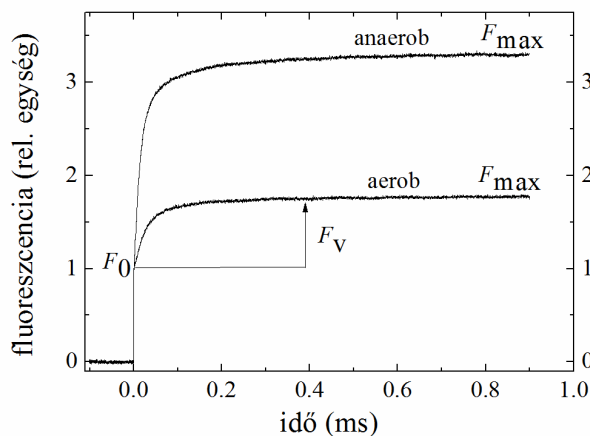
2. ábra. Sejtciklus-függő változások szinkronizált *Rba. sphaeroides* 2.4.1 tenyészetnél. A sejtek duplázódási ideje 3 óra (3 cikluson keresztül), ezt követi a teljes foszfát mennyiség [P]_i és az 530 nm-nél (ref. 510 nm) mért abszorpcióváltozás.

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. [3], [4]

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_{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).



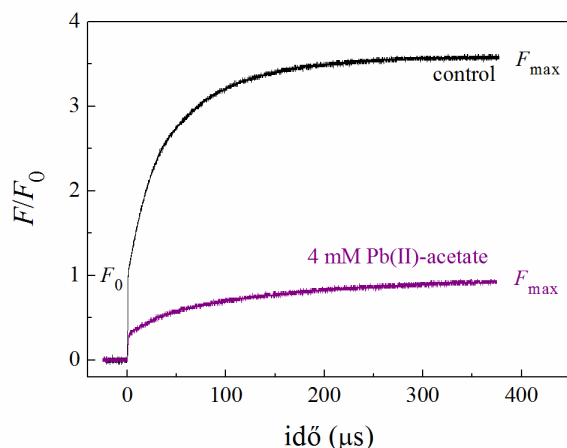
3. ábra. Fluoreszcencia indukció időbeli változása aerob és anaerob módon nevelt *Rba. sphaeroides* sejteknél.

A zöldítés során megfigyelhető gyors bakterioklorofill szintézis (0-4 óra) mellett megfigyelhető a perifériális fénybegyűjtő antennák domináns (LH2/LH1~2.5) szerepe, a fotokémiai folyamatok jelentősen megemelkedett sebessége ($\sim 7 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$)

¹⁾ és teljesítménye ($F_v/F_{max} \sim 0.7$), 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 komplexeként 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. [5]

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.



4. ábra. *Rsp. rubrum* egész sejt fluoreszcencia indukciója ólommal való kezelés prompt hatására.

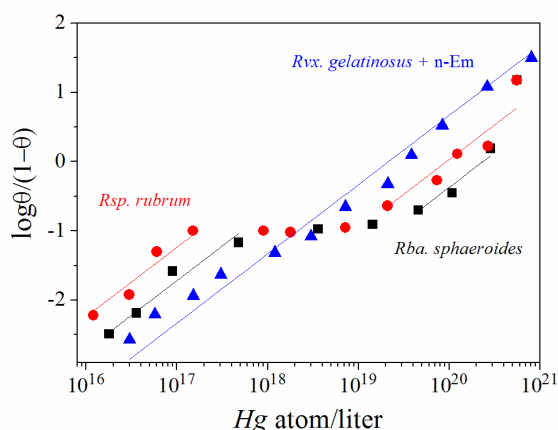
Az ólom hatására azonnali és jelentős a roncsolás az antennakomplexekben, amelyre a bakterioklorofill fluoreszcencia drasztikusan megváltozott indukciójából (4. ábra, ahol csökken

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 μM koncentrációjú Hg^{2+} 2-3 óra alatt leépíti, a *Rba. sphaeroides* növekedési sebességét pedig már 2 μM Hg^{2+} lefelezi, viszont a *Rvx. gelatinosus*-ban 200 μM Hg^{2+} sem okoz nagyobb mértékű károsodást. A *Rvx. gelatinosus* fotoszintetikus baktérium biofilmes életmódban még nagyobb rezisztenciát mutat a higanyal szemben, mint planktonikus életmódban, egyedi sejtekként, 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 adszorpciós és egy lassabb aktív metabolikus lépésből áll, neutrális pH-n a leghatékonyabb és aktiválható fénnel. Két, jól elkülönülő affinitású Hg^{2+} kötőhelyet azonosítottam $1 (\mu\text{M})^{-1}$ (erős kötés) és $1 (\text{mM})^{-1}$ (gyenge kötés) egyensúlyi kötési állandókkal. [6]

A higany bioakkumulációjának fizikai-kémiai tulajdonságait a *Rubrivivax gelatinosus* fotoszintetizáló baktériumban kémiai analitikai módszerrel (dithizon), fényindukált abszorpcióváltással 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 mM) Ca^{2+} koncentrációval és 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.



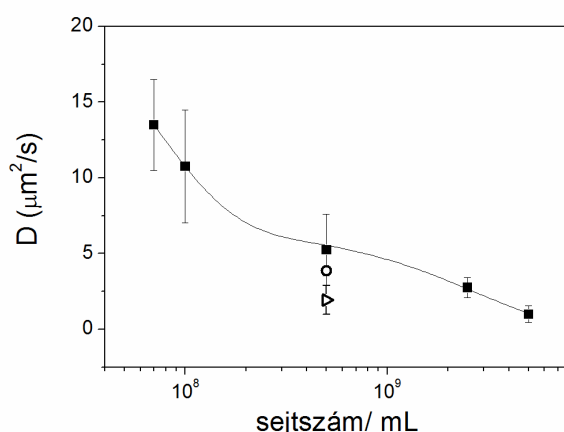
5. ábra. *Rvx. gelatinosus* higanyfelvétele Hill-ábrázolásban.

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 háttérében az általuk létrehozott biofilm mátrix miatti diffúziós állandó csökkenés és magasabb rendű sejt-asszociátumok képződése áll. [7]

A *Rvx. gelatinosus* sejtek (kiváltképp a növekedés stacionárius szakaszában) fokozott polimer termelésre képesek, amelyet a sejten kívüli térészbe 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 üledés 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 sejt koncentrációjú 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 ($D = 1.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$).



6. ábra. *Rvx. gelatinosus* diffúziós állandó (■) csökkenése a tenyésztés növekedése során. Az x-tengelyen a tenyésztőnek megfelelő sejt koncentráció van feltüntetve. A 3-5 sejtből (○) és 10-15 sejtből álló asszociátum (▷) diffúziós állandóit is feltüntettem.

Modell-kísérletként kis koncentrációjú ($c < 10^9$ sejt/mL) baktérium-tenyésztethez 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.

Irodalmi utalások

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

Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45:198–207.

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

Deng X, Jia P (2011) Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg²⁺ 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

Fankhauser, David B. (2004). "Bacterial Growth Curve". University of Cincinnati Clermont College.

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.

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

Mehta SK, Gaur JP (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Crit Rev Biotechnol* 25:113-152.

Niederman R (2013) Membrane development in purple photosynthetic bacteria in response to alterations in light intensity and oxygen tension. *Photosynth Res* 116:333–348

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.

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.

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

Wuichet K, Zhulin IB. (2010) Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci. Signal.*;3:50

A disszertációban felhasznált közlemények:

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

IF: 0.6

[2] **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

IF: 2.139

[3] 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.

[4] **Mariann Kis**, Emese Asztalos, Gábor Sipka, Péter Maróti (2014) Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* revealed by functional assessment at different growth phases and in synchronized and greening cells. *Photosynthesis Research* 122 (3): 261-273

IF: 3.502

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

IF: 2.960

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

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

Egyéb közlemények:

Asztalos Emese, Sipka Gábor, **Kis Mariann**, Trotta M. Maróti P. (2012) The reaction center is the sensitive target of the mercury(II) ion in intact cells of photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* 112(2):129-140

IF: 3.15

Konferencia absztrakt:

Kis Mariann, Asztalos Emese, Maróti Péter: Fotszintetikus baktériumok membránátalakulásainak vizsgálata abszorpció és fluoreszcencia kinetikával. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, 2012. június 10-13., Debrecen

Maróti Péter, Sipka Gábor, Asztalos Emese, **Kis Mariann**: A higanyszennyezés támadáspontjai és mechanizmusai fotoszintetizáló baktériumokban, A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, 2012. június 10-13., Debrecen

Kis Mariann, Asztalos Emese, Sipka Gábor, Rázga Zsolt, Maróti Péter: Környezeti stressz hatásai fotoszintetizáló baktériumokra, Magyar Biofizikai Társaság XXV. Kongresszusa, 2015 aug. 26-28. Budapest

Konferencia előadás:

Péter Maróti, Emese. Asztalos, **Mariann. Kis**, Zoltán. Gingl and Massimo. Trotta: Biomonitoring the environment by photosynthetic bacteria. 14th Congress of the European Society for Photobiology ESP 2011 – Geneva, Switzerland, September 1-6, 2011

Kis Mariann, Asztalos Emese, Maróti Péter: Intracitoplazma membrán kialakulása fotoszintetizáló baktériumokban. Magyar Biofizikai Társaság XXIV. kongresszusa, 2013. aug. 27-30., Veszprém

Mariann Kis, Péter Maróti: Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by greening cells. EBSA Course in Biophysics, Membrane and Lipid-Protein Interactions, Montpellier, France, 8-12 sept, 2014

Könyvfejezet:

Asztalos Emese, **Kis Mariann**, Maróti Péter: Oxigén-függő membránátalakulások *Rhodobacter sphaeroides* fotoszintetizáló baktériumokban. J. Vincze: Biophysics 40., 209-218., 2011