



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ROLE EXTRACELULÁRNÍ DNA V MIKROBIÁLNÍM
BIOFILMU**

ROLE OF EXTRACELLULAR DNA IN MICROBIAL BIOFILMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Anton Gromov

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1136/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Anton Gromov**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Role extracelulární DNA v mikrobiálním biofilmu

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Optimalizace metod pro kvantifikaci a charakterizaci eDNA
3. Studium vlivu přítomnosti eDNA na strukturu a vlastnosti bakteriálního biofilmu

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Anton Gromov
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na studium role extracelulární DNA v mikrobiálním biofilmu. Práce zahrnuje vlastnosti biofilmů, funkce biofilmů a rovněž funkce a vlastnosti extracelulární DNA v biofilmu. V teoretické části je popsán proces vzniku biofilmu a vliv působení různých typů stresů na něj. Práce rovněž pojednává o roli biofilmu u bakterií či o jeho způsobech rozmnožování. Zajímavé je také pojednání o působení antibiotik na biofilm, o způsobech získávání eDNA či o využití DNAsy. V některých kapitolách byly důkladně probrány funkce eDNA a vliv její přítomnosti na obranu bakterie. V experimentální části byl zjišťován obsah biofilmu a byl porovnán s buňkami, které rostly v tekutém a pevném mediu. Bylo provedeno měření obsahu DNA v médiích a měřen byl také vliv solného a teplotního stresu na biofilm. Zároveň byl v biofilmu změřen obsah celkových proteinů, sacharidů, obsah PHB a redukujících cukrů. Na základě výsledků experimentu bylo zjištěno, že biofilm buňku velice dobře chrání před velkým osmotickým tlakem a teplotním stresem. Stresové podmínky také ovlivňovaly produkci PHB, jenž je využíván jako rezervní forma energie a uhlíku. Pro studium vlivu stresu na obsah makromolekul byl pomocí antronového reagentu změřen obsah celkových cukrů. Za pomoci gelové elektroforézy byla nejprve zkontrolována přítomnost eDNA v biofilmech a planktonických buňkách a pak za využití různých spektrofotometrických metod byla stanovena přesná koncentrace v planktonických a biofilmových buňkách.

Abstract

This bachelor's thesis deals with defining the role of extracellular DNA in microbial biofilms. The thesis includes a part about the basic characteristics and functions of biofilms, as well as the characteristics and functions of extracellular DNA. The theoretic part additionally deals with the process of formation of biofilms, and the influence of different types of stresses on it. Also, the paper discusses the role of such stresses. The role of biofilm in bacteria and their reproduction methods are also discussed. An interesting section of the thesis outlines the impact of antibiotics on biofilms, or the ways to gain DNA or use DNase. The eDNA functions and their effects on bacterial defence will be discussed thoroughly. In the experimental part, the biofilm content was examined and compared with cells growing in a liquid and solid medium. Measurement of DNA content in media was carried out and the effects of salt and temperature stresses on biofilm were also measured. Stress conditions affected the production of PHB, which is used as a reserve form of energy and carbon. Total sugars were measured using an anthracite reagent to study the effects of stresses on the content of macromolecules. The presence of eDNA in biofilms and planktonic cells was firstly checked using gel electrophoresis and then accurate concentrations in planktonic and biofilm cells were determined using different spectrophotometric methods.

Klíčová slova

Biofilm, kultivace, quorum sensing, extracelulární polymerní substance, extracelulární DNA, antibiotika, tvorba biofilmu

Keywords

Biofilm, quorum sensing, extracellular polymeric substance, extracellular DNA, antibiotics, biofilm formation

GROMOV, Anton. Role extracelulární DNA v mikrobiálním biofilmu. Brno, 2017. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v brně. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

Prohlášení

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

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., Ing. Pavle Benešové, Ing. Ivě Pernicové a Ing. Danu Kučerovi za cenné rady, připomínky, pomoc při práci v laboratoři, trpělivost, ochotu a vstřícný přístup. Dále bych také rád poděkoval své přítelkyni, za velkou podporu při psaní bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část.....	7
2.1	Obecná charakteristika biofilmů	7
2.2	Tvorba biofilmu	8
2.3	Metody kultivace biofilmu.....	9
2.4	Komunikace v biofilmu	10
2.5	Extracelulární polymerní substance (EPS)	10
2.6	Působení antibiotika na biofilm	11
2.7	Role eDNA v biofilmech	11
2.8	Vliv stresových faktorů na tvorbu biofilmu.....	14
3	Experimentální část	16
3.1	Mikrobiální kmeny, chemikálie a přístrojové vybavení	16
3.1.1	Použité mikroorganismy.....	16
3.1.2	Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů.....	16
3.1.3	Ostatní chemikálie	16
3.1.4	Přístroje a pomůcky	16
3.2	Kultivace bakterií.....	17
3.3	Postupy při stanovení obsahu biofilmu.....	17
3.3.1	Stanovení koncentrace PHA.....	17
3.3.2	Stanovení kalibrační přímky koncentrace PHA	18
3.3.3	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5 – dinitrosalicylové kyseliny.....	18
3.3.4	Stanovení obsahu celkových sacharidů za pomoci Antronu	18
3.3.5	Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou	19
3.3.6	Stanovení 2'-deoxypentosových sacharidů pomocí Dischovy difenylaminové zkoušky.....	19
3.3.7	Analýza DNA horizontální elektroforézou.....	20
3.3.8	Analýza DNA pomocí spektrofotometru s využitím nástavce NanoDrop.	20
4	Výsledky a diskuze	21
4.1	Kalibrace metod	21
4.1.1	Stanovení obsahu PHB v sušině	21
4.1.2	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny.....	21
4.1.3	Stanovení obsahu celkových sacharidů za pomoci Antronu	22
4.1.4	Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou	22
4.1.5	Stanovení 2'-deoxypentosových cukrů pomocí Dischovy difenylaminové zkoušky	23
4.2	Stanovení obsahu PHB v sušině	23
4.2.1	Vliv solného stresu na obsah PHB	23

4.2.2	Vliv teplotního stresu na obsah PHB.....	24
4.3	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny.....	26
4.3.1	Koncentrace redukujících sacharidů při teplotním stresu.....	26
4.3.2	Koncentrace redukujících sacharidů při solném stresu	27
4.4	Stanovení obsahu cukrů za pomoci Anthronu	29
4.4.1	Koncentrace celkových sacharidů při teplotním stresu	29
4.4.2	Koncentrace celkových sacharidů u solného stresu	30
4.5	Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou.....	31
4.5.1	Stanovení celkových proteinů při teplotním stresu	31
4.5.2	Stanovení celkových proteinů při solném stresu	33
4.6	Analýza DNA horizontální elektroforézou.....	34
4.7	Stanovení 2'-deoxypentosových cukrů pomocí Dischovy difenylaminové zkoušky.....	35
4.7.1	Analýza DNA pomocí spektrofotometru s využitím nástavce NanoDrop. 37	
5	Závěr.....	39
6	Literatura	41
7	Seznam použitých zkratk	45

1 Úvod

Biofilmy se nachází u více než 80% chronických infekčních a zánětlivých chorob. V soustavě biofilmu jsou bakterie chráněny před imunitním systémem pacienta a před antibakteriálními preparáty. V potravinářském průmyslu vznik biofilmu na potravinách zvyšuje riziko kontaminace patogenními mikroorganismy. Důsledkem vzniku biofilmu v potrubí, na naftových stanicích či různých zařízeních je koroze těchto povrchů, která způsobuje závažné potíže.

Prokaryotické buňky můžeme v přírodě najít ve dvou formách, přičemž využívají dvě různé strategie přežití. Planktonické populace, které se aktivně dělí a mají vyvinutý aktivní a pasivní systém formy pohyblivosti, se rychle rozšiřují v prostředí. Usedlé buňky (*sessile cells*) jsou naopak charakterizovány malou rychlostí růstu populace a schopností specifické adheze a tvorby buněčných konsorcií. Takové buňky tvoří biofilmy se složitým systémem regulace fyziologických procesů. Tato strategie je výhodná z evolučního hlediska, například 99% zástupců taxonomického druhu *Bacteria* je schopno tvořit biofilm [7].

V dnešní době studují vědci biofilmy nejen proto, aby zabránili jejich vzniku, také aby se o nich naopak dozvěděli více jako o velice zajímavé životní strategii. Existuje mnoho způsobů, jak využít bakterie tvořící biofilm. Jedním z nich je například jejich použití při produkci různých biodegradabilních polymerů. V ruském jezeře Bajkal se provádí kontrola stavu čistoty vody pomocí odběru biofilmu z jeho dna, protože mikroorganismy v soustavě biofilmu dokáží přinést víc enviromentálních informací než planktonické buňky. Biofilmy mohou sloužit k biologickému čištění vody a mohou zabezpečit odolnost bakterií před působením toxických látek nacházejících se v prostředí. Vznik biofilmu na rostlině může zabránit vzniku různých onemocnění.

V této práci bylo porovnáváno složení biofilmu bakterií *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* při teplotním a solném stresu. Pro porovnání biofilmových a planktonických kmenů byly bakterie kultivovány v tekutém a pevném mediu. V obsahu biofilmu bylo sledováno množství bílkovin a množství redukujících a celkových sacharidů. Rovněž se bylo porovnáno množství vzniklé eDNA při různých stresových podmínkách.

2 Teoretická část

2.1 Obecná charakteristika biofilmů

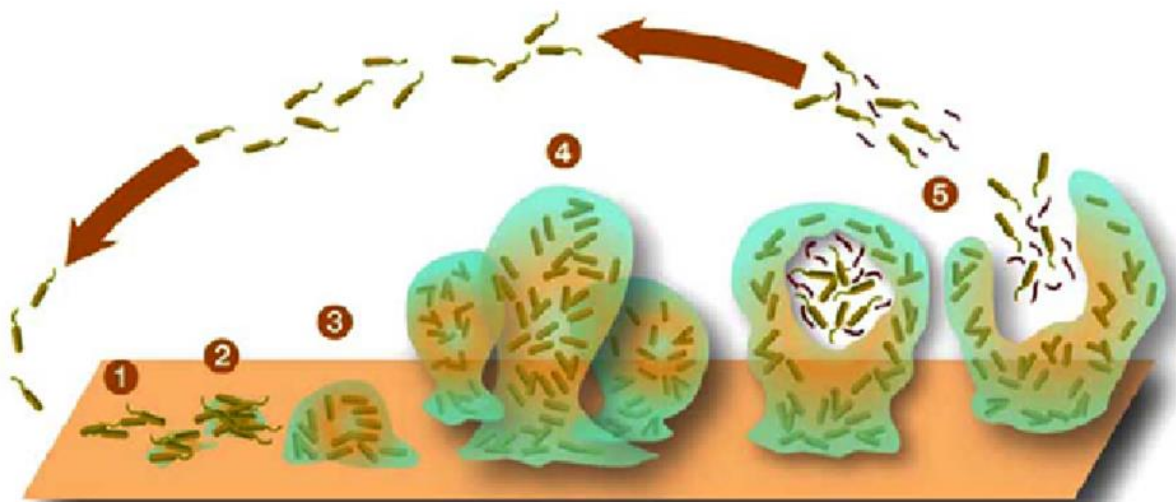
Biofilm je společenstvo mikroorganismů vázané k určitému povrchu a obklopené intracelulárním matrixem, který buňky v biofilmu vylučují. Biofilmy jsou útvary tvořené mikroorganismy žijícími společně v hydratovaném extracelulárním matrixu. Existence bakterií v biofilmu je výhodná z mnoha důvodů. Biofilm poskytuje bakteriálním buňkám ochranu ve formě bariéry, která je izoluje od jejich okolí. Buňky v biofilmu vykazují vyšší metabolickou aktivitu a způsobují tak lepší adhezi. Tato adheze k biologickému povrchu (k buňkám tkáně a ke stěnám cév) je způsobena specifickou interakcí bílkovin adhezínů či lektinů, vyskytujících se v endoplazmatickém kompartmentu bakteriální buňky, s receptorem nebo s určitou doménou povrchu membrány buňky. Důležitým polysacharidem podílejícím se na adhezi je *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA), který je odpovědný nejen za substrátovou adhezi, ale také za vznik buněčných skupin (buňka-buněčná adheze) [1, 2].

Další zajímavou složkou exoplazmatické části buňky je *£-toxin*, který je u stafylokoků kódován genem *hla*. *£-toxin* je odpovědný za vznik pórových kanálů na eukaryotní membráně (jeden z faktorů virulentnosti) a vyznačuje se také adhezivní schopností. Buňky s porušenou syntézou PIA nebo *£-toxinu* nejsou schopny tvořit biofilm. U gram-negativních bakterií hrají při vzniku biofilmu důležitou roli bičíky a fimbrie čtvrtého typu. V pokusech s *Pseudomonas aeruginosa* bylo dokázáno, že buňky, ve kterých došlo ke změně genomu odpovědnému za vývoj bičíku a fimbrií, nejsou schopny vytvářet biofilm. Povrchový amorfní obal vzniká postupně z polysacharidů, které buňka buď produkuje, nebo vzniká při jejich částečném zničení. Po čase se začínají přidávat další vrstvy, které mohou být tvořeny z bílkovin a polysacharidů.

Mezi buňkami se nachází látka zvaná extracelulární matrix. V soustavě takového matrixu se mohou nacházet různé organické látky, jako např. bílkoviny, polysacharidy a další. V matrixu mohou být zakotveny membránové bubliny. Je známo, že počet bublin se mění v závislosti na kultivaci a obvykle se zvětšuje při nežádoucích podmínkách. Uvnitř se mohou nacházet polysacharidy, lipidy, bílkoviny, různé toxiny také nukleové kyseliny, které se mohou vyskytovat jak uvnitř, tak i vně struktury biofilmu. Transportní kanálky jsou odpovědné za transport živin. Nejčastěji takový transport slouží k formování povrchové vrstvy. Některé sloučeniny nacházející se v bublinách také napomáhají k degradaci antibiotik [3].

2.2 Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmu začíná absorpcí na povrch bakterie. Po nějaké době dochází k tvorbě prvotního biofilmu. Dále dochází k produkci extracelulárního matrixu. Biofilm začíná růst a může docházet k tvorbě různorodých struktur. Po kompletním zformování biofilmu dochází k jeho otevření a uvolnění bakterie, jež vede k vytvoření nového biofilmu. Celý tento proces je popsán na obrázku číslo 1.



Obrázek č. 1: Tvorba biofilmu: 1) Vazba bakterie k povrchu (absorbce), 2) Vznik jednovrstevného biofilmu, 3) Produkce extracelulárního matrixu, 4) Maturace biofilmu a vytváření trojrozměrné struktury, 5) Uvolňování buněk pro vytváření nového biofilmu [4]

Biofilm se dá rozdělit na dvě části – první z nich jsou bakterie, které tvoří mikrokolonie, v těch se může vyskytnout několik různých druhů bakterií. Druhá část je matrix, který obsahuje hydratovanou směs extracelulárních polymerních látek, které drží buňky pohromadě a má vliv na adhezi – zastává roli v ochraně před antimikrobiálními látkami. Transportní systém biofilmu tvoří vodní kanály. Z chemického hlediska je matrix nehomogenní a má různé složení závislé na typu biofilmu. Ve většině případů tvoří extracelulární vrstvu ze 40-95 % polysacharidy (dextran, hyaluronová kyselina, celulóza, a další.). Bílkoviny mohou být obsaženy do 60 %, lipidy do 40 % a nukleové kyseliny do 1-20% [5]. Všechny tyto sloučeniny se nachází ve vodě, která zaujímá 80-90 % biofilmu. Matrix je rozdělen kanálky naplněnými vodou a obsahuje také dutiny a prázdná místa. Obrazně je můžeme přirovnat ke krevnímu oběhu buňky. Skrze kanálky prochází do biofilmu výživné látky a kyslík, a to způsobem od vnější k vnitřní části. Současně jsou z biofilmu vyvedeny metabolity bakteriálních buněk [6].

Výzkum za využití mikroelektrod prokázal, že periferní vrstvy v porovnání s jinými částmi biofilmu, v nichž vzniká anaerobní mezera, jsou více okyseleny. Za využití mikroelektrod se podařilo zjistit, že v hloubce 30 mikrometrů od povrchu koncentrace kyslíku v biofilmu prudce klesá. Takový pokles je způsoben změnou biochemických procesů probíhajících v buňkách. Buňky buď přechází na jiný typ dýchání, nebo snižují své potřeby kyslíku. Podrobně zkoumán byl proces přepínání

metabolismu z aerobního dýchání na anaerobní typ u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Takové přepínání metabolismu je způsobeno změnou konečného akceptoru kyslíku na molekuly nitrátů a nitritů v dýchacích cestách. V důsledku toho v buňce dochází ke přepnutí genové exprese a začíná syntéza metabolitů specifická pro aerobní dýchání: Nap – periplazmatická nitrátoreduktáza (periplasmic nitrate reductases); NarGHI, NarZYV – dýchací nitrátoreduktáza (respiratory nitrate reductase) a další. Klíčovou roli v přepínání aerobního metabolismu na anaerobní hraje regulátor transkripce Fnr (fumarát a nitrát reduktáza). Anaerobní subpopulace biofilmu *P. aeruginosa* má lepší odolnost vůči prostředí, a také je odolnější vůči působení antimikrobiálních látek [5].

Změna koncentrace kyslíku, živin, metabolitů buněk a kolísání kyselosti jsou odpovědné za vznik různorodých oblastí biofilmu. Taková adaptace vede ke vzniku populace s velmi silnou odolností vůči stresovým faktorům.

2.3 Metody kultivace biofilmu

Za posledních deset let došlo k rozšíření možností výzkumu mikrobiálních biofilmů. Hlavní směr výzkumů je spojen s vývojem metod kultivace mikroorganismů v dynamických (imitování reálných podmínek vzniku biofilmů) a statických podmínkách. Příkladem dynamické kultivace může být fermentor. Očkování mikroorganismu probíhá v planktonické fázi do kapalného růstového média, které cirkuluje v uzavřeném systému. K adhezi mikroorganismu dochází buď na povrchu nádoby, nebo na vnitřních částech fermentoru. Dalším příkladem dynamické kultivace může být Robinsonův přístroj a jeho různé modifikace. Tyto metody používají zařízení se složitou konstrukcí zabezpečující tok živin, které se stýkají s deskou z umělého nebo biologického materiálu, na kterém se nachází fyziologicky adaptované buňky mikroorganismu. Biofilm vzniká v důsledku konstantní dostupnosti živin a aeraci kyslíkem. U průtokové metody vzniká biofilm na povrchu průtokových otvorů silikonových trubek, přes které se za pomoci pumpy podává živné medium. Tato metoda napomáhá modelaci procesu vzniku biofilmu na abiotických objektech například na cévních katetrech. Hlavní výhodou dynamických metod je vznik biofilmu maximálně se podobajícího biofilmu vzniklému v podmínkách živých systémů [7].

Při statických metodách kultivace se nejčastěji využívají kultivační desky v různých modifikacích. Podstata metody je v tom, že se suspenze bakterií vnáší do důlku desky a po inkubaci při optimálních podmínkách můžeme planktonické bakterie odstranit a provést kvantitativní nebo kvalitativní analýzu biofilmu. Existuje velké množství modifikací této metody, příkladem může být metoda ALI (air-liquid interface). Kultivace u ní rovněž probíhá na deskách. Rozdílem je úhel, který je nastaven tak, aby se meniskus živného média dotýkal středu dna důlku. V tomto místě jsou nejlepší podmínky pro tvorbu biofilmu. Výhodou je dobrá vizualizace vzorku a také je umožněna jednoduchá manipulace se vzorkem [7].

Jako zvláštní způsob můžeme uvést metodu vymyšlenou D. E. Kadouri a kolektivem, která se nachází na rozhraní mezi dynamickým a statickým přístupem. V metodě se využívá desky se šesti důlky, na níž je ke každému důlku připojen systém přívodu a odvodu živného média. Po určité době inkubace dostatečné pro adhezi

se bakterie vyskytuje na povrchu důlku. Poté se připojí systém mikrocirkulace, který zabezpečuje optimální dostup živných látek k vznikajícímu biofilmu [8].

2.4 Komunikace v biofilmu

Stavba biofilmu díky těsnému a stabilnímu kontaktu jeho složek ideálně vyhovuje procesům výměny genetické informace. Buňky v biofilmu mohou komunikovat. Příkladem takové komunikace může být mořská bakterie *Vibrio fischeri*. Jedná se o bakterie, které jsou v případě, že kolem nich je dostatečné množství bakterií stejného druhu, schopny luminiscence. Tento způsob komunikace je nazýván **quorum sensing** (dále *QS*) [9].

QS také reguluje důležité procesy přechodu od planktonické buňky na usedlou buňku (sessile cell). V případě *Pseudomonas aeruginosa* jsou od začátku všechny zásoby využity na biosyntézu bičíků a specifických bílkovin adhezínů. Poté je tvorba bičíků a fimbrií biologicky nevýhodná, protože jejich součástí jsou silné imunogeny, které mohou narušit vznik biofilmu. Na konci tvorby biofilmu dochází k uvolňování buněk, a v této fázi je naopak vznik pohyblivých částí buňky podporován. Signální systémy pracují na principu autoindukce. Syntetizovaná signální molekula působí na vlastní buňku a časem dochází při ukládání v extracelulárním prostředí k aktivaci závislých promotorů – regulonů genomů buněk. U mnoha gramnegativních bakterií (např. *Acinebacter*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Erwina*, *Enterobacter*, *Chromobacterium*, *Hafnia*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* atd.) může docházet ke vzniku *QS* na bázi signální molekuly N-Acyl homoserin laktonu (AHL) [6]. *AHL* komunikace je většinou realizována uvnitř jednoho kmenu, ale často dochází ke křížové komunikaci (cross-talk communication), která zabezpečuje interakci různých populací mezi sebou [9]. Ve smíšených biofilmech *P.aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*, reaguje *Burkholderia* na signály *Pseudomonas* (která není citlivá na signály *Burkholderie*), což znamená že *P.aeruginosa* je schopna regulovat fyziologické procesy svého asistenta [9, 10].

U gramnegativních bakterií se nachází ještě dva typy kontaktu „těsné slepení“ a „cytoplazmatické můstky“. Představují části buněčné stěny, které jsou společné pro sousedské buňky. Cytoplazmatické můstky tvoří membránové trubice spojující buňky a mající uvnitř cytoplazmu. U grampozitivních bakterií se můžeme setkat pouze s těsným slepením. Určitým důkazem takové komunikace v kolonii může být diferenciací buněk. Buňky v závislosti na svém rozmístění mohou plnit rozdílné funkce [11].

2.5 Extracelulární polymerní substance (EPS)

Součástí EPS mohou být nukleové kyseliny. V biofilmech je eDNA odvozena z genomové DNA. eDNA je v ranějších biofilmech uspořádána do síťovité struktury. Ve starších biofilmech vytváří eDNA houbovitý útvar na dolní části biofilmu, eDNA se podílí na jeho stabilizaci [9]. Uvolnění eDNA je regulováno pomocí železa. Nejvyšší koncentrace eDNA je zde ve střední části biofilmu. Nízká koncentrace železa indukuje vývoj biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*, způsobí up-regulaci PQS genu a utváření

eDNA . Naproti tomu vysoká koncentrace železa potlačí vývoj biofilmu, způsobí down – regulaci PQS genů a tvorba eDNA je nižší [12].

Jak už bylo zmíněno, EPS napomáhá vzniku rezistence proti různým antimikrobiálním činidlům. Biofilmy *Pseudomonas aeruginosa* odolávají fagocytóze, kterou způsobují makrofágy aktivované interferonem γ , díky exopolysacharidu alginátu, který je součástí EPS [13].

Existuje několik hypotéz, které se zabývají možnými mechanismy obrany bakterií v biofilmu vůči antibiotikům. Podle jedné z nich extrapolymerní matrix zpomaluje difúzi látek. Matrix je nabit negativně a váže tak pozitivně nabitá antibiotika. Poskytuje biofilmu rezistenci vůči velkým molekulám, jako jsou lysozym nebo molekuly komplementu [14]. Anderl, Franklin a Steward [15] při testování průniku ampicilinu do biofilmu *Klebsiella pneumoniae* přišli na to, že antibiotikum není schopno pronikat do biofilmu díky enzymu β -laktamáze, který produkují bakterie. Avšak při použití stejného antibiotika na bakteriální biofilm bez laktamázy část buněk neodumřela. Z toho plyne, že k rezistenci bakterií vůči antibiotikům přispívají i jiné mechanismy než pouhá přítomnost β – laktamázy. Ty však dosud nejsou známy.

2.6 Působení antibiotika na biofilm

Mechanismus, který zvyšuje odolnost bakterií vůči antibiotikům v biofilmech, funguje na principu omezení jejich průniku přes biofilm, což je způsobeno složitou strukturou biofilmu a různými sloučeninami v jeho sestavě. Další omezení živin a změna prostředí způsobí v biofilmu pokles dělení buněk, v důsledku čehož je pro antibiotika těžší najít cíl. Různé adaptivní reakce mohou způsobovat změnu antimikrobiální funkce antibiotik. Také může u bakterií dojít ke genové změně v biofilmu a tím ke vzniku takové bakterie, která je vůči antibiotikům odolná nebo je pro ně neviditelná.

Antibiotika je možné rozdělit na dva typy. První je ten, který je schopen proniknout do biofilmu a utiskovat nebo zabíjet mikroorganismy uvnitř. Druhý typ téměř neproniká dovnitř, ale velmi efektivně zabraňuje migraci bakterií. K antibiotikům, která dobře pronikají přes fosfolipidovou dvojvrstvu, patří fluorochinony. Tato skupina může působit na původce urologických onemocnění. Takže je zcela zřejmé, že zvýšení efektivnosti léčiva není možné bez provedení testu, který zjišťuje schopnost průniku antibiotika do biofilmu a jeho působení. Vědci z univerzity Pastera v roce 2010 poprvé dokázali, že viry mohou také tvořit biofilmy. Například HTLV-1 retroviry mohou tvořit komplexy podobné biofilmům. Díky tomu jsou chráněny před imunitním systémem [16].

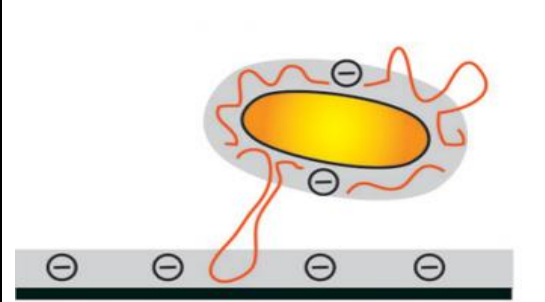
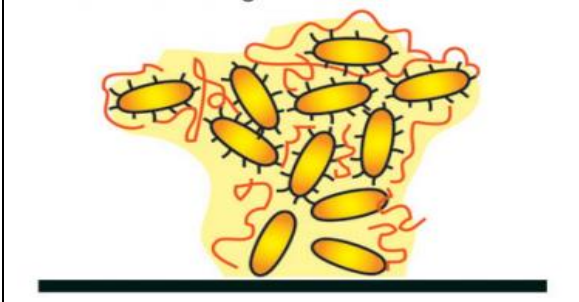
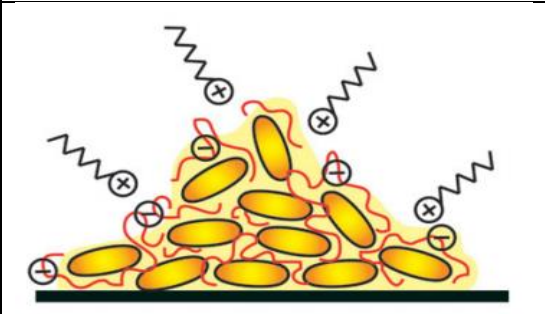
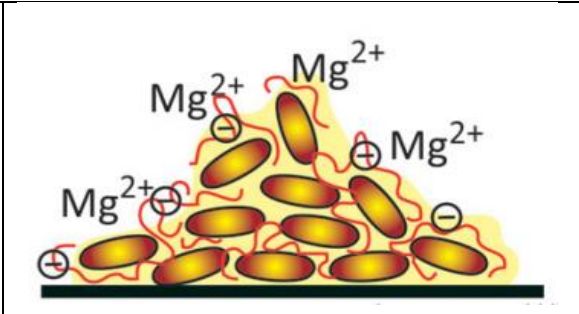
2.7 Role eDNA v biofilmech

Většina studií pátrajících po zdroji eDNA v biofilmu přišla na to, že eDNA v matrixu biofilmu je výsledkem buněčného rozpadu. Ten je řízen mechanismem *quorum sensing*. Další možnosti vzniku eDNA v matrixu je transport plazmidové DNA za pomoci vezikul. Proces je popsán na příkladu kultury *Pseudomonas aeruginosa* [17]. V práci je ukázáno, že plazmidová DNA je ukládána do vezikul, zatímco její chromozomální fragmenty zůstávají přilepené k její vnější membráně. Je známo, že při příznivých

podmínkách u některých bakterií syntéza DNA předbíhá rychlost dělení buněk. V důsledku toho můžeme získat buňku, která má víc než jeden chromozom. Není vyloučeno, že fragmenty takové DNA mohou být přítomny v extracelulárním matrixu.

Role eDNA v biofilmech byla poměrně dlouhou dobu přehlížena. Přítomnost eDNA sice známa byla, ale vědci nevěřili, že by sehrávala nějakou aktivní roli v biofilmu. Poprvé byl její funkční význam zjištěn a publikován Whitchurchem v roce 2002 [18]. Vědci přidali DNAsu do biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* a zjistili, že biofilm zmizel. Ukazuje se, že eDNA je jako adhezivní substance univerzální při formování biofilmu bakterií [19].

Tabulka č. 1: Tvorba a obrana bakterie z pomoci eDNA [19]

Tvorba eDNA v biofilmu	
	
<p>eDNA napomáhá adhezi skrze narušení odpudivé elektrické dvojité vrstvy.</p>	<p>eDNA zajišťuje stabilitu struktur a díky specifickým interakcím i pohyblivost biofilmu.</p>
Obrana eDNA v biofilmu	
	
<p>eDNA zachytává kationty antimikrobiálních peptidů z hostitelského imunitního systému.</p>	<p>eDNA zachytává bivalentní kationty, které spouští genovou odpověď při zvýšení přítomnosti patogenů a obranné mechanismy proti mikrobiotickým organismům.</p>

Adheze jednotlivých bakteriálních buněk k povrchu je v podstatě prvním stupněm formování biofilmu. Tento proces se skládá ze dvou částí. V první části se bakteriální buňky chovají jako netečné koloidní částice, které přichází do kontaktu s okolím v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. V následující části biologicky vytvořené adheziny ukotví buňky pevněji k povrchu. Obě tyto fáze jsou ovlivněny přítomností či nepřítomností eDNA v buněčném povrchu a přispívají k závěrečné interakční síle, která napomáhá překonat vzdálenost desítek nanometrů. Konkrétně

v druhé fázi adheze hraje eDNA velmi významnou roli. Tato hypotéza je podložena zjištěním, že DNA adsorbuje k povrchu jednotlivých bakteriálních buněk v dlouhých smyčkových formacích, které se táhnou až 300 nm po povrchu buňky. Extracelulární DNA rovněž ovlivňuje hydrofobicitu povrchu bakteriálních buněk. Vlastnost, která má různorodý vliv na tendenci navázání bakterií, závisí na relativní hydrofobicitě substrátu. Tvoří tak zvanou intracelulární spojku mezi matrixem biofilmu. Rovněž eDNA určitým způsobem hraje komplexnější roli v strukturální celistvosti biofilmů vytvořených *Caulobacter crescentus*. Berne, ukazuje, že vazby eDNA k polárnímu háku (počáteční část bičíku) těchto pohyblivých buněk efektivně inhibují jejich schopnost usadit se v ještě nevytvořeném biofilmu. Tímto způsobem eDNA v matrixu biofilmu zastává modulační roli rozptylující biofilm, dokud není jisté, že existující biofilmová struktura zůstane neporušena [20].

Množství eDNA obsažené v extracelulárním matrixu agregátu a biofilmu se liší v závislosti na rodu. Zatímco v biofilmu matrixu vytvořeném *S. aureus* je eDNA hlavní strukturální komponentou, u *S. epidermidis* je zastoupena pouze velmi málo. Nicméně pro tvorbu biofilmu je eDNA velmi důležitá u obou rodů, a to kvůli strukturální stabilitě. Význam eDNA pro stabilitu biofilmu se ukazuje být nejvyšším v prvních stádiích vývoje biofilmu. Vlivem DNAsy dochází k velmi rychlému rozptylování nově zformovaného biofilmu, avšak na zralý biofilm má jen malý vliv. Důležitost eDNA v počáteční tvorbě a raných stádiích formování biofilmu je velmi dobře zdokumentována, a můžeme proto předpokládat, že se eDNA uvolňuje v raných stádiích vývoje. Přestože je eDNA důležitá pro tvorbu a vývoj biofilmu po všech stránkách, neexistuje v podstatě korelace mezi formováním biofilmu a kumulací eDNA v kmenových kulturách nebo biofilmu. Zjištění, že je role eDNA v stabilitě biofilmu zásadní. Ve vyzrálých biofilmech eDNA interaguje s ostatními biomolekulami, které tvoří štít proti enzymatické akci DNAsy. Interakce DNA s biomolekulami na buněčném povrchu a v extracelulární polymerní substanci je řízena nescifickými elektrostatickými interakcemi, zřejmě pomocí bivalentních kationtů [19]. Ačkoli jde pouze o základní pochopení těchto specifických interakcí, jsou do nich zapojeny DNA vazebné proteiny.

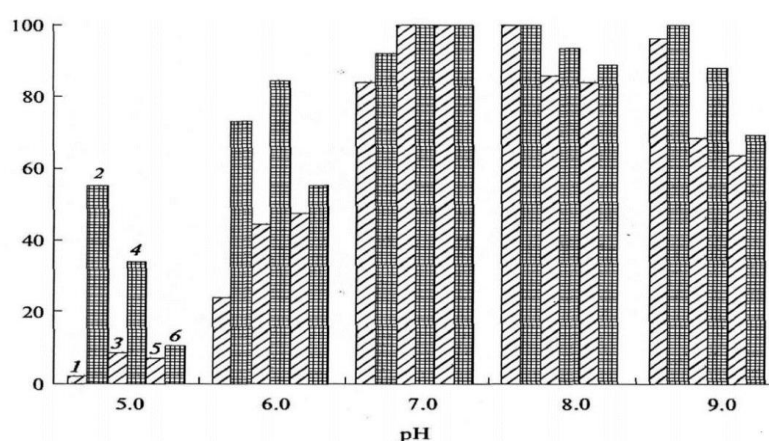
Soubor extracelulární DNA nacházející se v bakteriálních biofilmech poskytuje bohatý substrát pro přirozeně se objevující hlen, který je jedinou cestou k pohybu genetických částic a bakteriofágů stimulující genetický transfer [21]. Toto zjištění směřuje vědce k pátrání po buňkách produkujících DNA v biofilmech, a k závěru, že buňky biofilmu aktivně darují DNA svým prokaryotickým sousedům. Pokud srovnáme komunitu bakterií žijících v biofilmu s jejich planktonickými protějšky, jsou bakterie biofilmu vysoce rezistentní vůči antibiotikům. Rezistence biofilmů není nutně genetická záležitost, ale je výsledkem různorodosti metabolických procesů v buňkách biofilmu. Ochrana před antimikrobiálními agenty je zabezpečována skrze matrix biofilmu. Často se předpokládá, že ochranné faktory extracelulárního matrixu jsou důsledkem snížení přenosu antibiotik skrze matrix, a to kvůli interakci s exopolysacharidy a proteiny [22]. Skrze schopnost navázat kationty eDNA hrají hlavní roli v ochranném systému hostitele. Zdá se, že eDNA hraje také nepřímou roli v odolnosti proti antibiotikům. DNA může tvořit vazby a odloučit bivalentní kovové kationty jako jsou hořečnatý, manganatý, vápenatý a zinečnatý. eDNA může pracovat jak pro,

tak proti infikování bakterie. Studie prováděné *in vitro* ukazují, že velké množství eDNA může zredukovat výskyt horečnatých a vápenatých kationtů na povrchu bakterie, což vede k narušení membrány a následnému rozpadu buněk [23]. Nicméně podobný efekt eDNA, který by se objevil *in vivo*, není znám. Například v plicích pacientů s cystickou fibrózou můžeme najít velké množství eDNA (nad 20 mg/l) pocházející z neutrofilů [24]. Neutrofilové obsahují eDNA a mnoho dalších sloučenin, ale antimikrobiální efekt primárně zajišťují histony, [25] takže přítomnost DNA jako takového je zřejmě ve prospěch napadajících bakterií, a to díky vytváření štítu zabraňujícímu průniku kationtovým peptidů a antibiotik. Hostitelský organismus je schopný rozlišit mezi eDNA, která je mu vlastní a bakteriální. eDNA vyskytující se na povrchu bakterie může fungovat jako molekulární vzor patogenu, který je specificky rozpoznán vrozeným imunitním systémem savců [26].

2.8 Vliv stresových faktorů na tvorbu biofilmu.

Jak už bylo uvedeno výše, biofilmy zastávají obrannou funkci bakterie. Brání ji vůči různým nevhodným fyzikálně-chemickým podmínkám (teplotním, osmotickým, změnou pH apod.). Mikroorganismy nacházejí se v soustavě biofilmu, projevují díky přítomnosti polymerního matrixu větší odolnost vůči stresovým podmínkám. Při neoptimální teplotě může docházet ke změnám biochemických reakcí, denaturaci klíčových fermentů či lýze buněk. Také může dojít ke změně bariérní funkce buněčných membrán, což způsobí únik důležitých metabolitů. Důsledkem tohoto jevu je pokles rychlosti růstu buněk. Matrix biofilmu zmenšuje tuto ztrátu a pomáhá návratu metabolitů do buněk. Mikroorganismy v biofilmu dokážou produkovat termoprotektivní látky, které budou zadržovány matrixem. V takových denaturačních podmínkách je rychlost růstu biofilmu 1,5–2krát větší než u planktonických buněk [27].

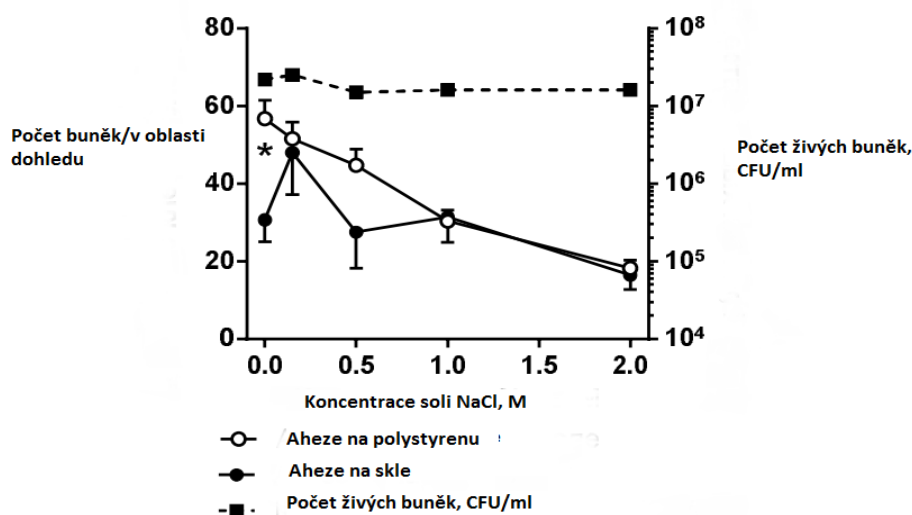
Stejně jako teplotní stres se na biofilmu výrazně projevuje vliv kyselého nebo zásaditého prostředí. Matrix biofilmu slouží jako bariera a omezuje propustnost škodlivého pH prostředí. Podrobně se vlivu pH na růst bakterie v biofilmu ve své práci věnovala Jekatěrina Strelková. Výsledky této práce můžeme vidět na grafu číslo 1.



Graf č. 1: Závislost růstu planktonických a biofilmových kultur bakterie na pH: 1 – planktonická kultura *Dietzia species*; 2 – biofilm *Dietzia sp.*; 3 – planktonická kultura *Chromobacterium violaceum*; 4 – biofilm *C. violaceum*; 5 – planktonická kultura mutanta *C. violaceum* CV026; 6 – biofilm mutanta *C. violaceum* CV026 [27].

Při optimálních podmínkách se narůst biomasy podstatně neliší. Při nízkých hodnotách pH avšak vidíme velký rozdíl mezi planktonickou kulturou a biofilmem. Mutantní kmen *C. violaceum* CV026 je zbaven schopnosti tvořit biofilm, což při porovnání s planktonickou kulturou vysvětlují podobné výsledky.

Zvýšením koncentrací NaCl do 0,1M může dojít k lepší adhezi bakterií [28]. Vliv velkých koncentrací soli však způsobuje zvětšení osmotického tlaku, který má vliv na strukturu buňky a na její biochemické a fyzikální funkce. Při kritických koncentracích soli může dojít k osmóze. Některé mikroorganismy se dokonce kritickým hodnotám osmotického tlaku začaly evolučně přizpůsobovat. Buňka se tomuto ději brání produkcí různých organických látek nebo akumulací části stresového iontu. Na obrázku číslo 4 můžeme vidět výsledky experimentu, který sledoval vliv osmotického tlaku na bakterie *Staphylococcus epidermidis* [29].



Graf č. 2: Vliv osmotické síly roztoku na adhezi *Staphylococcus epidermidis* na skle a polystyrenu [29].

Je známo, že stafylokoky jsou velmi odolné vůči osmotickému tlaku. Nicméně se zvýšením koncentrace soli adheze jak na skle, tak na polystyrenu klesá. Erošková uvádí inhibiční schopnosti velkých koncentrací iontů Na⁺. Podle ní se mohou nespecificky spojovat se záporně nabitými skupinami na povrchu buňky (kyselina teichoová, peptidoglykan). V důsledku toho dochází ke změně nábojů bakteriální buňky a k poklesu počtu absorbovaných buněk [28].

3 Experimentální část

3.1 Mikrobiální kmeny, chemikálie a přístrojové vybavení

3.1.1 Použité mikroorganismy

V naší práci byly použity bakterie *Burkholderia sacchari* DSM 17165 z Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH a *Burkholderia cepacia* CCM 2656 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy University v Brně. Pro porovnání biofilmových a planktonických buněk byly bakterie kultivovány v tekutém a pevném mediu o stejném složení při teplotě 30°C.

3.1.2 Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{NH}_4\text{-Fe(III)}$ citrát
- $\text{Ca(Cl)}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- K_2HPO_4
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- Glukóza
- Agarový prášek (Himedia)

3.1.3 Ostatní chemikálie

- 3,5-dinitrosalicylová kyselina
- Hydroxid sodný (Lach-ner)
- Chloroform (Lach-ner)
- Vínan sodno – draselný (tetrahydrát)
- Uhličitan sodný, Penta (ČR)
- Pentahydrát síranu mědnatého, Penta (ČR)
- Folin-Ciocalteuova činidlo, Serva (Německo)
- Difenylamin, Penta (ČR)
- Kyselina sírová, Penta (ČR)
- Ethanol, Penta (ČR)
- Antron
- Kyselina boritá, Penta (ČR)
- Tris(hydroxymethyl) aminomethan, Lachner (ČR)
- Bromfenolová modř
- Glycerol (Lach-ner)
- Midori Green Advance, Nippon genetics europe (Německo)

3.1.4 Přístroje a pomůcky

- Laminární box Aura mini, BioAir Instruments (USA)
- Nanofotometr PEARL IMPLN (Velká Británie)
- Plynový chromatograf Trace GC Ultra FID detector, Finnigan (USA)
Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm

- Vortex TK3S, Kartell spa (USA)
- Termostat LS-35 (ČR)
- Centrifuga Laboratortzentrifugen 3-15, Sigma (Německo)
- Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen, (Německo)
- Analytické váhy, Boeco (Německo)
- Váhy Kern EW 620-3NM (Německo)
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace bakterií

Inokulum bylo kultivováno po dobu 24 hodin při teplotě 30°C. K přípravě inokula pro *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* bylo použito medium o stejném složení jako produkční medium:

- | | |
|--|---------|
| • (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 g |
| • Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 6,8 g |
| • NH ₄ -Fe(III) citrát | 0,06 g |
| • Ca(Cl) ₂ · 2 H ₂ O | 0,1 g |
| • K ₂ HPO ₄ | 1,5 g |
| • MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,2 g |
| • Roztok glukózy (100 g/l) | 40 ml |
| • Roztok stopových prvků* | 1 ml |
| • Destilovaná voda | 1000 ml |

* Roztok stopových prvků

- | | |
|---------------------|----------|
| • FeCl ₃ | 9,7 g |
| • CaCl ₂ | 7,8 g |
| • CuSO ₄ | 0,156 g |
| • CoCl ₂ | 0,119 g |
| • NiCl ₂ | 0,118 g |
| • CrCl ₂ | 0,062 g |
| • 0,1 M HCl | 1 000 ml |

Produkční medium bylo připravováno pomocí experimentu, ve kterém byl aplikován solný stres. Obsahovalo chlorid sodný o koncentraci 5, 10, 15 a 20 g/l NaCl. V případě teplotního stresu se mikroorganismy kultivovaly na třepačkách při teplotách 20 °C, 30 °C a 40 °C. Sterilizace médií probíhala při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po provedení sterilace byl přidán roztok stopových prvků a glukózy.

3.3 Postupy při stanovení obsahu biofilmu

3.3.1 Stanovení koncentrace PHA

Celková koncentrace PHA v sušině byla stanovována pomocí plynové chromatografie s FID detekcí. Do vialek bylo naváženo přibližně 10 mg (s přesností na 0,1 mg) sušiny získané z paralelních kultivací. Ke vzorku byl poté přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v metanolu s obsahem interního standartu –

kyseliny benzoové (5mg/ml). Uzavřené vialky byly umístěny do termostatu vyhřátého na 96 °C, kde byly ponechány po dobu třech hodin. Po esterifikaci byly vzorky extrahovány v 0,5 ml NaOH o koncentraci 0,05 mol/dm³ a pro účely analýzy bylo odebráno 0,05 ml spodní chloroformové fáze. Ke každému vzorku bylo přidáno 950 µl chloroformu a poté byly analyzovány plynovým chromatografem.

3.3.2 Stanovení kalibrační přímky koncentrace PHA

Pro přípravu kalibrační řady byl použit standard kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu) (88 % 3HB a 12 % 3HV). Kalibrační řada byla připravena do vialek v koncentračním rozmezí od 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 do 1 mg·ml⁻¹ a poté byla doplněna chloroformem do objemu 1 ml. K roztokům bylo přidáno 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v metanolu a uzavřené vialky byly poté umístěny do termostatu vyhřátého na 96 °C na dobu tří hodin. Po esterifikaci byly vzorky extrahovány v 0,5 ml NaOH o koncentraci 0,05 mol/dm³ a pro účely analýzy bylo odebráno 0,05 ml spodní chloroformové fáze. Ke každému vzorku bylo přidáno 950 µl chloroformu a vzorky byly poté analyzovány plynovým chromatografem s FID detekcí.

3.3.3 Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5 – dinitrosalicylové kyseliny

Do zkumavky bylo odpipetováno 0,05 ml vzorku a 0,45 ml destilované vody, čímž byl roztok desetkrát zředěn a poté bylo přidáno 0,5 ml činidla (1 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové, 20 ml hydroxidu sodného o koncentraci 2 mol·l⁻³, 50 ml vody, 30 g vínanu sodno-draselného). Poté byly vzorky po dobu 10 minut zahřívány ve vodní lázni při teplotě 70 °C. Po zahřátí byly vzorky ponechány ve tmě a zchlazeny na laboratorní teplotu. Následně byly zkumavky doplněny destilovanou vodou do objemu 10 ml a důkladně promíchány. Vzorek byl analyzován pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm. Současně s ostatními vzorky byl připravován i slepý vzorek.

3.3.3.1 Stanovení kalibrační křivky

Pro stanovení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0,025 – 0,175 g/l. Poté byly z těchto roztoků odpipetovány 0,5 ml vzorky a k nim bylo následně přidáno 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylové kyseliny. Zkumavky byly umístěny do vodní lázně zahřáté na teplotu 70 °C dobu deseti minut. Po zahřátí byly vzorky ponechány do zchlazení ve tmě a následně byly doplněny destilovanou vodou na objem 10 ml. Poté byla změřena absorbance při 540 nm.

3.3.4 Stanovení obsahu celkových sacharidů za pomoci Antronu

Pro stanovení celkových cukrů byl nejprve odebrán jeden ml desetkrát zředěného vzorku a společně s blankem přenesen do zkumavek ve studené vodní lázni. Antronový reagent (Antron 200 mg, H₂SO₄ 75 obj. %, ethanol 5 ml) byl rovněž ochlazen. Poté bylo 5 ml reagentu přidáno do zkumavek, které byly následně centrifugovány a přeneseny zpátky do vodní lázně. Po pěti minutách byly zkumavky znova přesunuty do vodní lázně

zahřáté na teplotu 96 °C, a to na deset minut. Poté byly všechny vzorky vráceny zpět do studené vodní lázně a po jejich vychladnutí byla znova změřena absorbance při 625 nm.

3.3.4.1 Stanovení kalibrační křivky

Kalibrační řada byla připravena ve zkumavkách v koncentračním rozmezí 20–100 mg/l a byla přenesena do vodní lázně. Antronový reagent byl ochlazen a bezprostředně po zchlazení bylo 5 ml reagentu přidáno do zkumavek, které byly následně zcentrifugovány. Po pěti minutách byly zkumavky přesunuty do vodní lázně zahřáté na 96 °C, a to na deset minut. Poté byly všechny vzorky vráceny zpátky do studené vodní lázně a po jejich vychladnutí byla znova změřena absorbance při 625 nm.

3.3.5 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

Nejprve byl do zkumavky odměřen 1 ml neznámého vzorku a 1 ml fyziologického roztoku (blank). Do všech zkumavek bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A (1 g vinanu sodno-draselného(tetrahydrát), 50 g uhličitanu sodného, 250 ml 1 mol/l hydroxidu sodného a vody do celkového objemu 500 ml). Vzorky byly poté inkubovány ve vodní lázni při teplotě 50 °C. Po 10 minutách inkubace byly zkumavky ochlazeny a do každé bylo přidáno 0,1 ml H-L činidla B (2 g vinanu sodno-draselného (tetrahydrát), 1 g pentahydrátu síranu mědnatého, 90 ml vody a 10 ml 1 mol/l hydroxidu sodného). Vzorky byly protřepány a ponechány při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Nakonec byly do každé zkumavky přidány 3 ml H-L činidla C (1 objem Folin-Ciocalteuova činidla a 15 objemů vody), byly zamíchány a opět 10 minut inkubovány ve vodní lázni při teplotě 50 °C. Po skončení inkubace byly roztoky ochlazeny a byla změřena jejich absorbance proti blanku při 650 nm.

3.3.5.1 Stanovení kalibrační křivky

Byl připraven zásobní roztok bílkovinného standardu (albumin) o koncentraci 3 mg/ml a z něj byla vytvořena série kalibračních standardů o koncentraci 0,3 – 0,9 g/l. Do všech zkumavek bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A a následně byly inkubovány ve vodní lázni při teplotě 50 °C. Po 10 minutách inkubace byly zkumavky ochlazeny a do každé z nich bylo přidáno 0,1 ml H-L činidla B. Poté byly protřepány a ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byly do každé zkumavky přidány 3 ml H-L činidla C. Zkumavky byly promíchány a opět 10 minut inkubovány ve vodní lázni zahřáté na 50 °C. Po skončení inkubace byly zkumavky ochlazeny a byla změřena jejich absorbance proti blanku při 650 nm.

3.3.6 Stanovení 2'-deoxypentosových sacharidu pomocí Dischovy difenylaminové zkoušky

Nejprve bylo z každého vzorku odebráno 500 µl do centrifugačních zkumavek. Ke každé zkumavce bylo přidáno 500 µl Dischova reagentu (60 mM difenylaminu, 11M ledové kyseliny octové, 179 mM kyseliny sírové, 0,62 % v/v ethanolu) a vše bylo následně zvortexováno. V této reakci dochází k specifické reakci deoxyribonukleové kyseliny s difenylaminem za vzniku modrého komplexu [30]. Zkumavky byly přeneseny do vroucí vodní lázně, kde byly ponechány po dobu 20 minut. Poté byly vzorky

ochlazovány na laboratorní teplotu. Eppendorfové zkumavky byly po ochlazení zcentrifugovány (otáčky 9300 x g). Supernatant ze vzorku byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.

3.3.6.1 Stanovení kalibrační křivky

Byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0,075 – 0,85 mg/ml. Do eppendorfek bylo k 500 µl vzorku o různých koncentracích přidáno 500 µl reagentu a následně zvoretexováno. Eppendorfové zkumavky byly přeneseny nad vroucí vodní lázeň a byly tam ponechány po dobu 20 minut. Poté se vzorky nechaly ochlazovat na laboratorní teplotu po dobu 10 minut. Eppendorfové zkumavky byly po vychladnutí 15 minut centrifugovány (otáčky 9300 x g). Supernatant ze vzorku byl změřen pomocí spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.

3.3.7 Analýza DNA horizontální elektroforézou

Do odměřeného objemu elektroforetického pufru (Tris(hydroxymethyl) aminomethan 108 g, H₃BO₃ 55 g, EDTA 9,3 g, voda 1000 ml) bylo přidáno příslušné množství agarózy (0,8 % agaróza, 0,8 g/100 ml pufru). Směs byla poté zahřívána v mikrovlnce do té doby, dokud se agaróza nerozpustila. Po ochlazení směsi na teplotu 70 °C bylo přidáno barvivo midori green advance a roztok byl nalit do formy, do níž byl vložen vzorkovací hřebínek. Po ztuhnutí byl gel přenesen na elektroforetickou aparaturu, do níž bylo nalito tolik elektroforetického pufru, aby došlo k převrstvení gelu pufrem. Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem (bromfenolová modř 20 mg, Glycerol 3 ml, voda 7 ml) a byly přeneseny do jamek vzniklých po odstranění nanášecího hřebínku. Po elektroforéze byl kvůli zlepšení viditelnosti DNA gel umístěn do zorného pole UV-transiluminátoru.

3.3.8 Analýza DNA pomocí spektrofotometru s využitím nástavce NanoDrop.

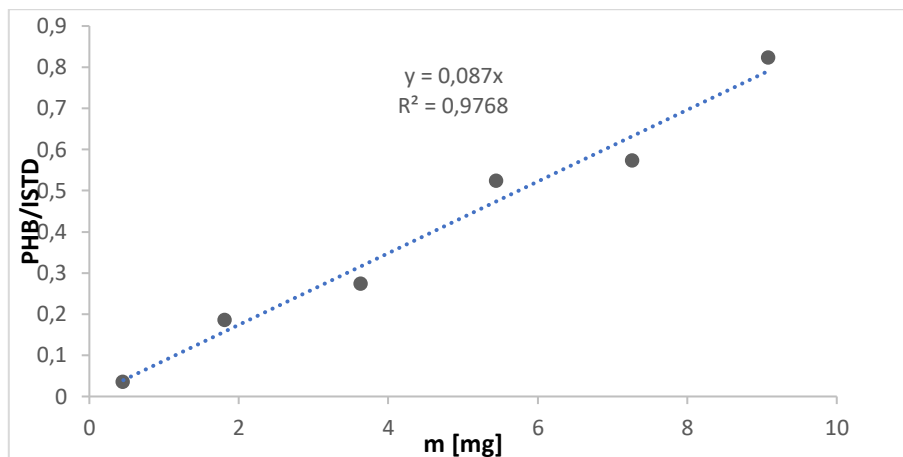
Nejprve byl spuštěn spektrofotometr a ve výběru metod byl nastaven program na měření DNA. Poté byl do spektrofotometru umístěn nástavec NanoDrop. Stanovení koncentrace DNA probíhá na spektrofotometru a čistota vzorku se kontroluje z poměrné absorbce při vlnových délkách 260/280 nm. Před začátkem měření byla optická část umyta vodou a ethanolem. Jako slepý vzorek byla pro tekuté médium použita destilovaná voda. V případě měření vzorku pevného media byl jako blank použit roztok PBS pufru.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Kalibrace metod

4.1.1 Stanovení obsahu PHB v sušině

Pro stanovení obsahu PHB ve vzorcích byla sestavena kalibrační řada podle postupu v kapitole 3.4.1

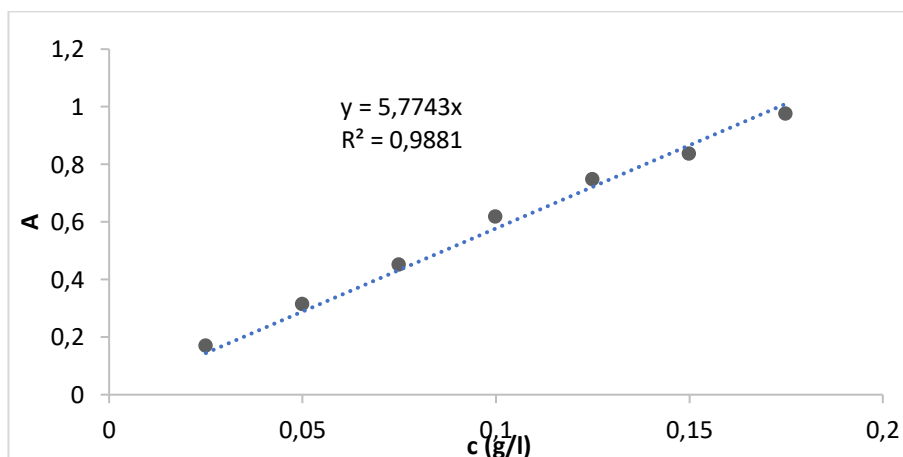


Graf č. 3: Kalibrační řada pro stanovení obsahu PHB

Ze závislosti absorbance na poměru koncentrace PHB/ISTD byla stanovena kalibrační závislost $y = 0,087x$, která byla použita pro stanovení obsahu PHB v sušině. Regresní koeficient $R^2 = 0,9768$.

4.1.2 Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny.

Kalibrační závislost byla zjišťována spektrometrickým měřením roztoků glukózy o různých koncentracích při vlnové délce 540 nm podle postupu v kapitole 3.3.2.1.

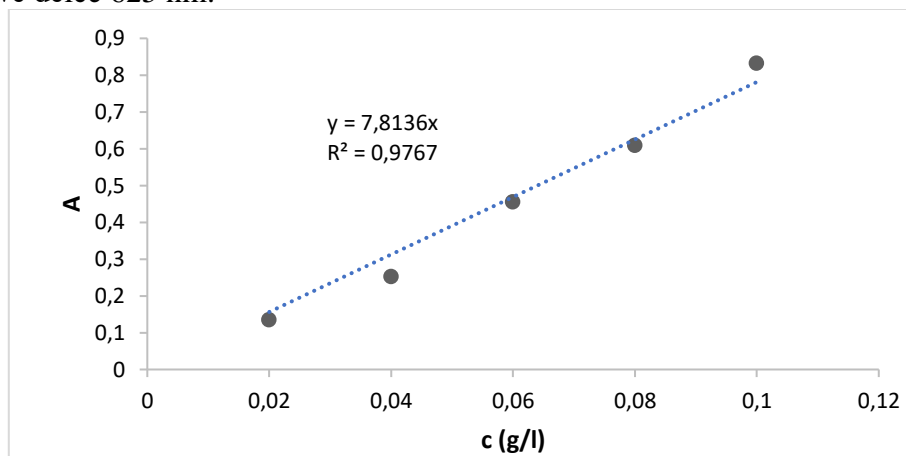


Graf č. 4: Kalibrační řada pro stanovení redukujících cukrů

Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační závislost $y = 5,7743x$, která byla použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů. Regresní koeficient $R^2 = 0,9881$.

4.1.3 Stanovení obsahu celkových sacharidů za pomoci Antronu

Pro stanovení obsahu cukru za pomoci Antronu byla podle postupu, který byl popsán v kapitole 3.3.3.1, spektrometrickou metodou změřena kalibrační závislost při vlnové délce 625 nm.

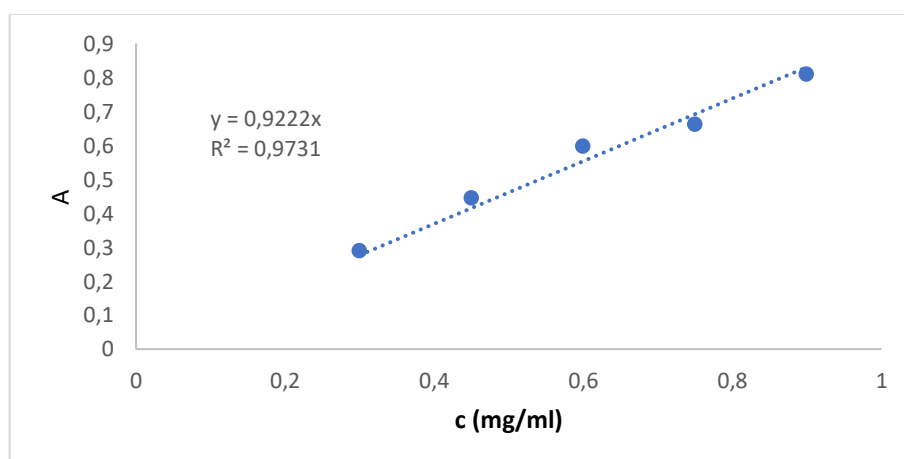


Graf č. 5: Kalibrační řada pro stanovení celkových cukrů

Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační závislost $y = 7,8136x$, která byla použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů. Regresní koeficient $R^2 = 0,9767$.

4.1.4 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

Pro stanovení celkových proteinů byla sestrojena kalibrační řada, která byla změřena spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 650 nm podle postupu, který byl popsán v kapitole 3.3.4.1.

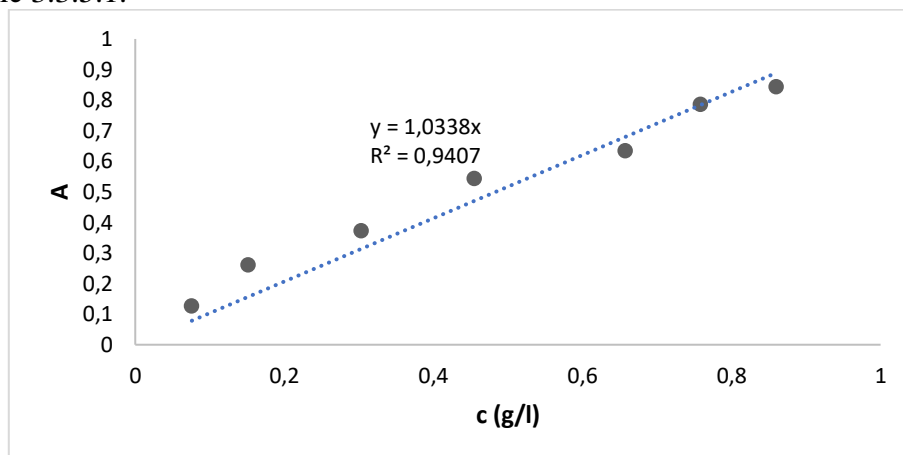


Graf č. 6: Kalibrační řada pro stanovení celkových proteinů

Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační závislost $y = 2,7667x$, která byla použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů. Regresní koeficient $R^2 = 0,9767$.

4.1.5 Stanovení 2'-deoxypentosových cukrů pomocí Dischovy difenylaminové zkoušky

Pro stanovení obsahu DNA byla sestrojena kalibrační řada, která byla změřena spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 600 nm podle postupu, který byl popsán v kapitole 3.3.5.1.



Graf č. 7: Kalibrační řada pro stanovení obsahu DNA

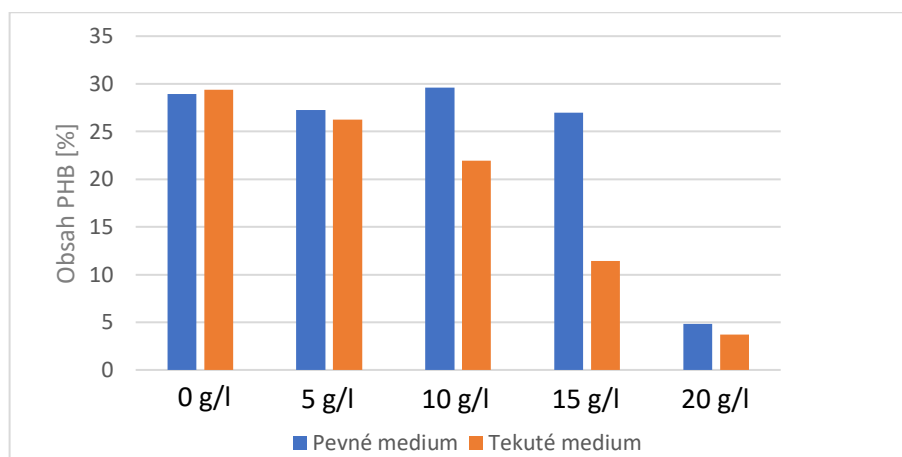
Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační závislost $1,0338x$, která byla použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů. Regresní koeficient $R^2 = 0,9407$.

4.2 Stanovení obsahu PHB v sušině

Vliv teplotního a solného stresu na produkci PHB byl stanovován s využitím plynového chromatografu s FID detektorem. Polyhydroxybutyrát je využíván jako zdroj uhlíku a zásobní zdroj živin pro bakterie. Při stresových podmínkách může dojít k rozkládání PHB a jeho využití k tvorbě biofilmu či jako zdroje živin a energie pro pokrytí energetických nároků stresového metabolismu [31].

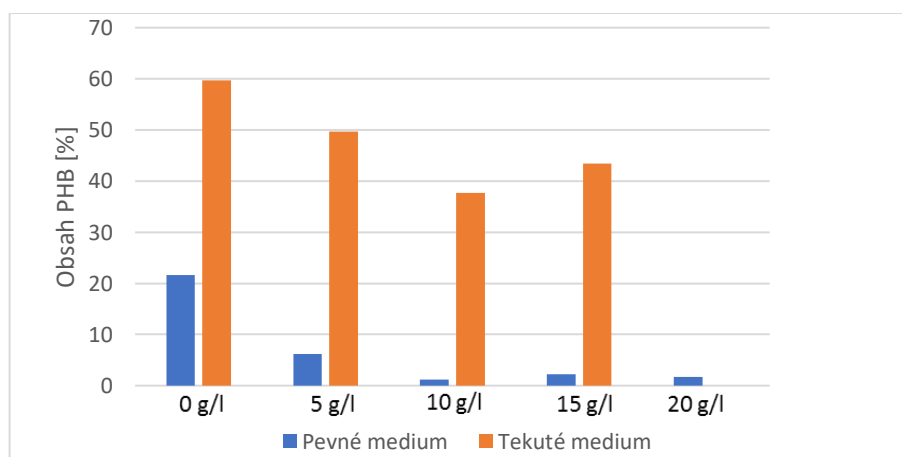
4.2.1 Vliv solného stresu na obsah PHB

Navýšení koncentrace NaCl způsobuje nárůst osmotického tlaku v prostředí buněk. Vliv tohoto stresu může způsobit rozklad PHB. Při porovnání výsledků působení solného stresu u bakterie *Burkholderia sacchari* je z grafu č. 8 vidět, že obsah PHB v tekutém a pevném mediu (Petriho miska) se při nulové koncentraci soli nelišil. Při koncentraci NaCl 5 g/l došlo v tekutém mediu k poklesu PHB, což je velmi pravděpodobně způsobeno v důsledku velkého osmotického tlaku, díky němuž buňky omezily produkci polymeru. V případě pevného media při koncentraci od 0 do 15 g/l se koncentrace obsahu PHB výrazně neměnila. Avšak při koncentraci 20 g/l došlo u obou medií k velkému poklesu koncentrace PHB. Při této koncentraci NaCl mohlo být PHB převedeno na tvorbu biofilmu nebo využito jako zdroj uhlíku.



Graf č. 8: Porovnání obsahu PHB při solném stresu v sušině tekutého a pevného media kultury *B. sacchari*.

Při porovnání výsledků solného stresu bakterie *Burkholderia cepacia* je z grafu číslo 9 vidět, že v tekutém mediu se projevuje větší odolnost buněk vůči osmotickému tlaku a bakterie byly dokonce schopny produkovat PHB při koncentracích 15 g/l soli. U pevného media v porovnání s tekutým došlo k více než čtyřnásobnému poklesu obsahu PHB. Během kultivace došlo ke kontaminaci tekutého media o koncentraci 20 g/l, takže jeho výsledky v grafu nejsou znázorněny.



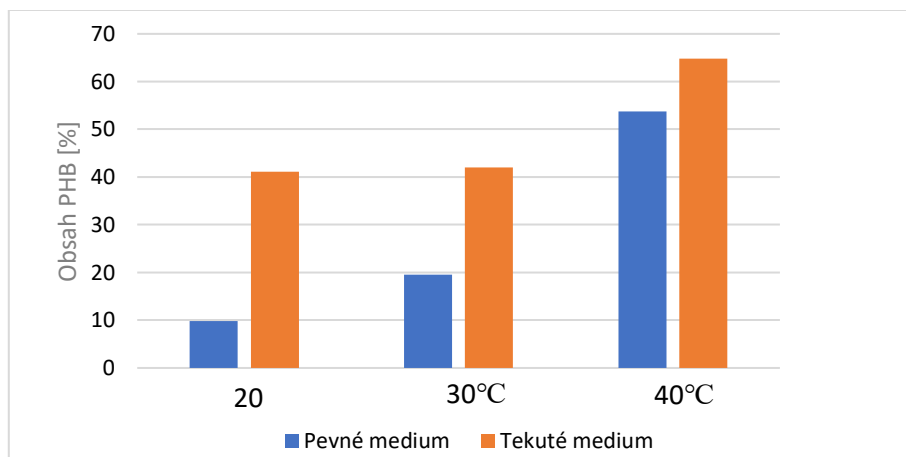
Graf č. 9: Porovnání obsahu PHB v sušině při solném stresu tekutého a pevného media kultury *B. cepacia*.

Z výsledku experimentu můžeme vidět, že obsah PHB při vyšších koncentracích soli v obou mediích klesá. To může být vysvětleno tak, že buňky využívají PHB jako rezervní formu energie a uhlíku, kterou prioritně využívají ve stresových podmínkách.

4.2.2 Vliv teplotního stresu na obsah PHB

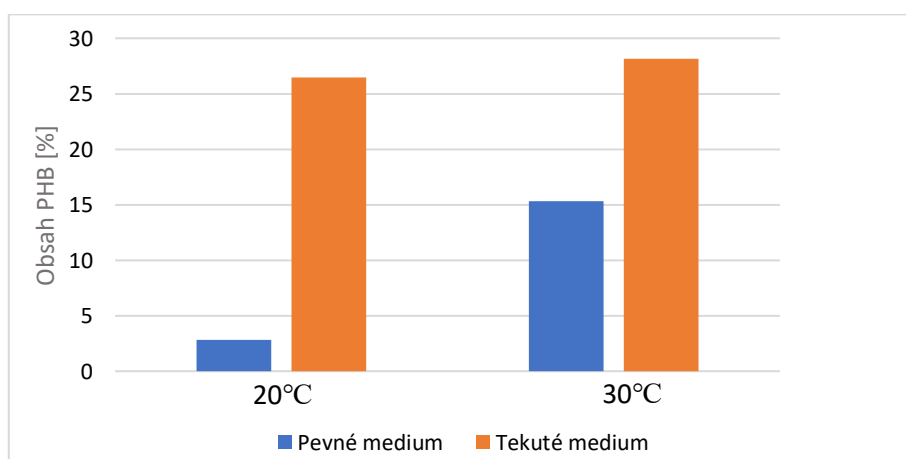
Bakterie se schopností k produkce PHB mají větší odolnost vůči různým stresovým faktorům jako vysoká teplota, mráz, působení peroxidu vodíku, ethanolu, UV záření nebo vysokého osmotického tlaku. Vysvětlení této odolnosti se nejspíš skrývá ve fyzikálních vlastnostech těchto polymerů a jejich vlivu za základní fyzikálně – chemické vlastnosti PHA akumulujících buněk [32].

Při porovnání výsledků teplotního stresu v obou bakteriích můžeme vidět nárůst koncentrace PHB. Toto může být spojeno s přímým vlivem teplotního stresu na produkci obraných polymerů. Z grafu č. 10 je vidět, že obsah PHB u bakterie *Burkholderia sacchari* s teplotou roste, a to jak v tekutém, tak i na pevném mediu. Zvýšení teploty tak mohlo v buňkách spustit obranné mechanismy vůči tomuto stresu, a proto je koncentrace PHB vyšší.



Graf č. 10: Porovnání obsahu PHB při teplotním stresu v sušině tekutého a pevného media kultury *B. sacchari*.

Při porovnání výsledků teplotního stresu u bakterie *Burkholderia cepacia* můžeme v grafu číslo 11 rovněž vidět nárůst produkce PHB, který souvisí se zvyšující se teplotou. Podobně jako u *B. sacchari* je produkce PHB v tekutém mediu vyšší než na pevném, avšak můžeme vidět, že biofilm při teplotě 30 °C v porovnání s teplotou 20 °C obsah PHB ztrojnásobil. Při teplotě 40 °C se bakterie jak v tekutém, tak i v pevném mediu nedokázaly přizpůsobit a nedošlo k nárůstu žádné biomasy. Je to způsobeno pravděpodobně nízkou odolností kmene *B. cepacia* vůči vysoké teplotě.



Graf č. 11: Porovnání obsahu PHB při teplotním stresu v sušině tekutého a pevného media kultury *B. cepacia*.

Při teplotním stresu se projevuje opačná tendence buňky než při solném stresu. Vlivem vyšší teploty narůstá produkce PHB. K velkému nárůstu PHB dochází u biofilmu

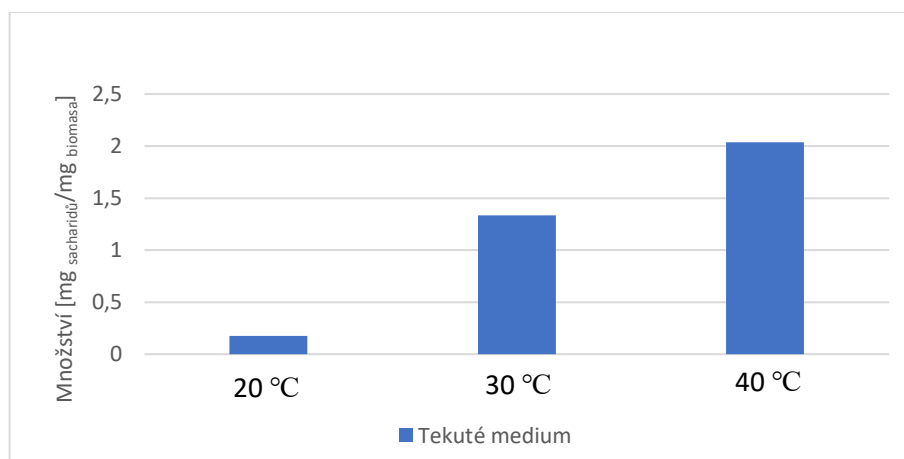
obou kmenů. Při teplotě 40 °C se koncentrace PHB u biofilmu dokonce přibližuje k planktonickým formám.

4.3 Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny.

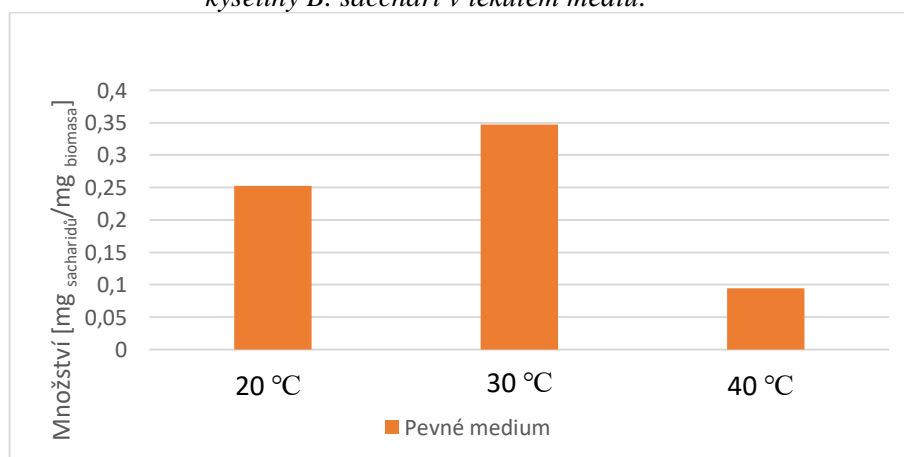
K redukujícím sacharidům patří všechny monosacharidy, disacharidy, oligosacharidy i polysacharidy, pokud mají poloacetalový hydroxyl. Nejčastěji jsou buňkou využívány jako výživné složky. Mohou být přetvořeny v energii nebo použity jako stavební bloky. Polysacharidy mohou tvořit od 40 - 95 % biofilmu [5].

4.3.1 Koncentrace redukujících sacharidů při teplotním stresu

Bylo zjištěno, že nejnižší koncentrace redukujících sacharidů u bakterie *B. sacchari* byla naměřena u teplotního stresu při teplotě 40 °C. Na základě toho lze předpokládat, že tato teplota je pro kultivaci bakterií na pevném mediu nejvhodnější, protože dochází k největšímu poklesu sacharidu. V tekutém mediu došlo při této teplotě k nejnižšímu poklesu sacharidu. Nejpravděpodobněji lze tento jev vysvětlit tím, že pro planktonické formy bakterií je tato teplota na rozdíl od biofilmových kritická.

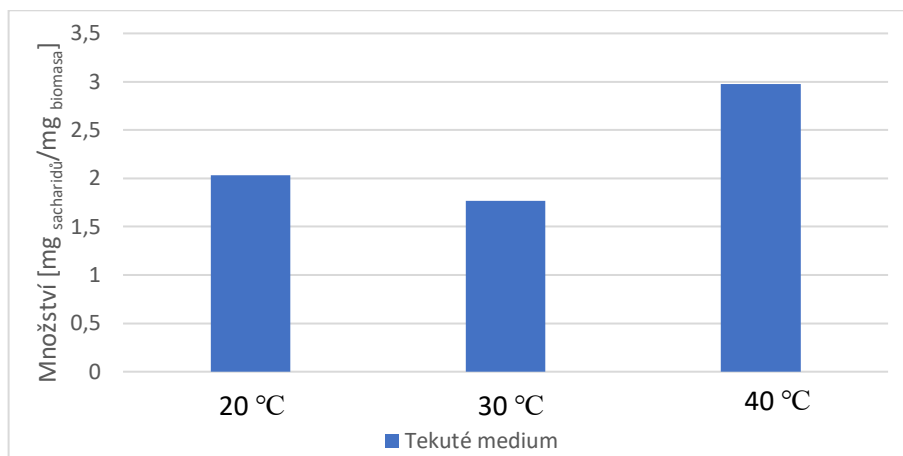


Graf č. 12: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny *B. sacchari* v tekutém mediu.

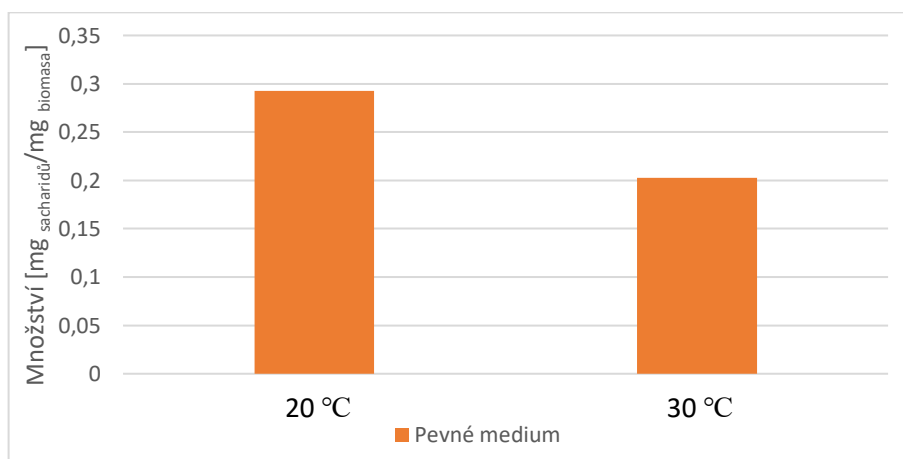


Graf č. 13: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny *B. sacchari* v pevném mediu.

U bakterie *B.cepacia* v grafu č. 14 je vidět, že k největšímu poklesu koncentrace redukujících sacharidů dochází u teplotního stresu při teplotě 30 °C a to jak u pevného graf č. 15, tak u tekutého media. Tato hodnota odpovídá optimální teplotě pro kultivaci těchto bakterií. V pevném mediu bakterie při teplotě v 40 °C nedošlo k nárůstu žádné biomasy.



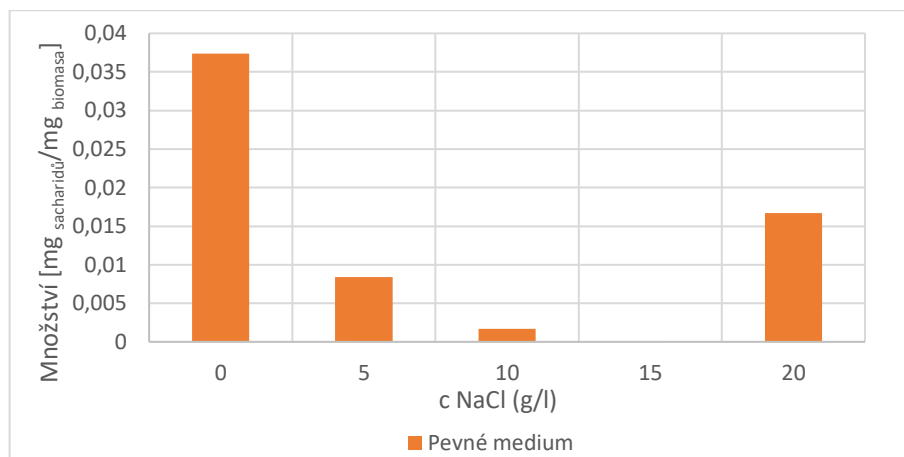
Graf č. 14: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny u *B. cepacia* v tekutém mediu.



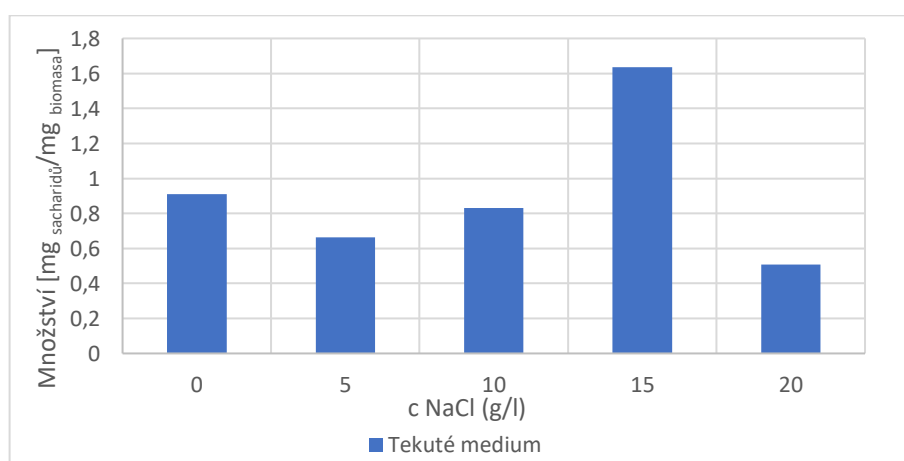
Graf č. 15: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny u *B. cepacia* v pevném mediu.

4.3.2 Koncentrace redukujících sacharidů při solném stresu

Při solném stresu byla u bakterie *B. sacchari* koncentrace redukujících sacharidů ve vzorcích pevného media velmi nízká. V grafu číslo 16 při koncentraci 15 g/l NaCl buňky spotřebovaly veškerý množství sacharidu. V tekutém mediu v grafu č. 17 byla koncentrace redukujících sacharidů při aplikaci 20 g/l NaCl nejnižší, což může být vysvětleno tím, že se bakterie musely přizpůsobit kritickým podmínkám a začaly spotřebovávat větší množství glukózy.

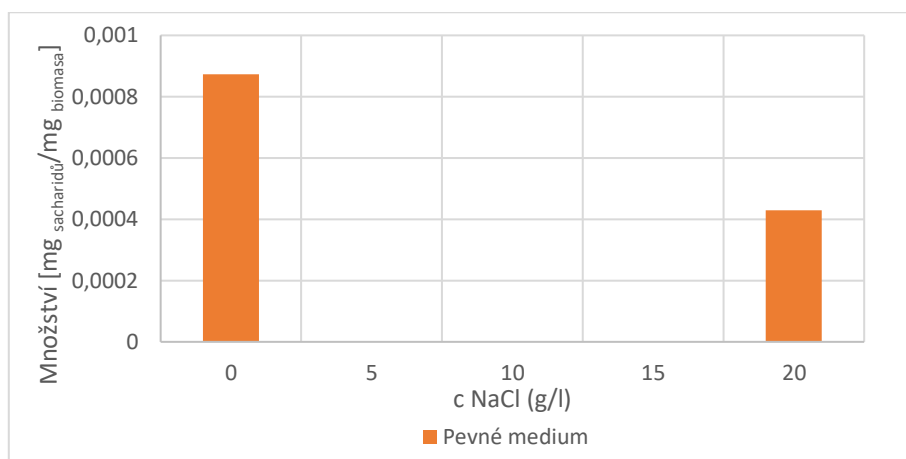


Graf č. 16: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů při solném stresu u *B. sacchari* v pevném mediu.

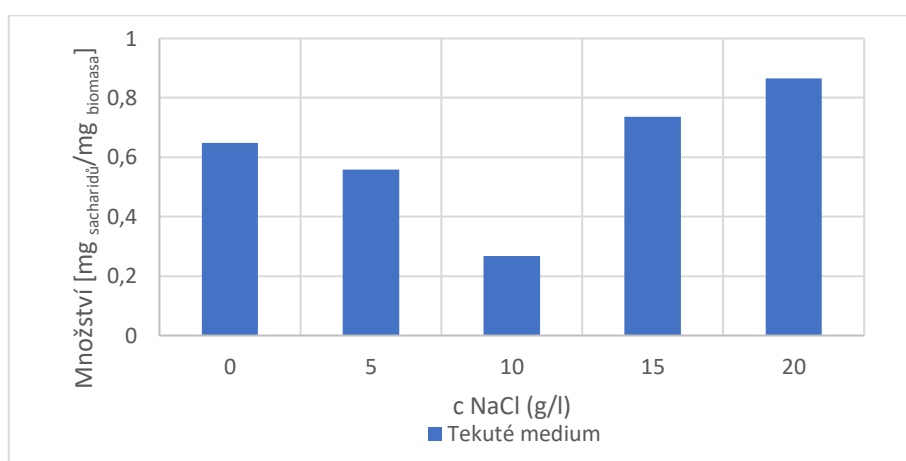


Graf č. 17: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů při solném stresu u *B. sacchari* v tekutém mediu.

Při aplikaci solného stresu u bakterie *B. cepacia* v pevném mediu došlo ke spotřebě prakticky veškerých redukujících sacharidů. Stopové množství můžeme vidět v grafu číslo 18 při koncentraci 0 g/l a 20 g/l NaCl. Při porovnání výsledků v grafu číslo 19 nejnižší koncentrace v tekutém mediu byla naměřena při koncentraci NaCl 10 g/l. Při této koncentraci buňky spotřebovaly velké množství sacharidu tak, aby se ochránili před vlivem osmotického tlaku. Další koncentrace 15 g/l a 20 g/l už byly kritické a došlo k menší spotřebě zdroje uhlíku – glukózy.



Graf č. 18: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů při solném stresu u *B. cepacia* v pevném mediu.



Graf č. 19: Stanovení koncentrace redukujících sacharidů při solném stresu u *B. cepacia* v tekutém mediu.

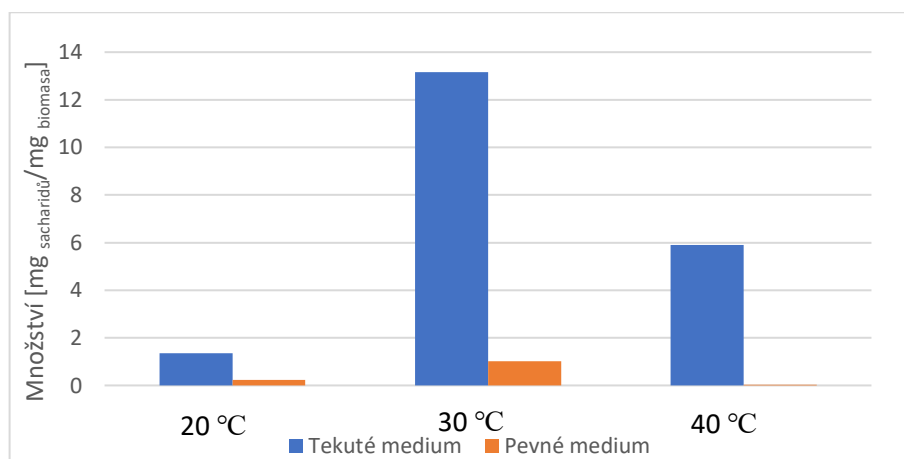
4.4 Stanovení obsahu cukrů za pomoci Anthronu

Dehydratací celkových sacharidů v prostředí minerálních kyselin vznikají deriváty furfuralu. Furfural a odvozené sloučeniny kondenzují s fenoly aromatickými aminy nebo polycyklickými sloučeninami za vzniku barevných produktů [33].

4.4.1 Koncentrace celkových sacharidů při teplotním stresu

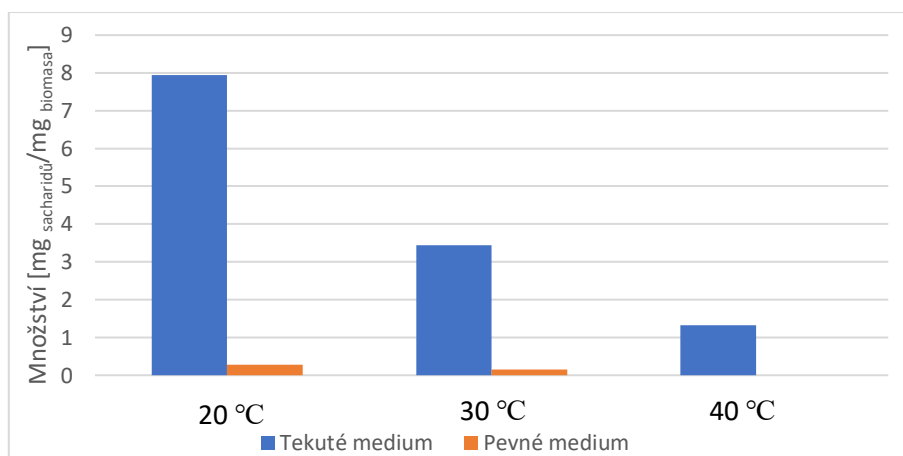
Teplotní stres ovlivňuje biochemické reakce v buňkách. Má vliv na rozpustnost kyslíku ve vodě, a při velkých teplotách může dojít dokonce k denaturaci bílkovin. Takové změny mohou ovlivňovat různé biochemické reakce. Příkladem mohou být různé anabolické nebo katabolické děje, které ovlivňují celkové poměry sacharidů v buňce.

Při porovnání výsledků v grafu č. 20 můžeme vidět, že nejnižší koncentrace cukrů byla naměřena u vzorku *B. sacchari* z pevného media při teplotě 40 °C. V případě tekutého media byla tato teplota 20 °C. V případě biofilmu nedochází k výrazným změnám koncentrace celkových sacharidů. Lze tudíž předpokládat, že biofilm si reguluje své vlastní klima a je méně ovlivňován vnějším teplotním stresem.



Graf č. 20: Stanovení koncentrace celkových cukrů u *B. sacchari*

Na pevném mediu nebylo možné při teplotě 40 °C bakterii *B. cepacia* nakultivovat. V grafu číslo 21 můžeme vidět, že u tekutého media byla nižší koncentrace při teplotě 40 °C. U pevného media bakterie při této teplotě narůst nedokázaly. Koncentrace sacharidů u biofilmu při teplotách 20 °C a 30 °C byly přibližně stejné.

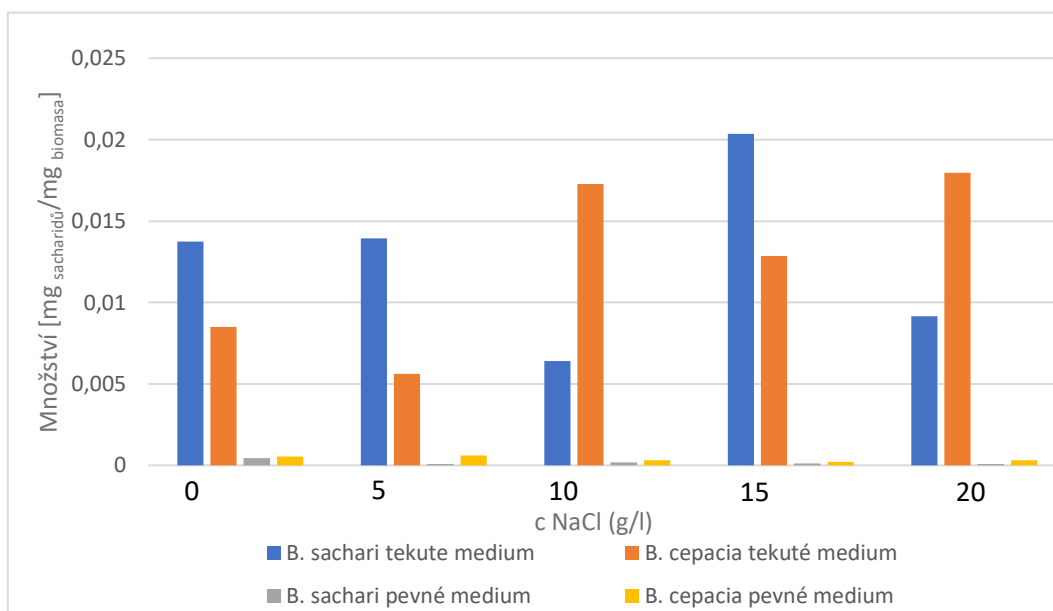


Graf č. 21: Stanovení koncentrace celkových cukrů u *B. cepacia*

4.4.2 Koncentrace celkových sacharidů u solného stresu

Celkové sacharidy se mohou nacházet nejen v buňce, ale také mohou být součástí EPS. Pokles této koncentrace by mohl ovlivnit tvorbu biofilmu. V případě solného stresu mohou být sacharidy použity na produkci látek snižujících osmotický tlak.

V grafu č 22 můžeme vidět porovnání koncentrace celkových sacharidů u obou bakterií. V případě pevného media bakterie vykazují podobnou tendenci. Při nižších koncentracích NaCl došlo k největší tvorbě celkových sacharidů, přičemž u bakterie *B. cepacia* byla koncentrace sacharidů v pevném mediu vždy větší než u *B. sacchari*. Koncentrace celkových sacharidů v tekutém mediu u obou bakterií byla větší než u biofilmu. V případě tekutého media je dostupnost látek pro tvorbu různých polysacharidů větší a také z výsledků předchozích experimentů víme, že odolnost vůči osmotickému tlaku je u biofilmů větší než u planktonických forem. Lze z toho usoudit, že nadměrnou produkci celkových sacharidů bakterie planktonických forem využívají ke zmenšení vlivu osmotického tlaku.



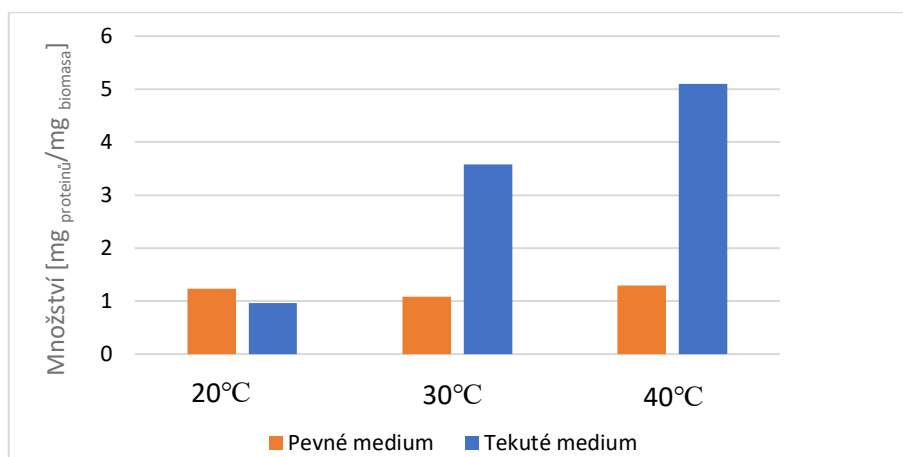
Graf č. 22: Stanovení koncentrace celkových sacharidů při solném stresu u kultur *B. sacchari* a *B. cepacia*

4.5 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

Bílkoviny mohou tvořit až 60 % biofilmu. Buňka často produkuje tyto sloučeniny kvůli ochraně před osmotickým tlakem nebo v některých případech i jako zdroj energie. V buňce může docházet k tvorbě stresových proteinů (heat – shock protein). Tyto proteiny chrání buňky před vlivem stresu vyvolaného vysokou teplotou, ozářením, oxidačním poškozením nebo těžkými kovy [5, 34].

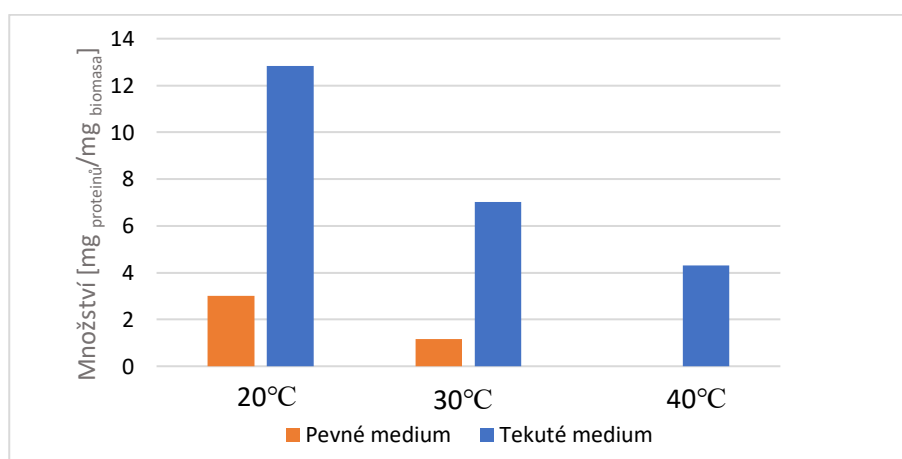
4.5.1 Stanovení celkových proteinů při teplotním stresu

Produkce proteinu teplotního šoku je jeden z nejzákladnějších mechanismů buněčné ochrany. Při stanovení celkových proteinů v grafu číslo 23 můžeme vidět, že koncentrace proteinu v tekutém mediu se zvyšuje s rostoucí teplotou. Zdůvodnit to můžeme tím, že podmínky při teplotě 40 °C jsou pro *B. sacchari* kritické a dochází k velkému nárůstu produkce proteinu teplotního šoku. Toto tvrzení můžeme podložit zjištěním, že produkce proteinu v biofilmu byla na rozdíl od planktonických buněk více méně konstantní.



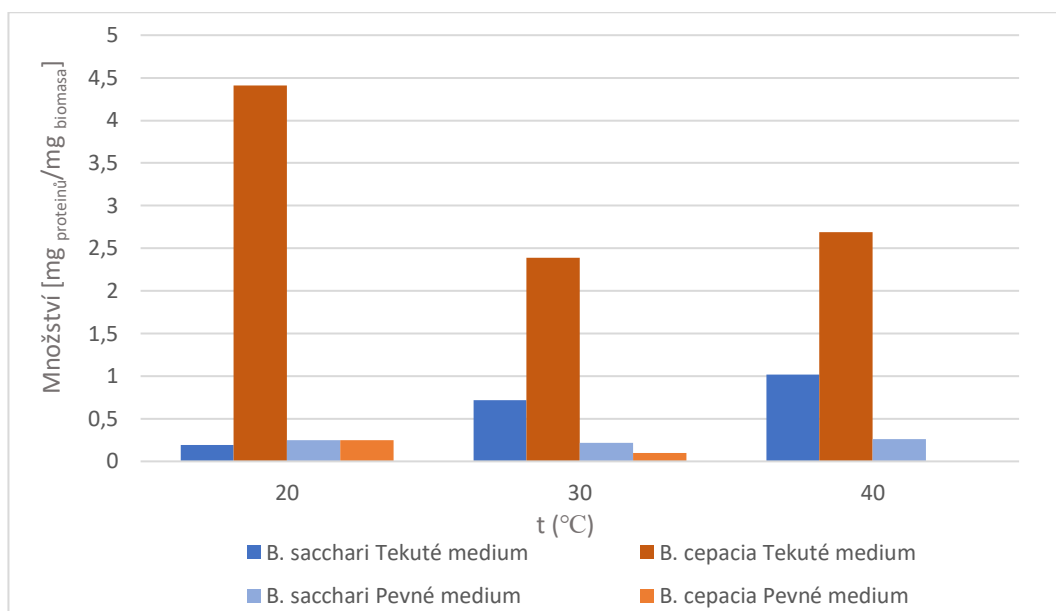
Graf č. 23: Stanovení celkových proteinů při teplotním stresu tekutého a pevného media kultury *B. Sacchari*

V grafu č 24 byla nejvyšší koncentrace celkových proteinů změřena u bakterie *B. cepacia* při teplotě kultivace 20 °C u tekutého media. Mezi pevným a tekutým mediem byl zjištěn významný rozdíl mezi koncentracemi. Tento rozdíl může být vysvětlen tím, že buňky v biofilmu jsou méně ovlivněny teplotním stresem a nepotřebují tudíž produkovat velké množství adhezních sloučenin. Dalším vysvětlením může být, že jsou buňky méně ovlivňovány teplotním stresem a nepotřebují produkovat velké množství proteinu teplotního šoku. V pevném mediu u bakterie při teplotě 40 °C nedošlo k nárůstu žádné biomasy.



Graf č. 24: Stanovení celkových proteinů při teplotním stresu tekutého a pevného media kultury *B. cepacia*

V grafu číslo 25 je znázorněno porovnání výsledků celkových proteinů kultur *B. cepacia* a *B. sacchari* jak v tekutém, tak i pevném mediu. V grafu můžeme vidět, že *B. cepacia* v tekutém mediu produkuje více stresových proteinů obzvláště při teplotách 20 °C a 40 °C. V pevném mediu bakterie je produkce stresových proteinů více méně stejná. Může to být vysvětleno tím, že teplotní stres má na biofilmové kultury nižší vliv než na planktonické.



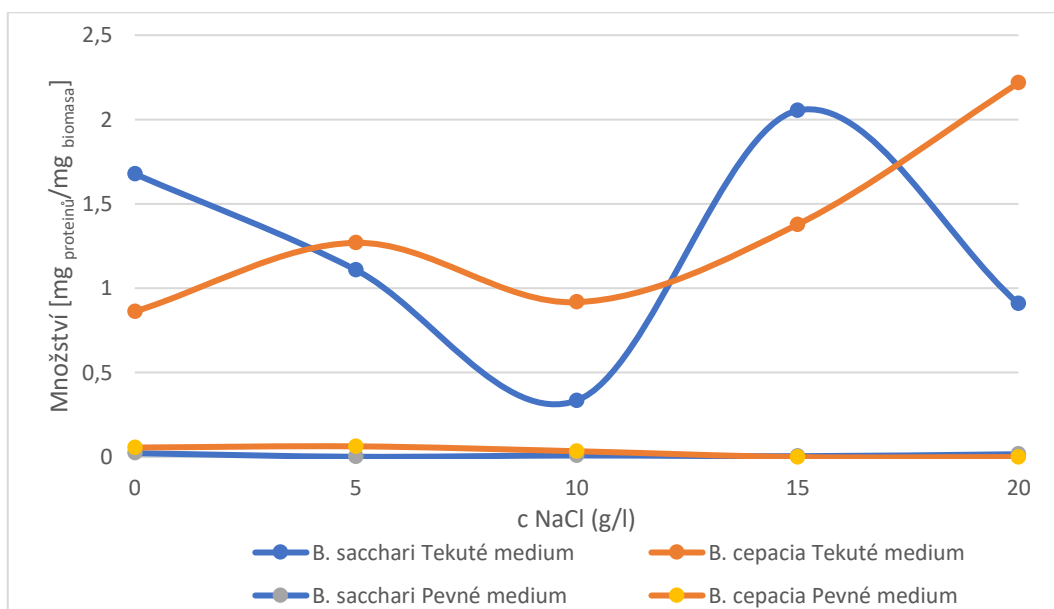
Graf č. 25: Stanovení celkových proteinů při teplotním stresu tekutého a pevného média kultur *B. cepacia* a *B. sacchari*

4.5.2 Stanovení celkových proteinů při solném stresu

Solný stres má na buňky negativní vliv, protože díky němu dochází ke zvýšení osmotického tlaku, v důsledku čehož buňky umírají. Buňky se proti tomu mohou bránit tvorbou organických osmoticky aktivních sloučenin (proteinů).

Výsledky celkových proteinů při solném stresu jsou znázorněny na obrázku číslo 26. U bakterie *B. sacchari* dochází v tekutém médiu k poklesu koncentrace bílkovin až do koncentrace chloridu sodného 10 g/l, což může být způsobeno tím, že při poměrně malých koncentracích soli se buňky dokázaly přizpůsobit a nedocházelo k významné tvorbě proteinu. V médiu obsahujícím 15 g/l a 20 g/l chloridu sodného můžeme vidět významný nárůst koncentrace stresových proteinu. U pevného média můžeme vidět podobnou tendenci s tím rozdílem, že k nárůstu dochází od 10 g/l soli.

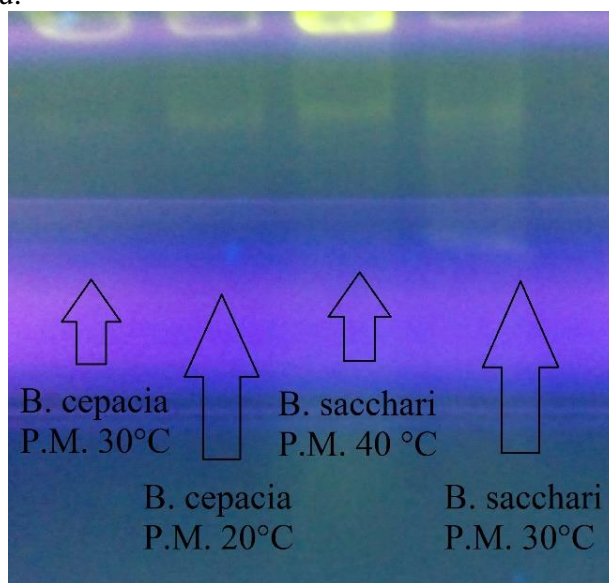
U *B. cepacia* můžeme jak v tekutém, tak i v pevném médiu pozorovat podobný trend z hlediska obsahu proteinů u jednotlivých vzorků bakteriálních kultur, které byly vystaveny solnému stresu. Při koncentraci 5 g/l NaCl dochází k nárůstu koncentrace celkových proteinů a pak při 10 g/l NaCl k poklesu, což mohlo být způsobeno menší tendencí buněk přizpůsobovat se při takové koncentraci vnějším stresovým podmínkám. V tekutém médiu dochází ke zvýšení obsahu proteinů, protože jsou buňky nuceny přizpůsobovat se podmínkám. Bakterie se v biofilmu nachází v ochranném obalu, který je chrání vůči tlaku. Planktonické buňky takový obal nemají, takže jedinou jejich šancí na přežití v prostředí s vysokým osmotickým tlakem, je zvýšená produkce proteinu. Při koncentracích 15 a 20 g/l byly hodnoty absorbance u pevného média *B. cepacia* nulové, což mohlo být způsobeno chybou měření nebo příliš malou koncentrací proteinu.



Graf č. 26: Stanovení celkových proteinů při solném stresu tekutého a pevného media kultur *B. cepacia* a *B. sacchari*

4.6 Analýza DNA horizontální elektroforézou

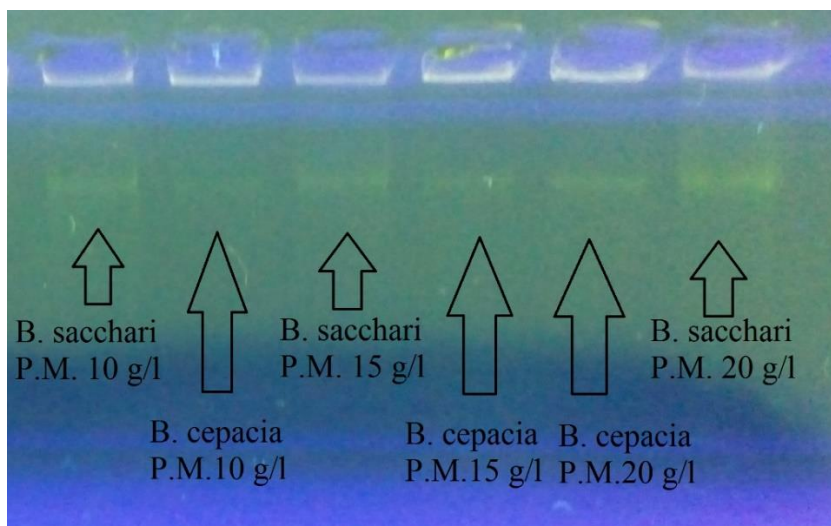
Analýza mimobuněčné DNA probíhala za pomoci elektroforézy. Fragmenty DNA se pohybovaly ke kladně nabitě anodě. Pro lepší viditelnost bylo použito fluorescenční barvivo. Na obrázku číslo 3 můžeme vidět foto gelu z UV –transiluminátoru. Přítomnost DNA byla zaznamenána u vzorku z pevného media. Vzorek biofilmu *B. sacchari* však při teplotě 20 °C nebyl zaznamenán. Cílem této metody bylo ověření přítomnosti DNA ve vzorcích biofilmu.



Obrázek č. 3 Analýza DNA při teplotním stresu

Jak už bylo uvedeno v kapitole 2.7, přítomnost DNA v biofilmu napomáhá rezistenci bakterií vůči stresovým podmínkám. Na obrázku číslo 4 můžeme vidět, že

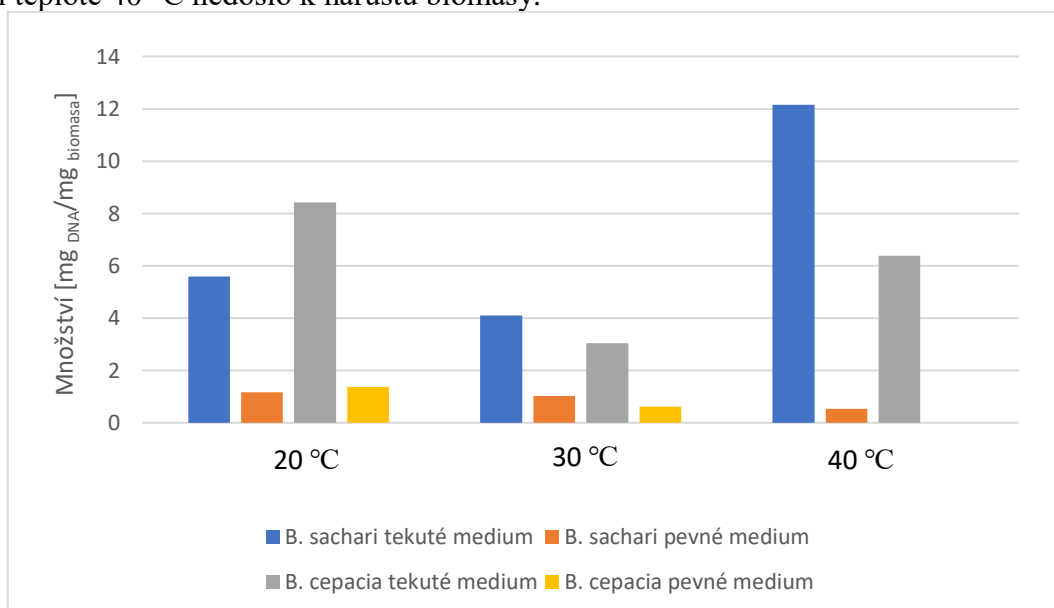
DNA byla u vzorku přítomna za koncentrace 10 g/l, 15 g/l a 20 g/l. Při těchto koncentracích je vliv osmotického tlaku největší.



Obrázek č. 4 Analýza DNA při solném stresu

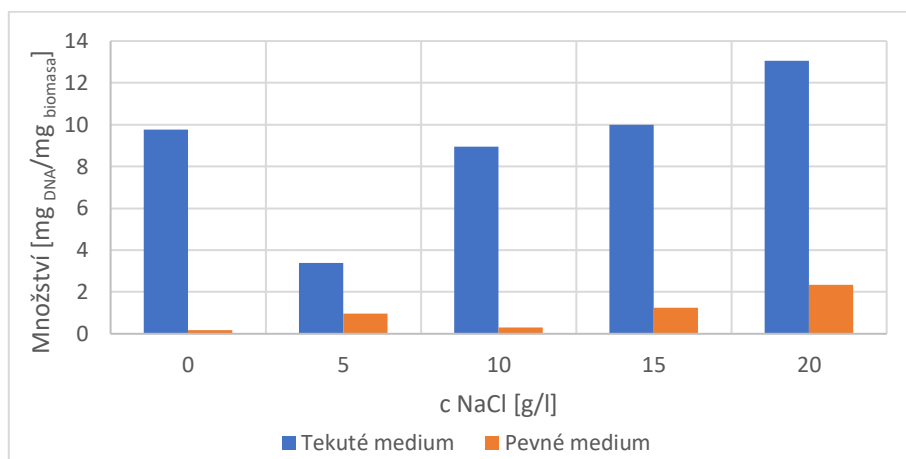
4.7 Stanovení 2'-deoxypentosových cukrů pomocí Dischovy difenylaminové zkoušky

Při této metodě dochází k specifické reakci deoxyribonukleové kyseliny s difenylaminem za vzniku barevného komplexu. Toto může být využito při kvantitativním stanovení obsahu DNA. Všechny koncentrace deoxypentosových cukrů byly vztaženy k 10 mg biomasy. V grafu číslo 27 můžeme vidět, že při teplotách 20 °C a 40 °C dochází v tekutém mediu k nárůstu koncentrace DNA, což odpovídá předpokladu, že při těchto podmínkách dochází k velkému uhynutí buněk. U pevného media můžeme vidět, že teplota nemá na růst bakterie až tak silný vliv. V pevném mediu u *B. cepacia* bakterie při teplotě 40 °C nedošlo k nárůstu biomasy.



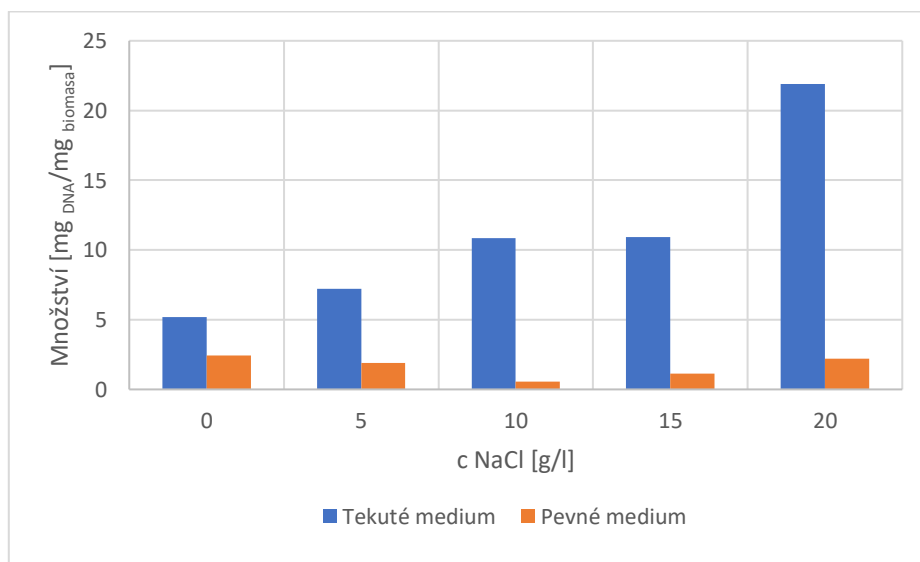
Graf č. 27: Stanovení 2'-deoxypentosových cukrů při teplotním stresu u tekutého a pevného media kultur *B. cepacia* a *B. sacchari*

Jako jeden ze způsobů obrany proti škodlivým kladně nabitým iontům využívají buňky eDNA [19]. Při zvětšení koncentrace soli v mediu dochází k většímu stresu buněk, což může způsobovat jejich lyzi. V grafu číslo 28 můžeme vidět, že tato podmínka byla ve většině případů splněna, nicméně pouze u bakterie *B. sacchari* došlo v tekutém mediu při koncentraci soli 5 g/l a u pevného media při 10 g/l k poklesu eDNA. V pevném mediu došlo zpočátku ke zmenšení koncentrace, ale poté od koncentrace 10 g/l soli dochází k nárůstu a návratu téměř původní do koncentrace 0 g/l soli. Při porovnání vzorků tekutého a pevného media vidíme, že větší koncentrace DNA byly naměřeny u tekutého média.



Graf č. 28: Koncentrace DNA při solném stresu *B. sacchari*

V grafu číslo 29 můžeme vidět, že v tekutém mediu u bakterie *B. cepacia* docházelo k postupnému zvětšování koncentrace DNA. Vzorky z pevného media měly přibližně stejnou koncentraci DNA. Výjimku však tvoří koncentrace NaCl 10 g/l. Při porovnání koncentrace tekutého a pevného media při 20 g/l můžeme vidět, že vliv soli byl největší u planktonické formy buněk.



Graf č. 29: Koncentrace DNA při solném stresu *B. cepacia*

4.7.1 Analýza DNA pomocí spektrofotometru s využitím nástavce NanoDrop.

Koncentrace DNA měla při teplotním stresu u bakterie *B. sacchari* stejnou tendenci jak v pevném, tak i v tekutém mediu. Jak můžeme vidět v tabulce číslo 2, nejmenší hodnota byla naměřena při teplotě 30 °C, což odpovídá optimální teplotě pro kultivaci. Stejná tendence se byla pozorována při kolorimetrickém stanovení. Nejmenší koncentrace DNA u obou metod byla při teplotě 30°C. Největší čistota vzorku DNA byla zaznamenána při teplotě 40°C.

Tabulka č. 2: Koncentrace DNA při teplotním stresu u bakterie *B. sacchari*.

Teplota [°C]	Čistota A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentrace v pevném mediu [ng/μl]	Čistota A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentrace v tekutém mediu [ng/μl]
20	1,546	3,6	1,54	25,6
30	1,598	1,5	1,56	13,7
40	1,782	2,3	1,81	51,5

Z výsledků v tabulce 3 můžeme vidět, že v tekutém mediu se zvyšující se teplotou docházelo k nárůstu DNA. V pevném mediu při teplotě 30 °C byla zaznamenána nejmenší koncentrace DNA. Při teplotě 40 °C v pevném mediu u *B. cepacia* nedošlo k nárůstu biomasy.

Tabulka č. 3: Koncentrace DNA při teplotním stresu u bakterie *B. cepacia*

Teplota [°C]	Čistota A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentrace v pevném mediu [ng/μl]	Čistota A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentrace v tekutém mediu [ng/μl]
20	1,554	12,8	1,6675	27,5
30	1,748	4,0	1,631	64,1
40	0	0	1,4835	244,9

V tabulce číslo 4 bylo porovnáváno tekuté a pevné medium při solném stresu. Koncentrace DNA v pevném mediu u bakterie *B. sacchari* vyšla mnohem menší než v tekutém, což může znamenat, že v pevném mediu došlo k menší lýze buněk než v tekutém. Nejvyšší koncentrace DNA byla v pevném mediu při 20 g/l NaCl. V případě tekutého media to bylo při 15 g/l soli. Největší čistota DNA byla zaznamenána při koncentraci 0 g/l v obou mediích.

Tabulka č. 4: Koncentrace DNA při solném stresu *B. sacchari*

NaCl [g/l]	Čistota A_{260}/A_{280}	Koncentrace v pevném mediu [ng/μl]	Čistota A_{260}/A_{280}	Koncentrace v tekutém mediu [ng/μl]
0	1,839	6,968	1,758	465,979
5	1,396	20,704	1,526	133,799
10	1,502	8,539	1,533	156,250
15	1,438	9,552	1,701	524,242
20	1,644	26,619	1,577	335,329

U bakterie *B.cepacia* byl při solném stresu zaznamenán významný nárůst DNA v tekutém mediu. V tabulce číslo 5 je vidět, že při koncentraci soli 20 g/l se tato hodnota oproti vzorku bez přídavku soli pětinasobně zvětšila. V pevném mediu při této koncentraci rovněž došlo ke zvýšení obsahu DNA ve vzorku. Čistota vzorku v obou mediích byla poměrně nízká, což může být zdůvodněno obsahem stresových proteinů napomáhajících obraně proti osmotickému tlaku v mediu.

Tabulka č. 5: Koncentrace DNA při solném stresu *B. cepacia*

NaCl [g/l]	Čistota A_{260}/A_{280}	Koncentrace v pevném mediu [ng/μl]	Čistota A_{260}/A_{280}	Koncentrace v tekutém mediu [ng/μl]
0	1,576	6,0483	1,582	154,122
5	1,439	32,289	1,526	128,032
10	1,513	22,156	1,594	317,273
15	1,438	18,673	1,655	440,833
20	1,468	43,886	1,622	706,977

5 Závěr

Bakterie se ve vyhovujících podmínkách dělí a předávají svoji genetickou informaci od mateřské buňky k dceřině. Nejlepší strategií v případě vlivu vnějších faktorů, jakými jsou například nedostatek živin či působení solného stresu, je zakonzervování buňky až do doby, dokud se podmínky nezlepší. Jednou z komponent nacházejících se v biofilmu je EPS. Slouží jako pevný obal obklopující buňky a brání je před poškozením. Obsahuje mnoho látek, které mu pomáhají v obraně vůči různým stresovým faktorům. Jednou z těchto látek je eDNA. Extracelulární DNA je schopna napomáhat adhezi biofilmu, zachytávat kationty antimikrobiálních peptidů, zajišťovat stabilní strukturu a napomáhat komunikaci mezi buňkami.

Při kritických hodnotách soli a teploty byla koncentrace redukujících cukrů nulová. V kapitole 2.2 bylo uvedeno, že biofilm mohou tvořit polysacharidy od 40 do 95 %. Biofilm mohl využívat redukující sacharidy na tvorbu vhodnějších sloučenin. Stanovení pomocí antronu ukázalo, že koncentrace celkových sacharidů je vyšší u planktonických forem. Planktonické formy mají lepší přístup k živinám z prostředí, ale zároveň jsou více ovlivňovány osmotickým tlakem. Tato skutečnost mohla způsobit zvýšení tvorby makromolekul z důvodu lepšího přizpůsobení stresovým faktorům.

Biofilm buňku velice dobře chrání před velkým osmotickým tlakem a teplotním stresem. Ve výsledcích z kapitol 4.5.1 a 4.5.2 můžeme vidět, že planktonické buňky jsou nuceny produkovat větší množství proteinu, aby zabránili vlivu osmotického tlaku. Rovněž můžeme pozorovat, že při teplotním a solném stresu bakterie v biofilmu prakticky nemění množství produkovaných proteinů. Může to být způsobeno tím, že proteiny se až z 60 % podílí na tvorbě biofilmu. Buňky se proto snaží dodržet stále stejné množství proteinu tak, aby nedošlo k významným změnám ve struktuře biofilmu.

Stanovením obsahu PHB bylo zjištěno rozdílné chování dvou kmenů bakterií. *B. sacchari* při solném stresu produkuje velké množství PHB, které bylo u biofilmu dokonce větší než u planktonických forem. V případě *B. cepacia* se projevilo zcela opačné chování, protože v tomto případě planktonické formy vždy produkovaly více PHB, přičemž stres měl větší vliv na biofilm než na planktonické formy. Stejně chování obou kmenů můžeme vidět při produkci PHB pouze při teplotním stresu. Produkce rostla jak v biofilmu, tak i v planktonických formách. Tento jev může být vysvětlen tím, že buňky využívají produkci tohoto polymeru, aby se bránili před teplotním stresem.

Za pomoci gelové elektroforézy byla nejprve zkontrolována přítomnost eDNA v biofilmech a planktonických buňkách. Za využití Dischovy difenylaminové zkoušky a Nanodropu byla stanovena přesná koncentrace v planktonických a biofilmových buňkách. Při teplotách 20 °C a 40 °C bylo produkováno více eDNA. Se zvětšením koncentrace soli docházelo u planktonických forem k mnohem výraznějšímu zvětšení obsahu eDNA, což může být vysvětleno tím, že bakterie v planktonických formách mají nižší odolnost vůči osmotickému tlaku či teplotnímu stresu. Tyto výsledky byly ověřeny rovněž na nanodropu. Při porovnávání čistoty DNA můžeme vidět, že se zvětšující se koncentrací stresu dochází k poklesu čistoty vzorku. Extracelulární DNA mohla být

využívána k obraně proti stresu. V případě solného stresu může eDNA vázat škodlivý sodíkový kationt.

6 Literatura

- [1] VERGARA-IRIGARAY, M., T. MAIRA-LITRAN, N. MERINO, G. B. PIER, J. R. PENADES a I. LASA. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. DOI: 10.1099/mic.0.2007/013292-0. ISBN 10.1099/mic.0.2007/013292-0. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/013292-0>
- [2] VU, Barbara, Miao CHEN, Russell J. CRAWFORD a Elena P. IVANOVA. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. DOI: 10.3390/molecules14072535. ISBN 10.3390/molecules14072535. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/7/2535/>
- [3] Knox K.W., Vesik M., Work E. Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine- Limited Culture of *Escherichia coli* II J. Bacteriol-1966.-Vol 92, № 4.-P. 1206-1217.
- [4] Gestaltreality [online]. 2016. [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://www.gestaltreality.com/2013/09/16/how-to-eliminate-candida-biofilms/>
- [5] GOSEV, V. a S. SIDORENKO. Bacterial biofilms and infections. Journal Infectology. Saint-Petersburg, 2010, 3, 15.
- [6] MOONS, Pieter, Chris W. MICHELS a Abram AERTSEN. Bacterial interactions in biofilms. DOI: 10.1080/10408410902809431. ISBN 10.1080/10408410902809431. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410902809431>
- [7] Chernjavsky, V.I., 2013. Bacterialnie bioplenki i infekcii (lekci) [Bacterial biofilms and infection (lecture)]. Annals of Mechnikov Institute 1
- [8] MERRITT, Judith H., Daniel E. KADOURI a George A. O'TOOLE. Growing and Analyzing Static Biofilms. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00. ISBN 10.1002/9780471729259.mc01b01s00. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>
- [9] WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012856-0. ISBN 10.1099/mic.0.2007/012856-0. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/012856-0>
- [10] SIFRI, Costi D. Healthcare Epidemiology: Quorum Sensing. DOI: 10.1086/592072. ISBN 10.1086/592072. Dostupné také z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/592072>
- [11] TETZ, VICTOR V. a OKSANA V. RYBALCHENKO. Ultrastructure of colony-like communities of bacteria. DOI: 10.1111/j.1699-

- 0463.1997.tb00547.x. ISBN 10.1111/j.1699-0463.1997.tb00547.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1699-0463.1997.tb00547.x>
- [12] YANG, L., K. B. BARKEN, M. E. SKINDERSOE, A. B. CHRISTENSEN, M. GIVSKOV a T. TOLKER-NIELSEN. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2007, 153(5), 1318-1328. DOI: 10.1099/mic.0.2006/004911-0. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2006/004911-0>
- [13] Leid J. G., Willson C. J., Shirliff M. E., Hassett D. J., Parsek M. R., Jeffers A. K. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *J Immunol* 175:7512-7518
- [14] LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, 45(4), 999-1007. DOI: 10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- [15] ANDERL, J. N., M. J. FRANKLIN a P. S. STEWART. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, 44(7), 1818-1824. DOI: 10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- [16] МАЛЬЦЕВ, С. а Г. МАНСУРОВА. What is biofilm? *Практическая медицина*. Казанская государственная медицинская академия, 2011. ISSN 2307—3217.
- [17] RENELLI, M. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. DOI: 10.1099/mic.0.26841-0. ISBN 10.1099/mic.0.26841-0. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26841-0>
- [18] WHITCHURCH, C. B. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*. 295(5559), 1487-1487. DOI: 10.1126/science.295.5559.1487. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.295.5559.1487>
- [19] OKSHEVSKY, Mira a Rikke Louise MEYER. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. DOI: 10.3109/1040841X.2013.841639. ISBN 10.3109/1040841X.2013.841639. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.841639>
- [20] BERNE, Cécile, David T. KYSELA a Yves V. BRUN. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. DOI:

- 10.1111/j.1365-2958.2010.07267.x. ISBN 10.1111/j.1365-2958.2010.07267.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2010.07267.x>
- [21] THOMAS, Christopher M. a Kaare M. NIELSEN. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. DOI: 10.1038/nrmicro1234. ISBN 10.1038/nrmicro1234. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1234>
- [22] FLEMMING, Hans-Curt a Jost WINGENDER. The biofilm matrix. DOI: 10.1038/nrmicro2415. ISBN 10.1038/nrmicro2415. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2415>
- [23] MULCAHY, Heidi, Laetitia CHARRON-MAZENOD, Shawn LEWENZA a Michael S. GILMORE. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000213. ISBN 10.1371/journal.ppat.1000213. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
- [24] SHAK, S., D. J. CAPON, R. HELLMISS, S. A. MARSTERS a C. L. BAKER. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. DOI: 10.1073/pnas.87.23.9188. ISBN 10.1073/pnas.87.23.9188. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.87.23.9188>
- [25] BRINKMANN, V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. DOI: 10.1126/science.1092385. ISBN 10.1126/science.1092385. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1092385>
- [26] HEMMI, H., T. KAISHO, K. TAKEDA a S. AKIRA. The Roles of Toll-Like Receptor 9, MyD88, and DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in the Effects of Two Distinct CpG DNAs on Dendritic Cell Subsets. DOI: 10.4049/jimmunol.170.6.3059. ISBN 10.4049/jimmunol.170.6.3059. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.6.3059>
- [27] СТРЕЛКОВА, Екатерина. ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ С ДЕФЕКТОМ СТРУКТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА. Moskva, 2013. The Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Science. Vedoucí práce Плакунов Владимир Константинович.
- [28] Gordon AS, Millero FJ. Electrolyte Effects on Attachment of an Estuarine Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;47(3):495-499.
- [29] ЕРОШЕНКО, Дарья. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ПЕРВЫЕ ЭТАПЫ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*. INSTITUTE OF ECOLOGY AND GENETICS OF MICROORGANISMS, 2015. Vedoucí práce Коробов В.П.
- [30] PATTERSON, Jennifer a Cameron MURA. Rapid Colorimetric Assays to Qualitatively Distinguish RNA and DNA in Biomolecular Samples. *Journal of Visualized Experiments*. 2013, (72), -. DOI: 10.3791/50225. ISSN 1940-087x. Dostupné také z: <http://www.jove.com/video/50225/rapid-colorimetric-assays-to-qualitatively-distinguish-rna-dna>

- [31] BOYANDIN, Anatoly N. Production of Two- and Three-Component Polyhydroxyalkanoates by Luminous Bacteria of the Photobacterium Genus. DOI: 10.17516/1997-1389-2016-9-2-162-168. ISBN 10.17516/1997-1389-2016-9-2-162-168. Dostupné také z: http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle/2311/20362/04_Boyandin.pdf?sequence=1
- [32] ZHAO, Yan Hong, Hong Ming LI, Ling Fang QIN, Hong Hui WANG a Guo-Qiang CHEN. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x. ISBN 10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>
- [33] Anthrone test for Carbohydrates quantitative analysis [online]. 2017 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <https://allmedicalstuff.com/anthrone-test-carbohydrates/>
- [34] BAKTHISARAN, Raman, Ramakrishna TANGIRALA a Ch. Mohan RAO. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2015, 1854(4), 291-319. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.12.019. ISSN 15709639. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963914003355>

7 Seznam použitých zkratek

Pia	polysaccharid intercellularni adhesin
Nap	periplazmatická nitrátreduktáza
Nar	dýchací nitrátreduktáza
Fnr	fumarát a nitrát reduktáza
AHL	N-acyl homoserin lakton
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(4HV)	poly(4-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)