



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ISOLACE, IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE
EXTREMofilŮ SCHOPNÝCH PRODUKCE PHA**

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTREMOPHILES CAPABLE OF PHA
PRODUCTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Terézia Vlasáková

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1209/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Terézia Vlasáková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Isolace, identifikace a charakterizace extremofilů schopných produkce PHA

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Optimalizace PCR detekce pha syntázy
3. Isolace a identifikace PHA produkujících extremofilů

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Terézia Vlasáková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predložená diplomová práca sa zameriava na izoláciu a identifikáciu termofilných mikroorganizmov schopných produkcie polyhydroxyalkanoátov (PHA) vo vzorke aktivovaného kalu z čističky odpadových vôd. Z aktivovaného kalu bolo pomocou kultivačných techník a metód molekulárnej biológie vyizolovaných 6 vzoriek, ktoré boli na základe nukleotidových sekvencií génu *16S*-rRNA bližšie identifikované a zaradené k bakteriálnemu rodu *Anoxybacillus*. Tieto vzorky obsahovali gén *phaC* kódujúci PHA-syntázu a poskytovali pozitívnu odozvu na detekciu intracelulárnych lipidických štruktúr farbením kolónií Nílskou červeňou. Produkcia PHA s vybranými izolátmi však nebola úspešná. Dôvodom mohlo byť nevyhovujúce produkčné médium či nastavené podmienky produkcie. Pozitívny fenotypový výsledok pri farbení Nílskou červeňou bol zrejme spôsobený produkciou veľkého množstva lipidu poskytujúceho podobnú fluorescenciu ako granule PHA.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on isolation and identification of thermophilic microorganisms capable of production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in the sample of activated sludge from wastewater treatment. 6 culture samples were isolated from activated sludge by means of cultivation technics and methods of molecular biology. They were closer specified by comparing nucleotide sequences of *16S*-rRNA gene and assigned to bacterial genus *Anoxybacillus*. The production of PHA by this genus was not reported in literature so far. Samples were confirmed to contain *phaC* gene that codes the enzyme PHA-synthase and they also gave a positive response to staining colonies with Nile red, what refers to presence of intracellular lipidic structures. However, the PHA production by isolates was not successful. The reason should be an inappropriate production medium or conditions. The positive phenotype result of Nile red dyeing was probably achieved by production of huge amount of lipids by bacterial cells that provides similar fluorescence than PHA granules.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), extrémofilné mikroorganizmy, termofily, aktivovaný kal, PHA-syntáza, *Anoxybacillus*

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoate (PHA), extremophile microorganisms, thermophiles, activated sludge, PHA-synthase, *Anoxybacillus*

VLASÁKOVÁ, T. *Isolace, identifikace a charakterizace extremofilů schopných produkce PHA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 57 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Podakovanie:

Moje podakovanie patrí vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za odborné rady a smerovanie práce, a ďalej Ing. Ive Pernicovej za veľkú dávku prispôsobivosti a trpezlivosti, ochotnú pomoc v laboratóriu aj pri vypracovávaní samotnej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Kompozícia a fyzikálno-chemické vlastnosti PHA	10
2.1.2	Biosyntéza	12
2.1.3	PHA-syntázy	13
2.1.4	Využitie PHA	15
2.1.5	Možnosti zníženia produkčných nákladov	15
2.2	Extrémofilné mikroorganizmy	16
2.2.1	Využitie extrémofilov v biotechnologickom priemysle	18
2.3	Vybrané termofily produkujúce PHA	19
2.3.1	<i>Thermus thermophilus</i>	19
2.3.2	<i>Chelatococcus daeguensis</i> TAD1	19
2.3.3	<i>Caldimonas taiwanensis</i>	20
2.4	Aktivovaný kal	20
2.4.1	Aktivovaný kal a PHA	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	23
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie, materiál a prístroje	23
3.1.1	Mikroorganizmy a vzorky z prostredia	23
3.1.2	Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov	23
3.1.3	Chemikálie použité pre izoláciu DNA, PCR, agarózovú gélovú elektroforézu a ostatné chemikálie	24
3.1.4	Prístroje	24
3.2	Uchovávanie mikroorganizmov	25
3.3	Kultivácia mikroorganizmov	25
3.3.1	Kultivačné médiá	25
3.3.2	Príprava tekutých kultúr	27
3.3.3	Príprava kultúr na agarových platniach	27
3.3.4	Odber biomasy a stanovenie podielu sušiny	27
3.3.5	Stanovenie podielu PHA v biomase	27
3.3.6	Farbenie kolónií Nílskou červeňou	27
3.4	Izolácia DNA	28
3.4.1	Príprava lyzačného pufu	28
3.4.2	Izolácia DNA	28
3.4.3	Optimalizácia lyzačnej teploty	28

3.4.4	Stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA.....	29
3.5	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	29
3.5.1	Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBm.....	30
3.5.2	Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBc	30
3.6	Agarózová gélová elektroforéza.....	30
3.6.1	Príprava TBE puftru, agarózového gélu a nanášacieho puftru	30
3.6.2	Detekcia PCR produktov agarózovou gélovou elektroforézou.....	31
3.7	Príprava PCR produktov na sekvenáciu DNA	31
3.8	Vplyv typu média na rast termofilných MO z aktivovaného kalu	32
3.9	Čistenie kultúr z aktivovaného kalu	32
3.9.1	Kultivácia na <i>médiu M2</i>	32
3.9.2	Kultivácia na <i>médiu NB</i>	32
3.9.3	Selekcia producentov farbením kolónií Nílskou červeňou	33
3.10	Sekvenácia génov <i>phaC</i> a <i>16S-rRNA</i>	33
3.11	Hľadanie génov pre iné typy PHA-syntáz.....	34
3.11.1	PHA-syntázy II. triedy	34
3.11.2	PHA-syntázy IV. triedy	34
3.12	Produkcia PHA s vybranými izolátmi.....	34
3.12.1	Výber vhodného uhlíkového zdroja pre kultiváciu a produkciu PHA.....	34
3.12.2	Zopakovanie produkcie PHA s vybranými izolátmi.....	35
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	36
4.1	Optimalizácia lyzačnej teploty	36
4.1.1	Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBm.....	36
4.1.2	Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBc	37
4.2	Vplyv typu média na rast termofilných MO z aktivovaného kalu	37
4.3	Čistenie kultúr z aktivovaného kalu	38
4.3.1	Kultivácia na <i>médiu M2</i>	38
4.3.2	Kultivácia na <i>médiu NB</i>	41
4.3.3	Selekcia producentov farbením kolónií Nílskou červeňou	42
4.4	Sekvenácia génov <i>phaC</i> a <i>16S-rRNA</i>	44
4.5	Hľadanie génov pre iné typy PHA-syntáz.....	45
4.5.1	PHA-syntázy II. triedy	45
4.5.2	PHA-syntázy IV. triedy	45
4.6	Produkcia PHA s vybranými izolátmi.....	46
4.6.1	Výber vhodného uhlíkového zdroja pre kultiváciu a produkciu PHA.....	47
4.6.2	Zopakovanie produkcie PHA s vybranými izolátmi.....	48
5	Záver	50

6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	51
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	57

1 ÚVOD

Syntetické plastové materiály sa globálne vyrábajú a používajú od polovice minulého storočia. Vďaka svojej všestrannosti, variabilite chemicko-fyzikálnych vlastností a veľmi dobrej cenovej dostupnosti dokázali nahradiť väčšinu iných materiálov. Dopyt po plastoch neustále rastie ešte aj dnes, napriek všeobecnému vedomiu o negatívnom dopade na životné prostredie. Masívna produkcia v kombinácii s extrémnou odolnosťou a biologickou nerozložiteľnosťou vyústila do celosvetového problému s hromadením plastového odpadu. Okrem obrovského množstva skládok na pevnine sa odpad hromadí aj v moriach a oceánoch a drobné plastové čiastočky a vlákna znečisťujú i pitnú vodu po celom svete. Odstraňovanie spaľovaním nie je vhodné riešenie, keďže sa tak do ovzdušia uvoľňujú toxické splodiny.

Ideálnym riešením sa zdá byť nahradenie súčasných petrochemických plastov vhodnou alternatívou, ktorá nebude predstavovať riziko pre životné prostredie. Takúto alternatívu by mohla poskytnúť skupina organických biopolymérov – polyhydroxyalkanoáty (PHA). Polyhydroxyalkanoáty sú kompletne syntetizované pomocou mikroorganizmov a na rozdiel od ropných derivátov sa k ich produkcii využívajú obnoviteľné suroviny. Svojimi vlastnosťami sú podobné syntetickým polymérom a vďaka úžasne variabilnej štruktúre je možné ich vlastnosti ďalej upravovať.

Hlavnou výhodou PHA je ich biodegradabilita – pôsobením mikroorganizmov sa dokážu rozložiť v krátkom časovom horizonte. Dalo by sa tak predísť nadmernému hromadeniu odpadov a znečisťovaniu prostredia plastami. Inou atraktívnou vlastnosťou PHA je biokompatibilita, čo umožňuje ich využitie v biomedicínskych aplikáciách.

Prekážkou v širokom uvedení do praxe doposiaľ zostáva ich vysoká cena v porovnaní s plastami syntetickými. Preto je v súčasnosti hlavnou témou výskumu v tejto oblasti znižovanie nákladov na výrobu, pričom sa ponúka viacero možností. Keďže veľkú rolu vo výslednej cene získaného polyméru zohráva použitý substrát, náklady sa dajú významne znížiť voľbou lacného substrátu, ako sú napr. rôzne vedľajšie či odpadné produkty z priemyselných a poľnohospodárskych výrob (lignocelulóзовé odpady, odpadný glycerol, oleje, srvátka, atď). Inou možnosťou je využitie extrémofilných mikroorganizmov, čo ponúka výhody ako napr. zníženie nárokov na celkovú sterilitu procesu a iné. Produkciu polyhydroxyalkanoátov prostredníctvom extrémofilov bola zatiaľ venovaná len malá pozornosť, určite je to však oblasť, ktorá si zaslúži širší prieskum.

Táto práca je venovaná hľadaniu extrémofilných, konkrétne termofilných mikroorganizmov schopných produkcie PHA. K tomuto cieľu bol použitý aktivovaný kal z čističky odpadových vôd, ktorý bol zdrojom termofilných mikroorganizmov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

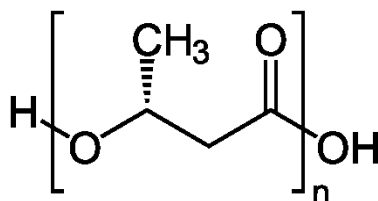
2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Akumulácia plastového odpadu v životnom prostredí je známy celosvetový problém. Plastové materiály na báze ropy v krátkom období nahradili množstvo iných dovtedy používaných materiálov a sú široko využívané v domácnostiach, medicíne či v priemyselných odvetviach. Je tomu tak vďaka ich všestrannosti a trvácnosti.

Podľa súčasných odhadov však dochádza alarmujúcou rýchlosťou k úbytku zásob minerálnych olejov, a preto je namieste uvažovať o obnoviteľných alternatívach. Vážnym dôvodom pre nahradenie produkcie syntetických plastov je ich minimálna rozložiteľnosť. Voči mikrobiálnej degradácii sú mimoriadne odolné. Navyše dochádza k hromadeniu odpadu na skládkach a v moriach. Závažnou skutočnosťou je taktiež fakt, že spaľovaním plastového odpadu sa do prostredia uvoľňujú toxické produkty [1,2].

Vhodnou alternatívou ku konvenčným plastom by mohli byť polyhydroxyalkanoáty, objavené už v dvadsiatych rokoch minulého storočia francúzskym mikrobiológom. Maurice Lemoigne objavil intracelulárne granule poly-3-hydroxybutyrátu produkované Gram-pozitívnou baktériou *Bacillus megaterium* [1]. Polyhydroxyalkanoáty sú úplne degradovateľné na oxid uhličitý a vodu skrz mikrobiálnu mineralizáciu. Syntéza PHA z prírodných obnoviteľných zdrojov navyše umožňuje udržateľný cyklický proces [3].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú skupinou prírodných polymérov, presnejšie lineárnych polyesterov 3,4,5 a 6 – hydroxykyselín (Obrázok 1). Sú syntetizované mnohými baktériami v procese fermentácie cukrov, lipidov, alkánov, alkénov a alkánových kyselín ako intracelulárna zásoba uhlíku a energie [4,5].



Obrázok 1: Štruktúra polyhydroxybutyrátu P(3HB).

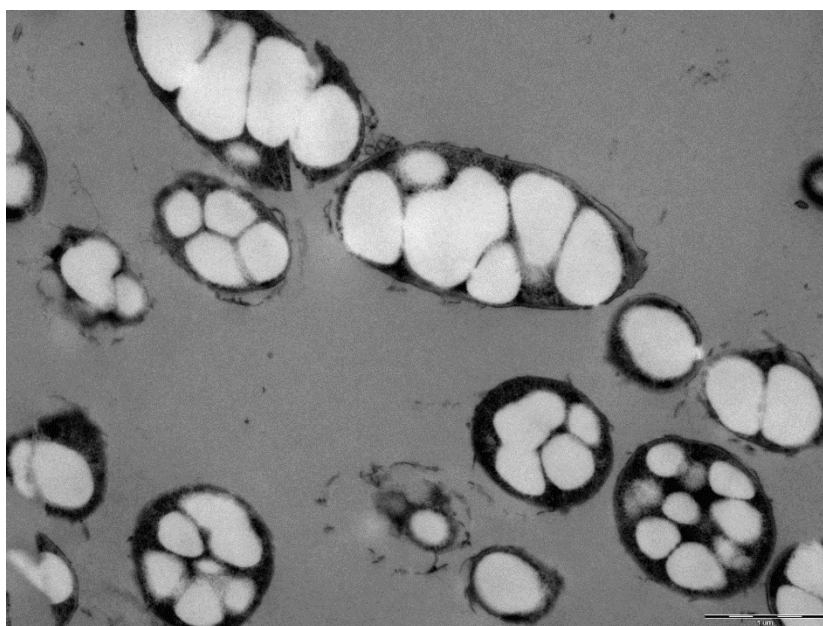
V bakteriálnych bunkách sú prítomné vo forme samostatných cytoplazmatických inklúzií (Obrázok 2) nerozpustných vo vode [4,5]. K ich tvorbe dochádza pri nadbytku zdroja uhlíka a súčasnej limitácii niektorou z esenciálnych živín ako je kyslík, dusík, fosfor, atď. Uhlíkový zdroj je bunkou konvertovaný na hydroxyalkanoátové zlúčeniny a následne polymerizovaný do štruktúr s vysokou molekulovou hmotnosťou. PHA sú výbornou zásobnou látkou, pretože ich prítomnosť v cytoplazme ani vo veľkých množstvách nenarúša osmotický tlak bunky [4].

PHA sú svojimi vlastnosťami veľmi podobné syntetickým plastom a svojou rozmanitosťou a variabilitou v štruktúre predčia iné biodegradabilné polyméry, ako napríklad chemicky syntetizované plasty (kyselina polymliečna), či plasty na báze škrobu. Vďaka svojej biodegradabilite a biokompatibilite je budúcnosť ich využitia napríklad v medicínskych oblastiach sľubná, aj napriek ich nákladnej produkcii [1].

Syntézy polyhydroxyalkanoátov sú schopné mnohé gramnegatívne aj grampozitívne baktérie, napríklad rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Aeromonas*, *Rhodobacter* a niektoré archea, najmä príslušníci čeľade Halobacteriaceae (napr. *Haloferax mediterranei*) [5]. Mikroorganizmy produkujúce PHA sú schopné konvertovať uhlíkové zdroje, ako napríklad glukózu alebo mastné kyseliny na medziprodukty syntézy polyhydroxyalkanoátov [6].

Väčšina baktérií je schopná akumulovať PHA do obsahu okolo 30–50 % sušiny, ale napríklad veľmi dobre známy producent *Cupriavidus necator* dokáže nazhromaždiť PHA až do 90 % svojej sušiny [7].

Na základe počtu uhlíkových atómov v monomérnych jednotkách sa polyhydroxyalkanoáty rozdeľujú na PHA s krátkym reťazcom (*short-chain-length* – scl) obsahujúce 3–5 atómov uhlíka, a so stredne dlhým reťazcom (*medium-chain-length* – mcl), ktoré majú 6–14 uhlíkových atómov [5].



Obrázok 2: PHA granule vnútri mikrobiálnych buniek zobrazené pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie

2.1.1 Kompozícia a fyzikálno-chemické vlastnosti PHA

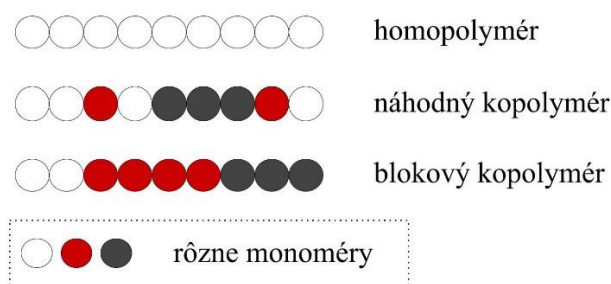
Prvou pozorovanou formou PHA bol homopolymér poly-3-hydroxybutyrát P(3HB). Nenachádza sa len v mikroorganizmoch ako zásobná látka, ale je pomerne rozšírený v celej prírode. Nízkomolekulárne oligoméry (120–200 monomérnych jednotiek) boli nájdené aj v rastlinných, živočíšnych a dokonca ľudských telách. Vo viacerých prípadoch bola táto forma P(3HB) objavená v bunkových membránach ako komplex s polyfosfátmi, slúžiaci zrejme ako iónový prenášač [8].

Izolovaný P(3HB) vykazuje 50–80% kryštalickosť, kým jeho inklúzie vnútri buniek majú amorfný charakter a sú nerozpustné vo vode [7]. Teplota skleného prechodu P(3HB) leží v rozmedzí 4–9 °C a teplota topenia je 173–180 °C. Polymér sa rozkladá pri teplote okolo 200 °C, čo je blízko teploty topenia. V pevnom, kryštalickom stave tvorí pravotočivý hélix a táto konformácia zostáva zachovaná aj v roztoku chloroformu [8]. Hustota kryštalického P(3HB) je 1,26 g·cm⁻³, v amorfnom stave 1,18 g·cm⁻³. Mechanické vlastnosti sú veľmi podobné

izotaktickému polypropylénu: Youngov modul 3,5 GPa a pevnosť v ťahu 43 MPa. Podstatne nižšia je však rozťažnosť, ktorá je u homopolyméru P(3HB) len okolo 3 %. Pre porovnanie, rozťažnosť polypropylénu je 400 %. Čistý homopolymér P(3HB) je krehký a málo elastický, čo obmedzuje jeho využitie [7–9].

Polyhydroxyalkanoáty sú v skutočnosti veľmi širokou skupinou polymérov, ktorých vlastnosti závisia na ich variabilnej štruktúre. V roku 1995 už bolo známych 91 rôznych hydroxyalkánových kyselín ako monomérov PHA [10]. Diverzita bola ďalej rozširovaná a boli rozlišované štruktúry ako homopolyméry, náhodné kopolyméry, blokové kopolyméry, blokovo-náhodné kopolyméry, funkčné polyméry, štepne polyméry, tiopolyestery a iné. Táto variabilita je daná odlišnými druhmi baktérií, ktoré majú odlišné typy PHA-syntáz, odlišné nároky na substrát a možno aj odlišné metabolické dráhy [11]. Zabudovanie iných monomérnych jednotiek do reťazca P(3HB) výrazne zlepšuje jeho mechanické vlastnosti. Je tak možné získať široký výber polyesterov s rozličnými vlastnosťami, od vysoko kryštalických plastov až po elastické gumeny [9]. Zabudovanie inej hydroxyalkánovej kyseliny do reťazca polyméru závisí na dostupnom uhlíkovom zdroji. Kopolymér P(3HB-co-3HV) má v porovnaní s P(3HB) dve veľké výhody: nižšiu teplotu topenia a úroveň kryštalickosti. Fyzikálne vlastnosti kopolyméru závisia na zastúpení 3-hydroxyvalerátu (3HV) v molekule. Pri vyšších podieloch 3HV je jemnejší a elastickejší [9].

Obrázok 3 znázorňuje schematické znázornenie rozdielu v usporiadaní monomérov v homopolyméroch, náhodných kopolyméroch a blokových kopolyméroch PHA.



Obrázok 3: Schéma štruktúrneho zloženia homopolyméru, náhodného a blokového kopolyméru PHA

Blokové kopolyméry pozostávajú z polymérnych reťazcov obsahujúcich dve a viac samostatných polymérnych oblastí (blokov). Tieto oblasti sú navzájom viazané kovalentnou väzbou. Výsledná štruktúra potom zahŕňa vlastnosti každého bloku a získava tak nové vlastnosti, ktoré sa nedajú dosiahnuť jednoduchým zmiešaním polymérov [12].

Príklady blokových kopolymérov PHA, produkčné mikroorganizmy a využívané zdroje uhlíka uvádza *Tabuľka 1*.

Tabuľka 1: Príklady blokových kopolymérov PHA s priradeným produkujúcim mikroorganizmom a uhlíkovým zdrojom.

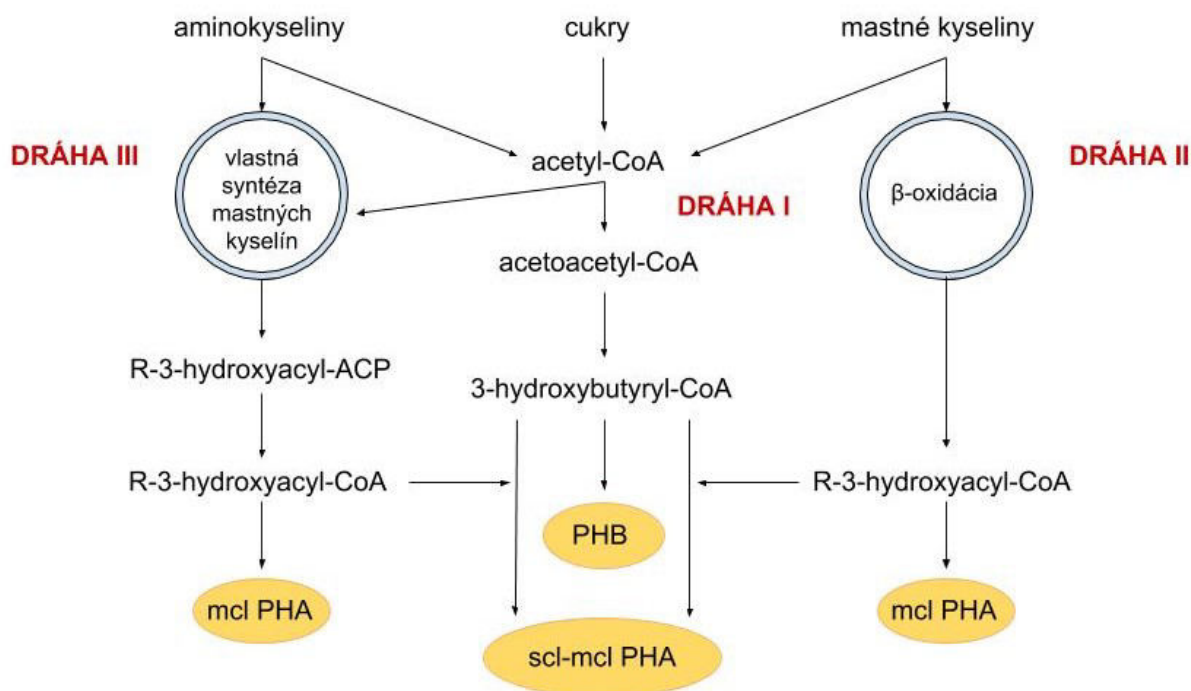
blokový kopolymér	mikroorganizmus	zdroj uhlíka	literárny zdroj
P(3HB- <i>b</i> -3HV)	<i>Cupriavidus necator</i>	fruktóza a kyselina pentánová	[13]
P(3HB- <i>b</i> -4HB)	<i>Pseudomonas putida</i>	butyrát sodný a gama-butyrolaktón	[14]
P(3HP- <i>b</i> -4HB)	<i>Escherichia coli</i>	1,3-propándiol a 1,4-butándiol	[15]
P(3HB- <i>b</i> -3HHx)	<i>Pseudomonas putida</i>	butyrát sodný a hexanoát sodný	[16]
P(3HB- <i>b</i> -3HP)	<i>Escherichia coli</i>	fruktóza a glycerol	[13]

2.1.2 Biosyntéza

Štruktúra PHA, ktoré sa v bunke akumulujú, je vo veľkej miere závislá na využívanom zdroji uhlíka. Tieto zdroje môžeme rozdeliť na tie, ktoré sú s PHA štruktúrne príbuzné (napr. masné kyseliny, ktoré majú podobnú štruktúru ako hydroxyalkánové kyseliny) a štruktúrne nepríbuzné (glukóza) [17].

Za konečnú štruktúru polyméru zodpovedá konkrétna metabolická dráha biosyntézy PHA. Všeobecne sa rozlišujú tri základné metabolické dráhy, ktoré môžu byť ďalej upravované metódami génového inžinierstva na minimálne 12 dráh, ktoré vedú k syntéze rôznych polyhydroxyalkanoátov [17].

Kľúčovú rolu v biosyntéze zohráva acetyl-koenzým A, ktorý je ďalej enzymaticky prevádzaný na 3-hydroxyalkanoyl-CoA o rôznych dĺžkach reťazca ako substrát pre PHA-syntázy. 3-hydroxyalkanoyl-CoA môže byť dodávaný taktiež z β -oxidácie masných kyselín. Do syntézy PHA sú priamo alebo nepriamo zapojené viaceré gény kódujúce rôzne enzýmy [18]. Schematické znázornenie troch hlavných metabolických dráh vedúcich k tvorbe PHA zobrazuje *Obrázok 4*.



Obrázok 4: 3 hlavné metabolické dráhy syntézy PHA [17].

Prvá dráha zahŕňa tri kľúčové enzýmy: β -ketothiolázu, NADPH-dependentnú acetyl-CoA-reduktázu a PHA-syntázu kódované génmi *phaA*, *phaB* a *phaC* [18]. β -ketothioláza konvertuje dva acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA, ktorý je druhým enzýmom transformovaný na hydroxybutyryl-CoA a následne pomocou PHA-syntázy polymerizovaný do štruktúry polyhydroxybutyrátu. Typickým zástupcom tejto dráhy je baktéria *Cupriavidus necator* (iným menom *Ralstonia eutropha*), ktorá disponuje scl PHA-syntázou [17].

Druhá dráha syntézy PHA je spájaná s mikrobiálnym príjmom mastných kyselín. Po β -oxidácii mastných kyselín acetyl-CoA vstupuje do procesu syntézy monomérov PHA [18]. Pomocou enzýmu R-3-hydroxyacyl-CoA-hydratázy je enoyl-CoA vznikajúci v β -oxidácii prevedený na R-3-hydroxyacyl-CoA, a ten je prekurzorom polymerizácie mcl PHA. Polymerizáciu zabezpečuje mcl PHA-syntáza. Túto dráhu je možné pozorovať napríklad u *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* a *Pseudomonas aeruginosa* [17].

Tretia dráha vychádza z *in situ* syntézy mastných kyselín. Tento cyklus poskytuje na syntézu PHA R-3-hydroxyacyl-ACP. Kľúčovým enzýmom je 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transferáza, ktorá prevádza 3-hydroxyacyl-ACP opäť na 3-hydroxyacyl-CoA. Ukázalo sa, že vlastná syntéza mastných kyselín a β -oxidácia môžu prebiehať nezávisle na sebe k doplneniu prekurzorov pre syntézu PHA [17].

2.1.3 PHA-syntázy

PHA-syntáza je enzým zodpovedný za syntézu PHA. Presnejšie, katalyzuje polymerizáciu CoA-tioesterov hydroxykyselín do polymérov PHA. Gén kódujúci PHA-syntázu je označovaný *phaC*. Zvyčajne býva súčasťou zhluku ďalších génov zapojených do syntézy PHA, ako sú napríklad *phaA* (β -ketothioláza), *phaB* (acetoacetyl-CoA-reduktáza), *phaG* (3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transferáza), *phaJ* (enoyl-CoA-hydratáza) a iné [19].

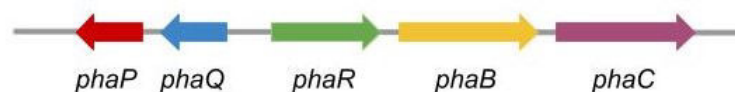
PHA-syntázy sa rozdeľujú do štyroch tried na základe kompozície ich podjednotiek a substrátovej špecificity. Syntázy tried I a II pozostávajú z jednej podjednotky (phaC), kým syntázy tried III a IV k svojej aktivite vyžadujú okrem podjednotky phaC prítomnosť podjednotiek phaE a phaR [20].

Syntázy triedy I uprednostňujú scl hydroxykyseliny s hydroxyskupinou na uhlíku C3 alebo C4 ako monoméry, avšak pri určitých podmienkach dokážu rozpoznať aj mcl hydroxykyseliny. Napríklad, keď ako zdroj uhlíka slúžia masné kyseliny s párnym počtom uhlíkov v reťazci, dochádza k akumulácii P(3HB-co-3HHx), a keď sú ako zdroj uhlíka využívané masné kyseliny s nepárnym reťazcom, vzniká P(3HB-co-3HV). Typickým predstaviteľom, ktorý disponuje PHA-syntázou triedy I je baktéria *Cupriavidus necator*, ďalej napríklad príslušníci rodu *Agrobacterium*. Gén kódujúci PHA-syntázu triedy I je označovaný *phaC* [19,21].

PHA-syntázy triedy II polymerizujú najmä tioestery-CoA mcl monomérov, pozostávajúcich zo 6–12 atómov uhlíka. Tie vznikajú pri β -oxidácii alebo pri syntéze masných kyselín *de novo*. PHA-syntázy II. triedy sa typicky vyskytujú u baktérií rodu *Pseudomonas* [19]. PHA-syntázy triedy II sú kódované génmi *phaC1* a *phaC2* [6,21].

Syntázy triedy III sú heterodiméry pozostávajúce z podjednotiek phaC a phaE, kódovaných génmi *phaC* a *phaE*. Táto trieda syntáz sa nachádza napríklad u baktérie *Allochromatium vinosum*, ale typickými predstaviteľmi sú príslušníci domény archea, konkrétne rody *Haloferax* a *Haloarcula* [6,19].

PHA-syntázy triedy IV boli objavené ako posledné, pri skúmaní týchto enzýmov u baktérie *Bacillus megaterium* [20]. Taktiež pozostávajú z dvoch podjednotiek: phaC a phaR, ktoré kódujú gény *phaC* a *phaR* [6]. V roku 2005 bolo navrhnuté, že génové sekvencie pre IV. triedu PHA-syntáz by mali byť rozdelené do minimálne dvoch podskupín, na základe rozsahu sekvenčných zhôd nukleových kyselín, a to na: podskupinu typu *B. megaterium* (zahŕňajúcu *B. sphaericus*, *B. circulans* a *B. brevis*) a podskupinu typu *B. cereus* (zahŕňajúcu *B. anthracis*, *B. thuringiensis* a *Bacillus* sp. INT005) [22]. U *B. megaterium* je génový klaster (Obrázok 5) dlhý 4 104 párov báz a obsahuje 5 *pha* génov zodpovedných za syntézu PHA: *phaP*, *phaQ*, *phaR*, *phaB* a *phaC* [23].



Obrázok 5: Znáznornenie usporiadania génového klastera baktérie *B. megaterium* [23].

Gén *phaB* kóduje acetoacetyl-CoA-reduktázu, ktorá posúva hydroxybutyryl-CoA PHA-syntáze. PhaQ je proteín viažuci sa na DNA, čo spôsobuje represiu jeho vlastnej syntézy. Vyprodukovaný PHB sa viaže na phaQ, čím odstráni represiu transkripcie génov *phaQ* a *phaP* [23]. PhaP je označenie pre phasin, amfifilný proteín, ktorý sa viaže na povrch PHA granule. Phasiny tak vytvárajú akési medzifázové rozhranie medzi cytoplazmou a hydrofóbnymi granulami PHA a zabraňujú tak koalescencii jednotlivých granúl [24].

2.1.4 Využitie PHA

Vlastnosti ako biodegradabilita, termoplasticita, biokompatibilita a netoxickosť robia z polyhydroxyalkanoátov skvelých kandidátov na náhradu za petrochemické plasty. Spočiatku boli PHA využívané hlavne ako obalové materiály pre kozmetiku a čistiace prostriedky, alebo ako surovina pre výrobu latexových náterov. Ďalším bolo ich využitie ako nosičov pre dlhodobé uvoľňovanie pesticídov a insekticídov v agrochemickom priemysle [2].

Súčasným trendom je však využitie PHA v biomedicínskych aplikáciách, a to vďaka spomínaným vlastnostiam. Najväčšia pozornosť je v tejto oblasti venovaná homopolyméru P(3HB) a kopolyméru P(3HB-co-3HV). Momentálne sa zvažujú ako materiály pre zhotovovanie kardiovaskulárnych produktov ako srdcových chlopní či cievnych štepov. Ďalšie možnosti poskytujú vo sfére prenosu liečiv, kde môžu slúžiť ako tablety alebo mikronosiče pre liečbu nádorových ochorení. Pri ošetrovaní zranení nájdu uplatnenie ako stehy, tampóny, svorky, a iné. V ortopédii ako kostné platničky. Vďaka vysokej imunotolerancii sú využiteľné v tkanivovom inžinierstve [2].

Polyhydroxyalkanoáty sú sľubnými biomateriálmi aj v oblasti farmácie. 3-hydroxyalkánové kyseliny sú využiteľné ako prekursori pre syntézu chemikálií s pridanou hodnotou, ako sú farmaceutiká, antibiotiká, potravinárske aditíva, arómy a vitamíny [2,25]. Ukázalo sa, že čistý mcl homopolymér kyselina 3-hydroxyoktánová vykazuje potenciálnu antimikrobiálnu aktivitu [26]. V súčasnosti sa skúmajú možnosti využitia PHA na enkapsuláciu liečiv, najmä protinádorového charakteru. Do kopolyméru P(3HB-co-3HV) bolo úspešne enkapsulované modelové protirakovinové liečivo ellipticin. Potvrdilo sa tak zvýšenie cytotoxického efektu ellipticinu so zvýšením jeho biologickej dostupnosti [2,27]. Rovnaký kopolymér bol použitý aj ako nosič hydrofóbneho fotosenzibilizátoru k liečbe rakoviny. Takéto nanočastice vykazujú vysokú fototoxicitu k určitému typu nádorových buniek a PHA tak môžu byť atraktívnym biopolymérom vo fotodynamickej terapii [2,28].

Mikrobiálna biosyntéza bioplastov vyžaduje technickú životaschopnosť a uskutočniteľnosť už tak náročnej produkcie. Zatiaľ čo je vyrábaná široká škála polyhydroxyalkanoátov s rôznymi charakteristikami, ich produkcia je stále nízka a náklady vysoké v porovnaní so syntetickými plastmi. Táto skutočnosť zatiaľ zostáva prekážkou v ich širokom priemyselnom využití [1].

2.1.5 Možnosti zníženia produkčných nákladov

Aby sa polyhydroxyalkanoáty mohli stať ekonomicky atraktívnou alternatívou k materiálom na báze ropy, je nutné zabezpečiť zníženie ich produkčných nákladov. S týmto zámerom bolo v laboratórnom meradle navrhnutých viacero riešení. Jednou z najslubnejších možností je využitie vedľajších a odpadných produktov z priemyselných výrob, ako napríklad poľnohospodárskych surovín, odpadných rastlinných olejov či odpadových vôd ako zdrojov uhlíka pre mikrobiálnu produkciu [29].

Súčasná produkcia PHA je realizovaná prostredníctvom čistých kultúr (napríklad *Cupriavidus necator* alebo geneticky upravená *Escherichia coli*). Avšak produkcia s využitím zmiešaných kultúr umožňuje využitie komplexných odpadných substrátov, čo výrazne znižuje náklady na substrát. Príkladom zmiešanej kultúry je aktivovaný kal používaný v zariadeniach na čistenie odpadových vôd. Ďalšou výhodou využívania zmiešaných kultúr je znížená potreba aseptickosti procesu, keďže sa nejedná o kultiváciu čistej kultúry [30,31].

Inou možnosťou je využitie extrémofilných mikroorganizmov. Ich zapojenie do procesu poskytuje viaceré výhody. Pri fermentácii za zvýšených teplôt napríklad dochádza k zvýšeniu reakčných rýchlostí, rýchlosti difúzie, ionizácie či rozpustnosti látok. V takýchto podmienkach sa navyše výrazne znižuje riziko kontaminácie a klesajú aj náklady na chladiace a zahrievacie procesy [3].

2.2 Extrémofilné mikroorganizmy

Už z pomenovania vyplýva, že sa jedná o organizmy prosperujúce v drsných, extrémnych podmienkach. V prostredí, v ktorých iné organizmy nie sú schopné prežitia. Extrémofily sú taxonomicky širokou skupinou. Podľa typu extrémnych podmienok, v ktorých sa vyskytujú, je možné rozlíšiť termofily, psychrofilny, acidofily, alkalofily, halofily, barofily, metalofily a rádiofilny. Ich stratégia prežitia v nepriaznivých podmienkach spočíva v produkcii extrémofilných enzýmov (extrémozým) a protektívnych organických biomolekúl (extrémolytov) [32].

Termofily sú organizmy, ktorých optimálna teplota pre rast je v rozmedzí 60–80 °C. Organizmy s optimálnou teplotou rastu vyššou ako 80 °C sa potom označujú ako hypertermofilné. Príkladom hypertermofilov sú príslušníci rodu *Pyrolobus* [33].

Výskyt termofilných mikroorganizmov bol pozorovaný v horúcich prameňoch (Obrázok 6), hlbokomorských hydrotermálnych prúdoch, vo vulkanickom prostredí, kompostoch či na púštiach [34]. Aby mohli v takýchto podmienkach prežiť, musia mať vyvinuté mechanizmy chrániace najcitlivejšie komponenty bunky, ako sú nukleové kyseliny, proteíny a lipidy. Nukleové kyseliny bežne podliehajú denaturácii už pri teplotách nad 70 °C. V extrémnych teplotách je DNA stabilizovaná pomocou jednomocných a dvojmocných solí, ktoré zatiaňujú negatívne náboje fosfátových skupín. KCl a MgCl₂ navyše chránia DNA od depurinácie a hydrolýzy. Ribozomálna a transferová RNA môže byť stabilnejšia vďaka vyššiemu podielu nukleotidových párov G–C. Tie sú od A–T párov stabilnejšie vďaka prítomnosti tretej vodíkovej väzby. V DNA termofilných prokaryot nebol zistený vyšší podiel párov G–C, jej stabilita sa pripisuje enzýmu DNA-topoizomérase, ktorá katalyzuje nadšróbovicové vinutie DNA [35].

Termofilné proteíny sú stabilizované pomocou viacerých mechanizmov. Medzi ne patrí zvýšený počet kovalentných a nekovalentných interakcií v rámci podjednotiek, ako aj medzi nimi, efektívne zbaľovanie, nižšia povrchová hydrofóbcita, vyšší podiel sekundárnych štruktúr, menej a kratšie povrchové slučky, viac väzbových miest pre kovy a aminokyselinové zloženie [36].

Taktiež lipidy sú citlivé na teplotu. Vyššie teploty spôsobujú zvyšovanie fluidity bunkových membrán. Na udržanie optimálnej fluidity membrán musí mať bunka prispôsobenú kompozíciu z hľadiska množstva a typu lipidov, napríklad pomer a rozmiestnenie nasýtených a nenasýtených mastných kyselín. Vyšší podiel nasýtených nerozvetvených mastných kyselín, zvýšený obsah fosfolipidov a silnejšie hydrofóbne interakcie znižujú membránovú fluiditu. Dôležitý je aj pomer fosfatidyletanolamínu a fosfatidylcholínu [35,37].



Obrázok 6: Horúce pramene v Yellowstonskom národnom parku [38].

Halofilné mikroorganizmy sa vyskytujú v prostrediach s vysokým obsahom solí, napríklad v soľných jazerách. Bunky za normálnych okolností v tak vysokých koncentráciách solí uhynú kvôli strate vody v dôsledku osmotického toku. Halofily sa s týmto javom vysporiadávajú tak, že vo svojej cytoplazme uchovávajú vyššie množstvo rozpustených látok, než sa nachádza v okolitom prostredí [32,39]. Kľúčovým je teda zachovanie osmotickej rovnováhy. Halofilné mikroorganizmy využívajú dve základné stratégie k udržaniu osmotickej rovnováhy [40].

Prvá stratégia – akumulácia intracelulárnych iónov – spočíva v hromadení sodných a draselných iónov. Vysoká koncentrácia intracelulárnych iónov si vyžaduje adaptáciu enzymatického systému. Proteíny halofilných mikroorganizmov obsahujú vyšší podiel kyslých aminokyselín, a sú tak schopné udržiavať si svoju konformáciu a aktivitu v prostredí s koncentráciou solí blízku saturácii [40]. Druhou stratégiou je akumulácia osmolytov, teda nízkomolekulárnych zlúčenín s osmotickým potenciálom. Tieto látky vyrovnávajú osmotický tlak, a umožňujú tak fungovanie aj bunkám s obyčajnými proteínmi a enzýmami. Najčastejšími osmolytmi, ktoré mikroorganizmy využívajú, sú cukry, glycín betaín, tetrahydropyrimidíny alebo α -aminokyseliny ako prolín či glutamín. Všetky sú vysoko polárne [41,42].

V doméne archea je možné nájsť mnoho zástupcov halofilov. Zaraďujú sa do spoločnej čeľade *Halobacteriaceae*. Väčšina z nich potrebuje pre svoj rast a zachovanie integrity buniek koncentráciu solí okolo 1,5 M NaCl. Vo vodnom prostredí blízko bodu saturácie prevažujú rody *Haloarcula*, *Halobacterium* a *Halorubrum*. Väčšina halobaktérií je sfarbená červeno alebo oranžovo v dôsledku prítomnosti karotenoidov. Druhy, ktoré v cytoplazmatickej membráne obsahujú farbivo baktériorodopsín, bývajú sfarbené fialovo. Halofilné baktérie je možné nájsť v antarktických jazerách či v soľných pôdach. Ich zástupcovia sa vyskytujú v rodoch *Halomonas*, *Bacillus*, *Salinococcus*, *Marinococcus* a iných [41].

Acidofily sú prispôsobené životu v podmienkach s nízkym pH (pH<5), a k tomu často disponujú adaptáciou aj na vysoké teploty, vysokú salinitu či koncentráciu ťažkých kovov. Tieto podmienky sa totiž často vyskytujú spolu na jednom mieste. Príkladom takého prostredia je odpad z ťažby uhlia alebo niektoré horúce pramene. Acidofily nedokážu tolerovať takto nízke pH vo vnútri svojich buniek, kde by zničilo dôležité komponenty, ale sú schopné udržiavať kyseliny mimo buniek.

Alkalofilom sa darí v zásaditom prostredí, ako sú napríklad pôdy bohaté na uhličitany alebo takzvané sódové jazerá, a často sú zároveň halofilnými organizmami.

Rádiofilny sú schopné prežiť v prostredí s vysokým oxidačným stresom a radiačným žiarením vďaka schopnosti opravovať rozsiahle poškodenia DNA.

V hĺbkach pod morskou hladinou i pod pevninou sa nachádzajú barofilné mikroorganizmy. Táto skupina extrémofilov produkujúcich polynenasýtené mastné kyseliny vytvára multimérne a antioxidačné proteíny, ktoré im umožňujú prežiť pod extrémne vysokým hydrostatickým tlakom. Väčšina barofilov patrí k psychrofilným Gram-negatívnym baktériám a k archeám [32,39].

2.2.1 Využitie extrémofilov v biotechnologickom priemysle

Záujem o využitie extrémofilných mikroorganizmov v biotechnologických procesoch je čoraz väčší. Jednou z oblastí záujmu sú ich enzýmy nazývané extrémozýmy. Extrémozýmy si vyvinuli molekulárne mechanizmy k adaptácii na extrémne fyzikálno-chemické podmienky. Vďaka tomu nachádzajú využitie ako biokatalyzátory v priemyselných biotransformačných procesoch. Poskytujú vysokú stabilitu a znižujú riziko kontaminácie svojich producentov [39]. Enzýmy z psychrofilných a termofilných mikroorganizmov sú aktívne v rozmedzí teplôt, v ktorých už klasické enzýmy aktivitu nevykazujú. Okrem toho je pre ne typická zvýšená tolerancia k rozpúšťadlu a stabilita. Vďaka týmto unikátnym vlastnostiam sú termozýmy veľmi cennými nástrojmi pre biotechnológie [34].

Alkalofilné extrémozýmy, konkrétne proteázy a lipázy nachádzajú uplatnenie v detergentoch, ktoré majú obvykle vysoké pH. Naopak, enzýmy acidofilných organizmov dokážu fungovať v extrémne kyslom prostredí. Sú teda schopné katalyzovať napríklad syntézu zlúčenín v kyslých roztokoch. Používajú sa aj ako aditíva do potravy pre zvieratá, pričom majú zostať aktívne v prostredí tráviaceho systému. Špeciálnou vlastnosťou halofilných enzýmov je ich stabilita a schopnosť katalýzy v prostredí s nízkou vodnou aktivitou, napríklad v prítomnosti organických rozpúšťadiel. Lipázy halofilov majú široké využitie, zahŕňajúce produkciu polynenasýtených mastných kyselín v potravinárskom priemysle alebo výrobu bionafty [32,34].

Iným využitím extrémofilov je bioremediácia toxických látok a ťažkých kovov. Niektoré druhy baktérií majú fyziológiu vhodnú na precipitáciu a imobilizáciu kovov. Metabolické procesy takýchto baktérií vedú k vzniku sulfánu a sulfidov železa, a následne k tvorbe minerálov. Tieto minerály sú schopné reagovať s ťažkými kovmi za vzniku zrazenín [32,39].

Ďalším významným bodom je produkcia biopolymérov: biosurfaktantov, exopolysacharidov a bioplastov. Biosurfaktanty sú užitočné pri čistení pôdy a vody kontaminovaných olejmi. Znižovaním povrchového napätia zvyšujú rozpustnosť olejov a urýchľujú tak ich degradáciu. Halofilné mikroorganizmy sú z tohto hľadiska využiteľné napríklad pri bioremediácii morskej vody znečistenej olejmi.

Extrémofilné organizmy majú veľký potenciál aj pri produkcii polyhydroxyalkanoátov. Ich zapojenie do výroby dokáže zjednodušiť niektoré kroky biotechnologického procesu. Pri produkcii PHA halofilmi je možné jednoducho uvoľniť produkt z biomasy tak, že sa vystavia nízkej koncentrácii solí, čo spôsobí lýzu buniek [23]. Hlavnými výhodami halofilov z hľadiska

biotechnologického využitia je nízka náročnosť fermentačného procesu a taktiež nízke nároky na aseptické podmienky [41].

O termofilné baktérie je z hľadiska priemyselných procesov veľký záujem, pretože fermentácia za zvýšených teplôt má niekoľko významných výhod. Medzi ne patria napríklad vyššia rýchlosť difúzie, ionizácie a rozpúšťania látok. Veľkou výhodou je zníženie rizika kontaminácie a celkové zníženie nákladov na chladenie a zahrievanie procesu. V priemysle sa využívajú napríklad hypertermofily rodu *Sulfolobales*, a to pri biolúhovaní sulfidických rúd a pri odsírovaní uhlia. Druhy redukujúce sulfity sa používajú na odsírovanie priemyslových odpadných plynov [41].

2.3 Vybrané termofily produkujúce PHA

2.3.1 *Thermus thermophilus*

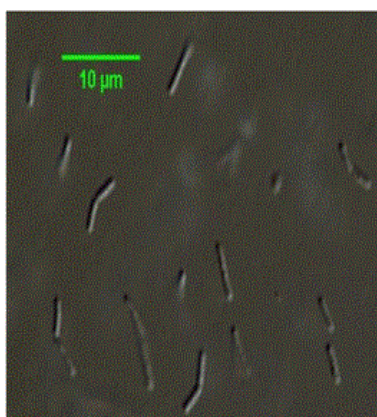
Thermus thermophilus je termofilná baktéria vyskytujúca sa v horúcich prameňoch s neutrálnym až zásaditým pH, v teplej vode alebo v prírodných vodách vystavených tepelnému znečisteniu. *T. thermophilus* a príbuzné druhy rastú v rozmedzí teplôt 50–85 °C, pričom optimálna teplota rastu je 70 °C [43].

Tvorba PHA bola sledovaná s využitím glukonátu sodného a oktanoátu sodného ako samostatných zdrojov uhlíka. Pri kultivácii s glukonátom sodným bol dosiahnutý obsah PHA 35 % sušiny biomasy. Získaný polyester pozostával hlavne z 3-hydroxydekanoátu (64 mol. %), ďalej z 3-hydroxyoktanoátu, 3-hydroxyvalerátu a 3-hydroxybutyrátu. Keď uhlíkový zdroj tvoril oktanoát sodný, najvyšší obsah PHA bol 40 % a získaný polymér pozostával z 35,4 mol. % 3-hydroxyundekanoátu, 24,5 mol. % 3-hydroxybutyrátu, ďalej z 3-hydroxydekanoátu, 3-hydroxynonanoátu, 3-hydroxydodekanoátu a 3-hydroxyoktanoátu [44].

T. thermophilus je výborným kandidátom na tvorbu PHA najmä vďaka schopnosti produkovať kopolyméry pozostávajúce z scl a mcl monomérov, a to za využitia rôznych zdrojov uhlíka. Bola potvrdená jeho schopnosť využívať k produkcii PHA srvátku ako nízkonákladový zdroj uhlíka. Pri kultivácii na médiu s 24% obsahom srvátky bola dosiahnutá akumulácia PHA do 34 % hmotnosti biomasy. Z hľadiska kompozície sa jednalo o heteropolymér pozostávajúci z scl 3-hydroxyvalerátu (38 mol. %) a mcl 3-hydroxyheptanoátu (9,89 mol. %), 3-hydroxynonanoátu (16,59 mol. %) a 3-hydroxyundekanoátu (35,42 mol. %) [45].

2.3.2 *Chelatococcus daeguensis* TAD1

Chelatococcus daeguensis TAD1 (Obrázok 7) je termofilná aeróbna baktéria tyčinkovitého tvaru, nedávno izolovaná z biofilmu biofiltru slúžiaceho k odstraňovaniu oxidov dusíka v uhoľnej elektrárni [46]. Jej schopnosť akumulovať P(3HB) bola skúmaná s využitím glycerolu ako samostatného zdroja uhlíku. V dvojstupňovej fed-batch kultivácii pri 50 °C bol v 40. hodine dosiahnutý obsah P(3HB) v sušine biomasy 68,3 %. Koncentrácia P(3HB) v médiu činila 17,4 g/l. Ukázalo sa tak, že *C. daeguensis* TAD1 by mohol byť jednou z možností na ceste k zníženiu produkčných nákladov výroby PHA, a to vďaka svojej termofilnej povahe a schopnosti utilizovať glycerol – nízkonákladovú surovinu vznikajúcu ako vedľajší alebo odpadný priemyselný produkt. [47]



Obrázok 7: *Chelatococcus daeguensis* TAD1 pozorovaný pomocou svetelnej mikroskopie s fázovým kontrastom [47].

2.3.3 *Caldimonas taiwanensis*

Caldimonas taiwanensis je termofilná baktéria izolovaná z horúceho prameňa v južnom Taiwane. Je schopná produkcie PHA, k čomu dokáže využívať škrob. Ten je taktiež považovaný za ekonomicky výhodný zdroj uhlíku, keďže je to hojne sa vyskytujúca a veľmi ľahko obnoviteľná surovina. Vďaka svojej enzymatickej výbave je *C. taiwanensis* schopný utilizovať škrob bez nutnosti predchádzajúcej hydrolýzy. Navyše dokáže do polyméru P(3HB) inkorporovať 3-hydroxyvalerát. Táto skutočnosť bola skúmaná pri kultivácii na glukonáte a valeráte alebo škrobe a valeráte ako zmiešaných uhlíkových zdrojoch pri teplote 50 °C. Podiel 3HV môže tvoriť 10–95 mol. %, v závislosti na koncentrácii pridaného valerátu. Valerát síce so zvyšujúcou sa koncentráciou zvyšoval inhibičný vplyv na rast biomasy i na tvorbu PHA, to sa však podarilo do určitej miery vykompenzovať prídavkom kvasničného extraktu. Pri využití glukonátu a valerátu ako uhlíkového zdroja bol dosiahnutý obsah PHA 51 % sušiny biomasy a podiel 3HV v polymére P(3HB-co-3HV) 51 %. Keď ako zmiešaný zdroj uhlíku slúžil škrob a valerát, obsah PHA bol 67 % sušiny a podiel 3HV činil 13 % [48].

2.4 Aktivovaný kal

Základnými krokmi pri čistení odpadových vôd uskutočňovanými pomocou mikroorganizmov sú odstraňovanie dusíka a fosforu. Je nutné, aby bol dusík pri čistení odpadovej vody v čo najvyššej miere odstránený, pretože prispieva k eutrofizácii vody a toxicita amoniaku a dusitanov predstavuje vážnu hrozbu pre vodný život. Eliminácia dusíka prostredníctvom mikroorganizmov zahŕňa tri hlavné kroky: nitrifikáciu, denitrifikáciu a anaeróbnu oxidáciu amoniaku. Nitrifikácia je uskutočňovaná postupne chemolitotrofnými baktériami oxidujúcimi amoniak a baktériami oxidujúcimi dusitany. K baktériám oxidujúcim amoniak, vyskytujúcim sa v nitrifikátoroch patria *Nitrosococcus mobilis* a *Nitrosomonas europaea*. Dusitany sú zase oxidované rodmi *Nitrospira*, *Nitrobacter* a inými [49]. Prostredníctvom anaeróbnej oxidácie amoniaku sú amoniak a dusitany spájané rovno do plynného dusíku, a to pôsobením členov kmeňa *Planctomycetes*. Odstraňovanie fosforu je zabezpečované organizmami, ktoré sú schopné intracelulárnej akumulácie polyfosfátu. Tieto organizmy sú vyselektované počas postupných anaeróbných a aeróbných fáz. Okrem polyfosfát-akumulujúcich organizmov sa tu nachádzajú aj organizmy akumulujúce glykogén. Medzi týmito druhmi prebieha vzájomná kompetícia o zdroj uhlíka [50].



Obrázok 8: Aerovaná nádrž s aktivovaným kalom [51].

Pri čistení odpadových vôd sú rozpustené organické látky prevedené do formy jemných, vysoko hydratovaných vločiek (aktivovaný kal). Tieto vločky pozostávajú z neživých častíc (molekulové fragmenty rozkladajúcej sa organickej hmoty a pevné častičky) a zo zhlukov mikroorganizmov. Z baktérii sa tu za aeróbnych podmienok vyskytujú primárne heterotrofné fakultatívne organizmy. Na vonkajšej strane vločiek sa vytvára lepkavá vrstva tvorená extracelulárnymi polymérnymi látkami, ktorá baktériám umožňuje adherovať na povrch a zároveň im poskytuje ochrannú bariéru. Za túto vrstvu sú majoritne zodpovedné rody *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Klebsiella*. Taktiež baktérie rodu *Zoogloea* vytvárajú vysoko hydratované agregáty. Majú však formu rozvetvených vlákien vykazujúcich želatínovú štruktúru [52]. Fotografia nádrže s aktivovaným kalom zobrazuje Obrázok 8.

2.4.1 Aktivovaný kal a PHA

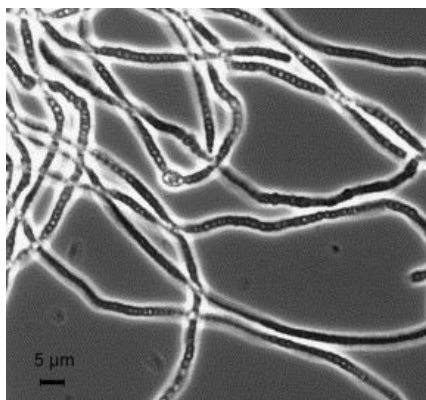
Aktivovaný kal používaný v čističkách odpadových vôd bol už viackrát skúmaný z hľadiska produkcie PHA. Obsahuje totiž mikroorganizmy schopné uchovávať si uhlíkové zdroje vo forme polyhydroxybutyrátu a glykogénu. Tie sú elektrónovými donormi pre endogénnu denitrifikáciu [53]. PHA sú najdôležitejšími zásobami uhlíka pre mikroorganizmy nachádzajúce sa v aktivovanom kale, najmä pri anaeróbno-aeróbných procesoch alebo systémoch so zvýšeným biologickým odstraňovaním fosforu. V takom procese mikroorganizmy v aktivovanom kale využívajú hydrolýzu intracelulárnych polyfosfátov ako zdroj energie pre anaeróbny príjem uhlíkových substrátov. Tie sú dočasne skladované vo forme PHA a pri prechode na aeróbné podmienky sú využité na rast a regeneráciu polyfosfátov [54].

Zastúpenie PHA-produkujúcich baktérií v aktivovanom kale sa môže pohybovať v rozmedzí 11–18 % [31].

Aktivovaný kal je zmiešaná kultúra. Produkcia polyhydroxyalkanoátov prostredníctvom zmiešanej kultúry má značné výhody ako nízke náklady, jednoduchá kontrola procesu, efektívnejšia utilizácia odpadu a nízke nároky na sterilitu [30]. Opätovné využitie organickej hmoty z priemyslových odpadných vôd za účelom produkcie PHA by bolo zároveň výhodné z hľadiska efektívnejšieho odstraňovania fosforu. Taktiež by sa tak mohol znížiť objem vypúšťaného odpadného kalu [55].

Produkcia polyhydroxyalkanoátov priamo z aktivovaného kalu nie je výhodná, je nutné najprv vyselektovať mikroorganizmy, ktoré majú vysokú kapacitu akumulácie PHA. Jednou z najúspešnejších stratégií je metóda „aeróbne dynamické kŕmenie“ (feast and famine), nasledovaná produkčným krokom za limitácie dusíkom [31]. Podstatou aeróbného dynamického kŕmenia je striedanie fázy s dostatkom živín a vhodných podmienok (napr. aerácia) s fázou „hladovania“ – teda nedostatku živín, kyslíka a pod. V takýchto podmienkach budú zvýhodnené druhy, ktoré sú schopné vytvoriť si počas prvej fázy energetické zásoby vo forme PHA. Tie potom môžu využívať počas nedostatku živín [56].

Pri skúmaní produkcie PHA mikroorganizmami prítomnými v aktivovanom kale z čističky odpadových vôd v papierni bola k obohateniu kultúry o PHA-produkujúce druhy taktiež využitá metóda aeróbného dynamického kŕmenia. Medzi výslednými PHA-produkujúcimi mikroorganizmami prevažovali filamentárne druhy (*Obrázok 9*). V produkčnej fáze bol dosiahnutý obsah PHA v sušine 48 % (39 mol. % 3HB a 61 mol. % 3HV) za limitácie fosforom, 44 % za limitácie dusíkom, 43 % za súčasnej limitácie P a N a najnižší obsah (32 %) pri nadbytku živín [57].



Obrázok 9: Filamentárne PHA-produkujúce organizmy v aktivovanom kale z čističky odpadných vôd v papierni zobrazené pomocou mikroskopie s fázovým kontrastom [57].

V rámci ďalšej práce bola študovaná tvorba PHA aktivovaným kalom z čističky komunálnych odpadných vôd. Okrem iného bol sledovaný vplyv prídavku acetátu a pH na akumuláciu PHA. Aktivovaný kal s prídavkom acetátu v odpadnej vode dokázal akumulovať do 30 % PHA, kým bez prídavku acetátu bolo dosiahnutých 20 % PHA v sušine. Hodnota pH taktiež ovplyvnila produkciu PHA. Pri udržiavaní pH na hodnotách 6–7 bol dosiahnutý veľmi nízky obsah PHA v biomase, naopak omnoho lepšie výsledky boli dosiahnuté pri hodnotách pH 8–9 [54].

Polyhydroxyalkanoáty produkované aktivovaným kalom by mohli byť v rámci čistenia odpadových vôd vedľajšími produktami s pridanou hodnotou. Navyac by bolo možné k produkcii využívať rôzne priemyselné odpadné substráty, čo by významne prispelo k zníženiu celkových nákladov na výrobu PHA [58].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie, materiál a prístroje

3.1.1 Mikroorganizmy a vzorky z prostredia

V práci boli použité nasledovné mikroorganizmy: *Bacillus megaterium* CCM 2037, *Bacillus cereus* CCM 2010^T, *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726, *Cupriavidus necator* PHB⁴, *Pseudomonas putida* KT 2440

Vzorkou termofilnej zmiešanej kultúry bol aktivovaný kal pochádzajúci z čističky odpadových vôd Bystřice pod Hostýnem.

3.1.2 Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov

- Nutrient Broth (HIMEDIA, IND)
- Peptone (HIMEDIA, IND)
- Beef extrakt (HIMEDIA, IND)
- Yeast extrakt (HIMEDIA, IND)
- Agar powder (HIMEDIA, IND)
- síran amónny p.a., (NH₄)₂SO₄ (Lach-ner, ČR)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a., Na₂HPO₄ · 12H₂O (Lach-ner, ČR)
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a., KH₂PO₄ (Lach-ner, ČR)
- síran horečnatý heptahydrát p.a, MgSO₄ · 7H₂O (Lach-ner, ČR)
- chlorid vápenatý dihydrát, CaCl₂ · 2H₂O (Lachema, ČR)
- citrát železito-amonný, Fe^{III} NH₄-citrát (Fluka, ČR)
- chlorid amónny, NH₄Cl (Lach-ner, ČR)
- kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA), (Lach-ner, ČR)
- hydrogenfosforečnan didraselný K₂HPO₄ (Lach-ner, ČR)
- chlorid železitý, FeCl₃ (Lach-ner, ČR)
- chlorid železitý hexahydrát, FeCl₃ · 6 H₂O (Lach-ner, ČR)
- chlorid zinočnatý, ZnCl₂ (Lach-ner, ČR)
- chlorid kobaltnatý hexahydrát, CoCl₂ · 6H₂O (Lach-ner, ČR)
- chlorid meďnatý dihydrát, CuCl₂ · 2H₂O (Lach-ner, ČR)
- chlorid mangánatý hexahydrát, MnCl₂ · 6H₂O (Lach-ner, ČR)
- chlorid nikelnatý hexahydrát, NiCl₂ · 6H₂O (Lach-ner, ČR)
- molybdénan sodný dihydrát, Na₂MoO₄ · 2 H₂O (Lach-ner, ČR)
- jodid draselný, KI (Lach-ner, ČR)
- síran meďnatý pentahydrát, CuSO₄ · 5H₂O (Lach-ner, ČR)
- síran zinočnatý heptahydrát, ZnSO₄ · 7H₂O (Lach-ner, ČR)
- D-glukóza p.a., C₆H₁₂O₆ (Lach-ner, ČR)
- D-fruktóza p.a., C₆H₁₂O₆ (Lach-ner, ČR)
- laktóza monohydrát p.a., C₁₂H₂₂O₁₁ · H₂O (Lach-ner, ČR)
- D-(+)-xylóza, C₅H₁₀O₅ (Sigma-Aldrich, SRN)
- D-galaktóza, C₆H₁₂O₆ (Sigma-Aldrich, SRN)
- acetát sodný trihydrát p.a., C₂H₃NaO₂ · 3 H₂O
- propionát sodný, C₃H₅NaO₂, (Sigma-Aldrich, SRN)

- kyselina levulinová, C₅H₈O₃ (Sigma-Aldrich, SRN)
- kyselina DL-mliečna, C₃H₆O₃ (Lach-ner, ČR)
- gama-butyrolaktón (GBL), C₄H₆O₂, (Sigma-Aldrich, SRN)
- odpadný glycerol

3.1.3 Chemikálie použité pre izoláciu DNA, PCR, agarózovú gélovú elektroforézu a ostatné chemikálie

- master mix One Taq Hot Start (2× koncentrovaný) so štandardným pufrom; zloženie: 20 mM Tris-HCl (pH 8,9), 1,8 mM MgCl₂, 22 mM NH₄Cl₂, 22 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 5% glycerol, 0,06% IGEPAL CA-630, 0,05% Tween 20, 25 jednotiek/ml One Taq Hot Start DNA polymeráza (New England BioLabs, UK)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)
- primery (Generi-Biotech, R)
- kyselina boritá, H₃BO₃ (Lachema, R)
- bromfenolová modrá (Serva, SRN)
- agaróza (Serva, SRN)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, SRN)
- DNA štandard (New England Biolabs, UK) obsahujúci fragmenty o veľkosti 3 000, 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100 bp
- tris(hydroxymethyl)aminometán (Lach-ner, R)
- kyselina chlorovodíková 35% p.a., HCl (Lach-ner, ČR)
- glycerol (Lachema, ČR)
- Nílska červeň (Sigma Aldrich, SRN)
- dimetylsulfoxid (DMSO), (CH₃)₂SO (Lachema, ČR)

3.1.4 Prístroje

- laminárny box Aura mini (Bio Air Instruments)
- laminárny box Biohazard Airstream (ESCO)
- inkubátor IP 60 (LTE)
- blokový termostat Stuart SBH 200D (Bibby Scientific)
- nanofotometr Pearl (Implen)
- laboratórna váha Scout Pro (Ohaus)
- laboratórna váha EW 620 (Kern)
- centrifúga AG 1-14 (Sartorius)
- centrifúga Mikro 120 (Hettich)
- centrifúga Z 100 M (Hermle LaborTechnik)
- gradientový Palm-cycler (Corbett Research)
- termo-cycler MyCycler™ (BIO-RAD)
- zdroj napätia MP 300 V (Major science)
- duálny vizualizačný systém Ultra Viewer (Ultra Lum)
- transiluminátor TVR 3121 (Spectroline)

3.2 Uchovávanie mikroorganizmov

Vzorka aktivovaného kalu z čističky odpadových vôd bola skladovaná v objemoch 10 ml, a to v pomere 2 diely vzorky a 1 diel 30% glycerol. Konečná koncentrácia glycerolu tak činila 10 %. Takto pripravené kryokonzervy boli uchovávané v hlbokomraziacom boxe pri teplote -80 °C.

Rovnakým spôsobom boli vo forme kryokonzerv uchovávané vzorky odobrané z jednotlivých tekutých kultúr, ale v objeme 1,8 ml.

Mikroorganizmy kultivované na pevných agarových platniach v Petriho miskách boli po ukončení kultivácie uchovávané v chladničke.

3.3 Kultivácia mikroorganizmov

3.3.1 Kultivačné médiá

médium NB:

-komerčne dostupné médium Nutrient Broth o zložení:

- Beef extrakt 1 g/l
- Pepton 1 g/l
- NaCl 0,5 g/l
- Agar 0,2 g/l

médium PY:

- pepton 2 g
- yeast extract 1 g
- destilovaná voda 1 000 ml

médium CN H16:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g
- KH_2PO_4 1,02 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 11,1 g
- fruktóza 20 g
- roztok stopových prvkov¹ 1 ml
- destilovaná voda 1 000 ml

¹roztok stopových prvkov:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 9,7 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 7,8 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,156 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,119 g
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,118 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- 0,1 M HCl 1 000 ml

médium TSB:

-komerčne dostupné médium Tryptone Soya Broth

- Tryptone Soya Broth 30 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

médium M1:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 g
- KH_2PO_4 6 g
- yeast extract 2 g
- pepton 6 g
- destilovaná voda 1 000 ml

médium M2:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,6 g
- NH_4Cl 0,16 g
- EDTA 0,1 g
- K_2HPO_4 0,092 g
- KH_2PO_4 0,045 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,07 g
- yeast extract 0,1 g
- $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 4 g
- roztok stopových prvkov² 2 ml
- destilovaná voda 1 000 ml

²roztok stopových prvkov:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 g
- H_3BO_3 0,15 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,15 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,12 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,12 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,06 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g
- KI 0,03 g
- destilovaná voda 1000ml

médium M3:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 9 g
- KH_2PO_4 1,5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- NH_4Cl 1 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,02 g
- $\text{Fe}^{\text{III}} \text{NH}_4\text{-citrát}$ 0,0012 g
- yeast extract 0,5 g
- glukóza 20 g
- roztok stopových prvkov³ 1 ml
- destilovaná voda 1 000 ml

³roztok stopových prvkov:

• EDTA	50 g
• FeCl ₃	8,3 g
• ZnCl ₂	0,84 g
• CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13 g
• CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1 g
• MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016 g
• H ₃ BO ₃	0,1 g
• destilovaná voda	1 000 ml

3.3.2 Príprava tekutých kultúr

Tekuté kultúry boli pripravované v objeme 100 ml. Kultivačné médium bolo vysterilované, po sterilácii bol prípadne pridaný sacharid a roztok stopových prvkov a v očkovacom boxe bolo naočkované danými mikroorganizmami. Termofilné mikroorganizmy boli kultivované na trepačke pri otáčkach 200 rpm a teplote 60 °C.

3.3.3 Príprava kultúr na agarových platniach

Pre prípravu pevných agarových platní bol k danému médiu pridaný agar o koncentrácii 17 g/l. Po sterilácii boli pridané potrebné komponenty a médium bolo rozliate do Petriho misiek, kde sa nechalo stuhnúť. Po stuhnutí boli misky pomocou sterilných bakteriologických kľučiek naočkované mikroorganizmami. Kultivácia prebiehala v termostate pri teplote 60 °C pre termofily a 30 °C pre ostatné mikroorganizmy.

3.3.4 Odber biomasy a stanovenie podielu sušiny

Z tekutej kultúry bolo odobraných 10 ml, ktoré boli následne stočené na centrifúge rýchlosťou 6 000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol vyliaty, biomasa bola premytá 10 ml destilovanej vody a opäť scentrifugovaná. Supernatant bol potom vyliaty a biomasa uložená do sušiarne s teplotou 70 °C. Po vyschnutí bola sušina zvážená na analytických váhach. Získaná hmotnosť tvorila podiel bunkovej sušiny v 10 ml kultúry.

3.3.5 Stanovenie podielu PHA v biomase

Celková koncentrácia P(3HB) v sušine bola stanovovaná plynovou chromatografiou s FID detekciou. Do vialiek bolo navážených približne 10 mg bunkovej sušiny s presnosťou na 0,1 mg. K vzorkám bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% H₂SO₄ v metanole s vnútorným štandardom kyselinou benzoovou o koncentrácii 5 g/ml. Uzavreté vialky boli umiestnené do termobloku vyhriateho na 94 °C po dobu troch hodín. Po transesterifikácii boli vzorky zneutralizované v 0,5 ml 0,05 M NaOH a pre analýzu bolo odobratých 50 µl spodnej chloroformovej fázy. Ku každej vzorke bolo pridaných 950 µl chloroformu a vzorky boli analyzované plynovým chromatografom.

3.3.6 Farbenie kolónií Nílskou červeňou

Roztok Nílskej červene bol pripravený rozpustením 0,5 mg Nílskej červene v 1 ml dimetylsulfoxidu. Do kultivačného agarového média bol po vysterilovaní a tesne pred naliatím na misky pridaný roztok Nílskej červene v koncentrácii 1 µl na 1 ml média. Konečná

koncentrácia Nílskej červene v médiu tak činila 0,5 µg/ml. Po stuhnutí boli na misky naočkované kolónie, u ktorých bola predpokladaná schopnosť akumulácie PHA granúl. Po ukončení kultivácie bola prostredníctvom UV-analyzátora sledovaná fluorescencia Nílskej červene zabudovanej do lipofilných častíc vnútri buniek.

3.4 Izolácia DNA

3.4.1 Príprava lyzačného pufru

Ako lyzačný pufr bol použitý 5 mM TrisHCl (pH 8,5), ktorý bol pripravený rozpustením 0,032 g tris(hydroxymetyl)aminometánu v 50 ml destilovanej vody. Pomocou HCl bolo upravené pH roztoku na hodnotu 8,5. Po vysterilovaní bol pufr rozpipetovaný do Eppendorfových skúmaviek a uchovávaný v mrazničke.

3.4.2 Izolácia DNA

Izolácia DNA bola uskutočňovaná z tekutých kultúr, aj z kultúr narastených na agarových platniach. Pre izoláciu DNA z tekutých kultúr bol odobraný 1 ml z kultúry do sterilnej Eppendorfovej skúmavky a pomocou centrifugácie pri 4 000 rpm po dobu 3 minút bola získaná biomasa. Na prečistenie biomasy bol bunkový sediment rozsuspendovaný v 1 ml sterilného fyziologického roztoku a následne scentrifugovaný pri rovnakých podmienkach. Supernatant bol vyliaty a k prečistenej biomase bolo pridaných 100 µl lyzačného pufru.

Izolácia DNA z kultúr na pevných agarových platniach prebiehala tak, že bola odobraná jedna bakteriologická kľučka narastených kolónii a následne bola biomasa uvoľnená do lyzačného pufru o objeme 100 µl. Biomasa bola v pufri rozsuspendovaná a podrobená lýze buniek.

Lýza buniek prebiehala v termobloku prostredníctvom zvýšenej teploty po dobu 15 min. Pre termofilné mikroorganizmy bola teplota optimalizovaná, na ostatné mikroorganizmy bolo pôsobené teplotou 90 °C. Po termolýze boli suspenzie opäť scentrifugované – pri 10 000 rpm po dobu 10 min. Supernatant obsahujúci uvoľnenú DNA bol odpipetovaný do novej sterilnej Eppendorfovej skúmavky a uchovávaný v mrazničke pri -30 °C.

3.4.3 Optimalizácia lyzačnej teploty

Pre termofilné kultúry bola optimalizovaná lyzačná teplota, a to pre tekuté aj pevné kultúry. Na kultiváciu bolo použité *médium M1* s prídavkom laktózy (4 g/l). Na prípravu lyzátu bol z tekutej kultúry odobraný 1 ml, ktorý bol scentrifugovaný pri otáčkach 4 000 rpm po dobu 3 minúty. Bunkový sediment bol prečistený v 1 ml sterilného fyziologického roztoku a následne scentrifugovaný pri rovnakých podmienkach. Následne bol vyliaty supernatant a k bunkovému sedimentu bolo pridaných 100 µl lyzačného pufru. Kultúry z misiek boli bakteriologickou kľučkou odobrané priamo do lyzačného pufru, kde boli rozsuspendované.

Pre experiment bolo zvolených 6 lyzačných teplôt: 90, 95, 100, 105, 110 a 115 °C. Týmto teplotám boli bunky vystavené po dobu 15 minút a následne boli scentrifugované pri otáčkach 10 000 rpm po dobu 10 minút. Výsledky boli stanovené pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

3.4.4 Stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Koncentrácia a čistota vyizolovanej DNA bola stanovovaná spektrofotometricky. K stanoveniu bol použitý spektrofotometer NanoPhotometer™ Implen (lid 10). Ako blank slúžil lyzačný pufo. Roztok DNA bol nanášaný v objeme 3 μ l. Z displeja prístroja bola odčítaná nameraná koncentrácia, ako ukazovateľ čistoty slúžil pomer absorbancií $A_{(260/280)}$.

3.5 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) boli podrobované úseky DNA kódujúce enzým PHA-syntázu tried I, II a IV, a ďalej úsek *16S*-rRNA kódujúci 16S podjednotku ribozomálnej RNA. Amplifikované gény a príslušné primery, ktoré boli k amplifikácii použité, zahŕňa *Tabuľka 2*.

Tabuľka 2: Zoznam použitých primerov, priradené gény a príslušné enzýmy.

Amplifikovaný gén	Veľkosť [bp]	Primery	sekvencia primeru	Príslušný enzým
<i>phaC</i> [59]	551	G-D	GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT	PHA-syntáza triedy I a II
		G1R	GTTCCAGWACAGSAKRTCAGAA	
<i>phaC1</i> [59]	1 965	E1-D	GGAGCGTCGTAGATGAGTAACAAGAA	PHA-syntáza triedy II
		E1R	AGGTTGGCGCCGATGCCGTTGAA	
<i>16S</i> -rRNA [60]	1 600	16S-F	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S-rRNA
		16S-R	GGTTACCTTGTTACGACTT	
<i>phaC</i> (Bm) [61]		phaCBm-F	CGTGCAAGAGTGGGAAAAAT	PHA-syntáza triedy IV (<i>B. megaterium</i>)
		phaCBm-R	TCGCAATATGATCACGGCTA	
<i>phaC</i> (Bc) [62]		phaCBc-F	CTTGTTAYTGCATGGGNGGAAC	PHA-syntáza triedy IV (<i>B. cereus</i>)
		phaCBc-R	ACTTGRYRKGGCANDGCRATRTGAT	

PCR mix pre multiplex PCR génov *phaC* a *16S*-rRNA obsahoval 12,5 μ l master mixu, 2,6 μ l iónov Mg^{2+} , po 1 μ l príslušných primerov, 3,9 μ l vody a 2 μ l DNA. Ako negatívna kontrola bol PCR mix namiesto DNA doplnený 2 μ l vody, pozitívna kontrola obsahovala DNA baktérie *Cupriavidus necator* H16. Pripravené vzorky boli krátko scentrifugované a umiestnené do termocycleru, kde prebiehala amplifikácia vybraných úsekov DNA podľa teplotného programu, ktorý uvádza *Tabuľka 3*.

Tabuľka 3: Časovo-teplotný program pre PCR fragmentov 16S-rRNA a phaC.

	teplota [°C]	čas [s]	počet cyklov
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	300	1
	4	60	1

PCR mix pre amplifikáciu génu *phaC1* obsahoval 12,5 µl master mixu, 1,8 µl iónov Mg²⁺, po 1 µl oboch primerov, 6,7 µl vody a 2 µl DNA. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA baktérie *Pseudomonas putida*. Pripravené vzorky boli krátko scentrifugované a umiestnené do termocycleru. Časovo-teplotný program reakcie uvádza *Tabuľka 4*.

Tabuľka 4: Časovo-teplotný program pre PCR fragmentu phaC1.

	teplota [°C]	čas [s]	počet cyklov
1	94	30	1
2	94	30	30
	62	30	
	68	90	
3	68	300	1
	30	60	1

3.5.1 Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBm

Primery phaCBm kódujú gén PHA-syntázy IV. triedy baktérie *Bacillus megaterium* [61]. Pre optimalizáciu annealingovej teploty (teploty nasadenia primerov) polymerázovej reťazovej reakcie bolo zvolené rozpätie teplôt 50–70 °C. Zloženie PCR mixu bolo nasledovné: 12,5 µl master mixu, po 1 µl každého z dvojice primerov, 8,5 µl vody a 2 µl DNA baktérie *Bacillus megaterium*. Optimalizácia prebiehala pomocou gradientovej PCR.

3.5.2 Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBc

Primery phaCBc sú ciele do oblasti génu PHA-syntázy IV. triedy, konkrétne pre bakteriálny druh *Bacillus cereus* [62]. Pre PCR uskutočňovanú s týmito primerami boli testované dve annealingové teploty. Na základe údajov v uvedenom literárnom zdroji bola otestovaná teplota 48 °C. Druhá teplota zvolená pre optimalizáciu reakcie bola 55 °C. Zloženie PCR mixu bolo nasledovné: 12,5 µl master mixu, po 1 µl každého z dvojice primerov, 8,5 µl vody a 2 µl DNA baktérie *Bacillus cereus*.

3.6 Agarózová gélová elektroforéza

3.6.1 Príprava TBE pufu, agarózového gélu a nanášacieho pufu

10× koncentrovaný TBE pufor bol pripravený nasledovne:

- tris(hydroxymetyl)aminometán 108 g
- H₃BO₃ 55 g
- EDTA 9,3 g
- destilovaná voda 1 000 ml

Na prípravu 2% agarózového gélu boli navážené 2 g agarózy a zaliate 100 ml 1× koncentrovaného TBE pufu. Na prípravu 0,8% agarózového gélu bolo navážených 0,8 g agarózy a zaliatych 100 ml 1× koncentrovaného TBE pufu. Roztok bol zahrievaný do viacnásobného prevarenia a úplného rozpustenia agarózy. Po vychladnutí na približne 70 °C bolo do roztoku pridaných 7 µl interkalačného farbiva Midori Green. Následne bol gél naliaty

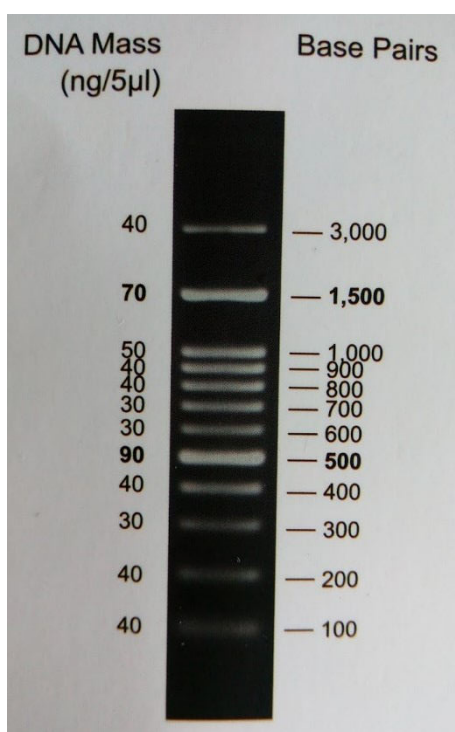
do vaničky s vloženými hrebeňmi, ktoré boli po stuhnutí gélu odstránené. Gél, ktorý nebol ihneď použitý, bol uchovávaný v chladničke v 1× koncentrovanom TBE pufri.

Nanášací pufor bol pripravený nasledovne:

- bromfenolová modrá 20 mg
- glycerol 3 ml
- destilovaná voda 7 ml

3.6.2 Detekcia PCR produktov agarózovou gélovou elektroforézou

10 μ l vzorky bolo zmiešaných s 5 μ l nanášacieho pufri. 10 μ l vzniknutej zmesi bolo napipetovaných do jamky agarózového gélu. Popri vzorkách bol na gél nanesený rebríček štandardu (Obrázok 10). Vanička s gélom bola vložená do elektroforetickej vane a zaliata TBE pufrom. Elektroforéza prebiehala pri napätí 90 V po dobu 60–80 minút. Po skočení bol gél pozorovaný prostredníctvom UV-analyzátoru.



Obrázok 10: Rebríček štandardu použitý pri detekcii PCR produktov agarózovou gélovou elektroforézou.

3.7 Príprava PCR produktov na sekvenáciu DNA

Pred samotnou sekvenáciou DNA bolo nutné PCR produkty prečistiť. Prečisťovanie DNA prebiehalo pomocou komerčného kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit podľa priloženého návodu. Prečistením sa DNA zbavila zvyškov proteínov, solí, voľných nukleotidov a iných kontaminácií.

Každá vzorka bola v objeme 5 μ l napipetovaná do malej Eppendorfovej skúmavky. K vzorke bolo pridaných 5 μ l 20× zriedeného primeru. Primery (predný a zadný) boli k vzorkám pridávané zvlášť. Takto pripravené vzorky boli zaslané na sekvenáciu do firmy SEQme s.r.o.

3.8 Vplyv typu média na rast termofilných MO z aktivovaného kalu

Do 250 ml Erlenmeyerových bánk boli v objemoch 100 ml pripravené nasledujúce 4 typy tekutých kultivačných médií:

1. *médium M1* + laktóza (12 g/l)
2. *médium M1* + galaktóza (12 g/l)
3. *médium M1* + xylóza (12 g/l)
4. *TSB*

Všetky kultivačné médiá boli vysterilované a zaočkované 1,5 ml vzorky aktivovaného kalu. Kultúry boli kultivované na trepačke pri teplote 60 °C a otáčkach 200 rpm. Po 24 hodinách boli preočkované do tekutých aj na pevné médiá rovnakého zloženia. Kultúry na miskách boli kultivované v termostate pri teplote 60 °C po dobu 24 hodín. Mikroorganizmy boli prečisťované opakovaným presadením na nové misky so zhodnými médiami.

Po narastení bola z kultúr izolovaná DNA. Získané izoláty boli podrobené PCR na overenie prítomnosti bakteriálnej DNA (gén *16S-rRNA*) a génu *phaC*.

3.9 Čistenie kultúr z aktivovaného kalu

Vzorkou aktivovaného kalu bolo zaočkované tekuté *médium M2* a prítomné mikroorganizmy boli podrobené metóde „aeróbne dynamické kŕmenie“ za účelom vyselektovania producentov PHA. Kultivácia prebiehala na trepačkách pri otáčkach 200 rpm a teplote 60 °C. Narastená kultúra bola každých 12 hodín prevedená do nového média, pričom boli pravidelne uskutočňované odbery biomasy v objeme 10 ml, v ktorých bol stanovovaný obsah PHA. Z tekutej kultúry boli popri odberoch pripravované kryokonzervy, ktoré boli uchovávané v hlbokomraziacom boxe pre ďalšie použitie.

3.9.1 Kultivácia na *médium M2*

Z prebiehajúcej tekutej kultivácie (metóda „dynamické aeróbne kŕmenie“) boli 6. deň krížovým rozterom naočkované agarové misky s *M2-médiom*. Kultúry boli kultivované v termostate pri teplote 60 °C po dobu 24 hodín.

Z narastených kolónií na agarových miskách, i priamo z tekutej kultúry bola izolovaná DNA a zisťovaná prítomnosť génov *phaC* a *16S-rRNA*. Tento postup bol v priebehu nasledujúcich týždňov ešte niekoľkokrát zopakovaný.

3.9.2 Kultivácia na *médium NB*

Vybrané kultúry narastené na agarových miskách s *médiom M2* boli preočkované na misky obsahujúce pevné *médium NB*. Na misky s *NB-médiom* boli očkované aj vzorky z prebiehajúcej tekutej kultivácie na *médium M2* (podrobovanej selekčnej metóde „dynamické aeróbne kŕmenie“). Kultúry boli prečisťované viacnásobným preočkovaním na nové pevné médiá.

Z narastených kolónií bola izolovaná DNA, ktorá bola amplifikovaná pomocou PCR s využitím primerov pre gény *phaC* a *16S-rRNA*.

3.9.3 Selekcia producentov farbením kolónií Nílskou červeňou

Pre zefektívnenie hľadania PHA-produkujúcich druhov boli kolónie, ktoré pri PCR poskytli pozitívnu odozvu, naočkované na agarové živné médium (*médium M3*) s prídavkom farbiva Nílskej červene, ktoré sa využíva na detekciu lipidových častíc v bunkách. Zoznam vybraných vzoriek uvádza *Tabuľka 5*.

Tabuľka 5: Zoznam vzoriek s preukázaným phaC génom nasadených na médium s prídavkom Nílskej červene.

vzorka	označenie	médium a popis kultúry
M12	NČ 1	M2 „biela kolónia“
M15	NČ 2	M2 „priesvitná kolónia“
M16	NČ 3	M2 „biela kolónia“
M17	NČ 4	M2 „biela kolónia“
M21	NČ 5	M2 „priesvitná kolónia“
M22	NČ 6	M2 „biela kolónia“
M23	NČ 7	M2 „biela kolónia“
NB4	NČ 8	NB „strapatá kolónia“
NB10	NČ 9	NB „biela kolónia“

Tieto vzorky na Petriho miskách boli kultivované v termostate pri teplote 60 °C. Pre pozitívnu a negatívnu kontrolu bola pripravená miska s *médiom CN H16*, prídavkom fruktózy (20 g/l) a Nílskou červeňou. Táto miska bola po stuhnutí rozdelená na dve časti, z ktorých jedna bola zaočkovaná baktériou *Cupriavidus necator* H16 (PK) a druhá mutantným kmeňom netvoriacim PHA (NK). Misky s PK a NK boli kultivované v termostate pri teplote 30 °C.

Po 24 hodinách boli narastené kultúry pozorované cez UV-analyzátor. U kolónií bola sledovaná fluorescencia indikujúca prítomnosť lipidických častíc. Kolónie poskytujúce najintenzívnejšiu odozvu boli presadené na nové pevné médiá (*médium M3*) bez Nílskej červene a kultivované rovnakým spôsobom.

Na agarové *médium M3* boli naočkované aj vzorky z tekutej kultivácie.

Zo všetkých narastených kultúr bola izolovaná DNA a následne amplifikovaná s využitím primerov pre gény *phaC* a *16S-rRNA*.

3.10 Sekvenácia génov *phaC* a *16S-rRNA*

Pre sekvenáciu génov *phaC* a *16S-rRNA* bolo vybraných 6 vzoriek, u ktorých bol preukázaný gén *phaC* pomocou PCR a agarózovej gélovej elektroforézy. Pred zaslaním vzoriek na sekvenáciu boli vybrané izoláty DNA podrobené PCR s primerami pre gény *16S-rRNA* a *phaC*. Získané amplikóny boli prečistené pomocou komerčného kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit a poslané na sekvenáciu do firmy SEQme s.r.o.

3.11 Hľadanie génov pre iné typy PHA-syntáz

3.11.1 PHA-syntázy II. triedy

DNA 6 vyizolovaných kultúr bola podrobená PCR s primerami E-D a E1R cielenými do oblasti génu *phaC1* kódujúceho PHA-syntázy triedy II. Výsledky boli stanovené pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

3.11.2 PHA-syntázy IV. triedy

Boli objednané dve sady primerov zamerané na úseky DNA kódujúce PHA-syntázy IV. triedy. Pre tieto primery boli optimalizované annealingové teploty. Vo vzorkách šiestich vyizolovaných kultúr bola overovaná prítomnosť PHA-syntáz IV. triedy pomocou týchto primerov. Boli teda uskutočnené dve PCR: jedna s využitím dvojice primerov *phaCBm-F/phaCBm-R* a druhá s využitím primerov *phaCBc-F/phaCBc-R*. Výsledky oboch reakcií boli stanovené pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

3.12 Produkcia PHA s vybranými izolátmi

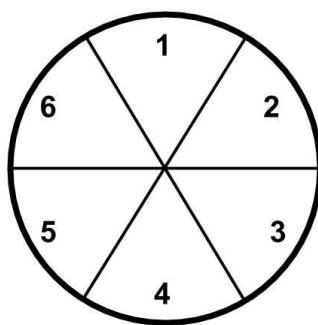
Do 100 ml Erlenmayerových bánk boli pripravené inokulačné médiá (*PY-médium*) v objeme 50 ml. Po sterilácii boli zaočkované izolátmi označenými 1–6 z kultúr na agarových miskách. Jedná sa o izoláty, ktoré boli poslané na sekvenáciu. Inokulá boli kultivované na trepačkách pri otáčkach 200 rpm a teplote 60 °C po dobu 24 hodín.

Do 250 ml Erlenmayerových bánk boli pripravené produkčné médiá (*médium M3*) v objeme 100 ml. Tieto médiá boli po sterilácii zaočkované narastenými inokulami (objemom 10 ml) a kultivované pri rovnakých podmienkach po dobu 72 hodín.

Po 48 a 72 hodinách kultivácie bol uskutočnený odber kultúry v objeme 10 ml. Kultúra bola stočená pomocou centrifúgy pri 6 000 rpm po dobu 5 minút, supernatant bol vyliaty, biomasa bola premytá etanolom a opäť scentrifugovaná. Následne bola uložená do sušiarne s teplotou 70 °C až do úplného vysušenia. Sušina jednotlivých vzoriek bola zvážená a prostredníctvom plynovej chromatografie v nej bola stanovená koncentrácia PHA.

3.12.1 Výber vhodného uhlíkového zdroja pre kultiváciu a produkciu PHA

Bolo pripravené *médium M3* s prídavkom agaru a Nílskej červene. Namiesto glukózy boli do vysterilovaného média pridané rôzne uhlíkové zdroje v koncentrácii vždy 20 g/l. Médiá boli potom naliate na Petriho misky a odložené do stuhnutia. Misky boli fixkou rozdelené na 6 častí, očíslovaných 1–6 podľa vzoriek (*Obrázok 11*). Na každú časť bola naočkovaná odpovedajúca vzorka.



Obrázok 11: Schéma rozdelenia misky pre pokus s Nílskou červeňou. Na každú očíslovanú časť bola naočkovaná odpovedajúca vzorka

Pre pozitívnu a negatívnu kontrolu bola pripravená miska s médiom *CN H16*, prídavkom fruktózy (20 g/l) a Nílskou červeňou. Táto miska bola po stuhnutí rozdelená na dve časti, z ktorých jedna bola zaočkovaná baktériou *Cupriavidus necator* H16 (PK) a druhá mutantným kmeňom netvoriacim PHA (NK).

Misky s PK a NK boli kultivované v termostate pri teplote 30 °C a misky s termofilnými vzorkami v termostate pri 60 °C po dobu 24 hodín. Po 24 hodinách boli misky pozorované prostredníctvom UV-analyzátoru.

3.12.2 Zopakovanie produkcie PHA s vybranými izolátmi

Do Erlenmayerových bánk boli pripravené inokulá (bolo použité médium *M3*) o objemoch 50 ml. Kultúry použité k zaočkovaniu médií pochádzali z kryokonzerv (vzorky č. 2, 3, 6) a z agarových misiek (vzorky č. 2, 3, 6). Kultivácia prebiehala na trepačke pri 200 rpm a teplote 60 °C. Po 24 hodinách boli inokulá preočkované do produkčného média (opäť médium *M3*) a kultivované rovnakým spôsobom. Po 72 hodinách bola kultivácia ukončená. Z každej vzorky bola odobraná biomasa, ktorá sa nechala vysušiť v sušiarňi pri 70 °C. V sušine bol stanovený obsah PHA. Prítomnosť polyhydroxyalkanoátov bola overená aj prostredníctvom infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR).

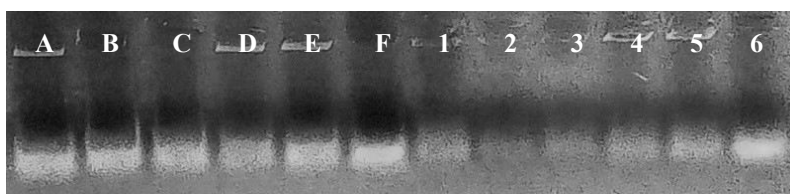
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Experimentálna časť práce bola zameraná na izoláciu termofilného producenta PHA zo vzorky aktivovaného kalu. K tomuto cieľu boli využité viaceré techniky: selekčná metóda „dynamické aeróbne kŕmenie“ slúžiaca k zakoncentrovaniu PHA-produkujúcich druhov v zmiešanej kultúre, farbenie kolónií Nílskou červeňou k priamej detekcii kolónií obsahujúcich lipidické častice, a ďalej metódy molekulárnej biológie (PCR).

Selekcia producentov prebiehala v tekutých kultúrach, aj prostredníctvom čistenia kultúr na agarových miskách. V priebehu práce bola zo vzoriek pravidelne izolovaná DNA a overovaná prítomnosť génu *phaC* kódujúceho enzým PHA-syntázu. Amplifikované úseky génu *16S-rRNA* vybraných izolátov boli zaslané na sekvenáciu za účelom bližšej identifikácie. S týmito izolátmi s preukázaným génom *phaC* bola otestovaná produkcia PHA. Výsledky produkcie boli stanovované pomocou plynovej chromatografie.

4.1 Optimalizácia lyzačnej teploty

Pre vybranie optimálnej lyzačnej teploty buniek sledovaných termofilných mikroorganizmov bolo testovaných 6 rôznych teplôt: 90, 95, 100, 105, 110 a 115 °C. Vyizolovaná DNA bola zobrazená na 0,8% agarózovom géle po prebehnutí elektroforézy. Gél bol sledovaný pod UV-analyzátorom. Výsledok zobrazuje *Obrázok 12*. Z výsledného gélu je zrejmé, že u všetkých vzoriek pripravených z misiek došlo k lýze buniek a vyizolovaniu DNA pri všetkých teplotách rovnako. Pri izolácii nedošlo k degradácii DNA, a to ani pri najvyšších skúmaných teplotách. Znamky degradácie nevykazovali ani vzorky pripravené z tekutej kultúry. Kvantita vyizolovanej DNA z tekutých kultúr však bola nižšia a rôzne lyzačné teploty vykazovali rôzne výsledky. Ako najefektívnejšie sa ukázali najvyššie teploty: 110 a 115 °C. Teplota 115 °C bola zvolená pre termolýzu buniek z tekutých kultúr a bola používaná počas celej práce. Pre termolýzu buniek z pevných kultúr bola zvolená teplota 105 °C.

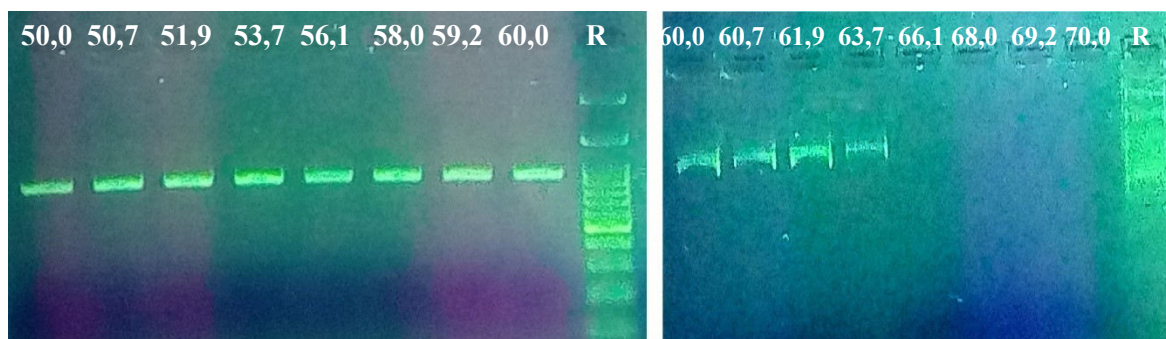


Obrázok 12: Výsledok optimalizácie lyzačnej teploty. Lyzáty pripravené z kultúr na agarovej miske sú označené písmenami A–F, zoradené od najnižšej lyzačnej teploty po najvyššiu. Lyzáty pripravené z tekutej kultúry sú označené číslami 1–6, zoradené rovnako od najnižšej lyzačnej teploty po najvyššiu.

4.1.1 Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBm

Pre primery phaCBm bola optimalizovaná annealingová teplota PCR v rozmedzí 50–70 °C. K optimalizácii bola využitá gradientová PCR. Na prvom géle (*Obrázok 13*) je vidieť výsledok prvej polovice, teda teplôt 50–60 °C. V celom tomto rozmedzí teplôt bola dosiahnutá veľmi dobrá úroveň amplifikácie. Na géle vpravo (*Obrázok 13*) je zobrazený výsledok reakcie v rozmedzí teplôt 60–70 °C. Prvé tri teploty poskytli opäť dobré výsledky, bend patriaci teplote 63,7 °C už vykazoval približne polovičnú intenzitu a pri vyšších teplotách už k namnoženiu DNA nedošlo.

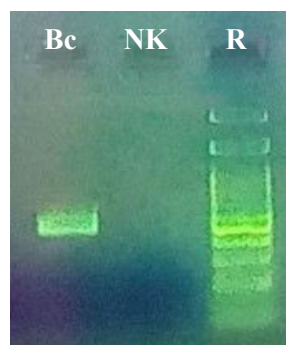
Set primerov phaCBm má pomerne širokú škálu optimálnej annealingovej teploty (50–61,9 °C). Pre ďalšie reakcie s využitím týchto primerov bola zvolená annealingová teplota 55 °C, a to kvôli možnosti uskutočňovania PCR s využitím rovnakého programu, ako multiplex PCR využívajúca primery G-D/G1R a 16S-F/16S-R.



Obrázok 13: Optimalizácia annealingovej teploty primerov phaCBm. Čísla označujú príslušné teploty v °C.

4.1.2 Optimalizácia annealingovej teploty pre primery phaCBc

Pre primery phaCBc boli overované dve annealingové teploty: 48 a 55 °C. Teplota 48 °C bola odporúčaná v literárnom zdroji, podľa ktorého boli primery vybrané. S touto teplotou bol dosiahnutý veľmi dobrý výsledok – po elektroforéze bol viditeľný výrazný bend amplifikovaného úseku DNA. Následne bola otestovaná ešte teplota 55 °C, keďže je nastavená ako annealingová teplota pre väčšinu používaných primerov. Výsledok bol rovnako dobrý aj pre túto teplotu, preto bola zvolená ako optimálna teplota pre PCR s danou dvojicou primerov (Obrázok 14).



Obrázok 14: Výsledok testovania annealingovej teploty 55 °C pre primery phaCBc-F/phaCBc-R. Bc - *B. cereus*, NK - negatívna kontrola, R - rebríček štandardu. Amplifikovaný fragment je veľkosti približne 550 bp.

4.2 Vplyv typu média na rast termofilných MO z aktivovaného kalu

Vzorkou aktivovaného kalu z čističky odpadových vôd boli naočkované 4 typy tekutých kultivačných médií. Narastené kultúry boli po 24 hodinách presadené na agarové misky s odpovedajúcimi médiami.

U tekutých kultúr bol sledovaný zákal. Mikroorganizmy v médiu s prídavkom xylózy nerástli vôbec, zrejme nie sú schopné xylózu utilizovať. Toto médium bolo z ďalších kultivácií

vyradené. Na médiu s prídavkom galaktózy a na médiu „tryptone soya broth“ mikroorganizmy narástli, ich koncentrácia však bola nevýznamná. Najlepšie podmienky pre rast poskytlo médium s prídavkom laktózy. Z nasledujúcich kultivácií na agarových miskách sa taktiež najviac osvedčilo médium s pridanou laktózou. Pre ďalšie experimenty bolo zvolené toto médium.

Z narastených kolónií na agarových miskách bola vyizolovaná DNA. Získané izoláty boli podrobené PCR na overenie prítomnosti génov *16S-rRNA* a *phaC*. PCR produkty boli detekované prostredníctvom agarózovej gélovej elektroforézy. Kontrolné overenie prítomnosti *phaC* génu bolo uskutočnené u kultúr narastených na agarových miskách obsahujúcich médium *M1* s prídavkom laktózy. Všetky vzorky poskytli negatívny výsledok. Narastené kultúry ale boli značne zmiešané. Je teda možné, že kolónie obsahujúce hľadaný gén sa zo zmiešaných kultúr nepodarilo izolovať. Z tohto dôvodu boli kultúry ďalej prečisťované presádzaním na nové misky.

U vzoriek DNA pripravených z ďalších generácií bola opäť potvrdená prítomnosť génu *16S-rRNA*. Ani u jednej vzorky však nebol prítomný gén *phaC*.

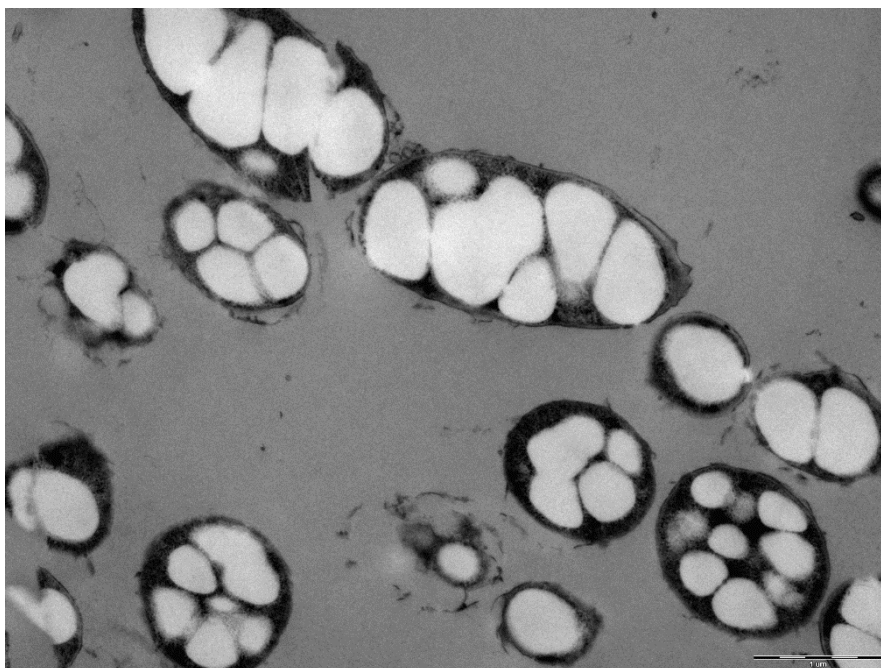
Zvolená stratégia hľadania producenta PHA v aktivovanom kale sa ukázala ako neefektívna. Na vybraných médiách rástli mikroorganizmy buď veľmi slabo, a bolo tak ťažké vyizolovať čistú kolóniu, alebo rástli zmiešané kultúry, ktoré mohli prípadných producentov prerásť.

4.3 Čistenie kultúr z aktivovaného kalu

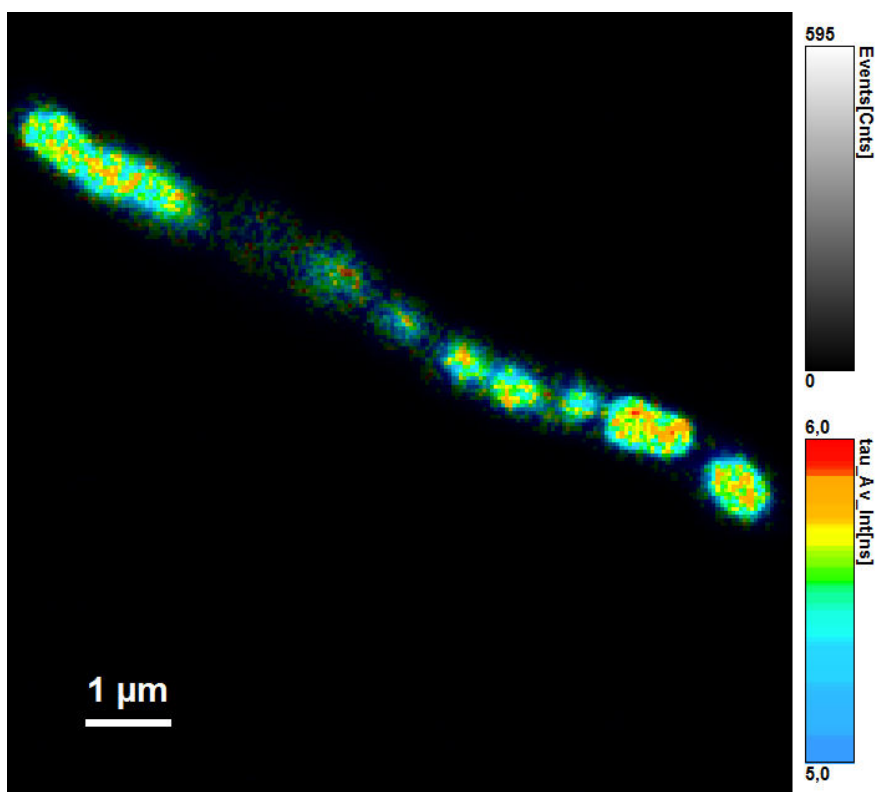
4.3.1 Kultivácia na médiu *M2*

V tekutej kultúre podrobovanej metóde „dynamické aeróbne kŕmenie“ bol pomocou plynovej chromatografie zistený obsah PHA v množstve 12 % sušiny biomasy.

Vzorka kultúry, u ktorej bol potvrdený obsah PHA, bola zaslaná na transmisnú elektrónovú mikroskopiu, pomocou ktorej je možné vizualizovať polyhydroxyalkanoátové granule v mikrobiálnych bunkách. Fotografiu nasnímanú pri pozorovaní zobrazuje *Obrázok 15*. Granule PHA sú v bunkách jasne viditeľné, a to vo väčšom množstve, než 12 %. *Obrázok 16* ukazuje výstup z pozorovania buniek pomocou fluorescenčnej mikroskopie, na ktorom je možné rozlíšiť lipofilné častice.



Obrázok 15: PHA granule vnútri mikrobiálnych buniek zobrazené pomocou TEM, vyznačená úsečka odpovedá dĺžke 1 μm .



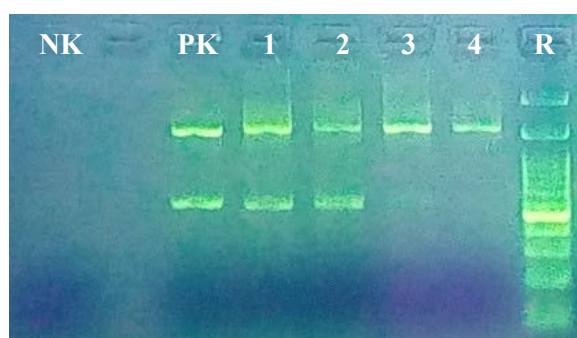
Obrázok 16: Zobrazenie lipofilných častíc (PHA) pomocou fluorescenčnej mikroskopie.

Po potvrdení prítomnosti baktérií produkujúcich PHA v tekutej kultúre boli z kryokonzervy naočkované agarové misky s *médiom* M2. Použitá kryokonzerva pochádzala zo 6. dňa tekutej kultivácie, kedy bol pomocou GC-FID v kultúre zistený 12% obsah PHA.

Z tekutej kultúry i z kultúr na agarových miskách boli pripravené izoláty DNA, ktoré boli podrobené multiplex PCR pre zistenie prítomnosti génov *16S-rRNA* a *phaC*. Obrázok 17 zobrazuje agarózový gél, na ktorom sú detekované PCR produkty izolátov z tekutých kultúr, aj izolátov pripravených z kolónií narastených na agarových miskách. U vzoriek tekutých kultúr je gén *phaC* dobre viditeľný a vzorka č. 3 z pevnej kultúry má len veľmi slabo pozorovateľný príslušný bend. Tabuľka 6 uvádza dosiahnuté výsledky označené ako „1. odber“.

Výsledky ukázali, že použitý aktivovaný kal obsahuje bakteriálne druhy disponujúce génom pre produkciu polyhydroxyalkanoátov a metódou „aeróbne dynamické kŕmenie“ sa podarilo tieto druhy „zakoncentrovat“. Na misky, u ktorých gén *phaC* potvrdený nebol, ale boli získané preočkovaním z *phaC*-pozitívnej tekutej kultúry, sa produkujúce druhy nemuseli dostať, alebo mohli byť potlačené inými druhmi.

Po potvrdení prítomnosti génu *phaC* v tekutej kultúre bolo zahájené prečisťovanie kolónií na agarových miskách. Z výsledných misiek i tekutého média boli pripravené lyzáty a v DNA bola opäť overená prítomnosť génu *phaC*. Obe vzorky z tekutej kultúry a 6 z 10 vzoriek kultúr na agarových miskách obsahovali gén *phaC*. Tabuľka 6 uvádza tieto výsledky označené ako „2. odber“.



Obrázok 17: Ukážka výsledkov kultivácie na médiu M2. 1, 2 – vzorky z tekutej kultúry podrobenej metóde „dynamické aeróbne kŕmenie“; 3, 4 – vzorky z agarových misiek; viditeľné sú namnožené úseky o veľkosti 1 500 bp (gén *16S-rRNA*) a 551 bp (gén *phaC*); NK a PK – negatívna a pozitívna kontrola; R – rebríček štandardu.

Tabuľka 6: Súhrn výsledkov jednotlivých vzoriek kultivovaných na médiu M2. Vzorky pripravené z tekutých kultúr sú označené písmenom „T“, vzorky z misiek sú označené písmenom „M“.

	médium	vzorka	<i>phaC</i>	<i>16S-rRNA</i>
M2	1. odber	T3	+	+
		T4	+	+
		M12	+	+
		M13	–	+
	2. odber	T5	+	+
		T6	+	+
		M14	–	+
		M15	+	–

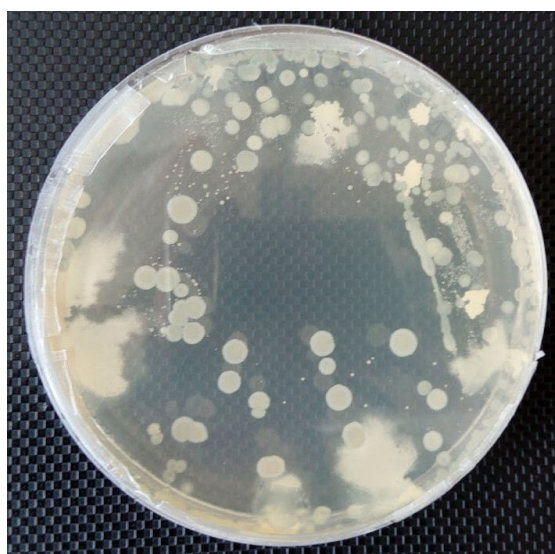
	M16	+	–
	M17	+	+
	M18	–	+
	M19	–	+
	M20	–	–
	M21	+	+
	M22	+	+
	M23	+	+

Médium M2 sa ukázalo ako dobré médium na selekciu baktérií produkujúcich PHA, avšak mikroorganizmy na ňom rástli veľmi slabo, na mnohých naočkovaných miskách nenarástli vôbec.

4.3.2 Kultivácia na *médiu NB*

Z dôvodu veľmi slabého rastu baktérií na *médiu M2* boli kultúry narastené na miskách s týmto médium preočkované na agarové misky obsahujúce *médium NB*. Nutrient Broth je komplexné médium so širokým záberom na mikroorganizmy. Vďaka tomu sa na ňom dobre darilo aj sledovaným baktériám. Avšak v izolovanej DNA z narastených kultúr nebol zistený gén *phaC*. S najväčšou pravdepodobnosťou boli PHA-produkujúce mikroorganizmy prerastené kontamináciou – druhmi, ktoré *phaC* génom nedisponujú.

Na agarové misky s *médiom NB* boli naočkované aj vzorky priamo z tekutej kultivácie podrobovanej zvolenej selekčnej metóde. Na miskách bolo po narastení zrejmých niekoľko odlišných kolónií (Obrázok 18). Misky boli ďalej prečisťované a prítomnosť génu *phaC* bola overovaná u viacerých kolónií v rámci každej misky. Tento gén bol zistený u dvoch vzoriek získaných prečisťovaním, po ich ďalšom presadení sa ho už potvrdiť nepodarilo.



Obrázok 18: Vzorka z tekutej kultivácie naočkovaná na agarovú miskú s médium NB.

Médium NB zrejme podporilo rast mikroorganizmov neprodukujúcich PHA, ktoré prerastali druhy disponujúce génom *phaC*. Tie potom tvorili kontamináciu, kvôli ktorej sa hľadané druhy nepodarilo izolovať. Z tohto dôvodu sa *médium NB* ukázalo ako neefektívne pre hľadanie druhov produkujúcich PHA.

Súhrn vzoriek kultivovaných na *médium NB* a dosiahnuté výsledky sú uvedené v *Tabuľka 7*.

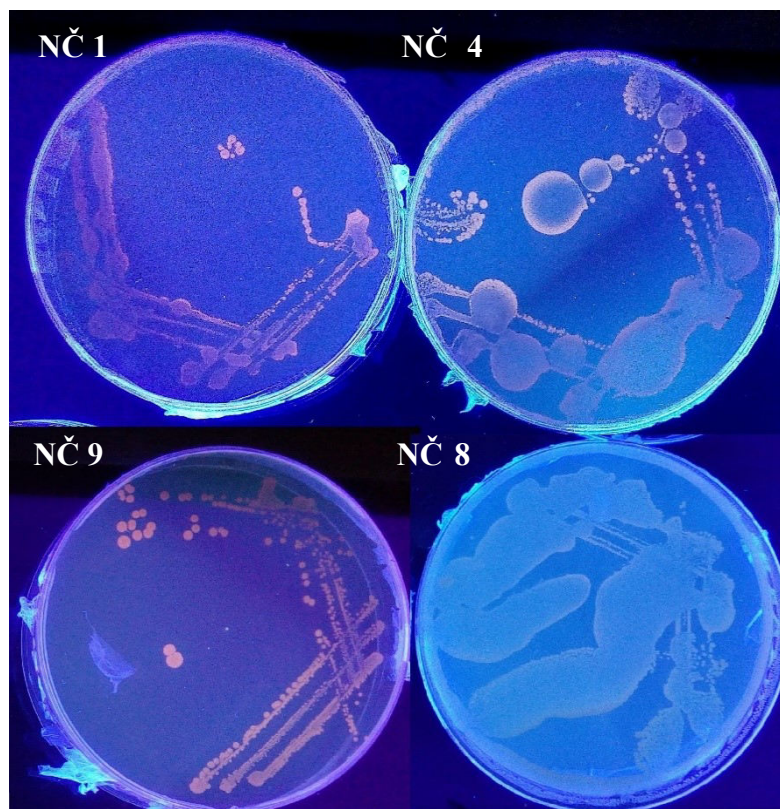
Tabuľka 7: Súhrn výsledkov a vzoriek na médium NB.

médium	vzorka	<i>phaC</i>	16S-rRNA	vzorka	<i>phaC</i>	16S-rRNA
NB	NB1	–	+	NB12	–	+
	NB2	–	+	NB13	–	+
	NB3	–	+	NB14	–	+
	NB4	+	+	NB15	–	+
	NB5	–	+	NB16	–	+
	NB6	–	+	NB17	–	+
	NB7	–	–	NB18	–	+
	NB8	–	+	NB19	–	+
	NB9	–	+	NB20	–	+
	NB10	+	+	NB21	–	+
	NB11	–	–	NB22	–	+

4.3.3 Selekcia producentov farbením kolónií Nílskou červeňou

Predchádzajúce dve médiá sa pri získavaní čistej kultúry termofilných producentov PHA zo vzorky aktivovaného kalu neosvedčili. Bola preto zvolená ďalšia metóda – farbenie kolónií Nílskou červeňou, pre priamu selekciu druhov obsahujúcich PHA vo svojich bunkách. Nílska červeň je lipofilné farbivo, ktoré sa pri utilizácii živného média dostáva do bakteriálnych buniek a zabuduje sa do intracelulárnych lipidických štruktúr. Pod UV žiarením poskytuje fluorescenciu, vďaka ktorej je možné rozoznať kolónie obsahujúce polyhydroxyalkanoátové granule.

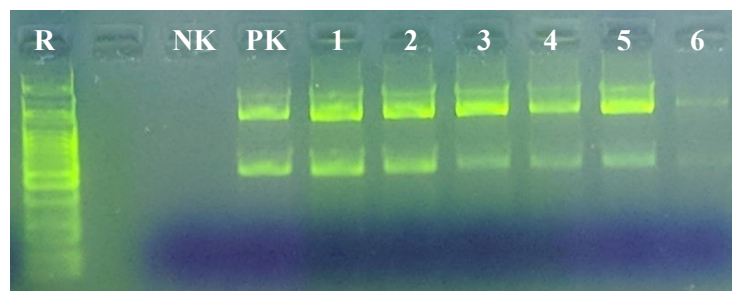
Kolónie, u ktorých bol v predchádzajúcich experimentoch potvrdený gén *phaC*, boli presadené na nové polosyntetické médium (*médium M3*) s prídavkom Nílskej červene. Po narastení boli vzorky, u ktorých bolo zreteľné fluorescenčné vyžarovanie, presadené na nové misky s *médiom M3* bez Nílskej červene. Na tomto médium rástli termofilné mikroorganizmy veľmi dobre. U narastených kultúr bol postup s naočkovaním na médium s Nílskou červeňou a preočkovaním pozitívnych kolónií na médium bez Nílskej červene ešte raz zopakovaný. Príklady kultúr na médium s Nílskou červeňou pozorovaných cez UV-analyzátor zobrazuje *Obrázok 19*. Vzorky NČ1, NČ4 a NČ9 vykazujú fluorescenciu zhodnú s pozitívnou kontrolou, na základe čoho je možné predpokladať, že prítomné mikroorganizmy obsahujú granule PHA.



Obrázok 19: Výsledok farbenia kolónií Nílskou červeňou. Vzorky NČ 1, NČ 4 a NČ 9 vykazujú fluorescenciu poukazujúcu na prítomnosť lipidických štruktúr v pozorovaných bunkách, kolónie na miske NČ 8 fluorescenciu nevykazujú.

Z výsledných kultúr, ktoré prešli opísaným čistením, boli vybrané 4 vzorky, z ktorých bola izolovaná DNA a zisťované gény *phaC* a *16S-rRNA*. U všetkých štyroch vzoriek boli oba gény potvrdené. Gél s detekovanými PCR produktami zobrazuje Obrázok 20 (vzorky 3–6).

Na médium M3 bez Nílskej červene boli naočkované aj dve vzorky z tekutej kultivácie podrobovanej metóde „aeróbne dynamické kŕmenie“. Obe obsahovali gén *phaC* (Obrázok 20: vzorky 1 a 2, Tabuľka 8: označenie A1, A2).



Obrázok 20: Agarózový gél so zobrazenými PCR produktami vzoriek 1–6. R - rebríček štandardu, NK - negatívna kontrola, PK - pozitívna kontrola.

Amplifikované úseky génov *16S-rRNA* a *phaC* šiestich vybraných izolátov (vzorky 1–6) boli prečistené a poslané na sekvenáciu. Zoznam vybraných vzoriek a označenie získaných izolátov DNA sú uvedené v Tabuľka 8.

Tabuľka 8: Zoznam vybraných vzoriek a označenie izolátov DNA; prečistené PCR produkty týchto vzoriek boli zaslané na sekvenáciu.

vzorka	označenie izolátu	prítomnosť génu <i>phaC</i>	prítomnosť génu <i>16S-rRNA</i>
A1	1	+	+
A2	2	+	+
NČ 1	3	+	+
NČ 9a	4	+	+
NČ 9b	5	+	+
NČ 4	6	+	+

Médium M3 sa osvedčilo ako z hľadiska kultivácie termofilných mikroorganizmov, tak aj pre rast druhov obsahujúcich gén *phaC*. Gén bol potvrdený aj u opakovane preočkovaných vzoriek.

Selekčná metóda, pri ktorej sa kolónie farbili Nílskou červeňou, sa ukázala ako efektívna pri hľadaní termofilných producentov PHA vo vzorke aktivovaného kalu.

4.4 Sekvenácia génov *phaC* a *16S-rRNA*

Bolo vybraných 6 izolátov s preukázaným *phaC* génom, ktorých amplifikované úseky DNA kódujúce gény *phaC* a *16S-rRNA* boli zaslané na osekvenovanie. Gén kódujúci 16S podjednotku ribozomálnej RNA sa používa na identifikáciu baktérií až na úrovni druhov. Cieľom sekvenácie tohoto génu bolo zistenie, či sú získané kultúry polymikrobiálne, alebo tvorené jedným bakteriálnym druhom. V prípade čistej kultúry taktiež zistiť, o aký bakteriálny druh sa jedná.

Výsledky porovnania sekvencií génu *16S-rRNA* jednotlivých vzoriek s databázou sú uvedené v Tabuľka 9.

Tabuľka 9: Výsledky sekvenácie úsekov DNA kódujúcich *16S-rRNA* vzoriek 1–6.

vzorka	mikroorganizmus	zhoda
1	<i>Anoxybacillus rупiensis</i>	100 %
	<i>Anoxybacillus</i> sp.	100 %
2	<i>Anoxybacillus rупiensis</i>	100 %
3	<i>Anoxybacillus rупiensis</i>	100 %
	<i>Anoxybacillus</i> sp.	100 %
	<i>Geobacillus</i> sp.	100 %
4	<i>Anoxybacillus</i> sp.	100 %

5	<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	100 %
	<i>Anoxybacillus rupiensis</i> sp.	100 %
6	<i>Anoxybacillus</i> sp.	99 %

Sekvencie génu *16S*-rRNA všetkých vzoriek sa podľa databázy NCBI Nucleotide BLAST zhodovali so sekvenciami génu *16S*-rRNA náležiacimi rodu *Anoxybacillus*. Väčšina výsledkov poukazovala na druh *Anoxybacillus rupiensis*, avšak sekvencie génu *16S*-rRNA jednotlivých druhov rodu *Anoxybacillus* sú si veľmi podobné (92–99% podobnosť) [63]. Z toho dôvodu nie je možná jednoznačná klasifikácia až na úrovni druhov len na základe jedného identifikačného údaju. U vzorky č. 3 bola zistená aj zhoda s rodom *Geobacillus*, ktorý je spolu s rodmi *Saccharococcus* a *Aeribacillus* taxonomicky najviac príbuzný rodu *Anoxybacillus* [63].

Rod *Anoxybacillus* je známy pomerne krátku dobu, v porovnaní s príbuznými rodmi *Bacillus* alebo *Geobacillus*. Názov pochádza od prvých objavených druhov, ktoré mali anaeróbny charakter. Postupne boli objavené druhy fakultatívne anaeróbne, fakultatívne aeróbne i aeróbne, rodový názov však ostal nezmenený. Väčšina druhov rodu *Anoxybacillus* má optimálnu teplotu rastu v rozmedzí 50–65 °C. Sú alkalofilné či alkalo-tolerantné, väčšina z nich však dokáže rásť pri neutrálnom pH.

Druhy rodu *Anoxybacillus* sú vďaka svojim vlastnostiam zaujímavé pre radu biotechnologických procesov. Vyznačujú sa rýchlym rastom, znesú extrémne podmienky a ich enzýmy sú termostabilné a tolerantné voči alkalickému prostrediu. Svoje uplatnenie nájdu aj vo viacerých oblastiach bioremediácie [63]. Sú schopné odstraňovať farbivá z odpadových vôd, ktorých teplota dosahuje 40–60 °C [64]. Inou možnosťou je bioremediácia ťažkých kovov, napr. ortuti [65]. Produkcia PHA podľa dostupnej literatúry u rodu *Anoxybacillus* zatiaľ pozorovaná nebola.

4.5 Hľadanie génov pre iné typy PHA-syntáz

4.5.1 PHA-syntázy II. triedy

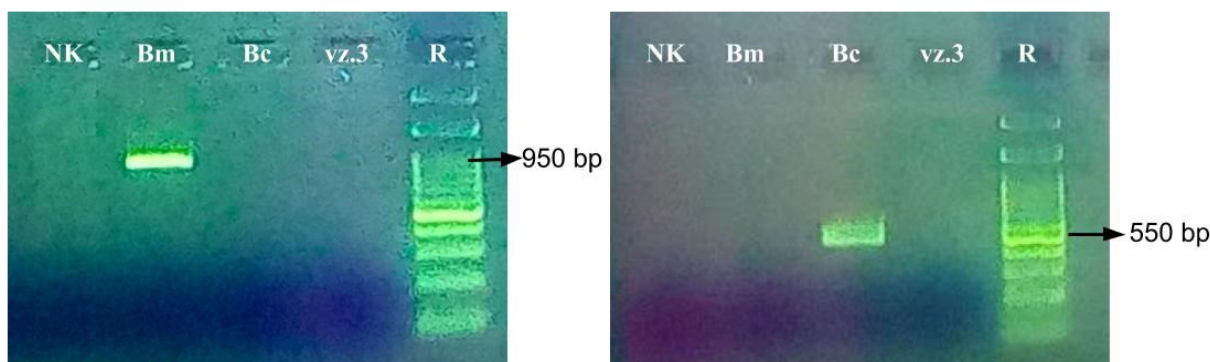
Šesť vybraných vzoriek s potvrdeným génom *phaC* bolo otestovaných aj na prítomnosť génu *phaC1*. Testovanie prebiehalo za pomoci PCR s využitím dvojice primerov E-D/E1R, špecifických pre gén *phaC1*. Pozitívny výsledok by poukazoval na schopnosť tvorby mcl-PHA. Z vybraných vzoriek ale žiadna gén *phaC1* neobsahovala.

4.5.2 PHA-syntázy IV. triedy

Porovnaním sekvencií génov *16S*-rRNA s databázou sa zistilo, že vyizolované kultúry náležia do čeľade *Bacillaceae*, pre ktorú sú charakteristické PHA-syntázy IV. triedy. Ich hlavnými predstaviteľmi sú *Bacillus megaterium* a *Bacillus cereus*. Gény pre PHA-syntázy týchto dvoch druhov sa čiastočne líšia, boli preto objednané 2 sady primerov. Primery *phaCBm-F/phaCBm-R* sú zamerané na typ PHA-syntázy, ktorým disponuje *B. megaterium*, kým dvojica *phaCBc-F/phaCBc-R* cieľi na PHA-syntázu baktérie *B. cereus*.

Prítomnosť tohto typu enzýmov bola overovaná v DNA vyizolovanej z narastených kultúr *B. megaterium* a *B. cereus*, ako aj vo všetkých šiestich vzorkách. Obrázok 21 zobrazuje výsledky

z PCR uskutočnenej pre izoláty oboch baktérií a vzorku č. 3 zo získaných izolátov 1–6. Veľkosti amplifikovaných fragmentov sa približne zhodujú s literatúrou, na základe ktorej boli primery objednané.



Obrázok 21: Výsledky PCR s primerami pre *phaC* gén *B. megaterium* (vľavo) a *B. cereus* (vpravo). NK - negatívna kontrola, Bm - *B. megaterium*, Bc - *B. cereus*, vz.3 - vzorka č. 3 z izolátov, R - rebríček štandardu. Šípka značí odhadnutú dĺžku amplikónu podľa rebríčku.

V čistých kultúrach *B. megaterium* a *B. cereus* boli gény pre príslušnú PHA-syntázu potvrdené. Amplifikácia fragmentov DNA izolovanej z *B. megaterium* sa s použitím primerov pre *B. cereus* nepodarila, rovnako ani naopak. Použité primery sú zrejme vysoko špecifické. Vo vzorkách 1–6 taktiež k amplifikácii cieľného úseku nedošlo, a to ani s jednou sadou primerov. Vzhľadom k zmienenej špecifickosti primerov však nie je vylúčené, že skúmané kultúry PHA-syntázu IV. triedy vo svojej enzymatickej výbave obsahujú. V tomto smere by bolo vhodné dôkladnejšie preskúmanie genetickej výbavy izolovaných vzoriek, napríklad s využitím všeobecnejších primerov pre PHA-syntázu IV. triedy.

4.6 Produkcia PHA s vybranými izolátmi

Inokulačné médiá boli zaočkované izolátmi 1–6 v objemoch 50 ml. Inokulá narástli pomerne slabo. Zvolené inokulačné médium (*médium PY*) im pravdepodobne nevyhovovalo. Po 24 hodinách kultivácie pri teplote 60 °C boli inokulá prevedené do produkčných médií (*médium M3*) v objemoch 100 ml, kde boli kultivované v rovnakých podmienkach. Po 48 a 72 hodinách bol z každej kultúry uskutočnený odber biomasy v objeme 10 ml. Sušina bola zvážená a bol v nej stanovený podiel PHA prostredníctvom plynovej chromatografie. Zistené koncentrácie biomasy jednotlivých vzoriek sú uvedené v *Tabuľka 10*.

Tabuľka 10: Obsah biomasy v g/l vo vzorkách 1–6 po 48 a 72 hodinách kultivácie.

vzorka	1	2	3	4	5	6
c(48)	0,88	0,70	1,01	1,34	1,00	1,08
c1(72)	1,00	0,95	0,75	0,70	0,79	1,22
c2(72)	1,04	1,09	1,00	0,97	0,70	0,60

Vo vzorkách nebol zistený takmer žiaden obsah PHA. Je možné, že zvolené médium nebolo pre baktérie vyhovujúce z hľadiska produkcie PHA.

4.6.1 Výber vhodného uhlíkového zdroja pre kultiváciu a produkciu PHA

Vzorky 1–6 boli naočkované na agarové misky s rôznymi uhlíkovými zdrojmi a prídavkom Nílskej červene.

Použité uhlíkové zdroje boli nasledovné:

- D-glukóza
- D-fruktóza
- laktóza monohydrát
- D-(+)-xylóza
- acetát sodný trihydrát
- propionát sodný
- acetát sodný trihydrát + propionát sodný
- D-glukóza + acetát sodný trihydrát
- kyselina levulinová
- kyselina DL-mliečna
- gama-butyrolaktón (GBL)
- odpadný glycerol

Na očkovanie boli použité narastené kultúry na miskách (vzorky 1, 2, 3, 4, 5, 6) a kryokonzervy (vzorky 2, 3, 6). Po 24 hodinách bol zhodnotený nárast kultúry na jednotlivých zdrojoch uhlíka a prostredníctvom UV-analyzátoru bola sledovaná fluorescencia Nílskej červene v jednotlivých vzorkách.

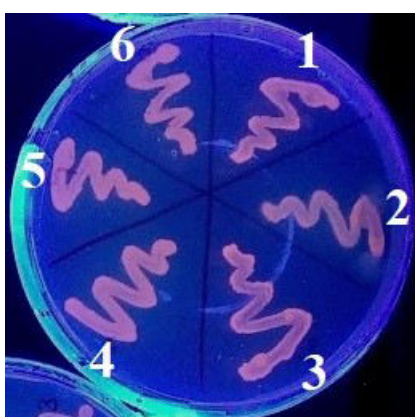
Najlepší nárast biomasy bol pozorovaný na médiu s prídavkom glukózy a odpadného glycerolu. Baktérie narastené na týchto médiách vykazovali zároveň aj veľmi dobrú fluorescenciu, čiže prítomnosť pomerne vysokých množstiev intracelulárnych lipidických štruktúr. Veľmi dobrá fluorescencia bola viditeľná aj u mikroorganizmov na médiách s fruktózou, xylózou, kyselinou mliečnou, GBL, acetátom a spoločným prídavkom glukózy a acetátu. Výrazne negatívny vplyv na rast všetkých vzoriek malo len médium s prídavkom kyseliny levulinovej. Tento uhlíkový zdroj izolované vzorky utilizovať zrejme nedokážu. Na všetkých ostatných zdrojoch uhlíka baktérie rástli pomerne dobre. Názorné zhrnutie výsledkov je uvedené v *Tabuľka 11*.

Tabuľka 11: Zhodnotenie nárastu baktérií a fluorescencie na rôznych uhlíkových zdrojoch. + + + : veľmi dobré, + + : dobré, - : nárast/fluorescencia neboli zaznamenané.

uhlíkový zdroj	očkované z pevných kultúr		očkované z kryokonzerv	
	nárast	fluorescencia	nárast	fluorescencia
glukóza	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
fruktóza	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
laktóza	+ + +	+ +	+ + +	+ +
xylóza	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
acetát	+ + +	+ + +	+ + +	+ +
propionát	+ +	+ +	+ + +	+ +
propionát + acetát	+ +	+ +	+ + +	+ +

glukóza + acetát	++	+++	+++	+++
kys. levulinová	–	–	–	–
kys. mliečna	+++	+++	++	+++
GBL	++	+++	+++	++
odpadný glycerol	+++	+++	+++	+++

Medzi vzorkami očkovanými z pevných kultúr a z kryokonzerv neboli zaznamenané výrazné rozdiely. Rovnako aj jednotlivé vzorky 1–6 sa na jednej miske správali vždy rovnako, z čoho je možné usudzovať, že sa u všetkých jedná o rovnaké, alebo veľmi blízke zloženie mikrobiálnej kultúry. *Obrázok 22* zobrazuje fotografiu misky obsahujúcej vzorky 1–6 naočkované na médiu s prídavkom glukózy.



Obrázok 22: Vzorky 1–6 na agarovom médiu s prídavkom glukózy.

4.6.2 Zopakovanie produkcie PHA s vybranými izolátmi

V prvom pokuse o produkciu PHA nebol v biomase vzoriek zistený takmer žiaden obsah PHA. Po naočkovaní vzoriek na rovnaké médium s Nílskou červeňou však všetky vydávali fluorescenciu zhodnú s pozitívnou kontrolou. Z tohto dôvodu bol pokus o produkciu zopakovaný.

Pre zopakovanie experimentu s produkciou PHA bola ako uhlíkový zdroj zvolená opäť glukóza, pretože v porovnávacom pokuse poskytla najlepšie výsledky z hľadiska rastu kultúry, aj obsahu lipidických štruktúr detekovaných pomocou Nílskej červene.

Ako inokulačné médium bolo tentoraz zvolené *médium M3*, ktoré bolo použité zároveň aj ako produkčné, keďže predchádzajúce inokulačné médium sa z hľadiska rastu izolátov neosvedčilo. Na tomto médiu inokulá narástli lepšie, avšak po 24 hodinách už neboli rovnomerne rozptýlené, ale tvorili zhluky, čo svedčí o prerastení kultúry. Podobne sa kultúry správali aj v médiu o objeme 100 ml, kde po 72 hodinách kultivácie boli už takisto vytvorené zhluky. Skúmané izoláty majú zrejme rýchlejšie prebiehajúce metabolické reakcie, čo s najväčšou pravdepodobnosťou súvisí s ich termofilnou povahou.

Z dôvodu rýchleho rastu mikroorganizmov bola vyskúšaná aj skrátená varianta kultivácie – 48 hodín produkčnej doby. Ani toto skrátenie ale nepomohlo, kultúry boli vyzrážané aj po 48 hodinách. V tejto fáze by bolo vhodné podrobnejšie zmapovanie rýchlosti rastu daných mikroorganizmov, napríklad zostrojením rastovej krivky. Podrobnejšie skúmanie

by bolo potrebné aj z hľadiska dynamiky tvorby PHA. Tieto aspekty sú už však nad rámec predloženej práce, preto ďalšie podmienky kultivácie a produkcie PHA už testované neboli.

Obsah PHA vo vzorkách sa prostredníctvom plynovej chromatografie opäť nepotvrdil.

Kvôli overeniu prítomnosti PHA boli vzorky skúmané ešte pomocou metódy FTIR (infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou), pomocou ktorej je možné sledovať PHA granule priamo v neporušených mikrobiálnych bunkách. Ani prostredníctvom tejto metódy sa obsah PHA nepotvrdil.

Zvolené médium sa z hľadiska produkcie PHA vybranými izolátmi neosvedčilo. Tekuté kultúry netvorili PHA a kultúry na miskách s Nílskou červeňou síce poskytli pozitívnu odozvu na prítomnosť lipidických častíc, metódou FTIR sa však obsah PHA granúl vyvrátil. Znamená to, že kultúry tvorili iné látky lipidového charakteru.

Následný prieskum dostupnej literatúry priniesol zistenie, že niektoré druhy rodu *Anoxybacillus* disponujú unikátnym lipidovým vybavením. Konkrétne u druhu *Anoxybacillus rupiensis* boli podrobnou analýzou zistené jedinečné polárne lipidy, ako napríklad plazmalogény. Medzi zistenými polárnymi lipidmi prevažovali alanyl-, lyzyl- a glukozyl-fosfatidylglyceroly a kardiolipíny. Prostredníctvom ESI-MS/MS bolo medzi nimi identifikovaných takmer 200 molekulových druhov náležiacich do 9 tried polárnych lipidov [66].

Plazmalogény patria do skupiny éterových fosfolipidov, konkrétne ide o deriváty kyseliny sn-glycero-3-fosforečnej obsahujúcej éterovú väzbu v sn-1 pozícii alkenylovej skupiny. Súhrne sa označujú ako plazmenyl-fosfolipidy a bežne sa vyskytujú medzi živočíšnymi lipidmi, vrátane ľudských. Najvýznamnejšie sú plazmalogén fosfatidylcholín, plazmalogén etanolamín, plazmalogén fosfatidylglycerol a plazmalogén kyselina fosfatidová [66].

Napriek tomu, že izoláty 1–6 podľa výsledkov obsahovali gény pre syntézu PHA a i podľa fenotypových testov s využitím lipofilnej fluorescenčnej sondy Nílska červeň sa zdali byť PHA-pozitívne, ich schopnosť produkcie PHA nebola preukázaná. Kombinované testovanie fenotypu a genotypu je obvykle považované za komplexný spôsob detekcie a izolácie biotechnologicky zaujímavých mikrobiálnych kmenů. V tomto prípade však ani kombinácia sledovania pozitívnych fenotypových a genotypových znakov nevedla k izolácii PHA produkujúcich termofilných baktérií. Izoláty totiž nerealizovali metabolickú dráhu syntézy PHA, aj keď obsahovali gén kódujúci PHA-syntázu. Pozitívny výsledok farbenia kolónií Nílskou červeňou bol pravdepodobne spôsobený tým, že bunky produkovali vysoké množstvo intracelulárnych lipidov, ktoré pri tomto pokuse vykazujú podobnú fluroescenciu ako PHA granule.

5 Záver

Cieľom predloženej práce bola izolácia a identifikácia extrémofilných mikroorganizmov schopných produkcie polyhydroxyalkanoátov. Ako zdroj pre izoláciu bol vybraný aktivovaný kal z čističky odpadových vôd – polymikrobiálna kultúra obsahujúca termofilné mikroorganizmy.

Na kultiváciu mikroorganizmov bolo použitých niekoľko živných médií. Na *médiách M1* a *NB* rástli kultúry veľmi dobre, avšak na získavanie čistej kultúry producentov PHA sa ukázali ako nevhodné, keďže podporovali rast druhov, ktoré gén pre tvorbu PHA nemali. *Médium M2* sa osvedčilo z hľadiska hľadania producentov PHA – v prečistených kolóniách bol potvrdený gén *phaC*, avšak mikroorganizmy na ňom rástli veľmi slabo a pre produkciu by bolo nevhodné. Dobré výsledky z hľadiska rastu kultúr i čistenia kolónií poskytlo *médium M3*.

V jednotlivých vzorkách bola overovaná prítomnosť génov kódujúcich 16S-rRNA a PHA-syntázu prostredníctvom PCR. Pre dva objednané sady primerov (cieľených do oblasti génu pre PHA-syntázu IV. triedy) boli optimalizované annealingové teploty PCR. Ako vhodná annealingová teplota pre obe sady primerov bola zvolená teplota 55 °C.

K izolácii termofilných baktérií produkujúcich PHA z aktivovaného kalu bolo využitých niekoľko metód. Ako najefektívnejšie sa ukázali metóda „aeróbne dynamické kŕmenie“, ktorá viedla k selekcii druhov obsahujúcich gén pre PHA-syntázu a farbenie kolónií Nílskou červeňou, čo umožnilo detekciu kolónií obsahujúcich intracelulárne lipidické štruktúry. Tieto metódy viedli k vyizolovaniu pomerne čistých kultúr, ktorých prečistené amplikóny génov *phaC* a *16S-rRNA* boli zaslané na sekvenáciu. Všetky vzorky boli na základe identifikácie porovnaním sekvencií génov *16S-rRNA* zaradené k bakteriálnemu rodu *Anoxybacillus*, jedna zo vzoriek vykazovala rovnakú zhodu aj s taxonomicky príbuzným rodom *Geobacillus*. Väčšina vzoriek vykazovala 100% zhodu s druhom *Anoxybacillus rupiensis*.

Šesť vybraných izolátov bolo otestovaných na produkciu PHA. Ako uhlíkový zdroj bola použitá glukóza. Vo vzorkách však nebol obsah PHA zistený, ani plynovou chromatografiou, ani metódou FTIR. Z hľadiska produkcie PHA mohlo byť nevyhovujúce použité médium alebo nastavené podmienky.

Napriek faktu, že pri kultivácii získaných izolátov nebol v ich biomase zistený obsah PHA, všetky vzorky vykazovali pozitívne výsledky v genotypových (prítomnosť génu *phaC*) i fenotypových testoch (fluorescencia na médiu s prídavkom Nílskej červene). Izoláty zrejme produkovali veľké množstvo lipidov vykazujúcich pri farbení Nílskou červeňou podobnú fluorescenciu ako polyhydroxyalkanoáty. Mohlo by sa jednať o určité látky s protektívnou funkciou pre termofilné mikroorganizmy.

Optimalizácia produkcie PHA a bližšia identifikácia zistených lipidických štruktúr u získaných izolátov sú už nad rámec tejto práce, ale poskytujú zaujímavé možnosti pre ďalší výskum.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. KESHAVARZ, T., ROY, I.: Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology*, 2010, 13(3), ISSN 321-326.
2. MOŽEJKO-CIESIELSKA, J. a R. KIEWISZ.: Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*. 2016, (192), 271-282. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013.
3. IBRAHIM, M.H.A., WILLEMS, A., STEINBÜCHEL, A.: Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x. ISSN 13645072.
4. LOO, C.-Y., SUDESH, K.: Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2007, vol. 2, no. 2, p 31-57.
5. PHILIP, S., KESHAVARZ, T., ROY, I.: Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, vol. 82, p. 233-247. ISSN 0268-2575.
6. MUANGSUWAN, W., RUANGSUJ, P., CHAICHANACHAICHARN, P.: A novel nucleic lateral flow assay for screening of PHA-producing haloarchaea. *Journal of Microbiological Methods*. 2015, **116**, 8-14. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.06.012. ISSN 01677012.
7. SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y.: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 2000, **25**(10): 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700.
8. FLICKINGER, M. C., DREW, S. W.: *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, 1999, č. 5 (xvii, 2756 p.). ISBN 04711666851.
9. BHATI, R., MALLICK, N.: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. *Algal Research*, 2015, roč. 2015, č. 7, s. 78-85. DOI: 10.1016/j.algal.2014.12.003.
10. STEINBÜCHEL, A.: Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, **128**(3), 219-228. DOI: 10.1016/0378-1097(95)00125-O. ISSN 03781097.
11. CHEN, G.-Q., HAJNAL, I.: The 'PHAome'. *Trends in Biotechnology*. 2015, **33**(10), 559-564. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.006. ISSN 01677799.
12. PEDERSON, E. N., MCCHALICHER, C. W. J., SRIENC, F.: Bacterial Synthesis of PHA Block Copolymers. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(6), 1904-1911. DOI: 10.1021/bm0510101. ISSN 1525-7797.
13. WANG, Q., YANG, P., XIAN, M. et al.: Production of Block Copolymer Poly(3-hydroxybutyrate)- block -poly(3-hydroxypropionate) with Adjustable Structure from an Inexpensive Carbon Source. *ACS Macro Letters*. 2013, **2**(11), 996-1000. DOI: 10.1021/mz400446g. ISSN 2161-1653.

14. MENG, D-C., SHEN, R., YAO, H. et al.: Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, **29**(1), 24-33. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.02.013. ISSN 09581669.
15. OUYANG, S.-P., LIU, Q., FANG, L. et al.: Construction of *pha*-Operon-Defined Knockout Mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their Applications in Poly(hydroxyalkanoate) Production. *Macromolecular Bioscience*. 2007, **7**(2), 227-233. DOI: 10.1002/mabi.200600187. ISSN 16165187.
16. KIM, O., GROSS, R. A., HAMMAR, W. J. et al.: Microbial Synthesis of Poly(β -hydroxyalkanoates) Containing Fluorinated Side-Chain Substituents. *Macromolecules*. 1996, **29**(13), 4572-4581. DOI: 10.1021/ma960059j. ISSN 0024-9297.
17. CHEN, G.-Q., HAJNAL, I., WU, H. et al.: Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology*. 2015, **33**(10), 565-574. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799.
18. CHEN, G.-Q.: Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Monographs*. 2010, **14**, 18-34. DOI: 10.1007/978-3-642-03287_5_2.
19. ZOU, H., SHI, M., ZHANG, T. et al.: Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, **101**(20), 7417-7426. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISSN 0175-7598.
20. JIA, K., CAO, R., HUA, D. H., a LI, P.: Study of Class I and Class III Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases with Substrates Containing a Modified Side Chain. *Biomacromolecules*. 2016, **17**(4), 1477-1485. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00082. ISSN 1525-7797.
21. TAE-KWON, K., SHIN, H.-D., SEO, M.-C., et al.: Molecular Structure of PCR Cloned PHA Synthase Genes of *Pseudomonas putida* KT2440 and Its Utilization for Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoate Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003, **13**(2), 182-190.
22. TSUGE, T., HYAKUTAKE, M., MIZUNO, K.: Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(15), 6231-6240. DOI: 10.1007/s00253-015-6777-9. ISSN 0175-7598.
23. NAYAK, P. K., MOHANTY, A. K., GAONKAR, T. et al.: Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for *phaC* Gene of *Bacillus megaterium*. *ISRN Bacteriology*. 2013, **2013**, 1-12. DOI: 10.1155/2013/562014. ISSN 2314-6273.
24. ZHAO, H., YAO, Z., CHEN, X.: Modelling of microbial polyhydroxyalkanoate surface binding protein PhaP for rational mutagenesis. *Microbial Biotechnology*. 2017, **10**(6), 1400-1411. DOI: 10.1111/1751-7915.12820. ISSN 17517915.
25. REN, Q., RUTH, K., THÖNY-MEYER, L.: Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, **87**(1), 41-52. DOI: 10.1007/s00253-010-2530-6. ISSN 0175-7598.

26. RUTH, K., GRUBELNIK, A., HARTMANN, R.: Efficient Production of (R)-3-Hydroxycarboxylic Acids by Biotechnological Conversion of Polyhydroxyalkanoates and Their Purification. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(1), 279-286. DOI: 10.1021/bm060585a. ISSN 1525-7797.
27. MASOOD, F., CHEN, P., YASIN, T.: Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, **33**(3), 1054-1060. DOI: 10.1016/j.msec.2012.11.025. ISSN 09284931.
28. PRAMUAL, S., ASSAVANIG, A., BERGKVIST, M., SUNINTABOON, P. et al.: Development and characterization of bio-derived polyhydroxyalkanoate nanoparticles as a delivery system for hydrophobic photodynamic therapy agents. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016, **27**(2), DOI: 10.1007/s10856-015-5655-4. ISSN 0957-4530.
29. RODRIGUEZ-PEREZ, S., SERRANO, A., PANTIÓN, A. A. et al.: Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*. 2018, **205**, 215-230. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.09.083. ISSN 03014797.
30. LI, X., JIN, Z., QIAN, Y.: Production of poly- β -hydroxybutyrate by activated sludge in sequencing batch reactor under aerobic conditions. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 2017, **32**(3), 733-738. DOI: 10.1007/s11595-017-1660-4. ISSN 1000-2413.
31. CAVAILLÉ, L., ALBUQUERQUE, M., GROUSSEAU, E.: Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture. *Bioresource Technology*. 2016, **201**, 65-73. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.003. ISSN 09608524.
32. RADDADI, N., CHERIF, A., DAFFONCHIO, D. et al.: Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(19), 7907-7913. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9. ISSN 0175-7598.
33. STETTER, K. O.: Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 1999, vol. 452, is. 1-2, s. 22-25.
34. ELLEUCHE, S., SCHÄFERS, C., BLANK, S.: Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology*. 2015, **25**, 113-119. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.011. ISSN 13695274.
35. ROTHSCCHILD, L. J., MANCINELLI, R. L.: Life in extreme environments. *Nature*. 2005, vol. 409, s. 1092-1101.
36. SIDDIQUI, K. S.: Defying the activity–stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, **37**(3), 309-322. DOI: 10.3109/07388551.2016.1144045. ISSN 0738-8551.
37. EDWARDS, C.: *Microbiology of extreme environments*. New York: McGraw-Hill. 1990. 218 s.

38. WOOSTER, R.: Biscuit Basin, Yellowstone National Park. In: *Roland Wooster Photography* [online]. 2007 [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: <http://www.rolandwooster.com/Geysers%20&%20Caves/slides/Biscuit%20Basin.html>
39. TANGO, M. S. A., ISLAM, M. R.: Potential of Extremophiles for Biotechnological and Petroleum Applications. *Energy Sources*. 2010, **24**(6), 543-559. DOI: 10.1080/00908310290086554. ISSN 0090-8312.
40. OREN, A.: Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline systems [online]. 2008, vol. 4. [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.salinesystems.org>>.
41. HORIKOSHI, K., GRANT, W. D.: Extremophiles: Microbial life in extreme environments. 1998. 322 s. ISBN 0-471-02618-2
42. YANG, Y., LEVICK, D. T., JUST, C. K.: Halophilic, Thermophilic, and Psychrophilic Archaea: Cellular and Molecular Adaptations and Potential Applications. The Journal of Young Investigators [online]. 2009, vol. 19, is. 11 [cit. 2009-05-01]. Dostupný z: <<http://www.jyi.org>>.
43. PANTAZAKI, A., PRITSA, A., KYRIAKIDIS, D. et al.: Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, **58**(1), 1-12. DOI: 10.1007/s00253-001-0843-1. ISSN 0175-7598.
44. PANTAZAKI, A. A., TAMBAKA, M. G., LANGLOIS, V. et al.: Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004, **254**(1/2), 173-183. DOI: 10.1023/A:1027373100955. ISSN 03008177.
45. PANTAZAKI, A. A., PAPANEPHYTOU, C. P., PRITSA, A. G.: Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*. 2009, **44**(8), 847-853. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.002. ISSN 13595113.
46. XU, F., HUANG, S., LIU, Y., CHEN, S. et al.: Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: a good candidate for large-scale production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, **98**(9), 3965-3974. DOI: 10.1007/s00253-014-5524-y. ISSN 0175-7598.
47. CUI, B., HUANG, S., XU, F.: Improved productivity of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) in thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1 using glycerol as the growth substrate in a fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(14), 6009-6019. DOI: 10.1007/s00253-015-6489-1. ISSN 0175-7598.
48. SHEU, D.-S., CHEN, W.-M., YANG, J.-Y. et al.: Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009, **44**(5), 289-294. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.01.004. ISSN 01410229.
49. MOUSSA, M.S., SUMANASEKERA, D. U., IBRAHIM, S. H. et al.: Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research*. 2006, **40**(7), 1377-1388. DOI: 10.1016/j.watres.2006.01.029. ISSN 00431354.

50. DAIMS, H., TAYLOR, M. W., WAGNER, M.: Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends in Biotechnology*. 2006, **24**(11), 483-489. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.09.002. ISSN 01677799.
51. AERATED ACTIVATED SLUDGE TREATMENT EFFICIENCY. In: *Water technology* [online]. Birmingham: Grand View Media Group, 2017 [cit. 2017-12-21]. Dostupné z: <https://www.watertechonline.com/sludge-treatment-efficiency/>
52. TANSEL, B.: Morphology, composition and aggregation mechanisms of soft bioflocs in marine snow and activated sludge: A comparative review. *Journal of Environmental Management*. 2018, **205**, 231-243. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.09.082. ISSN 03014797.
53. GE, G., ZHAO, J., LI, X.: Effects of influent COD/N ratios on nitrous oxide emission in a sequencing biofilm batch reactor for simultaneous nitrogen and phosphorus removal. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), DOI: 10.1038/s41598-017-06943-0. ISSN 2045-2322.
54. CHUA, A. S.M, TAKABATAKE, H., SATOH, H. et al.: Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*. 2003, **37**(15), 3602-3611. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00252-5. ISSN 00431354.
55. YUAN, Q., SPARLING, R., OLESZKIEWICZ, J.: Polyhydroxybutyrate Production from Municipal Wastewater Activated Sludge with Different Carbon Sources. *Air, Soil and Water Research*. 2015, **8**. DOI: 10.4137/ASWR.S27218. ISSN 1178-6221.
56. MARANG, L., VAN LOOSDRECHT, M. C.M., a KLEEREBEZEM, R.: Enrichment of PHA-producing bacteria under continuous substrate supply. *New Biotechnology*. 2018, **41**, 55-61. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.12.001. ISSN 18716784.
57. BENGTTSSON, S., WERKER, A., CHRISTENSSON, M. et al.: Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*. 2008, **99**(3), 509-516. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.020. ISSN 09608524.
58. BENGTTSSON, S., KARLSSON, A., a ALEXANDERSSON, T.: A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale. *New Biotechnology*. 2017, **35**, 42-53. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.11.005. ISSN 18716784.
59. EDWARDS, K. J., KAUFMANN, M. E. a SAUNDERS, N. A.: Rapid and Accurate Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, **39**(9), 3047-3051. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3047-3051.2001. ISSN 0095-1137.
60. REVELO ROMO, D. M., GROSSO, M. V., MORENO SOLANO, N. C. et al.: A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007, **10**(3), 0-0. DOI: 10.2225/vol10-issue3-fulltext-13. ISSN 07173458.
61. NAYAK, P. K., MOHANTY, A. K., GAONKAR, T.: Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for

- phaC Gene of *Bacillus megaterium*. *ISRN Bacteriology*. 2013, **2013**, 1-12. DOI: 10.1155/2013/562014. ISSN 2314-6273.
62. CIBICHAKRAVARTHY, B., ABINAYA, S., PRABAGARAN, S. R.: Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, **103**, 613-620. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.100. ISSN 01418130.
63. GOH, K. M., KAHAR, U. M., CHAI, Y. Y. et al.: Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, **97**(4), 1475-1488. DOI: 10.1007/s00253-012-4663-2. ISSN 0175-7598.
64. DEIVE, F.J., DOMÍNGUEZ, A., BARRIO, T. et al.: Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). *Journal of Hazardous Materials*. 2010, **182**(1-3), 735-742. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.096. ISSN 03043894.
65. KRITTEE, K., BLUM, J. D., BARKAY, T. et al.: Mercury Stable Isotope Fractionation during Reduction of Hg(II) by Different Microbial Pathways. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*. 2008, **42**(24), 9171-9177. DOI: 10.1021/es801591k. ISSN 0013-936X.
66. ŘEZANKA, T., KAMBOUROVA, M., DEREKOVA, A. et al.: LC–ESI–MS/MS Identification of Polar Lipids of Two Thermophilic *Anoxybacillus* Bacteria Containing a Unique Lipid Pattern. *Lipids*. 2012, **47**(7), 729-739. DOI: 10.1007/s11745-012-3675-0. ISSN 0024-4201.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PHA	polyhydroxyalkanoát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>b</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>b</i> -3-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>b</i> -4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>b</i> -4-hydroxybutyrát)
P(3HP- <i>b</i> -4HB)	poly(3-hydroxypropionát- <i>b</i> -4-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>b</i> -3HHx)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>b</i> -3-hydroxyhexanoát)
P(3HB- <i>b</i> -3HP)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>b</i> -3-hydroxypropionát)
3HHx	3-hydroxyhexanoát
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
scl PHA	short-chain-length polyhydroxyalkanoáty
mcl PHA	medium-chain-length polyhydroxyalkanoáty
A	adenín
T	tymín
C	cytozín
G	guanín
PCR	polymerázová reťazová reakcia
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovým ionizačným detektorom
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia