



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ZAPOJENÍ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ DO STRESOVÉ ODPOVĚDI BAKTERIÍ V POZDNÍ STACIONÁRNÍ FÁZI

INVOLVEMENT OF POLYHYDROXYALKANOATES IN STRESS RESPONSE OF BACTERIA
DURING LATE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ZUZANA ŠURÁŇOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0943/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Zuzana Šuráňová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií v pozdní stacionární fázi

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše - stresová odpověď bakterií, polyhydroxyalkanoáty jako stresové metabolity
- Experimentální část - studium zapojení PHA do stresové odpovědi vůči vybraným stresovým faktorům

Termín odevzdání bakalářské práce: **22.5.2015**

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Zuzana Šuráňová
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo studium zapojení polyhydroxyalkanoátů (PHA) do stresové odpovědi bakterií v pozdní stacionární fázi. Pro tento experiment byly vybrány bakterie *Cupriavidus necator* H16 (schopná produkovat PHA) a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 (neschopná produkovat PHA). V teoretické části byla zpracována literární rešerše zabývající se polyhydroxyalkanoáty a stresovou odpovědí bakterií. V praktické části bylo studováno zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií v pozdní stacionární fázi vůči vybraným stresovým faktorům. Byla studována odolnost bakterií vůči různým stresovým podmínkám. V průběhu dlouhodobých kultivací byla posouzena viabilita a distribuce PHA v bakteriálních buňkách pomocí průtokové cytometrie a obsah PHA v biomase byl analyzován pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Na základě výsledků získaných v této práci bylo zjištěno, že bakterie PHA akumulující *Cupriavidus necator* H16 lépe odolává limitaci uhlíkatým zdrojem a také vykazuje vyšší odolnost vůči některým stresovým faktorům ve stacionární fázi než PHA neprodukující bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, jako je aplikace ethanolu a zmražení.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the involvement of polyhydroxyalkanoates into stress response of bacteria in the late stationary phase. Bacteria *Cupriavidus necator* H16 (able to produce PHA) and bacteria *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻⁴ (unable to produce PHA) were used for the experiment. In the theoretical part, the polyhydroxyalkanoates and a stress response of bacteria were reviewed. In the experimental part of the work, the involvement of polyhydroxyalkanoates into stress response of bacteria in the late stationary phase against selected stress factors was studied. A resistance against various stress conditions of bacteria was studied. During long term cultivations a culture viability as well as PHA distribution among bacterial populations were assessed by using flow cytometry and the PHA content in biomass was analyzed by gas chromatography with FID detector.. Based on the results obtained in this work, it was found that the PHA accumulating bacteria *Cupriavidus necator* H16 is capable to survive carbon substrate limitations better than the bacteria *Cupriavidus necator* H16/PHB. Further, *Cupriavidus necator* H16 also revealed higher resistance against various stress factors such as ethanol treatment and freezing.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻⁴, pozdní stacionární fáze, stresová odpověď bakterií, průtoková cytometrie

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻⁴, late stationary phase, stress response of bacteria, flow cytometry

ŠURÁŇOVÁ, Z. *Zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií v pozdní stacionární fázi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT

.....
podpis studenta

..

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych touto cestou poděkovat Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za vedení, zájem, připomínky a čas, který mi věnoval. Mé poděkování patří taky mé rodině, spolupracovníkům a blízkým přátelům za pomoc a podporu během studia, které si nesmírně vážím.

1 OBSAH

1	OBSAH	5
2	ÚVOD	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Bakterie.....	9
3.1.1	Rozmnožování bakterií	9
3.1.1.1	Binární dělení bakterií.....	9
3.1.1.2	Dělení bakterií pučením	10
3.1.2	Růst bakterií	11
3.1.3	Růstová křivka bakterií	11
3.1.3.1	Lag-fáze	11
3.1.3.2	Exponenciální fáze růstu.....	11
3.1.3.3	Stacionární fáze.....	11
3.1.3.4	Fáze odumírání.....	12
3.1.4	Stresová odpověď bakterií.....	12
3.1.5	Stresové faktory.....	13
3.1.5.1	Teplotní stres.....	13
3.1.5.2	Studený šok	13
3.1.5.3	Vodní stres	13
3.1.5.4	Oxidační stres.....	14
3.2	Polyhydroxyalkanoáty (PHA)	14
3.2.1	Historie	15
3.2.2	Vlastnosti a praktické využití polyhydroxyalkanoátů	15
3.2.3	Biologická rozložitelnost.....	16
3.2.4	Obnovitelné zdroje v přírodě a životní cyklus	17
3.3	Zapojení PHA do stresové odpovědi	18
3.4	Průtoková cytometrie.....	18
4	PRAKTICKÁ ČÁST	21

4.1	Použité chemikálie, materiál a přístroje	21
4.1.1	Použité bakteriální kmeny	21
4.1.2	Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů.....	21
4.1.3	Ostatní chemikálie.....	21
4.1.4	Přístroje	21
4.1.5	Příprava inokula	21
4.1.6	Živná média.....	22
4.2	Převedení do minerálního média bez fruktózy	23
4.3	Stanovení PHA pomocí plynového chromatografu s FID.....	23
4.3.1	Stanovení kalibrační křivky	23
4.3.2	Stanovení PHA v biomase.....	23
4.4	Stanovení biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu.....	24
4.4.1	Stanovení kalibrační křivky	24
4.5	Posouzení viability dle roztěru na pevné médium.....	24
4.6	Stanovení fruktózy.....	24
4.6.1	Stanovení kalibrační křivky	24
4.7	Stanovení viability buněk pomocí průtokového cytometru.....	25
4.7.1	Stanovení viability po aplikování různých stresových faktorů	25
4.7.1.1	Stres zahřátím.....	26
4.7.1.2	Stres zmražením.....	26
4.7.1.3	Ethanolový stres.....	26
4.8	Stanovení obsahu PHA pomocí průtokového cytometru	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
5.1	Kalibrace metod.....	27
5.1.1	Kalibrace spektrofotometrického stanovení biomasy	27
5.1.2	Kalibrace stanovení koncentrace PHB pomocí plynového chromatografu.....	28
5.1.3	Kalibrace spektrofotometrického stanovení fruktózy	28

5.2	Dlouhodobý experiment – bez převedení do limitovaného média	29
5.2.1	Barvení kultur <i>Cupriavidus necator</i> H16 a <i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻ 4 pomocí nilské červeně	30
5.2.2	Stanovení viability obou kmenů <i>Cupriavidus necator</i> pomocí průtokového cytometru.....	32
5.2.3	Výsledky stanovení PHA v biomase pomocí GC–FID v poslední den kultivace 34	
5.2.4	Výsledky stanovení biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu	35
5.2.5	Výsledky stanovení fruktózy po ukončení kultivace	35
5.3	Dlouhodobý experiment – převedení kultury do C-limitovaného média	36
5.3.1	Výsledky stanovení PHA v biomase obou kultur	36
5.3.2	Výsledky stanovení biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu	37
5.3.3	Barvení kultur <i>Cupriavidus necator</i> H16 a <i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻ 4 pomocí nilské červeně.....	38
5.3.4	Stanovení viability obou kmenů <i>Cupriavidus necator</i> pomocí průtokového cytometru.....	41
5.3.5	Stanovení viability po aplikování různých stresových faktorů	43
6	ZÁVĚR.....	44
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	46
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	49

2 ÚVOD

Hlavním cílem této práce je zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií v pozdní stacionární fázi. Za tímto účelem bude zpracována literární rešerše zaměřená na stresovou odpověď bakterií a posuzování polyhydroxyalkanoátů jako stresových metabolitů. Dále bude zpracována experimentální část, která se bude zabývat studiem zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií vůči vybraným stresovým faktorům.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupina biologicky rozložitelných polymerů. Některé bakterie si vyrábějí PHA jako formu energie a při hladovění jim slouží jako zdroj uhlíku a energie. Funguje to na stejném principu, jako když si člověk ukládá energii do tuků a tloustne. Velkou výhodou polyhydroxyalkanoátů je jejich přirozená rozložitelnost. Další výhodou je skutečnost, že jsou na rozdíl od syntetických plastů vyráběných z ropy, připravovány z obnovitelných zdrojů. V prostředí kompostu nebo také z větší části v půdě dokážou některé bakterie výrobky z polyhydroxyalkanoátů využít, takže ty se pak obrátí v prach. Za příznivých podmínek je rozklad polyhydroxyalkanoátů otázkou týdnů nebo měsíců, zatímco u syntetických polymerů se hovoří o desetiletích. Nejlépe prostudovaným a v přírodě nejrozšířenějším typem polyhydroxyalkanoátů je PHB [1].

Bakterie na nedostatek živin a jiné stresy odpovídají syntézou sigma-faktorů. Ty regulují transkripci genů, jejichž produkty zmírňují účinky stresu. Aktivuje se mechanismus univerzální odpovědi založený třeba na změně propustnosti buněčné membrány pro antimikrobiální látky [2].

Stres je stav, kdy je organismus vystavován různým podmínkám. Existuje mnoho typů stresu, např. hladovění, vysoká nebo nízká teplota, vysoký osmotický tlak, nízké pH, oxidační stres nebo také aplikace ethanolu. Cílem stresové odpovědi je zabránění poškození nebo smrti organismu. Stres můžeme brát jako odchylku od optimálních hodnot a často se projevuje zastavením růstu. Bakterie dokážou růst v přítomnosti mnoha extrémních faktorů prostředí a můžeme je najít v každém prostředí na Zemi.

Stanování viability bylo prováděno pomocí průtokového cytometru, což je velmi moderní metoda umožňující komplexní studium určitých parametrů v buněčných populacích a poskytuje informace o každé buňce jednotlivě.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné organismy prokaryotického typu. Z evolučního hlediska tvoří jednu ze tří domén života na Zemi. Velikost bakterií se pohybuje v rozmezí 1-10 μm , ale mohou být i větší, např. spirochéty [3].

Buňky některých bakterií se větví. Až na několik málo výjimek (mykoplazmata) jsou buňky bakterií ohraničeny pevnou buněčnou stěnou, která se vyznačuje stálým tvarem a jako hlavní chemickou složku obsahuje peptidoglykany. Co se týče výživy a metabolismu jsou některé bakterie autotrofní (fotolitotrofní nebo chemoorganotrofní), jiné heterotrofní (fotoorganotrofní a chemoorganotrofní). Fotolitotrofní bakterie uskutečňují fotosyntézu za anaerobních podmínek. Pohyblivé druhy bakterií se pohybují pomocí bičků. Některé druhy bakterií se vyznačují klouzavým pohybem [4].

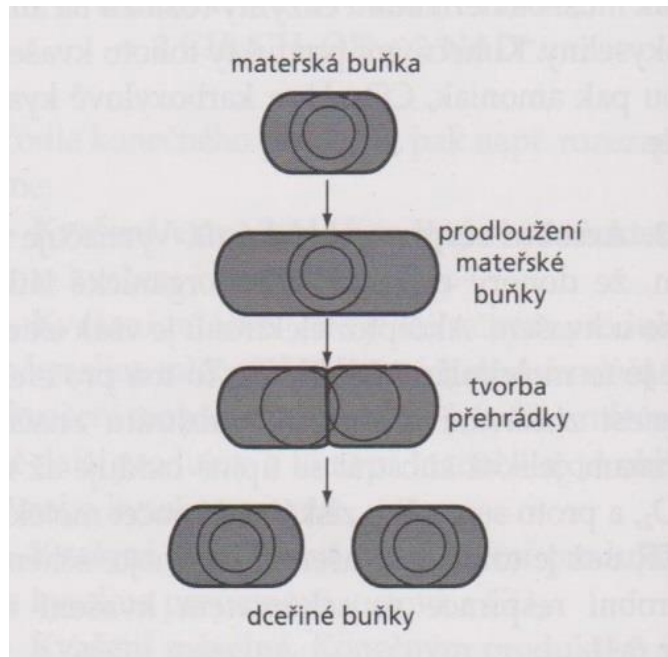
3.1.1 Rozmnožování bakterií

Růstem bakterií rozumíme zvyšování počtu buněk bakterií způsobené jejich množením. Jeho základem je u většiny bakterií binární dělení. Menší počet bakteriálních druhů se množí pučením [3].

3.1.1.1 Binární dělení bakterií

Binárním se označuje toto dělení proto, že z jedné mateřské buňky vznikají dvě dceřiné. Binární dělení bakterií tyčkového tvaru můžeme vidět na obrázku č. 1 a probíhá takto:

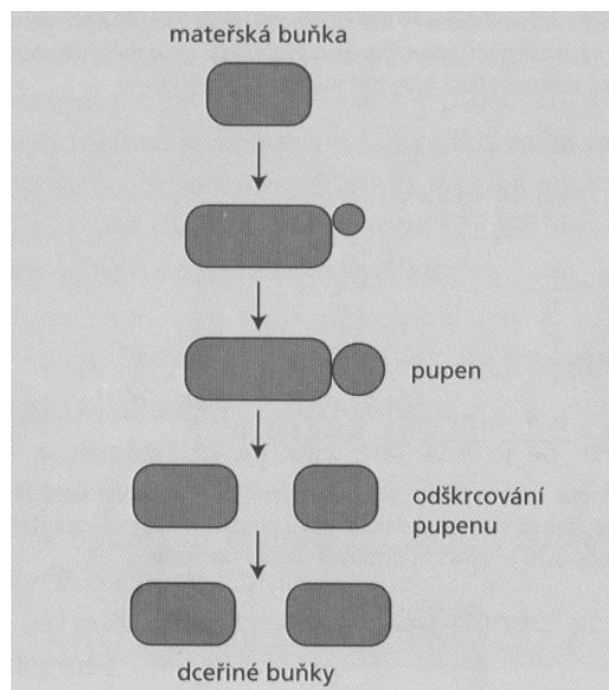
1. Mateřská buňka se prodlouží ve směru své podélné osy až na dvojnásobek své původní délky, její tloušťka přitom zůstává stejná.
2. Ještě před rozdělením buňky se zreplikuje její chromozom (kružnicová DNA), v buněčném cyklu bakteriální buňky lze označit tuto jeho fázi za S-fázi.
3. Uprostřed buňky se začne tvořit příčná přehrádka (septum), tj. plazmatická membrána a buněčná stěna, která rozděluje mateřskou buňku na dvě stejné dceřiné buňky. Do každé dceřiné buňky vchází jedna kopie (replika) mateřského chromozomu.
4. V konečné fázi se dokončí tvorba přehrádky, mateřská buňka se úplně rozdělí a ztrácí tak svou individualitu [3].



Obrázek č. 1: Schéma binárního dělení bakterií tyčkového tvaru [3]

3.1.1.2 Dělení bakterií pučením

Jen málo bakterií se množí tímto způsobem, který je charakteristický tím, že jakmile mateřská buňka doroste do své normální velikosti a dozraje k reprodukci, začne se tvořit na určitém místě jejího povrchu nová buňka. Přitom se buněčná stěna nově vznikající dceřiné buňky syntetizuje na novou a mateřská buňka si ponechává svou buněčnou stěnu. Jakmile do ní mateřská buňka vyše své rozdělené jádro, dceřiná buňka se oddělí a dorůstá do velikosti mateřské buňky [3].



Obrázek č. 2: Schéma množení bakterií pučením [3]

3.1.2 Růst bakterií

Bakteriální buňka roste, pokud ve svém okolí nachází vhodné chemické i fyzikální podmínky. Po dosažení jisté velikosti se příčně rozdělí na dvě buňky. Dobu mezi dvěma za sebou jdoucími děleními buňky nazýváme „generační doba“. Doba potřebná k tomu, aby se v rostoucí populaci počet buněk zdvojnásobil, se nazývá „doba zdvojení“ a označuje se T . [5]

Růst bakteriální buňky může být dvojitý. Buď takový, že všechny extenzivní vlastnosti buňky vzrůstají za daný časový interval stejnou měrou (např. za dobu T se zdvojnásobí), pak mluvíme o tzv. růstu vyváženém (balancovaném) nebo tomu tak není a pak je růst označován za nevyvážený [5].

3.1.3 Růstová křivka bakterií

Přibývání počtu buněk v závislosti na době kultivace při stejné teplotě lze vyjádřit grafickou křivkou. V některých časových úsecích je rychlejší, v jiných je pomalejší. Na křivce vymezují tyto úseky tzv. růstové fáze. Růstová křivka má typický tvar písmene S a rozdělujeme u ní 4 růstové fáze: lag-fázi, exponenciální fázi, stacionární fázi a fázi odumírání [4, 6].

3.1.3.1 Lag-fáze

Fáze, při které se navenek nic neděje a množství organismů zůstává stejné. Bývá často označována jako fáze klidová či přípravná. Buňky se v této fázi ještě nemnoží nebo se množí velmi pomalu a připravují se na dělení. Bakterie se v této fázi hlavně přizpůsobují novým podmínkám, vytvářejí potřebné enzymy a zvětšují svůj objem především syntézou buněčných složek nezbytných k zahájení procesu dělení, tj. nukleových kyselin a bílkovin. Délka této fáze závisí hlavně na podmínkách (čím lepší podmínky, tím kratší) a také na velikosti a stáří inokula [4, 5, 6, 7].

3.1.3.2 Exponenciální fáze růstu

Buňky se v exponenciální fázi vyznačují intenzivním množením a rychlost dělení v této fázi je konstantní. V této fázi jsou organismy v nejlepším fyziologickém stavu a v kultuře je nejvyšší procento živých buněk. Exponenciální fáze se jmenuje proto, že růst a množení bakterií se děje podle exponenciály. Koncentrace buněk (koncentrace biomasy) x je exponenciální funkcí času. Zpravidla to znamená, že kultura je v ustáleném stavu. Úbytek buněk způsobený odumíráním je v poměru k přírůstku nových jedinců minimální. Mezi faktory ovlivňující délku této fáze patří vedle druhových vlastností pěstované kultury především prostředí a teplota kultivace [4, 5, 6, 7].

3.1.3.3 Stacionární fáze

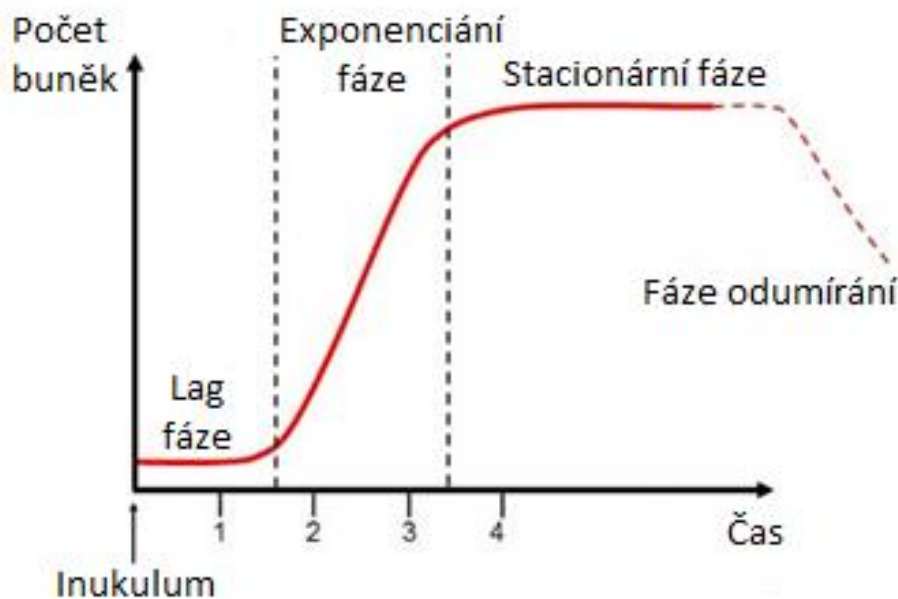
V této fázi již buňky nepřibývají ani neubývají, tj. jejich koncentrace je stabilní. Tato konstantnost může být spíše výrazem dynamické rovnováhy mezi úbytkem a přírůstkem počtu buněk, než aby znamenala skutečnou nepřítomnost obou dějů. Dříve než množení se zastavuje růst. Ve svojí podstatě existují dvě příčiny přechodu kultury do stacionární fáze: vyčerpání jedné z živin a potom také nahromadění toxických zplodin metabolismu. Druhá příčina je

komplexní a nesnadno analyzovatelná. Patří sem zvýšená koncentrace neúplně oxidovaných uhlíkatých sloučenin, jako jsou různé alkoholy a organické kyseliny [4, 5, 6, 7].

Pokles pH souvisí s tvorbou kyselin a může být příčinou zastavení růstu. Avšak první příčina, vyčerpání limitující živiny, je důležitější a obvyklejší. Pokud je přechod z exponenciální fáze do stacionární fáze způsobem vyčerpáním jedné limitující živiny, je to přechod tzv. náhlý a to především díky malé hodnotě saturační konstanty K_s . Naopak je-li přechod plyný, pak to znamená, že příčiny přechodu do stacionární fáze jsou komplexnější než vyčerpání jedné živiny. Pokud je ještě z čeho, tak buňky hromadí zásoby. Organismy aktivují obranné mechanismy [4, 5, 6, 7].

3.1.3.4 Fáze odumírání

V této fázi většina organismů umírá, protože se jim nedostává dostatek živin. Též se jí říká fáze poklesu a odpovídá časovému úseku charakterizovanému narůstajícím úbytkem buněk, který nabývá stále větší převahy nad přírůstkem. Rychlost dělení v této fázi klesá pod nulu a stává se tak negativní. Tento stav je podmíněn nadále se zhoršujícími podmínkami prostředí. Když se sníží koncentrace živin pod kritickou hladinu, tak to má za následek snížení aktivity metabolismu, postupné odbourání rezervních látek a konečně hromadné odumírání buněk [4, 5, 6, 7].



Obrázek č. 3: Růstová křivka bakterií (1-Lag-fáze, 2-Exponenciální fáze, 3-Stacionární fáze, 4-fáze odumírání) [8]

3.1.4 Stresová odpověď bakterií

Bakterie může přežít v různých prostředích. Zejména tam, kde se teplota, dostupnost živin a přítomnost různých chemických látek může lišit. Můžeme u ní pozorovat, jak jednobuněčné organismy reagují na vlivy okolního prostředí. Většina bakterií spojených

s potravinovou infekcí můžou přežít za různých podmínek a to jak uvnitř, tak vně hostitele [9, 10].

3.1.5 Stresové faktory

3.1.5.1 Teplotní stres

Teplotní stres je všudypřítomný jev, který umožňuje buňkám přežít různé vlivy okolního prostředí. Odpověď teplotního stresu byl první globální regulační systém, který byl objeven a je jedním z nejvíce zásadních stresů. Odpověď teplotního stresu obecně zkoumá ve všech živých buňkách ochranný a homeostatický buněčný proces, který zvyšuje termotoleranci. To bylo zkoumáno v mnoha buněčných systémech, třeba u bakterií, kvasinek, hmyzu a savců. Odpověď je charakterizována indukcí celé řady proteinů (proteinů teplotního šoku – HSPs) v důsledku rapidního nárůstu teploty v životním prostředí [10, 11].

3.1.5.2 Studený šok

Náhlý pokles teploty vyvolává u bakterií odpověď na studený šok. Tento fyzický stresový faktor ovlivňuje několik životně důležitých parametrů. Dva hlavní problémy vznikají z vystavení bakteriální buňky náhlému poklesu teploty, na kterou se bakterie musí přizpůsobit [11].

Při odpovědi na studený šok exponenciálně rostou buňky a mohou být rozděleny do tří různých fází. Fáze I. představuje první, přechodovou odezvu na studený šok (tzv. „aklimatizační fáze“ = zpoždění růstu buněk), po které ihned následuje vystavení chladu, což může trvat až několik hodin v závislosti na bakteriálních druzích. Když mezofilní bakterie *E.coli* změní teplotu z 37° C na teplotu nižší než 20° C, růst buněk se pozastaví pro dobu aklimatizace, která může trvat několik hodin. Během fáze I. nastane homeoviskózní adaptace a dramatické přeprogramování genové exprese [11].

Když je bakterie vystavena studenému šoku, přejde z tekutého stavu do tužší formy a je nutné včlenit do membrány mastné kyseliny, které mají schopnost udržet původní tekutost a mají zároveň nižší bod tání. Bakterie musí opravovat fluiditu membrány dle aktuálních podmínek k optimálnímu funkčnímu stavu, který tak udrží potřebnou homeostázu buňky a propustnost membrány. Zde popsání přizpůsobování se nazývá homeoviskózní adaptace [12].

Během fáze II. přichází zotavení, buňky začnou růst významně rychleji. Později jsou buňky považovány za přizpůsobené chladu a vstupují do fáze III., neboli stacionární fáze [11].

3.1.5.3 Vodní stres

Osmoregulace je důležitý mechanismus k přežití všech buněk. Cytoplazma bakteriální buňky obvykle obsahuje 300 až 400 g/l makromolekul (DNA, RNA, proteinů), které zabírají 20 – 30 % buněčného objemu. Primárním způsobem přispívají k osmolalitě cytoplazmy. Zvýšení („hyperosmotic up-shift“) nebo snížení („hypo-osmotic-down-shift“) ve vnější osmolalitě způsobí, že vody proudí přes membránu v důsledku koncentrace nebo zředění cytoplazmy. Změny v obsahu vody mají za následek změny objemu, viskozity, membránového napětí a případně i membránových potenciálů [11].

Když osmolalita klesá, tak voda proudí do buňky a může docházet až k lýzi buněk. K prevenci lýzi a plazmolýzy buňka odpovídá na „up- and downshifts“ tím, že rapidně

hromadí nebo uvolňuje osmolality s nízkou molekulární hmotností. Kanály a transportéry osmoregulatorů vnímají a reagují na osmotický stres pomocí různých mechanismů. Při osmotickém „upshift“ bude voda proudit ven z buňky, vnitřní tlak se sníží a buňky mohou vykonávat plazmolýzu. K prevenci lýzi a plazmolýzy bakterie přizpůsobují své vnitrobuněčné osmolytické koncentrace tím, že přijmou konkrétní zwitteriony organických rozpouštědel, jako je například glycerin, betain nebo ektoin, tedy osmoprotektanty obecně odkazované na kompatibilní rozpouštědla. Tyto sloučeniny mohou být nahromaděné na molárních úrovních a stabilizovány nativními proteinovými strukturami. Cytoplazmatické membrány na bázi proteinů se podílejí na první bakteriální odpovědi při osmotickém „up- and down-shift“. Jejich membránová lokalizace je zaměřena na hledání podnětu, který zjistí. Senzorické domény mohou zůstat spojené s periplazmatickou a cytoplazmickou plochou membrány [11].

3.1.5.4 Oxidační stres

Kyslík je nezbytný pro většinu živých organismů s výjimkou poměrně malé skupiny anaerobních bakterií, které jsou závislé na jeho přítomnosti v prostředí. Je potřeba pro výrobu energie ve formě ATP během procesu oxidativní fosforylace. Tento proces je spojen s redukcí O_2 molekuly vody a to je hlavní proces poskytující energii aerobním organismům [13].

Mikroorganismy byly navrženy jako poměrně jednoduchý a užitečný model pro zkoumání buněčné reakce na oxidační stres. U některých klíčových mikrobiálních druhů, jako je třeba *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae*, byly mechanismy oxidačního stresu široce zkoumány [14].

Během procesu dýchání v buňce se kyslík postupně snižuje o regulovaný přívod čtyř elektronů, čímž se získá voda. Neúplné snížení kyslíku je možné a vede ke vzniku chemických látek, které jsou stále ještě silnými oxidanty. Tyto molekuly jsou známé jako reaktivní kyslíkové druhy (ROS), jako je O_2^- , peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH) a oxid dusnatý [14].

Expozice bakteriální buňky oxidativnímu stresu způsobí aktivaci několika metabolických drah, zapojených do oxidačního stresu odpovědi. Podle podmínek oxidačního stresu jsou některé molekuly konstitutivně přítomny v buňce a pomáhají udržovat intracelulární prostředí nebo odstraňují chemicky reaktivní formy kyslíku. Například redukovaný glutathion, který je přítomný v buňkách, při vysokých koncentracích udržuje silné redukční intracelulární prostředí. Jeho redukované formy jsou generovány glutathion reduktázou pomocí NADPH jako zdroje snížení výkonu, proto buňky v oxidačním stresu potřebují k udržení vysoký poměr $NAD(P)H/NAD(P)^+$ [15].

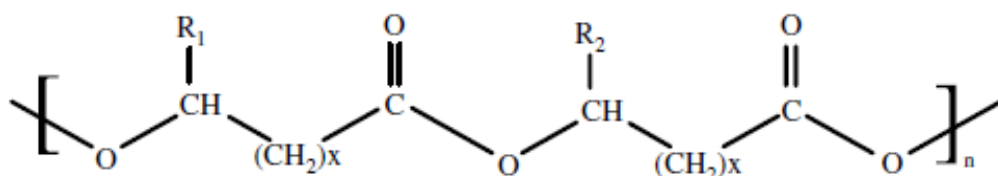
3.2 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)

Polyhydroxyalkanoáty jsou skupina biologicky rozložitelných polymerů mající podobné vlastnosti jako třeba polypropylen nebo polyethylen. Díky svým fyzikálním vlastnostem může PHA nahradit běžné plasty v mnoha aplikacích, jako mohou být třeba plastové nádoby, voděodolný povrch na lepence nebo nosiče pro řízené uvolňování léků a hormonů [16].

Dnes je známo, že PHA je syntetizováno širokou škálou mikroorganismů. Pro mnohé bakterie slouží nahromaděný polymer při hladovění jako zdroj uhlíku a energie. PHA představují ideální skladiště pro energii a uhlík, zejména díky jeho nízké rozpustnosti a

vysoké molekulové hmotnosti, která vyvolává zanedbatelný osmotický tlak uvnitř bakteriální buňky [17].

Polyhydroxyalkanoáty jsou rozděleny do dvou skupin na základě počtu uhlíkových atomů v jejich monomerních jednotkách. Rozlišujeme short-chain-length (SCL) a medium-chain-length (MCL) polyhydroxyalkanoáty. První skupina se skládá z monomerů s 3 až 5 atomy uhlíku a druhá obsahuje monomery s 6 až 14 atomy uhlíku [18].



Obrázek č. 4: Hlavní struktura polyhydroxyalkanoátů [19]

Více než 100 různých monomerních jednotek bylo identifikováno jako složky úložného PHA. To vytváří možnost pro výrobu různých druhů biologicky rozložitelných polymerů s rozsáhlou řadou vlastností. Molekulová hmotnost polyhydroxyalkanoátů je v rozmezí 50000 – 1000000 Da a liší se podle PHA produkčního organismu. Monomerní jednotky jsou všechny v D(-) konfiguraci vzhledem k stereospecifitě biosyntetických enzymů [20].

3.2.1 Historie

Lemoigne roku 1923 v Institutu Pasteura prokázal, že aerobní sporulující bacily tvoří množství 3-hydroxymáselné kyseliny v anaerobních suspenzích. Pokračoval v dalším zkoumání a byl velmi úspěšný v odhadu kvantitativního množství 3-hydroxymáselné kyseliny, kterou tvořil. V roce 1927 byl konečně schopný extrahovat látku z bakterie *Bacillus magaterium* pomocí chloroformu a dokázat, že materiál byl polymer z 3-hydroxymáselné kyseliny. Nicméně produkce poly-(3-hydroxybutyrátu) neboli P(3HB), byla prozkoumána v komerčním měřítku až na začátku šedesátých let v minulém století [21].

Průkopnická práce Babtisty a Werbera ve W.R. Grace & Co (U.S.A.) jim vynesla několik patentů na výrobu a izolaci P(3HB). Tito vědci začali používat polymer pro různé protetické pomůcky. Jejich úsilí muselo být zastaveno, protože výnosy fermentačních procesů byly nízké a polymer byl znečištěn zbytky bakteriálních buněk. Kromě toho proces rozpouštěcí extrakce byl velmi nákladný [21].

3.2.2 Vlastnosti a praktické využití polyhydroxyalkanoátů

PHA jsou netoxické, biokompatibilní, biologicky rozložitelné termoplasty, které mohou být vyrobeny z obnovitelných zdrojů. Mají vysoký stupeň polymerace, jsou vysoce krystalické a nerozpustné ve vodě. Polyhydroxyalkanoáty mají širokou škálu využití vzhledem k jejich novým funkcím. Jejich aplikace se rozšířila jak v množství, tak v druzích během posledních 2 – 3 desetiletích. Zpočátku byly PHA používány jako obaly (např. kosmetické obaly, láhve od šampónů, kartóny na mléko a fólie). Nyní kromě možnosti jejich využití jako plastu jsou také použitelné jako sloučeniny, které mohou sloužit jako chirální

prekurzory pro chemické syntézy opticky aktivních sloučenin. Tyto sloučeniny se používají zejména jako biologicky rozložitelné nosiče pro dávkování léků, hormonů, insekticidů a herbicidů [20, 22].

Polyhydroxyalkanoáty jsou považovány jako zdroj pro syntézu chirálních sloučenin a jsou to suroviny pro výrobu nátěrových hmot. Tyto plasty mohou být snadno depolymerované na bohatý zdroj opticky aktivních, čistých, bifunkčních kyselin. Kromě všeho pomáhají nahradit stávající rozpouštědla, estery a deriváty kyseliny 2-hydroxybenzoové [20, 22].

V závislosti na zastoupení monomerů lze získat řadu PHA s požadovanými vlastnostmi. Polymer může být těžký a krystalický nebo pružný a elastický. P(3HB) je vysoce krystalický s teplotou tání při 180 °C. Materiál je křehký a tuhý. Nicméně zavedení různých HA monomerů, jako jsou 3-hydroxyvalerát (3HV) nebo 3-hydroxyhexanoát (3HHx) do řetězce výrazně zlepšuje vlastnosti materiálu P(3HB) [21].

P(3HB), biokompatibilní polymer, je opticky čistý a má piezoelektrickou vlastnost, která pomáhá při osteoindukci. P(3HB-3HV) má nižší teplotu tání a nižší krystalinitu než P(3HB). Molární procento 3HV v polymeru je důležité pro určení vlastností kopolymeru. P(3HB-co-3HV) obsahující více než 20 % mol 3HV jednotek mohou být použity pro výrobu filmů a vláken s různou elasticitou. Na druhé straně P(4HB) je silný a poddajný termoplastický materiál s pevností v tahu téměř srovnatelnou s pevností polyethylenu. Má prodloužení při 100 % přetržení což má za následek extrémně elastické vlastnosti. Pokud jsou kombinovány s jinými hydroxykyselinami, mohou být materiální vlastnosti P(4HB) velmi pestré. Materiální vlastnosti P(3HB), P(3HB-3HV) a P(4HB) jsou shrnuty v následující tabulce [21].

Tabulka č.1: Fyzikální vlastnosti poly(3HB), poly(3HB-3HV), poly(4HB) [21]

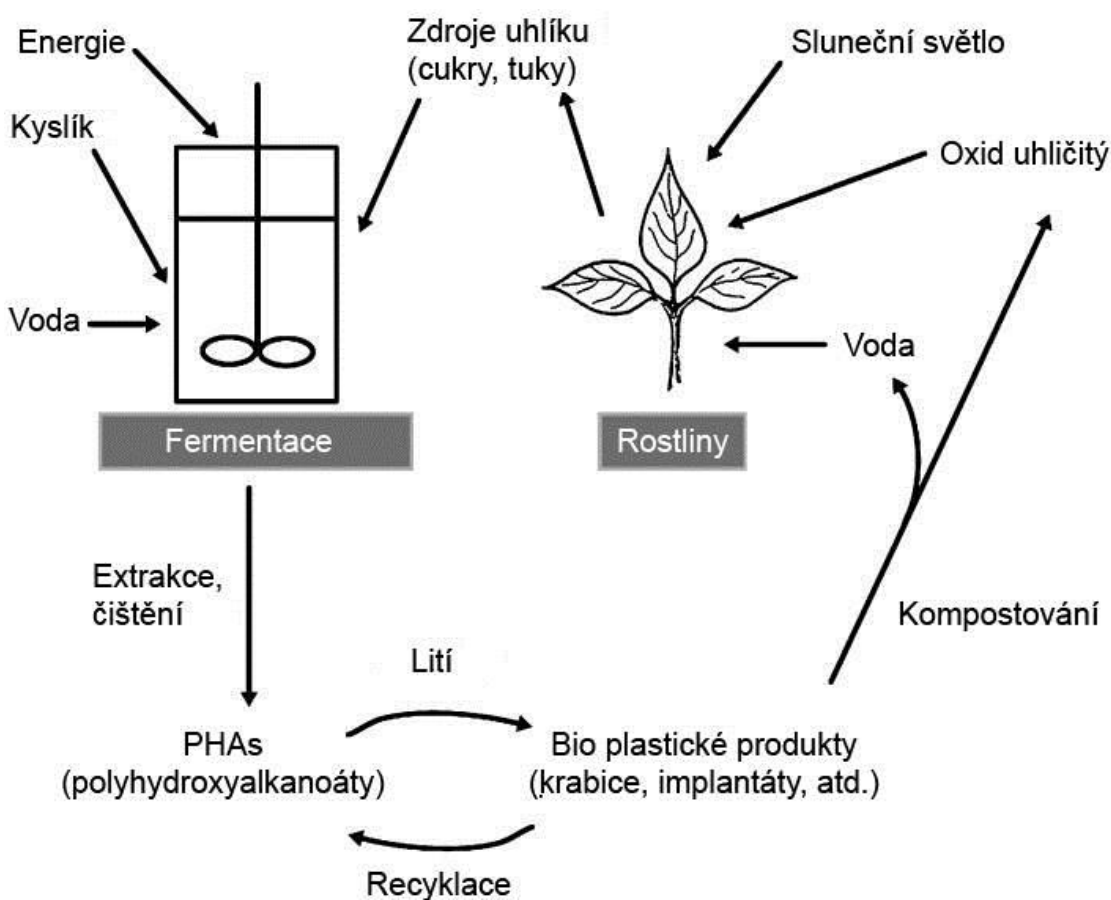
Vlastnosti	poly(3HB)	poly(3HB-3HV)	poly(4HB)
Teplota tání (°C)	177	150	60
Teplota skelného přechodu (°C)	4	-7,25	-50
Pevnost v tahu (MPa)	40	25	104
Prodloužení při přetržení (%)	6	20	1000

3.2.3 Biologická rozložitelnost

Biologická rozložitelnost polymeru se řídí především svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Bylo zjištěno, že s nízkou molekulovou hmotností jsou PHA náchylnější k biologickému rozkladu. Teplota tání je důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu při studiu biodegradace. Jak se bod tání zvyšuje, biologická rozložitelnost se snižuje. S rostoucí teplotou tání enzymatická rozložitelnost klesá. Mochizuki a Hiramí vysvětlili, že biologický rozklad pevných polymerů je ovlivněn chemickou strukturou (zejména funkční skupiny) a vysoce uspořádanými strukturami (hlavně krystalinitou, orientací a morfologickými vlastnostmi). Tokiwa zase se spolupracovníky potvrdil, že krystalinita hraje velmi důležitou roli v biologické rozložitelnosti. Kromě toho mikrobiální populace v daném prostředí a teplota rovněž přispívají k biologické rozložitelnosti v prostředí [21].

3.2.4 Obnovitelné zdroje v přírodě a životní cyklus

Ještě důležitější než biologická rozložitelnost polyhydroxyalkanoátů je skutečnost, že jejich výroba je biologická a na bázi obnovitelných zdrojů. Fermentační výroby polyhydroxyalkanoátů využívají zemědělských zdrojů. Mezi zemědělské zdroje se řadí například cukry a mastné kyseliny nebo třeba uhlík a zdroj energie. Syntéza a biologický rozklad PHA jsou zcela kompatibilní s cyklem znázorněným na obrázku č. 5. Pro některé aplikace je biologická rozložitelnost zcela rozhodující, avšak PHA získaly pozornost zejména díky tomu, že jsou založeny na obnovitelných sloučeninách namísto fosilních paliv [23].



Obrázek č. 5: Životní cyklus PHA [23]

Studie ohledně životního cyklu PHA vykazují obavy, že výroba těchto biopolymerů nemusí být o nic lepší pro životní prostředí než výroba konvenčních polymerů. Podle těchto studií by se v průběhu životního cyklu PHA spotřebovalo více energie od pěstování rostlin po tvarování konečného produktu než v životním cyklu běžných plastů. Nicméně fermentace PHA se rozvíjí, zatímco výroba petrochemických plastů je plně rozvinuta [23].

3.3 Zapojení PHA do stresové odpovědi

Bakterie mají vyvinuté mechanismy, které jim umožňují přežít hladovění a tolerovat vystavení více stresových faktorů převládajících v životním prostředí. Hladovění buňky v laboratorních podmínkách vykazuje obecnou stresovou reakci, která zvyšuje jejich ochranu před volnými kyslíkovými radikály, vysokými nebo nízkými koncentracemi iontů, ultrafialovým zářením (UV) a teplotními nebo studenými šoky. Hromadění polymerů, jako polyhydroxyalkanoátů (PHA), zvyšuje přežití v měnících se podmínkách. Předchozí studie ukazují, že polymer přispívá bakterii ke zvýšené schopnosti přežití a k toleranci vůči stresu. Mikroorganismy obývající antarktické oblasti jsou přirozeně vystaveny stresovým podmínkám v životním prostředí, jako jsou například nízké teploty, široké změny intenzity světla a vysoké UV záření. Během testování produkujících kmenů patřících do rodu *Bacillus* byl v antarktických vzorcích prostřednictvím klasického zahřívání nečekaně izolován kmen *Pseudomonas*, který produkuje vysoké hladiny polyhydroxybutyrátu (PHB) [24].

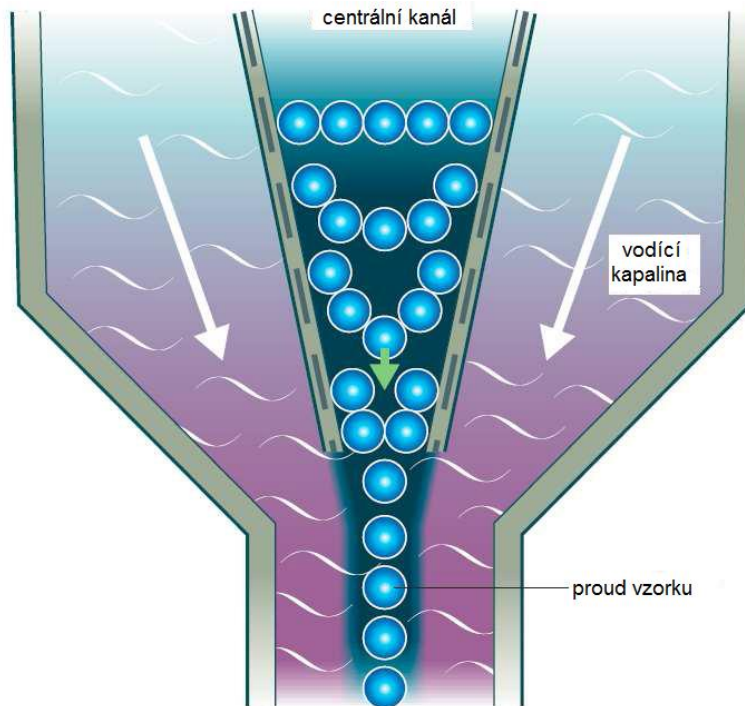
Ayub a kolektiv analyzovali *Pseudomonas sp. 14-3*, který byl schopen akumulovat polyhydroxybutyrát (PHB), tj. nejznámější PHA. *Pseudomonas sp. 14-3* syntetizuje velké množství PHB z oktanoátu a vykazoval vysokou odolnost vůči stresu ve srovnání s ostatními druhy *Pseudomonas* [25].

Zhao a kolektiv porovnávali dva kmeny: *Aeromonas hydrophila 4AK4* a *Aeromonas hydrophila CQ4*. Divoký kmen *Aeromonas hydrophila 4AK4* produkuje kopolymer, který se skládá z 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu (PHBHHx), které vykazují lepší biokompatibilitu a mechanické vlastnosti než PHB a PHBV. *Aeromonas hydrophila CQ4* je mutantní kmen s narušenou PhAc-syntázou. Oba bakteriální kmeny byly inkubovány při teplotě 30°C po dobu dvanácti hodin. V jejich studii bylo zjištěno, že *A. hydrophila 4AK4* byla odolnější vůči teplotnímu šoku, působení mrazu, UV záření, ethanolu a vysokému osmotickému tlaku ve srovnání s *A. hydrophila CQ4* [26].

3.4 Průtoková cytometrie

Je to jedna z moderních metod, která je jedinečná v tom, že poskytuje informace o jednotlivých buňkách, resp. jejich jednotlivých molekulách a nikoliv o buněčné populaci jako celku, jak tomu bývá u většiny jiných metod. Počet analyzovaných jednotlivých buněk se pohybuje v řádu 10^4 a více, což nám umožňuje velmi přesné zhodnocení získaných dat. Metoda se používá pro stanovení viability buněk, stanovení velikosti jednotlivých buněk, studium karyotypu nebo stupně granulace cytoplazmy a má spoustu dalších využití [27].

Vlastní analytické zařízení se skládá ze systému fluidního, optického (detekčního) a elektronického. Fluidní systém má za úkol zajistit, aby do detekční části přístroje přicházely buňky odděleně. Jev, který se k tomuto využívá, se nazývá hydrodynamické fokusování. Buněčná suspenze protéká zužující se kapilárou a na jejím konci jsou poté buňky strhávány vodící kapalinou („sheath fluid“) tak, že vytváří řetěz jednotlivých buněk, který pokračuje dále do detekčního systému přístroje [28].



Obrázek č. 6: Fluidní systém průtokového cytometru [29]

Princip této metody spočívá ve sledování a detekování rozptylu světla a míry fluorescence jednotlivých buněk v dané buněčné populaci, ve které míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru [27].

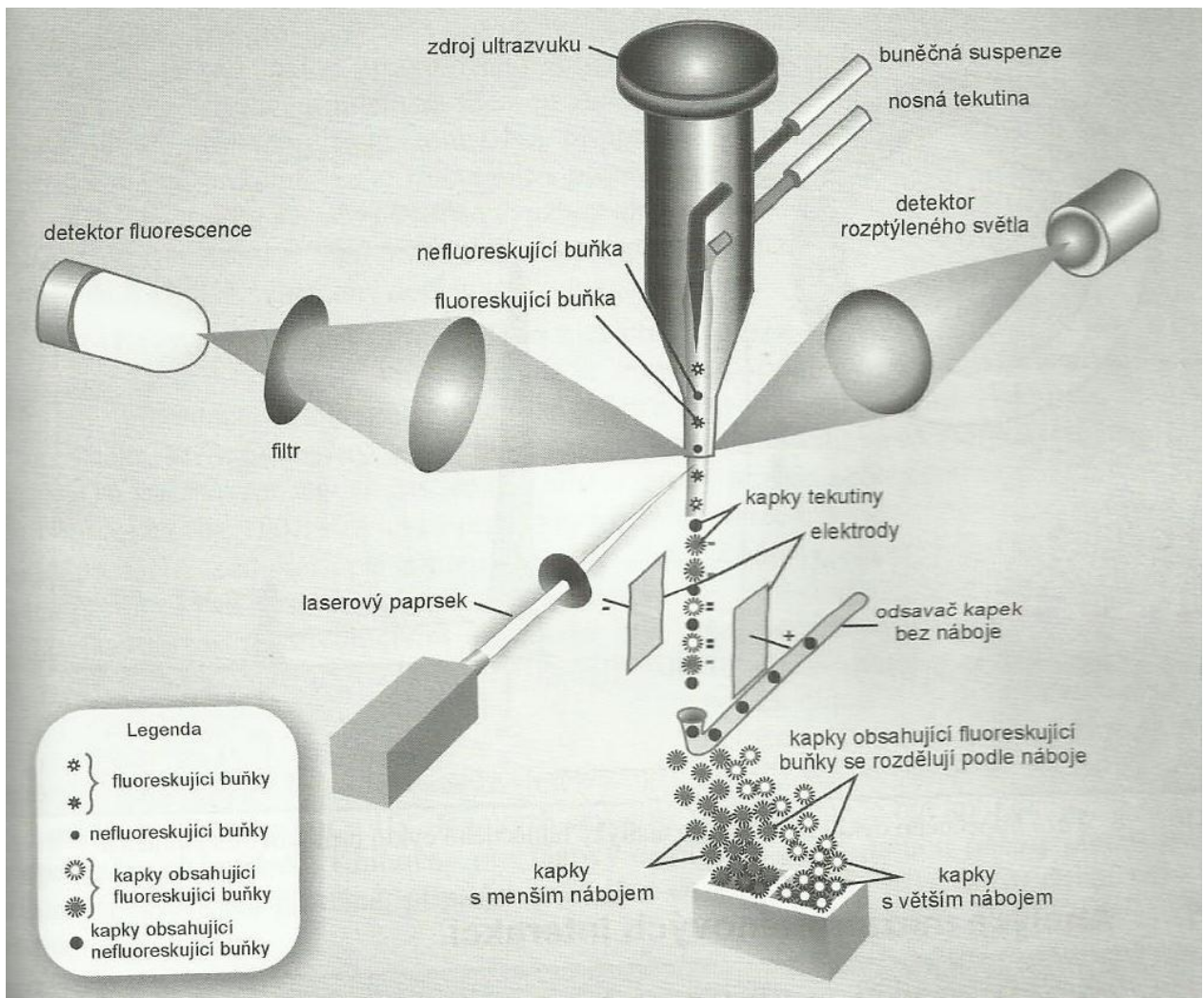
Při kontaktu buňky se světlem dochází k rozptylu světla ve všech směrech. V průtokové cytometrii se využívá měření rozptýleného světla ve dvou směrech, a to v přímém směru a v bočním směru. U měření rozptýleného světla v přímém směru (obvykle do 20° v úhlu od směru dopadajícího paprsku) je velikost signálu je přímo úměrná velikosti buněk. Výstup u měření rozptýleného světla v přímém směru se značí jako tzv. „Forward Scatter Channel“ (FSC) nebo „Small Angle Light Scattering“ (SALS). Druhý parametr, označovaný jako tzv. „Side Scatter Channel“ (SSC) nebo „Large Angle Light Scattering“ (LALS), měří intenzitu světla rozptýleného částicí v bočním směru (nejčastěji v úhlu 90° od směru dopadajícího paprsku). Velikost signálu je přímo úměrná vnitřní složitosti buněk (například dle počtu a velikosti granulí) [28].

Druhou veličinou, která se v průtokové cytometrii využívá, je fluorescence. Získaná data jsou zpracována počítačově. Koncentrovaná suspenze se opatří fluorescenční značkou, která se specificky váže na cílovou molekulu. Fluorescenčních barviv existuje řada, nejčastěji využívaným je propidium jodid (hlavně pro označení DNA). Buněčná suspenze se nejprve ultrazvukem v trysce průtokového cytometru rozdělí na malé kapičky, z nichž každá obsahuje pouze jednu buňku. Poté jednotlivé kapičky prochází přístrojem a každá je ozářena laserovým paprskem. Excitovaná fluorescenční značka emituje záření, které se pro každou jednotlivou buňku zachycuje detekčním zařízením a ukládá se v počítači [27].

Živé buňky po excitaci neposkytují tak velkou fluorescenci jako buňky mrtvé, a proto je možnost je navzájem od sebe odlišit a stanovit jejich počty nebo procentuální poměry. Díky použití fluorescenčních barviv lze stanovit viabilitu, ploiditu, profilaci nebo například apoptózu. Další často používaná fluorescenční barviva jsou 7-amino-aktinomycin, fluorescein

diacetát, Rhodamin 123 a jiné. Kromě již zmíněných fluorescenčních barviv však existuje i řada komerčních kitů pro stanovení viability všech typů buněk [28].

Existují i cytometry se sortovacím zařízením, kde se každé kapičce udělí elektrický náboj a ty se pak při průchodu elektrickým polem dělí podle velikosti náboje a je možné je zachycovat do oddělených zkumavek. Jednou z hlavních výhod průtokové cytometrie je fakt, že buňky nejsou při měření nijak poškozeny ani znehodnoceny a lze je používat pro další měření [27].



Obrázek č. 7: Průtokový cytometr se sortovacím zařízením [27]

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

4.1.1 Použité bakteriální kmeny

K práci byly použity dva kmeny bakterií: *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻4. Kmen *Cupriavidus necator* H16 byl získán z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻4 byl zakoupen z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

4.1.2 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Agar Powder (Himedia)
Nutrient Broth (Himedia)
Peptone (Himedia)
Beef extrakt (Himedia)
NaCl (LACHEMA)

4.1.3 Ostatní chemikálie

Nilská červeň (Sigma Aldrich)
Propidium jodid (eBioscience)

4.1.4 Přístroje

Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems
Plynový chromatograf: GC-FID detektor (Hewlett Packard, Series II 5890)
Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm
Předvážky, Kern EW 620-3NM
Analytické váhy, Boeco (Německo)
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA)
Centrifuga, Sigma (Sartorius)
Centrifuga, Sigma Laborzentrifugen 3-15
Centrifuga, Boeco U-32R (Německo)
Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o (ČR)
Termostat, Biotech Julabo TW2
Termostat blokový, Stuart SBH 200D
Spektrofotometr, Biotech (Implen)
Vortex, TK3S, Tecno Kartell (USA)
Inkubátor, Biotech IP60
Běžné laboratorní sklo a vybavení.

4.1.5 Příprava inokula

Nejprve bylo potřeba oživit kultury, které byly lyofilizované. Kultury byly oživeny a kultivovány na pevném médiu při zhruba 30 °C. Přeočkování bakterií se provádělo pravidelně v intervalu 30 dní.

Inokulum pro kultivaci bylo připravováno ve čtyřech 100 ml Erlenmeyerových baňkách, které obsahovaly 50 ml média. Inokulum bylo vícekrát zaočkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny. Poté bylo inokulum ponecháno 24 hodin na temperované třepačce při 30 °C a následně bylo připraveným médiem zaočkováno produkční médium.

4.1.6 Živná média

Pro kmen *Cupriavidus necator* H16 i *Cupriavidus necator* PHB⁻4 bylo používáno kapalně médium. Pro uchování kultury se zpravidla používalo médium Nutrient Broth:

Složení:

Hovězí extrakt	10g/l
NaCl	5 g/l
Pepton	10g/l
Agar	20g/l

Produkční minerální médium pro kultivaci kmenů *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus* PHB⁻4 mělo následující složení:

Síran amonný	3 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,02 g
Fosforečnan disodný	11,1 g
Síran hořečnatý	0,2 g
Fruktóza	20 g
Roztok stopových prvků *	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

*Složení roztoku stopových prvků

CaCl ₂	7,8 g
FeCl ₃	9,7 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
Destilovaná voda	1000 ml

Všechny sterilace živných médií byly prováděny v tlakových hrncích. Roztok fruktózy se musel sterilizovat samostatně, protože vyžaduje sterilizaci v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem.

V očkovacím boxu bylo do Erlenmeyerových baňek s produkčním minerálním médiem přidáno 10 ml z narostlých kultur (2x z *Cupriavidus necator* PHB⁻4 a 2x z *Cupriavidus necator* H16), dále bylo přidáno 100 µl stopových prvků a fruktóza, aby její koncentrace činila 20 g/l.

4.2 Převedení do minerálního média bez fruktózy

Nejprve byla ověřena schopnost/neschopnost produkce PHA u kultury *Cupriavidus necator* PHB⁻4 a kultury *Cupriavidus necator* H16 na průtokovém cytometru pomocí barviva nilské červeně. Stanovení proběhlo stejně jako v kapitole 4.8.

Následně bylo připraveno 1000 ml produkčního minerálního média. Složení média bylo stejné jako v kapitole 4.1.6. Jediný rozdíl v přípravě byl takový, že se nepřidávala fruktóza. Fruktóza nebyla přidána proto, že bylo požadováno, aby kultury měly stejné podmínky. Médium bylo zhruba hodinu sterilizováno.

Erlenmeyerovy baňky s *Cupriavidus necator* H16 obsahující i fruktózu byly celé slity do dvou speciálních nádob pro centrifugaci. To samé bylo provedeno s kulturou *Cupriavidus necator* PHB⁻4. Kultury byly zcentrifugovány (5000 rpm, 10 minut, laboratorní teplota) a po centrifugaci byl v očkovacím boxu slit supernatant ze všech stočených kultur. Malé množství minerálního média bylo přelito do speciální nádoby s usazeným sedimentem, takováto směs byla resuspendována a následně přelita do nově připraveného minerálního média. Tento postup byl opakován se všemi kulturami.

4.3 Stanovení PHA pomocí plynového chromatografu s FID

Jedná se o převedení PHA na lépe těkavé methylestery za pomoci kyseliny katalyzované esterifikace.

4.3.1 Stanovení kalibrační křivky

Do předem připravených vialek byl přidán roztok komerčně dostupného PHA o přesné koncentraci 10 mg/ml v množstvích 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml. Postupně byl přidán chloroform na výsledný objem 1 ml a následně bylo napipetováno po 0,8 ml 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly řádně zazátkovány a poté byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány při 95 °C 2 hodiny. Na skončení inkubace byly vialky schlazeny na co nejmenší teplotu a ochlazený produkt byl extrahován 0,5 ml 0,5 M NaOH. Směs byla protřepána a po oddělení fáze byla spodní chloroformová část odpipetována a přenesena do nových vialek, které byly uzavřeny a následně měřeny.

4.3.2 Stanovení PHA v biomase

V boxu bylo odebráno 10 ml z obou již zmíněných kultur do speciálních centrifugačních zkumavek a tyto zkumavky byly zcentrifugovány (8000 rpm, 5 minut, 20 °C). Po centrifugaci byl slit supernatant a zkumavka byla přes noc ponechána v sušárně při 75 °C.

Do připravených vialek bylo přidáno přibližně 10 mg biomasy, 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu. Důvod přidávání 15 % kyseliny sírové v methanolu je takový, že se polymery naštěpí a vzniklé 3-hydroxykyseliny se převedou na methylestery. Vialky byly řádně zazátkovány a poté byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány při 95 °C 3 hodiny.

Po uplynutí třech hodin bylo do větších vialek pipetováno 0,5 ml 0,5M NaOH a do těchto vialek byl vylit obsah vzorků z termostatu (obsah musel nejprve schládnout). Směs byla protřepána a po oddělení fáze bylo 50 µl spodní chloroformové části a 950 µl chloroformu

pipetováno do nových vialek. Vialky byly uzavřeny a připraveny k měření na plynovém chromatografu s FID detektorem.

4.4 Stanovení biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu

Měření bylo prováděno na spektrofotometru při vlnové délce 630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda a vzorky byly 20x zředěny (tj. 150 μ l vzorku a 2,85 ml destilované vody).

Měření bylo prováděno na principu turbidimetrie. Čím více buněk je přítomných ve vzorku, tím více se rozptyluje světlo a tím pádem vykazuje vzorek vyšší zdánlivou absorbanci.

4.4.1 Stanovení kalibrační křivky

Pro sestavení kalibrační přímky byla ředěna suspenze buněk destilovanou vodou. Aby bylo možné stanovit sušinu, tak bylo odebráno 10 ml roztoku buněčné suspenze a tento roztok byl centrifugován (8000 rpm, 5 minut, 20°C). Supernatant byl slit a biomasa byla následně resuspendována v 1 ml destilované vody. Následně byla tato suspenze kvantitativně převedena do předem zvážených a vysušených hliníkových misek a ty se následně sušily při 105°C do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly misky ochlazeny v exsikátoru a poté byly opět zváženy. Rozdíl navážených hmotností váženek (váženky po vysušení a váženky před vysušením) udával přesnou hmotnost biomasy v 10 ml. Kultura s již známou koncentrací biomasy byla ředěna a následně byla sestavena kalibrační přímka $A_{630\text{ nm}} = f(C_{\text{biomasa}})$.

4.5 Posouzení viability dle roztěru na pevné médium

Bylo připraveno živné médium Nutrient Broth, jehož složení je popsáno v kapitole 4.1.6 a toto médium se nechalo zhruba hodinu sterilizovat. Po sterilizaci bylo médium rozlito na 6 misek. Po zatuhnutí agaru byly misky očkovány křížovým roztěrem z obou kmenů (3x kmenem PHB⁻4 a 3x H16).

4.6 Stanovení fruktózy

4.6.1 Stanovení kalibrační křivky

Do předem připravených zkumavek byl pipetován roztok fruktózy (kdy navážka fruktózy činila 0,5 g) v množství 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ml a všechny zkumavky byly doplněny destilovanou vodou do 5 ml. Do nových zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml takto připravených vzorků a k nim bylo přidáno 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylové kyseliny. Poté byly vzorky zahřívány na vodní lázni při 70°C po dobu 10 minut a následně byly ponechány ve tmě zchladnout. Následně byly všechny zkumavky doplněny destilovanou vodou na objem 5 ml a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly analyzovány pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm. Slepý vzorek (blank) byl připravován spolu s ostatními vzorky a obsahoval 0,5 ml činidla (tj. neobsahoval roztok fruktózy). Po vyjmutí z vodní lázně (70°C po dobu 10 minut) a následném vychladnutí byl slepý vzorek doplněn 4,5 ml vody na objem 5 ml. Pomocí rovnice kalibrační křivky sestavené pro dané koncentrace glukózy bylo vypočítáno množství celkových sacharidů ve vzorku.

4.7 Stanovení viability buněk pomocí průtokového cytometru

Sledování životaschopnosti neboli viability buněk je možné díky nejrůznějším metodám. Jednou z nich je například stanovení životaschopnosti na pevných médiích, ale tato metoda se považuje za náročnou, zejména časově. Stanovení viability buněk je založeno na detekci životně důležitých funkcí a ty můžou být sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Škála komerčně dostupných fluorescenčních sond je již na dnešním trhu vysoká. Mezi ostatní vybavení pro sledování buněk patří například fluorescenční mikroskop a hlavně průtoková cytometrie.

Stanovení životaschopnosti buněk díky detekci membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami. Na druhou stranu, je-li membrána ve velké míře rozrušena a látky můžou do buňky projít, dojde k vazbě na složky buněčné hmoty a k zesílení nebo posunu spektra fluorescence. Živé buňky toto barvivo vylučují. Pro toto stanovení se používá propidium jodid, který je využíván v řadě studií. Jedná se o fenantrolinové interkalační činidlo, které se váže na nukleové kyseliny a po navázání dochází k posunu a zvýšení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra [30].

Protože hlavním úkolem mé práce bylo sledování viability v rámci týdnů až měsíců, tak byl pro toho stanovení používán průtokový cytometr, který je jednak přesný a nijak nepoškozuje použité buňky. Pro stanovení viability bylo používáno již zmíněné fluorescenční barvivo, propidium jodid.

Preparát byl připravován následovně. V očkovacím boxu bylo odebráno po 1 ml kultur obou kmenů a ty byly následně 10x zředěny. Tj. do mikrozkušavek bylo napipetováno 0,1 ml kultury a ta byla zředěna s 0,9 ml pufru PBS*. Všechny mikrozkušavky byly centrifugovány (10 000 rpm, 5 minut, laboratorní teplota), poté byl slit supernatant a precipitát byl resuspendován v pufru. Mikrozkušavky byly opět centrifugovány při stejných podmínkách. Následně se supernatant ze zkušavek opět slil, buňky byly resuspendovány v pufru. Bylo přidáno 5 μ l propidium jodidu, cca 5 minut byly zkušavky ponechány ve tmě a následně byla stanovena viabilita pomocí průtokového cytometru.

*Složení pufru PBS:

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g/l
Destilovaná voda	1000 ml

4.7.1 Stanovení viability po aplikování různých stresových faktorů

Hlavním úkolem tohoto experimentu bylo zjistit, jak reagují na různé stresové faktory dva kmeny, z nichž jeden je schopen produkovat PHA a druhý toho není schopen. Záměrem experimentu bylo, jak na aplikaci různých stresů působí kmeny v pozdní stacionární fázi, proto tato studie byla prováděna až v pozdní stacionární fázi bakterií. Byly využity tři stresové faktory – ethanolový stres, stres zmražením a stres zahřátím.

4.7.1.1 *Stres zahřátím*

Od každého kmene byl odebrán 1 ml kultury do mikrozkušavek. Tyto kultury byly centrifugovány (10 000 rpm, 5 minut, laboratorní teplota), supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml pufru PBS. Poté byly obě mikrozkušavky ponechány v termostatu při 60 °C asi 10 minut. Před měřením na průtokovém cytometru byla kultura zředěna 10x (tj. 0,1 ml vařené kultury + 0,9 ml pufru PBS) a k takto zředěné kultuře bylo přidáno 5 µl fluorescenčního barviva propidium jodidu. Po změření na průtokovém cytometru se z histogramu posuzovalo procento živých a mrtvých buněk.

4.7.1.2 *Stres zmražením*

Od každého kmene byl odebrán 1 ml kultury do mikrozkušavek. Tyto kultury byly centrifugovány (10 000 rpm, 5 minut, laboratorní teplota), supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml pufru PBS. Obě mikrozkušavky byly umístěny po dobu 30 minut v mrazáku a po uplynutí této doby byly rozmrazeny při laboratorní teplotě. Před měřením na průtokovém cytometru byla kultura zředěna 10x (tj. 0,1 ml vařené kultury + 0,9 ml pufru PBS) a k takto zředěné kultuře bylo přidáno 5 µl fluorescenčního barviva propidium jodidu. Po změření na průtokovém cytometru se z histogramu posuzovalo procento živých a mrtvých buněk.

4.7.1.3 *Ethanolový stres*

Od každého kmene byl odebrán 1 ml kultury do mikrozkušavek. Tyto kultury byly centrifugovány (10 000 rpm, 5 minut, laboratorní teplota), supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml pufru PBS. Od každé kultury bylo 900 µl napipetováno do mikrozkušavek a bylo přidáno 100 µl ethanolu. Tyto zkušavky byly ponechány 30 minut při pokojové teplotě, následně byly stočeny a resuspendovány v pufru PBS. Před měřením na průtokovém cytometru byla kultura zředěna 10x (tj. 0,1 ml vařené kultury + 0,9 ml pufru PBS) a k takto zředěné kultuře bylo přidáno 5 µl fluorescenčního barviva propidium jodidu. Po změření na průtokovém cytometru se z histogramu posuzovalo procento živých a mrtvých buněk.

4.8 Stanovení obsahu PHA pomocí průtokového cytometru

Stanovení obsahu PHA se provádí stejným způsobem jako stanovení viability buněk, s tím rozdílem, že se buňky musí nejprve resuspendovat ve 20 % ethanolu, poté je třeba je ponechat 10 minut v ledničce a centrifigovat. Následně se opět musí slit supernatant, buňky se musí resuspendovat v pufru, musí se přidat 5 µl fluorescenčního barviva nilské červeně a obsah PHA v buňkách je následně možné pozorovat pomocí průtokového cytometru.

Nilská červeň byla ve studii použita proto, že se používá hlavně k detekci polyhydroxyalkanoátů. Výsledná fluorescence je zapříčiněna hlavně interakcí mezi hydrofobními oblastmi molekul s barvivem. Nilská červeň (neboli 9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazin-5-on) se v molekulární biologii používá ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení polyhydroxyalkanoátů a i dalších esterů u mnoha bakterií, ale i kvasinek a plísni. [31].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

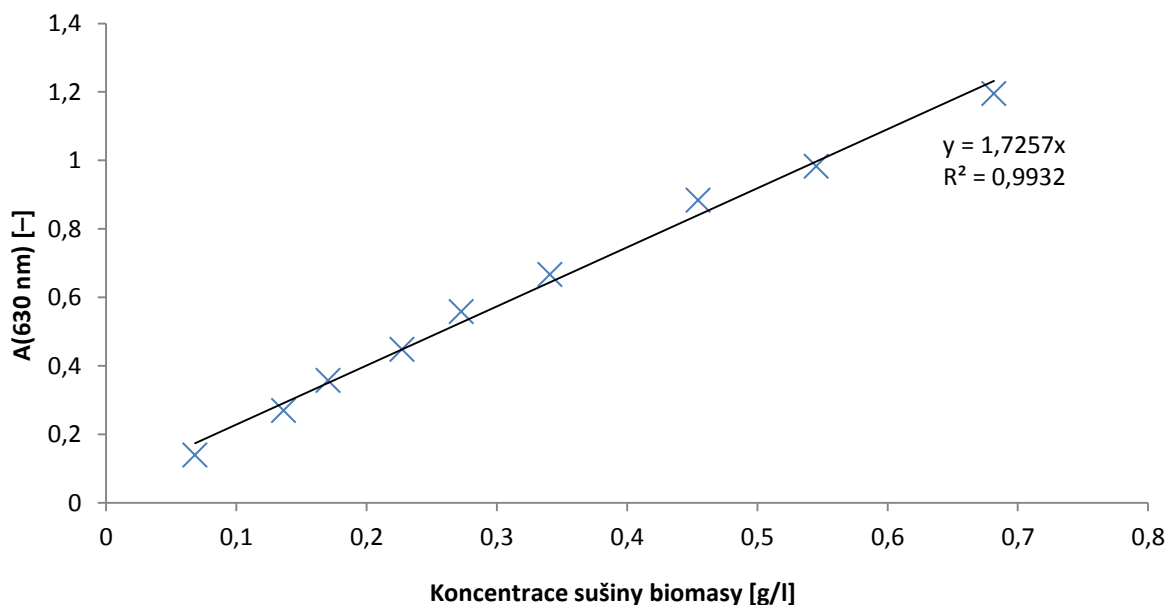
5.1 Kalibrace metod

5.1.1 Kalibrace spektrofotometrického stanovení biomasy

Kalibrační přímka biomasy byla sestrojena pomocí spektrofotometrického stanovení biomasy. Byla stanovena kalibrační závislost množství suché hmotnosti biomasy (ředění buněčné suspenze o známé koncentraci biomasy) a zákalu suspenze buněk z hodnot měření ze spektrofotometru při vlnové délce 630 nm.

Tabulka č. 2: Závislost zákalu stanoveného při $\lambda=630$ nm na množství biomasy

Koncentrace sušiny biomasy [g/l]	Absorbance při vlnové délce 630 nm
0,6817	1,195±0,013
0,5453	0,983±0,045
0,4544	0,884±0,017
0,3408	0,667±0,015
0,2727	0,558±0,005
0,2272	0,448±0,027
0,1704	0,357±0,027
0,1363	0,269±0,016
0,0682	0,139±0,002



Graf č. 1: Kalibrační závislost zákalu stanoveného při vlnové délce 630 nm na suché hmotnosti biomasy

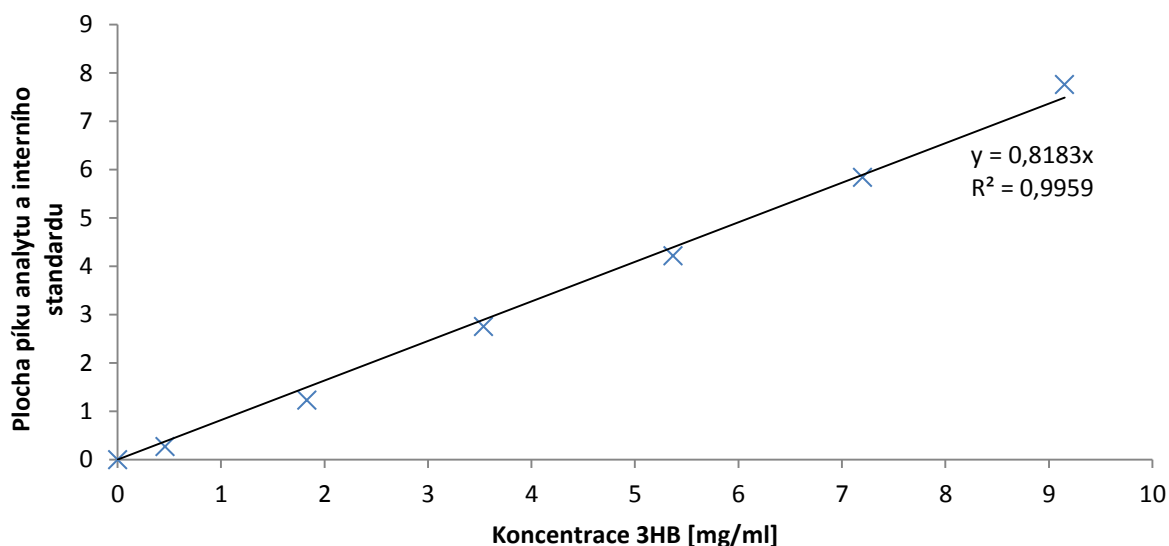
Z naměřených dat byla stanovena kalibrační závislost $y = 1,7257x$ a tato závislost byla použita pro stanovení koncentrace biomasy. Hodnota regresního koeficientu je $R^2 = 0,9932$.

5.1.2 Kalibrace stanovení koncentrace PHB pomocí plynového chromatografu

Kalibrační přímka byla sestrojena pro stanovení PHB a je to závislost plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB.

Tabulka č. 3: Závislost koncentrace 3HB na ploše píku analytu a interního standardu

Koncentrace 3HB [mg/ml]	Plocha píku analytu a interního standardu
0,458	0,034
1,830	0,170
3,538	0,393
5,368	0,653
7,198	0,896
9,152	0,202



Graf č. 2: Kalibrační závislost plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB

Z naměřených dat byla stanovena kalibrační závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu $y = 0,8183x$. Hodnota regresního koeficientu je $R^2 = 0,9959$.

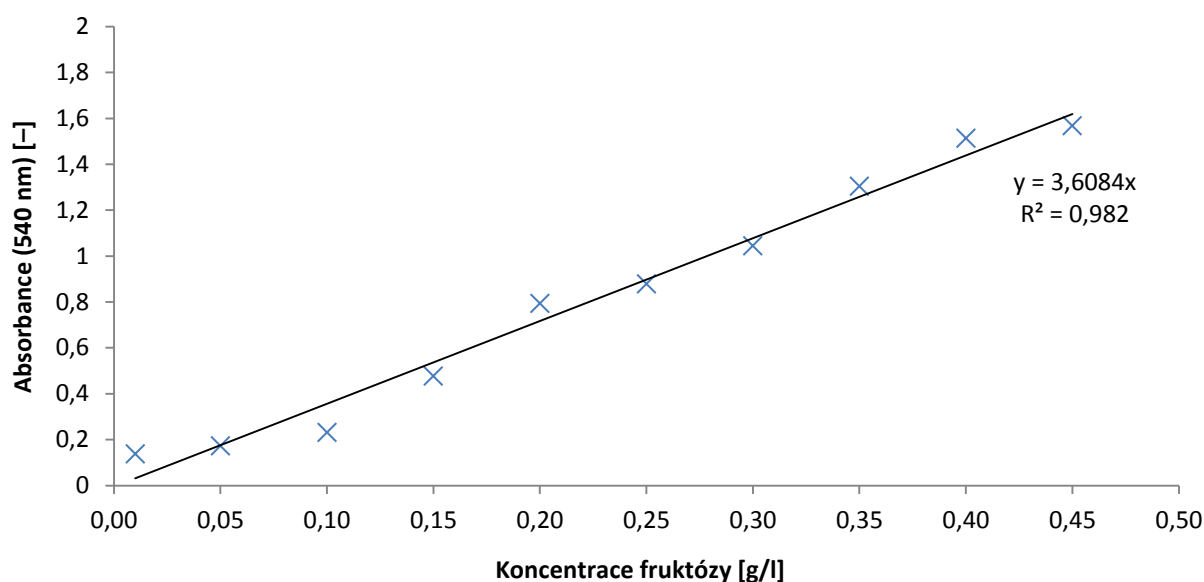
5.1.3 Kalibrace spektrofotometrického stanovení fruktózy

Stanovení celkových cukrů bylo stanoveno spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Byla sestrojena kalibrační závislost koncentrace vzorku na absorbanci (při $\lambda = 540$ nm).

Test stanovení celkových cukrů byl prováděn pouze u dlouhodobého experimentu. U zde zmíněného experimentu se obsah buněk necentrifugoval a tudíž tyto buňky obsahovaly ve svém médiu fruktózu. U druhého dlouhodobého experimentu by tento test neměl smysl, jelikož buňky byly centrifugovány a převedeny do média bez externího zdroje uhlíku a kultivační médium tím pádem neobsahovalo fruktózu.

Tabulka č. 4: Závislost absorbance naměřené při 540 nm na koncentraci fruktózy

Koncentrace fruktózy [g/l]	Naměřená absorbance při $\lambda = 540$ nm
0,01	0,137
0,05	0,171
0,10	0,230
0,15	0,476
0,20	0,792
0,25	0,877
0,30	1,044
0,35	1,303
0,40	1,512
0,45	1,566



Graf č. 3: Kalibrační závislost absorbance naměřené při 540 nm na koncentraci fruktózy

Z naměřených dat byla stanovena kalibrační závislost absorbance naměřené při 540 nm na koncentraci fruktózy $y = 3,6084x$. Hodnota regresního koeficientu je $R^2 = 0,982$.

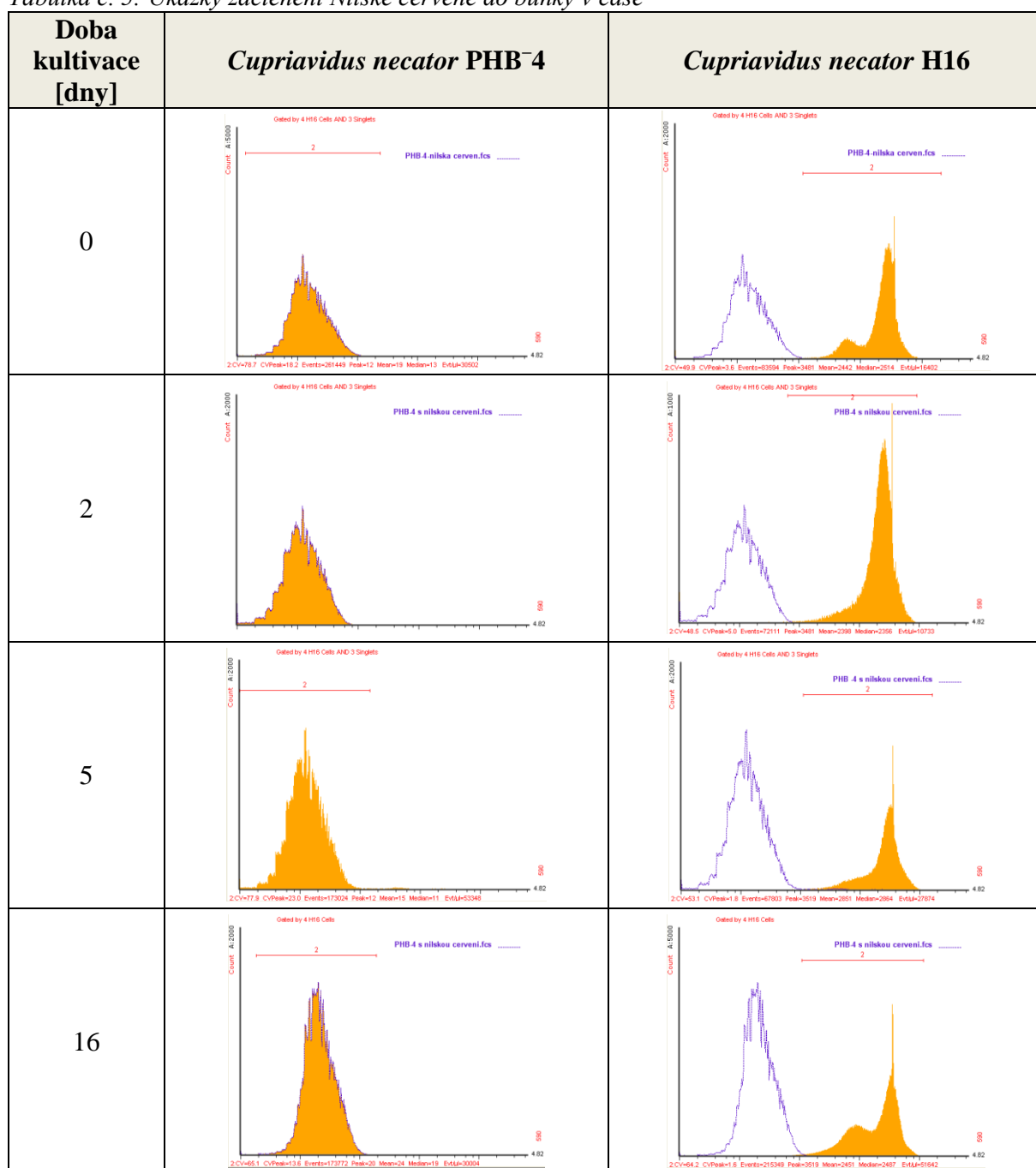
5.2 Dlouhodobý experiment – bez převedení do limitovaného média

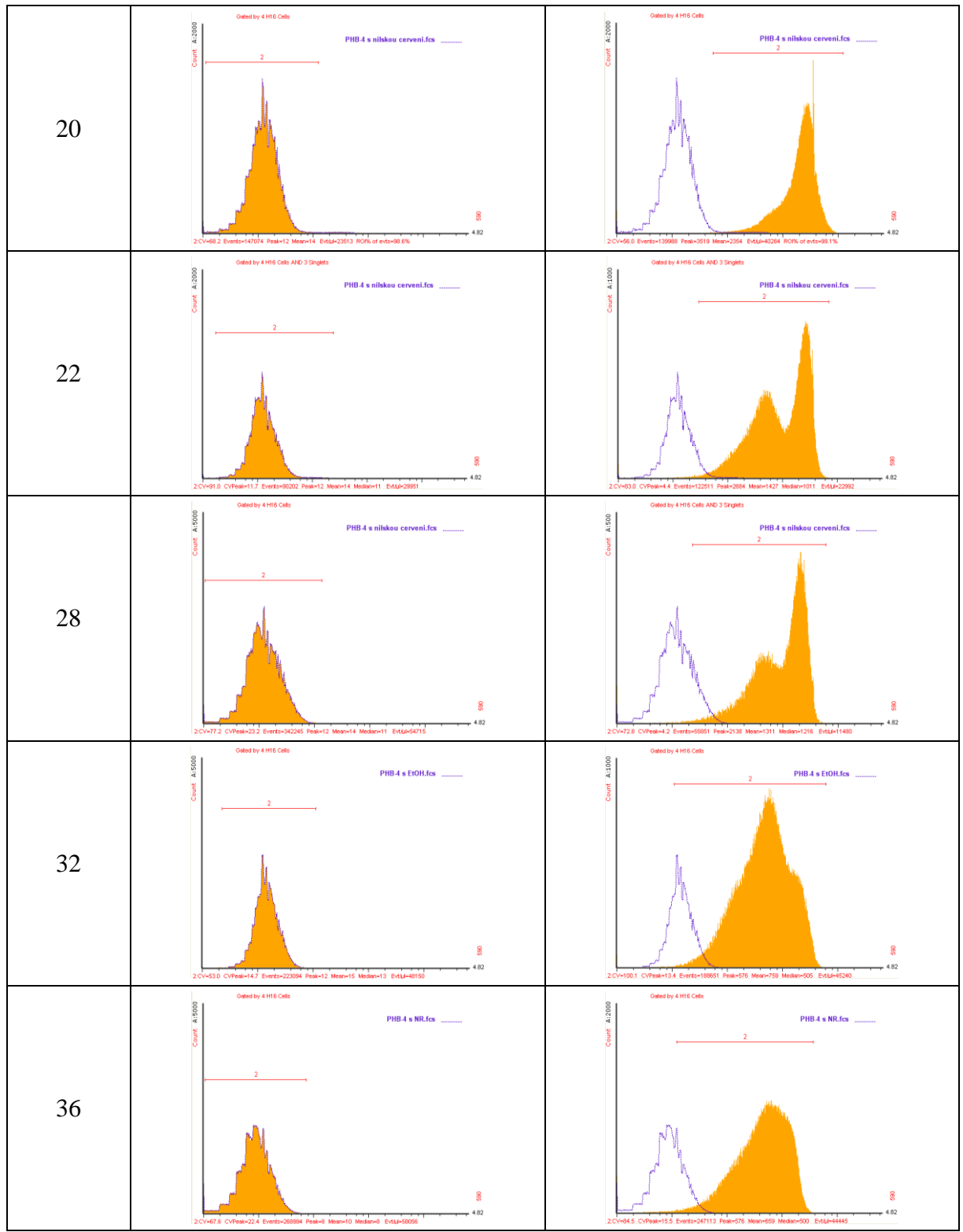
V rámci prvního experimentu bylo porovnáno chování PHB akumulující kultury *Cupriavidus necator* H16 a PHB neakumulující kultury *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ v průběhu dlouhotrvající kultivace. V průběhu experimentu, který celkem trval 36 dní byla pomocí průtokové cytometrie průběžně stanovována viabilita obou bakteriálních kultur a také monitorován intracelulární obsah PHA a jeho distribuce v bakteriální kultuře. Ve vybraných vzorcích byla navíc spektrofotometricky stanovena koncentrace biomasy a redukujících sacharidů a dále byl analyzován intracelulární obsah PHB pomocí plynové chromatografie.

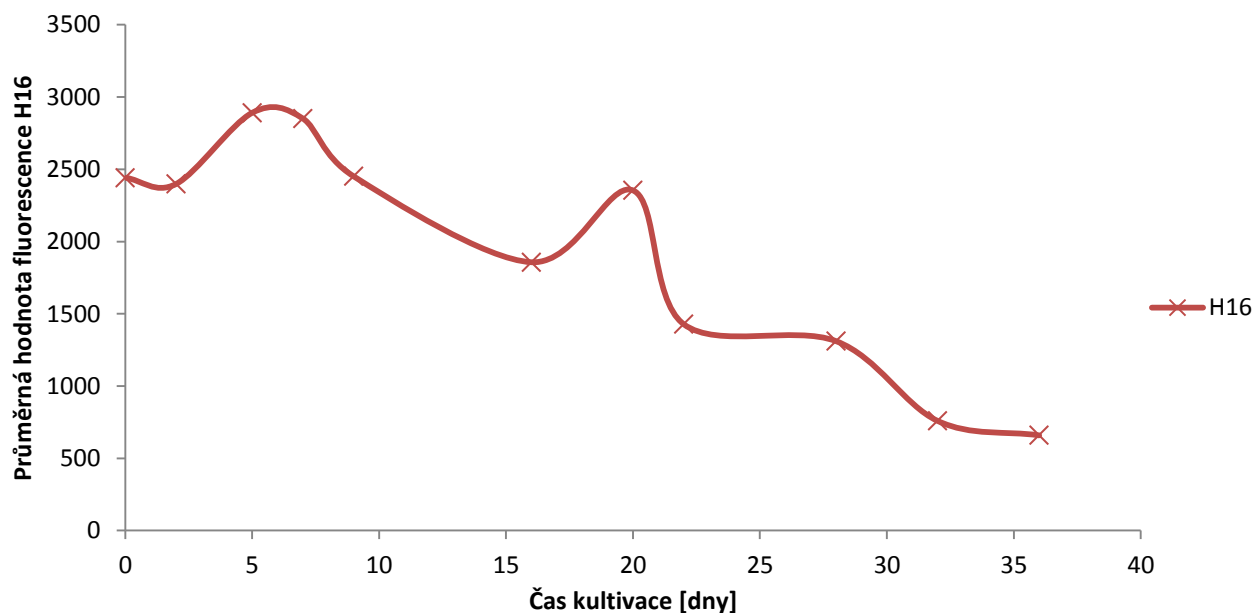
5.2.1 Barvení kultur *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻4 pomocí nilské červeně

V průběhu kultivace byl monitorován obsah PHA pomocí průtokového cytometru. Jako fluorescenční barvivo byla v tomto experimentu používána nilská červeně. Nilská červeně se začlení do polymeru a v jeho přítomnosti vykazuje oranžovou fluorescenci. Toto bylo zásadní především u bakterie *Cupriavidus necator* H16, protože to je kmen schopný produkovat PHA. Na druhou stranu kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻4 je kmen neschopný produkovat PHA, a proto u něj fluorescence byla vždy výrazně nižší.

Tabulka č. 5: Ukázky začlenění Nilské červeně do buňky v čase







Graf č. 4: Závislost průměrné hodnoty fluorescence u kmene H16 na čase kultivace

Test byl dlouhodobý a bakterie byly celou dobu kultivovány při 30°C. Při monitoringu obsahu PHA v bakteriální kultuře pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že u kmene, který je schopný produkovat PHA (tj. *Cupriavidus necator* H16) se v průběhu prvních několika dní intenzita fluorescence snižovala – bakterie v přítomnosti extracelulárního uhlíkatého zdroje akumulovala PHA, ale dále se postupně intenzita fluorescence snižuje. To je způsobeno tím, že kmen *Cupriavidus necator* H16 využívá polymer v pozdní stacionární fázi jako zdroj uhlíku poté, co vyčerpá extracelulární zdroj uhlíku. Postupné snižování fluorescence je patrné, jak z tabulky č. 5, tak z grafu č. 4.

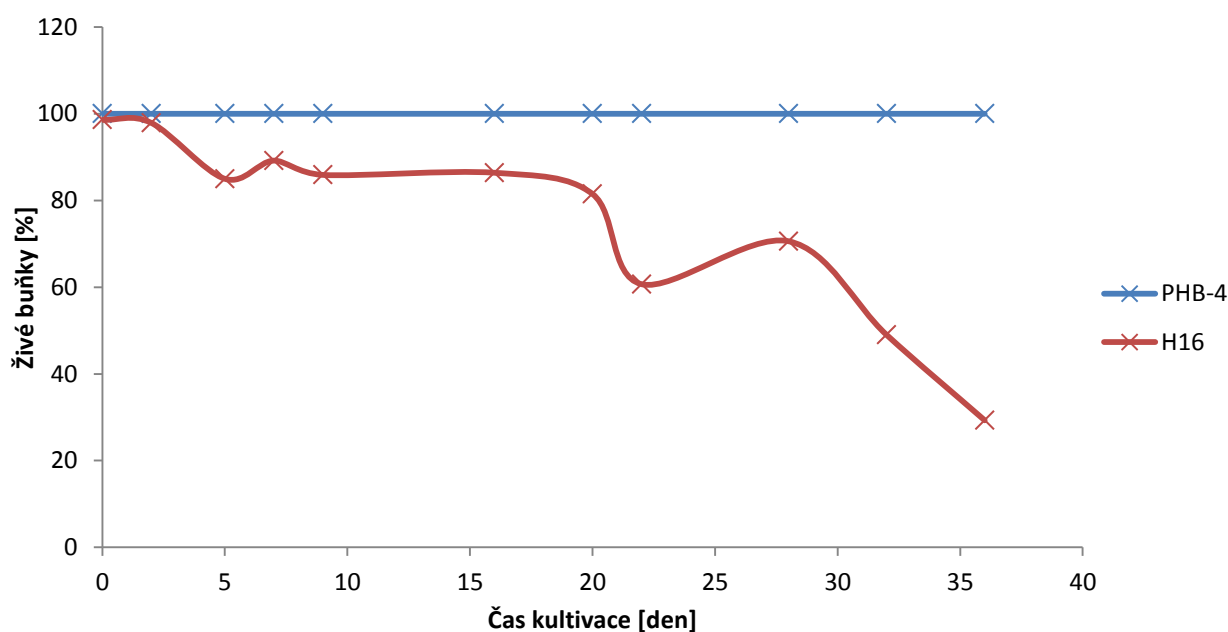
Velkou výhodou průtokové cytometrie je to, že umožňuje sledovat distribuci konkrétního parametru v analyzované buněčné populaci. V první fázi kultivace byl u bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16 pozorován jeden úzký pík, nicméně od 16. dne kultivace se profil píku začíná rozšiřovat a zároveň se pík začíná rozdělovat na dva. To naznačuje, že buňky v bakteriální kultuře neutilizovaly intracelulární zásoby PHA stejnou rychlostí a postupně je možné rozpoznat dvě subpopulace, první vykazuje vyšší intenzitu fluorescence a proces PHA odbourávání je v ní výrazně nižší. Je možné spekulovat, že se jedná o metabolicky méně aktivní nebo dokonce mrtvé buňky. Druhá subpopulace vykazující nižší intenzitu fluorescence pak odbourávala intracelulární zásoby PHA rychleji, z čehož lze usuzovat, že se jednalo o metabolicky aktivnější buňky.

5.2.2 Stanovení viability obou kmenů *Cupriavidus necator* pomocí průtokového cytometru

Průtoková cytometrie byla v mé práci velmi důležitou metodou. Byla s ní stanovována viabilita buněk a obsah PHA. Bylo sledováno, jak buňky přežívají, když jsou vystaveny hladovění, což je jeden ze stresových faktorů pro buňky. Analýza na průtokovém cytometru byla možná díky tomu, že buňky byly obarveny propidium jodidem.

Tabulka č. 6: Viabilita buněk při dlouhodobém experimentu

Den kultivace	Živé buňky kmene <i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻ 4 [%]	Živé buňky kmene <i>Cupriavidus necator</i> H16 [%]
0	100	98,6
2	100	97,9
5	100	85,0
7	100	89,2
9	100	85,9
16	100	86,4
20	100	81,5
22	100	60,7
28	100	70,6
32	100	49,0
36	100	29,3

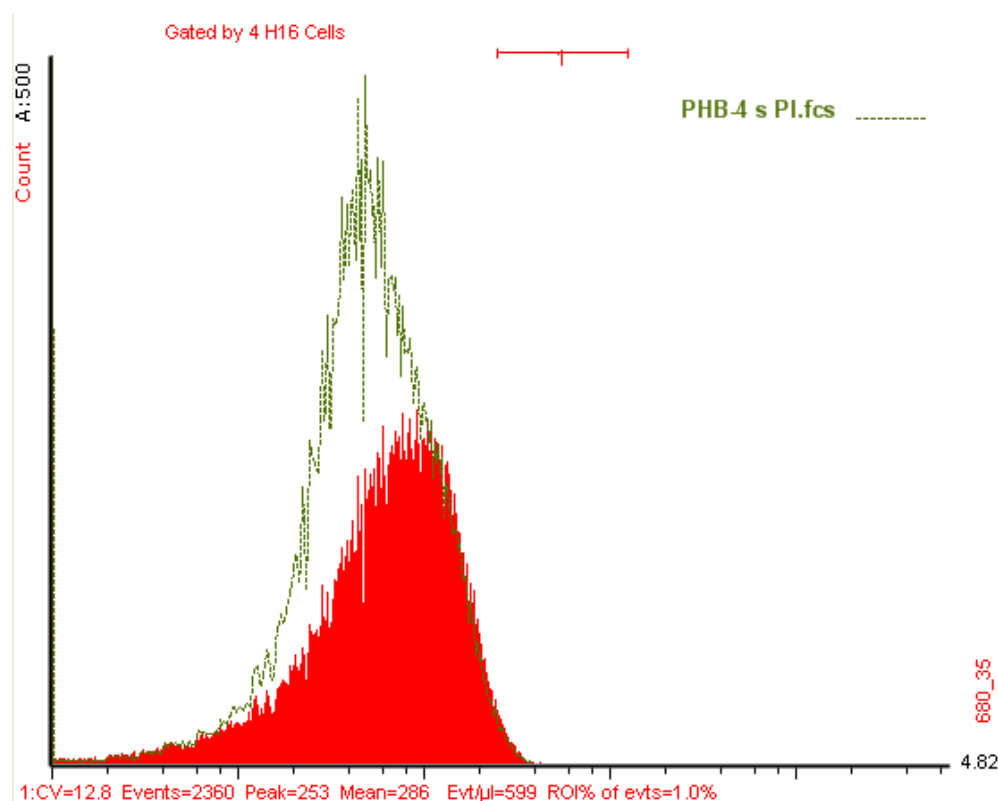


Graf č. 5: Procento živých buněk u obou kmenů v závislosti na čase kultivace

V grafu č. 5 je možnost vidět srovnání kmenů *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻4. Experiment trval celkem 36 dní. I po dlouhodobém experimentu se procento živých buněk u kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻4 nijak nezměnilo, zatímco kmen *Cupriavidus necator* H16 vykazoval výrazně vyšší počet mrtvých buněk. Vysvětlením tohoto neočekávaného jevu může být rozdílná dynamika růstu a spotřeby extracelulárního zdroje uhlíku. Zatímco kmen *Cupriavidus necator* H16 vykazoval velice rychlý růst a dynamickou spotřebu fruktózy, kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻4 rostl výrazně pomaleji a stejně tak pomaleji spotřebovával fruktózu. Ta byla v médiu po celou dobu kultivace přítomna v relativně vysokém množství, buňky nebyly vystaveny striktní limitaci substrátem, a proto

vykazovali výrazně vyšší viabilitu, než tomu bylo u kmene *Cupriavidus necator* H16, který musel své energetické nároky pokrýt utilizací intracelulární zásoby PHB.

Výsledky mohou být obtížně interpretovatelné, protože podmínky v médiu nebyly stejné. Výsledky se tudíž dají těžko srovnávat. Je to hlavně kvůli tomu, že kultura PHB⁻4 nevyužila všechnu fruktózu a tím pádem jí stále zůstával externí zdroj uhlíku, kdežto u kultury H16 byla skoro všechna fruktóza spotřebována.



Obrázek č.8: Ukázka histogramu kmene PHB⁻4 z posledního dne kultivace. Jedná se o závislost počtu daných signálu na intenzitě signálu. Zelený pik je vydefinován z předchozího měření. Lze jednoznačně posoudit, že všechny buňky jsou živé.

5.2.3 Výsledky stanovení PHA v biomase pomocí GC–FID v poslední den kultivace

Tabulka č. 7: Stanovení procentuální stanovení PHA v kulturách

Doba kultivace [den]	Kultura	Navážka biomasy [mg]	Koncentrace 3HB [mg/ml]	Koncentrace PHA [mg/ml]	Zastoupení PHA [%]	Průměr zastoupení PHA [%]
36	PHB ⁻ 4	4,9	0	0	0	0
36	H16	9,1	5,129	5,129	56,36	49,13
36	H16	10,4	4,357	4,693	41,89	

Pro stanovení PHA je kvůli vysoké spolehlivosti volen právě plynový chromatograf. Za pomoci plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (FID) bylo stanoveno procentuální zastoupení polyhydroxyalkanoátů v kulturách. Kultura *Cupriavidus*

necator PHB⁻⁴ podle očekávání neobsahovala vůbec žádné PHA. Na druhou stranu kultura *Cupriavidus necator* H16 tento polymer obsahuje a jak je možno vidět v tabulce č. 7 je v kultuře i po 36 dnech kultivace překvapivě vysoký intracelulární obsah PHB – cca 49 %.

5.2.4 Výsledky stanovení biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu

Dále byla stanovována biomasa pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu. Byla porovnána biomasa u kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a u kmene *Cupriavidus necator* H16 v 36 dnu kultivace.

Tabulka č. 8: Stanovení koncentrace biomasy

Kultura	A ₁ (630 nm)	A ₂ (630 nm)	A ₃ (630 nm)	X ₁ (g/l)	X ₂ (g/l)	X ₃ (g/l)	Průměr X (g/l)
PHB ⁻⁴	0,210	0,274	0,223	2,43	3,18	2,58	2,73 ± 0,4
H16	1,382	1,369	1,444	16,02	15,87	16,74	16,21 ± 0,5

Z výsledků vyplývá, že kultura *Cupriavidus necator* H16 i po tak dlouhé kultivaci obsahovala přibližně 6,5krát větší obsah biomasy než kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

5.2.5 Výsledky stanovení fruktózy po ukončení kultivace

Díky sestrojení kalibrační přímky v programu Microsoft Excel byla možnost určit, kolik přesně se v kulturách nachází fruktózy. Každá kultura (kultura s *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ i kultura *Cupriavidus necator* H16) byla na spektrofotometru proměřena třikrát, zprůměrována a následně bylo z kalibrační přímky vypočteno kolik fruktózy se nacházelo v kultivačním médiu.

Tabulka č. 9: Množství fruktózy v obou kulturách (měřeno v 35 dnu kultivace)

Kultura	Absorbance při $\lambda = 540 \text{ nm}$	Vypočtené množství fruktózy [g/l]	Průměrné množství fruktózy [g/l]
<i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻⁴	1,843	0,5108	0,5120
	2,016	0,5587	
	1,683	0,4664	
<i>Cupriavidus necator</i> H16	0,048	0,0133	0,0125
	0,042	0,0116	
	0,045	0,0125	

Počáteční koncentrace fruktózy byla 20 g/l. V průběhu kultivace pochopitelně obě kultury využívaly fruktózu jako uhlíkatý substrát k pokrytí energetických nároků spojených s růstem a metabolismem. Nicméně obě kultury vykazovaly jinou dynamiku růstu, což se nutně odrazilo i v rychlosti utilizace fruktózy. Z tabulky č. 9 je patrné, že kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ obsahovala na konci kultivace mnohonásobně více cukru fruktózy než kultura *Cupriavidus necator* H16. Tato skutečnost výrazně komplikuje vyhodnocení tohoto

experimentu – u kultury *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ pravděpodobně nedošlo v průběhu kultivace k zásadní limitaci uhlíkatým substrátem, což komplikuje její porovnání s kulturou *Cupriavidus necator* H16, která spotřebovala prakticky všechny extracelulární substrát a nároky svého metabolismu v pozdějších fázích kultivace musela pokrýt z intracelulárních zásob – PHB. Jak bylo uvedeno v kapitole věnující se viabilitě kultury v průběhu dlouhodobé kultivace, tato skutečnost měla zcela zásadní vliv na počet živých a mrtvých buněk.

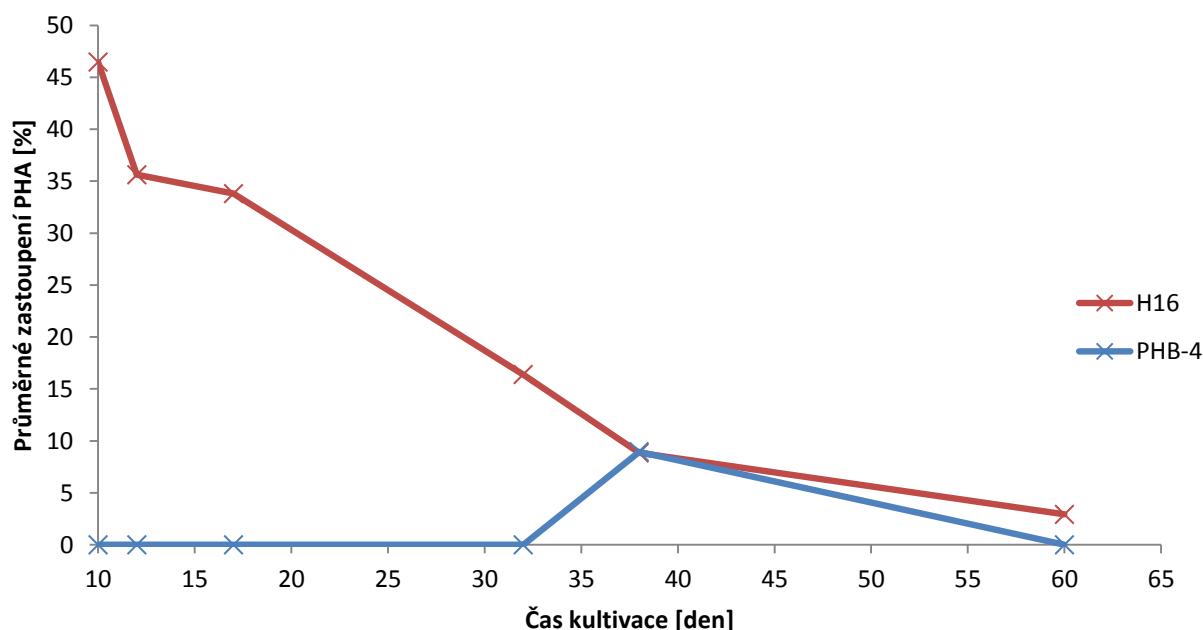
5.3 Dlouhodobý experiment – převedení kultury do C-limitovaného média

V rámci druhého dlouhodobého experimentu byl zvolen jiný přístup částečně eliminující problémy s odlišnou dynamikou růstu a utilizace extracelulárních uhlíkatých substrátů u obou kmenů kultury *Cupriavidus necator*. Po 5 dnech kultivace ve standardním médiu s fruktózou byly obě kultury sterilně centrifugovány a převedeny do sterilního minerálního média bez fruktózy, čímž byla u obou kultur navozena intenzivní limitace extracelulárním uhlíkatým zdrojem.

5.3.1 Výsledky stanovení PHA v biomase obou kultur

Tabulka č. 10: Stanovení procentuální stanovení PHA v kulturách

Doba kultivace [den]	Kultura	Navážka biomasy [mg]	Koncentrace 3HB [mg/ml]	Koncentrace PHA [mg/ml]	Zastoupení PHA [%]	Průměr zastoupení PHA [%]
10	PHB ⁻⁴	10,8	0	0	0	0
10	H16	10,1	4,693	4,693	46,47	46,47
12	PHB ⁻⁴	11,8	0	0	0	0
12	H16	10,6	3,776	3,776	35,62	35,62
17	PHB ⁻⁴	11,8	0	0	0	0
17	H16	10,1	3,415	3,415	33,81	33,81
32	PHB ⁻⁴	12,0	0	0	0	0
32	H16	10,1	1,653	1,653	16,37	16,37
38	PHB ⁻⁴	5,0	0,469	0,469	9,38	8,94
38	PHB ⁻⁴	5,5	0,467	0,467	8,49	
38	H16	6,3	0,531	0,531	8,43	8,84
38	H16	6,5	0,601	0,601	9,25	
60	PHB ⁻⁴	8,0	0	0	0	0
60	H16	8,5	0,248	0,248	2,92	2,92



Graf č. 6: Průměrné zastoupení polyhydroxyalkanoátů u obou kmenů v závislosti na čase kultivace

Pro stanovení konkrétní hodnoty obsahu PHA v biomase byl opět volen plynový chromatograf. Bylo stanoveno procentuální zastoupení polyhydroxyalkanoátů v kulturách. Kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻4 podle očekávání neobsahovala žádné PHA, ale v 38. dnu kultivace podle našich analýz obsahovala 8,94 % PHA. Vysvětlením může být minoritní kontaminace kulturou *Cupriavidus necator* H16, případně částečná reverzní mutace a opětovné získání schopnosti akumulovat polymer. Kultura *Cupriavidus necator* H16 obsahovala polymer v průběhu celé kultivace a v tabulce č. 10 je možné vidět, jak se u této kultury v časovém průběhu zmenšuje procentuální zastoupení PHA. Důvod je takový, že *Cupriavidus necator* H16 zpracovává tento polymer jako intracelulární zdroj energie a uhlíku a tím se jeho obsah zmenšuje.

5.3.2 Výsledky stanovení biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu

Tabulka č. 11: Stanovení koncentrace biomasy

Kultura	Den kultivace	A ₁ (630 nm)	X ₁ (g/l)
PHB ⁻ 4	10	0,335	3,88
H16	10	1,076	12,47
PHB ⁻ 4	12	0,307	3,56
H16	12	0,719	8,33
PHB ⁻ 4	17	0,277	3,21
H16	17	0,606	7,02
PHB ⁻ 4	32	0,254	2,94
H16	32	0,532	6,17
PHB ⁻ 4	38	0,130	1,51

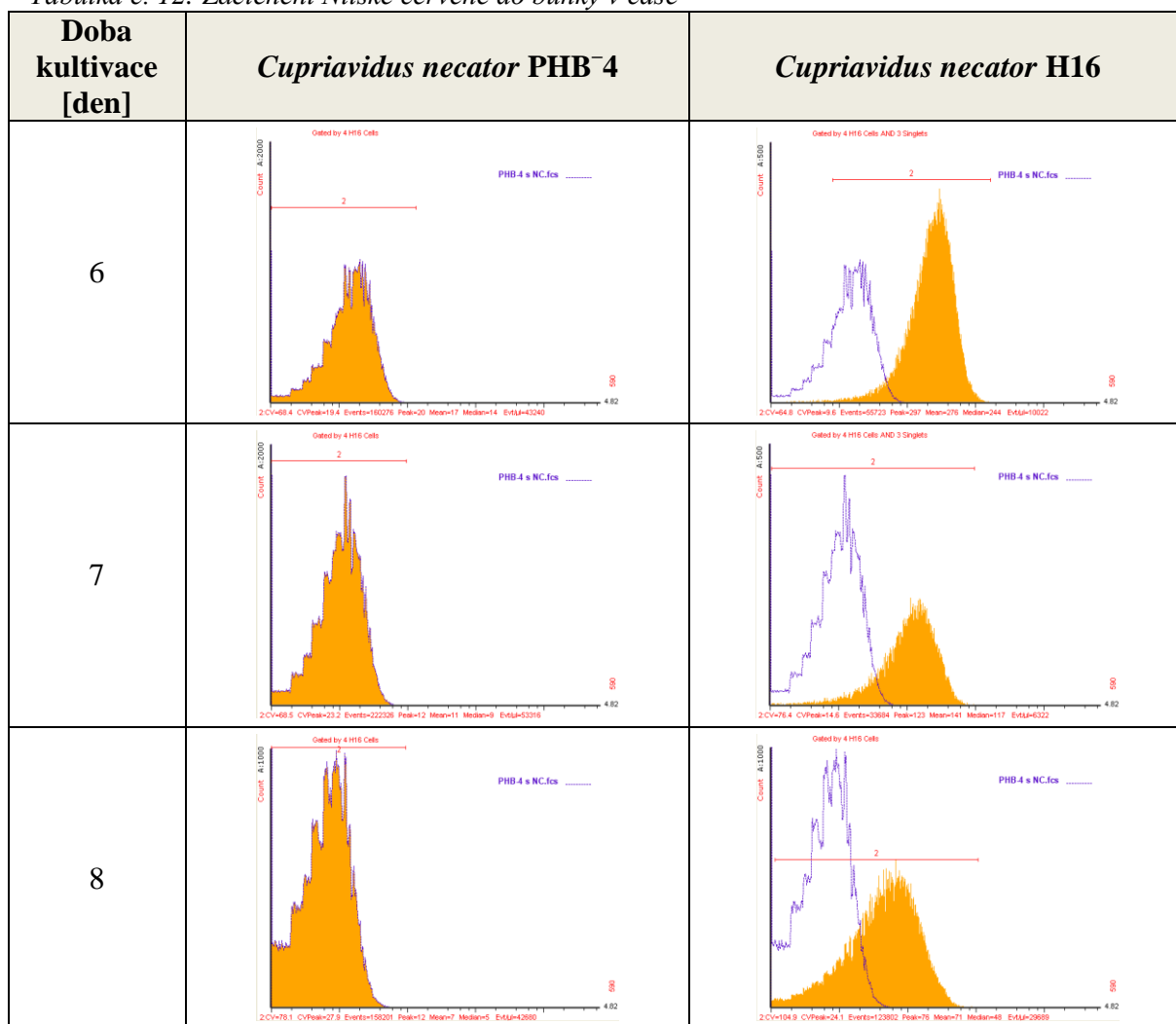
H16	38	0,101	1,17
PHB ⁻ 4	60	0,139	1,61
H16	60	0,134	1,55

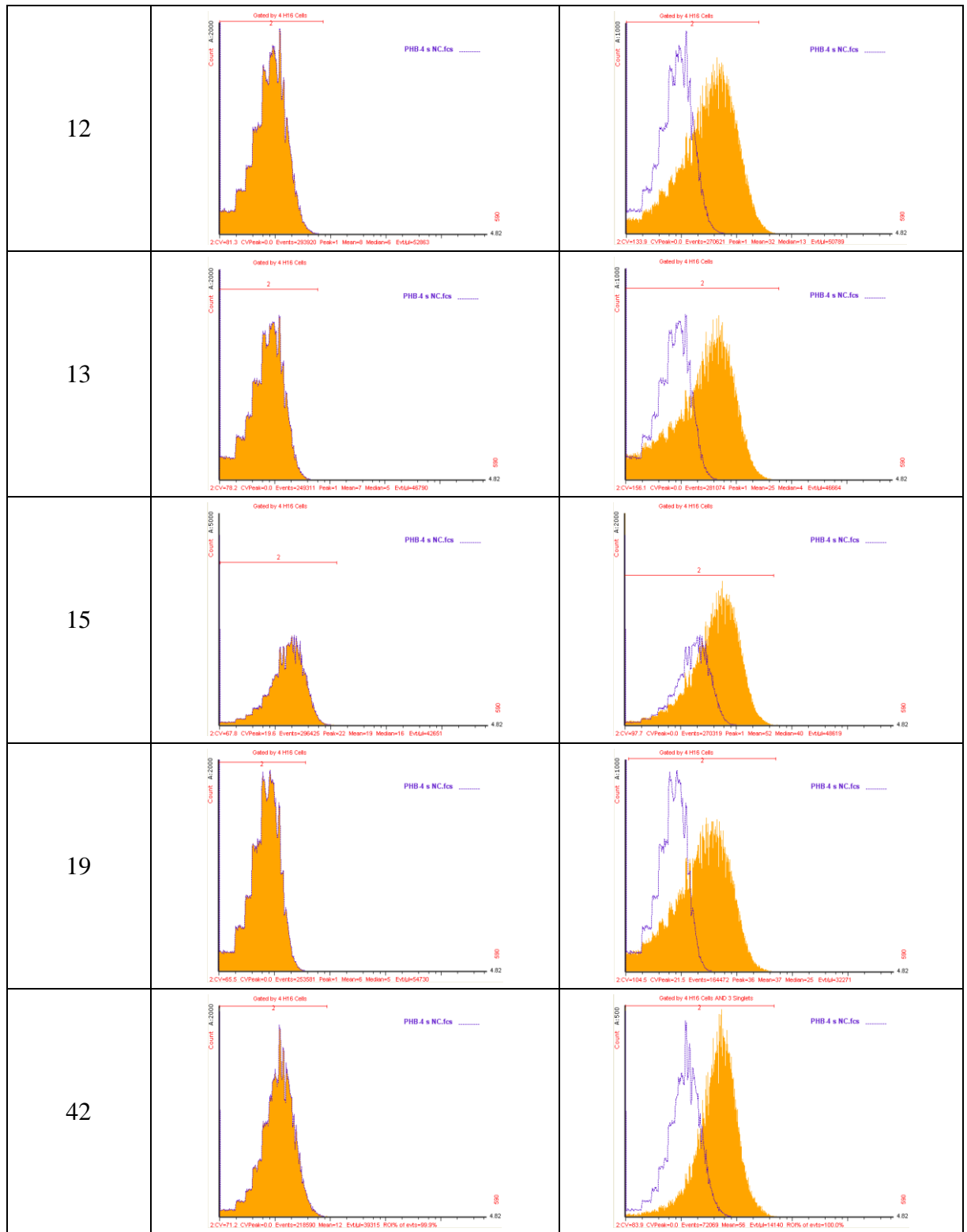
V tabulce č. 11 je vidět jak se koncentrace biomasy v průběhu času snižuje. Ze začátku kultivace je koncentrace biomasy u kmene *Cupriavidus necator* H16 zhruba 3krát vyšší než u kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻4. Na konci kultivace jsou koncentrace biomasy zhruba stejné.

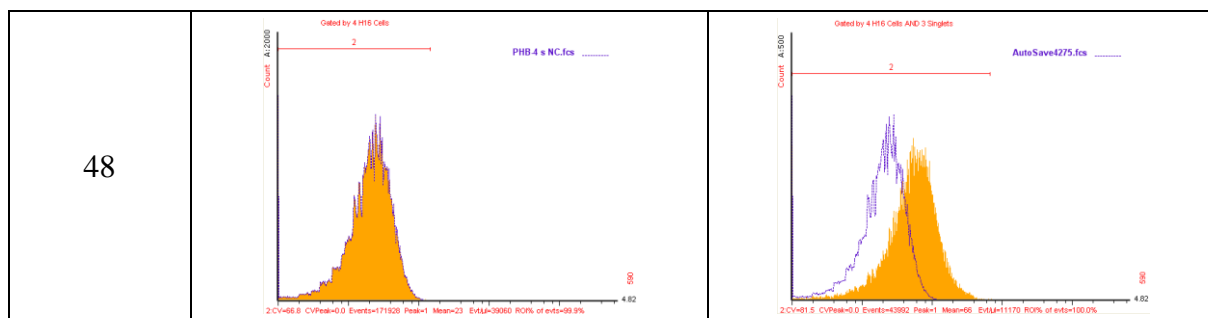
5.3.3 Barvení kultur *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻4 pomocí nilské červeně

Další dlouhodobější studie již tedy probíhala s zcentrifugovanými buňkami. Buňky byly převedeny do stejného média (bez fruktózy), tudíž měly stejné podmínky a obě kultury se tak mohly lépe porovnat. Pro lepší srovnání je v tabulce č. 12 přerušovanou modrou čarou uvedena kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻4 a oranžový pík vykresluje kulturu *Cupriavidus necator* H16, což je kmen schopný produkovat polyhydroxyalkanoáty.

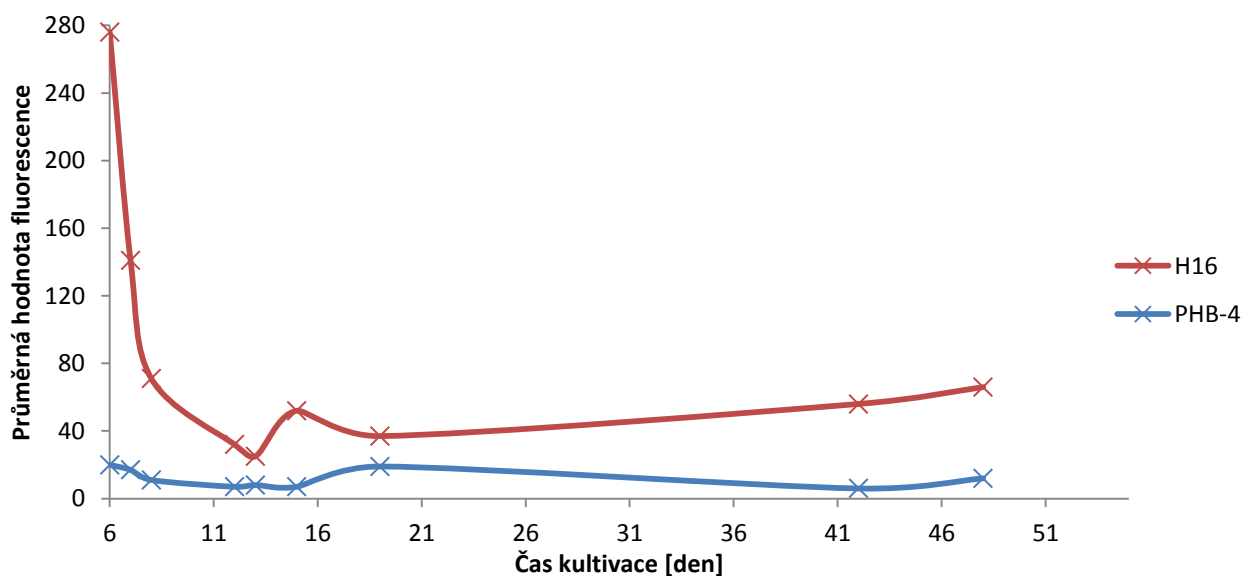
Tabulka č. 12: Začlenění Nilské červeně do buňky v čase







Opět bylo prokázáno, že kultura *Cupriavidus necator* H16 využívá polymer v pozdní stacionární fázi jako zdroj uhlíku. Fluorescence se postupem času snižuje a dokonce již patnáctý den kultivace je hodnota fluorescence obou kmenů velmi podobná. Rozdíl mezi předchozí studií, kdy se buňky nepřevedly do limitovaného média a nynější studií je patrný, protože například fluorescence u kmene H16 již není tak vysoká, jako tomu bylo v předchozí studii a to ani na počátku kultivace, což je v souladu s daty z plynové chromatografie. Zdá se, že kultura *Cupriavidus necator* H16 v rámci tohoto experimentu akumulovala menší množství PHB než v experimentu předchozím. Další rozdíl mezi oběma dlouhodobými experimenty spočívá v tom, že v průběhu pozdní stacionární fáze utilizovala intracelulární zásoby PHA v podstatě rovnoměrnou rychlostí a nedošlo tedy ke vzniku dvou jasně oddělitelných subpopulací.



Graf č. 7: Závislost průměrné hodnoty fluorescence obou kmenů *Cupriavidus necator* na čase kultivace

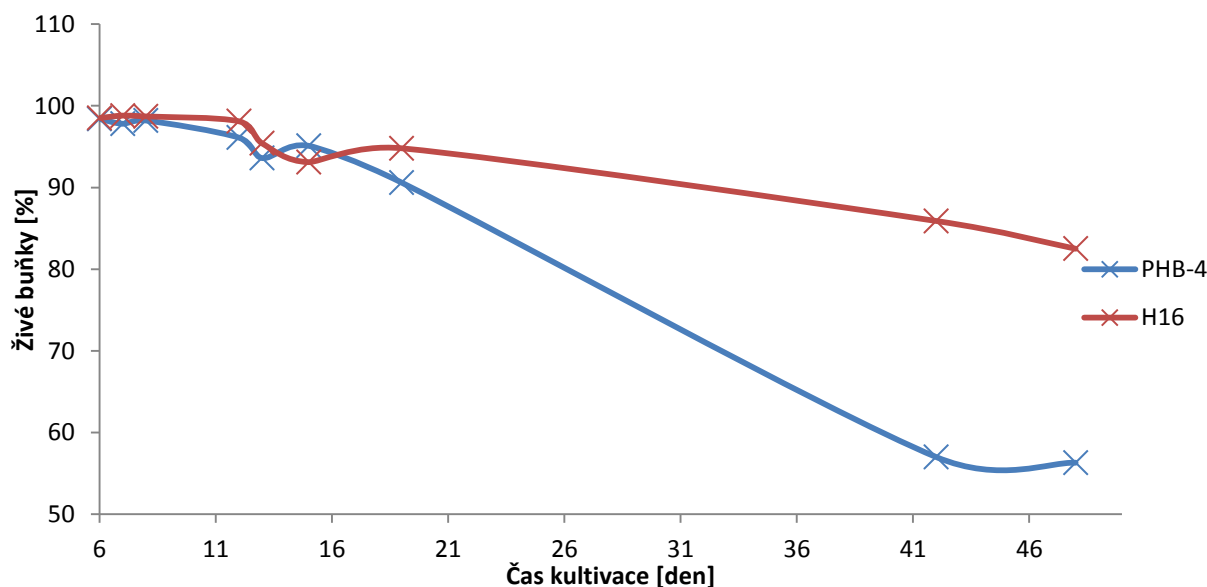
V grafu č. 7 je další možnost vidět jak se průměrná fluorescence u kmene s časem snižuje. Na začátku kultivace je fluorescence u kmene *Cupriavidus necator* H16 poměrně vysoká a poté se fluorescence v prvních dnech kultivace rapidně snižuje. Zhruba od patnáctého dne do konce kultivace kultury H16 je fluorescence nízká a zůstává téměř konstantní. U kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ je dle očekávání fluorescence po celou dobu kultivace velmi nízká.

5.3.4 Stanovení viability obou kmenů *Cupriavidus necator* pomocí průtokového cytometru

Kromě obsahu PHA byla pomocí průtokového cytometru stanovována také viabilita bakteriálních kultur v průběhu dlouhodobé kultivace.

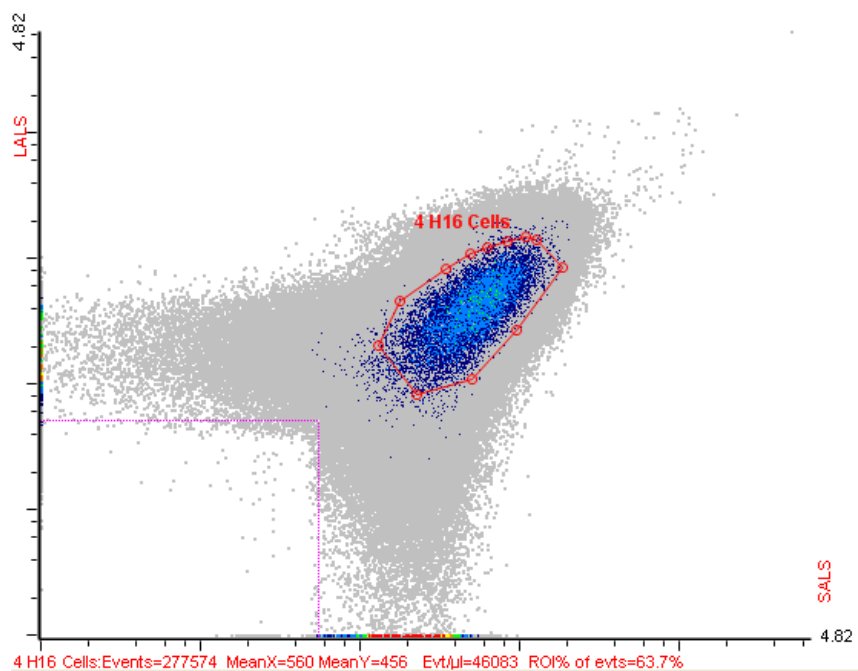
Tabulka č. 13: Viabilita buněk

Den kultivace [den]	Živé buňky kmene <i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻ 4 [%]	Živé buňky kmene <i>Cupriavidus necator</i> H16 [%]
6	98,4	98,5
7	97,8	98,8
8	98,2	98,7
12	96,1	98,1
13	93,6	95,4
15	95,1	93,1
19	90,6	94,8
42	57,0	85,9
48	56,3	82,5

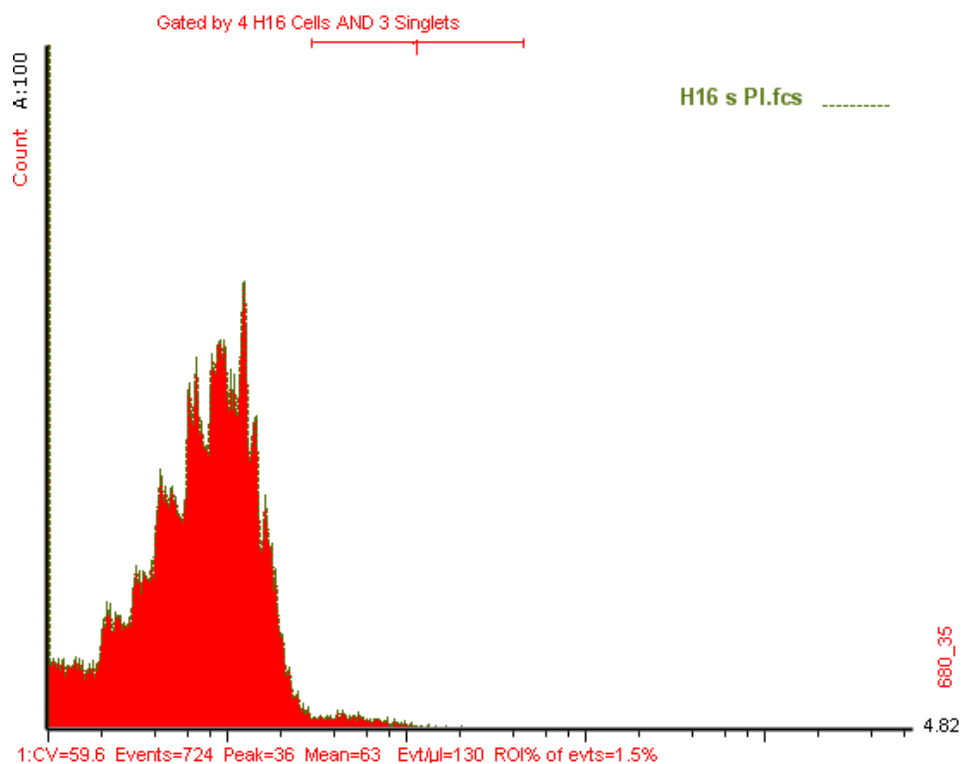


Graf č. 8: Procento živých buněk obou kmenů v závislosti na čase

Bylo prokázáno, že mutantní kmen rodu *Cupriavidus necator* (tedy PHB⁻4) při výrazné limitaci a dlouhodobé limitaci zdrojem uhlíku umírá podstatně rychleji než kmen *Cupriavidus necator* H16. Zhruba po 19 dnech kultivace začaly buňky u kmene PHB⁻4 rychle umírat, zatímco kmen H16 i po 48 dnech kultivace vykazuje relativně vysokou viabilitu, okolo 82,5 % živých buněk.



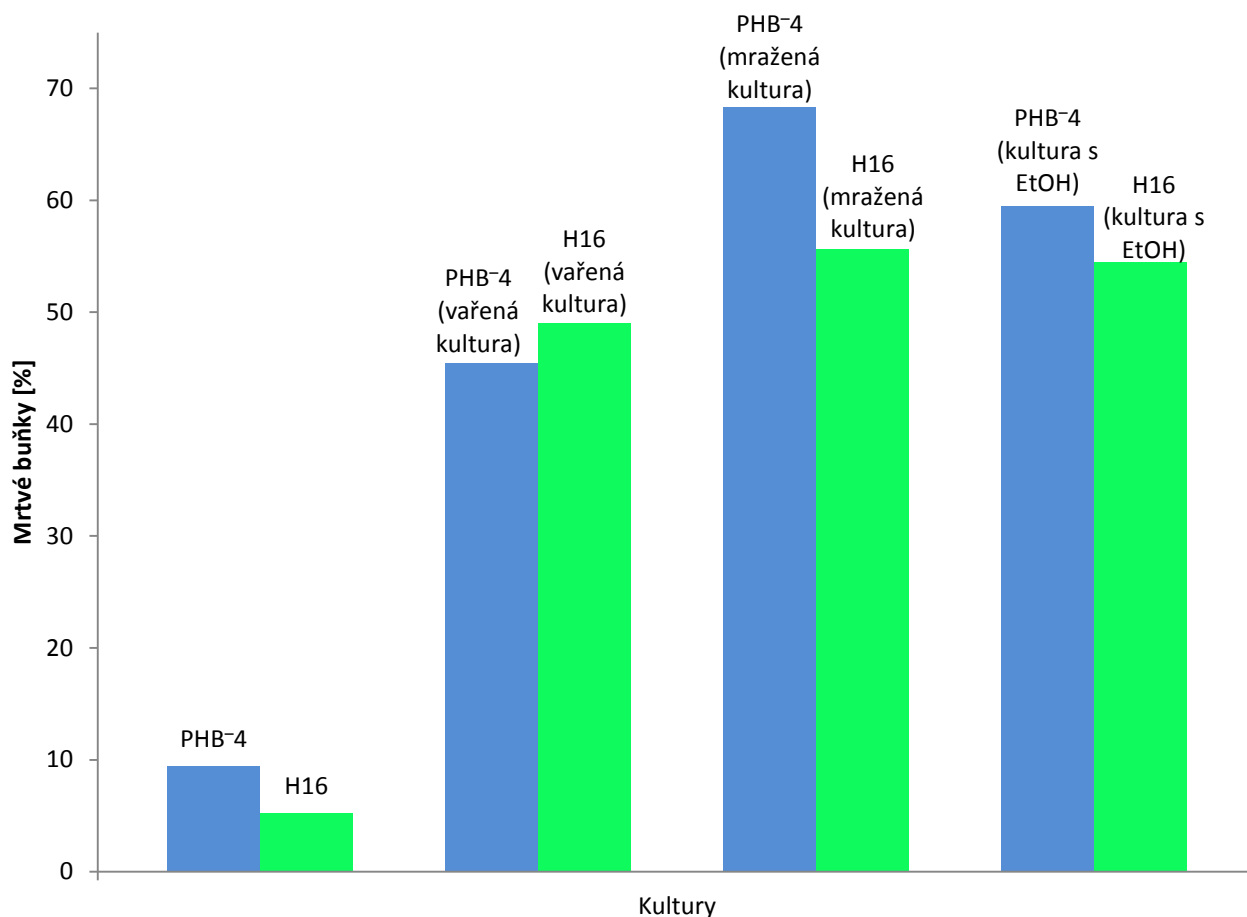
Obrázek č. 9: Příklad gatování populace (závislost měření intenzity rozptýleného světla v bočním směru na intenzitě rozptýleného světla ve směru přímém)



Obrázek č. 10: Ukázka histogramu kmenu H16 z prvního dne kultivace. Jedná se o závislost počtu daných signálu na intenzitě signálu

5.3.5 Stanovení viability po aplikování různých stresových faktorů

Cílem dalšího experimentu bylo ověřit vliv schopnosti akumulovat PHB na odolnost vůči stresu v pozdní stacionární fázi. Proto byly buňky po 19 dnech kultivace v médiu bez zdroje uhlíku exponovány vybraným stresovým faktorům – zvýšené teplotě, mrazu a působení ethanolu. V literatuře je často zmiňována souvislost mezi utilizací intracelulárních zásob PHB a aktivací stresových mechanismů v buňce.



Graf č. 9: Procentuální zastoupení mrtvých buněk obou kultur před a po aplikování různých stresových faktorů

Je zřejmé, že s výjimkou expozice buněk teplotnímu šoku představuje schopnost produkovat a následně využít PHB významnou výhodu. U kmene *Cupriavidus necator* H16 byl při stresu způsobeném zmražením i ethanolom stanoven větší počet živých respektive menší počet mrtvých buněk.

Podle literárních zdrojů vede utilizace PHB k navýšení intracelulární koncentrace alormonu tetraguanosin fosfátu, který následně navyšuje genovou expresi alternativního stresového sigma faktoru RPoS. Díky tomu dochází v bakteriální buňce k adaptaci vůči celé řadě stresových faktorů [32]. Naše data tento obecný mechanismus potvrzují.

6 ZÁVĚR

- Práce byla zaměřena na zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií v pozdní stacionární fázi. Pro tuto studii byly použity dva kmeny: PHA akumulující *Cupriavidus necator* H16 a jeho PHA neakumulující mutant *Cupriavidus necator* PHB⁻4.
- V praktické části jsou zahrnuty postupy studií a porovnání kmenů *Cupriavidus necator* PHB⁻4 a *Cupriavidus necator* H16. V praktické části hraje hlavní roli stanovení obsahu PHA a stanovení viability buněk pomocí průtokového cytometru, jež se osvědčil jako velmi vhodný přístroj pro tato stanovení. Průtoková cytometrie je metoda, která na rozdíl od standardních analytických technik umožňuje také studium distribuce vybraného parametru (v našem případě především obsahu) v rámci vybrané bakteriální kultury.
- V průběhu práce byly provedeny dva dlouhodobé experimenty. První probíhal bez převedení do limitovaného média a druhý zase s převedením do C-limitovaného média.
- U prvního dlouhodobého experimentu byla sledována viabilita buněk a obsah PHA pomocí průtokového cytometru a bylo zjištěno, že buňky neprodukující polymer vykazují nečekaně nízkou růstovou rychlost a také pomalou spotřebu uhlíkatého zdroje, ale také velice vysokou viabilitu. U buněk produkující polymer (*Cupriavidus necator* H16) došlo naopak k velice rychlému růstu a spotřebě externího uhlíkatého zdroje, v důsledku čehož byla brzy navozena striktní limitace uhlíkatým substrátem, která vedla k výskytu výrazně vyššího počtu mrtvých buněk. Podmínky v obou testovaných kulturách nejspíše nebyly stejné a kmeny se proto nedaly porovnat, a proto byly u druhého dlouhodobého experimentu buňky převedeny do C-limitovaného média.
- Při stanovení obsahu PHA u prvního experimentu bylo zjištěno, že u kmene, který je schopný produkovat polymer se postupně snižuje fluorescence a počet buněk. To je způsobeno tím, že kmen *Cupriavidus necator* H16 využívá polymer v pozdní stacionární fázi jako zdroj uhlíku poté, co vyčerpá extracelulární zdroj uhlíku. Zároveň bylo v rámci prvního experimentu možné pozorovat vznik dvou subpopulací, které se lišily dynamikou utilizace intracelulárních zásob PHA. Subpopulace vykazující vyšší fluorescenci (a tedy i obsah PHA) byla pravděpodobně metabolicky méně aktivní a pravděpodobně se jednalo o mrtvé buňky.
- Obsah biomasy byl stanovován na konci prvního experimentu u obou kmenů. U kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻4 činilo zastoupení polyhydroxyalkanoátů podle očekávání 0 %, avšak u kmene *Cupriavidus necator* H16 bylo toto zastoupení i po 36 dnech kultivace poměrně vysoké, okolo 49 %. Ke konci prvního experimentu byl stanovován i obsah fruktózy v médiu, přičemž na začátku kultivace činila koncentrace fruktózy 20 g/l. Po 35 dnech kultivace činila koncentrace fruktózy u kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻4 0,5120 g/l a u kmene *Cupriavidus necator* H16 0,0125 g/l. Bylo tedy potvrzeno, že *Cupriavidus necator* H16 spotřebovával fruktózu rychleji.
- U druhého dlouhodobého experimentu bylo schéma experimentu podobné jako u experimentu prvního, avšak s tím rozdílem, že kultury byly převedeny do C-limitovaného média a tudíž měly během stacionární fáze stejné podmínky. U tohoto experimentu byla konkrétní hodnota obsahu PHA taktéž stanovována na plynovém

chromatografu. Kultura *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ u tohoto experimentu neobsahovala žádný polymer, s výjimkou toho, že v 33. dnu obsahovala asi 8,94 % PHA, což bylo zřejmě zapříčiněno kontaminací kmenem *Cupriavidus necator* H16. Procentuální zastoupení PHA se v časovém průběhu zmenšovalo. Kmen *Cupriavidus necator* H16 na začátku kultivace obsahoval zhruba 47 % PHA a na konci jen 3 % PHA. Ze spektrofotometrického měření zákalu bylo zjištěno, že koncentrace biomasy u kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ činila na začátku kultivace 3,88 g/l a na konci 1,61 g/l. U kmene *Cupriavidus necator* H16 byl tento rozdíl výrazně vyšší, tj. koncentrace činila 12,47 g/l na začátku a 1,55 g/l na konci kultivace.

- Viabilita byla u kmenů v průběhu druhého experimentu lépe porovnatelná. Bylo zjištěno, že kmen *Cupriavidus necator* H16 lépe přežívá než kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, u něhož se viabilita po 19. dnu kultivace razantně změnila. Kmen *Cupriavidus necator* H16 vykazoval i na konci kultivace relativně vysokou viabilitu, pouze 17,5 % mrtvých buněk.
- Po aplikování různých stresových faktorů byly bakterie porovnávány a bylo zjištěno, že bakterie *Cupriavidus necator* H16 lépe odolává aplikaci ethanolu a zmrazení než bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Na druhou stranu bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ lépe zvládala aplikaci vysoké teploty, která bývá pro bakterie letální.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CHEMPOINT. CHEMPOINT [online]. Brno [cit. 2014-12-31]. Dostupné z:<http://www.chempoint.cz/obruca-1>
- [2] ŽIVA. HOLÁ, Veronika. [online]. 2012. vyd. [cit. 2014-12-31]. Dostupné z:<http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/mikrobiani-biofilmy-3-biofilmova-spolecenstva-lid.pdf>
- [3] *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003, xxii, 797 s. ISBN 80-718-3268-5
- [4] ROSYPAL, Stanislav, Karel HODÁK a Miloslav KOCUR. *Biologie bakterií*. Praha 1: Státní pedagogické nakladatelství, 1979.
- [5] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 603 s.
- [6] DOLEŽÁLKOVÁ, Iva. *Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub*. Brno, 2010. 98 l. Dostupné z:http://is.muni.cz/th/105941/prif_r/RP_Dolezalkova.pdf. Rigorózní práce. Masarykova univerzita.
- [7] *Rozmnožování mikroorganismů* [online]. Ústí nad Labem: UJEP [cit. 2014-05-01]. Dostupné z:<http://fzp.ujep.cz/~trogl/3Rozmnozovani.pdf>
- [8] *Bacterial Growth and Regulation* [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: http://cronodon.com/BioTech/Bacteria_Growth.html
- [9] BOOR, Kathryn J. Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biology*. New York, NY: Springer New York, 2006, vol. 4, issue 1, e23-. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040023. Dostupné z: <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document>
- [10] RON, Eliora Z. Bacterial Stress Response. *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 2006, s. 1012. DOI: 10.1007/0-387-30742-7_32. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/0-387-30742-7_32
- [11] CALDERWOOD, Stuart K. *Cell stress proteins* [online]. New York: Springer, 2009, xv, 476 p. [cit. 2014-05-01]. ISBN 03-873-9717-5.
- [12] LIPENSKÁ, Ivana. *Změny cytoplazmatické membrány typového kmene Streptomyces nodosus subsp. asukaensis jako odpověď na růstové podmínky*. České Budějovice, 2012. Diplomová práce. The University of South Bohemia. Vedoucí práce RNDr. Dana Elhottová, Ph.D.
- [13] LUSHCHAK, V. I. Oxidative Stress and Mechanisms of Protection Against It in Bacteria. *Biochemistry (Moscow)*. vol. 66, issue 5, s. 476-489. DOI: 10.1023/A:1010294415625. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1010294415625>
- [14] BAI, Zhonghu, Linda M. HARVEY a Brian MCNEIL. Oxidative Stress in Submerged Cultures of Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2003, vol. 23, issue 4, s. 267-302. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07388550390449294>.
- [15] OBRUČA, S.: Controlled production and degradation of selected biomaterials. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

- [16] MORGAN-SAGASTUME, Fernando, Anton KARLSSON, Peter JOHANSSON, Steven PRATT, Nico BOON, Paul LANT a Alan WERKER. Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus: biological polyesters. *Water Research*. 2010, vol. 44, issue 18, s. 5196-5211. DOI: 10.1016/j.watres.2010.06.043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135410004306>
- [17] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, vol. 25, issue 10, s. 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [18] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology*. 2007, vol. 82, issue 3, s. 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [19] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology*. 2010, vol. 85, issue 6, s. 732-743. DOI: 10.1002/jctb.2392. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392>
- [20] REDDY, C.S.K, R GHAI, Guglielmo RASHMI, V.C KALIA, Federico QUARANTA, Monica PITTALUGA, Stefania SABATINI, Paolo CASEROTTI, Paolo PARISI, Attilio PARISI a Daniela CAPOROSSO. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, vol. 87, issue 2, s. 137-146. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [21] PHILIP, S., T. KESHAVARZ, I. ROY, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology*. 2007, vol. 82, issue 3, s. 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [22] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, vol. 13, issue 3, s. 321-326. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [23] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, vol. 102, issue 6, s. 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [24] AYUB, Nicolás D., M. Julia PETTINARI, Jimena A. RUIZ, Nancy I. LÓPEZ a Guo-Qiang CHEN. A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*. 2004, vol. 49, issue 3, s. -. DOI: 10.1007/s00284-004-4254-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-004-4254-2>

- [25] AYUB, Nicolás D., Paula M. TRIBELLI a Nancy I. LÓPEZ. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*. 2009, vol. 13, issue 1, s. 59-66. DOI: 10.1007/s00792-008-0197-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-008-0197-z>
- [26] ZHAO, Yan Hong, Hong Ming LI, Ling Fang QIN, Hong Hui WANG a Guo-Qiang CHEN. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, vol. 276, issue 1, s. 34-41. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>
- [27] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [28] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, 167 s. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [29] RAHMAN, Misha. SEROTEC. Introduction to Flow Cytometry. Kidlington, 2005. Dostupné z: <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- [30] BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZOCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy: *Chemické listy*. 2011, s. 8. Dostupné z: http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [31] CASTRO, Guillermo R., Bridget K. LARSON, Bruce PANILAITIS a David L. KAPLAN. Emulsan quantitation by Nile red quenching fluorescence assay. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, vol. 67, issue 6, s. 767-770. DOI: 10.1007/s00253-004-1849-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1849-2>
- [32] RUIZ, J. A., N. I. LOPEZ, R. O. FERNANDEZ a B. S. MENDEZ. 2001. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(1): 225-230. DOI: 10.1128/AEM.67.1.225-230.2001. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.67.1.225-230.2001>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoáty
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HV)	poly(3-hydroxyvalerát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
3HHx	3-hydroxyhexanoát
SCL PHA	short-chain-length PHA
MCL PHA	medium-chain-length PHA