



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

STUDIUM METABOLISMU POLYHYDROXYALKANOÁTŮ BAKTERIE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

STUDY ON METABOLISM OF POLYHYDROXYALKANOATES IN BACTERIUM RHODOSPIRILLUM RUBRUM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Viktorie-Alexandra

Pacasová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1792/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Viktorie-Alexandra Pacasová**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů bakterie *Rhodospirillum rubrum*

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Porovnání PHA pozitivního a negativního kmene z pohledu morfologie buněk
3. Využití pokročilých analytických technik k posouzení vlivu PHA na základní fyziologické vlastnosti mikrobiálních buněk
4. Stanovení vlivu PHA na stresovou odolnost buněk *R. rubrum*

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Viktorie-Alexandra Pacasová
studentka

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce je zaměřena na produkci polyhydroxyalkanoátů (PHA) u bakterie *Rhodospirillum rubrum*, na porovnání divokého PHA produkujícího (*R. rubrum*) a mutantního PHA neprodukujícího kmene z pohledu morfologie buněk. Tyto bakteriální kmeny byly rovněž podrobeny vybraným stresům a byl u nich stanoven vliv PHA na stresovou odpověď s využitím pokročilých analytických technik. Použité dva kmeny byly nejprve kultivovány za různých podmínek, lišících se přístupem světla, kyslíku, dobou kultivace a substrátem. Poté byl zkoumán vliv kultivačních podmínek a obsahu PHA na odolnost vůči vybraným stresorům – zvýšené teplotě, osmotickému stresu a cyklům opakovaného mražení. Nejprve byly kmeny kultivovány za aerobních podmínek ve tmě po dobu 48 a 72 h. U těchto vzorků byla zkoumána životaschopnost pomocí fluorescenční sondy (propidium jodid) metodou průtokové cytometrie a zároveň bylo zkoumáno porušení buněk pomocí elektronové mikroskopie. Dále byl proveden obdobný experiment, při kterém byl divoký a mutantní kmen kultivován v mikroaerobních podmínkách na světle po dobu 120 h za účelem produkce pigmentů (bakteriochlorofyl *a* a karotenoidy). Pro stanovení extrahovaných pigmentů byla použita UV-VIS spektroskopie. U obou bakteriálních kmenů byl také stanoven vliv doby a podmínek kultivace na stresovou odpověď pomocí průtokové cytometrie a elektronové mikroskopie. V experimentální části práce byla potvrzena schopnost produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) u divokého kmene *R. rubrum*. Také byla potvrzena hypotéza o protektivní vlastnosti PHA granulí při vystavení mrazícím cyklům. Naopak při vystavení osmotickému stresu nebyla protektivní funkce PHA prokázána.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rhodospirillum rubrum, polyhydroxyalkanoáty, stresové faktory, pigmenty, průtoková cytometrie, elektronová mikroskopie.

ABSTRACT

The present thesis focuses on polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Rhodospirillum rubrum*, comparing wild-type PHA-producing (*R. rubrum*) and mutant PHA-non-producing strains in terms of cell morphology. These bacterial strains were also subjected to selected stresses and the effect of PHA on the stress response was determined using advanced analytical techniques. The two strains used were first cultured under different conditions differing in light access, oxygen, culture time and substrate. The effect of culture conditions and PHA content on resistance to selected stressors - elevated temperature, osmotic stress and repeated freezing cycles - was then investigated. First, strains were cultured under aerobic conditions in the dark for 48 and 72 h. Viability of these samples was examined using a fluorescent probe (propidium iodide) by flow cytometry, while cell disruption was examined by electron microscopy. Furthermore, a similar experiment was performed in which the wild-type and mutant strains were cultured under microaerobic conditions in the light for 120 h to produce pigments (bacteriochlorophyll *a* and carotenoids). UV-VIS spectroscopy was used to determine the extracted pigments. The effect of culture time and conditions on the stress response was also determined for both bacterial strains by flow cytometry and electron microscopy. In the experimental part of the work, the ability to produce the copolymer P(3HB-*co*-3HV) was confirmed in a wild-type strain of *R. rubrum*. The hypothesis of the protective property of PHA granules when exposed to freezing cycles was also confirmed. In contrast, the protective function of PHA was not proven when exposed to osmotic stress.

KEY WORDS

Rhodospirillum rubrum, polyhydroxyalkanoates, stress factors, pigments, gas chromatography, flow cytometry, electron microscopy.

Bibliografická citace

PACASOVÁ, Viktorie-Alexandra. *Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů bakterie Rhodospirillum rubrum* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148955>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Slaninová.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé vedoucí, Ing. Evě Slaninové Ph.D., za ochotu, trpělivost, pomoc a čas, a také v neposlední řadě za odborné, ale lidské vedení při tvorbě a vypracování mé diplomové práce. Dále moje velké díky patří mé konzultantce, Ing. Kateřině Mrázové za vedení a pomoc při měření na ÚPT, AV ČR a za nekonečnou trpělivost při práci se mnou. Také bych chtěla poděkovat Ing. Martině Havlíkové za výpomoc s fluorescenční mikroskopií. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za neutuchající podporu při mém dosavadním studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Charakteristika	9
2.1.2	Struktura.....	9
2.1.3	Biosyntéza PHA	12
2.1.4	Biodegradace PHA	13
2.1.5	Využití v praxi.....	14
2.2	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	14
2.2.1	Struktura a vlastnosti	15
2.2.2	Metabolismus	16
2.2.3	Asimilace různých substrátů	21
2.2.4	Zásobní látky	24
2.3	Polyhydroxyalkanoáty a stresová odpověď bakterií	25
2.3.1	UV záření	26
2.3.2	Osmotický stres	26
2.3.3	Teplotní stres.....	27
2.3.4	Přítomnost těžkých kovů	28
2.3.5	Oxidační stres.....	29
3	Experimentální část.....	31
3.1	Mikroorganismy, chemikálie, přístroje.....	31
3.1.1	Mikroorganismy	31
3.1.2	Použité chemikálie.....	31
3.1.3	Použité přístroje.....	34
3.2	Kultivace <i>Rhodospirillum rubrum</i>	35
3.2.1	Růstová křivka.....	35
3.2.2	Mikroaerobní kultivace.....	35
3.3	Stanovení množství biomasy	35
3.3.1	Spektrofotometrické stanovení množství biomasy.....	35
3.3.2	Gravimetrické stanovení množství biomasy	36
3.4	Stanovení obsahu PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem.....	36
3.4.1	Příprava vzorků	36

3.5	Stanovení viability bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie	36
3.5.1	Příprava vzorků	36
3.5.2	Optimalizace fluorescenčních sond	37
3.6	Příprava vybraných stresů	38
3.6.1	Teplotní stres	38
3.6.2	Akutní stres 20 % ethanolem	38
3.6.3	Osmotický stres	38
3.6.4	Zamražení a rozmražení	38
3.7	Stanovení morfologických změn pomocí fluorescenční mikroskopie	39
3.7.1	Příprava vzorků na měření	39
3.8	Stanovení morfologických změn pomocí elektronové mikroskopie	40
3.8.1	Kryo-skenovací elektronová mikroskopie (kryo-SEM)	40
3.8.2	Skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM)	41
3.9	Extrakce a následné stanovení pigmentů	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
4.1	Optimalizace koncentrace substrátu a doby kultivace	43
4.1.1	Stanovení množství biomasy a PHA	44
4.2	Stanovení morfologických změn pomocí fluorescenční mikroskopie	45
4.3	Kultivace v médiu s acetátem jako zdrojem uhlíku	47
4.3.1	Stanovení množství biomasy a PHA	47
4.4	Produkce pigmentů a jejich stanovení	49
4.5	Stanovení viability bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie	51
4.5.1	Acetátová média	51
4.5.2	Kultury produkující pigmenty	54
4.6	Stanovení morfologických změn pomocí elektronové mikroskopie (kryo-SEM) ..	56
4.7	Stanovení morfologických změn pomocí elektronové mikroskopie (STEM)	62
5	ZÁVĚR	68
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	81
	PŘÍLOHY	83

1 ÚVOD

Technologické změny v posledních desetiletích ovlivnily výrazným způsobem rozvoj mnoha odvětví jako např. hospodářství, průmysl, transport, medicína, či věda. Výsledky pokroku ale, spolu s exponenciálně narůstající lidskou populací, začaly v posledních letech znatelně zatěžovat přírodu a životní prostředí na celém světě. Právě odpady z lidských činností, jejich hromadění a likvidace, představují v posledních letech celosvětový problém. Z tohoto důvodu se v posledních desetiletích začaly zkoumat možnosti zlepšení, nebo nápravy znečištění životního prostředí.

Jednou z možností, jak zabránit stále se zvyšujícímu znečišťování životního prostředí, je používání materiálů, které mají podobné vlastnosti jako petrochemické plasty, ale na rozdíl od nich jsou snadno rozložitelné v přírodě. Mezi takové materiály se řadí i polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou produkty metabolismu mnoha mikroorganismů. Jejich primární funkcí u mikroorganismů, které je produkují, je tvorba zásob, sloužících jako zdroj energie a uhlíku a následně jsou v přírodě rozkládány mikroorganismy na oxid uhličitý a vodu, což je činí biodegradabilními, a nedochází k jejich hromadění v přírodě. Kromě biodegradability je lze označit i za biokompatibilní látky. I přes skutečnost, že jsou klasické petrochemické plasty stále levnější než tyto biologicky rozložitelné materiály, se mnoho vědeckých skupin hledá nové producenty PHA, kteří by dokázali co nejrychleji a nejefektivněji produkovat nejenom PHA.

Právě jedním z nadějných producentů PHA je i bakterie *Rhodospirillum rubrum*, která je zajímavá především svým všestranným metabolickým aparátem, díky kterému je schopná na základě různých kultivačních podmínek produkce více metabolitů (např. PHA, pigmenty, aj.). Tato bakterie a její schopnost produkce PHA byla blíže zkoumána v předložené diplomové práci, zaměřené na popis morfologie buněk PHA produkujícího a neprodukujícího kmene. U těchto kmenů byl rovněž stanoven vliv obsahu PHA na základní fyziologické vlastnosti a stresovou odolnost buněk *R. rubrum*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

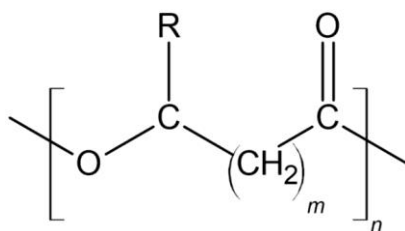
2.1.1 Charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery hydroxyalkanových kyselin, produkované mikroorganismy, které si je ukládají jako zásobní látku ve formě granulí o velikosti od 0,2–0,5 μm . Tyto intracelulární granule slouží mikroorganismům jako zdroje energie a uhlíku. Často se granule v mikroorganismech akumulují ve vyšší míře, jestliže se kultura vyskytuje v prostředí s nadbytkem uhlíku a zároveň s nedostatkem dusíku či fosforu. Zároveň jejich obsah zvyšuje odolnost mikroorganismů při stresové zátěži jako je např. působení UV, přítomnost těžkých kovů, neoptimální pH či teplota, aj. Obsah PHA granulí závisí na druhu mikroorganismu, kdy u některých obsah PHA tvoří až 90 % sušiny [1].

Fyzikálně-chemické vlastnosti PHA jsou podobné petrochemickým plastům, ale jsou navíc biokompatibilní a plně biodegradabilní. Při jejich degradaci dochází k rozkladu na oxid uhličitý a vodu, při čemž se na jejich rozkladu podílí mikroorganismy obsahující enzymatický aparát schopný degradace PHA. Pokud dochází k degradaci za anaerobních podmínek, jsou granule PHA rozloženy na methan a vodu [2, 3, 4].

2.1.2 Struktura

PHA (viz. obrázek 1) se skládají z monomerních jednotek a mají strukturu šroubovice helixu, který je stabilizovaný vodíkovými můstky mezi karbonylovou skupinou jednotlivých monomerů.



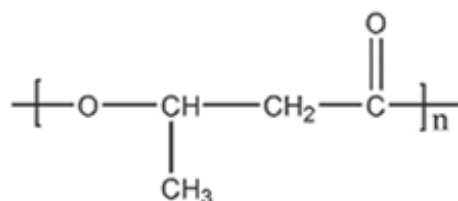
Obrázek 1 – Obecná struktura PHA, převzato upraveno [5]

Podle délky řetězce monomeru lze PHA dělit na 3 skupiny. PHA s monomery skládajícími se ze 3–5 uhlíkových atomů se nazývají PHA s krátkým řetězcem, tzv. *scl*-PHA, mezi které se řadí např. poly-3-hydroxybutyrát – P(3HB), poly-4-hydroxybutyrát – P(4HB), nebo poly-3-hydroxyvalerát – P(3HV). PHA jejichž monomery mají 5–14 uhlíkových atomů se řadí mezi PHA se středně dlouhým řetězcem, tzv. *mcl*-PHA a pokud obsahuje monomerní jednotka PHA více uhlíkových atomů než 14, jedná se o PHA s dlouhým řetězcem, tzv. *lcl*-PHA. Jedny

z nejčastějších monomerů PHA jsou 3-hydroxybutyrát, 3-hydroxyvalerát, 4-hydroxybutyrát, aj. [4, 6]

2.1.2.1 Polyhydroxybutyrát

Jak už bylo nastíněno výše, jeden z nejznámějších zástupců PHA jsou polyhydroxybutyráty (PHB, viz. obrázek 2), především poly(3-hydroxybutyrát, P(3HB)), který byl jako první zástupce PHA objeven v bakterii *Bacillus megaterium* v roce 1925 francouzským vědcem Mauricem Lemoignem [1]. Jedná se o biopolymer skládající se z monomerních jednotek (*R*)-3-hydroxybutyrátu. Jsou známy 3 typy P(3HB) s různým počtem 3HB jednotek. Vysokomolekulární zásobní P(3HB) se skládá z více než 10^3 3HB jednotek. Dalším typem je nízkomolekulární úložiště P(3HB), které má 100–200 3HB jednotek (oligo-PHB). Posledním typem je konjugovaný P(3HB) (cPHB), v němž je méně než 30 3HB jednotek, které jsou kovalentně vázány na proteiny. Vysokomolekulární úložiště P(3HB) se vyskytuje u mnoha prokaryot (*Eubacteria* a *Archea*), zatímco oligo-PHB a cPHB se vyskytují u všech prokaryot a eukaryot [2].



Obrázek 2 - Struktura P(3HB), převzato a upraveno [7]

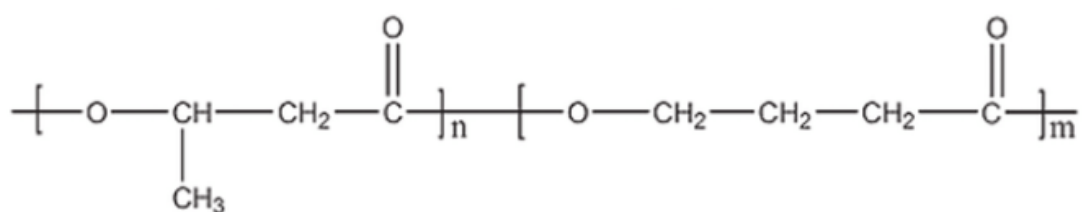
2.1.2.2 Vlastnosti a vliv struktury

Struktura a délka monomerních jednotek PHA značně ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou dále ovlivněny molekulovou hmotností PHA, která se pohybuje mezi 50–1 000 kDa [8]. PHA jsou ve vodě nerozpustné a stabilní při vystavení UV záření. V nativním stavu se granule v mikroorganismech vyskytují v amorfním stavu, po extrakci se stávají vysoce krystalické a také křehkými v závislosti na dané struktuře homo nebo heteropolymeru PHA [9].

Jak už bylo zmíněno výše, struktura PHA má velký vliv na vlastnosti samotného polymeru. Kupříkladu *scl*-PHA jsou výrazně křehké, krystalické a mají vyšší termoplasticitu, což znamená, že lépe tuhnou při ochlazování a měknou při vyšších teplotách [6]. Naopak *mcl*-PHA jsou amorfní polymery, u kterých klesá teplota skelného přechodu se zvětšujícím se postranním řetězcem [6].

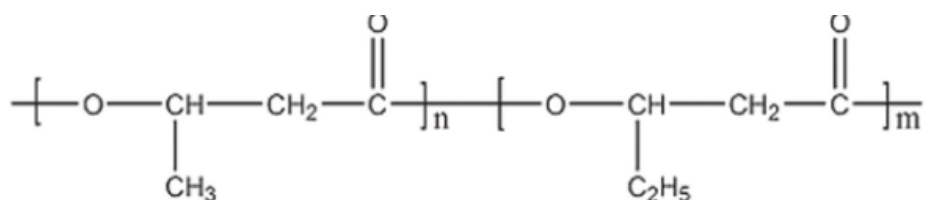
P(3HB), který je typickým zástupcem skupiny *scl*-PHA, je křehký a krystalický (krystalinita 70 %), s teplotou skelného přechodu 5 °C a teplotou tání 179 °C, přičemž jeho degradace začíná při teplotě 200 °C, což bývá problematické při průmyslovém zpracování. P(3HB) je podobný polypropylenu (PP) v Youngově modulu pružnosti [2].

Lepší vlastnosti, s ohledem na snazší zpracování a aplikaci, má kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), P(3HB-*co*-3HV), viz. obrázek 3. Ten má nižší krystalinitu (60 %), než P(3HB), díky čemuž je více elastický a méně tuhý. Jeho teplota tání odpovídá 145 °C a teplota skelného přechodu činí -13 °C. Se zvyšujícím se počtem 3HV jednotek v kopolymeru se zvyšuje jeho tažnost, což z něj dělá možného konkurenta PP [10].



Obrázek 3 – Struktura P(3HB-*co*-4HB), převzato a upraveno [7]

Dalším významným kopolymerem P(3HB) je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát), P(3HB-*co*-4HB), viz obrázek 4.



Obrázek 4 – Struktura P(3HB-*co*-3HV), převzato a upraveno [7]

Zabudováním 4HB monomeru do struktury dochází k vyšší míře degradace *in vivo* ve srovnání s jinými PHA, což zvyšuje biokompatibilitu materiálu a tím i lepší využití v praxi, zejména v medicíně). P(3HB-*co*-4HB) s různým obsahem 4HB monomeru vykazuje širokou škálu mechanických vlastností od vysoce krystalických bioplastů (nižší procentuální obsah 4HB), po materiály podobně elastomernímu kaučuku (vysoký procentuální obsah 4HB). V tabulce 1 jsou uvedeny základní vlastnosti P(3HB), PP, P(3HB-*co*-4HB), P(3HB-*co*-3HV) [11].

Tabulka 1 – Mechanické vlastnosti P(3HB), P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-3HV) a PP, převzato a upraveno [12], [13]

Mechanické vlastnosti	P(3HB)	P(3HB-co-4HB)*	P(3HB-co-3HV)**	PP
Bod tání, T_m [°C]	179	159	145	170
Teplota skleného přechodu, T_g [°C]	4	-15	-13	-10
Youngův modul [GPa]	3,5	–	1,2	1,7
Pevnost v tahu [MPa]	40	24	32	34,5
Tažnost [%]	5	242	50	100–600

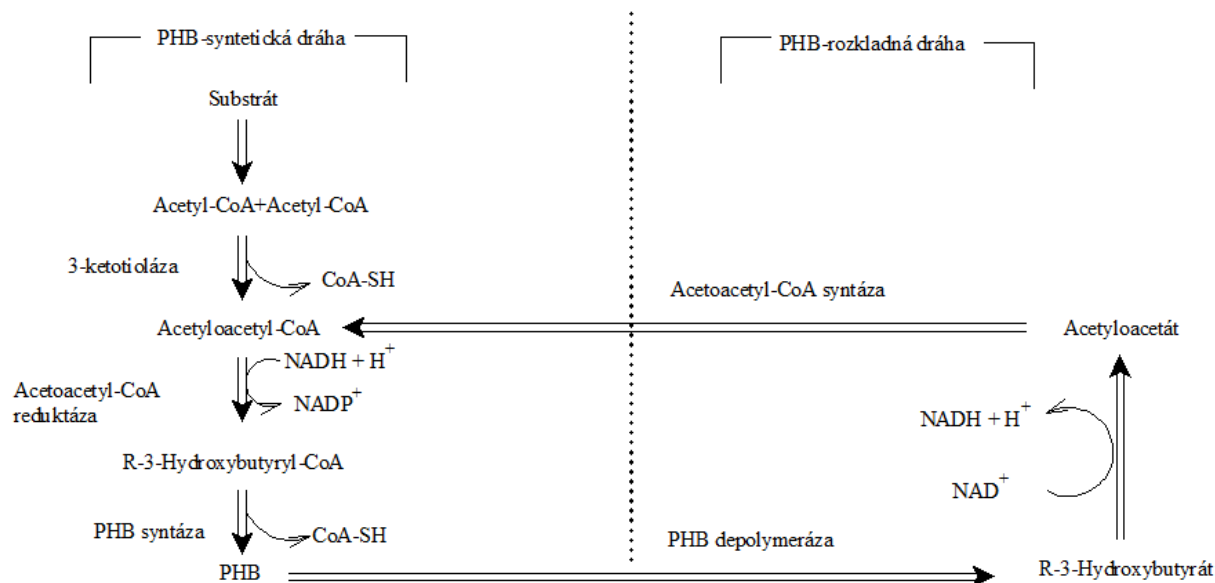
* kopolymer o složení 90 mol. % 3HB a 10 mol. % 4HB

** kopolymer o složení 80 mol. % 3HB a 20 mol. % 3HV

2.1.3 Biosyntéza PHA

Mikroorganismy začínají syntetizovat PHA v momentě, kdy mají dostatek uhlíkatého zdroje, ale zároveň jsou limitovány zdrojem biogenních prvků jako je dusík, fosfor, hořčík, nebo síra. V takovém případě dochází v cytoplazmě k syntéze PHA granulí, které potom slouží mikroorganismům jako zdroj energie, nebo uhlíku [14]. Využitím metod elektronové mikroskopie bylo určeno, že *in vivo* jsou P(3HB) granule potaženy svrchní vrstvou, která se liší od struktury středu polymeru. Donedávna však nebylo známo přesné složení tohoto povrchu granulí a bylo středem mnoha diskuzí v literatuře. Předpokládalo se, že povrch P(3HB) granulí se skládá z lipidické monovrstvy, ve které jsou inkorporovány proteiny [2]. Další teorie složení povrchové vrstvy P(3HB) granulí předpokládala, že povrch P(3HB) je složen ze 3 vrstev, kdy jsou 2 bílkovinné vrstvy odděleny vrstvou fosfolipidickou [15]. Nicméně předpokládaná přítomnost fosfolipidů v membráně P(3HB) granulí byla vyvrácena *Bresan a spol.* Tento tým prokázal, že P(3HB) granule u přírodních producentů neobsahují žádné fosfolipidy a skládají se pouze z proteinů, které oddělují hydrofobní jádro P(3HB) granulí od hydrofilního prostředí cytoplazmy [16]. Metabolická dráha syntézy *scl*-PHA (viz. obrázek 5) se skládá ze tří reakcí, které jsou katalyzovány enzymy 3-ketotiolázou, acetoacyl-CoA reduktázou a P(3HB) syntázou. Jako prekurzory slouží acetyl-CoA, hydroxybutyryl-CoA, nebo hydroxy-valeryl-CoA. První reakcí je Claisenova kondenzace dvou acetyl-CoA. Tato reakce je katalyzována enzymem 3-ketotiolázou a výsledný produkt je acetoacetyl-CoA, který je následně redukován acetoacetyl-CoA reduktázou na *R*-3-Hydroxybutyryl-CoA. Poslední krok syntetické dráhy je polymerizace P(3HB) syntázou, která katalyzuje přeměnu *R*-Hydroxybutyryl-CoA

na monomer P(3HB) odstraněním koenzymu A. Souběžně se syntézou P(3HB) probíhá i samotná degradace P(3HB) pomocí P(3HB) depolymeráz (viz. následující kapitola 2.1.4) [17].



Obrázek 5 – Schéma syntézy a biodegradace P(3HB), převzato a upraveno [17]

2.1.4 Biodegradace PHA

Jak už bylo zmíněno výše v kapitole 2.1.1, jedna z vlastností zvýhodňující PHA oproti klasickým petrochemickým plastům, je právě jejich biodegradabilita neboli rozložitelnost pomocí bakterií, hub, či dalšími mikroorganismy. PHA lze rozkládat za aerobních i anaerobních podmínek umožňuje-li to prostředí, ve kterém mikroorganismy rostou. Degradaci PHA za aerobních podmínek vzniká oxid uhličitý s vodou, za podmínek anaerobních jsou PHA degradovány na methan. Nejlépe se PHA rozkládají v půdě či kompostu s vyšší relativní vlhkostí, kdy se doba degradace PHA pohybuje v rozmezí několika měsíců. Naopak v moři zabere degradace i několik let. Dalším faktorem, hrajícím roli při degradaci PHA, je jeho samotné složení. Se zvyšující se složitostí, délkou a komplexností PHA řetězce se snižuje intenzita degradace. Roli v rychlosti degradace hraje i míra krystalinity, která také zhoršuje degradaci. Vliv na rychlost degradace má i molekulová hmotnost polymeru, kdy platí, že rychlost degradace klesá se zvyšující se molekulovou hmotností polymeru [15, 18, 19].

Mikroorganismy jsou schopné degradovat PHA pomocí intracelulárních a extracelulárních depolymeráz hydrolyzují esterovou vazbu v polymerech. Jejich působením vznikají ve vodě rozpustné oligomery a monomery. Tyto depolymerázy se liší zejména svou substrátovou

specifitou, kdy intracelulární depolymeráza štěpí pouze amorfni PHA a extracelulární depolymerázy jsou schopné degradovat pouze krystalické PHA.[18, 20].

Společným znakem intercelulárních a extracelulárních depolymeráz je schopnost hydrolyzovat esterové vazby PHA pouze v (*R*)-konfiguraci. Obecně jsou tyto depolymerázy nízkomolekulární enzymy s vysokou stabilitou vůči teplotě, iontové síle, nebo hodnotě pH, nicméně jejich pH optimum se nachází v rozmezí pH 7,5 – 9,8 [21] .

Jak můžete vidět na obrázku 5, samotná degradace *scl*-PHA se skládá, podobně jako syntéza, ze 3 enzymaticky katalyzovaných kroků. Prvním z nich je výše zmíněná hydrolyzaP(3HB) pomocíP(3HB) depolymerázy na *R*-hydroxybutyryl-CoA. Následuje reakce s *R*-3-hydroxybutyrát dehydrogenázou, kdy vzniká acetoacetát, který se může vrátit do metabolismu syntézyP(3HB) pomocí acetoacetyl-CoA syntázy. Acetoacetyl-CoA syntáza je enzym, katalyzující zařazení CoA do acetoacetátu za vzniku acetoacetyl-CoA [17].

2.1.5 Využití v praxi

PHA jsou díky svým mechanickým vlastnostem (viz. podkapitola 2.1.2.2), které se podobají petrochemickým plastům, jedním z možných materiálů budoucnosti. Vzhledem k vysoké variabilitě PHA díky různému složení a procentuálnímu zastoupení jednotlivých monomerních jednotek mají PHA různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem je potom možné jejich využití takřka ve všech průmyslových odvětvích. Mají velký potenciál pro aplikace v mnoha formách jako např. obalové materiály, nanovlákná, mulčovací folie v zemědělství, biopaliva či materiál využitelný v biomedicině a v tkáňovém inženýrství (např. ve formě scaffoldů). Nevýhodou těchto materiálů je jejich cena, která je výrazně vyšší než cena podobných výrobků z petrochemických plastů, nebo jiných typů používaných biokompatibilních materiálů [22].

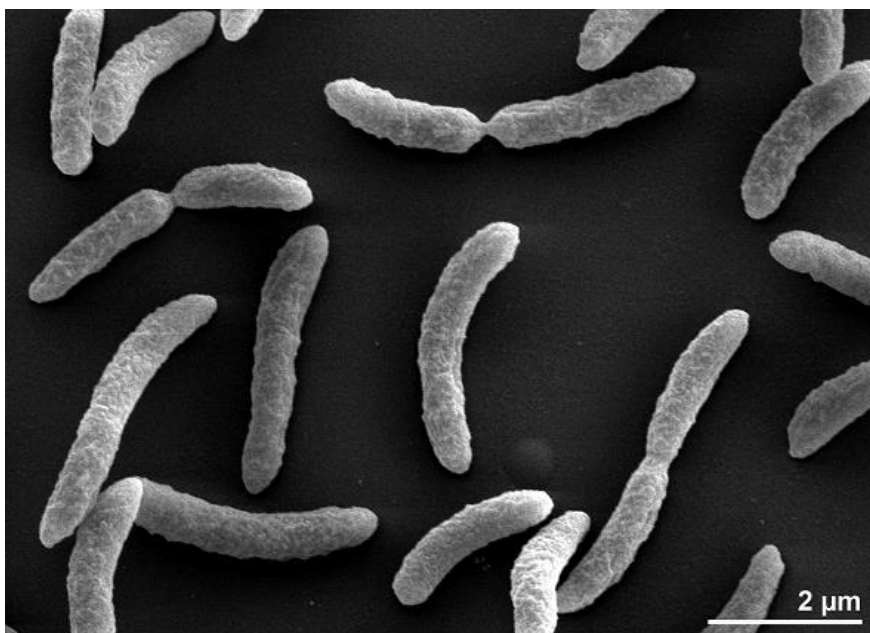
2.2 *Rhodospirillum rubrum*

Rhodospirillum rubrum (viz. obrázek 6) je G^- nesírná bakterie, která je schopná chemotrofního růstu ve tmě za přítomnosti kyslíku, nebo fototrofního růstu v prostředí bez kyslíku. Jedná se o mezofilní organismus s teplotním optimem v rozmezí 25–30 °C a optimálním pH mezi 6,8–7,2. Tato bakterie se nejčastěji vyskytuje ve sladkovodních stojatých i tekoucích vodách, může se však vyskytovat i v bahně, nebo v odpadních vodách. Je také častým modelovým mikroorganismem pro zkoumání regulačních drah fixace dusíku a přeměny světelné energie na energii chemickou [23, 24].

2.2.1 Struktura a vlastnosti

Bakteriální kmen *Rhodospirillum rubrum* patří mezi spirochety o šířce 0,8–1,0 μm a délce 3–10 μm a je schopný fotoautotrofního, fotoheterotrofního i fotomixotrofního růstu. Tato bakterie vytváří mnohvrstevné vnější obaly, které se skládají z nenasycených i nasycených tuků. Uvnitř buňky se nacházejí specializované intracelulární membrány (ICM), neboli chromatofory, zploštělé disky obsahující cholin-fosfolipidy, kardiolipin a galaktosyl diglyceridy a také elektron transportní řetězec, který zahrnuje cytochromy, flavin a pyridinové nukleotidy [23, 24].

Chromatofory obsahují dále karotenoidy a bakteriochlorofyl, které bakterie využívá při fotosyntéze. Bakteriochlorofyl absorbuje světelné záření v rozmezí 800–960 nm, což je jiné světelné spektrum než chlorofyl, vyskytující se v rostlinách, který absorbuje záření v rozmezí 450–475 nm [25, 26]. V aerobním prostředí, kdy kyslík inhibuje fotosyntézu, je bakterie *Rhodospirillum rubrum* bezbarvá. Naopak v anaerobním prostředí, kdy probíhá anoxygenní fotosyntéza, má bakterie výraznou purpurově červenou barvu, jelikož dochází k aktivaci pigmentů (bakteriochlorofyl, spiriloxantin, aj.) v chromatoforech [27].



Obrázek 6 – *Rhodospirillum rubrum*, převzato a upraveno [28]

Jak bylo naznačeno v předchozí kapitole, *Rhodospirillum rubrum* je fakultativní anaerobní bakterie. Je-li v prostředí přítomen kyslík, tento bakteriální kmen se uchyluje k aerobnímu dýchání, kdy využívá elektron transportního řetězce s NAD^+/NADH jako primárního přenašeče elektronů [29]. Při anaerobním dýchání jsou alternativními akceptory elektronů

dimethylsulfoxid, nebo trimethylaminoxid. Tyto akceptory umožňují *Rhodospirillum rubrum* využívat sukcinát, malát nebo acetát jako substrát pro růst. Nicméně dimethylsulfoxid a trimethylaminoxid se ukázaly být stejně efektivní jako kyslík pouze z 33–41 % z hlediska přeměny energie [30]. *Rhodospirillum rubrum* je také schopná anoxygenní fotosyntézy, při které neprodukuje kyslík ale vodík. Tento typ fotosyntézy je inhibován přítomností kyslíku [29].

U *Rhodospirillum rubrum* byla nedávno prokázána i odolnost vůči radioaktivitě. Při vystavení subletální dávce gama záření kobaltu-60 byly v bakterii zaznamenány markerové geny specifické pro ionizující záření. Expres těchto genů se zvyšovala po uplynutí určité doby od vystavení danému gama záření. Tato schopnost *Rhodospirillum rubrum* vytváří prostor pro další výzkum, který by mohl vést k novým objevům na poli aplikované radiační rezistence [27].

2.2.2 Metabolismus

Jak už bylo nastíněno výše, *Rhodospirillum rubrum* je fakultativně anaerobní mikroorganismus, schopný přežít za aerobních i anaerobních podmínek. Jsou-li životní podmínky aerobní, bakterie využívá aerobní respirační řetězec. V případě anaerobních podmínek využívá fotosyntézu, kdy finálním akceptorem elektronů není kyslík ale síra. Dále je bakteriální kmen *Rhodospirillum rubrum* schopný fixovat dusík na amoniak pomocí enzymatického proteinového komplexu nitrogenázy a také umí oxidovat oxid uhelnatý, kdy je finálním produktem metabolismu vodík [23, 24, 29].

2.2.2.1 Anoxygenní fotosyntéza

Anoxygenní fotosyntéza je fotosyntéza probíhající bez přítomnosti kyslíku (v anaerobním prostředí), přičemž i finální akceptor elektronů nebývá kyslík. V případě *Rhodospirillum rubrum* je finálním akceptorem síra, jak už bylo zmíněno v předchozích kapitolách.

Organismy schopné tohoto druhu fotosyntézy mají jako primární pigment bakteriochlorofyl. Přičemž neoxidují vodu, ale využívají např. síru, vodík, či organické zdroje jako redukční činidlo (sírné bakterie využívají síru jako redukční činidlo, *Rhodospirillum rubrum* jako nesírná bakterie využívá vodík). Kromě bakteriochlorofylu obsahuje *Rhodospirillum rubrum* také karotenoidní barviva (např. rhodopsin, lykopen atd.) [31, 32].

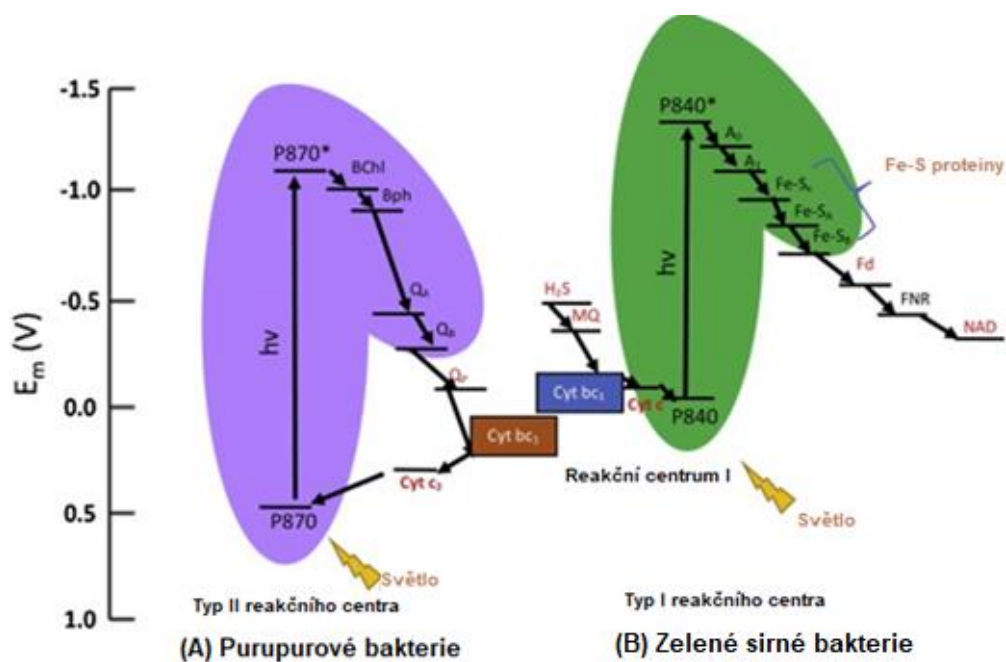
Na obrázku 7 lze vidět oba typy reakčních center, využívané při anoxygenní fotosyntéze. Jeden z hlavních rozdílů mezi reakčním centrem typu I, které využívají zelené sírné bakterie (GSB), a purpurovými bakteriemi, které využívají typ II reakčního centra, spočívá v absorpci světla.

Reakční centrum typu I (obrázek 7B) absorbuje světlo o vlnové délce 840 nm, naopak v reakčním centru typu II (obrázek 7A) dochází k absorpci při vlnové délce 870 nm. Další odlišností jsou primární akceptory elektronů. GBS využívají chlorofyl a fylochinon jako primární akceptory elektronů, a poté, místo chinonů, využívají kaskádu Fe-S proteinů, které přenáší elektrony prostřednictvím ferredoxinu a ferredoxin-NADP⁺ reduktázy na NAD [32].

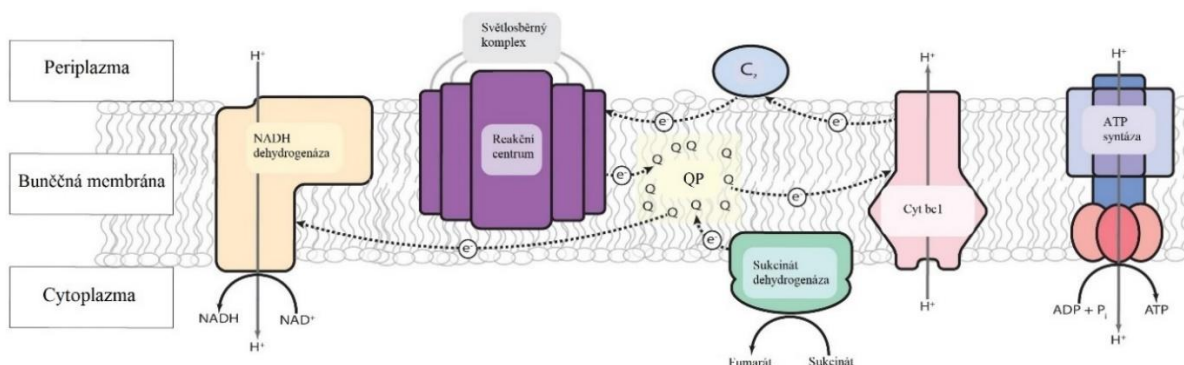
Elektronový transport

Anoxygenní fototrofní bakterie (AFB) používají typ I, nebo typ II reakčního centra. *Rhodospirillum rubrum* se řadí mezi *Proteobacteria*, takže využívá typ II reakčního centra, které lze vidět na obrázku 7A. Po dopadu fotonů na toto reakční centrum je světelná energie fotonů zachycena světlosběrnými komplexy a přenesena do dimeru bakteriochlorofylových molekul, tzv. pigmentu P870. Po excitaci P870 (absorpci světla o vlnové délce 870 nm) dojde k přenosu elektronu do bakteriochlorofylu (BChl), který je primárním akceptorem elektronu. Z něj se elektron přenáší na bakteriofytin (BPh), ze kterého putuje elektron na primární ubichinonový akceptor (QA) (viz. obrázek 7A a obrázek 8). [31, 32].

Z QA je elektron dále přesunut na sekundární ubichinonový akceptor (QB), který z cytoplazmy přijímá dva elektrony a dva protony a následně je přesouvá do posledního ubichinonového poolu (QP). Redukovaný QB je následně reoxidován cytochromovým komplexem bc₁ (Cyt bc₁), z kterého se elektron přesouvá na cytochrom c₂ (Cyt c₂), který reoxiduje P870. Po pohlcení dvou fotonů reakčním centrem, dochází k extracelulárnímu přenosu 4 protonů, které jsou využity pro syntézu ATP. ATP je syntetizováno v momentě, kdy dojde ke zvýšení koncentrace protonů v mezimembránovém prostoru, kam proudí skrze komplex Cyt bc₁. Zvýšení koncentrace protonů navýší pH v mezimembránovém prostoru, což zapříčiní změnu konformace ATP syntázy. Tato změna způsobí otevření kanálu v transmembránové části enzymu a protony začnou proudit zpět dovnitř po koncentračním spádu. Tímto prouděním se roztočí hlava ATP syntázy a začne syntéza ATP [33]. Zatímco elektrony nahromaděné v QP vytvářejí zpětný tok elektronů proti termodynamickému gradientu pomocí protony poháněné energie směrem k NADH dehydrogenáze, kde dochází ke tvorbě NADH z NAD⁺ (viz. obrázek 8) [34, 35].



Obrázek 7 - Schéma elektronového transportu u anoxygenní fotosyntézy, převzato a upraveno [32]

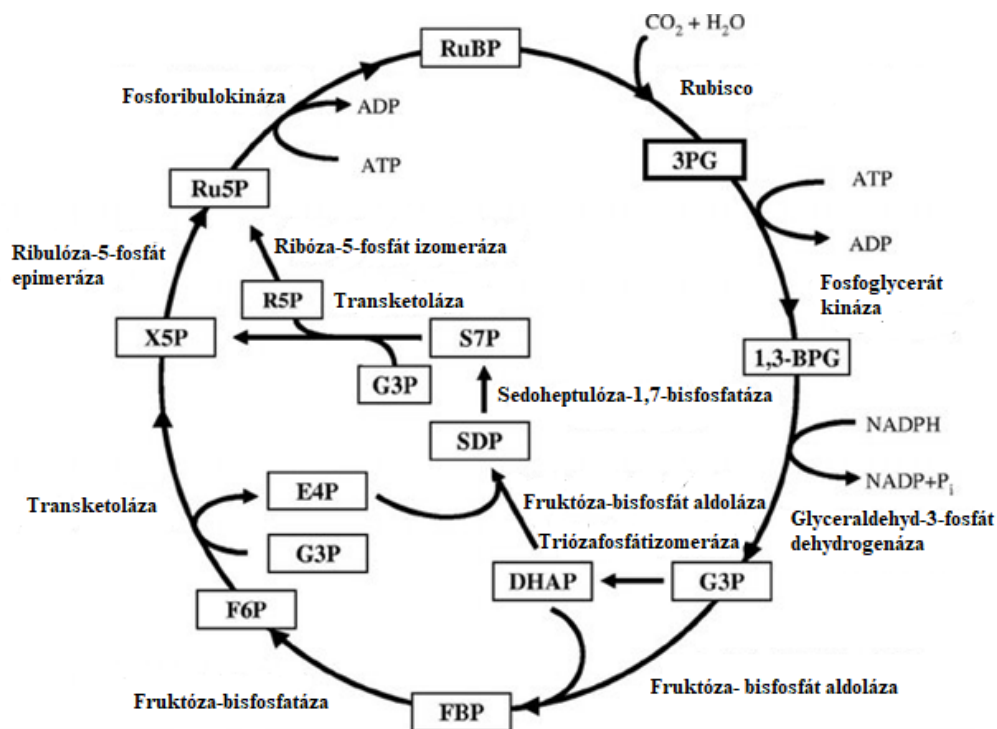


Obrázek 8 - Schéma anoxygenní fotosyntézy a jejího spřažení v tvorbou ATP, převzato a upraveno [35]

Calvin-Benson-Basshamův cyklus (CBB)

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.1, *Rhodospirillum rubrum* je bakterie schopná ftoheterotrofního, fotoautotrofního i fotomixotrofního růstu. Proto využívá Calvin-Benson-Basshamův cyklus, během kterého dochází k fixaci oxidu uhličitého CO_2 během ftoheterotrofního růstu jak fototrofních, tak i ftoheterotrofních organismů. Bylo prokázáno, že u kultur, které neměly dostatek enzymu Rubisco, došlo k nahromadění nadbytku intracelulárního reduktantu (ribulózy-1,5-bisfosfátu), což naznačuje, že CBB cyklus je důležitý při udržování redoxní rovnováhy [36].

Jak můžete vidět na obrázku 9 Calvin-Benson-Basshamův cyklus začíná začleněním 3 molekul CO_2 do 5 uhlíkaté molekuly ribulózy-1,5-bisfosfátu (RuBP) pomocí enzymu Rubisco a ATP za vzniku šesti 3 uhlíkatých molekul 3-fosfoglycerátu (3PG). Ty jsou následně fosforylovány na 1,3-bisfosfoglycerát (1,3-BPG), který je poté za oxidace NADPH na $\text{NADP}+\text{P}_i$ redukován na glyceraldehyd-3-fosfát (G3P). Jedna molekula glyceraldehyd-3-fosfátu (G3P) odchází z cyklu jako uhlíkatý zdroj a zbylých 5 molekul je pomocí triozafosfátizomerázy izomerizováno na dihydroxyaceton-fosfát (DHAP). Odtud je možné dihydroxyaceton přeměnit fruktózabisfosfát aldolázou na šestiuhlíkatou fruktózu-1,6-bisfosfát (FBP), nebo na sedmiuhlíkatou sedoheptulózu-1,7-bisfosfát (S7P). Fruktóza-1,6-bisfosfát je dále redukována na xylulózu-5-fosfát (X5P), která je ribulóza-5-fosfát epimerázou epimerizována na ribulózu-5-fosfát (R5P). Ta je za spotřeby jedné molekuly ATP fosforylována na ribulózu-1,5-bisfosfát (RuBP). Mezitím sedoheptulóza-1,7-bisfosfát (S7P) je sledem redukčních reakcí také přeměněna na ribulózu-5-fosfát (R5P) a potom fosforylována na ribulózu-1,5-bisfosfát (RuBP), která se vrací na začátek celého cyklu [36].



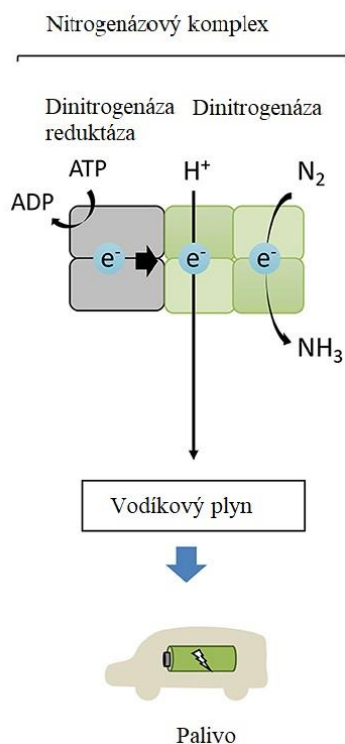
Obrázek 9 - Schéma Calvin-Benson-Bassham cyklu, převzato upraveno [36]. RuBP – ribulóza-1,5-bisfosfát; 3PG – 3-fosfoglycerát; 1,3-BPG – 1,3-bisfosfoglycerát; G3P – glyceraldehyd-3-fosfát; DHAP – dihydroxyacetonfosfát; SDP – sedoheptulóza-1,7-bisfosfát; S7P – sedoheptulóza-7-fosfát; E4P – erytróza-4-fosfát; FBP – fruktóza-1,6-bisfosfát; F6P – fruktóza-6-fosfát; R5P – ribóza-5-fosfát; X5P – xylulóza-5-fosfát; Ru5P – ribulóza-5-fosfát; RuBP – ribulóza-1,5-bisfosfát

2.2.2.2 Fixace dusíku

Jak bylo v textu již opakovaně uvedeno, bakterie *Rhodospirillum rubrum* je výjimečná metabolickou všestranností, kdy je schopna i fixace vzdušného dusíku. Fixace dusíku je proces katalyzovaný komplexem nitrogenázou, při kterém je dusík ve formě N_2 redukován na amoniak NH_3 , který je výhodnějším zdrojem dusíku pro bakterie. *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodobacter capsulatus* mají molybden-nitrogenázu (Mo-nitrogenázu) a zároveň disponují i Fe-nitrogenázou [37, 38].

Fixace dusíku je proces (viz. obrázek 10), kdy dochází k redukci dusíku N_2 na amoniak NH_3 za spotřeby minimálně 16 molekul ATP. Zároveň během tohoto procesu vzniká také vodík H_2 a v případě, že bakterie nemají k dispozici N_2 , dochází pouze k redukci protonů na H_2 . Tato schopnost je v posledních letech zkoumána jako možná cesta k produkci vodíkových paliv [38].

Fixace dusíku je regulována faktory jako např. obsah amoniaku, molybdenu, železa, kyslíku a světla. Na regulaci se také podílí regulační proteiny jako dvou složkový systém NtrB-NtrC, transkripční aktivátor NifA, aj. Při limitaci amoniakem NtrB fosforyluje NtrC, který následně aktivuje expresi NifA, a dalších genů vázaných na proces fixace dusíku, které aktivují Mo a Fe-nitrogenázovou expresi [37].

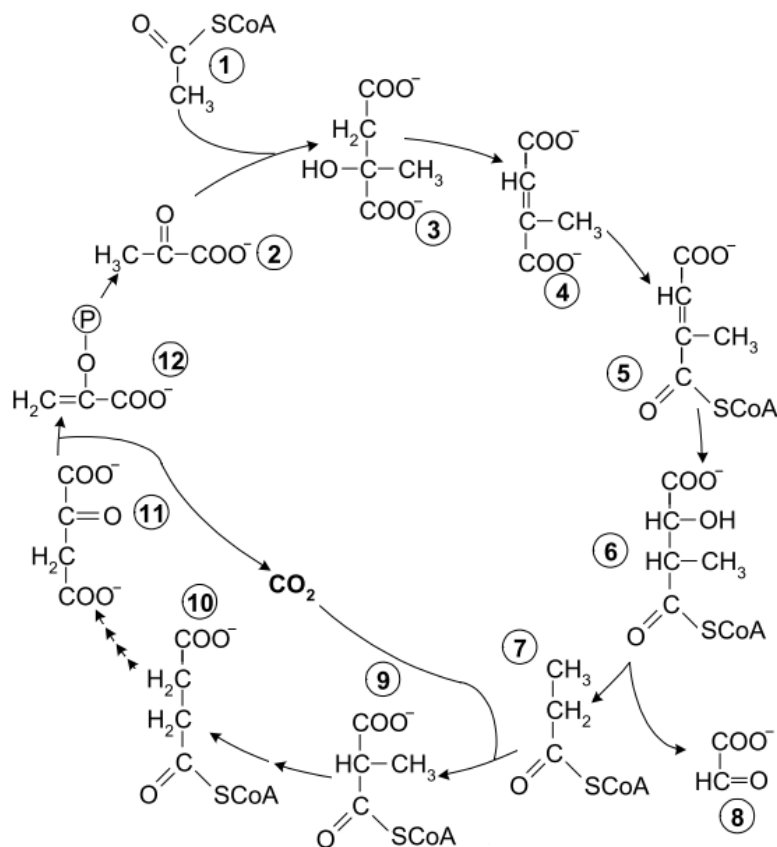


Obrázek 10 - Schéma fixace dusíku, převzato a upraveno [39]

2.2.3 Asimilace různých substrátů

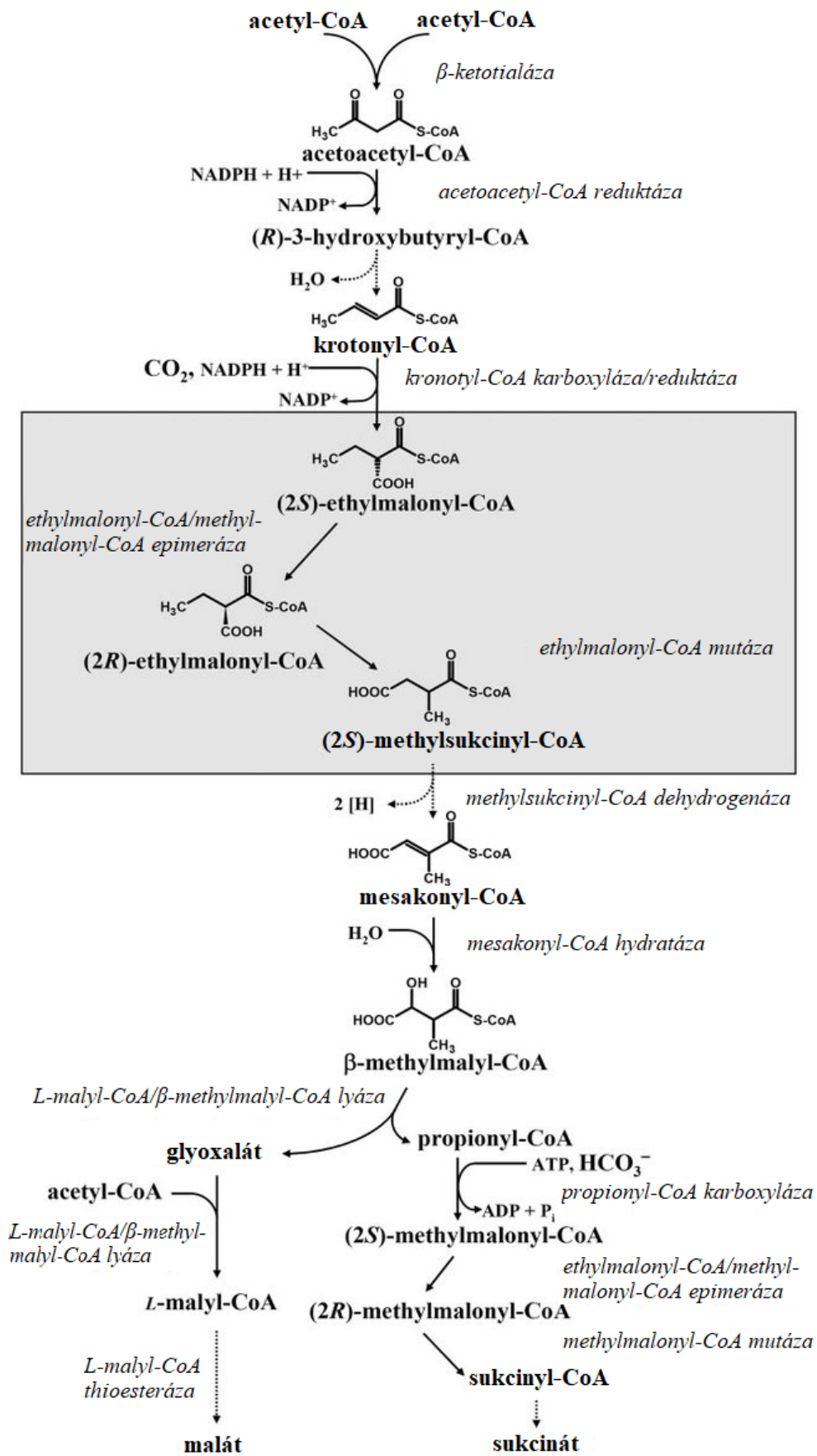
Na základě metabolické všestrannosti bakteriálního kmene *Rhodospirillum rubrum*, byly kromě detailně popsaného metabolismu dusíku, provedeny u této bakterie i studie metabolismu těžkých mastných kyselin, a to převážně acetátu, který vzniká při fermentačních procesech. Katabolismus acetátu se koná prostřednictvím cyklu trikarboxylových kyselin (TCA). Při využití acetátu jako kultivačního substrátu je důležité, aby byly do TCA doplňovány čtyřuhlíkaté kyseliny. Tyto C₄ sloučeniny se za normálních okolností doplňují díky glyoxalátovému cyklu, nicméně *Rhodospirillum rubrum* patří mezi bakterie, které nejsou tohoto cyklu schopny, protože nemá isocitrát-lyázu. Glyoxalátový cyklus je u ní tedy nahrazen citrátmalátovým cyklem, nebo ethylmalonyl-CoA dráhou (EMC) [40, 41] .

Citrátmalátový cyklus, který lze vidět na obrázku 11, začíná kondenzací acetyl-CoA s pyruvátem za vzniku citrátmalátu. Ten je následně přeměněn na mesakonát, ze kterého vznikne mesakonyl-CoA. Z mesakonylu-CoA vznikne β -methylmalyl-CoA, který je potom rozložen na glyoxylát a propionyl-CoA. Propionyl-CoA je poté karboxylován pomocí propionyl-CoA karboxylázy na methylmalonyl-CoA, který je přeměněn na sukcinyl-CoA a něj vznikne oxalacetát s pomocí části TCA cyklu. Oxalacetát je dekarboxylován na fosfoenolpyruvát, ze kterého s pomocí pyruvátkinázy vzniká pyruvát. Ten je následně regenerován na acetyl-CoA [40].



Obrázek 11 – Citrátmalátový cyklus: 1. acetyl-CoA, 2. pyruvát, 3. citrátmalát, 4. mesakonát, 5. mesakonyl-CoA, 6. β -methylmalyl-CoA, 7. propionyl-CoA, 8. glyoxylát, 9. methylmalonyl-CoA, 10. sukcinyl-CoA, 11. oxalacetát, 12. fosfoenopyruvát; převzato upraveno [42]

Naopak při ethylmalonyl-CoA dráze, která je znázorněna na obrázku 12, dochází nejprve ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Ten je následně přeměněn přes (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA na krotonyl-CoA, který je karboxylován krotonyl-CoA karboxylázou na (*2S*)-ethylmalonyl-CoA. Tato sloučenina je pomocí ethylmalonyl-CoA/methylmalonyl-CoA epimerázy přeměněn na (*2R*)-ethylmalonyl-CoA, který je ethylmalonyl-CoA mutázou převeden na (*2S*)-methylsukcinyl-CoA. A ten je poté dehydrogenázou oxidován na mesakonyl-CoA, který je mesakonyl-CoA hydratázou přeměněn na β -methylmalyl-CoA, který se dělí na glyoxalát a propionyl-CoA. Glyoxylát poté kondenzuje s třetí molekulou acetyl-CoA za vzniku malátu, zatímco propionyl-CoA je přes sukcinyl-CoA převeden na sukcinát, který je následně převeden na druhou molekulu malátu [41].



Obrázek 12 – Schéma ethylmalonyl-CoA dráhy, převzato a upraveno [43]

Jako další možný uhlíkatý zdroj pro *Rhodospirillum rubrum* se ze skupiny mastných kyselin, řadí butyrát, který je bakterií zpracováván za fotoheterotrofních podmínek. Dá se předpokládat, že první krok asimilace butyrátu je jeho aktivace, při které vznikne butyryl-CoA. Tato aktivace je pravděpodobně poháněna enzymem acetyl-CoA hydroláza, který byl při kultivaci na butyrátu detekován ve zvýšeném množství. Vzniklý butyryl-CoA je následně oxidován butyryl-CoA dehydrogenázou za vzniku krotonyl-CoA. Ten je následně přeměněn na acetyl-CoA. Při této reakci vzniká jako meziprodukt (*S*)-3-hydroxybutyryl-CoA, který je 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenázou oxidován na acetoacetyl-CoA. Tato látka je poté rozštěpena na 2 molekuly acetyl-CoA. Výsledky studií také prokázaly, že při asimilaci butyrátu a jeho konverzi na acetyl-CoA dochází k uplatnění anaplerotických drah, které doplňují meziprodukty do TCA cyklu. Dále bylo zjištěno, že do asimilace butyrátu je pravděpodobně zapojena i biosyntetická dráha aminokyselin s rozvětveným řetězcem (izoleucin, leucin a valin). Při růstu na butyrátu byla totiž pozorována zvýšená aktivita enzymů, které se podílejí nasyntéze i degradaci L-valinu a L-izoleucinu (α -pyruvát oxidoreduktáza a β -pyruvát oxidoreduktáza) [44, 45, 46].

2.2.4 Zásobní látky

Vzhledem k zadanému tématu diplomové práce, je tato kapitola v rámci zásobních látek zaměřena pouze na polyhydroxyalkanoáty, které slouží bakteriím jako zásobárna uhlíku a energie v případě jeho nedostatku. V poslední době se dostal do popředí vědeckého zájmu výzkum produkce PHA z CO₂ prostřednictvím fotosyntézy sinic, či rostlin, jelikož tyto organismy nepotřebují uměle dodávat významná množství uhlíkového zdroje ve formě cukru, či rostlinných olejů, jako klasičtí producenti PHA. Purpurové bakterie jsou také schopny fotosyntézy (viz. kapitola 2.2.2.1) a mezi fotosyntetizujícími organismy se řadí mezi dobré producenty PHA [47]. PHA produkce byla popsána u mnoha sladkovodních purpurových bakterií jako jsou *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter spaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* a *Allochromatium vinosum*. Naopak produkce PHA pomocí mořských purpurových bakterií je v porovnání se sladkovodními nízká. [39].

Biosyntéza PHA u purpurových bakterií probíhá dle metabolické dráhy, která byla již popsána v kapitole 1.3. Existují čtyři typy enzymu PHA syntázy, třídy I – IV. PHA syntázy třídy I a II jsou složeny z jedné podjednotky o molekulové hmotnosti mezi 60–70 kDa. Třída III je složena ze dvou podjednotek PhaC a PhaE a třída IV obsahuje také dvě podjednotky a to PhaC a PhaR. Bylo prokázáno, že velká část nesírných purpurových bakterií, včetně *Rhodospirillum rubrum*, obsahuje PhaC třídy I, tudíž tvořenou jednou podjednotkou [48, 49].

Mořské purpurové sírné bakterie, jako např. *Thiohalocapsa marina*, jsou schopné produkovat pouze homopolymer P(3HB), zatímco mořské nesírné purpurové a sladkovodní purpurové bakterie jako např. *Rhodovulum sulfidophilum*, nebo *Rhodospirillum rubrum*, dokáží produkovat kopolymer P(3HB-co-3HV). Rozdíl v produkci těchto dvou skupin bakterií je pravděpodobně zapříčiněn rozdílnými druhy PHA syntáz, které se u daných bakterií vyskytují [39, 50]. Právě purpurové nesírné bakterie jsou v poslední době často využívány v oblasti průmyslové aplikace při výrobě bioplastů, pigmentů, nebo i biomasy. Pro optimalizaci výnosů těchto biotechnologických procesů je zapotřebí prozkoumat a pochopit asimilaci jednotlivých uhlíkových zdrojů [51].

Mezi slibné uhlíkové zdroje se řadí i těkavé mastné kyseliny (VFA – „volatile fatty acids“), jelikož jsou levným a snadno dostupným zdrojem uhlíku. Jedním z často zkoumaných zástupců této skupiny je kyselina octová, která je výsledkem fermentačních procesů, a proto byl popis její asimilace součástí mnoha výzkumů. V současné době je již prokázáno (studie *Janssen a Harfoot*), že *Rhodospirillum rubrum* využívá pro fotoasimilaci acetátu alternativní cestu ethylmalonyl-CoA, která je popsána v kapitole 2.2.3, protože nemá gen pro isocitrát-lyázu. Mezi jeden z často zkoumaných VFA se řadí i valerát, který je také produktem fermentačních procesů. Na rozdíl od např. kyseliny octové, u které je již známý princip asimilace, u valerátu nebyl zatím přesný princip asimilace u *Rhodospirillum rubrum* popsán [51].

Výzkum *Bayon-Vincente a spol.* prokázal, že přítomnost hydrogenuhličitanových iontů je nezbytná pro asimilaci valerátu. Při přidání valerátu a hydrogenuhličitanových iontů do kultivačního média byl výrazně urychlen růst *Rhodospirillum rubrum*, oproti kultivaci bez hydrogenuhličitanových iontů, což naznačuje významnou roli těchto iontů při asimilaci valerátu a podpoře růstu *Rhodospirillum rubrum*. Kultivace této bakterie, která probíhala pouze na valerátu měla významný vliv, konkrétně na zvýšený obsah proteinů (stresové proteiny, alkylhydroperoxid reduktáza, acetyl-CoA C-acetyl transferáza, aj.) spojených se zvládnutím stresu a redoxní homeostázy. A současně bylo zaznamenáno nižší množství PHA-depolymerázy, která degraduje PHA, než v prostředí obsahující sukcinát jako uhlíkatý zdroj [51].

2.3 Polyhydroxyalkanoáty a stresová odpověď bakterií

Bakterie jsou v přírodě neustále vystavovány různým stresovým faktorům jako je nedostatek živin, kolísající teplota okolí, přítomnost těžkých kovů v prostředí, nebo zvýšené UV záření. Z těchto důvodů se u nich vyvinula celá řada adaptivních a protektivních mechanismů vůči stresům vnějšího okolí. Kromě adaptace povrchu buněk (tvorba extracelulárních bariér, aj.),

nebo tvorby enzymů, aminokyselin, či pigmentů se mezi tyto ochranné mechanismy řadí i syntéza a akumulace PHA granulí [52].

2.3.1 UV záření

UV záření patří k nejběžnějším, ale zároveň je i jedním z nejvíce škodlivých faktorů, kterým jsou mikroorganismy neustále vystavovány. Existují různé druhy UV záření. UV-C záření o vlnové délce 100–295 nm je pohlcováno ozonovou vrstvou Země. Na její povrch ale dopadá záření UV-B o vlnové délce 295–320 nm, které v případě absorpce mikroorganismy může způsobit fatální změny v jejich DNA. Kromě těchto nežádáných změn UV záření způsobuje i tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které poškozují DNA, RNA, proteiny, anebo lipidy. Proto si mikroorganismy vyvinuly celou řadu ochranných mechanismů, které je před tímto druhem stresu chrání, jako jsou produkce různých pigmentů (bakterioruberin, melanin, scytonemin, aj.), aminokyselin, enzymů (fotolyáza, glykolyáza, nebo endonukleáza, které opravují již poškozenou DNA), nebo akumulace PHA granulí. [53].

Ochranný účinek PHA před UV zářením byl prokázán u bakterie *Azospirillum brasilense*, kdy bakterie obsahující PHA granule měly vyšší životaschopnost než bakterie, které PHA granule neobsahovaly. Dále byl ochranný účinek PHA granulí prokázán také u bakterií *Cupravidus necator* H16 a *Pseudomonas extremaustralis*, nebo u geneticky modifikované *E. coli*, kde bylo prokázáno, že ochranný účinek PHA granulí je postaven na rozptylu UV záření, čímž je snížena celková absorpce UV záření bakteriální buňkou. Snížením absorpce dopadeného záření se omezí např. množství intracelulárního ROS, nebo počet fatálních změn v DNA, či RNA, způsobených UV zářením [53, 54].

2.3.2 Osmotický stres

V přírodě jsou výkyvy osmolarity velice častým jevem. Při zvýšení extracelulární osmolarity v hypertonickém prostředí dochází k indukci transportu vody z buněk, což způsobuje narušení integrity plazmatické membrány a dochází tak k plazmolýze (osmotické ztrátě vody u buňky nacházející se v hypertonickém prostředí). V případě, že jsou buňky vystavené hypotonickému prostředí, voda je rychle transportována do buněk. Zvýšeným příjmem vody opět způsobí narušení integrity plazmatické membrány a její poškození může způsobit až tzv. hypotonickou lyzi, při které je poškozena celá bakteriální buňka. Z tohoto důvodu mikroorganismy disponují mechanismy, které je před takovým typem stresu chrání [55, 56].

Na příklad u bakteriálního kmene *Cupravidus necator* H16 jsou nativní PHA granule využívány ke stabilizaci buněčné membrány. Princip tohoto protektivního mechanismu se zakládá

na amorficitě PHA intracelulárních granulí (viz podkapitola 1.4), díky které jsou bakterie schopné granulemi zaplnit mezery v poškozené plazmatické membráně vytvořené během plazmolýzy [56]. Nepřímým důkazem o ochranné funkci PHA před osmotickým tlakem je i skutečnost, že řada halofilních bakterií, jako např. *Haloferax meiterranei*, *Halogeometricum borinwuense*, nebo *Halomonas halophila* akumuluje značné množství PHA. Bylo zjištěno, že při vystavení osmotickému šoku u bakterií, které neobsahovaly PHA granule, došlo ke zvýšení mortality. Pouze 2 % buněk těchto bakterií byla schopná si udržet buněčnou strukturu. Naopak kultury, obsahující PHA granule, měly vyšší počet viabilních buněk (7,5 % viabilních buněk) [55].

2.3.3 Teplotní stres

Výkyvy teplot jsou dalším častým stresovým faktorem běžně se vyskytujícím v přírodě např. v závislosti na změně ročního období. I z tohoto důvodu si mikroorganismy vyvinuly protektivní mechanismy, které je chrání před náhlými změnami teplot. V případě zvýšení teploty nad optimální teplotu daného mikroorganismu dojde k denaturaci proteinů, buněčné stěny, nebo enzymů. U bakterie *Cupravidus necator* H16 bylo prokázáno, že 3-hydroxybutyrát (3HB), který je produktem degradace P(3HB) (viz podkapitola 1.4), hraje protektivní roli u enzymu lipáza při zahřívání. Za nepřítomnosti 3HB začal tento enzym denaturovat při 49 °C, zatímco v přítomnosti 1000mM 3HB začala denaturace lipázy až při 53 °C. Přítomnost 3HB tak zvýšila teplotní maximum, při kterém byla lipáza aktivní. Tyto ochranné účinky 3HB se zvyšovaly s jeho koncentrací (byl použit 3HB o koncentracích 50mM a 100mM 3HB) [58].

Protektivní vlastnost PHA granulí byla rovněž pozorována u bakteriálního kmene *Herbaspirillum seropedicae*, kdy byla syntéza PHA aktivována až po vystavení buněk teplotnímu šoku 45 °C (optimální teplota *H. seropediace* je v rozmezí 30–34 °C). Naopak mutantní kmen *H. seropediace*, který nebyl schopný produkovat PHA, byl mnohem náchylnější k poškození vlivem zvýšené teploty. Pouze 20 % buněk mutantního kmene zůstalo viabilních, zatímco u divokého kmene zůstalo viabilních 80 % buněk [59].

Nicméně bylo potvrzeno, že výskyt PHA granulí v buňkách neslouží u bakterií jen jako ochrana proti vysokým teplotám, ale byl prokázán i jejich kryoprotektivní účinek. K vystavení podmínkám pod 0 °C je reakce prokaryotických buněk většinou pasivní, což způsobuje tvorbu ledových krystalů. S růstem ledu se koncentrace rozpuštěných látek v médiu vylučuje do zmenšujícího se objemu rozpouštědla, což vyvolává osmotický stres, jehož účinek byl popsán v kapitole 2.3.2. Tento jev se nazývá tzv. „mrazová dehydratace“ a je jedním

z negativních důsledků zamrazení buněk, které nejsou chráněné kryoprotektanty. Další škodlivý mechanismus zamrazování je tvorba intracelulárního ledu, který může poškodit membrány či organel [60].

Významným faktorem ovlivňující poškození způsobené při zamrazování buněk, je samotná rychlost zamrazování. V případě nízké rychlosti zmrazení dochází k extracelulární tvorbě krystalů ledu, při čemž odtok vody z buňky zůstává dostatečný pro udržení chemické rovnováhy. Také rozsah vnitrobuněčného podchlazení zůstává minimální. Naopak při rychlém zmrazení dojde k rozsáhlému podchlazení uvnitř buněk, což vede ke zmrazení intracelulární vody. Při takovém zmrazení může také docházet ke tvorbě reaktivní formě kyslíku tzv. ROS, které dále poškozují buňky. Na základě těchto vlivů si mikroorganismy vyvinuly mechanismy, jako adaptace složení plazmatické membrány, syntéza antioxidantních enzymů, akumulace trehalózy, či právě produkci a akumulaci PHA [52, 60, 61]. Kryoprotektivitu PHA granulí podporuje i fakt, že u bakterií *Pseudomonas extremaustralis* a *Shingopyxis chilensis*, žijících v extrémně chladných podmínkách (vyskytují se na Antarktidě), byl rovněž prokázán výskyt PHA granulí. Stejně jako u vysokých teplot byla prokázána ochranná funkce 3HB i u teplot nízkých u bakterie *Cupravidus necator* H16 [62, 63].

2.3.4 Přítomnost těžkých kovů

Těžké kovy jako kadmium, chrom, olovo, měď, rtuť, stříbro, nebo arsen se v určitém množství vyskytují v přírodě, převážně ve formě minerálů. Nicméně působením lidské činnosti se v posledních letech začaly v prostředí objevovat častěji a ve vyšší koncentraci např. z odpadních vod z průmyslových koželužen. Těžké kovy svou přítomností znečišťují životní prostředí hlavně díky faktu, že se v přírodě bioakumulují a nerozkládají se. Toxicita těžkých kovů vyvolává negativní účinky na mikroorganismy, která se odvíjí od biologické dostupnosti těžkého kovu a absorbované dávce. Toxicita těžkých kovů zahrnuje několik mechanismů fatálních působení jako je narušení enzymatických funkcí (inhibice funkce enzymu vytvořením inaktivního komplexu), destrukce iontové regulace, ovlivnění tvorby DNA a proteinů, nebo mohou způsobit i tvorbu ROS. Chrom a kadmium vyvolávají oxidační poškození, denaturaci buněk a způsobují mutagenezi. Naopak měď způsobuje tvorbu ROS, které vážně poškozují cytoplazmatické molekuly, DNA, a lipidy. Rtuť způsobuje denaturaci proteinů, inhibuje funkci enzymů a rozrušuje buněčnou membránu. Také olovo inhibuje funkci enzymu a narušuje transkripci. Zatímco stříbro vyvolává lyzi buněk, inhibuje buněčný růst a arsen inaktivuje enzymy [64].

Mezi ochranné mechanismy mikroorganismů proti toxickému vlivu těžkých kovů se řadí tvorba extracelulární bariery, extracelulární sekvestace a aktivní transport kovových iontů do extracelulárního prostředí, nebo intracelulární sekvestrace a redukce kovových iontů. Objevily se i případy, kdy byl zaznamenán ochranný účinek PHA granulí. Konkrétně u bakterie *Cupriavidus taiwanensis* byla prokázána za optimálních podmínek (kultivace v LB médiu) odolnost vůči kadmii (Cd) do koncentrace 5mM. Při kultivaci v LB médiu, které obsahovalo glukonát sodný jako dodatečný zdroj uhlíku došlo ke zvýšení produkce PHA. A zároveň se zvýšila odolnost *C. taiwanensis* vůči kadmii na koncentraci 7mM. Lze tedy usoudit, že se zvyšující se koncentrací PHA granulí, se zvyšuje i tolerance vůči těžkým kovům (v tomto případě kadmia) [65]. Přičemž u bakteriálního kmene *Azospirillum brasilense* bylo zaznamenáno zvýšení produkce PHA v přítomnosti měďnatých iontů (0,1 mM Cu²⁺), kdy byla produkce PHA 1,6 signifikantně vyšší (39 % obsahu sušiny) než u kontrolních kultur bez přítomnosti měďnatých iontů (24 % obsahu sušiny) [66].

2.3.5 Oxidační stres

Kyslík je prvek, který tvoří 21 % vzduchu na Zemi a také se řadí mezi prvky s nejvyšším zastoupením na Zemi. Kvůli jeho přítomnosti v zemské atmosféře si museli mikroorganismy vyvinout mechanismy před potenciálním nebezpečím škodlivých vedlejších produktů metabolismu kyslíku. V aerobním oxidačním metabolismu totiž dochází ke tvorbě ROS. Mezi takto produkované formy ROS se řadí např. superoxid (O²⁻) a peroxid vodíku (H₂O₂). Díky přítomnosti ROS v buňkách dochází k poškození struktury nukleových kyselin, bází nukleových kyselin, volných i vázaných aminokyselin, kofaktorů proteinů, proteinů i lipidů, což může vést až k buněčné smrti. Jako ochrana před těmito škodlivými sloučeninami slouží hlavně enzymy označované jako superoxid dismutázy (SOD), které přeměňují superoxid na kyslík a peroxid vodíku. Dalšími enzymy, které mikroorganismy chrání před ROS jsou katalázy a peroxidázy, které odstraňují vzniklý peroxid vodíku. Koncentrace ROS uvnitř buněk může být zvýšena i vlivem okolního prostředí např. vlivem UV záření, při rychlém zmrazení nebo působením těžkých kovů, jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách [67].

Byla prokázána i protektivní vlastnost PHA granulí proti oxidačnímu stresu, a to u bakteriálních kmenů *Azospirillum brasilense* a *Aeromonas hydrophila*, kde byla prokázána větší odolnost u PHA produkujících kmenů vůči ROS. Ochranná funkce PHA granulí před oxidačním stresem byla také potvrzena faktem, že se u bakterie *Cupriavidus necator* H16 v přítomnosti peroxidu vodíku zvýšila produkce PHA o 30 % [54]. Dále byl u Δ phaC1 mutantního bakteriálního kmene *Herbaspirillum seropedicae* zkoumán vliv absence PHA při zvládnutí oxidačního stresu a bylo

potvrzeno, že při absenci PHA byl negativní vliv oxidačního stresu zvýšený a zároveň byla ovlivněna exprese mnoha genů regulujících metabolismus bakterie jako např. regulátoru Fnr, který se podílí na expresi cytochromu-c v dýchací řetězci [68].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Mikroorganismy, chemikálie, přístroje

3.1.1 Mikroorganismy

V této práci byla použita bakterie *Rhodospirillum rubrum* ze sbírky z Leibnizova institutu, číslo sbírky DSM 467.

3.1.2 Použité chemikálie

- Aceton (Sigma-Aldrich)
- LB Broth (Sigma-Aldrich)
- Biotin (Sigma-Aldrich)
- BODIPY (eBioscience)
- D-fruktóza (Lach-Ner)
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)
- Dihydrát molybdenanu sodného (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Etanol absolutní (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu horečnatého (Lach-Ner)
- Heptahydrát síranu železnatého (Lach-Ner)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner)
- Chlorid amonný (Lach-Ner)
- Chlorid draselný (Lach-Ner)
- Chlorid nikelnatý (Lach-Ner)
- Chlorid sodný (Lach-Ner)
- Chlorid vápenatý (Lach-Ner)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- Isopropylalkohol (Lach-Ner)
- Kyselina boritá (Penta)
- Kyselina benzoová (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková 37% (Penta)
- Kyselina sírová (Sigma-Aldrich)

- Lecitin (Sigma-Aldrich)
- Metanol pro plynovou chromatografii (Sigma-Aldrich)
- MOPS (Sigma-Aldrich)
- Oxid osmičelý (Sigma-Aldrich)
- Peroxid vodíku 30% (Fluka)
- Propidium jodid (eBioscience)
- Sodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové (Lach-Ner)
- SYTOX™ Blue Dead Cell Stain for flow cytometry (Thermo Fisher)
- Tris(hydroxynetyl)aminometan (Lach-Ner)
- Trihydrát octanu sodného (Penta)
- Yeast extract Powder (HiMedia)

3.1.2.1 Média a roztoky

R. rubrum bylo kultivováno v komplexním médiu LB Broth a dále v produkčním médiu SYN FAY.

Složení LB Broth*:

- | | |
|---------------------|---------|
| ▪ Trypton | 10 g |
| ▪ Kvasničný extrakt | 5 g |
| ▪ NaCl | 5 g |
| ▪ Destilovaná voda | 1000 ml |

* Pozn. – pro kultivaci na Petriho miskách byl do média přidán agar (1,7 g/l).

Složení SYN média:

- | | |
|--|---------|
| ▪ SYN salts (5x) | 200 ml |
| ▪ K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ | 0,5 ml |
| ▪ Biotin | 0,1 ml |
| ▪ Destilovaná voda | 1000 ml |

Složení SYN salts (5x):

- | | |
|---|--------|
| ▪ MgSO ₄ · 7H ₂ O | 1,25 g |
| ▪ MOPS | 10,5 g |
| ▪ NH ₄ Cl | 5 g |
| ▪ CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0,66 g |

- NiCl₂ 5 ml
- Roztok FeMo chelated 50 ml
- Destilovaná voda 1000 ml

Chelátový FeMo roztok:

- H₃BO₃ 0,28 g
- Na₂EDTA 2 g
- FeSO₄ 0,4 g
- Na₂MoO₄ 0,1 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Komplexní uhlíkový substrát

- 1,5 M roztok fruktózy 10 ml
- 1M roztok acetátu 10 ml
- Kvasničný extrakt (50 g/l) 20 ml
- Destilovaná voda 1000 ml

Fosfátový pufr (PBS)

- NaCl 8 g
- KCl 0,2 g
- Na₂HPO₄ · 12H₂O 13,86 g
- KH₂PO₄ 0,24 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Fosfátový pufr (pH = 7,4)

- NaH₂PO₄ · 2H₂O 1,76 g
- Na₂HPO₄ · 2H₂O 6,89 g
- Destilovaná voda 1000 ml

3.1.2.2 Příprava médií

Při přípravě komplexního LB Broth média byly všechny navážené složky rozpuštěné v požadovaném obsahu destilované vody za pomoci magnetické míchačky. Dále bylo médium rozděleno po 100 ml do 500 ml Erlenmeyerových baněk, které byly poté sterilizovány.

Při přípravě produkčního SYN FAY média byl nejprve připraven roztok SYN salts v odměrné baňce. Dále bylo upraveno pH SYN salts roztoku na hodnotu 7,1 pomocí 1M roztoku NaOH.

Poté bylo připraveno SYN médium, které obsahovalo komplexní uhlíkatý substrát (FAY) jako zdroj uhlíku. Později byl při experimentech komplexní uhlíkový substrát nahrazen 1M roztokem acetátu sodného v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v médiu dosahovala 100, 200, 300 a 400 mM. Sterilní roztok biotinu byl do média přidán sterilně před zaočkováním kultury v laminárním boxe.

3.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy ew 620-3NM, KERN
- Centrifuga Hettich EVA20, MANEKO
- Centrifuga Sartorius Weender Landstrasse, Sigma Santorius
- Fluorescenčním mikroskop MicroTime 200
- Jednotka pro mrazovou substituci AFS2, Leica Microsystems, Vídeň, Rakousko
- Jednotka pro vysokotlaké mražení EM ICE, Leica Microsystems, Vídeň, Rakousko
- Magnetická míchačka bez ohřevu technoKartell, MERCI s.r.o
- Nanofotometr P 300, Implen
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300 (kolona DB-WAX 30 m by 0,25 mm)
- pH metr pH 50+ DHS, XS Instruments
- Průtokový cytometr NL-2000 Cytex Biosciences, Cytex Flow Cytometry Product
- Předvážky EW 620-3NM, Kern
- Skenovací elektronový mikroskop Helios G4 HP, ThermoFisher Scientific, MA, USA, (vybavený STEM3+ detektorem)
- Skenovací elektronový mikroskop Megallan 400/L, FEI, Hillsboro, OR, USA (vybavený kryostolkem)
- Termoblok Block heater SBH130D, Stuart
- Temperovaná třepačka, Heidolph, Icubator 1000
- Ultramikrotom UTC 7, Leica Microsystems, Vídeň, Rakousko
- UV-VIS Spektrofotometr Hitachi U-3900H s integračním nástavcem 60mmDIA
- Vortex BENCHMIXER. Benchmark Scientific Inc.
- Vakuová přípravná komora ACE 600, Leica Microsystems, Vídeň, Rakousko
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace *Rhodospirillum rubrum*

Rhodospirillum rubrum i jeho mutantní kmen (*Rhodospirillum rubrum* $\Delta phac_1c_2$) byly kultivovány nejprve na Petriho miskách na médiu LB Broth, na které byly zaočkovány z kryozkumavky. Misky byly inkubovány ve tmě při teplotě 30 °C po dobu 4 dnů. Poté byly kultury přeočkovány do 500 ml Erlenmeyerových baněk, obsahujících 100 LB Broth média. Tyto kultury (inokula) byly kultivovány v temperované třepačce po dobu 2–3 dnů při 160 rpm a teplotě 28 °C. Následně byly kultury přeočkovány do produkčního 100 ml SYN média v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml. Do média bylo napipetováno takové množství kultury, aby byla počáteční optická hustota 0,1 ($\lambda=660$ nm). Tato kultivace poté probíhala 48 hodin při 160 rpm a teplotě 28 °C.

3.2.1 Růstová křivka

Pro růstovou křivku bylo připraveno 14 Erlenmeyerových baněk se 100 ml SYN média, které obsahovaly komplexní uhlíkatý substrát (FAY), nebo 1M roztok acetátu o finální koncentraci 100, 200, 300 a 400 mM. Do těchto medií byl naočkován takový objem inokula, aby byla počáteční optická hustota 0,1 ($\lambda=660$ nm). Kultivace probíhala v temperované třepačce při 160 rpm a teplotě 28 °C po dobu 6 dní, během kterých byla měřena optická hustota a byly prováděny odběry biomasy v časových intervalech 24, 32, 48, 72, 82, 96 a 120 hodin.

3.2.2 Mikroaerobní kultivace

Mikroaerobní kultivace *Rhodospirillum rubrum* i jeho mutantního kmene (*Rhodospirillum rubrum* $\Delta phac_1c_2$) probíhala ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách, které obsahovaly SYN FAY médium. Do těchto medií byl naočkován takový objem inokula, aby byla počáteční optická hustota 0,1 ($\lambda=660$ nm). Kultivace probíhala za přímého světla, bez pohybu po dobu 5 dnů. Po ukončení kultivace byly odebrány vzorky pro vybrané analýzy. Obdobným způsobem byla provedena i mikroaerobní kultivace v SYN médiu, které obsahovalo jako zdroj uhlíku roztok 1 M acetátu o finální koncentraci 100 mM.

3.3 Stanovení množství biomasy

3.3.1 Spektrofotometrické stanovení množství biomasy

Optická hustota byla měřena pomocí spektrofotometru, jako blank byl použit LB Broth/PBS. Byl odebrán 1 ml kultury do plastové kyvety a následné měření optické hustoty probíhalo při vlnové délce 660 nm.

3.3.2 Gravimetrické stanovení množství biomasy

Z Erlenmeyerových baněk bylo odebráno 10 ml biomasy do centrifugačních zkumavek, které byly centrifugovány 6 minut při 5000 rpm. Po centrifugaci byl slit supernatant. Zkumavky byly promyty 5 ml PBS, jejich obsah byl homogenizován pomocí vortexu a byla provedena druhá centrifugace za stejných podmínek (6 minut, 5000 rpm). Po ukončení druhé centrifugace byl supernatant opět slit a zkumavky byly umístěny do sušárny, kde byly vzorky vysušeny do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly vzorky zváženy a byla zpětně vypočítaná koncentrace biomasy v původních vzorcích v g/l.

3.4 Stanovení obsahu PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem

Množství PHA bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie s plamenoionizačním detektorem (FID). Byly stanovovány methylestery získané pomocí kyselé hydrolyzy polymeru a následnou esterifikací vzniklého monomeru.

3.4.1 Příprava vzorků

Z biomasy připravené dle kapitoly 3.3.2 bylo naváženo 8–10 mg sušené biomasy do krimpovacích vialek. Do vialek byl napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi, která obsahovala 15 % hm kyseliny sírové v methanolu a 5 mg/ml vnitřního standardu, kyseliny benzoové. Vzorky byly poté esterifikovány v termobloku po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C. Po esterifikaci byly vzorky protřepány v 0,5 ml 50 mmol/l roztoku hydroxidu sodného, přičemž došlo k oddělení organické (spodní) a vodné fáze (horní). Z organické (spodní fáze) bylo odebráno 50 µl do šroubovací vialky, která obsahovala 0,9 ml isopropylalkoholu. Vialka byla uzavřena, její obsah byl protřepán a vzorky byly poté analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID.

3.5 Stanovení viability bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie

Pro stanovení viability bakteriálních buněk byla použita metoda průtoková cytometrie, což je metoda, při které dochází k analýze chemických i fyzikálních vlastností analyzovaných buněk při průchodu laserem. Výhoda této metody je analýza na úrovni jedné buňky vlivem hydrodynamické fokusace.

3.5.1 Příprava vzorků

Do Eppendorfovy zkumavky byl odebrán 1 ml bakteriální kultury, která byla centrifugována po dobu 5 minut při 6000 rpm. Poté byl odlit supernatant a sediment byl rozsuspendován v 1 ml PBS pufru. Takto připravený vzorek byl zředěn tak, aby obsahoval přibližně 10^6 buněk.

K naředěnému vzorku byla přidána vybraná fluorescenční sonda a následovala inkubace vzorku ve tmě. Po inkubaci byl vzorek analyzován pomocí průtokového cytometru NL-2000 Cytex Biosciences. Měření vzorku bylo nastaveno na 10 000 analyzovaných buněk.

3.5.2 Optimalizace fluorescenčních sond

Pro optimalizaci vybraných fluorescenčních sond byly připraveny dva typy vzorků. První vzorek byl tvořen živou kulturou a druhý obsahoval mrtvou kulturu. Vzorky obsahující mrtvou kulturu byly připraveny inkubací kultury ve vodní lázni o teplotě 80 °C po dobu 60 min. Takto připravené vzorky byly následně připraveny k analýze průtokovým cytometrem postupem uvedeným v kapitole 3.5.1. Po proměření vzorků obsahujících pouze živou nebo mrtvou kulturu byla připravena sada vzorků obsahující různý poměr živých a mrtvých buněk (1:4, 1:1 a 4:1). Tyto vzorky byly také jednotlivě inkubovány s fluorescenčními sondami a následně analyzovány průtokovým cytometrem.

3.5.2.1 Propidium jodid

Propidium jodid je interkalační činidlo, značící mrtvé bakterie, u kterých se interkaluje do jejich DNA, zatím co viabilní bakterie jej aktivně vylučují mimo buňku. Propidium jodid je excitován při vlnové délce 488 nm a jeho emisní spektrum se pohybuje okolo 695 ± 35 nm. Propidium jodid (PI) byl používán ve formě roztoku o koncentraci 1 mg/ml v destilované vodě. Do vzorku zředěné bakteriální kultury o objemu 1 ml a následovala analýza průtokovým cytometrem.

3.5.2.2 SYTOXTM Blue Dead Cell Stain

SYTOXTM Blue je podobně jako propidium jodid interkalační činidlo, které se váže na DNA mrtvých buněk tak, že proniká do buněk s poškozenou buněčnou stěnou. Naopak u viabilních buněk není schopna proniknout dovnitř buňky díky neporušené buněčné stěně. SYTOXTM Blue je excitován při vlnové délce 405 nm a jeho emisní spektrum je při vlnové délce 408 nm. Sonda SYTOXTM Blue byla dodána výrobcem ve formě 1 mM roztoku, ve kterém byl jako rozpouštědlo použit dimethylsulfoxid. Tento roztok byl uchováván v mrazicím boxe za teploty -20°C. Po ohřátí na laboratorní teplotu byl do připraveného vzorku bakteriální kultury o objemu 1 ml napipetován 1 µl sondy SYTOXTM Blue a proběhla za laboratorní teploty inkubace ve tmě po dobu 5 minut. Po inkubaci následovala analýza na průtokovém cytometru.

3.6 Příprava vybraných stresů

3.6.1 Teplotní stres

Do Eppendorfové zkumavky byl odebrán 1 ml kultury a centrifugován po dobu 5 minut při 6000 rpm. Poté byl ze vzorku odlit supernatant a sediment byl rozsuspendován v 1 ml PBS pufru. Následně byla zkumavka vložena do vodní lázně o teplotě 50 °C po dobu 10, 30 a 60 minut. Poté byly vzorky vyjmuty z vodní lázně a po jejich vychladnutí byly naředěny PBS pufrům byly inkubovány s fluorescenční sondou (PI) a následně proběhla analýza na průtokovém cytometru. Obdobným způsobem byly připraveny vzorky, které byly inkubovány ve vodní lázni při teplotě 80 °C.

3.6.2 Akutní stres 20 % ethanolem

Do 10 ml centrifugační zkumavky bylo odebráno 5 ml kultury, která byla centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Po stočení byl slit supernatant a sediment byl rozsuspendován v 20 % roztoku ethanolu (v PBS) a vzorek byl inkubován po dobu 15 a 30 minut při teplotě 28 °C v temperované třepačce v 50 ml Erlemeyerové baňce při 160 rpm. Kontrolní vzorek byl připraven obdobným způsobem s tím rozdílem, že sediment byl rozsuspendován v PBS pufru. Následně byl odebrán 1 ml vzorku, který byl připraven pro analýzu na průtokovém cytometru podle postupu popsáném v kapitole 3.5.1.

3.6.3 Osmotický stres

Do 10 ml centrifugační zkumavky bylo odebráno 10 ml kultury, která byla centrifugována po dobu 5 minut při 6000 rpm. Poté byl supernatant a sediment rozsuspendován v PBS pufru, který obsahoval NaCl o koncentraci 50 g/l, 100 g/l a 200 g/l. Kontrolní vzorek byl rozsuspendován pouze v PBS pufru. Takto připravené vzorky byly inkubovány na temperované třepačce v 50 ml Erlenmeyerových baňkách při 160 rpm při teplotě 28 °C po dobu 120 h. Po ukončení inkubace byl odebrán 1 ml kultury, která byla připravena k analýze na průtokovém cytometru dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1.

3.6.4 Zamražení a rozmražení

Byl odebrán 1 ml kultury do Eppendorfové zkumavky, která byla centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Po ukončení centrifugace byl ze vzorku odlit supernatant a sediment byl rozsuspendován v 1 ml PBS pufru. Následně byl vzorek vložen do mrazícího boxu, ve kterém byla nastavena teplota na -20 °C. Vzorky byly takto uloženy po dobu 20 minut. Poté byly vyjmuty a rozmrazeny při laboratorní teplotě. Následně byl vzorek použit pro analýzu pomocí

průtokové cytometrie a ostatní vzorky byly vloženy zpět do chladicího boxu na dobu 20 minut. Tento postup byl opakován ve 4 cyklech. Po ukončení cyklu byl vzorek připraven k analýze podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

3.7 Stanovení morfologických změn pomocí fluorescenční mikroskopie

Vzorky byly měřeny metodou FLIM (fluorescence life-time imaging), která byla realizována na konfokálním fluorescenčním mikroskopu MicroTime 200. K měření byl využit objektiv s vodní imerzí UPLSAPO s 60násobným zvětšením. Zdrojem záření byl zvolen laser o vlnové délce 470 nm ve vertikální polarizaci s frekvencí 40 MHz. Dle zvoleného laseru bylo vybráno dichroické zrcadlo z470/635_{RPC}. K měření fluorescence daného vzorku byl využit band-pass emisní filtr 520/35 od Semrock, který také eliminoval signál z Ramanova rozptylu použitého rozpouštědla. Emitované záření prošlé konfokální štěrbinou pinhole bylo pak sbíráno na detektoru SPAD 2 (Single Photon Advanced Diodes). Nastavení měření, samotné měření a vyhodnocení probíhalo v softwaru SymPhoTime 64.

3.7.1 Příprava vzorků na měření

Vzorky byly značeny fluorescenční sondou Bodipy, která je excitována při 488 nm a její emisní spektrum je v 535 ± 35 nm. Koncentrace sondy ve vzorku byla vždy řádově 10^{-9} mol/l. Po přidání sondy byly vzorky ponechány 5 až 10 minut ve tmě. Na krycí sklíčko bylo nejprve napipetováno 25 až 30 μ l a k zafixování vzorku na sklíčko byl využit 2% roztok agarózy. Po ztuhnutí agarózy byl vzorek ihned změřen.

Vzorky fixované na krycím sklíčku byly uchopeny do speciální držáků, které pak byly umístěny na objektiv s vodní imerzí. Přes klasický optický mikroskop bylo nejdříve nalezeno vhodné místo k měření a vzorek byl co nejvíce zafokusován. Přes konfokální fluorescenční mikroskop byl proveden *xy* sken s maximální velikostí obrázku 80×80 μ m. Rozlišení obrázku bylo nejprve nastaveno na 150×150 pixelů. Dále bylo zapotřebí nastavit dwell time, tedy čas, po kterém budou sbírány informace z jednoho pixelu. Pro prvotní zaměření ve vzorku není nutné nastavovat detailní rozlišení, proto tato volba pixelů, a proto byl i dwell time stažen na minimální hodnotu, která byla v softwaru pro tato měření nabídnuta. Po získání *xy* skenu mohlo dojít ke dvěma situacím. Pokud došlo k dobrému zaostření přes optický mikroskop, mohl být dále proveden detailní sken, 500×500 pixelů, případně byl vybrán výřez v tomto skenu na např. shluk buněk nebo naopak samostatnou buňku, k získání detailního obrázku. Pokud byl ale obrázek rozostřený, bylo potřeba provést skeny v rovině *xz* (respektive *yz*) a pomocí nich lépe zaostřit na vzorek, resp. rovinu měření. Detailní měření pak bylo provedeno stejně, jak

bylo popsáno výše. Samotné měření i příprava vzorků byla provedena paní Ing. Martinou Havlíkovou.

3.8 Stanovení morfologických změn pomocí elektronové mikroskopie

Pro sledování morfologických změn způsobenými vybranými stresy (zvýšená teplota, 4 cykly zamražení a rozmražení a osmotický stres) byly kromě průtokové cytometrie použity také dvě metody elektronové mikroskopie, a to kryogenní skenovací a skenovací transmisní elektronová mikroskopie. Elektronový mikroskop využívá k ozáření vzorku elektronového svazku na rozdíl od světelného mikroskopu, který využívá světelného záření fotonů. Pomocí elektronového mikroskopu lze dosáhnout lepšího rozlišení a také vyššího zvětšení a zároveň lze získat detailní informace o drsnosti, morfologii, rozdílech ve složení, vnitřní struktuře vzorku, aj. [69].

3.8.1 Kryo-skenovací elektronová mikroskopie (kryo-SEM)

Při skenovací elektronové mikroskopii je pozorován povrch vzorku a obraz je tvořený sekundárním signálem, tzn. odraženými nebo sekundárními elektrony. Díky tomu je SEM považován na nepřímou metodu. Výhodou této metody je vysoká ostrost obrazu, které dodává 2D snímkům určitý 3D aspekt. Kromě sekundárního signálu ve formě odražených a sekundárních elektronů také vzniká při analýze rentgenové záření, Augerovy elektrony, nebo katodoluminiscence. Tyto faktory také nesou určité informace o pozorovaném vzorku. Při využití mrazových (kryo) metod je výhodou rychlost přípravy, zachování celkové struktury vzorku tak, aby co nejvíce odpovídala nativnímu stavu. Také je možné nahlédnout do vnitřní struktury vzorku při použití metody mrazového lámání [69].

3.8.1.1 Příprava vzorků

Vzorky po působení vybraných stresů, připravené dle postupů uvedených v kapitole 3.7, byly nejprve koncentrovány centrifugací (5 min při 6000rpm) a poté naneseny na 0,2 mm stranu 6 mm hliníkového nosiče typu A. Ten byl přikryt nosičem typu B a vzorek byl zamrazen za zvýšeného tlaku pomocí přístroje EM ICE. Následovalo přenesení vzorku do vakuové přípravné komory ACE 600, kde byl vzorek podroben mrazovému lámání a sublimaci (7 min při $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$) pro odhalení vnitřních struktur buňky. Následně byl vzorek přenesen do elektronového mikroskopu Megallan 400/L, vybaveného kryostolkem, a bylo provedeno pozorování vzorků při $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pořizování snímků. Příprava i měření vzorků probíhalo pod odborným vedením Ing. Kateřiny Mrázové na Ústavu přístrojové techniky AV ČR.

3.8.2 Skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM)

Při skenovací transmisní elektronové mikroskopii (STEM) je svazek elektronů soustředěn do velmi úzkého paprsku a je skenován přes vzorek bod po bodu, přičemž pro každý jednotlivý bod (pixel) jsou prošlé elektrony detekovány pod různými úhly rozptylu [70, 71, 72]. Výhoda snímků pořízených pomocí STEM spočívá ve vyšší ostrosti a současně je zachován vyvážený kontrast a nízký šum na obrazu. Další výhodou této metody je možnost pozorování vzorků za použití nízkého napětí, díky čemuž není nutné vzorky kontrastovat těžkými kovy (uran a olovo) a zároveň se snižuje riziko neostrého obrazu způsobeného chromatickou aberací. Nevýhodami této metody jsou méně pohodlné pořizování snímků z důvodu vyššího poškození vzorku paprskem např. kontaminací uhlíkem, nebo ztrátou hmoty. Zásadní roli při zobrazování hraje vhodně zvolený detektor prošlých elektronů (v našem případě byl použit detektor STEM3+) [73, 74].

3.8.2.1 Příprava vzorků

Vzorky po působení vybraných stresů, připravené dle postupů uvedených v kapitole 3.6, byly nejprve koncentrovány centrifugací a poté naneseny na 0,2 mm stranu zlatého nosiče o velikosti 3 mm, jehož povrch byl ošetřen 1% roztokem lecitinu v chloroformu. Tato povrchová úprava umožnila následné snadnější oddělení vzorku od povrchu nosiče. Poté byly vzorky zamrazeny za zvýšeného tlaku pomocí přístroje EM ICE. Následně byly vzorky přeneseny do jednotky pro mrazovou substituci pro jejich postfixaci a odvodnění pomocí substitučního roztoku obsahujícího 1,5% OsO₄ v acetonu. Tento proces probíhal v jednotce pro mrazovou substituci AFS2 po dobu 7 dní. Počáteční fáze mrazové substituce byla nastavena na -90 °C po dobu 72 h, poté následovalo zahřátí na -20 °C po dobu 24 h (5 °C za hodinu) a proces byl ukončen při 4 °C po dobu 18 h (3 °C za hodinu). Díky tomuto procesu bylo možná další manipulace se vzorky za laboratorních teplot. Následovalo opakované promytí vzorků 98% acetonem (3 x 15 min) pro odstranění nenavázaného OsO₄. Poté následoval proces infiltrace, což je prosycení vzorku pryskyřicí tak, že dochází k inkubaci vzorků po dobu 60 minut ve směsi acetonu a epoxidové pryskyřice v různých poměrech (2:1, 1:1 a 1:2). Následně byly vzorky zality do čisté pryskyřice, kde tyto vzorky byly ponechány v exikátoru pod vývěvou po dobu 24 h. Posledním krokem přípravy vzorku bylo jeho přenesení do kapslí a zalití čerstvou pryskyřicí, která byla vytvrzena při teplotě 62 °C po dobu 48 h. Po vytvrzení kapslí byly vzorky nakrájeny na ultratenké řezy pomocí diamantového nože s úhlem řezu 45 ° a ultramikrotomu UTC 7. Takto připravené řezy byly vloženy na měděnou síťku a pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu

Helios G4 HP, který byl vybavený STEM3+ detektorem. Příprava i měření vzorků probíhalo pod odborným vedením Ing. Kateřiny Mrázové na Ústavu přístrojové techniky AV ČR.

3.9 Extrakce a následné stanovení pigmentů

U kultur, které byly kultivovány při mikroaerobních podmínkách za světla, byl stanovován obsah pigmentů (bakteriochlorofyl *a* a karotenoidy) dle protokolu [75]. Nejprve byl odebrán 1 ml kultury, který byl centrifugován při 15 000 g po dobu 7 minut. Po ukončení centrifugace byl slit supernatant a k sedimentu byl přidán 1 ml předchlazeného metanolu. Vzorek byl homogenizován na vortexu a vzorky byly inkubovány v chladicím boxu, který byl vychlazen na teplotu 4 °C po dobu 20 minut. Následně proběhlo měření kompletního UV-VIS spektra na spektrofotometru Hitachi U-3900H. Koncentrace vyextrahovaných barviv byla stanovena pomocí těchto vzorců [75, 76]:

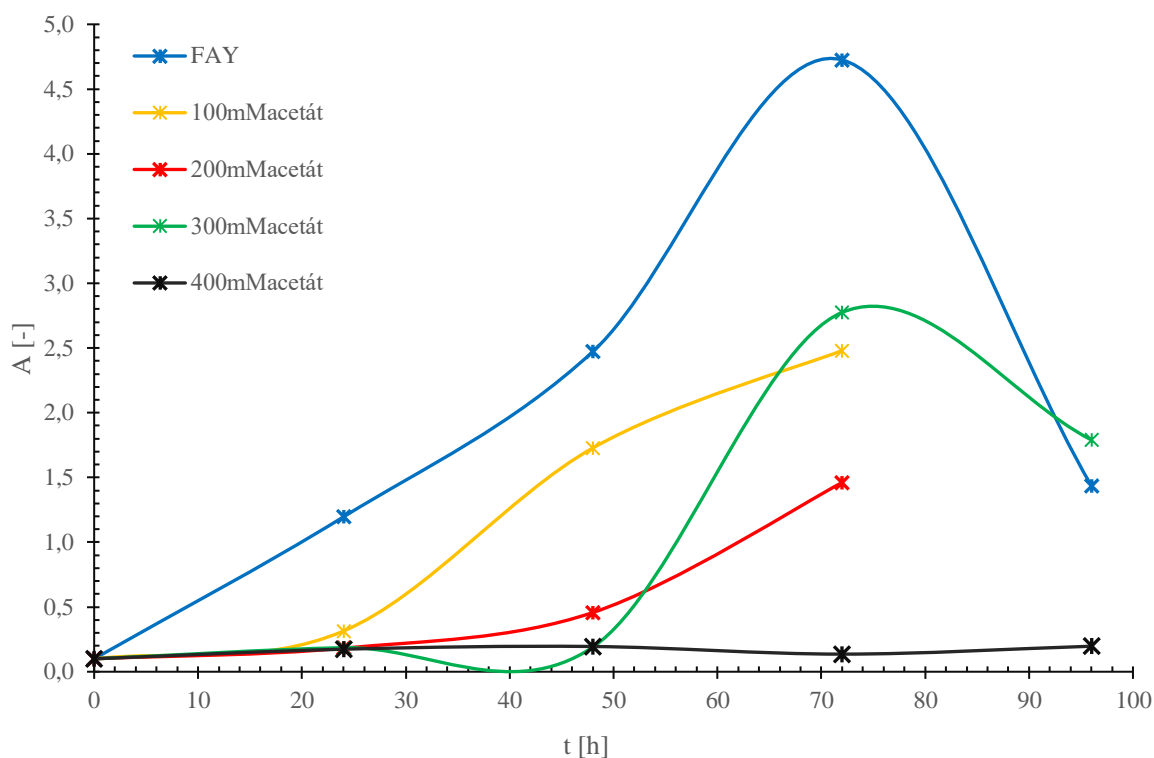
$$Ch_a [\mu g/ml] = 16,29 \cdot A_{665} - 8,54 \cdot A_{652} \quad (1)$$

$$karotenoidy [\mu g/ml] = [1000 \cdot (A_{470} - A_{720}) - 2,86 \cdot (Chl_a [\mu g/ml])]/221 \quad (2)$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace koncentrace substrátu a doby kultivace

Prvním provedeným experimentem bylo proměření růstové křivky bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Zároveň byla při tomto experimentu provedena optimalizace počáteční koncentrace substrátu a doby kultivace se zaměřením na zvýšení produkce PHA. Příprava a průběh tohoto experimentu byl popsán v kapitole 3.2.1. Při experimentu byly použity různé zdroje uhlíku, a to polokomplexní uhlíkaté médium (FAY), kde byl substrát fruktóza, acetát a kvasniční extrakt a produkční médium s acetátem o různých koncentracích (100, 200, 300 a 400 mM). Naměřené absorbance odebraných vzorků kultur byly vloženy do grafu (viz obrázek 13).



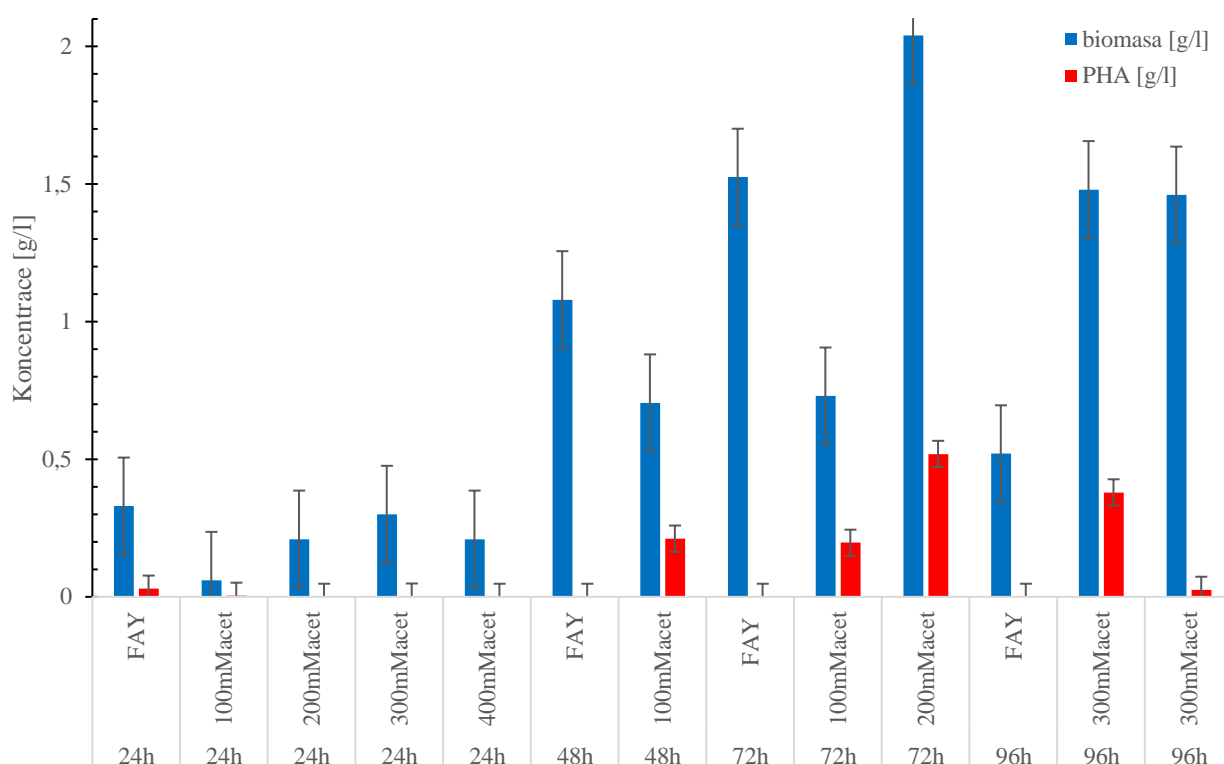
Obrázek 13 – Růstová křivka bakterie *Rhodospirillum rubrum* při kultivaci s různými substráty

Z obrázku 13 je patrné, že se zvyšující se koncentrací acetátu jako zdrojem uhlíku docházelo k postupné inhibici růstu oproti již ověřenému FAY médiu. Nejvíce podobný průběh křivky je vidět u koncentrace acetátu 100 mM až do 72 h kultivace. Mezi 72–96 h kultivací došlo pravděpodobně ke kontaminaci, a proto nebyla hodnota naměřené absorbance uvedena v grafickém znázornění. U kultivací s 200 mM a 300 mM acetátem je vidět výrazné prodloužení lag fáze, přičemž po 48 h došlo k nárůstu biomasy i produkci PHA (viz obrázek 14). U kultur kultivovaných při 200 mM koncentraci acetátu došlo stejně jako u kultur se 100 mM koncentrací acetátu, ke kontaminaci mezi 72–96 h kultivace, a proto nebyla ani jejich hodnota

absorbance znázorněna v grafu. Z obrázku 13 je dále patrné, že u kultur kultivovaných s 400 mM koncentrací acetátu došlo k naprosté inhibici růstu, a proto byla tato koncentrace vyřazena pro další experimenty.

4.1.1 Stanovení množství biomasy a PHA

U odebraných vzorků biomasy bylo také během optimalizace stanoveno množství biomasy a PHA. Polymer byl extrahován a derivatizován dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 a množství PHA bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (GC-FID) dle postupu 3.4.1. Výsledné hodnoty stanoveného množství biomasy a PHA byly vloženy do grafu, viz. obrázek 14.



Obrázek 14 – Grafické znázornění obsahu biomasy a PHA u bakterie *Rhodospirillum rubrum* při optimalizaci substrátu a doby kultivace

Z obrázku 14 je patrné, že se zvyšující koncentrací acetátu nedocházelo pouze ke zpomalení růstu, ale i produkce PHA byla posunuta k pozdějším hodinám kultivace. Nicméně s pozdější dobou kultivace stoupalo množství biomasy i produkce PHA. Na médium FAY bylo dosaženo nejvyšší produkce PHA ve 24 h, která byla 8,96 % ($0,03 \pm 0,002$ g/l PHA). Ve 48 h bylo sice zaznamenáno vysoké množství biomasy ($0,33 \pm 0,14$ g/l), ale nebyly stanoveny žádné PHA, což mohlo být způsobeno zvoleným substrátem, jelikož produkce PHA na fruktóze je minimální. Oproti tomu u 100 mM koncentrace acetátu byla nejvyšší produkce PHA

v rozmezí od 48–72 h, která se pohybovala mezi 30,00–26,90 % ($0,21 \pm 0,002$ a $0,20 \pm 0,0$ g/l PHA). V těchto hodinách bylo pro tuto koncentraci acetátu zaznamenáno i nejvyšší množství biomasy ($0,71 \pm 0,15$ a $0,73 \pm 0,00$ g/l). U kultivace při 200 mM acetátu došlo k nejvyšší produkci biomasy ($2,04 \pm 0,00$ g/l) v 72 h kultivace. A zároveň byl v tuto dobu stanoven nejvyšší obsah PHA a to 25,46 % ($0,52 \pm 0,007$ g/l PHA). U 300 mM koncentrace acetátu byl nejvyšší obsah biomasy ($1,48 \pm 0,00$ g/l) a PHA stanoven v 96 h kultivace, kdy byl obsah PHA 25,60 % ($0,379$ g/l $\pm 0,013$ g/l PHA). Pro následující experimenty byly proto zvoleny média obsahující 100 a 200 mM koncentraci acetátu z důvodu zvýšené produkce PHA v nejkratším časovém intervalu.

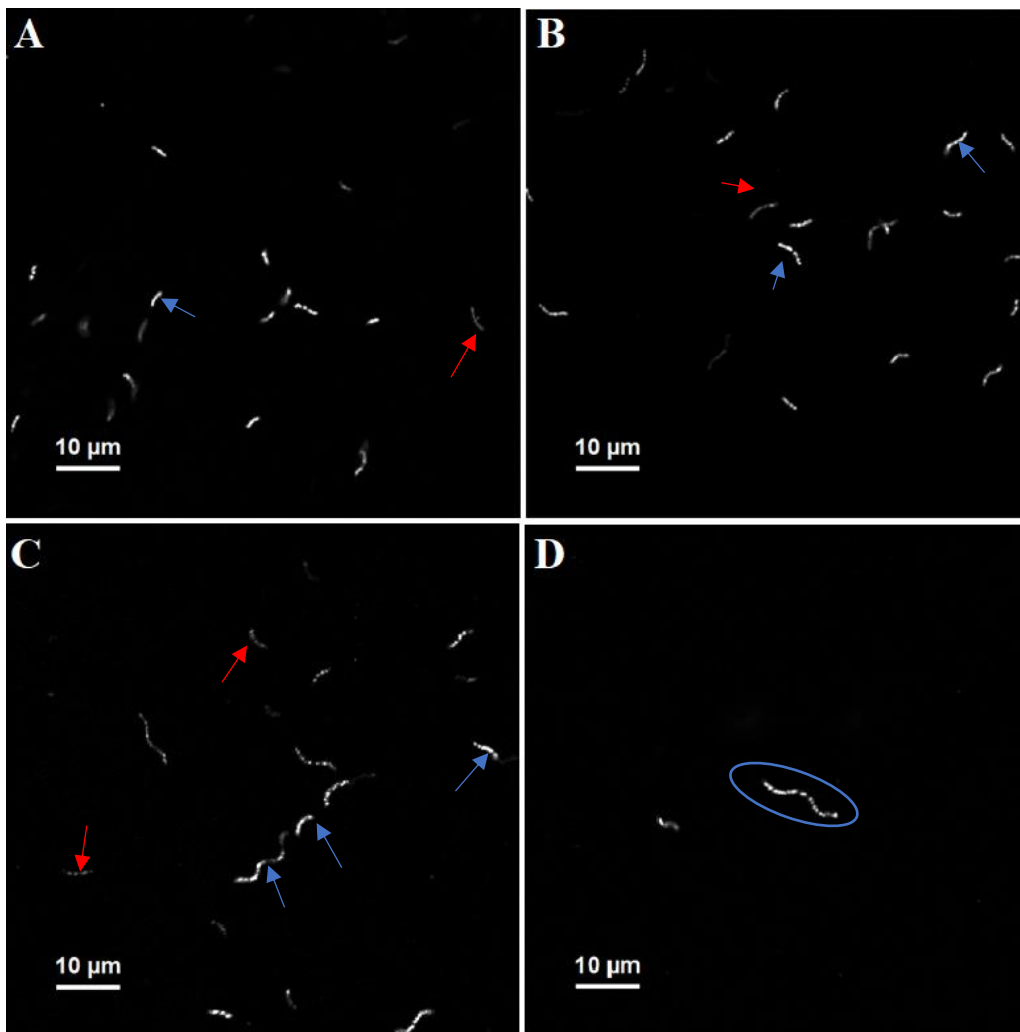
Dalším zajímavým faktem bylo také to, že po 48 h došlo ke změně složení PHA z 100 % P(3HB) na kopolymer obsahující 3HB a 3HV jednotky, tedy P(3HB-co-3HV) a to pouze u vzorků, které byly kultivovány na acetátu jako jediném substrátu. Procentuální složení kopolymeru jsou uvedené v tabulce 2, ze které je zřejmé, že se obsah 3HV monomeru u všech vzorků pohyboval mezi 1–3 %. Tento jev byl v nedávné době potvrzen i týmem *Godoy et. al* popsals produkci P(3HB-co-3HV) při omezené aeraci a s fruktózou jako zdrojem uhlíku [77].

Tabulka 2 – Obsah celkových PHA a procentuální zastoupení monomerů 3HB a 3HV u vzorků, u kterých byl detekován obsah 3HV

Stáří kultury	Zdroj uhlíku	PHA [g/l]	PHA [mol. %]	3HB [mol. %]	3HV [mol. %]
48 h	100 mM acetát	$0,21 \pm 0,00$	30,00	98,57	1,43
72 h	100 mM acetát	$0,20 \pm 0,00$	26,90	99,03	0,97
	200 mM acetát	$0,52 \pm 0,00$	25,46	97,07	2,93
96 h	300 mM acetát	$0,38 \pm 0,01$	25,60	97,57	2,42

4.2 Stanovení morfologických změn pomocí fluorescenční mikroskopie

Během optimalizace počáteční koncentrace substrátu a doby kultivace byly z každé kultury po 24 a 48 h provedeny odběry vzorků, které byly analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie pro charakterizaci morfologie jednotlivých buněk. Jako sonda byl použita BODIPY 439/503, která se inkorporuje do hydrofobní části buněk, jako jsou membrány, nebo PHA granule. Příprava vzorků a měření bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 3.7.1.



Obrázek 15 – Snímky z fluorescenčního mikroskopu bakteriálních buněk *Rhodospirillum rubrum* kultivovaných za různých podmínek; **A** – 100 mM acetát po 24 h, **B** – 200 mM acetát po 24 h, **C** – 300 mM acetát po 24h; **D** – 300 mM acetát po 48h; šipky vysvětleny v textu

Na obrázku 15 jsou vidět vybrané snímky z fluorescenčního mikroskopu. Na snímcích lze vidět bakterie s výraznou, nebo naopak nízkou fluorescencí s využitím fluorescenční sondy BODIPY, která se váže na hydrofobní komponenty buněk. Bakterie s výraznou fluorescencí (značené modrou šipkou) značí vyšší obsah PHA granulí, naopak bakterie s nižší fluorescencí (značené červenou šipkou) značí naopak nižší obsah PHA granulí. Na snímcích (např. na snímku D v modrém kroužku) je viditelný kromě přítomnosti PHA granulí také klasický spirálovitý tvar bakterie *Rhodospirillum rubrum*.

Na všech snímcích (A–D) je také patrný poměrně nízké množství buněk, což bylo zapříčiněno celkově nízkým počtem buněk ve vzorcích, kvůli již zmíněné inhibici způsobené zvyšující se koncentrací acetátu (viz. kapitola 4.1). Dalším faktorem, který způsobil nízký počet buněk s fluorescenčním signálem je ta skutečnost, že podle výsledků z plynové chromatografie

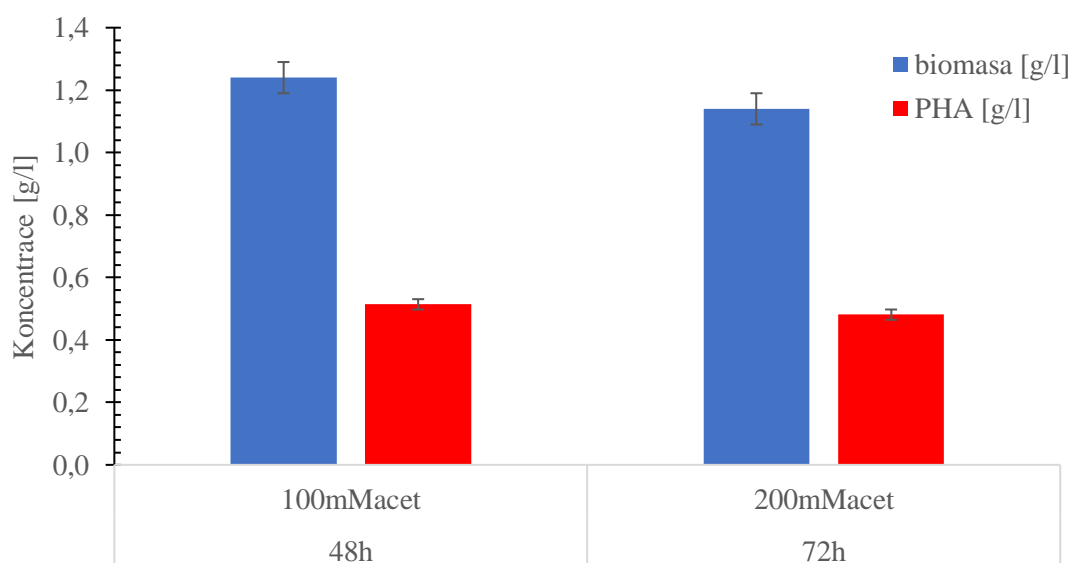
neobsahovaly kultury kultivované na médiích s acetátem mezi 24–48 h kultivace prakticky žádné PHA. Skutečné množství buněk obsahující PHA granule v kulturách byl tedy pod limitem detekce GC-FID přístroje, což také přispělo k nízkému počtu buněk se signálem při analýze pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.3 Kultivace v médiu s acetátem jako zdrojem uhlíku

Na základě optimalizace substrátu a doby kultivace byly provedeny kultivace divokého kmene *Rhodospirillum rubrum* v SYN médiích, které obsahovaly acetát o koncentraci 100 mM po dobu 48 h a 200 mM po dobu 72 h. Mutantní kmen *Rhodospirillum rubrum* $\Delta phac_1c_2$ byl kultivován v SYN médiu obsahující 100 mM acetátu po dobu 48 h. Po ukončení kultivace byla část biomasy použita v dalších experimentech (stanovení stresové odpovědi obou kmenů pomocí průtokové cytometrie a elektronové mikroskopie) a druhá část byla vysušena a využita pro stanovení koncentrace biomasy a obsahu PHA ve vzorcích.

4.3.1 Stanovení množství biomasy a PHA

U odebraných vzorků biomasy bylo stanoveno množství PHA pomocí plynové chromatografie GC-FID. Pro přípravu vzorků byl použit stejný postup jako při stanovení obsahu PHA u vzorků odebraných během optimalizace substrátu a doby kultivace, který byl uveden v kapitole 3.4.1. Získané hodnoty obsahu biomasy a PHA byly poté vyneseny na grafu, který lze vidět na obrázku 16. Procentuální zastoupení stanovených monomerních jednotek je uvedeno v tabulce 3.



Obrázek 16 – Grafické znázornění obsahu biomasy a PHA u bakterie *Rhodospirillum rubrum* kultivované při 100 a 200 mM acetátu

U kultury *Rhodospirillum rubrum* kultivované na 100 mM acetátu po dobu 48 h byl obsah PHA 41,46 % biomasy. Stejně jako u přechozího experimentu (viz. kapitola 4.1.1, tabulka 2) i u těchto vzorků byla potvrzena přítomnost kopolymeru P(3HB-co-3HV), kdy 3HB byl v kopolymeru zastoupen z 98,03 % a 3HV tvořil 1,97 % (viz. tabulka 3). U kultury kultivované při 200 mM koncentraci acetátu po dobu 72 h tvořily PHA 42,17 % obsahu biomasy. A i u této kultury byla potvrzena přítomnost kopolymeru P(3HB-co-3HV), který obsahoval 98,14 % 3HB a 1,86 % 3HV.

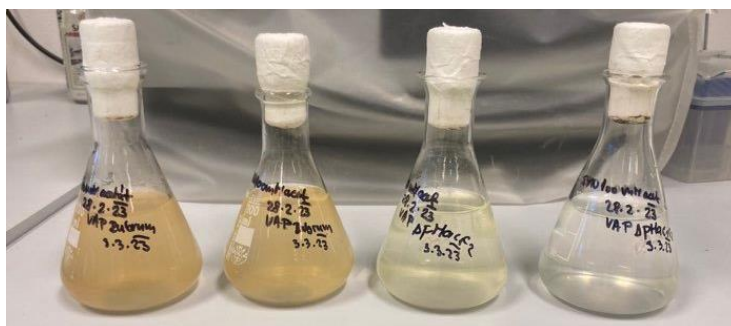
Tabulka 3 – Obsah celkových PHA a procentuální zastoupení monomerů 3HB a 3HV u bakterie *Rhodospirillum rubrum* kultivované při 100 a 200 mM acetátu

Stáří kultury	Zdroj uhlíku	PHA [g/l]	PHA [mol. %]	3HB [mol. %]	3HV [mol. %]
48 h	100mMacet	0,51±0,00	41,46	98,03	1,97
72 h	200mMacet	0,48±0,00	42,17	98,14	1,86

Při porovnání těchto dvou kultur je patrné, že stanovené množství kopolymeru i jeho složení je velice podobné. Tato informace je velice zajímavá, protože kultury se od sebe liší stářím, a to o celých 24 h. Tento fakt byl pravděpodobně způsoben rozdílnou koncentrací substrátu, což potvrzuje hypotézu, že se zvyšující se koncentrací dochází k částečné inhibici, prodloužení lag fáze a celkovému zpomalení růstu bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Dalším zajímavým faktem je samotná produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV). Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.2.4, byla popsána produkce P(3HB-co-3HV) při přidání valerátu do produkčního média během kultivace [51]. Nedávný výzkum *Godoy et. al* popsal produkci P(3HB-co-3HV) bez přítomnosti prekurzoru 3HV při omezené aeraci a s fruktózou jako zdrojem uhlíku. Kdy na začátku kultivace za aerobních podmínek tvořil kopolymer 29 % z celkové biomasy a zastoupení 3HV tvořilo 75 % mol. kopolymeru. Maximálního výtěžku P(3HB-co-3HV) bylo dosaženo při převedení *Rhodospirillum rubrum* z aerobní kultivace do anaerobních podmínek s kontrolovaným množstvím CO₂ přidáním hydrogenuhličitanu do média. Za těchto podmínek došlo k navýšení produkce P(3HB-co-3HV), kdy obsah kopolymeru tvořil 81 % z celkové biomasy s 86 % mol. zastoupením 3HV [77]. Naopak v našem případě byl jako zdroj uhlíku použit acetát ve dvou různých koncentracích a kultivace probíhala pouze za aerobních podmínek, a proto nedošlo k tak výrazné produkci kopolymeru s většinovým podílem 3HV.

4.4 Produkce pigmentů a jejich stanovení

Produkce pigmentů *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodospirillum rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ probíhala při mikroaerobních podmínkách za přístupu světla po dobu 120 h (viz. kapitola 3.2.2). Jako zdroj uhlíku byl u bakteriálních kultur použit polokomplexní uhlíkatý substrát FAY a 100 mM acetát. Po ukončení kultivace byly odebrány vzorky pro stanovení obsahu biomasy a PHA (dle postupu 3.4.1), pigmentů (dle postupu 3.9) a také pro další experimenty (stanovení vlivu pigmentů na stresovou odpověď pomocí průtokové cytometrie).



Obrázek 17 – *Rhodospirillum rubrum* (nalevo) a *Rhodospirillum rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ (napravo) po 120 h mikroaerobní kultivaci za přístupu světla při 100 mM acetátu jako zdroji uhlíku

Na obrázku 17 můžeme vidět narostlé kultury divokého (nalevo) a mutantního kmene (napravo) za světla, které měly zdroj uhlíku 100 mM acetátu po 120 h kultivace. Tyto kultury jsou rovněž na obrázku 18 srovnány ve 3. řadě. Při porovnání kultur na obrázku 18 je zřejmá změna v množství vyprodukovaných pigmentů i celkové biomasy v závislosti na využitých substrátech. Konkrétně kultury kultivované při 100 mM acetátu měly nízkou optickou hustotu ($OD_{660} = 0,3$), u mutantního kmene byl naměřena optická hustota nižší než počátečních 0,1, což značí lyzi kultur během 120 h. Tento fakt byl zapříčiněn kombinací mikroaerobních podmínek a acetátu jako jediného zdroje uhlíku, protože *Rhodospirillum rubrum* je pravděpodobně schopné zpracovat acetát pouze za aerobních podmínek (jak bylo v této práci již uvedeno v kapitole 2.2.3). Kultury divokého kmene měly oranžovou barvu, což značí nízký obsah pigmentů, a proto byly oba kmeny z následujících analýz a experimentů vyloučeny.



Obrázek 18 – Fotodokumentace kultur *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodospirillum rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ po 120 h mikroaerobní kultivace za přístupu světla při komplexním uhlíkatém zdroji FAY (první dvě řady zleva) a 100 mM acetátu (první řada vpravo)

Naopak kultury divokého i mutantního kmene kultivované při komplexním uhlíkatém zdroji FAY byly zabarveny do syté červené barvy, což značilo výraznou produkci pigmentů, a proto byly tyto kultury použity pro další analýzy i experimenty. Pro extrakci a stanovení pigmentů byl použit postup uvedený v kapitole 3.9 a stanovené množství karotenoidů a bakteriochlorofylu *a* bylo vloženo do tabulky 4. U divokého kmene *R. rubrum* bylo stanoveno množství bakteriochlorofylu *a* na 0,47 $\mu\text{g/ml}$ a u mutantního kmene *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ tvořil chlorofyl *a* 0,36 $\mu\text{g/ml}$. Vzhledem k červenému zabarvení obou kultur je zvláštní nízký obsah karotenoidů, který u mutantního kmene tvořil pouze 0,07 $\mu\text{g/ml}$ a u divokého kmene nebyly stanoveny žádné karotenoidy. Je pravděpodobné, že během analýzy nedošlo k vyextrahování všech pigmentů, a proto byl stanovený obsah karotenoidů tak nízký. Zároveň je také pravděpodobné, že kultury obsahovaly ještě další pigmenty, jako např. bakteriofeofytin a spiriloxantin, které jsou také produkovány bakterií *Rhodospirillum rubrum* [78]. V rámci příštích experimentů by tedy bylo vhodné zahrnout extrakci a stanovení nejenom karotenoidů a bakteriochlorofylu *a*, ale také bakteriofeofytinu a spiriloxantinu.

Tabulka 4 – Obsah stanovených pigmentů (karotenoidů a chlorofylu *a*) u obou kmenů bakterie *Rhodospirillum rubrum*

substrát	Kmen	chl _a [$\mu\text{g/ml}$]	karotenoidy [$\mu\text{g/ml}$]
FAY	<i>R. rubrum</i>	0,47	0,00
	<i>R. rubrum</i> $\Delta phac_{1C2}$	0,36	0,07

U obou divokých kmenů *R. rubrum* byl také stanoven obsah PHA pomocí GC-FID. Vzhledem k prodloužené době kultivace s cílem produkce pigmentů, nebyl předpokládán vysoký

obsah PHA. Výsledky stanovení tento předpoklad potvrdily, protože oba kmeny obsahovaly opravdu nízké množství PHA (0,40 % při FAY substrátu a 2,50 % při 100 mM acetátu z celkové biomasy).

4.5 Stanovení viability bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie

Po optimalizaci vhodných substrátů a kultivaci obou kmenů *R. rubrum* při různých koncentracích acetátu následovalo vystavení vzorků vybraným stresovým faktorům. Jak už bylo zmíněno v experimentální části, byly zvoleny tyto stresory – zvýšená teplota (50 °C a 80 °C), osmotický stres chloridem sodným (50, 100 a 200 g/l) a cykly zamrazení a rozmrazení (1.–4. cyklus). Podrobná příprava těchto vzorků byla popsána v kapitole 3.6 a poté následovalo měření pomocí průtokové cytometrie dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1., kdy bylo nejprve nutné vybrat vhodnou viabilní fluorescenční sondu. Na základě výsledků byl vybrán propidium jodid (viz přílohy obrázek 31–35), který vykazoval spolehlivější výsledky oproti fluorescenční sondě SYTOX™ blue.

4.5.1 Acetátová média

Po optimalizaci sondy byl jako první experiment provedeno stanovení stresové odpovědi a viability divokého i mutantního kmene *R. rubrum* při kultivaci se 100 mM koncentrací acetátu po dobu 48 h a 200 mM koncentrací acetátu po dobu 72 h. Získané procentuální zastoupení živých buněk po vystavení vybraným stresorům bylo vloženo pro větší přehlednost do tabulek (tabulka 5–7).

V tabulce 5 je zobrazeno procentuální zastoupení bakteriálních buněk *R. rubrum* a *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ po vystavení zvýšeným teplotám 50 a 80 °C po dobu 30 a 60 minut a dále vystavení osmotickému stresu a cyklům zamrazení a rozmrazení. Tyto kultury byly kultivovány po dobu 48 h a divoký kmen po této době obsahoval 41,46 % PHA (viz. obrázek 16). Při vystavení teplotě 50 °C po dobu 30 a 60 min nedošlo k žádnému výraznému úmrtí buněk, jelikož se hodnoty živých buněk pohybovaly mezi 90–98 %. Při vystavení teplotě 80 °C již ale došlo k výraznému umírání buněk. Při vystavení 80 °C po dobu 30 minut klesl počet viabilních buněk na $37,26 \pm 2,39$ % u divokého kmene a $60,72 \pm 0,09$ % u kmene mutantního. Jak z histogramů (viz. přílohy obrázek 36), tak i z tabulky 5 je patrné, po 60 minutách stoupl počet živých buněk u divokého kmene ($47,88 \pm 1,63$ %). Nárůst počtu živých buněk nebyl pravděpodobně způsoben rozpadem buněk a tím způsobenou ztrátou signálu sondy vlivem vysoké teploty, jelikož nedošlo ke snížení složitosti buněk (SSC kanál). Bylo by proto vhodné v dalších experimentech ověřit, či vyvrátit přítomnost dalšího ochranného mechanismu, který toto

zjištění způsobil. Naopak u mutantního kmene došlo k poklesu na $54,66 \pm 0,31$ % živých buněk. Při porovnání s mutantním kmenem vykazuje i přes přítomnost PHA divoký kmen sníženou odolnost vůči zvýšené teplotě oproti mutantnímu kmenu, což naznačuje přítomnost doposud nepopsaného protektivního mechanismu vůči zvýšené teplotě u *R. rubrum* $\Delta phac1c2$.

Tabulka 5 – Procentuální zastoupení živých buněk po vystavení vybraným stresovým faktorům u kultur kultivovaných ve 100 mM acetátu po dobu 48 h

Bakteriální kmen	Stres	Expozice stresu	Živé buňky [%]
<i>R. rubrum</i>	Kontrola	60 min	$96,90 \pm 0,00$
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	Kontrola	60 min	$95,60 \pm 0,00$
<i>R. rubrum</i>	50 °C	30 min	$97,73 \pm 0,47$
		60 min	$97,63 \pm 0,33$
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	50 °C	30 min	$95,21 \pm 0,30$
		60 min	$90,30 \pm 0,56$
<i>R. rubrum</i>	80 °C	30 min	$37,26 \pm 2,39$
		60 min	$47,88 \pm 1,63$
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	80 °C	30 min	$60,72 \pm 0,09$
		60 min	$54,66 \pm 0,31$
<i>R. rubrum</i>	Osmotický stres	50 g/l	$91,11 \pm 0,66$
		100 g/l	$89,44 \pm 0,46$
		200 g/l	$60,06 \pm 0,74$
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	Osmotický stres	50 g/l	$88,90 \pm 0,31$
		100 g/l	$71,26 \pm 1,05$
		200 g/l	$85,82 \pm 1,14$
<i>R. rubrum</i>	Mrazící cykly	1. cyklus	$98,92 \pm 0,54$
		2. cyklus	$92,95 \pm 3,18$
		3. cyklus	$94,85 \pm 0,17$
		4. cyklus	$93,96 \pm 0,08$
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	Mrazící cykly	1. cyklus	$93,55 \pm 2,20$
		2. cyklus	$81,90 \pm 1,02$
		3. cyklus	$83,65 \pm 1,22$
		4. cyklus	$87,82 \pm 0,81$

Při porovnání viabilit obou kmenů při vystavení osmotickému stresu je patrná vyšší viabilita při 50 a 100 g/l NaCl u divokého kmene ($91,11 \pm 0,66$ a $89,44 \pm 0,46$ % živých buněk *R. rubrum* oproti $88,90 \pm 0,31$ a $71,26 \pm 1,05$ % živých buněk *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$). Naopak při nejvyšší koncentraci NaCl došlo ke zvýšení viability ($85,82 \pm 1,14$ %), což mohlo být opět zapříčiněno případným neznámým protektivním mechanismem, který by byl aktivován vysokou hladinou stresu (bez přechodí adaptace na stresor). Oproti tomu u *R. rubrum* došlo k výraznému snížení viability na $60,06 \pm 0,74$ %. Při zmrazovacích a rozmrazovacích cyklech byl patrný vliv obsahu PHA u divokého kmene (41,46 % PHA), jelikož procentuální zastoupení živých buněk nekleslo pod 92 %. Naopak v případě mutantního kmene došlo k poklesu viability. Nejnižší viabilita byla po 2. mrazícím cyklu ($81,90 \pm 1,02$ %). Poté došlo k nárůstu živých buněk na $83,65 \pm 1,22$ % při 3. mrazícím cyklu a na $87,82 \pm 0,81$ % živých buněk po 4. mrazícím cyklu. Tento pokles a následný nárůst viability mohl být zapříčiněn chybou při přípravě vzorku (nepřesné ředění). Příklad histogramů naměřených vzorků po 4. cyklům zamrazení a rozmrazení jsou k dispozici v kapitole přílohy (viz. obrázek 37).

V jsou tabulce 6 zobrazeny hodnoty procentuálního zastoupení bakteriálních buněk *R. rubrum* (kultivováno v 200 nM koncentraci acetátu po dobu 72 h – 42,17 % PHA) po vystavení vybraným stresovým faktorům jako tomu bylo u předchozích vzorků. Při porovnání kultury *R. rubrum* kultivované 72 h při 200 mM koncentrací acetátu (42,17 % PHA) s kulturou *R. rubrum* kultivovanou v 100 mM acetátu po dobu 48 h (41,46 % PHA) je patrný výrazný pokles viability u kultury staré 72 h. Při vystavení několika zamrazovacích a rozmrazovacích cyklů došlo k podobnému jevu jako u kultury *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ kultivované při 100 mM acetátu po dobu 48 h. Kdy došlo také k prudkému poklesu viabilních buněk z $84,91 \pm 1,16$ % po prvním cyklu zamrazení a rozmrazení na $58,02 \pm 1,40$ % po druhém cyklu zamrazení a rozmrazení. Po 3 cyklu rozmrazení a zamrazení stoupl počet živých buněk na $66,66 \pm 1,43$ % a po 4. cyklu došlo opět k poklesu na $59,01 \pm 1,53$ % živých buněk. Vzhledem k velice podobnému obsahu PHA je pravděpodobné, že výrazné snížení viability u starší kultury bylo způsobeno právě jejím stářím. Příklad histogramů naměřených vzorků po expozici 80 °C a 4. cyklům zamrazení a rozmrazení jsou k dispozici v kapitole přílohy (viz. obrázek 38).

Tabulka 6 – Procentuální zastoupení živých buněk po vystavení vybraným stresovým faktorům u kultur kultivovaných ve 200 mM acetátu po dobu 72 h

Bakteriální kmen	Stres	Expozice stresu	Živé buňky [%]
<i>R. rubrum</i>	Kontrola	60 min	87,65 ± 0,00
	50 °C	30 min	77,76 ± 0,13
		60 min	32,04 ± 0,59
	80 °C	30 min	16,29 ± 0,14
		60 min	42,26 ± 0,75
	Osmotický stres	50 g/l	93,00 ± 0,25
		100 g/l	85,17 ± 1,19
		200 g/l	63,40 ± 0,01
	Mrazící cykly	1. cyklus	84,91 ± 1,16
		2. cyklus	58,02 ± 1,40
		3. cyklus	66,66 ± 1,43
		4. cyklus	59,01 ± 1,53

4.5.2 Kultury produkující pigmenty

Po stanovení stresové odpovědi *R. rubrum* a *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ při kultivaci s acetátovými médii a vystavení vybraným stresovým faktorům bylo provedeno další měření, které stanovilo vliv obsahu pigmentů na stresovou odpověď. Vybraným stresovým faktorům byly vystaveny kultury *R. rubrum* a *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$ kultivované mikroaerobně za přístupu světla po dobu 120 h při komplexním uhlíkatém substrátu (FAY). Získané procentuální zastoupení živých buněk po vystavení vybraným stresorům bylo vloženo do tabulce 7. Viability obou kmenů po vystavení vybraným stresorům byly velice podobné. Konkrétně při vystavení vzorků teplotě 50 °C po dobu 30 min nedošlo k výraznému poklesu živých buněk (87,44 ± 0,66 % viabilních buněk *R. rubrum* a 94,49 ± 0,79 % viabilních buněk *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$). Naopak při expozici 50 °C po dobu 60 minut došlo k poklesu procentuálního zastoupení živých buněk na ± 45 %. Příklad histogramů naměřených vzorků po expozici 80 °C a jsou k dispozici v kapitole přílohy (viz. obrázek 39).

Při porovnání těchto hodnot s viabilitami kultur obou kmenů kultivovanými 48 h při 100 mM acetátu, u kterých při vystavení teplotě 50 °C nedošlo k poklesu viability pod 90 %, je patrné, že oba kmeny kultivované 120 h s FAY byly výrazně náchylnější k poškození tepelným stresem. U divokého kmene, kultivovaného 120 h, mohla být snížena viabilita způsobena absencí PHA (0,40 % PHA) v porovnání s divokým kmenem, který byl kultivovaný

48 h (41,46 % PHA). Také je možné, že u divokého i mutantního kmene měla vliv na sníženou viabilitu hlavně prodloužená doba kultivace (120 h), nebo také rozdílné podmínky kultivace (mikroaerobní kultivace na světle po dobu 120 h versus aerobní kultivace za tmy po dobu 48 h).

Tabulka 7 – Procentuální zastoupení živých buněk po vystavení vybraným stresovým faktorům u kultur kultivovaných ve *FAY* po dobu 120 h

Bakteriální kmen	Stres	Expozice stresu	Živé buňky [%]
<i>R. rubrum</i>	Kontrola	60 min	90,85 ± 0,00
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	Kontrola	60 min	94,70 ± 0,00
<i>R. rubrum</i>	50 °C	30 min	87,44 ± 0,66
		60 min	45,25 ± 1,19
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	50 °C	30 min	94,49 ± 0,79
		60 min	45,77 ± 1,99
<i>R. rubrum</i>	80 °C	30 min	53,13 ± 2,06
		60 min	55,99 ± 1,15
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	80 °C	30 min	60,71 ± 0,06
		60 min	59,52 ± 0,32
<i>R. rubrum</i>	Osmotický stres	50 g/l	72,26 ± 0,26
		100 g/l	70,24 ± 1,32
		200 g/l	69,92 ± 0,11
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	Osmotický stres	50 g/l	81,92 ± 0,42
		100 g/l	75,23 ± 0,13
		200 g/l	74,92 ± 0,60
<i>R. rubrum</i>	Mrazicí cykly	1. cyklus	72,08 ± 0,58
		2. cyklus	80,88 ± 0,57
		3. cyklus	41,37 ± 0,32
		4. cyklus	55,97 ± 0,25
<i>R. rubrum</i> $\Delta phac1c2$	Mrazicí cykly	1. cyklus	69,49 ± 0,81
		2. cyklus	75,11 ± 1,35
		3. cyklus	38,27 ± 0,02
		4. cyklus	53,15 ± 0,03

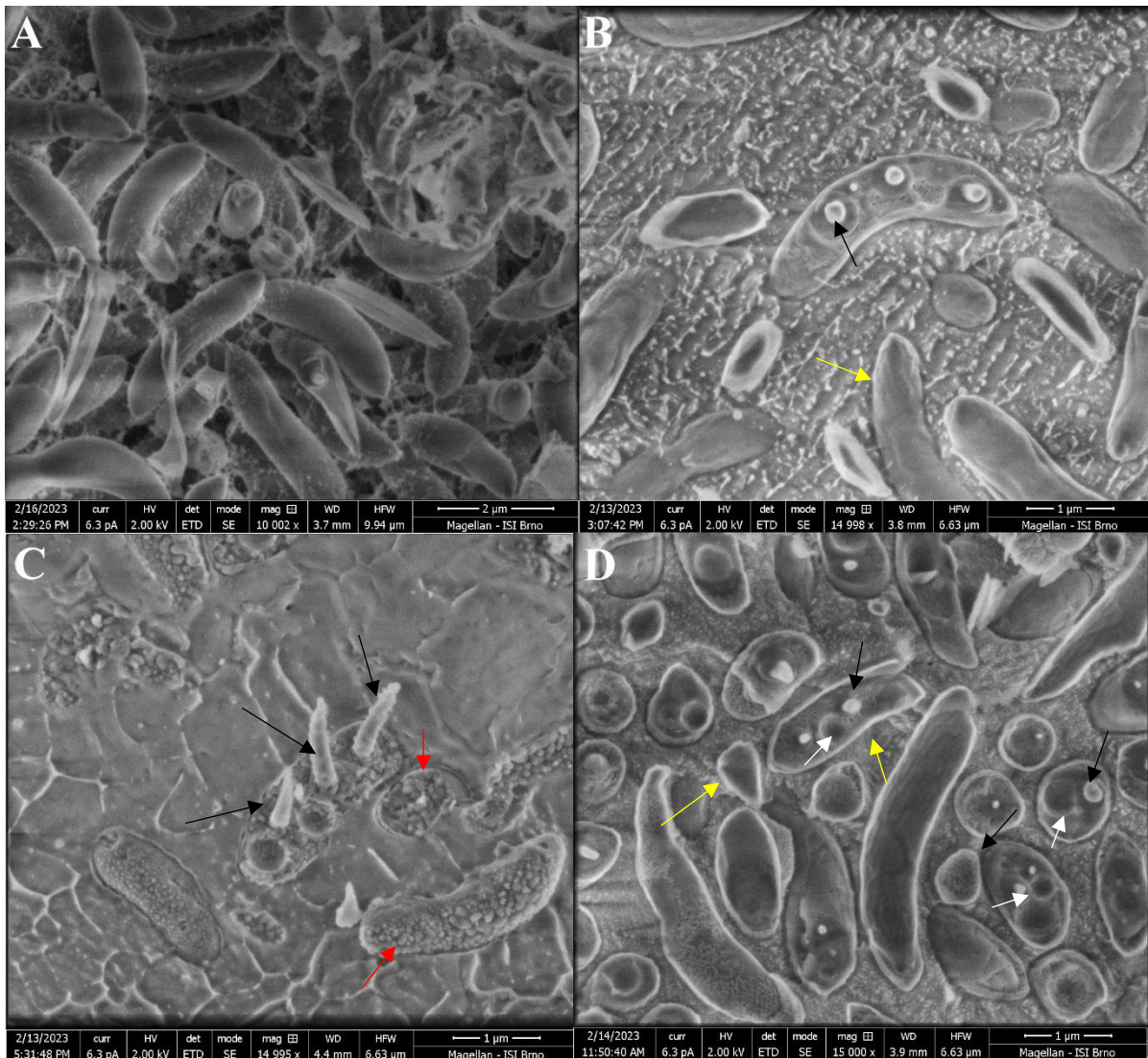
Při vystavení osmotickému stresu docházelo se zvyšující se koncentrací NaCl v prostředí u obou kmenů k postupnému snižování procentuálního zastoupení živých buněk. Během

mrazících cyklů došlo k výraznému poklesu viability po 3. cyklu rozmrazení a zamrazení ($41,37 \pm 0,32$ % živých buněk *R. rubrum* a $38,27 \pm 0,02$ % živých buněk *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$). Během 4. cyklu zamrazení a rozmrazení došlo k nárůstu procentuálního zastoupení živých buněk na $55,97 \pm 0,25$ % u *R. rubrum* a $53,15 \pm 0,03$ % u *R. rubrum* $\Delta phac_{1C2}$. I zde se dá uvažovat o případném protektivním mechanismu, který by byl aktivován vysokou hladinou stresu. Příklady histogramů naměřených vzorků po expozici 4. cyklům zamrazení a rozmrazení a 200 g/l NaCl jsou k dispozici v kapitole přílohy (viz. obrázek 40).

U osmotického stresu a zamrazovacích cyklů je podobně jako u zvýšené teploty patrný rozdíl ve vaibilitě buněk mezi kulturami obou kmenů starými 48 h a kulturami obou kmenů starými 120 h. Snížená viabilita starších kultur byla i v tomto případě pravděpodobně zapříčiněna právě rozdílným stářím kultur, případně rozdílnými kultivačními podmínkami (aerobní kultivace za tmy po dobu 48 h versus mikroaerobní kultivace za světla po dobu 120 h).

4.6 Stanovení morfologických změn pomocí elektronové mikroskopie (kryo-SEM)

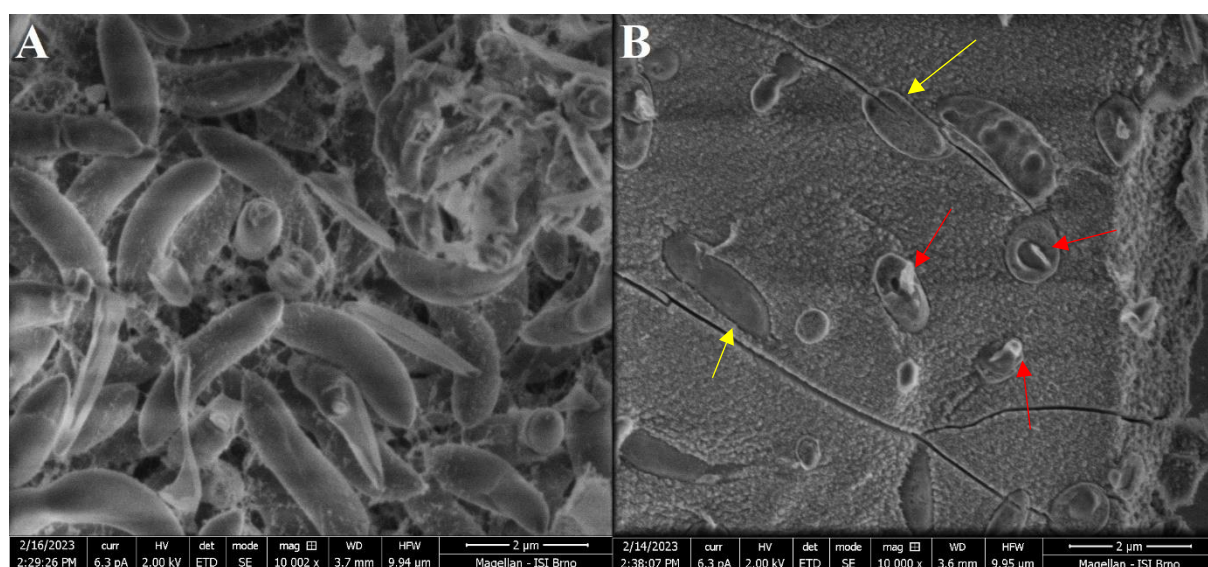
Kromě analýzy pomocí průtokové cytometrie byly vzorky vystavené stresorům analyzovány kryo-skenovací elektronovou mikroskopií. Vzorky byly připraveny a analyzovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.8.1.1. Z časových důvodů byly analyzovány pouze vzorky divokého a mutantního kmene (kultivované aerobně při acetátových médiích) vystavené vybraným stresovým faktorům se záměrem pozorovat morfologické změny po vystavení vybraným stresovým faktorům. Pořízené snímky jsou k vidění na obrázku 19–24.



Obrázek 19 – kryo-SEM snímky *R. rubrum* kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B–50 °C, C – 80 °C, D – 4. mrazicí cyklus; šípky vysvětleny v textu

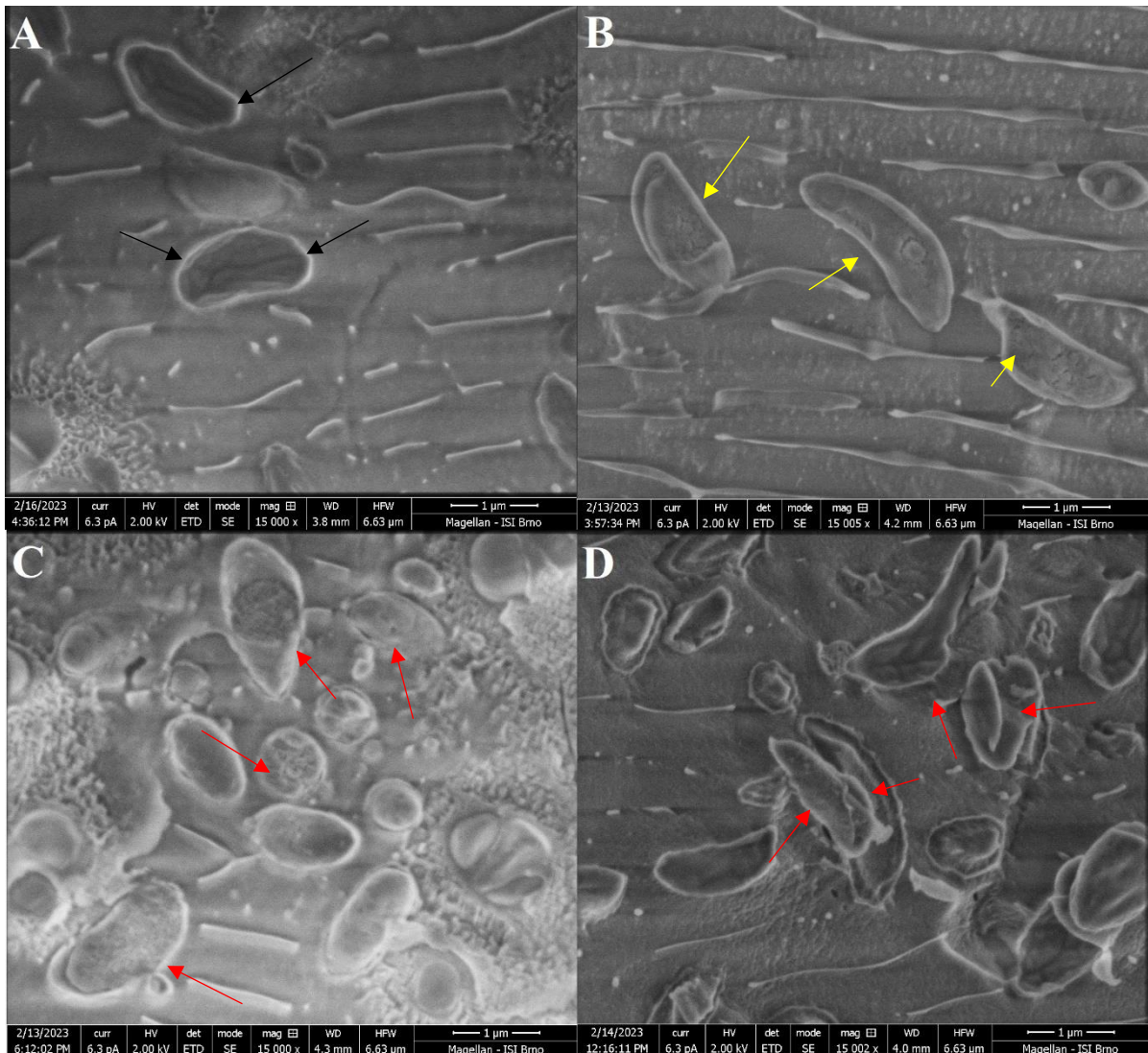
Na obrázku 19A je znázorněn kontrolní vzorek, který nebyl vystaven žádnému stresu. Díky tomu nejsou buňky nijak viditelně poškozené a lze opět vidět klasický spirálovitý tvar bakterie. Snímek 19B znázorňuje buňky vystavené teplotě 50 °C po dobu 60 minut, na kterých je patrné poškození buněk (viz. žlutá šipka), které ovšem není příliš výrazné. Toto koreluje s výsledky analýzy pomocí průtokové cytometrie, ze které víme, že divoký kmen *R. rubrum* obsahoval ± 97 % viabilních buněk. Zároveň lze na snímku 19B spatřit lom bakteriální buňkou, který ukazuje přítomnost PHA granulí (znázorněno černou šipkou). Naopak při pohledu na snímek 19C, znázorňující vystavení 80 °C po dobu 60 minut, je patrné výrazné poškození buněk (naznačeno červenými šipkami). Opět je vidět korelace mezi výsledky průtokové cytometrie, která stanovila pokles viabilních buněk na ± 48 %. Snímky v kombinaci s výsledky z průtokové cytometrie potvrzují předpokládanou náchylnost divokého kmene *R. rubrum* vůči

zvýšené teplotě. Na snímku 19C lze také vidět PHA granule ve tvaru hrotu (zaznačeno černými šipkami). Tento tvar byl zapříčiněn při přípravě vzorku, kdy při mrazovém lámání došlo k řezu skrz PHA granule, které byly potom oddělením dvou ploch, vzniklých pomocí lomu, nataženy do tohoto hrotovitého tvaru. Na snímku 19D jsou k vidění bakteriální buňky vystavené 4 mrazícím cyklům. Buňky nejsou na pohled výrazně poškozeny (naznačeno pomocí žlutých šipek), což opět koreluje s výsledky průtokové cytometrie, kdy byl počet živých buněk po 4. mrazícím cyklu stanoven na $\pm 94\%$. Dále můžeme na snímku vidět přítomné PHA granule, které jsou zaznačeny černými šipkami. Vzhledem k nízkému poškození bakteriálních buněk se dá předpokládat, že v buňkách přítomné PHA granule (41,46 % PHA) slouží divokému kmeni *R. rubrum* jako kryoprotektivum. Na snímku 19D jsou také zřetelné díry po vytažených PHA granulích (značené bílými šipkami), které vznikly při procesu mrazového lámání.



Obrázek 20 – kryo-SEM snímky *R. rubrum* kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 200 g/l NaCl; šipky vysvětleny v textu

Na obrázku 20B je znázorněný vzorek po vystavení 200 g/l NaCl, u kterého je zajímavé, že i přes výsledky průtokové cytometrie poukazující na nízký počet živých buněk ve vzorku ($\pm 60\%$ živých buněk), není na snímcích patrné výrazné vnější buněčné stěny buněk (naznačeno žlutými šipkami). Červené šipky značí PHA granule nezvyklého tvaru. Tento tvar byl pravděpodobně způsoben již zmíněným mrazovým lámáním, kdy došlo oddělením dvou vzniklých ploch k natažení granulí do tohoto neobvyklého tvaru. Z těchto snímků nelze potvrdit, ale ani vyvrátit protektivní funkci PHA granulí u divokého kmene *R. rubrum*. Z tohoto důvodu by bylo vhodné v rámci příštích experimentů zahrnout i studii vlivu osmotického stresu na bakterii *R. rubrum*.



Obrázek 21 – kryo-SEM snímky *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 50 °C, C – 80 °C, D – 4. mrazící cyklus; šipky vysvětleny v textu

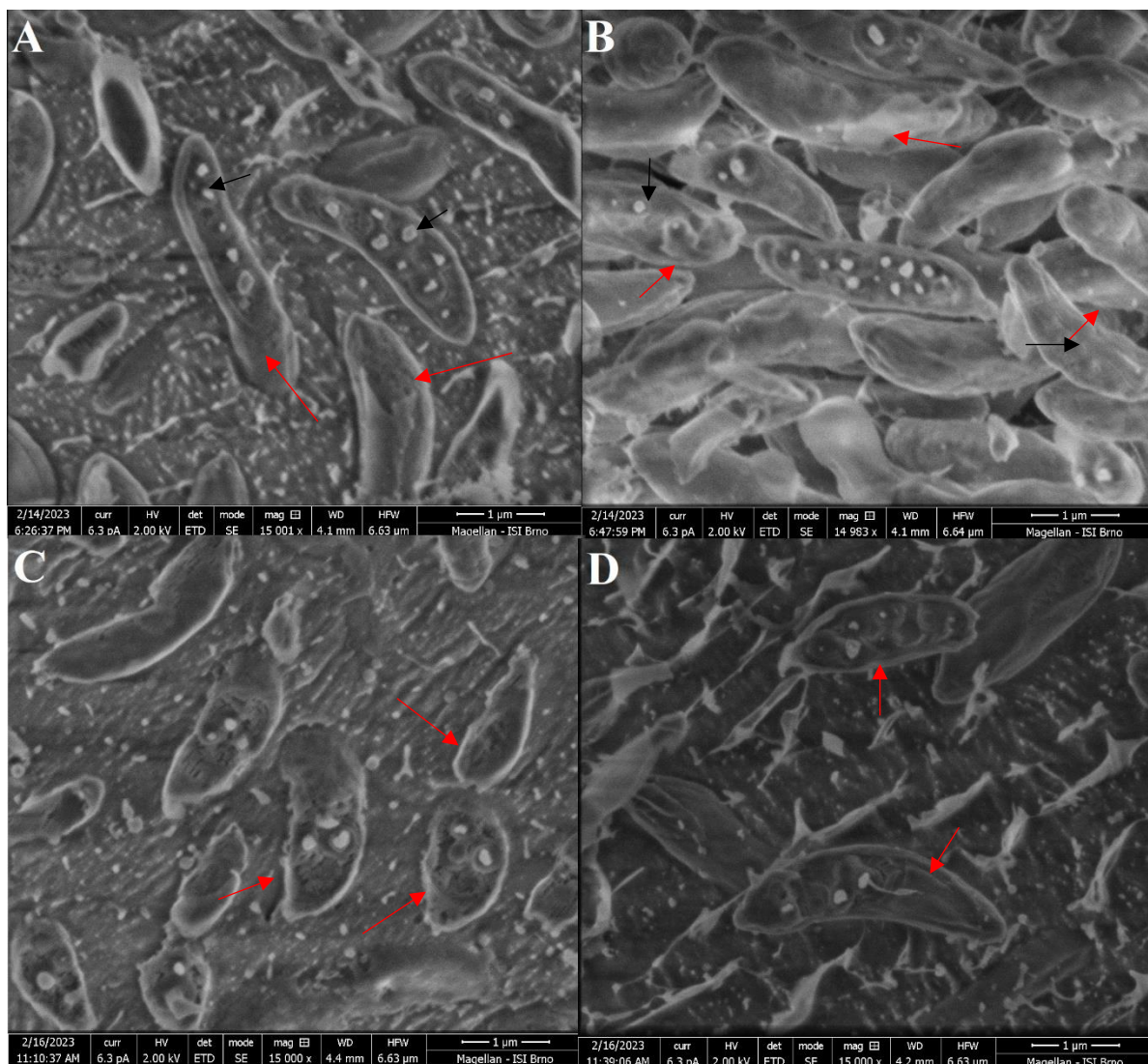
Obrázek 21A znázorňuje kontrolní vzorek mutantního kmene *R. rubrum* $\Delta phac1c2$, který nebyl vystaven žádným stresorům. Na snímku nejsou vidět žádné PHA granule, což potvrzuje neschopnost tvorby PHA. Na snímku 21B jsou potom znázorněny bakteriální buňky vystavené 50 °C po dobu 60 minut, na kterých nejsou opět patrné žádné PHA granule a žlutými šipkami je naznačeno malé poškození buněk, které koreluje s výsledky průtokové cytometrie, která stanovila počet živých buněk na $\pm 90\%$. Červenými šipkami je na obrázku 21C zaznačeno poškození bakteriálních buněk vlivem vystavení zvýšené teplotě 80 °C. Snímek opět potvrzuje výsledek průtokové cytometrie, při které byl stanoven pokles živých buněk na $\pm 55\%$. I u mutantního kmene je zřejmé, že je nejvíce náchylný k poškození tepelným stresem. Snímek 21D potom ukazuje bakteriální buňky mutantního kmene po 4. mrazícím cyklu. Průtoková cytometrie stanovila u tohoto vzorku viabilitu bakteriálních buněk $\pm 87\%$, nicméně

na snímcích je zřetelné výrazné poškození buněk vlivem opakovaného zamrazování a rozmrazování. Nejvíce poškozené buňky jsou na snímku označeny červenými šipkami. Výrazné poškození mutantních buněk *R. rubrum* potom potvrzuje hypotézu o kryoprotektivním účinku PHA granulí u divokého kmene.



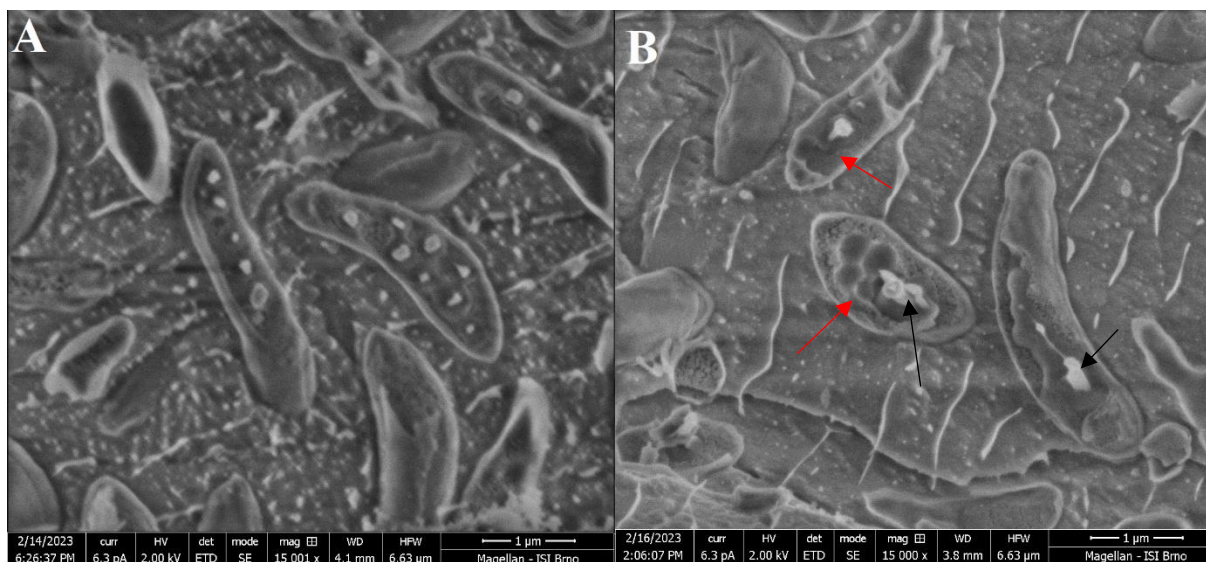
Obrázek 22 – kryo-SEM snímky *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ kultivováno 48 h při 100 mM acetátu;
A – kontrolní vzorek, B – 200 g/l NaCl, šipky vysvětleny v textu

U vzorku, který byl vystavený osmotickému stresu (viz. obrázek 22B) je i přes poměrně vysokou viabilitu stanovenou průtokovou cytometrií (± 85 % živých buněk) patrné poškození buněk (viz. červené šipky). Podobně jako u divokého kmene, i u kmene mutantního bylo poškození spíše vnitřní než vnější.



Obrázek 23 – kryo-SEM snímky *R. rubrum* kultivováno 72 h při 200 mM acetátu; A – kontrola, B – 50 °C, C – 80 °C, D – 4. mrazící cyklus

Obrázek 23A znázorňuje kontrolní vzorek, na kterém je i přes absenci vystavení stresům patrné značné poškození (zaznačeno červenou šipkou). Zároveň je i viditelná přítomnost PHA granulí, které jsou zaznačeny černými šipkami. Na snímku 23B jsou bakteriální buňky vystavené 50 °C po dobu 60 minut. Opět lze spatřit PHA granule (viz. černá šipka). Červenými šipkami je potom znázorněno patrné poškození buněčné stěny vlivem tepelného stresu. Toto koreluje s výsledky průtokové cytometrie, která určila počet živých buněk na $\pm 32\%$. Snímek 23C zobrazuje bakteriální buňky po vystavení 80 °C po dobu 60 minut, u kterých došlo až k potrhání buněk, jak je zaznačeno červenými šipkami. Tento snímek opět koreluje s výsledky průtokové cytometrie, kdy byl počet živých buněk $\pm 42\%$. Na snímku 23D jsou znázorněny bakteriální buňky po vystavení 4. cyklům mrazení a rozmrazení. I zde je patrné větší poškození buněk, hlavně při porovnání s kulturou mladší o 24 h vystavenou stejnému stresu (viz. Obrázek 19D).



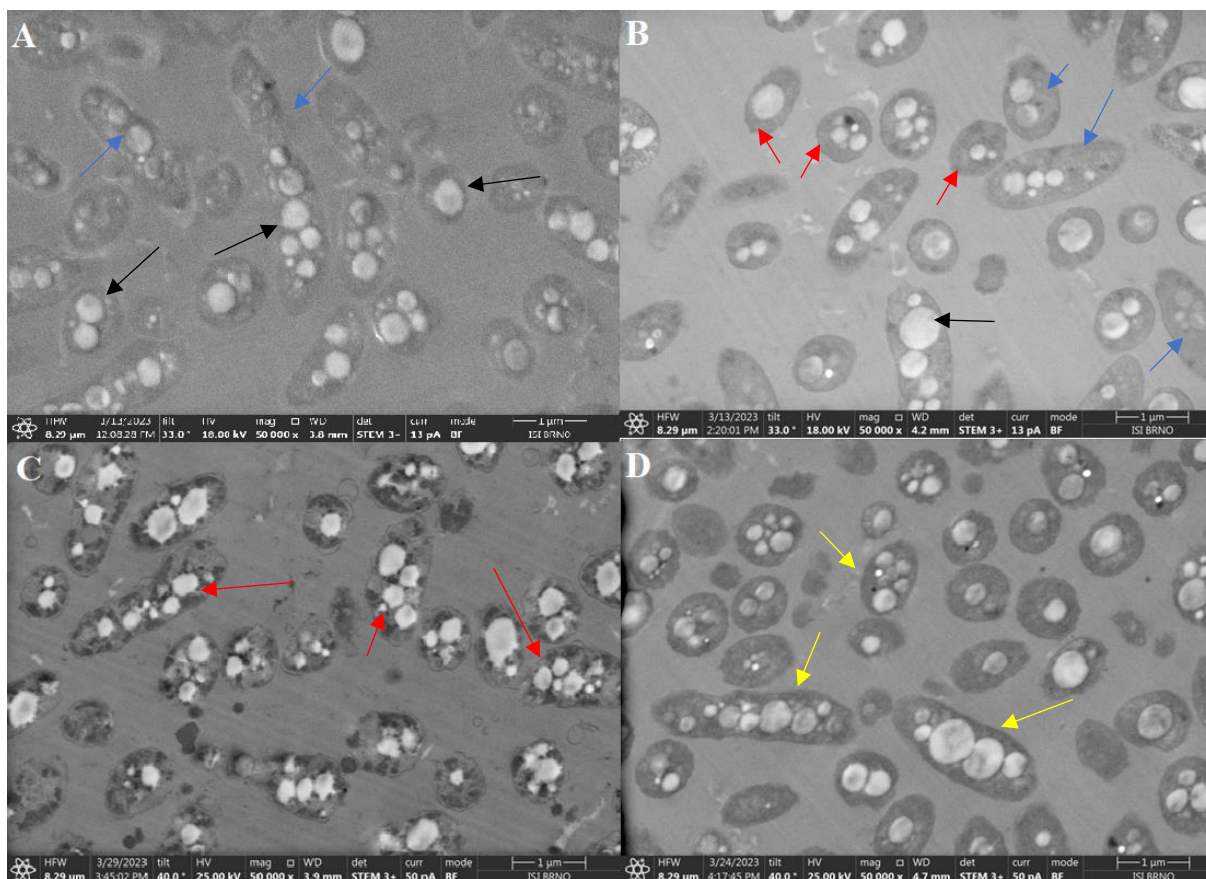
Obrázek 24 – kryo-SEM snímky *R. rubrum* kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 200 g/l NaCl; šipky vysvětleny v textu

U buněk vystavených 200 g/l NaCl, které jsou znázorněny na snímku 24B, je také patrné vnější poškození buněk ve formě porušení buněčné stěny (znázorněno červenými šipkami). I u tohoto vzorku došlo k porušení vnitřní struktury (viz. červené šipky), ale zároveň byla poškozena i struktura vnější. Dále jsou na snímku 24B patrné PHA granule (černé šipky), u kterých je viditelná atypická struktura, pravděpodobně zapříčiněná mrazovým lámáním.

Celkově tyto snímky potvrzují teorii, i přes vysoký obsah PHA (42,17 % PHA) má na viabilitu divokého kmene *R. rubrum* dopad především stáří kultur, jelikož kultura stará 48 h měla výrazně vyšší viabilitu i přes to, že měla podobný obsah PHA (41,46 % PHA) jako kultura stará 72 h.

4.7 Stanovení morfologických změn pomocí elektronové mikroskopie (STEM)

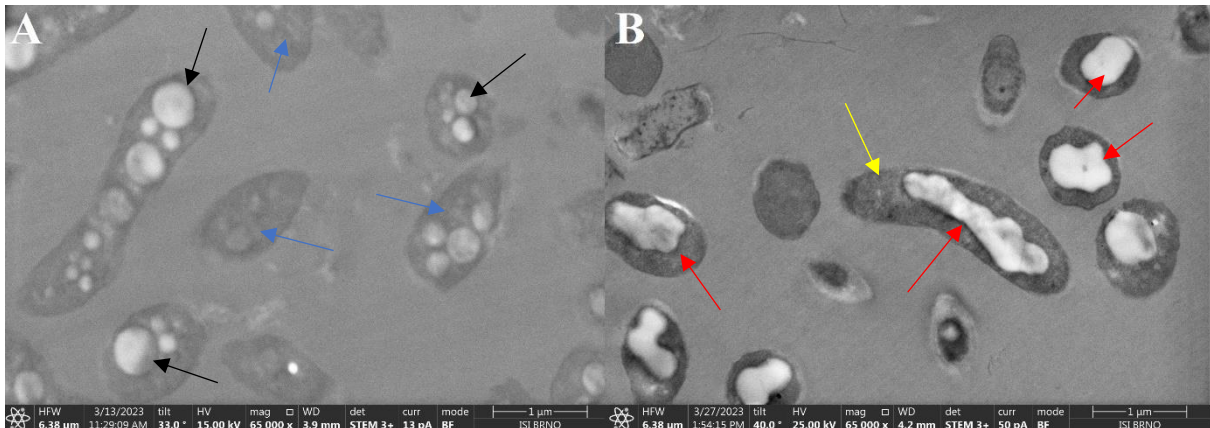
Zároveň se skenovací elektronovou mikroskopií byly, některé vzorky analyzovány i s pomocí skenovací transmisní elektronové mikroskopie (STEM). Vzorky byly připraveny a analyzovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.8.2.1. Z časových důvodů byly touto metodou analyzovány pouze vzorky divokého a mutantního kmene (kultivované 48 h ve 100 mM acetátu) vystavené vybraným stresorům. Vybrané snímky jsou zobrazené v obrázku 25–29.



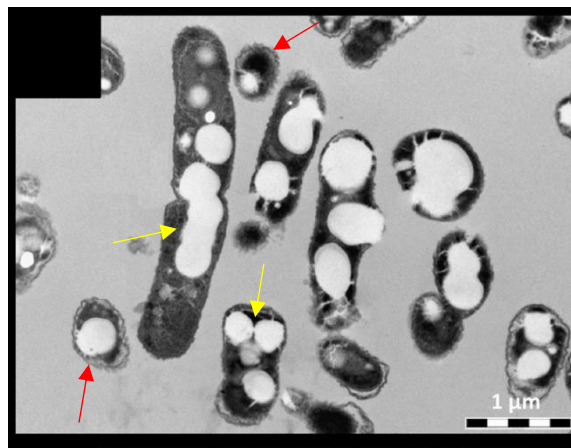
Obrázek 25 – STEM snímky *R. rubrum* kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 50 °C, C – 80 °C, D – 4. mrazící cyklus; šipky vysvětleny v textu

Na snímku 25A lze vidět kontrolní vzorek kultury divokého kmene, který nebyl vystaven žádnému stresoru. V buňkách jsou patrné vezikuly, které jsou označeny modrými šipkami. Dále je vidět velké množství PHA granulí, což koreluje s výsledky GC-FID analýzy, která stanovila obsah PHA na 41,46 %. Jelikož nebyly buňky vystaveny žádnému stresoru není patrné žádné poškození buněčné stěny, nebo intracelulárního prostředí. Snímek 25B znázorňuje bakteriální buňky divokého kmene po vystavení teplotě 50 °C po dobu 60 minut, u kterých není na snímku patrné výraznější poškození buněk, pouze u některých buněk je viditelné lehké pokrivení tvaru buněčné stěny (značeno červenými šipkami). Na tomto snímku jsou opět modrými šipkami označeny viditelné vezikuly. Naopak na snímku 25C je patrné výrazné poškození extra i intracelulární struktury buněk po vystavení teplotě 80 °C po dobu 60 minut (znázorněno červenými šipkami). Tyto snímky také potvrzují předpokládanou náchylnost bakterie *R. rubrum* vůči zvýšené teplotě. Snímek 25D zobrazuje vystavení divokého kmene celkově 4 cyklům mrazení a rozmrazení. Na bakteriálních buňkách není patrné extra nebo intracelulární poškození (viz. žluté šipky). Vysoká viabilita divokého kmene

při opakovaném zamrazení a rozmrazení může být pravděpodobně přisouzena kryoprotektivnímu účinku PHA granulí.

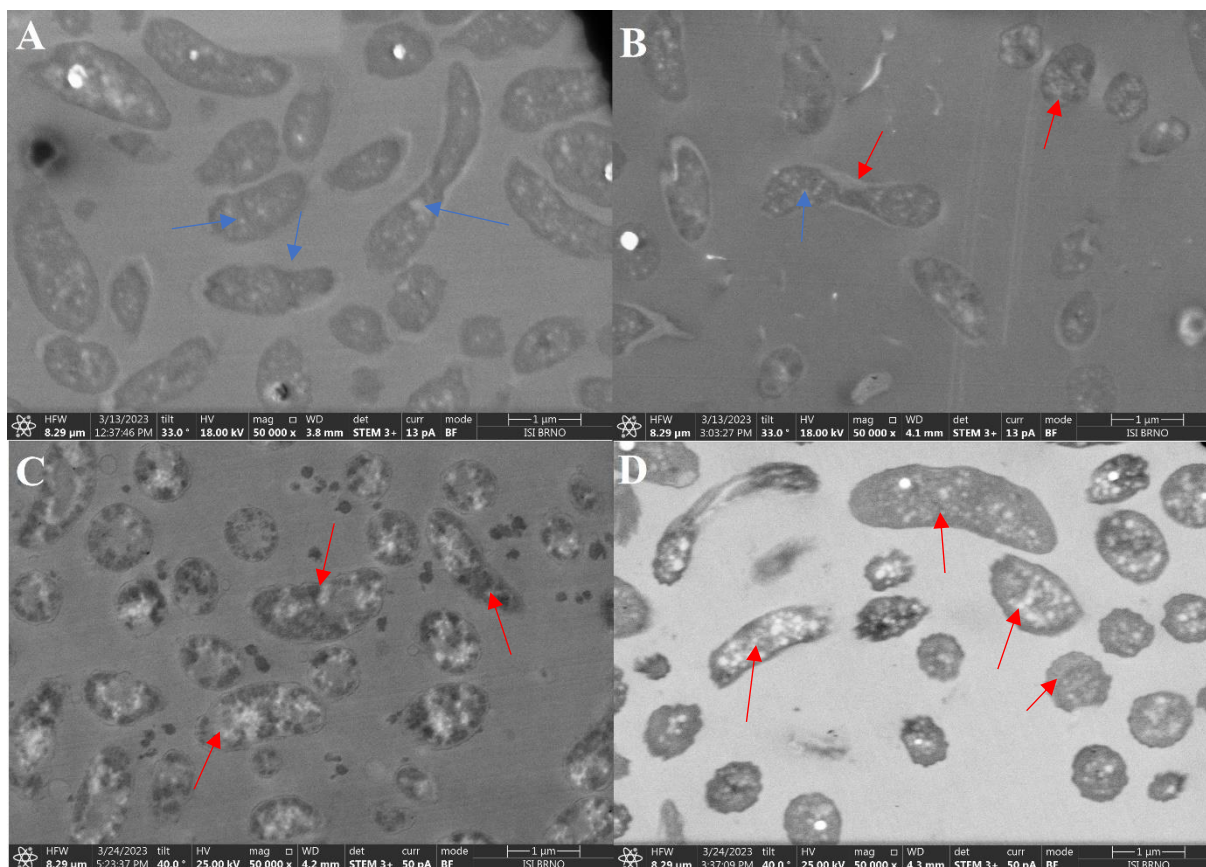


Obrázek 26 – STEM snímky *R. rubrum* kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 200 g/l



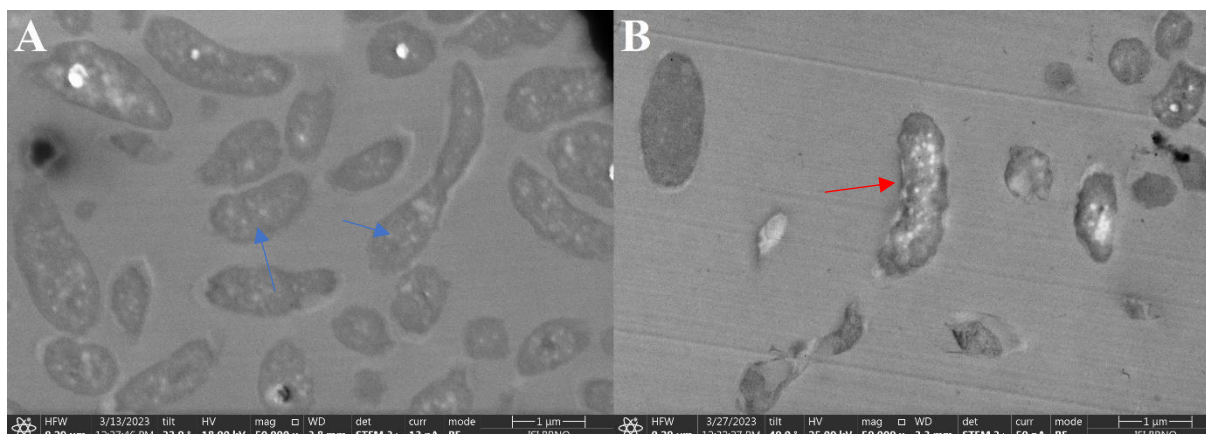
Obrázek 27 – Bakterie *Cupravidus necator* H16 po vystavení osmotickému stresu 200 g/l NaCl, převzto upraveno [55]

Snímek 26B potom znázorňuje divoký kmen *R. rubrum* po vystavení 200 g/l NaCl, kdy snímky potvrdily intracelulární poškození vlivem zvýšeného osmotického tlaku. Ze snímku je patrné, že i přes neporušenou buněčnou stěnu (viz. žlutá šipka) došlo k poškození vnitřní struktury buněk, a to hlavně proteinů, ze kterých se skládají obaly PHA granulí. Na snímku jsou červenými šipkami zaznačeny PHA granule, u kterých došlo porušení proteinových obalů k vylití PHA do intracelulárního prostředí bakteriální buňky. Při porovnání se snímky bakterie *C. necator* H16 (viz. obrázek 27), která byla také vystavená 200 g/l NaCl patrný rozdíl ve struktuře PHA granulí, protože u *C. necator* H16 nedošlo k tak intenzivnímu poškození intracelulárního prostředí (viz. žluté šipky) jako u divokého kmene *R. rubrum*. Červené šipky ve snímku 27 potom značí poškození buněčné stěny *C. necator* H16 [55].



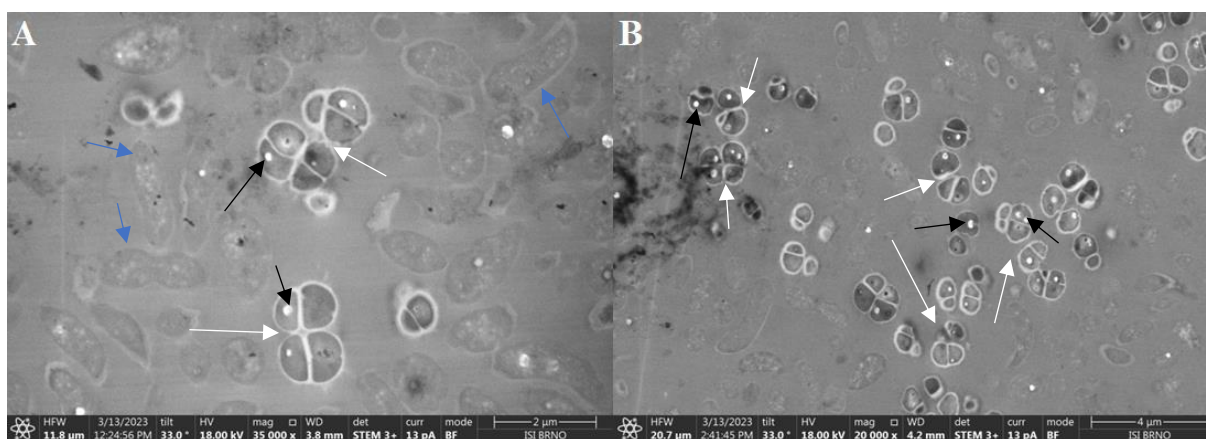
Obrázek 28 – STEM snímky *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 50 °C, C – 80 °C, D – 4. mrazící cyklus; šipky vysvětleny v textu

Obrázek 28A znázorňuje kontrolní vzorek kultury mutantního kmene, na kterém je patrná absence PHA granulí, což opět potvrzuje neschopnost PHA produkce mutantního kmene. Modrými šipkami jsou značeny přítomné vezikuly, které jsou u mutantního kmene více viditelné právě pravděpodobně díky absenci PHA granulí, jelikož mají na snímcích větší kontrast než vezikuly. Snímek 28B znázorňuje bakteriální buňky po vystavení 50 °C po dobu 60 minut. Červené šipky značí poškození tímto tepelným stresem, které stejně jako u divokého kmene, není výrazné a spíše se jedná o pokrivení tvaru buněčné stěny. Naopak u snímku 28C je patrné, že při vystavení 80 °C po dobu 60 minut došlo u mutantního kmene, obdobně jako u divokého kmene, k výraznému poškození extra i intracelulární struktury (zaznačeno červenými šipkami). Tímto se opět potvrdil předpoklad o náchylnosti *R. rubrum* vůči zvýšené teplotě. Na snímku 28D je mutantní kmen *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ po 4. cyklu zamrazení a rozmrazení, kdy na rozdíl od divokého kmene je u kmene mutantního viditelné poškození struktury buněk (opět označeno červenými šipkami). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben absencí PHA granulí, které by sloužily jako kryoprotektant. Tento snímek mutantního kmene, také potvrzuje hypotézu o kryoprotektivním účinku PHA granulí u divokého kmene *R. rubrum*.



Obrázek 29 – STEM snímky *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ kultivováno 48 h při 100 mM acetátu; A – kontrola, B – 200 g/l NaCl; šipky vysvětleny v textu

Na snímku 29A je zobrazen kontrolní vzorek, který nebyl vystaven žádnému stresoru, u kterého je opět patrná absence PHA granulí a modrými šipkami jsou zaznačené přítomné vezikuly. Na snímku 29B jsou vidět bakteriální buňky po vystavení 200 g/l NaCl. Na rozdíl od divokého kmene je u mutantního kmene patrné i výrazné poškození buněčné stěny, které bylo zaznačeno červenou šipkou. Nicméně kromě poškození buněčné stěny není u buněk mutantního kmene patrné výrazné poškození intracelulárního prostředí.



Obrázek 30 – STEM snímky *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ kultivováno 48 h při 100 mM acetátu s přítomností tetrádyformujících mikroorganismů; A – kontrola, B – 50 °C; šipky vysvětleny v textu

Zajímavým výsledkem STEM analýzy vzorků mutantního kmene *R. rubrum* $\Delta phac1c2$, kultivovaného 48 h při 100 mM acetátu, bylo objevení přítomnosti zvláštních tetrádyformujících organismů (TFO) ve vzorcích (značeno bílými šipkami). Tato skupina mikroorganismů, která je patrná na obou snímcích 30A i B, je fylogeneticky velice rozmanitá. Hlavními dosud popsány skupinami jsou *alfaproteobakterie*, *betaproteobakterie*, *gamaproteobakterie*, a *aktinobakterie*. Tyto TFO organismy se vyskytují hlavně v systémech se zvýšeným biologickým odstraňování fosforu (enhanced biological phosphorus

removal – EBPR) v laboratorním měřítku, ve kterých mají k dispozici syntetický zdroj uhlíku (např. acetát + glukóza, nebo pouze samotný acetát). Vzhledem k diverzitě této skupiny byla u některým zástupců TFO popsána syntéza PHA, u jiných se předpokládá, že se řadí mezi glykogen akumulující organismy (GAO) [80, 81].

Je zajímavé, že tuto neobvyklou kontaminaci neodhalila ani průtoková cytometrie, ani kryo-SEM pozorování. Zároveň je na obou snímcích patrný vyšší kontrast TFO v porovnání s buňkami mutantního kmene *R. rubrum* $\Delta phac1c2$. U TFO přítomných na snímcích A i B je také patrná přítomnost granulí (značeno černými šipkami), ale vzhledem k rozmanitosti této skupiny je těžké určit, zda se jedná o PHA nebo o glykogen bez bližšího zařazení do jedné z výše zmíněných skupin.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium metabolismu PHA u bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Jedním z hlavních cílů práce byla optimalizace podmínek kultivace divokého PHA pozitivního kmene za účelem zvýšené produkce PHA v co nejkratším časovém intervalu. Další cíl byl zaměřen na porovnání divokého PHA produkujícího a mutantního PHA neprodukujícího kmene (Δ *phac1c2*) z pohledu morfologie buněk a stanovení vlivu PHA na stresovou odpověď při vystavení vybraným stresovým faktorům s využitím pokročilých analytických technik jako průtoková cytometrie, elektronová mikroskopie, aj. Jako poslední byla sledována produkce pigmentů u obou kmenů.

Prvním provedeným experimentem této práce byla optimalizace počáteční koncentrace substrátu a doby kultivace se zaměřením na zvýšenou produkci PHA. V tomto experimentu byly použity různé zdroje uhlíku, a to polokomplexní médium FAY a 1M roztok acetátu a rozdílných finálních koncentracích (100, 200, 300 a 400 mM). Ze získaných výsledků bylo stanoveno, že se zvyšující se koncentrací acetátu dochází k postupné inhibici růstu oproti FAY substrátu, ale zároveň byla zvýšena produkce PHA. Také byla potvrzena produkce kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) u acetátových médií po 48 h kultivace. Vzhledem ke stanovenému obsahu PHA a době kultivace byla pro další experimenty zvolena média se 100 mM a 200 mM koncentrací acetátu. Při optimalizaci byla popsána také morfologie buněk divokého kmene *R. rubrum* pomocí fluorescenčního mikroskopu a sondy Bodipy 439/503.

Kromě optimalizace kultivací byla před hlavními experimenty provedena i optimalizace fluorescenčních sond pro průtokovou cytometrii. Z použitých sond propidium jodid a SYTOX™ Blue byla pro další experimenty zvolena sonda propidium jodid. SYTOX™ Blue byla pro následující experimenty vyloučena z důvodu opakovaného zkreslení signálu.

Následně byly provedeny kultivace divokého a mutantního kmene při optimalizaci zvolených koncentrací acetátu. Oba kmeny byly kultivovány za aerobních podmínek ve tmě po dobu 48 h při 100 mM koncentraci acetátu a 72 h v médiu obsahující 200 mM koncentraci acetátu. Pomocí GC-FID analýzy byl stanoven celkový obsah PHA u divokého kmene jako 41,46 % z celkové biomasy pro kulturu starou 48 h a 42,17 % pro kulturu starou 72 h. U obou kultur byla také potvrzena přítomnost kopolymeru P(3HB-*co*-3HV), kdy u 48 h staré kultury bylo zastoupení monomerů 98,03 % 3HB jednotek a 1,97 % 3HV jednotek. U 72 h staré kultury se kopolymer skládal z 98,14 % 3HB jednotek a 1,86 % 3HV jednotek.

Současně se stanovením obsahu PHA u divokého kmene *R. rubrum* byly oba kmeny (divoký i mutantní) vystaveny vybraným stresovým faktorům, zvýšené teplotě, osmotickému stresu a mrazicím cyklům. Získané vzorky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie a elektronové mikroskopie (kryo-SEM a STEM). Výsledky analýz potvrdily očekávaný výsledek totálního poškození obou kmenů *R. rubrum* při teplotě 80 °C ($47,88 \pm 1,63$ % viabilních buněk divokého kmene a $54,66 \pm 0,31$ % viabilních buněk mutantního kmene) v porovnání s osmotickým stresem nebo opakovanými cykly mrazení a rozmrazení. U divokého kmene docházelo při vystavení osmotickému stresu k porušení intracelulární struktury a byl také stanoven nižší počet viabilních buněk ($60,06 \pm 0,74$ %), než u mutantního kmene, který měl $85,82 \pm 1,14$ % viabilních buněk, ale zároveň u něj došlo k porušení intra i extracelulární struktury. Analýzy nepotvrdily, ale ani nevyvrátily protektivní vlastnost PHA granulí při vystavení osmotickému stresu. Naopak u divokého kmene byla potvrzena hypotéza o kryoprotektivním účinku PHA granulí při analýze vzorků vystavených opakovaným cyklům mrazení a rozmrazení, jelikož viabilita bakteriálních buněk neklesla pod 92 %. Tyto výsledky byly potvrzeny snímky z elektronových mikroskopů, kdy nebylo viditelné poškození intra či extracelulární struktury buněk divokého kmene po vystavení mrazicím cyklům. Dále výsledky těchto analýz prokázaly, že i přes vysoký obsah PHA má na viabilitu divokého kmene *R. rubrum* výrazný vliv hlavně stáří kultury, jelikož kultura stará 72 h, obsahující 42,17 % PHA, měla při vystavení vybraným stresovým faktorům nižší viabilitu a viditelné poškození všech buněk na snímcích z kryo-SEM a STEM analýzy, v porovnání s kulturou starou 48 h, která obsahovala 41,46 % PHA.

Posledním provedeným experimentem bylo sledování produkce pigmentů u obou bakteriálních kmenů a stanovení jejich vlivu na stresovou odpověď. Produkce probíhala 120 h při mikroaerobních podmínkách na světle. Byly zvoleny dva uhlíkaté zdroje a to 100 mM koncentrace acetátu a polokomplexní uhlíkatý substrát FAY. U acetátových medií došlo k inhibici růstu pravděpodobně vlivem zvolených podmínek, protože *R. rubrum* zpracovává acetát převážně aerobním způsobem. Proto byly pro stanovení obsahu pigmentů a stresové odpovědi použity kultury kultivované při FAY substrátu. Obsah pigmentů byl stanovován pomocí UV-VIS spektroskopie. U divokého kmene byl stanoven vyšší obsah bakteriochlorofylu *a* ($0,47 \mu\text{g/ml}$) v porovnání s mutantním kmenem, u kterého bylo stanoveno $0,36 \mu\text{g/ml}$. Naopak při stanovení karotenoidů bylo stanoveno vyšší množství u mutantního kmene ($0,07 \mu\text{g/ml}$), u divokého kmene analýzy neprokázaly žádné karotenoidy. Pro příští experimenty by tedy bylo vhodné se zaměřit se i na extrakci a stanovení i jiných pigmentů jako

bakteriofeofytin a spiriloxantin. U divokého kmene byl navíc pomocí GC-FID stanoven obsah PHA, který byl vzhledem k dlouhé době kultivace nepodstatný (0,40 % PHA). Obdobně jako v předchozím experimentu byly oba kmeny vystaveny vybraným stresovým faktorům (zvýšená teplota, osmotický stres, mrazící cykly) a vzorky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. U obou kmenů byla stanovena výrazně nižší viabilita při porovnání s kulturami starými 48 h kultivovanými aerobně za tmy při 100 mM acetátu. Viabilita obou bakteriálních kmenů byla velice podobná, což bylo pravděpodobně způsobeno nízkým obsahem PHA u divokého kmene (0,40 %). Vliv pigmentů na viabilitu obou kmenů nebyl prokázán. Kromě stáří kultur a obsahu PHA mohly mít na viabilitu obou kmenů vliv také podmínky, při kterých byly tyto kmeny kultivovány (mikroaerobní kultivace při světle po dobu 120 h). Tyto výsledky potvrdily, že zvýšenou viabilitu kultury divokého kmene, staré 48 h lze přisoudit právě zvýšenému obsahu PHA.

Výsledky předkládané diplomové práce prokázaly schopnost zvýšené produkce PHA bakterií *Rhodospirillum rubrum* při acetátu jako jediném uhlíkatém zdroji a současně i aktivaci produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) po 48 h kultivaci. Dále byla potvrzena protektivní vlastnost PHA granulí vůči snížené teplotě u divokého kmene *R. rubrum*. Pro potvrzení a následné rozvedení výsledků a hypotéz uvedených v této diplomové práci bude nutné pokračovat v dalších studiích této metabolicky zajímavé a perspektivní bakterie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT, 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. **126**, 45-56 [cit. 2020-11-11]. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [2] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* [online]. 2014, **16**(8), 2357-2373 [cit. 2022-03-27]. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.1235
- [3] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*. 2010, **55**(1), 17-22. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- [4] WINNACKER, Malte, 2019. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. **121**[11] [cit. 2020-11-11]. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <http://doi:10.1002/ejlt.201900101>
- [5] GOMES GRADÍSSIMO, Diana, Luciana PEREIRA XAVIER a Agenor VALADARES SANTOS. Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoates: A Sustainable Alternative in Circular Economy. *Molecules* [online]. 2020, **25**(18) [cit. 2022-03-27]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25184331
- [6] KOLLER, Martin. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(2) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation4020030
- [7] KE, Yu, Caikun LIU, Xiaoye ZHANG, Meng XIAO a Gang WU. Surface Modification of Polyhydroxyalkanoates toward Enhancing Cell Compatibility and Antibacterial Activity. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2017, **302**(11) [cit. 2022-03-27]. ISSN 14387492. Dostupné z: doi:10.1002/mame.201700258
- [8] ŠPITALSKÝ, Z., I. LACÍK, E. LATHOVÁ, et al. Controlled degradation of polyhydroxybutyrate via alcoholysis with ethylene glycol or glycerol. *Polymer Degradation and Stability*. 2006, **91**(4), 856-861. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.06.019

- [9] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, V. ENEV, et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(4), 1905-1917. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- [10] FERRE-GUELL, A. a J. WINTERBURN. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates with Controlled Composition and Microstructure. *Biomacromolecules*. 2018, 19(3), 996-1005. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.7b01788
- [11] HUONG, Kai-Hee, Vigneswari SEVAKUMARAN a A. A. AMIRUL. P(3HB- co -4HB) as high value polyhydroxyalkanoate: its development over recent decades and current advances. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2021, 41(4), 474-490 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.1080/07388551.2020.1869685
- [12] LEE, Sang Yup. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, 49(1), 1 - 14. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:13.O.CO;2- P. ISSN 0006-3592.
- [13] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, 25(10), 1503-1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [14] TAN, G. Y., C. Y. CHEN, L. LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. 2014, 6(3), 706-754. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6030706
- [15] STUART, E.S., LENZ, R., and FULLER, R.C. (1995) The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in *Pseudomonas oleovorans*. *Can J Microbiol* 41 (Suppl. 1): 84–93
- [16] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6(1) [cit. 2023-02-27]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612
- [17] ROJA, K., D. RUBEN SUDHAKAR, Susaimanickam ANTO a Thangavel MATHIMANI, 2019. Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 22 [cit. 2020-11-11]. ISSN 18788181. Dostupné z: <http://doi:10.1016/j.bcab.2019.101358>.

- [18] JENDROSSEK, D. a R. HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. Annual Review of Microbiology. 2002, 56(1), 403-432. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- [19] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology. 2007, 102(6), 1437-1449. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [20] JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007, 74(6), 1186-1196. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-007-0860-9
- [21] DOS SANTOS, A., L. OLIVEIRA DALLA VALENTINA, et al. From Obtaining to Degradation of P(3HB): Material Properties. Part I. Ingeniería y Ciencia. 2017, 13(26), 269-298. ISSN 17949165. Dostupné z: doi:10.17230/ingciencia.13.26.10
- [22] WANG, S., W. CHEN, H. XIANG, et al. Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). Polymers. 2016, 8(8), 16-19. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym8080273
- [23] BROCK, T.D., M.T. MADIGAN, J.M. MARTINKO, and J PARKER. Biology of Microorganisms. 9th Edition. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. p. 459
- [24] COHEN-BAZIRE, G. and KUNISAWA, R. "The Fine Structure of Rhodospirillum Rubrum ." Journal of Cell Biology. 1963. Volume 16. p. 401-419.
- [25] GUIDI, Lucia, Massimiliano TATTINI a Marco LANDI. How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light?. JACOB-LOPES, Eduardo, Leila Queiroz ZEPKA a Maria Isabel QUEIROZ, ed. *Chlorophyll* [online]. InTech, 2017, 2017-05-10 [cit. 2022-05-05]. ISBN 978-953-51-3107-6. Dostupné z: doi:10.5772/67887
- [26] MUNK, A. Christine, Alex COPELAND, Susan LUCAS, et al. Complete genome sequence of Rhodospirillum rubrum type strain (S1T). Standards in Genomic Sciences [online]. 2011, 4(3), 293-302 [cit. 2022-05-05]. ISSN 1944-3277. Dostupné z: doi:10.4056/sigs.1804360
- [27] MASTROLEO, F., MONSIEURS, P., and LEYS, N. "*Insight into the radiotolerance of the life support bacterium Rhodospirillum rubrum S1H by means of phenotypic and transcriptomic methods*". COSPAR Scientific Assembly. 2010. p. 4.
- [28] MUNK, A. Christine, Alex COPELAND, Susan LUCAS, et al. Complete genome sequence of Rhodospirillum rubrum type strain (S1T). Standards in Genomic Sciences

- [online]. 2011, 4(3), 293-302 [cit. 2021-5-25]. ISSN 1944-3277. Dostupné z:
doi:10.4056/sigs.1804360
- [29] Keister, D. and Minton, N. “Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. 3. Further studies on energy-linked nicotinamide-adenine dinucleotide reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores.” *Biochemistry*. 1969. Volume 8. p. 167-173
- [30] SCHULTZ, J. E. a P. F. WEAVER. Fermentation and Anaerobic Respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology* [online]. 1982, **149**(1), 181-190 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.149.1.181-190.1982
- [31] HANADA, Satoshi. Anoxygenic Photosynthesis —A Photochemical Reaction That Does Not Contribute to Oxygen Reproduction—. *Microbes and environments* [online]. 2016, **31**(1), 1-3 [cit. 2022-05-05]. ISSN 1342-6311. Dostupné z: doi:10.1264/jsme2.ME3101rh
- [32] GEORGE, Drishya M., Annette S. VINCENT a Hamish R. MACKEY. An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable Resource recovery. *Biotechnology Reports* [online]. 2020, **28** [cit. 2022-05-05]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2020.e00563
- [33] RASMUSSEN, Michelle a Shelley D. MINTEER. Photobioelectrochemistry: Solar Energy Conversion and Biofuel Production with Photosynthetic Catalysts. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2014, **161**(10), H647-H655 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:10.1149/2.0651410jes
- [34] ADESSI, A., and DE PHILIPPIS, R. (2014). “Photosynthesis and hydrogen production in purple non sulfur bacteria: fundamental and applied aspects,” in *Microbial BioEnergy: Hydrogen Production*, eds D. Zannoni and R. Philippis (Netherlands: Springer), 269–290. doi: 10.1007/978-94-017-8554-9
- [35] STEPHENS, Sheida, Radhakrishnan MAHADEVAN a D. Grant ALLEN. Engineering Photosynthetic Bioprocesses for Sustainable Chemical Production: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **8** [cit. 2022-05-06]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.610723
- [36] WANG, Di, Yaoping ZHANG, Edward L. POHLMANN, Jilun LI a Gary P. ROBERTS. The Poor Growth of *Rhodospirillum rubrum* Mutants Lacking RubisCO Is Due to the Accumulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate. *Journal of Bacteriology* [online]. 2011, **193**(13), 3293-3303 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00265-11

- [37] B. MASEPOHL Regulation of nitrogen fixation in photosynthetic purple nonsulfur bacteria, *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes; Metabolism, Bioenergetics, and Omics*, P. C. Hallenbeck Springer New York, New York, NY, 2017, p. 1
- [38] ADESSI A, CONCATO M, SANCHINI A, ROSSI F, DE PHILIPPIS R (2016) Hydrogen production under salt stress conditions by a freshwater *Rhodospseudomonas* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2917–2926
- [39] HIGUCHI-TAKEUCHI, Mieko a Keiji NUMATA. Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2019, 7 [cit. 2022-05-06]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2019.00258
- [40] IVANOVSKY, Ruslan N, Elena N KRASILNIKOVA a Ivan A BERG. A proposed citramalate cycle for acetate assimilation in the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1997, 153(2), 399-404 [cit. 2023-03-17]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12602.x
- [41] DE MEUR, Quentin, Adam DEUTSCHBAUER, Matthias KOCH, Ruddy WATTIEZ, Baptiste LEROY a Robert M. KELLY. Genetic Plasticity and Ethylmalonyl Coenzyme A Pathway during Acetate Assimilation in *Rhodospirillum rubrum* S1H under Photoheterotrophic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2018, 84(3), e02038-17 [cit. 2023-03-15]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02038-17
- [42] BERG, Ivan A, Ludmila V FILATOVA a Ruslan N IVANOVSKY. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2002, 216(1), 49-54 [cit. 2022-03-29]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11413.x
- [43] ERB, Tobias J., Janos RÉTEY, Georg FUCHS a Birgit E. ALBER. Ethylmalonyl-CoA Mutase from *Rhodobacter sphaeroides* Defines a New Subclade of Coenzyme B12-dependent Acyl-CoA Mutases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, 283(47), 32283-32293 [cit. 2023-03-15]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M805527200
- [44] BAYON-VICENTE, Guillaume, Elie MARCHAND, Jeson DUCROTOIS, François E. DUFRASNE, Regis HALLEZ, Ruddy WATTIEZ a Baptiste LEROY. Analysis of the Involvement of the Isoleucine Biosynthesis Pathway in Photoheterotrophic Metabolism

- of *Rhodospirillum rubrum*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, 12 [cit. 2022-04-27]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.731976
- [45] DE MEUR, Quentin, Adam DEUTSCHBAUER, Matthias KOCH, Guillaume BAYON-VICENTE, Paloma CABECAS SEGURA, Ruddy WATTIEZ a Baptiste LEROY. New perspectives on butyrate assimilation in *Rhodospirillum rubrum* SIH under photoheterotrophic conditions. *BMC Microbiology* [online]. 2020, 20(1) [cit. 2022-04-27]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-020-01814-7
- [46] CABECAS SEGURA, Paloma, Rob ONDERWATER, Adam DEUTSCHBAUER, Laurent DEWASME, Ruddy WATTIEZ, Baptiste LEROY a Arpita BOSE. Study of the Production of Poly(Hydroxybutyrate- co -Hydroxyhexanoate) and Poly(Hydroxybutyrate- co -Hydroxyvalerate- co- Hydroxyhexanoate) in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2022, 88(6), e01586-21 [cit. 2022-05-02]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.01586-21
- [47] Yoshizumi, T., Yamada, M., Higuchi-Takeuchi, M., Matsumoto, K., Taguchi, S., Matsui, M., et al. (2017). Sucrose supplementation suppressed the growth inhibition in polyhydroxyalkanoate-producing plants. *Plant Biotechnol.* 34, 39–43. doi: 10.5511/plantbiotechnology.16.1121a
- [48] Yuan, W., Jia, Y., Tian, J., Snell, K. D., Muh, U., Sinskey, A. J., et al. (2001). Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 87–98. doi: 10.1006/abbi.2001.2522
- [49] HEINRICH, Daniel, Matthias RABERG, Philipp FRICKE, et al. Synthesis Gas (Syngas)-Derived Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Engineered *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2016, 82(20), 6132-6140 [cit. 2023-03-04]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01744-1
- [50] HIGUCHI-TAKEUCHI, Mieko, Kumiko MORISAKI, Kiminori TOYOOKA, Keiji NUMATA a Guo-Qiang CHEN. Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(8) [cit. 2023-03-04]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0160981
- [51] BAYON-VICENTE, Guillaume, Sarah ZARBO, Adam DEUTSCHBAUER, Ruddy WATTIEZ, Baptiste LEROY a Haruyuki ATOMI. Photoheterotrophic Assimilation of Valerate and Associated Polyhydroxyalkanoate Production by *Rhodospirillum*

- rubrum. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2020, **86**(18), e00901-20 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00901-20
- [52] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. [52] cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, 36(3), 856-870 [cit. 2022-11-03]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [53] SLANINOVA, E., SEDLACEK, P., MRAVEC, F. et al. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 1923–1931 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>
- [54] KOLLER, M. (2020). *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates: Kinetics, Bioengineering, and Industrial Aspects* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429296635>
- [55] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Martin KOLLER, Jana NEBESAROVA, Ivana MAROVA, Vladislav KRZYZANEK a Stanislav OBRUCA. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* [online]. 2019, 49, 129-136 [cit. 2020-12-30]. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://doi:10.1016/j.nbt.2018.10.005>
- [56] WOOD, Janet M. Bacterial responses to osmotic challenges. *Journal of General Physiology* [online]. 2015, 145(5), 381-388 [cit. 2020-12-30]. ISSN 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.201411296
- [57] BREMER, Erhard a Reinhard KRÄMER. Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2019, **73**(1), 313-334 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-020518-115504
- [58] OBRUCA S, SEDLACEK P, MRAVEC F, et al. (2016a) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(3):1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7162-4>
- [59] ALVES LPS, SANTANA-FILHO AP, SASSAKI GL et al. 3-Hydroxybutyrate derived from poly-3-hydroxybutyrate mobilization alleviates protein aggregation in heat-stressed *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. *Appl Environ Microbiol* 2020; 86:e01265–20.
- [60] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK, et al. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLOS ONE*

- [online]. 2016, **11**(6) [cit. 2022-05-11]. ISSN 1932-6203. Dostupné z:
doi:10.1371/journal.pone.0157778
- [61] TANGHE, AN, PATRICK VAN DIJCK a JOHAN M. THEVELEIN. Determinants of Freeze Tolerance in Microorganisms, Physiological Importance, and Biotechnological Applications. LASKIN, Allen, Joan BENNETT a Geoffrey GADD. *Advances in Applied Microbiology*. © Academic Press, 2003, s. 129-161. ISBN 9780080544045
- [62] HUBALEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003;46: 205–229. pmid:12818211
- [63] PAVEZ, P., J. L. CASTILLO, C. GONZÁLEZ a Miguel MARTÍNEZ. Poly-β-Hydroxyalkanoate Exert a Protective Effect Against Carbon Starvation and Frozen Conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current Microbiology* [online]. 2009, **59**(6), 636-640 [cit. 2022-11-05]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-009-9485-9
- [64] IGIRI, Bernard E., Stanley I. R. OKODUWA, Grace O. IDOKO, Ebere P. AKABUOGU, Abraham O. ADEYI a Ibe K. EJIOGU. Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicology* [online]. 2018, 2018, 1-16 [cit. 2023-03-17]. ISSN 1687-8191. Dostupné z: doi:10.1155/2018/2568038
- [65] CHIEN, Chih-Ching, Li-Jung WANG a Wei-Ran LIN. Polyhydroxybutyrate accumulation by a cadmium-resistant strain of *Cupriavidus taiwanensis*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2014, **45**(4), 1164-1169 [cit. 2020-12-29]. ISSN 18761070. Dostupné z: <http://10.1016/j.jtice.2014.02.004>
- [66] KAMNEV, Alexander A., Anna V. TUGAROVA, Petros A. TARANTILIS, Philip H.E. GARDINER a Moschos G. POLISSIOU. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effects of copper(II). *Applied Soil Ecology* [online]. 2012, **61**, 213-216 [cit. 2022-11-05]. ISSN 09291393. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.020
- [67] FASNACHT, Michel a Norbert POLACEK. Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2021, **8** [cit. 2023-03-17]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2021.671037
- [68] BATISTA, Marcelo B., Cícero S. TEIXEIRA, Michelle Z. T. SFEIR, et al. P(3HB) Biosynthesis Counteracts Redox Stress in *Herbaspirillum seropedicae*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, **9** [cit. 2022-11-05]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.00472

- [69] WIGHTMAN, Raymond. An Overview of Cryo-Scanning Electron Microscopy Techniques for Plant Imaging. *Plants* [online]. 2022, 11(9) [cit. 2023-05-04]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11091113
- [70] SOUSA, Alioscka A. a Richard D. LEAPMAN. Development and application of STEM for the biological sciences. *Ultramicroscopy* [online]. 2012, **123**, 38-49 [cit. 2023-03-25]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultramic.2012.04.005
- [71] COLLIEX, Christian a Claudie MORY. Scanning transmission electron microscopy of biological structures. *Biology of the Cell* [online]. 1994, **80**(2-3), 175-180 [cit. 2023-03-25]. ISSN 02484900. Dostupné z: doi:10.1111/j.1768-322X.1994.tb00928.x
- [72] WOLF, Sharon Grayer, Eyal SHIMONI, Michael ELBAUM a Lothar HOUBEN. STEM Tomography in Biology. In: *Cellular Imaging*; 2018, s. 33-60 [cit. 2023-03-25] ISBN 978331968995.
- [73] EGERTON, R.F. Radiation damage to organic and inorganic specimens in the TEM. *Micron* [online]. 2019, **119**, 72-87 [cit. 2023-03-25]. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2019.01.005
- [74] HETTLER, Simon, Manuel DRIES, Peter HERMANN, Martin OBERMAIR, Dagmar GERTHSEN a Marek MALAC. Carbon contamination in scanning transmission electron microscopy and its impact on phase-plate applications. *Micron* [online]. 2017, **96**, 38-47 [cit. 2023-03-25]. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2017.02.002
- [75] ZAVŘEL, Tomáš, Maria A. SINETOVA a Jan ČERVENÝ, 2015. Measurement of Chlorophyll a and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria. *Bio-protocol* [online]. 5(9) [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.21769/BioProtoc.1467. Dostupné z: <https://bioprotocol.org/pdf/Bio-protocol1467.pdf>
- [76] NAMSARAEV, Z. B. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Microbiology* [online]. 2009, **78**(6), 794-797 [cit. 2023-04-06]. ISSN 0026-2617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261709060174
- [77] GODOY, M.S., DE MIGUEL, S.R. & PRIETO, M.A. Aerobic-anaerobic transition boosts poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in *Rhodospirillum rubrum*: the key role of carbon dioxide. *Microb Cell Fact* 22, 47 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02045-x>
- [78] VAN DER REST, Michel a Gabriel GINGRAS. The Pigment Complement of the Photosynthetic Reaction Center Isolated from *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1974, 249(20), 6446-6453 [cit. 2023-05-04]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)42177-7

- [79] NOVACKOVA, Ivana, Vendula HRABALOVA, Eva SLANINOVA, et al. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2022, 206, 977-989 [cit. 2023-04-12]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102
- [80] WONG, Man-Tak, Fea Mein TAN, Wun Jern NG a Wen-Tso LIU. Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic–aerobic activated sludge processes. *Microbiology* [online]. 2004, 150(11), 3741-3748 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.27291-0
- [81] KONG, Yunhong, Say Leong ONG, Wun Jun NG a Wen-Tso LIU. Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacterial group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Environmental Microbiology* [online]. 2002, 4(11), 753-757 [cit. 2023-04-23]. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00357.x

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3HB – 3-hydroxybutyrát

3HV – 3-hydroxyvalerát

4HB – 4-hydroxyvalerát

AFB – anoxygenní fototrofní bakterie

ATP – adenosintrifosfát

AV ČR – Akademie věd České republiky

BChl – bakteriochlorofyl

BPh – bakteriofytin

CBB – Calvin-Benson-Basshamův cyklus

CO₂ – oxid uhličitý

cPHB – konjugovaný polyhydroxybutyrát

Cyt bc₁ – cytochromový komplex bc₁

Cyt c₂ – cytochrom c₂

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EBPR – enhanced biological phosphorus removal;

EMC – ethylmalonyl-CoA dráha

GAO – glykogen akumulující organismy

GC-FID – plynová chromatografie s plamenoionizačním detektorem

GSB – zelené sírné bakterie

H₂O₂ – hydroxid vodíku

ICM – specializované intracelulární membrány

lcl-PHA – PHA s dlouhým řetězcem

mcl-PHA – PHA se středním řetězcem

MOPS – kyselina 4-morfolinopropansulfonová

NAD⁺/NADH – nikotinamidadeninukleotid

O²⁻ – superoxid

OsO₄ – oxid osmičelý

P(3HB) – poly-3-hydroxybutyrát

P(3HB-*co*-4HB) - poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát)

P(3HB-*co*-3HV) – poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát)

P(4HB) – poly-4-hydroxybutyrát

PHB – polyhydroxybutyrát

PHA – polyhydroxyalkanoáty

PP – polypropylén

QA – ubichininový akceptor

QB – ubichininový akceptor

QP – ubichininový pool

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní forma kyslíku

scl-PHA – PHA s krátkým řetězcem

TCA – cyklus trikarboxylových kyselin

TFO – tetrádyformující organismy

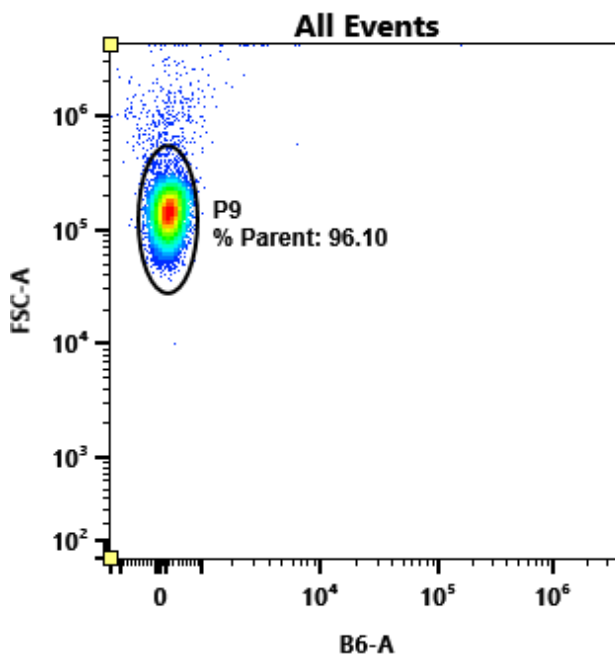
UV – ultrafialové záření

UV-VIS spektrum – ultrafialové – viditelné spektrum

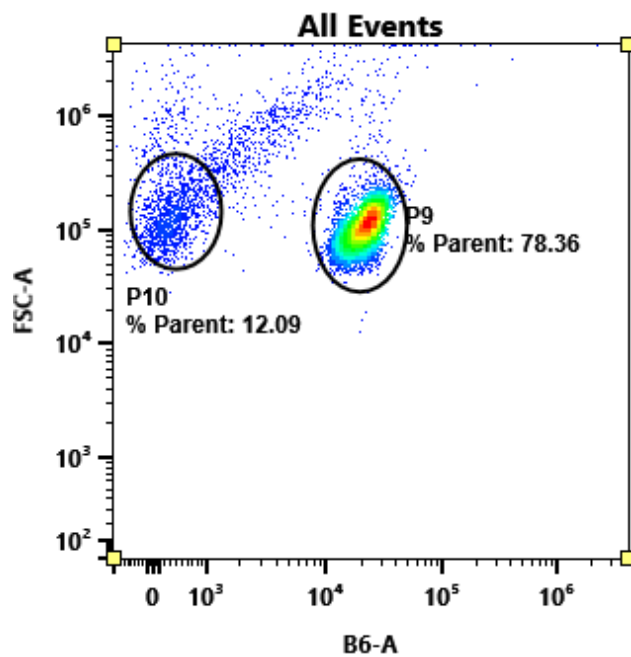
VFA – těkavé mastné kyseliny

PŘÍLOHY

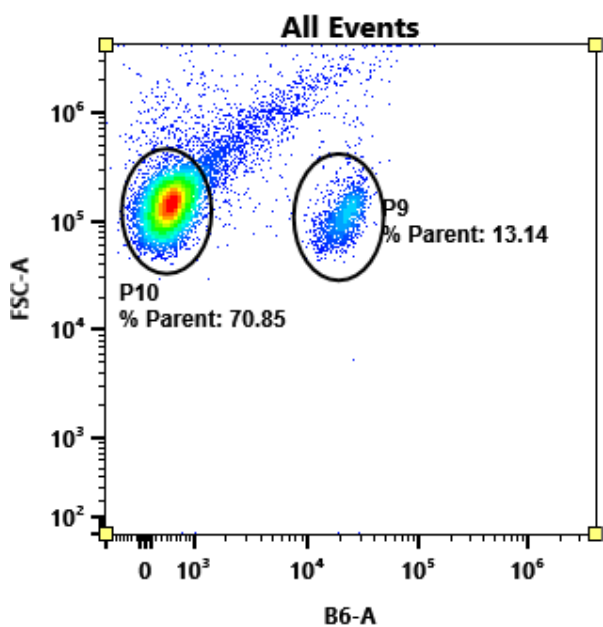
Optimalizace průtokové cytometrie



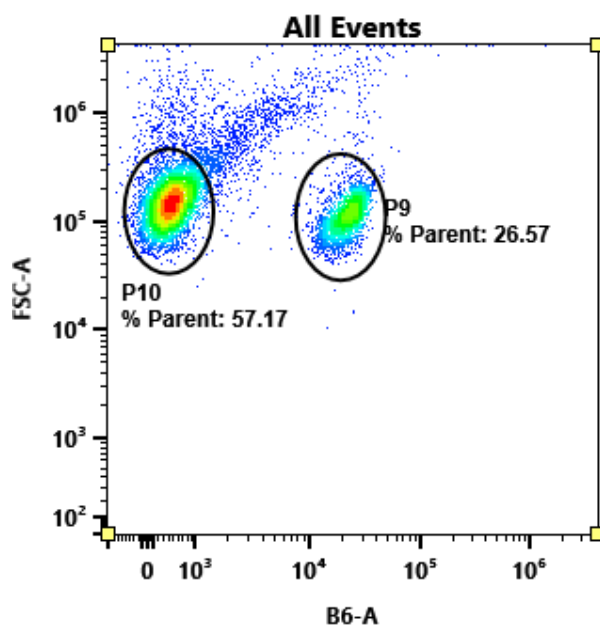
Obrázek 31 – živé buňky (*R. rubrum*)



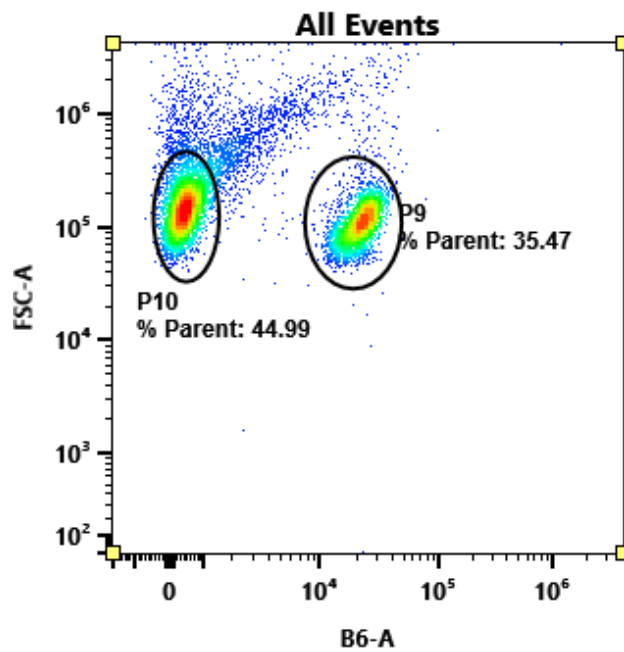
Obrázek 32 – Mrtvé buňky (*R. rubrum*, 80 °C)



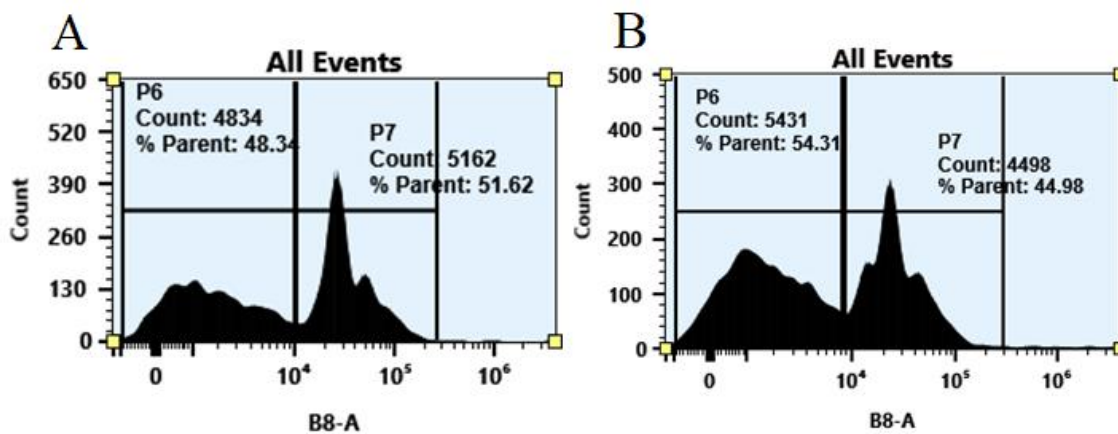
Obrázek 33 – 4:1 (živé : mrtvé; *R. rubrum*)



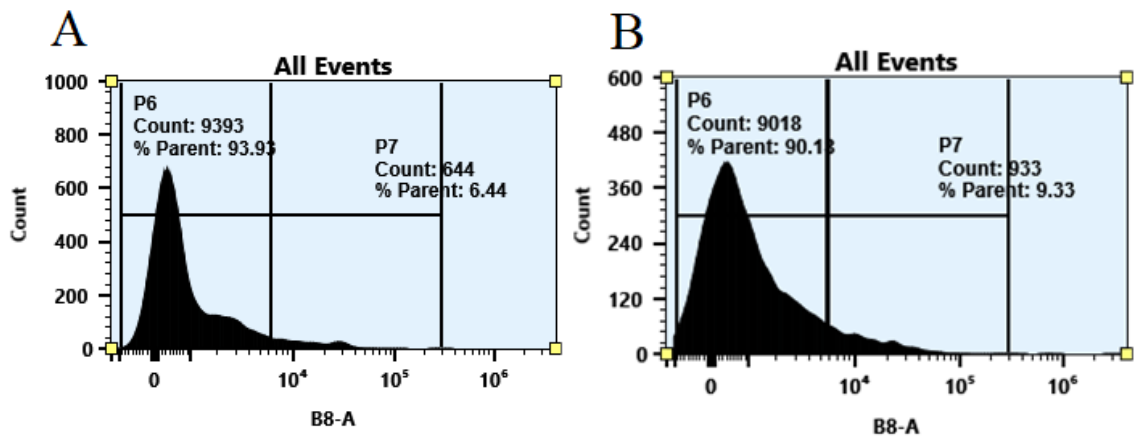
Obrázek 34 – 1:1 (živé : mrtvé; *R. rubrum*)



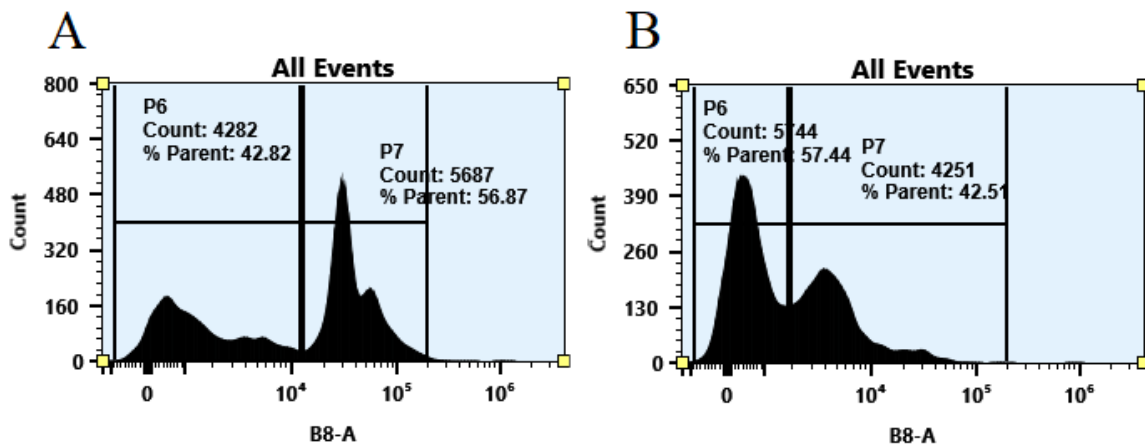
Obrázek 35 – 1:4 (živé : mrtvé; *R. rubrum*)



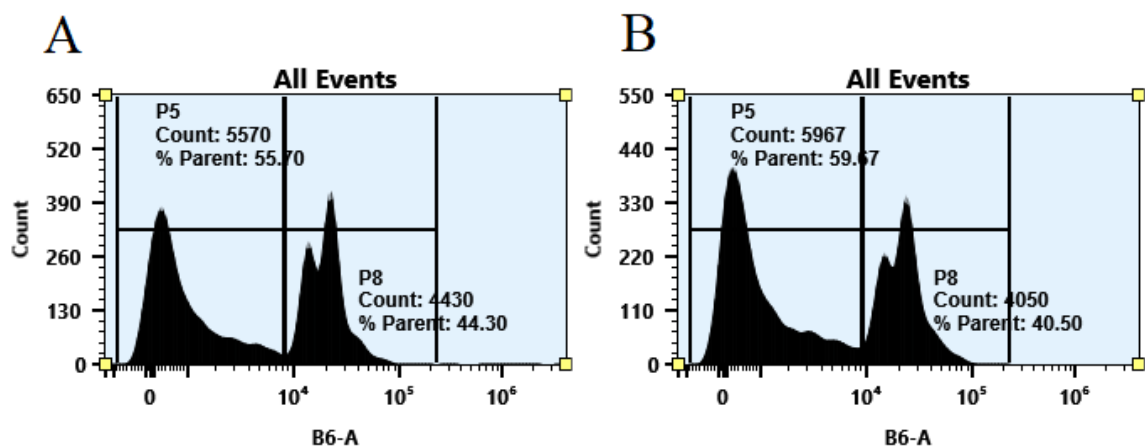
Obrázek 36 – *R. rubrum* (A) a *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ (48 h, 100mM acetát) po vystavení 80 °C po dobu 60min



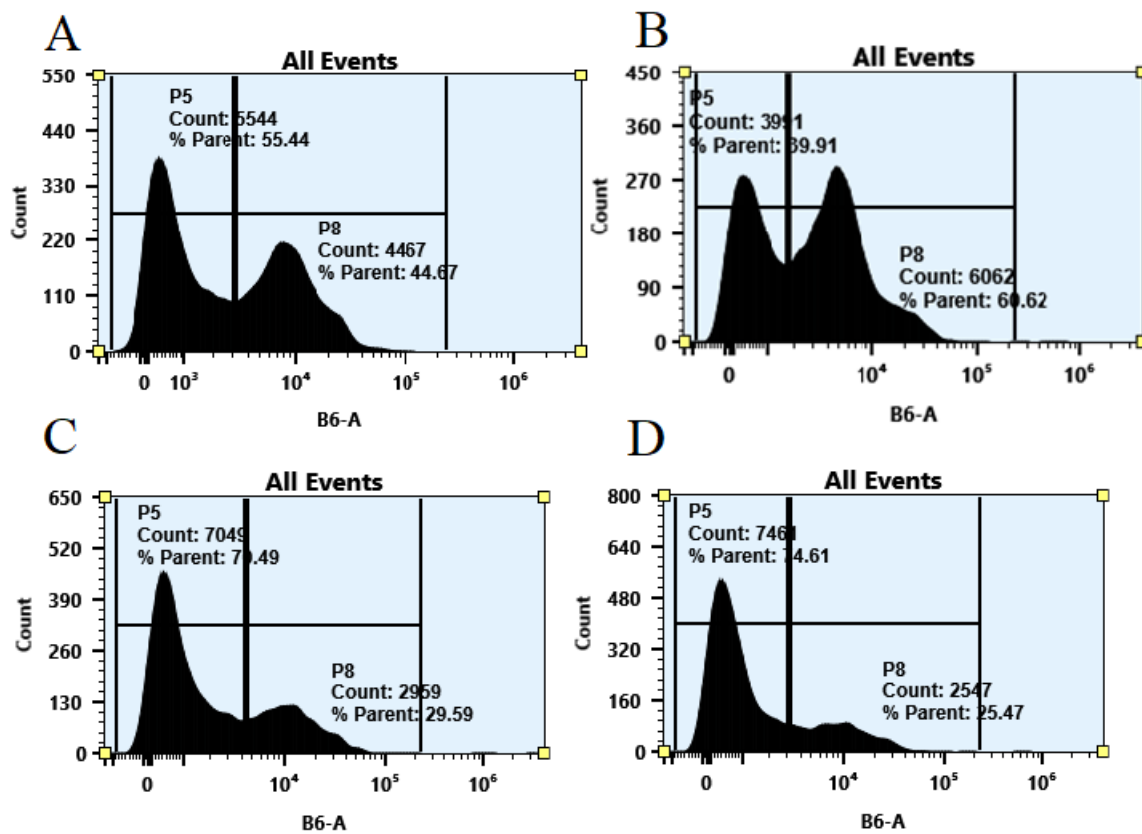
Obrázek 37 – *R. rubrum* (A) a *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ (48 h + 100mM acetát) po vystavení 4. mrazicímu cyklu



Obrázek 38 – *R. rubrum* (A) a *R. rubrum* $\Delta phac1c2$ (72 h + 200mM acetát) po vystavení 4. mrazicímu cyklu



Obrázek 39 – *R. rubrum* (120h FAY) po vystavení 80 °C po dobu 60 min (A) a 4. mrazicímu cyklu (B)



Obrázek 40 – *R. rubrum* (A) a *R. rubrum* Δ phac1c2 (B), 120 h, FAY po expozici 4. cyklům zamrazení a rozmrazení a *R. rubrum* (C) a *R. rubrum* Δ phac1c2 (D), po expozici 200 g/l NaCl