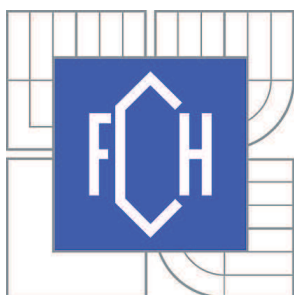


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM ZAPOJENÍ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ DO STRESOVÉ ODPOVĚDI MIKROORGANISMŮ

INVOLVEMENT OF POLYHYDROXYALKANOATES INTO STRESS RESPONSE OF BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

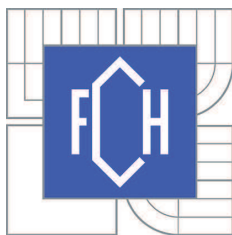
DAN KUČERA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0733/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Dan Kučera	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název bakalářské práce:

Studium zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na téma stanovení viability bakterií s využitím moderních technik
2. Rešerše na téma zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi mikroorganismů
3. Experimentální část: posouzení vlivu schopnosti akumulovat PHA na odolnost bakterií vůči vybraným stresovým faktorům

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Dan Kučera
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Cílem práce bylo studium zapojení polyhydroxyalkanoátů (PHA) do stresové odpovědi bakterií. Teoretická část bakalářské práce se zabývá možností stanovení viability mikroorganismů s využitím moderních technik, především průtokové cytometrie. Dále pak byla zpracována rešerše zaměřená na vybrané stresové faktory a zapojení PHA do stresové odpovědi. V experimentální části práce byla posuzována stresová odpověď v souvislosti se schopností akumulovat PHA. Tomuto experimentu posloužila bakterie *Cupriavidus necator*. Schopnost akumulace PHA v pozdější fázi růstové křivky navyšuje odolnost vůči ethanolu, vysoké teplotě a mražení. Naopak nižší odolnost jeví kmen produkující PHA při působení anorganickými kyselinami a zásadami. Důvodem může být odlišná morfologie PHA produkujících buněk. Dílčím cílem bylo i studium možnosti barvení živých buněk akumulujících PHA pomocí Nilské červeně. Studium ukázalo, že barvivo penetruje do živých buněk při teplotě zvýšené na 40-45 °C. Tato teplota není pro buňky letální a intenzita barvení je dostatečná k odlišení PHA produkujících buněk pomocí průtokové cytometrie, což může mít využití při selekci průmyslových producentů PHA.

Abstract

The aim of this work was to study the involvement of polyhydroxyalkanoates (PHA) into stress response of bacteria. The theoretical part of the thesis deals with the possibility of establishing the viability of microorganisms using modern techniques, in particular flow cytometry. Furthermore, the research focused on selected stress factors and PHA involvement in stress response was described. In the experimental part of the work the stress response with regard to the ability to accumulate PHA was assessed. Bacteria *Cupriavidus necator* was used for the experiment. Its ability to accumulate PHA at a later stage of growth increased resistance to ethanol, high temperature and freezing. Conversely, the PHA-producing strain showed lower resistance to the action of inorganic acids and bases. This may be caused by different morphology of PHA-producing cells. One of partial objectives was also to study the possibilities of staining of living cells accumulating PHA using Nile red. The research proved that the dye penetrates into living cells at elevated temperature of 40-45°C. This temperature is not lethal to the cells and the intensity of staining is sufficient to distinguish PHA-producing cells using flow cytometry; that can be applied in the selection of industrial PHA producers.

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4, stresová odpověď bakterií, viabilita, průtoková cytometrie

Keywords

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

KUČERA, D. *Studium zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 54 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mojí bakalářské práce Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení a za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Určitě bych také rád poděkoval doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za vstřícný přístup a cenné rady. Dále bych chtěl poděkovat všem, co se mnou pracovali ve stejné laboratoři za to, že se s nimi vždy dalo hovořit při dlouhých dnech strávených měřeními, a za pomoc při obsluze některých přístrojů. V neposlední řadě bych také rád poděkoval své rodině a přátelům za podporu.

Práce byla podpořena z prostředků projektu "Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně" registrovaného pod číslem CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

OBSAH

OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Viabilita	8
2.2 Stanovení viability bakterií.....	8
2.3 Přístroje založené na měření fluorescence	8
2.4 Průtoková cytometrie.....	9
2.4.1 Princip průtokové cytometrie.....	9
2.4.1.1 Fluidní systém.....	9
2.4.1.2 Optika a detekce	10
2.4.1.3 Zpracování signálu	12
2.4.1.4 Elektostatické třídění (sorting) buněk.....	12
2.5 Fluorescenční mikroskopie.....	13
2.5.1 Základní součásti fluorescenčního mikroskopu.....	14
2.6 Stresová odpověď	14
2.7 Přehled specifických stresových faktorů	16
2.7.1 Teplotní stres.....	16
2.7.2 Stres buněčné stěny	17
2.7.3 Osmotický stres.....	18
2.7.4 Reaktivní formy kyslíku a dusíku	19
2.7.5 Ethanolový stres	19
2.8 PHA a stresová odpověď bakterií.....	20
2.8.1 Polyhydroxyalkanoáty – struktura a vlastnosti	20
2.8.2 Zapojení PHA do stresové odpovědi	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Použité bakterie, chemikálie, materiál a přístroje	23
3.1.1 Použité bakterie.....	23
3.1.2 Chemikálie pro kultivaci.....	23
3.1.3 Ostatní chemikálie	23
3.1.4 Přístrojové vybavení	23
3.2 Oživování bakteriálních kultur	24
3.3 Kultivace bakterií	24
3.4 Stanovení biomasy.....	25
3.5 Stanovení obsahu PHA v biomase	25
3.6 Porovnání produkce PHA u různých druhů bakterií	26
3.7 Barvení živých buněk <i>Cupriavidus necator</i> H16 pomocí Nilské červeně	26
3.7.1 Intenzita barvení.....	26
3.7.2 Stanovení viability průtokovým cytometrem.....	27
3.7.3 Stanovení viability plotnovou metodou	27
3.8 Pozorování granulí PHA.....	28
3.9 Stanovení viability.....	28

3.9.1	Optimalizace metody	29
3.9.2	Viabilita po působení stresových faktorů	29
3.9.2.1	Ethanolový stres	29
3.9.2.2	Teplotní šok	29
3.9.2.3	Stresový faktor – změna pH	30
3.9.2.4	Stresový faktor – zmražení	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	Porovnání produkce PHA u různých druhů bakterií	31
4.1.1	Obsah biomasy	31
4.1.2	Barvení fixovaných preparátů	32
4.1.3	Pozorování pod fluorescenčním mikroskopem	32
4.2	Stanovení biomasy v průběhu kultivace	34
4.3	Stanovení PHA v biomase	35
4.4	Barvení živých buněk <i>Cupriavidus necator</i> H16 pomocí Nilské červeně	35
4.4.1	Intenzita barvení	35
4.4.2	Stanovení viability průtokovým cytometrem	39
4.4.3	Stanovení viability plotnovou metodou	39
4.5	Pozorování granulí PHA pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu	40
4.6	Stanovování viability průtokovou cytometrií	42
4.6.1	Ethanolový stres	44
4.6.2	Teplotní šok	45
4.6.3	Stresový faktor – změna pH	46
4.6.4	Stresový faktor – zmražení	48
5	ZÁVĚR	50
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52

1 ÚVOD

Stres je funkční stav živého organismu, kdy je tento organismus vystaven mimořádným podmínkám. Aby mikroorganismus přežil i přes nepříznivé a proměnné podmínky musí umět rozpoznat různé změny prostředí a vhodně na ně zareagovat. Cílem stresové odpovědi je zachování homeostáze a zabránění poškození nebo smrti organismu. Mikroorganismy často reagují současně na celou řadu stresů a různé systémy stresových odpovědí spolu vzájemně interagují a tvoří komplex regulačních sítí. Tyto regulační systémy řídí expresi dalších efektorů, které udržují stabilitu buněčné rovnováhy za různých podmínek. Nejčastějšími efektorů zprostředkovávající odpověď na stres jsou sigma faktory, což jsou podjednotky DNA-dependentních RNA-polymeráz. Umožňují iniciaci transkripce a výběr promotoru.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou zásobním zdrojem uhlíku a jsou akumulovány ve většině bakteriích při nevyrovnaných podmínkách růstu. Akumulace a následná degradace PHA usnadňuje bakteriím schopnost přežít, zvyšuje toleranci vůči stresu a zlepšuje kondici při měnících se podmínkách. Cílem práce bylo posoudit vliv schopnosti akumulovat PHA bakterií na odolnost vůči ethanolu, mrazu, změně pH a zvýšení teploty nad letální teplotu. Viabilita bakterií byla stanovována moderní technikou pomocí průtokového cytometru, která umožňuje analyzovat jednotlivé buňky a pomocí fluorescenčních sond rozlišit buňky podle různých vlastností.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Viabilita

Viabilita je výraz používaný k vyjádření schopnosti buněk růst, reprodukovat se a interagovat se svým bezprostředním okolím. Obecně je chápána jako „poměr“ mezi živými a mrtvými buňkami. Oproti tomu termín vitalita označuje „míru“ aktivity buněk, výkonnost při fermentaci či schopnost kvasinek vyrovnat se a případně regenerovat, po působení stresových faktorů. [1]

Definice a detekce bakteriální životaschopnosti byla hlavním problémem v mikrobiologické cytometrii už od prvního dokumentu o syntéze bílkovin a nukleových kyselin v jednotlivých mikroorganismech [2]. Bakteriální viabilita byla donedávna definována schopností bakterií růst na kultivačních médiích v definovaných *in vitro* podmínkách. Odhaduje se však, že jen necelá 2 % všech bakteriálních druhů jsou schopna na pevných médiích aktivně růst a tvořit zřetelné kolonie. [3]

2.2 Stanovení viability bakterií

Nejčastější a zároveň i tradiční technikou stanovení životaschopnosti je tradiční kultivace mikroorganismů na pevných médiích. Hodnocení bakteriální životaschopnosti a identifikace bakterií klasickými mikrobiologickými metodami vždy mělo hlavní nevýhodu, závislost mnoha cyklů buněčného dělení na získaný výsledek. Pro stresované, zraněné nebo organismy s velkými nároky na prostředí, může být obtížné nebo nemožné najít správné růstové podmínky, které mohou zahrnovat simulaci symbiotické interakce a růst může být velmi pomalý [4]. Velmi významným omezením klasických metod je časová náročnost, která neumožňuje dostatečně rychlou odezvu na získaný výsledek. [5]

Proto byly vyvinuty alternativní postupy stanovení viability, mezi něž mimo jiné patří právě fluorescenční analýza. Stanovení viability buněk je založeno na detekci životně důležitých funkcí, které jsou sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami [5]. Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. [6]

2.3 Přístroje založené na měření fluorescence

Ke sledování značených buněk je tradičně využíván fluorescenční mikroskop, který poskytuje náhled na jednotlivé buňky, počet analyzovaných částic za určitou dobu je však omezený a i s využitím analyzátorů obrazu mnohdy pracný. Fluorimetry naopak mohou měřit velký počet buněk, ale neumožňují pohled na vlastnosti konkrétní buňky. K velkému rozvoji fluorescenčního značení tak vedlo především rozšíření průtokové cytometrie, která umožňuje analýzu jednotlivých buněk rychlostí až 100 000 částic za sekundu. [5]

Přestože většina aplikací průtokové cytometrie se zaměřuje na výzkum lidských, živočišných a rostlinných buněk, tak se v posledním desetiletí průtoková cytometrie těší stále většímu zájmu mikrobiologů, kde je aplikována zejména ve výzkumu kvasinek. [7] Využití průtokové cytometrie v aplikované mikrobiologii má zřetelně stoupající tendenci. V databázi *Web of Science* byla provedena bibliometrická analýza. Ukázalo se, že od roku 1987 mikrobiální průtoková cytometrie vykazuje stabilní růst a v roce 2009 se jí zabývalo 8 % z celkového počtu článků se týkajících se průtokové cytometrie. [8]

2.4 Průtoková cytometrie

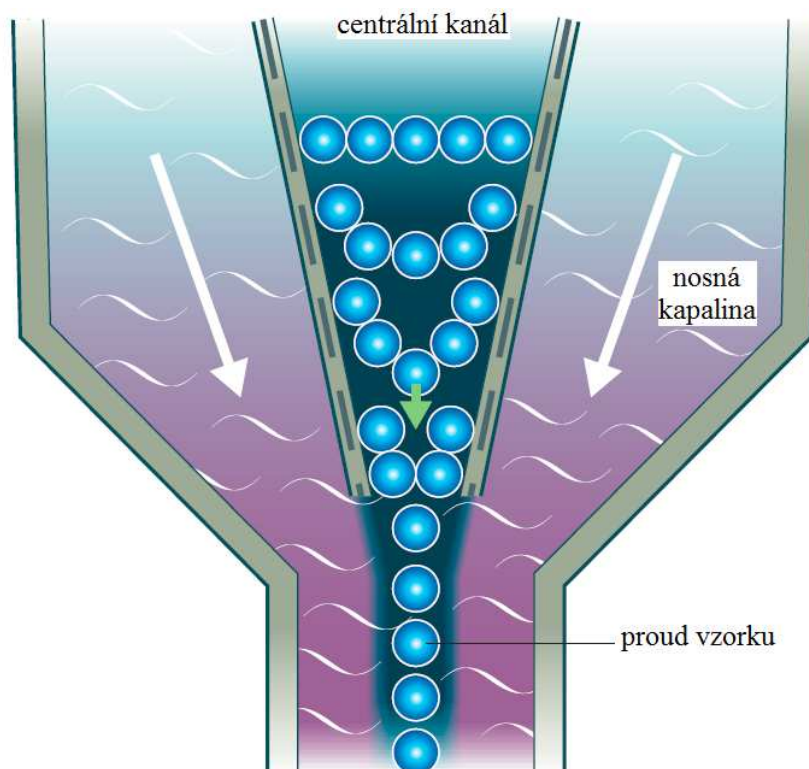
Průtokový cytometr je integrovaný systém využívající principů mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Buňky jsou unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde jsou analyzovány. Nejjednodušší průtokové cytometry detekují částice na základě tzv. Coulterova principu, kdy je průchod částice (buňky) měrnou celou zaznamenán jako změna elektrické vodivosti nebo rezistivity. Velikost změny je úměrná objemu procházející částice, a je tedy využívána také ke stanovení jejich velikosti. [9]

Jinou možností je měření světelného signálu, kdy je při průchodu částice paprskem světla analyzováno kvantum fotonů dopadajících na fotodetektor zařazený jednak ve směru původního paprsku a dále pod úhlem 90° . [9]

2.4.1 Princip průtokové cytometrie

2.4.1.1 Fluidní systém

Jednou ze základních možností v průtokové cytometrii je měřit vlastnosti jednotlivých částic. Je-li vzorek v roztoku aplikován do průtokového cytometru, jsou částice náhodně rozděleny v trojrozměrném prostoru. Vzorek musí být proto seřazen do proudu jednotlivých částic, které mohou být vyšetřovány detekčním systémem stroje. Tento proces je řízen fluidním systémem. Fluidní systém se skládá z centrálního jádra, kterým je vstřikován vzorek. Centrální jádro je ohraničeno vnějším pláštěm, kterým nosná kapalina proudí rychleji. Jak se pohybuje nosná kapalina, tak se vytváří masivní tažný efekt na zužující se centrální komoru. To mění rychlost toku centrální kapaliny, jejíž přední tok se stává parabolický s největší rychlostí v jeho středu a nulovou rychlostí u stěn kapiláry. Výsledkem je jeden soubor částic nazývaný hydrodynamická fokusace (Obrázek 1). Za optimálních podmínek (laminární proudění) se tekutina v centrální komoře nemíchá s nosnou kapalinou. [10]



Obrázek 1: Hydrodynamická fokusace [10]

2.4.1.2 Optika a detekce

Po hydrodynamickém zafokusování prochází každá částice jedním nebo více paprsky světla. Rozptyl světla nebo fluorescenční emise (pokud je částice označena fluorescenční sondou) poskytuje informace o vlastnosti částice. Nejčastěji používané světelné zdroje jsou v moderní průtokové cytometrii lasery a diody. [9]

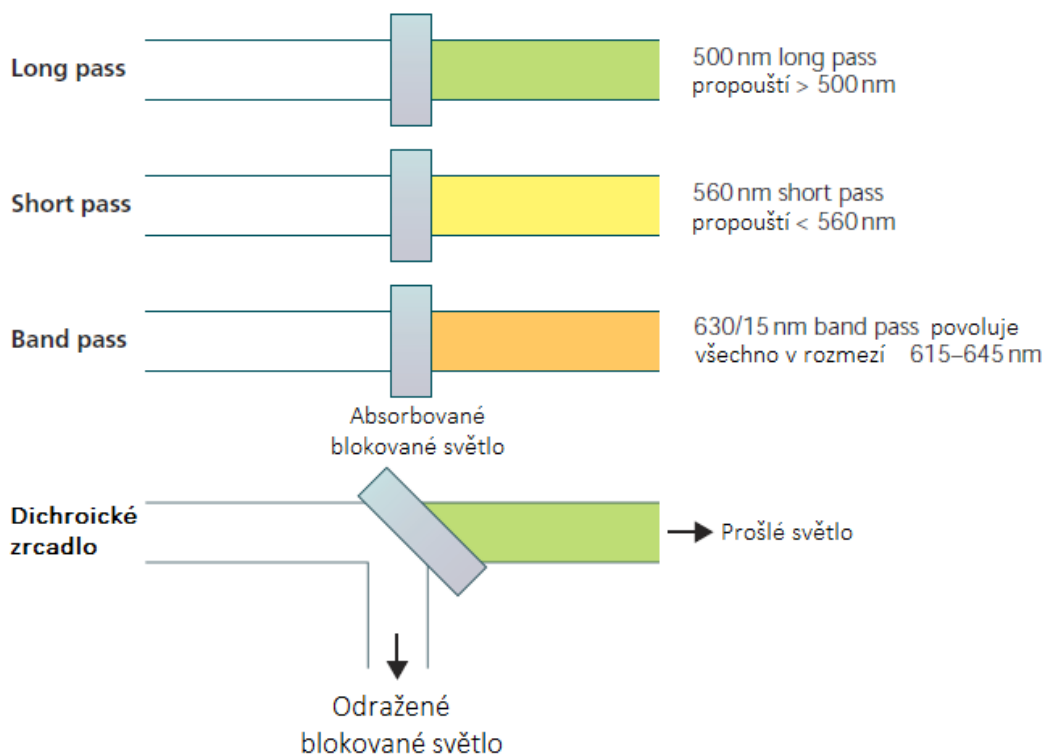
Lasery produkují světlo jedné vlnové délky (laserový paprsek) na jedné nebo více diskretních frekvencích (koherentní světlo). Diody jsou obvykle méně nákladné než lasery a využívají barevné emise zapálených plynů v uzavřené trubici. To však vytváří nestabilní a nekoherentní světlo směsi vlnových délek, které musí být následně opticky filtrováno. [9]

Světlo, které je rozptýlené ve směru dopředu, obvykle s až 20° odklonem od osy laserového paprsku, je sbíráno objektivem známým jako „forward scatter channel“ (přední rozptylový kanál - FSC). Intenzita FSC přibližně odpovídá velikosti částice a může být také použita pro rozlišení buněk od abiotických nečistot. Světlo měřené přibližně na úhlu 90° od excitační linie se nazývá boční rozptyl. „Side scatter channel“ (SSC) poskytuje informace o granulovém obsahu v rámci částice. Oba kanály FSC a SSC jsou jedinečné pro každou částici, a jejich kombinace, mohou být proto použity k rozlišení různých typů buněk v heterogenním vzorku. [7][10]

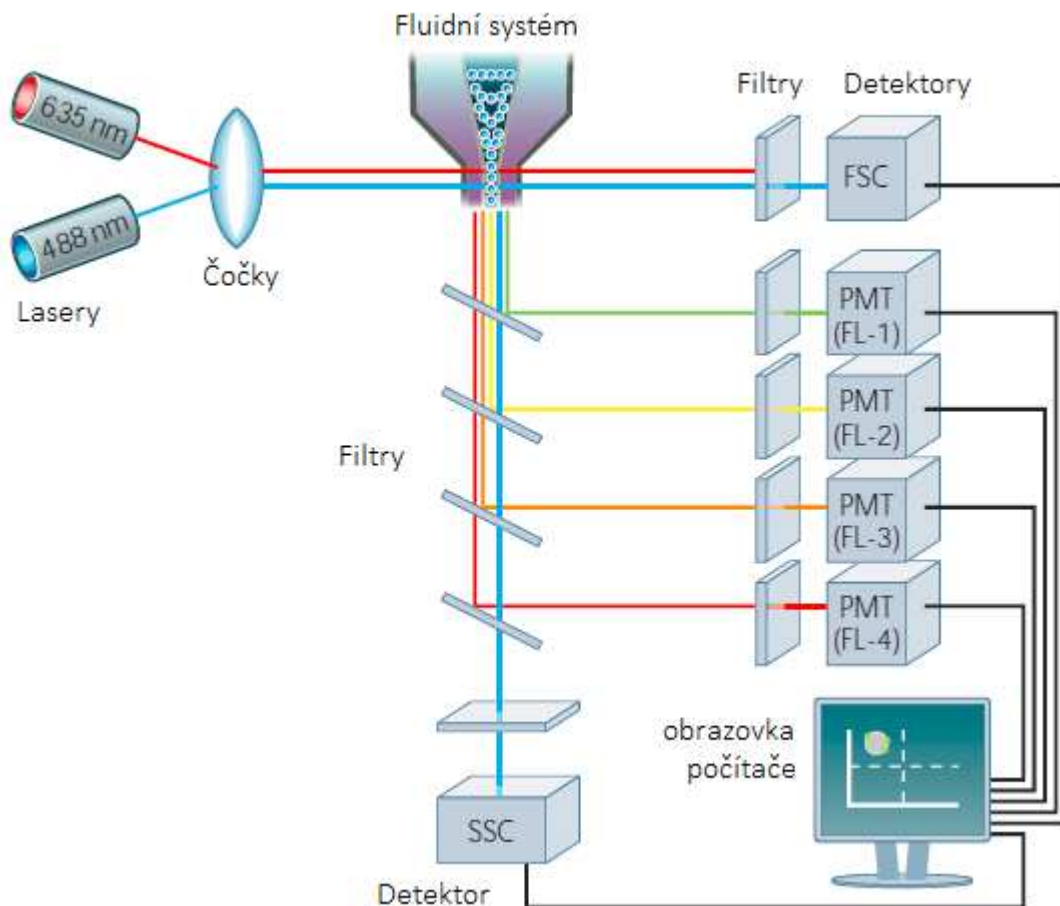
Fluorescenční měření prováděná na různých vlnových délkách mohou poskytnout kvantitativní a kvalitativní údaje o fluorochromem značeném receptoru na povrchu buněk nebo intracelulárních molekulách, jako jsou například DNA nebo cytokiny. Průtokové cytometry používají separované fluorescenční (FL-) kanály pro detekci emitovaného záření. Počet snímačů se mění v závislosti na přístroji. Jako detektory se používají buď křemíkové fotodiody nebo fotonásobiče (PMT). Křemíkové fotodiody se obvykle používají k měření

FSC, když je signál silný. Fotonásobiče jsou citlivější zařízení a jsou ideální pro boční rozptyl a zaznamenání fluorescence. [10]

Specifičnost detekce je řízena optickými filtry, které blokují určité vlnové délky, zatímco propouštějí ostatní. Existují tři hlavní typy filtrů. "Long pass" filtry umožňující prostřednictvím světla nad cut-off vlnové délce, "short pass" povoluje světlo pod cut-off vlnovou délkou a "band pass" propouštějí světlo v určeném úzkém rozsahu vlnových délek (nazývaném "band width"). Všechny tyto filtry blokují světlo absorpcí. Když je filtr umístěn v úhlu 45° k blížícímu se světlu, stává se dichroickým zrcadlem. Tento typ filtru má dvě funkce. První funkcí je propustit zadané vlnové délky v přímém směru a druhou je odrazit blokované světlo pod úhlem 90° (Obrázek 2). Při měření více signálů současně, je důležitý správný výběr optických filtrů a jejich pořadí (Obrázek 3). [10]



Obrázek 2: Různé typy optických filtrů [10]



Obrázek 3: Schematické shrnutí typického uspořádání průtokového cytometru [10]

2.4.1.3 Zpracování signálu

Když světlo dosáhne fotodetektoru, vygeneruje se malý proud (několik mikroampérů). Jeho napětí má amplitudu úměrnou k celkovému počtu fotonů, které detektor přijme. Toto napětí je pak zesíleno řadou lineárních nebo logaritmických zesilovačů a analogově-digitálními konvertory (ADC) převedeno na elektrické signály o dostatečné velikosti (5 až 10 voltů), aby mohly být graficky vyneseny. [9]

Logaritmické zesílení se obvykle používá ve fluorescenční studii, protože rozšiřuje slabé signály a komprimuje jasné signály, což vede k rozdělení, které se snadno zobrazí na histogramu. Lineární je naopak vhodné tam, kde není taková široká škála signálů, např. při analýze DNA. [10]

2.4.1.4 Elektstatické třídění (sorting) buněk

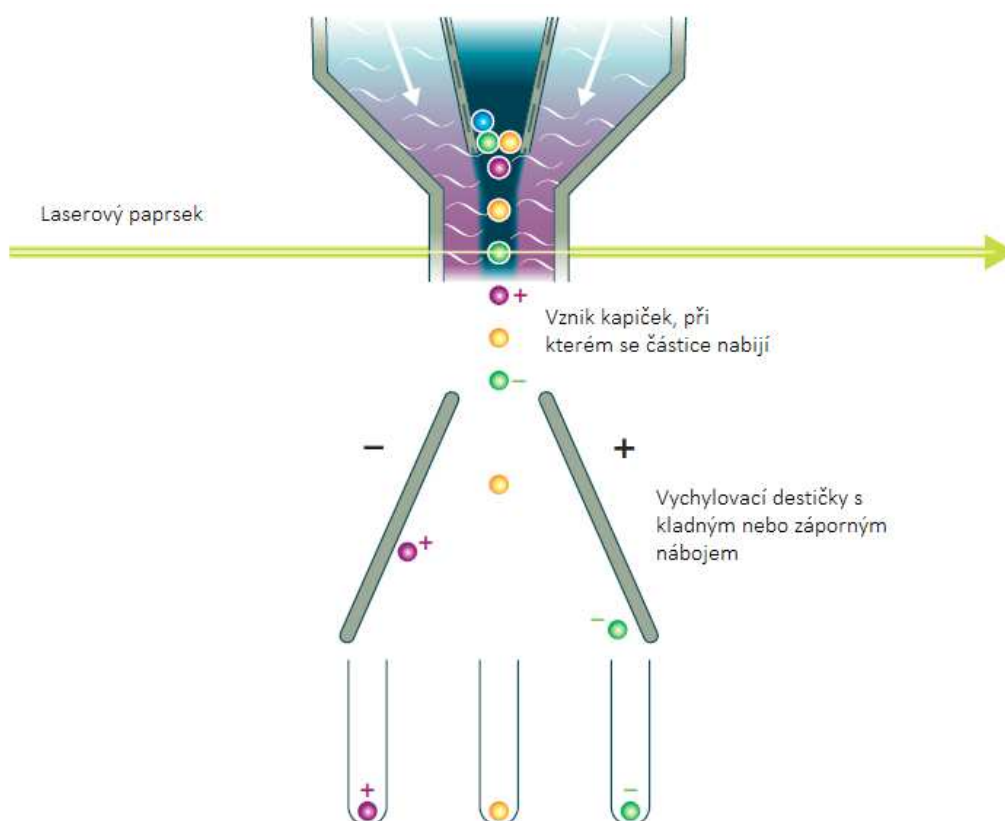
Důležitou aplikací průtokové cytometrie je oddělování buněk podle podtypu nebo antigenních determinantů pro další biologické studie. Tento proces bývá nazýván „třídění buněk“ nebo FACSTM („Fluorescence activated cell sorting“) analýza. [11]

Poté, co je každá částice sondována s paprskem světla, je signál FSC a signál fluorescence porovnáván se zadanými kritérii třídění. Pokud částice odpovídá kritériím, je proud tekutiny nabit na výstupu z trysky fluidního systému. Částice získá elektrostátický náboj v přesném okamžiku nazývaném "break-off point", který je popisován jako okamžik, kdy se kapička

obsahující námi požadované částice, oddělí od proudu. V této chvíli se proud vzorku přemění na aerosol. [7][11]

Aby k okamžiku break-off nedocházelo v náhodných vzdálenostech od trysky, a aby se udržovala konstantní velikost kapiček, tryska se rozkmitává vysokou frekvencí. Kapky aerosolu nakonec prochází silným elektrostatickým polem, které je vychýlí doleva nebo doprava na základě jejich náboje. Nenabitě částice vychýleny nejsou (Obrázek 4). [7][10]

Rychlost průtoku třídění závisí na několika faktorech včetně velikosti částic a rychlosti tvorby kapek. Typická tryska, která má mezi 50-70 μm v průměru v závislosti na rychlosti proudění, může produkovat 30 000-100 000 kapiček za sekundu, což je ideální pro přesné třídění. Při vyšších tryskových rychlostech již riskujeme ucpaní trysky nebo snížení čistoty přípravku. [10] V závislosti na rychlosti se částice separují s čistotou 90-99 %. [11]



Obrázek 4: Elektrostatické třídění (sorting) buněk [10]

2.5 Fluorescenční mikroskopie

Technika fluorescenční mikroskopie je jedním ze základních nástrojů jednak v biologii a biomedicínských vědách, tak i ve výzkumu materiálů. Použitím řady fluorochromů je možné určit buňky a buněčné komponenty s vysokým stupněm specifčnosti uprostřed nefluoreskujícího materiálu. Díky tomu je fluorescenční mikroskop schopen odhalit přítomnost i jedné molekuly. S použitím více fluorescenčních značení je možné současně identifikovat několik cílových molekul současně. [12]

Tohoto lze využít zejména při studování přítomnosti proteinů v buněčných organelách nebo přítomnosti specifické sekvence nukleové kyseliny v buňkách. Při obarvení dvou různých proteinů fluorochromy různé barvy lze studovat jejich vzájemnou interakci.

Interferenci excitačního světla při pozorování lze odstranit filtrem, který do okuláru nebo kamery propustí jen světlo excitované. [12]

Pomocí fluorescenční mikroskopie je možné vyšetřit vznik některých metabolitů v organismech. Příkladem může být vznik granulí poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB). Obarvením PHB fluorochromem Nile Red v prvotních fázích tvorby a následnou analýzou na fluorescenčním mikroskopu, je možné stanovit mechanismus tvorby PHB. Jendrossek zkoumal produkci PHB v bakteriích *Rhodospirillum rubrum*, *Ralstonia eutropha* a v rekombinantní *Escherichia coli* s transgenním operonem *phaCAB* z *R. eutropha* zajišťujícím biosyntézu PHB. Tímto experimentem dokázal, že se syntéza neinicuje náhodně, ale v diskretních oblastech bakterie. [13]

2.5.1 Základní součásti fluorescenčního mikroskopu

Fluorescenční mikroskop se neobejde bez čtyř základních součástí [12]:

- Zdroj světla:

Ze světelného zdroje vychází světlo s různými vlnovými délkami od ultrafialové po infračervenou.

- Excitační filtry:

Filtry propouští pouze to světlo, které potřebujeme k fluorescenci vzorku, obvykle s kratší vlnovou délkou. Ostatní světlo je pohlceno.

- Fluorescenční preparát:

Vzorky musí reagovat na dopadající světlo fluorescencí. Vzorky samotné buď mohou být fluorofory a nebo mohou poskytovat fluorescenci po přidání fluorescenční sondy.

- Bariérový filtr:

Tento filtr pohlcuje všechno excitační světlo, které nebylo použito k excitaci a propouští pouze fluorescenční světlo. Navíc je možné z fluorescenčního spektra nechat projít pouze jeho část.

2.6 Stresová odpověď

Metabolická činnost mikroorganismů je velmi závislá na vnějším prostředí. Aby se mikroorganismy mohly rozmnožovat, musí být v prostředí dostatečné množství surovin pro syntézu buněčné hmoty, dostatek zdroje využitelné energie a vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se přizpůsobit, aby byly vůči nepříznivému prostředí odolnější, a to nejen změnou enzymového vybavení svých buněk, ale mohou do určité míry změnit i chemické složení nebo tvar buněk. Krom toho mohou ovlivnit i své nejbližší okolí, například změnou pH. Všechny tyto schopnosti mikroorganismů jsou však omezeny určitou hranicí, za kterou dochází k zastavení metabolismu nebo usmrcení buňky. [14][15]

Tabulka 1: Příklady exogenních stresových faktorů [14]

Fyzický stres	Teplotní šok
	Osmotický šok
	Vysoušení/dehydratace
	Vysoký hydrostatický tlak
	Přetěžovací/smykový stres
	Radiace
Chemický stres	Ethanol a jiné metabolické toxiny
	Nutriční limitace/hladovění
	Oxidativní stres
	pH šok
	Stres kovovými ionty (toxicita a limitace)
	Chemické mutageny
Biologický stres	Buněčné stárnutí
	Genotypové změny (př. ztráta chromozomu)
	Konkurence jinými organismy

Bakterie, bez ohledu na přírodní prostředí, jsou vystaveny neustále se měnícím výkyvům jejich vnějších podmínek. V důsledku toho se vyvinuly sofistikované odpovědi modulované remodelováním proteinových komplexů a systémy fosforylace závislých transdukčních signálů, aby se přizpůsobily a přežily řadu poškození. V konečném důsledku tyto signalizační systémy ovlivňují transkripční faktory buď aktivací alternativního sigma faktoru podjednotky RNA polymerázy za koordinace genové exprese, například *sigma E* (σ^E) v *Escherichia coli* a v *Bacillus subtilis sigma B* (σ^B) a *sigma F* (σ^F), nebo aktivací DNA vazebných dvousložkových regulátorů odpovědi. [16]

První třídou transkripčních faktorů s rolí ve stresové resistenci je podjednotka RNA polymerázy - sigma faktor, který je nezbytný pro zahájení transkripce tím, že hraje klíčovou roli při rozpoznání promotoru [17]. Každý z několika sigma faktorů v buňce je nutný pro transkripci určité podmnožiny genů/operonů v rámci jejich regulonu. Například spektrum σ^B faktoru v *B. subtilis* obsahuje 200 otevřených čtecích rámců (5 % genomu), poskytují obecnou odolnost vůči stresu buňky, zatímco 17 dalších sigma faktorů v této bakterii je regulováno méně než 50 otevřenými čtecími rámci. Vzhledem k tomu, sigma faktory mohou regulovat významnou podskupinu otevřených čtecích rámců, může modulace jejich aktivity být poměrně složitá. Dostupnost některých alternativních faktorů *sigma* (např. σ^F a σ^B) pro vytváření produkčních komplexů s RNA polymerázy je v konečném důsledku řízená takzvaným „vazným partnerem“ známým jako *anti-sigma* faktor, který zase může být regulován, například cílenou proteolýzou nebo fosforylací. [16]

Alternativní odpovědi při vnímání stresu jsou také dvousložkové regulátorové systémy. Ty jsou fosforylačně závislé a skládají se ze senzorké kinázy kanonicky membránově zanořené a z regulátoru odpovědi. Ve chvíli, kdy kináza přijme stresový signál, předtím než převede fosforylové skupiny na neměnný aspartát, autofosforyluje konzervovaný histidin, a tím aktivuje její latentní biologické funkce. Nejčastěji, nikoli však výlučně, jsou regulátory odpovědi transkripční aktivátory, které aktivují promotory umístěné před otevřenými čtecími

rámci regulující a stimulující zahájení transkripce v interakci se *sigma* vazbou RNA polymerázy. [16]

V Tabulce 2 jsou shrnuty *sigma* faktory bakterie *Ralstonia metallidurans* CH34 a jejich funkce. Tento bakteriální kmen dokáže tolerovat vysoké koncentrace těžkých kovů a je blízce příbuzný bakteriálnímu druhu *Cupriavidus necator* – modelový organismus pro metabolismus polyhydroxyalkanoátů. Sigma faktor RpoS (nazývaný také σ^S , σ^{38}) je odpovědný za obecné odpovědi na širokou škálu stresových podmínek, jako je hladovění, vysoká osmolarita, kyselé nebo alkalické pH, vysoké nebo nízké teploty, UV záření a přítomnost mnoha toxických látek (včetně ethanolu). [18]

Tabulka 2: Sigma faktory *Ralstonia metallidurans* CH34 a jejich funkce [18]

Name	Contig	Cluster	Related proteins	Possible function
RpoD	629	ICF	RpoD_Ecoli	Main housekeeping sigma factor
RpoS	533	ICF	RpoS_Ecoli	Starvation and other cytoplasmic stress conditions
RpoH	660	ICF	RpoH_Ecoli	Response to protein denaturation in the cytoplasm, heat shock
Sig345	345	(ICF)	None	Sequencing artifact?
FliA	706	MDF	FliA_Ecoli	Synthesis of the bacterial flagellum
Sig605	605	(ECF)	SigH_Bsub	Transition from exponential to stationary phase of growth?
Sig538	538	(ECF)	SigH_Bsub	Transition from exponential to stationary phase of growth?
Sig588	588	ECF:RpoE	CnrH	Another metal resistance?
CnrH	(pMOL28)	ECF:RpoE	(NccH)	Nickel resistance
RpoE	534	ECF:RpoE	RpoE_Ecoli	Response to protein denaturation in the periplasm and cell wall
Sig562	562	ECF:Fecl	None	Cell wall integrity?
Sig681	681	ECF:Fecl	None	Cell wall integrity?
Sig679	679	ECF:Fecl	None	Cell wall integrity?
Sig680	680	ECF:Fecl	Fecl_Ecoli	Metal (iron?) homeostasis?
Sig697	697	ECF:Fecl	Fecl_Ecoli	Uptake of citric iron
Sig611	611	ECF:Fecl	Fecl_Ecoli	Uptake of citric iron
RpoN	669	RpoN	RpoN_Ecoli	Tight control of operons, e.g., nitrogen assimilation, hydrogenase synthesis, degradation of xenobiotics and aromatic compounds
(ORF)	480	None	TrpF	No sigma factor
(ORF)	593	None	None	No sigma factor

2.7 Přehled specifických stresových faktorů

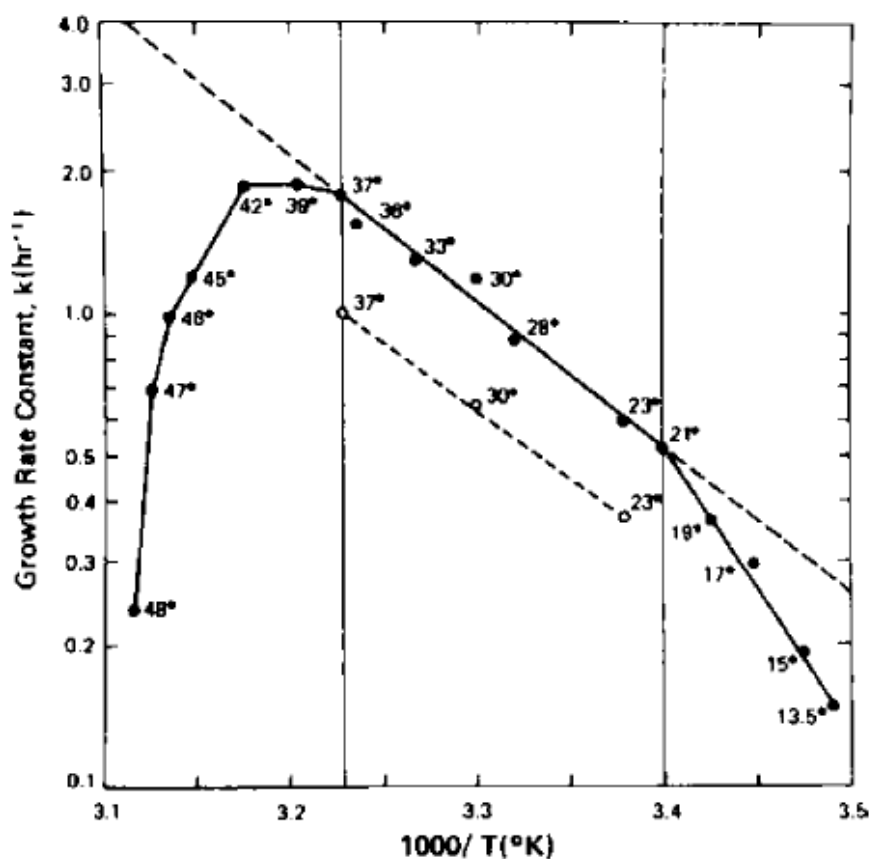
2.7.1 Teplotní stres

Charakteristickým znakem bakteriálního růstu je schopnost organismů přizpůsobit se i velmi variabilnímu prostředí. Ve skutečnosti bakterie tvoří zhruba polovinu světové biomasy a spolu s dalšími mikroorganismy jsou nejvíce široce distribuované organismy na Zemi. Teplota je jedním z nejvíce pervazivních problémů organismů. Půdní volně žijící bakterie se musí přizpůsobit denním změnám teplot v důsledku rozdílu teplot ve dne a v noci, případně sezónním změnám. Bakterie, které žijí v různých organismech, se často z jednoho do druhého organismu dostávají fekálně-orálním přenosem. Proto musí být rovněž vybaveny tak, aby přežily teplotní výkyvy v prostředí mimo hostitelský organismus. Pro ty, které žijí v oceánech má schopnost růstu v chladu zásadní význam, protože 90 % oceánů má teploty $\leq 5^\circ \text{C}$. [19]

Podle vztahu k teplotě se mikroorganismy dělí na psychofilní, mezofilní a termofilní. U psychofilních mikroorganismů se optimální teplota pohybuje mezi 5 a 18°C .

U mezofilních organismů se tato teplota pohybuje kolem 30°C, termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu 45°C a nebo i vyšší. [15]

Nejlépe jsou prostudované strategie mezofilních bakterií využívané k vyrovnání se s náhlými tepelnými stresey nebo šoky z chladu u *Escherichia coli*. Optimální teplota pro růst *E. coli* je asi 25 až 37 °C. Buňky v tomto teplotním rozmezí nepodléhají žádnému nebo jen malému zpoždění v adaptaci na novou růstovou rychlost. Není vyvolána ani tepelná šoková odpověď („heat shock response“ - HSR), ani odpověď šoku z chladu („cold shock response“ - CSR). Navíc buněčné složení zůstává relativně konstantní. Při postupném zvyšování teploty dochází k postupnému snížení rychlosti růstu až do dosažení letální teploty (asi 47 až 50 °C, v závislosti na konkrétním kmenu a podmínkách růstu). Při snižování teploty poklesne tempo růstu až do dosažení minimální teploty pro pokračující růst (asi 8 °C). Posun od rozmezí teplot optimálního růstu nad 37 °C vyvolává postupně intenzivnější HSR a naopak při snížení teploty na teplotu 15 °C a méně je výsledkem klasické CSR [19]. Zatímco při HRS hraje klíčovou roli σ^{32} faktor, tak CSR spočívá v úpravě exprese chaperonů RNA a ribosomálních faktorů [20].



Obrázek 5: Růstová rychlost *E. coli* jako funkce teploty. Specifická rychlost růstu (k , h^{-1}), logaritmická stupnice, vynesena proti inverzní absolutní teplotě (K). Jednotlivé \bullet body jsou označeny ve stupních Celsia: \bullet v bohatém médiu; \circ v glukózovém-minimálním médiu. [19]

2.7.2 Stres buněčné stěny

Buněčná stěna bakterií tvoří vnější obal organismu, který obklopuje cytoplazmu a chrání ji před vnějším světem. Nicméně, buněčná stěna je mnohem složitější, než jednoduchá

membrána a představuje jedinečný a dynamický extracelulární prostor. Kromě toho, že slouží jako bariéra, je buněčná stěna široce zapojená do kritických buněčných procesů, včetně tvorby energie, dělení buněk, úprava makromolekulárních komplexů, transport živin do buněk a exkrece jiných molekul z buňky. Buněčná stěna je také aktivně přestavována v reakci na životní prostředí v průběhu vývoje i v rámci patogeneze. Fyzikálně-chemické podmínky se v této „obálce buňky“ liší od cytoplasmy tak, že bakterie vyvinuly jedinečné reakce na stres, jejichž cílem je zejména boj proti stresu v tomto prostoru. [19]

Odpovědi buňky na stres buněčné stěny („Cell envelope stress responses“) jsou definovány obecně jako transkripční odpovědi aktivovány podmínkami, které negativně ovlivňují komponenty stěny a narušují její funkci. Obecné stresy, jako je teplota, ethanol, oxidační stres a hladovění má vliv na celou buňku a často aktivují jak cytoplazmatické odpovědi na stres, tak i odpovědi buňky na stres buněčné stěny. Zato konkrétnější stresy, například ošetření chemickými látkami, které inhibují procesy buněčné stěny, aktivují pouze odpovědi buňky na stres buněčné stěny, a nikoliv však cytoplazmatické stresové reakce. [19]

Historicky se studie odpovědi buňky na stres buněčné stěny v gram-negativních a gram-pozitivních bakteriích rozdělila do dvou linií. Představitelem gram-negativních bakterií se stala *E. coli* a představitelem gram-pozitivních byl *B. subtilis*. V gram-negativních bakteriích jsou za odpověď odpovědné především tyto komponenty: σ^E , Cpx, Rcs, protein phage-shock (Psp) a Bae. Mnoho prací se při zjišťování reakce v gram-pozitivních bakteriích zaměřila na stres vyvolaný látkami, které narušují syntézu peptidoglykanů. Regulon, který byl identifikován jako zodpovědný za odpověď, je dvousložkový systém LiaRS a byl indukovaný antibiotikem a bacitracinem. [19]

2.7.3 Osmotický stres

Bakteriální odpověď na osmotický stres okolí je různá. Mechanismy osmotické stresové tolerance určují, zda bakterie přežije nebo zda bude růst, protože osmotický stres významně ovlivňuje strukturu, fyziku, chemii a metabolickou aktivitu bakteriálních buněk. Ve chvíli, kdy se roztok, ve kterém buňka roste, stane více koncentrovaným, než obsah v buňce, začne voda difundovat ven, aby vyrovnala tento tlak. Bakterie je schopná zmírnit tento vodní tok akumulací nebo uvolněním elektrolytů a malých organických látek, z nichž některé jsou označeny jako kompatibilní rozpuštěné látky. Zvýšení osmotického tlaku inhibuje bioenergetické funkce a syntézu většiny makromolekulárních látek, které aktivuje stávající osmoregulační systémy a indukuje expresi osmo-regulačních genů. [19]

Objasnění tolerance k osmotickému stresu přispívá k našemu porozumění bakteriálnímu přežití a růstu v různých přirozených prostředích, jako je půda, čistá voda, mořská voda, rostlinní a živočišní hostitelé, v potravinách a dalších prostředích. Osmotický tlak je "koligativní" vlastnost, protože závisí na celkové koncentraci rozpuštěných látek v roztoku. To je často popisováno termínem osmolalita, což představuje osmotický tlak při určité teplotě v jednotkách koncentrace. Osmolalita přírodních bakteriálních prostředí nabývá hodnot od téměř 0 mol/kg (čisté vody) do alespoň 16 mol/kg a je zvýšená různými rozpuštěnými látkami, včetně solí a cukrů. [19]

V souvislosti s odpovědí na osmotický stres dochází k zásadní změně buněčné fyziologie, zvláště v případě, kdy se osmolalita změní náhle. Osmotický up-shock dehydratuje buňky

během několika sekund, čímž přechodně brání dýchání a jiné funkce založené na membráně. Koncentrace ATP v cytoplasmě se přechodně zvýší, především protože klesá objem cytoplazmy. Odpovědí na osmotický down-shock se přechodně ztratí elektrochemický gradient, při vyčerpání důležitých metabolitů buňky. [19]

2.7.4 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

I přes energetické výhody aerobního metabolismu jsou částečně redukované reaktivní formy kyslíku vzniklé během aerobního metabolismu škodlivé pro buňky. Jedno-, dvou-, a tří-elektronová redukce molekulárního kyslíku (O_2) má za následek vznik nepříznivého superoxidu (O_2^-), peroxidu vodíku (H_2O_2), a hydroxylových radikálů molekuly ($OH\cdot$). Ačkoli O_2^- a H_2O_2 jsou rychle degradovány, poškozují proteiny a FeS klastry ([Fe-S]) dehydratáz, které jsou obzvláště citlivé na oxidaci těchto druhů. Zvýšená hladina O_2^- a H_2O_2 také významně podporuje poškozování DNA. Další poškození je způsobeno reakcí H_2O_2 s železem, nazývaná Fenton reakce ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH$), což vede k vytváření extrémně reaktivního a krátce trvajícího $\cdot OH$. Existují i jiné typy reaktivních kyslíkových radikálů – singletový kyslík (1O_2), chlornany (HClO) a organické peroxidy (ROOH), například lipidové peroxidy. Nerovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a detoxikací meziproductů byla definována jako oxidační stres. [19]

Podobné formám reaktivního kyslíku, mohou být reaktivní formy dusíku generované endogenními metabolickými procesy nebo jako obranný mechanismus. Například volný radikál oxidu dusnatého (NO) je meziproduct dýchací dráhy denitrifikace. Denitrifikační bakterie mají nitritreduktázu, která redukuje dusitany na NO a NO-reduktázy redukují NO na oxid dusný (N_2O). Ve střevních bakteriích je určité množství NO produkováno jako vedlejší produkt při redukcí dusičnanů a dusitanů na amoniak za anaerobních podmínek. NO je také produkován inducibilní NO-syntázou (také označován NOS) v buňkách imunitního systému savců. NO může inhibovat nebo poškozovat enzymy reakcí s FeS klastry nebo s hemem. [19]

SoxR, člen rodiny *MerR* transkripčních regulátorů, byl charakterizován jako jeden z prvních oxidačních regulátorů stresové reakce. Gen *E. coli soxR* byl identifikován ve screenu pro mutanty rezistentní na redoxně-aktivní sloučeninu menadion a bylo zjištěno, že mají zvýšenou expresi genů indukovaných redoxně aktivních sloučenin, které mohou produkovat O_2^- (např. parakvat). V *E. coli* a podmnožině střevních bakterií *SoxR* řídí expresi pouze *SoxS* transkripční regulátor typu *AraC*. [19]

2.7.5 Ethanolový stres

Ethanol je inhibitor růstu mikroorganismů při relativně nízkých koncentracích. Inhibuje buněčné dělení, pokles buněčného objemu a specifickou rychlost růstu. Vysoké koncentrace etanolu snižují vitalitu buněk a zvyšují buněčnou smrt. Ethanol také ovlivňuje buněčný metabolismus a makromolekulární biosyntézu tím, že přiměje produkci proteinů tepelného šoku, sníží rychlost akumulace RNA a proteinů, zvýší frekvenci drobných mutací, mění metabolismus, denaturuje intracelulární proteiny a glykolytické enzymy, a také snižuje jejich aktivitu. [21]

Nejlépe prostudovaná odpověď na ethanolový stres je u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Nad kritickou hranicí koncentrace ethanolu dochází ke specifické transkripční odpovědi. Ta je zahájena indukcí proteinů tepelného šoku (HSP), které se zdají být podobné indukovaným během tepelnému šoku. Kvasinkové buňky začnou syntetizovat řadu HSP, včetně Hsp104, Hsp82, HSP70, Hsp26, Hsp30 a Hsp12, ale pouze u Hsp104 a Hsp12 bylo prokázáno, že fyziologicky ovlivňují toleranci kvasinek k ethanolu. Hsp104 působí jako činidlo přestavby při rozpadu denaturovaných bílkovin, zatímco Hsp12 je membránový protein, který dokáže chránit liposomální membránové celky proti vysušení a ethanolu. [21]

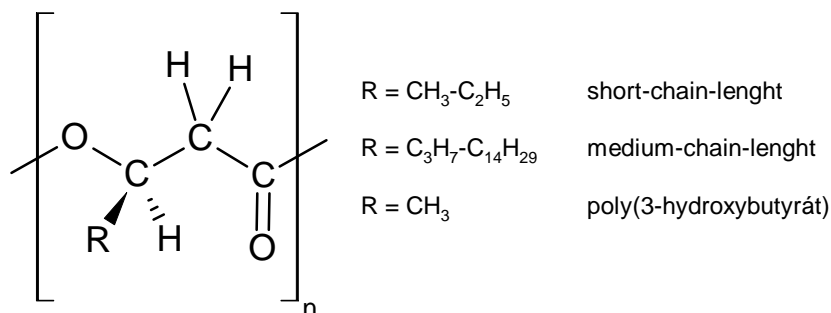
Mikroorganismy mohou disponovat rozsáhlým spektrem stresových odpovědí a adaptačních mechanismů cílených na odstraňování nebo zmírňování škodlivých účinků ethanolu. To zda mikroorganismus přežije, zpravidla závisí na struktuře a schopnosti efektivní obrany plazmatické membrány, která představuje hlavní cílovou strukturu působení ethanolu. [14]

2.8 PHA a stresová odpověď bakterií

2.8.1 Polyhydroxyalkanoáty – struktura a vlastnosti

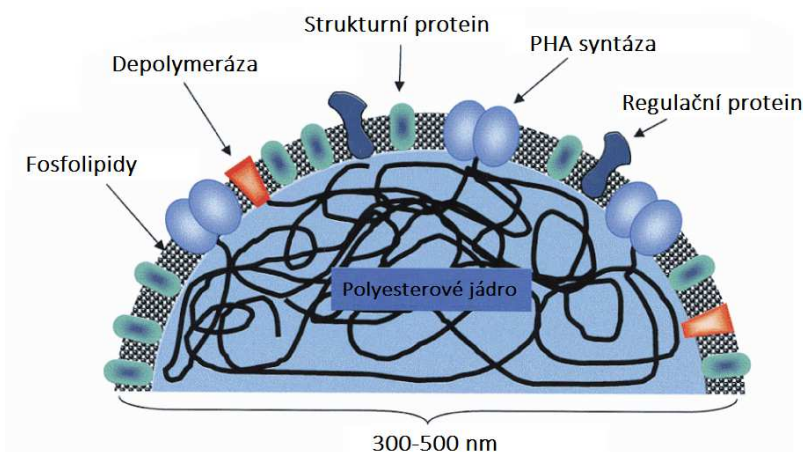
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery přírodního původu, které byly objeveny již v roce 1926 francouzským mikrobiologem Lemoignem. Ten izoloval a charakterizoval poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) z bakterie *Bacillus megaterium*. Od té doby byla schopnost produkce a akumulace PHA objevena u celé řady mikroorganismů, a to jak u gram-pozitivních tak i gram-negativních kmenů (autotrofních, heterotrofních, fototrofních; aerobních i anerobních), ale také u některých kmenů archaebakterií. Bakterie syntetizují PHA jako zásobní zdroj uhlíku, energie a redukční síly, a to nejčastěji při nadbytku uhlíkatého zdroje a současné limitaci jiným důležitým prvkem (dusíkem, fosforem, železem atd.). Po vyčerpání uhlíkatého substrátu dokáží buňky PHA rozložit a využít je jako zdroj uhlíku a energie ke svým metabolickým pochodům. [22][23]

PHA jsou polyestery hydroxykyselin. V závislosti na délce řetězce hydroxykyseliny se PHA dělí do dvou skupin. Polyestery složené z hydroxykyselin o délce 3-5 atomů uhlíku se označují jako short-chain-length (scl-PHA), zatímco PHA obsahující monomery o délce 6-14 atomů uhlíku spadají do skupiny medium-chain-length (mcl-PHA) (Obrázek 6). Nejlépe prostudovaným a v přírodě nejrozšířenějším typem PHA je PHB. [24]



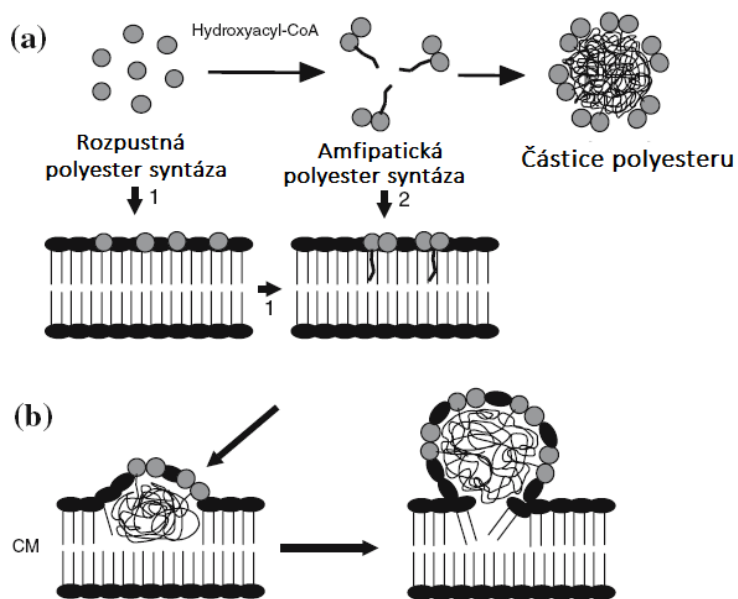
Obrázek 6: Struktura PHA

PHA se nachází v cytoplasmě v buňkách ve formě granulí (Obrázek 7). Počet a velikost granulí závisí na kultivačních podmínkách a liší se v rámci různých bakteriálních kultur. Granule bakterie *Bacillus megaterium* jsou složeny z 97,7 % polyesteru, 1,87 % proteinů a 0,46 % lipidů a fosfolipidů. Polyester je obsažen uvnitř objemu granulí, jejichž povrch je tvořen fosfolipidovou vrstvou, do které jsou zabudovány proteiny plnící různé funkce. PHA mají hydrofobní charakter, což je pro mikrobiální buňky výhodné, protože akumulace PHA nezvyšuje intracelulární osmotický tlak. [22][23]



Obrázek 7: Schéma struktury PHA granule [24]

Existují dva modely pro sestavení PHA granulí *in vivo*. Micerální model je založen na pozorování tvorby PHA granulí volně v cytoplasmě. Druhou možností je model „pučících“ granulí, který je pak podpořen pozorováním membránového materiálu ve struktuře izolovaných granulí a faktem, že nově vzniklé PHA granule nejsou v cytoplasmě rozmístěny náhodně, ale naopak se nacházejí poblíž membrány (Obrázek 8). [23][25]



Obrázek 8: Modely tvorby granulí *in vivo*: a) micerální model b) model „pučících“ granulí [26]

2.8.2 Zapojení PHA do stresové odpovědi

Obecně se předpokládá, že je PHA v bakteriální říši jeden z nejrozšířenějších typů zásobních materiálů a usnadňuje bakteriím s možností akumulovat PHA přežití ve stresových podmínkách. Přesné mechanismy však zůstávají stále neobjasněny. [13][27]

U antarktického bakteriálního kmenu *Pseudomonas* sp. 14-3 byla pozorována odolnost vůči mrazu, a to za podmínek kdy kultura akumulovala PHB a za podmínek, kdy jej neakumulovala. Kultura, která akumulovala PHB, měla výrazně zvýšenou odolnost vůči mrazu [28]. Oproti tomu však ve studii Sardesai a Babu testovali bakteriální kmen *Rhizobium* DDSS69 a dospěli k závěrům, že při stresu způsobeném nízkou teplotou dochází k poklesu hladiny PHB, ale že to nesouvisí se stresovou odpovědí, a schopnost produkovat PHB tedy není odpovědná za odolnost bakterie vůči mrazu. Snížené množství intracelulárního PHB bylo způsobeno inhibicí biosyntézy PHB a zvýšením jeho rozpadu [29].

Zhao a kolektiv ve svých experimentech porovnávali divoký kmen *Aeromonas hydrophila* 4AK4, produkujícího kopolyestery skládající se z 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu, a mutantní kmen *A. hydrophila* CQ4 s narušenou PhaC-syntázou. *A. hydrophila* 4AK4 poskytovala lepší resistenci proti celé řadě přírodních stresových faktorů včetně vysokých teplot, působení mrazu, peroxidu vodíku, UV záření, ethanolu a vysokého osmotického tlaku v porovnání a kmenem neschopným produkce PHA. [30]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V experimentální části práce se pracovalo s bakteriemi *Cupriavidus necator* H16, *Bacillus megaterium* a *Delftia acidovorans*. Kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻4 byl zakoupen z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

3.1.2 Chemikálie pro kultivaci

- Nutriet Broth (Himedia)
- Agar Powder (Himedia)
- Peptone (Himedia)
- Beef extrakt (Himedia)

3.1.3 Ostatní chemikálie

- Propidium jodid (eBioscience)
- Nile Red (Sigma Aldrich)
- eFluor® 780 (eBioscience)

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

3.1.4 Přístrojové vybavení

- Plynový chromatograf: GC-FID (Hewlett Packard, Series II 5890)
Kolona - DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems
- Fluorescenční mikroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
- Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.
- Analytické váhy, Boeco
- Termostat, LS-35
- Centrifuga, Hettich MIKRO 200
- Centrifuga, Boeco U-32R
- Elisa reader – ELx808, BioTek Instruments, Inc.
- Inkubátor, IP60

3.2 Oživování bakteriálních kultur

Bakterie byly dodávány v lyofilizovaném stavu. Bakterie byly oživovány dle přiloženého návodu a kultivovány na pevném médiu (viz. kapitola 3.3) při 30 °C. Po kultivaci byly bakterie uchovávány při 4 °C a pravidelně přeočkovávány na nové Petriho misky v intervalu asi 30 dní.

Inokula pro všechny kultivace byla připravována v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml s obsahem 50 ml média. Inokulum bylo zaočkováváno třikrát bakteriologickou kličkou z agarové plotny. Po 24 hodinách kultivace při 30 °C na temperované třepačce při 170 rpm, bylo inokulum používáno pro zaočkování produkčního média. Do produkčního media bylo inokula zpravidla přidáváno 2,5 % celkového objemu.

3.3 Kultivace bakterií

Pro přípravu inokula pro *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻4 a *Delftia acidovorans* bylo používáno kapalné médium, pro uchování kultury bylo použito pevné agarové médium Nutrient Broth (dále pak NB).

Složení Nutrient Broth:

- Beef extract 10 g/l
- Pepton 10 g/l
- NaCl 5 g/l
- Agar 20 g/l

Pro přípravu inokula pro *Bacillus megaterium* bylo používáno kapalné médium, pro uchování kultury bylo použito pevné agarové médium Bacillus medium.

Složení Bacillus medium:

- Beef extract 5 g/l
- Pepton 3 g/l
- MnSO₄ 0,1 g/l
- Agar 20 g/l

Jako produkční médium pro kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻4 bylo používáno následující minerální médium [27]:

- (NH₄)₂SO₄ 3 g
- KH₂PO₄ 1,02 g
- Na₂HPO₄ 11,1 g
- MgSO₄ 0,2 g
- Fruktosa 20 g
- Roztok stopových prvků* 1 ml
- Destilovaná voda 1000 ml

*Roztok stopových prvků

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

Jako produkční medium pro kultivaci bakterií *Delftia acidovorans* bylo používáno medium Nutrient Broth s přísadkou glukosy o koncentraci 10 g/l. Podobně tomu bylo i při kultivaci bakterie *Bacillus megaterium*, kde se jako produkční medium používalo Bacillus medium s přísadkou 10 g/l glukosy.

Sterilizace médií byla prováděna v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem po dobu 30 minut. Roztoky fruktosy a glukosy se přidávali až po sterilizaci a sterilizovali se separátně v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut.

3.4 Stanovení biomasy

Obsah biomasy byl stanovován spektrofotometrickou metodou založenou na měření zákalu. Měření bylo prováděno při vlnové délce 630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda. S výjimkou měření po 24 hodinách byl vzorek ve zkumavce třikrát zředěn přidáním 2 ml vody k 1 ml vzorku. Do plastové mikroadestičky bylo do tří jamek pipetováno 25 μ l vzorku, a poté bylo přidáno 225 μ l destilované vody. Ve výsledku byl vzorek zředěný 30krát. To bylo provedeno s oběma vzorky a do dalších tří jamek bylo přidáno 250 μ l destilované vody jako blank.

Dosažením absorbance do regresní přímky z předem stanovené kalibrační křivky byl vypočten obsah biomasy v g/l. Biomasa byla stanovována 5krát po 24 hodinách u bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻4.

3.5 Stanovení obsahu PHA v biomase

Současně se stanovováním biomasy byl v biomase *Cupriavidus necator* H16 stanovován obsah polyhydroxyalkanoátů. Pro stanovení bylo použito 10 ml suspenze buněk. Suspenze byla stočena (8 000 rpm, 5 min.), supernatant byl slit a biomasa byla resuspendována v 10 ml destilované vody. Suspenze byla opět stočena, supernatant byl opět slit a biomasa byla v 1 ml destilované vody převedena do mikrozkuhavky typu Eppendorf, ve které byla opět stočena (10 000 rpm, 5 min.). Supernatant byl poté slit a biomasa byla ve mikrozkuhavce sušena do konstantní hmotnosti při 105 °C.

Do vialek bylo naváženo přibližně 10 mg suché biomasy. Dále byl do vialek přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly zavíčkované a tato směs byla udržována při teplotě 100 °C po dobu 3 hodin. Po esterifikaci byla směs ochlazená a extrahována v 0,5 ml NaOH o koncentraci 0,05 mol/dm³. Po extrakci a vytvoření fázového

rozhraní byla spodní chloroformová frakce odpipetována do nových vialek a ty byly uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie FID (plamenový ionizační) detektorem.

3.6 Porovnání produkce PHA u různých druhů bakterií

V tomto experimentu byli porovnáváni tři různí producenti PHA - *Cupriavidus necator* H16, *Bacillus megaterium* a *Delftia acidovorans*. Bakteriální druhy byly porovnávány po 48 hodinovém růstu na produkčním médiu. Porovnáván byl obsah biomasy (viz. kapitola 3.4), obsah PHA v biomase v (viz. kapitola 3.5) a vzhled granulí PHA pod fluorescenčním mikroskopem (viz. kapitola 3.8).

3.7 Barvení živých buněk *Cupriavidus necator* H16 pomocí Nilské červeně

Obarvit po fixaci mrtvou buňku fluorescenčním barvivem Nile Red, neboli Nilskou červení, není nijak obtížné, stačí přidat vhodné množství o vhodné koncentraci. Problém však nastává, jestliže chceme obarvit buňky živé, protože se barvivo musí dostat skrz membránu, a to živá buňka za běžných podmínek nedovolí. Nilská červeň je činidlo barvicí lipidy a bývá používáno k měření intracelulárních lipidových granulí a ke stanovení obsahu PHA v bakteriích fluorimetricky nebo průtokovou cytometrií. Nilská červeň je excitovaná při vlnové délce 488 nm a následně emitované světlo má vlnovou délku 510-580 nm. [33]

3.7.1 Intenzita barvení

Cílem experimentu bylo stanovit, zda buňky, které porostou v médiu obsahujícím Nilskou červení (0,5 µg/ml), budou mít i ve své cytoplasmě její určitý obsah dostatečný k tomu, aby bylo možné průtokovou cytometrií rozlišit buňky kmene H16 od PHB⁻4, a mít tedy živé buňky obarvené NR. Dále pak bylo cílem určit, zda se krátkodobou změnou teploty kultivace zvýší prostupnost Nilské červeně membránou.

Nejprve byly připraveny Petriho misky s minerálním médiem, fruktózou (10 g/l) a obsahem NR. Na takovéto médium byl bakteriologickou kličkou z jedné půlky naočkován kmen *Cupriavidus necator* H16 a na druhou půlku byl naočkován kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻4. Misky byly inkubovány při 30 °C po dobu 48 hodin a poté byly misky pozorovány pod UV analyzátozem.

Dále byly kromě běžných kultur na produkčním médiu připraveny dvě Erlenmayerovy baňky s kapalným produkčním médiem s obsahem NR. Do každé byl inokulem zaočkován jeden bakteriální kmen. Po 48 hodinách růstu byly připraveny a proměřeny následující vzorky (Tabulka 3).

Tabulka 3: Označení jednotlivých vzorků

		H16 barveno při inzulaci	H16 barveno v čase $t = 0$	PHB ⁻ 4 barveno při inzulaci
kontrola		H16 (30 °C) ¹		PHB (30 °C) ¹
1 h	4 °C	1-1A	1-1B	1-1C
	35 °C	1-2A	1-2B	1-2C
	40 °C	1-3A	1-3B	1-3C
	45 °C	1-4A	1-4B	1-4C
2 h	4 °C	2-1A	2-1B	2-1C
	35 °C	2-2A	2-2B	2-2C
	40 °C	2-3A	2-3B	2-3C
	45 °C	2-4A	2-4B	2-4C
3 h	4 °C	3-1A	3-1B	3-1C
	35 °C	3-2A	3-2B	3-2C
	40 °C	3-3A	3-3B	3-3C
	45 °C	3-4A	3-4B	3-4C

3.7.2 Stanovení viability průtokovým cytometrem

Protože hlavním záměrem bylo barvit živé buňky, probíhalo souběžně se stanovováním intenzity barvení stanovování aktuální viability bakterií. Vzhledem k tomu, že nebylo dostupné žádné fluorescenční barvivo, se kterým by bylo možné barvit buňky současně s NR, bylo nutné vzorky připravovat zvlášť. Příkladem barviva, kterým by bylo možné barvit současně s NR je například eFluor® 780, který může být excitovaný červeným (633 nm) laserovým paprskem a má pík emise při 780 nm, což lze detekovat pomocí 780/60 pásmového filtru [34]. Pro toto viabilní barvivo se však nepodařilo optimalizovat postup pro rozlišení živých buněk od mrtvých, a bylo proto nutné použít propidium jodid (PI), který se s NR kombinovat nedá.

Pro všechny čtyři teploty byla po třech hodinách pomocí PI stanovena viabilita kmene *Cupriavidus necator* H16. Stanovení viability probíhalo stejně jako v kapitole 3.9.

3.7.3 Stanovení viability plotnovou metodou

Kromě stanovení viability u buněk neobarvených NR bylo také důležité stanovit viabilitu buněk obarvených. Nilská červeň by totiž mohla narušovat biologické pochody v buňce, zvláště pak při kombinaci se změnou teploty kultivace. Z důvodu nepoužitelnosti průtokového cytometru (spektrální překryv fluorescence NR a PI) bylo nutné viabilitu stanovit plotnovou metodou. Porovnáním výsledků plotnové metody a výsledky průtokového cytometru z předchozí kapitoly poté mohlo posloužit k posouzení vlivu NR na životaschopnost bakterie.

Viabilita bakterií, které rostly na produkčním médiu s přidaným NR, byla stanovena po 3 hodinách kultivace při dané teplotě. Vzorky byly naředěny desítkovým ředěním do ředění 10^{-8} . Poté bylo sterilní hokejkou od každého ředění 0,1 ml rozetřeno na dvě agarové plotny

¹ 30 °C je teplota běžné inkubace kultur a teplotní optimum pro *C. necator* H16. Vůči těmto hodnotám byly porovnávány ostatní naměřená data.

s NB. Agarové plotny byly 48 hodin kultivovány při 30 °C a následně byl na miskách s počitatelným množstvím kolonií (20-200) stanoven jejich počet.

3.8 Pozorování granulí PHA

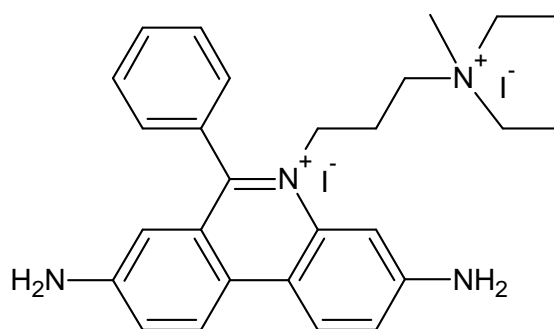
Granule PHA je možné sledovat pod fluorescenčním mikroskopem, jestliže je obarvíme NR. Vzhledem k časové náročnosti práce na fluorescenčním mikroskopu byla nutná jistota, že je PHA obarveno. Proto byly připravovány fixované preparáty. Jejich výhodou bylo mimo jiné i to, že se daly dlouhodobě skladovat.

Fixovaný preparát byl připravován následujícím způsobem. Kultura na produkčním médiu byla v mikrozkuvkách 100krát zředěna. Suspenze byla stočena (10 000 rpm, 5 min.), supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány v PBS. Suspenze byla opět stočena. Buňky byly resuspendovány ve 20% ethanolu a suspenze byla inkubována na ledu po dobu 10 minut. Suspenze poté byla stočena a fixované buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS. Poté bylo přidáno 5 μ l fluorescenční barviva NR o koncentraci 1 mg/ml (NR se ředí dimethylsulfoxidem DMSO). Suspenze buněk převrstvená agarózou, aby vzorek nebyl v pohybu, byla následně pozorována na fluorescenčním mikroskopu.

3.9 Stanovení viability

Pro určení viability buněk na průtokovém cytometru je důležité nastavit přístroj tak, abychom byli schopni v histogramu rozlišit populace živých buněk od mrtvých. Nejdůležitějším parametrem z tohoto hlediska je nastavení napětí fotonásobičů (PMT). Fotony excitovaného záření totiž dopadají na fotonásobiče. Jejich nastavením můžeme ovlivnit intenzitu signálu tak, aby bylo možné rozlišit signál buněk, které nejsou obarveny fluorescenční sondou od těch, které obarveny jsou.

Ke stanovování viability bylo využíváno fluorescenční barvivo propidium jodid. Živé buňky s neporušenými membránami se vyznačují schopností vyloučit barvivo, které naopak snadno proniká do mrtvých či poškozených buněk, kde se interkaluje do DNA. Fluorescenční excitační maximum má při 535 nm a emisní maximum má při 617 nm.



Obrázek 9: Struktura PI

3.9.1 Optimalizace metody

Vzhledem k velmi podobným vlastnostem *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻4 nebylo zapotřebí provádět optimalizace pro oba kmeny. Kultura s živými buňkami (inokulum) *Cupriavidus necator* H16 byla naředěna v mikrozkumavkách pufrům PBS* na koncentraci 10⁶ buněk na 1 ml. K suspenzi byl přidán 1 µl propidium jodidu (PI) o koncentraci 2 mg/ml. Poté byla suspenze uchována v temnu po dobu 20 minut a proměřena při různých PMT od 200 do 1000. Stejný postup byl proveden se suspenzí mrtvých buněk. Ta byla připravena přidáním ethanolu na výslednou koncentraci 10 % a následným povařením ve vodní lázni po dobu 10 minut. Porovnáním poloh píků při stejných hodnotách PMT bylo určeno, že při PMT 900 lze nejlépe rozlišit živé buňky od mrtvých. Na závěr byla provedena zkouška se suspenzí živých i mrtvých buněk, která byla připravena povařením na vodní lázni po dobu 5 minut.

*Složení pufru PBS

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	0,144 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilovaná voda	1 000 ml

3.9.2 Viabilita po působení stresových faktorů

Pro posuzování vlivu schopnosti akumulovat PHA na odolnost vůči stresovým faktorům byly porovnávány dva kmeny bakterie *Cupriavidus necator*. Kmen schopný produkovat PHA *Cupriavidus necator* H16 a mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4 neschopný akumulace PHB.

3.9.2.1 Ethanolový stres

Test byl prováděn po dobu 5 dnů. Vždy po 24 hodinách kultivace na minerálním médiu (20 g/l fruktózy) bylo od každého kmene do jedné mikrozkumavky odebráno 0,95 ml kultury na produkčním médiu. Poté bylo přidáno 0,05 ml 100% ethanolu. Výsledná koncentrace ethanolu tedy byla 5 %. Následně byl vzorek po 5, 10 a 15 minutách 100krát zředěn desítkovým ředěním fosfátovým pufrům. Po přidání 1 µl PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru a z histogramu bylo odečteno procento živých buněk.

3.9.2.2 Teplotní šok

Test byl prováděn po dobu 5 dnů. Vždy po 24 hodinách kultivace na minerálním médiu (20 g/l fruktózy) bylo od každého kmene do tří mikrozkumavek odebrán 1 ml kultury na produkčním médiu. Mikrozkumavky byly umístěny do vodní lázně o teplotě 60 °C. Následně byla od každého kmene odebrána jedna mikrozkumavka z vodní lázně po 5, 10 a 15 minutách. Vzorek byl 100krát zředěn desítkovým ředěním fosfátovým pufrům. Po přidání 1 µl PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru a z histogramu bylo odečteno procento živých buněk.

3.9.2.3 Stresový faktor – změna pH

Test byl prováděn po dobu 3 dnů. Vždy po 24 hodinách kultivace na minerálním médiu (20 g/l fruktózy) bylo od každého kmene do tří mikrozkuvek odebráno 0,9 ml kultury na produkčním médiu. Do první zkuvky bylo přidáno 0,1 ml 1M NaOH (výsledná koncentrace 0,1 mol/dm³, pH ≈ 13), do druhé 0,1 ml 0,1M NaOH (výsledná koncentrace 0,01 mol/dm³, pH ≈ 12) a do třetí 0,1 ml 0,1M HCl (pH ≈ 2). Následně byly vzorky po 15, 30 a 60 minutách 100krát zředěny desítkovým ředěním fosfátovým pufrem. Po přidání 1 μl PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru a z histogramu bylo odečteno procento živých buněk.

3.9.2.4 Stresový faktor – zmražení

Test byl prováděn po dobu 3 dnů. Vždy po 24 hodinách kultivace na minerálním médiu (20 g/l fruktózy) byl od každého kmene do tří mikrozkuvek odebrán 1 ml kultury na produkčním médiu. Mikrozkuvky byly umístěny do mrazicího boxu s teplotou -30 °C. Po 60 minutách byly vzorky rozpuštěny za laboratorní teploty. Po přidání 1 μl PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru a z histogramu bylo odečteno procento živých buněk.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

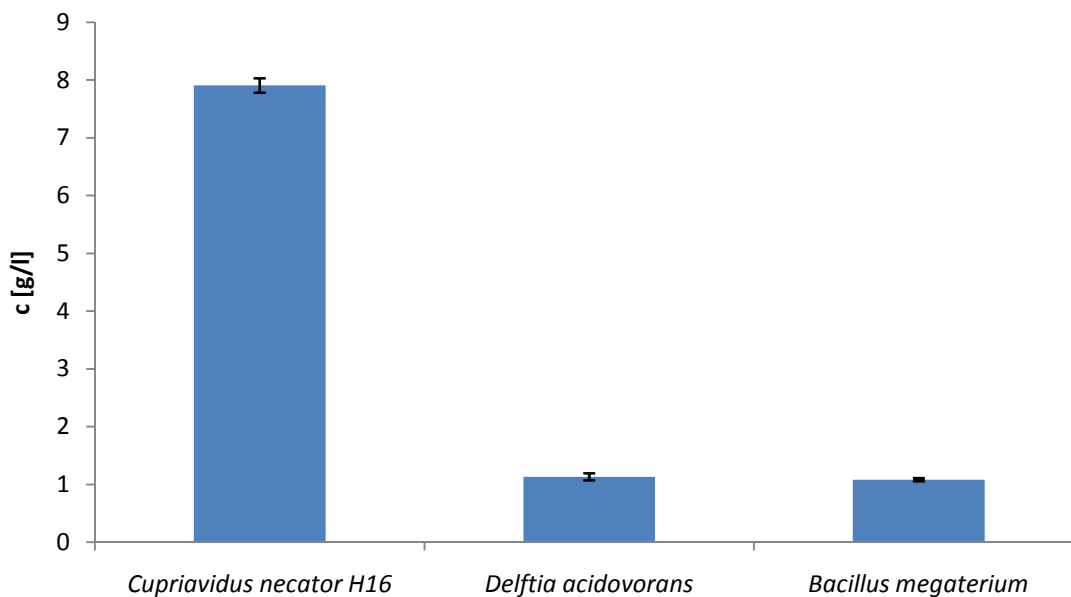
4.1 Porovnání produkce PHA u různých druhů bakterií

Na počátku experimentu bylo nutné vybrat vhodného producenta PHA, abychom mohli zkoumat vliv produkce PHA na stresovou odpověď mikroorganismu. Porovnávány byly tři kmeny bakterií: *Cupriavidus necator* H16, *Bacillus megaterium* a *Delftia acidovorans*.

4.1.1 Obsah biomasy

Tabulka 4: Obsah biomasy u různých producentů PHA

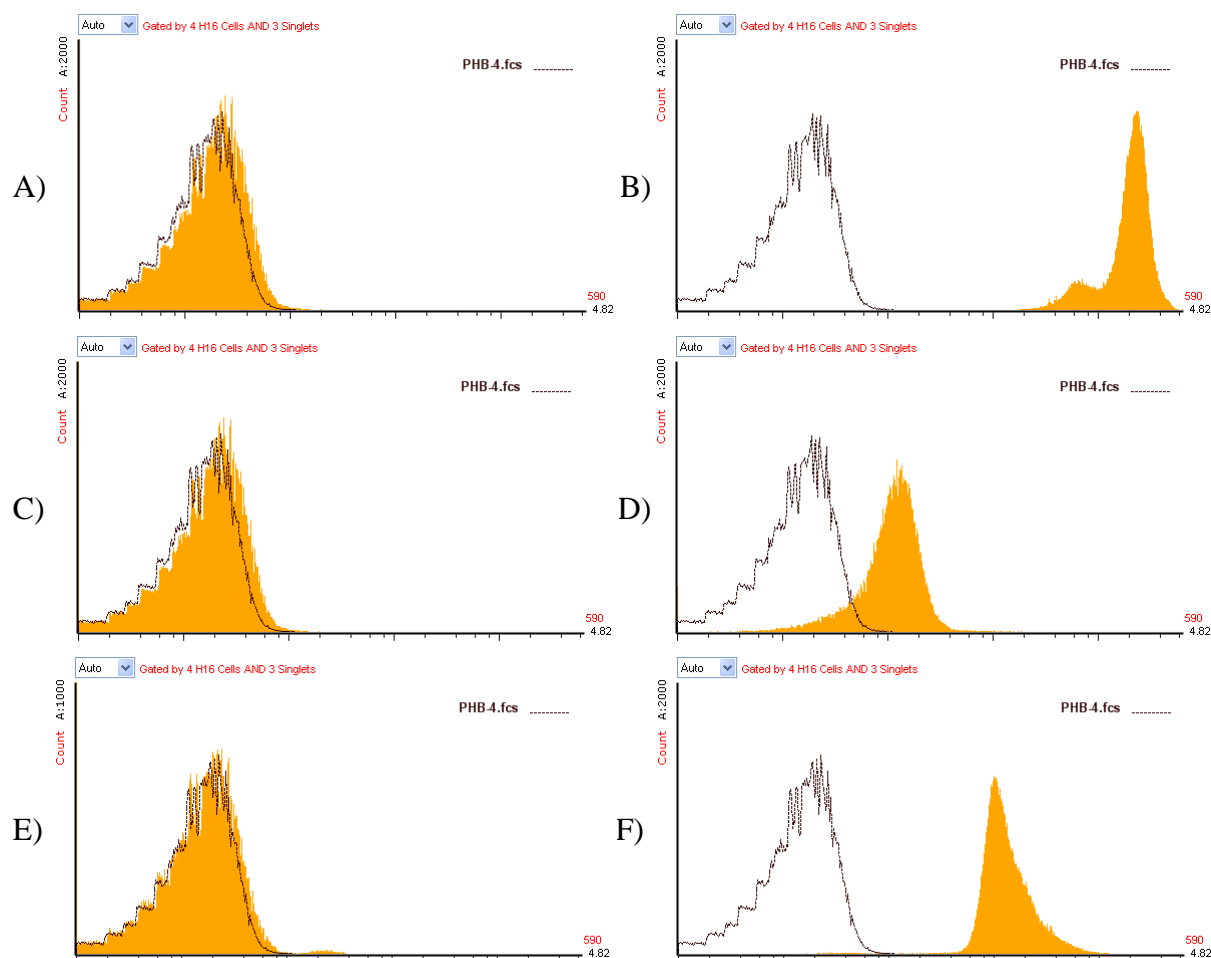
Producent	X ₁ [g/l]	X ₂ [g/l]	X ₃ [g/l]	\bar{X} [g/l]	Smodch výběr
<i>Cupriavidus necator</i> H16	7,77	8,02	7,92	7,91	0,13
<i>Delftia acidovorans</i>	1,11	1,20	1,08	1,13	0,06
<i>Bacillus megaterium</i>	1,07	1,07	1,11	1,08	0,03



Graf 1: Obsah biomasy u různých producentů PHA

Největší obsah biomasy měl po 48 hodinách kmen *Cupriavidus necator* H16. Ostatní dva kmeny měly přibližně 7krát menší obsah biomasy.

4.1.2 Barvení fixovaných preparátů

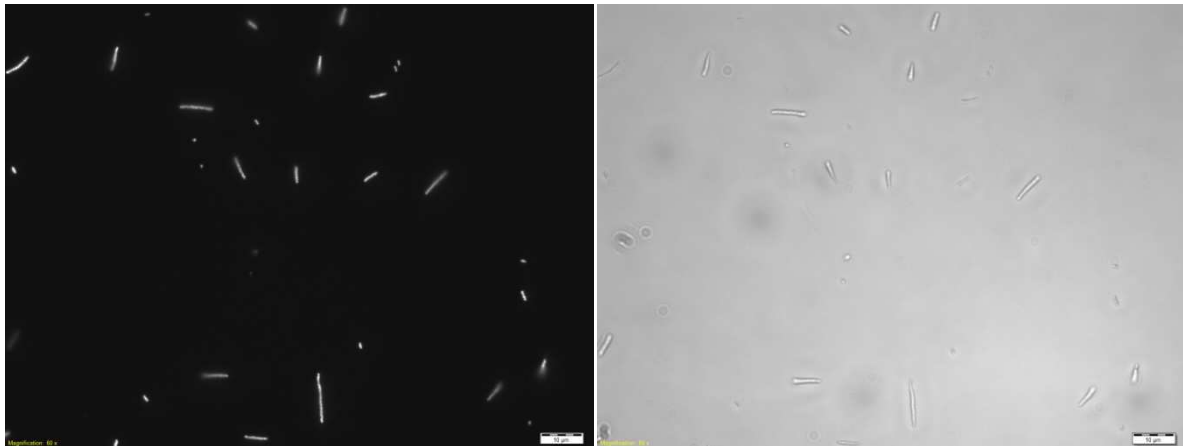


Obrázek 10: Histogram při měření neobarvených (A, C, E) a obarvených (B, D, F) fixovaných preparátů tří producentů PHA - *Cupriavidus necator* H16 (A, B), *Delftia acidovorans* (C, D) a *Bacillus megaterium* (E, F). Jako barvivo je použito Nile Red. Jako referenze je použita intenzita obarveného *Cupriavidus necator* PHB⁻4.

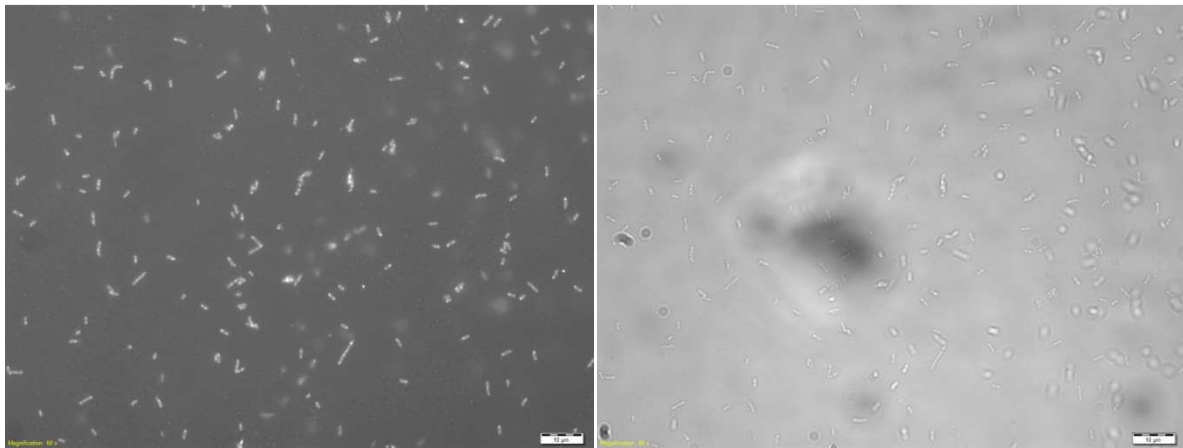
Intenzita fluorescence může být dána obsahem PHA v biomase nebo postupem fixování a barvení. Největší intenzita fluorescence byla zaznamenána u kmene *Cupriavidus necator* H16. Naopak nejmenší intenzitu fluorescence vykazoval kmen *Delftia acidovorans*.

4.1.3 Pozorování pod fluorescenčním mikroskopem

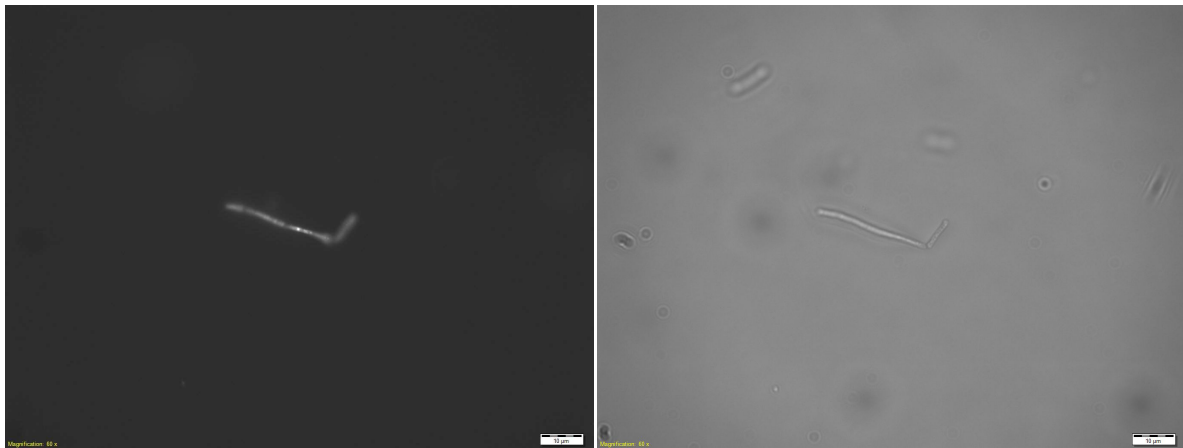
Obarvené fixované preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Snímky bakterií jsou zachyceny na Obrázcích 11, 12 a 13.



Obrázek 11: *Cupriavidus necator* H16 – fluorescence (nalevo) a transmise (napravo)



Obrázek 12: *Delftia acidovorans* – fluorescence (nalevo) a transmise (napravo)



Obrázek 13: *Bacillus megaterium* – fluorescence (nalevo) a transmise (napravo)

Všechny tři bakterie měly tyčinkovitý tvar. Svoji velikostí se jednotlivé buňky výrazně lišily. S produkcí PHA se buňky protahují do relativně velkých délek. Největší velikost měl *Bacillus megaterium* (asi 30 μm). *Cupriavidus necator* dosahoval délky asi 25 μm a nejmenší byla *Delftia acidovorans* s délkou asi 10 μm . Intenzita fluorescence odpovídala výsledkům naměřeným na průtokovém cytometru. Nejsilnější fluorescenci vykazoval *Cupriavidus necator* a nejnižší *Delftia acidovorans*.

Na základě porovnání producentů PHA bylo rozhodnuto, že další experimenty budou prováděny s kmenem *Cupriavidus necator* H16. Tento kmen vykazoval nejrychlejší růst

biomasy, vysoký intracelulární obsah PHA v biomase a vyprodukované PHA bylo snadno obarvitelné fluorescenční sondou Nile Red. *Cupriavidus necator* H16 je navíc považován za modelový mikroorganismus ve vztahu k metabolismu PHA a zároveň je uvažován pro průmyslovou biotechnologickou produkci PHA.

4.2 Stanovení biomasy v průběhu kultivace

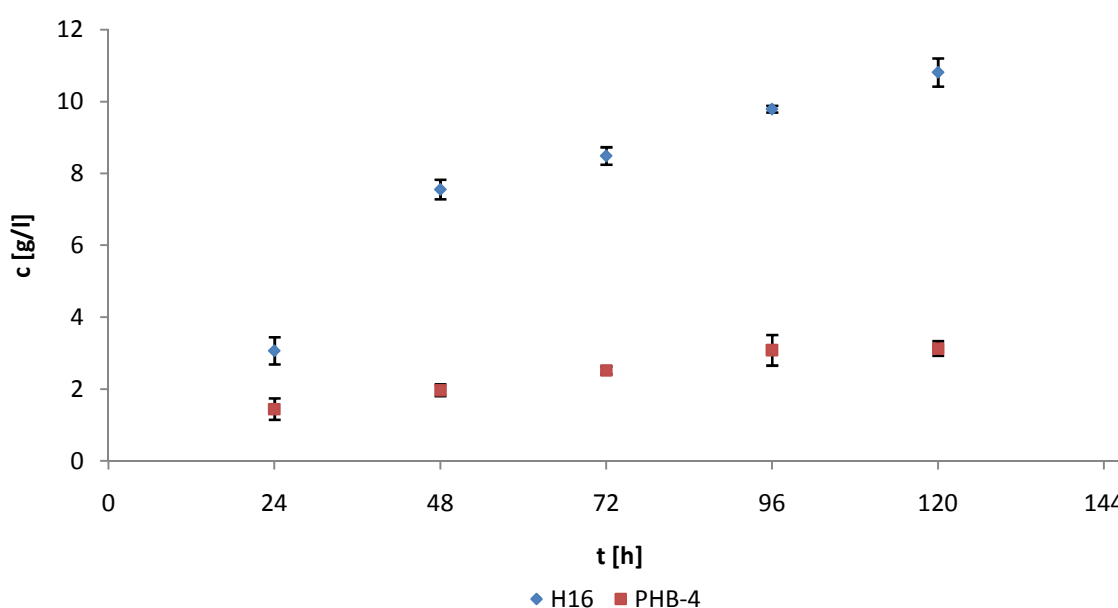
V průběhu jednoho týdne byl vždy po 24 hodinách stanovován obsah biomasy. Ze závislosti koncentrace biomasy na čase byla sestrojena růstová křivka pro oba kmeny *Cupriavidus necator*.

Tabulka 5: Stanovení biomasy u *Cupriavidus necator* H16

t [h]	X ₁ [g/l]	X ₂ [g/l]	X ₃ [g/l]	\bar{X} [g/l]	Smodch výběr
24	3,36	3,21	2,65	3,07	0,31
48	7,79	7,63	7,26	7,56	0,22
72	8,32	8,77	8,39	8,49	0,20
96	9,69	9,82	9,87	9,79	0,07
120	10,37	11,07	11,01	10,81	0,32

Tabulka 6: Stanovení biomasy u *Cupriavidus necator* PHB⁻4

t [h]	X ₁ [g/l]	X ₂ [g/l]	X ₃ [g/l]	\bar{X} [g/l]	Smodch výběr
24	1,75	1,15	1,45	1,45	0,25
48	2,06	2,08	1,79	1,98	0,13
72	2,65	2,49	2,44	2,53	0,09
96	2,62	3,46	3,18	3,08	0,35
120	2,90	3,26	3,24	3,13	0,17



Graf 2: Růstová křivka kmenů *Cupriavidus necator*

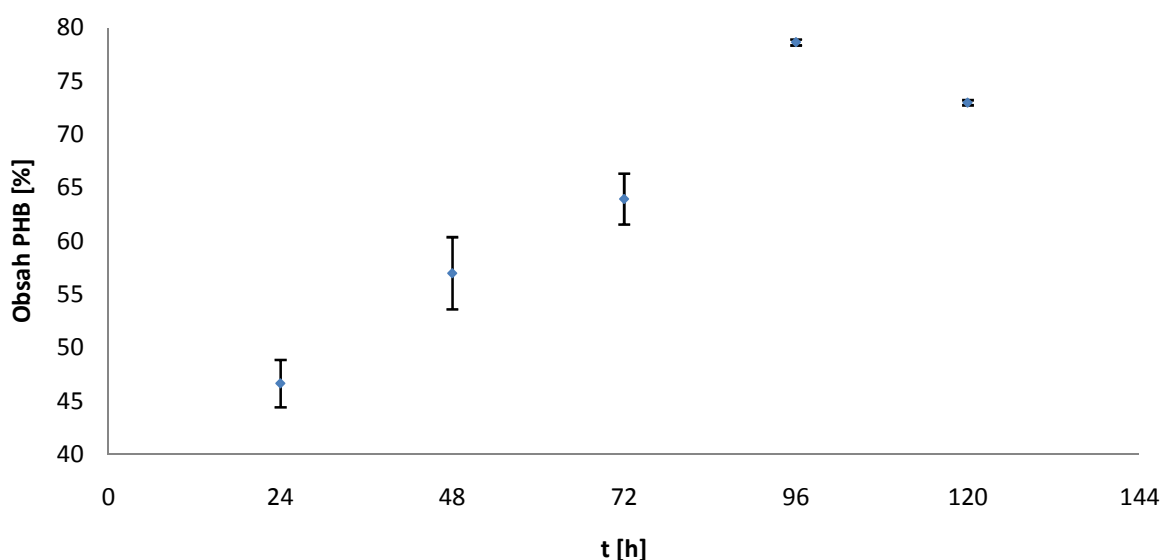
4.3 Stanovení PHA v biomase

V průběhu kultivace byl také stanoven intracelulární obsah PHA. Buňky *C. necator* H16 při růstu na minerálním médiu velice rychle akumulovali PHB, již po 24 h kultivace dosáhla intracelulární koncentrace 46,7 % suché hmoty buněk. Maximální množství PHA obsahovaly buňky po 96 h kultivace (79 %), poté pravděpodobně kultura vyčerpala uhlíkatý substrát v médiu a začala utilizovat PHA, protože obsah PHA v buňkách klesl na hodnotu 73%.

Tabulka 7: Stanovení obsahu PHA v biomase

t [h]	Obsah PHB [%]	Smodch
24	46,65	2,22
48	56,99	3,39
72	63,94	2,39
96	78,63	0,28
120	72,98	0,24

Závislost obsahu PHB na čase



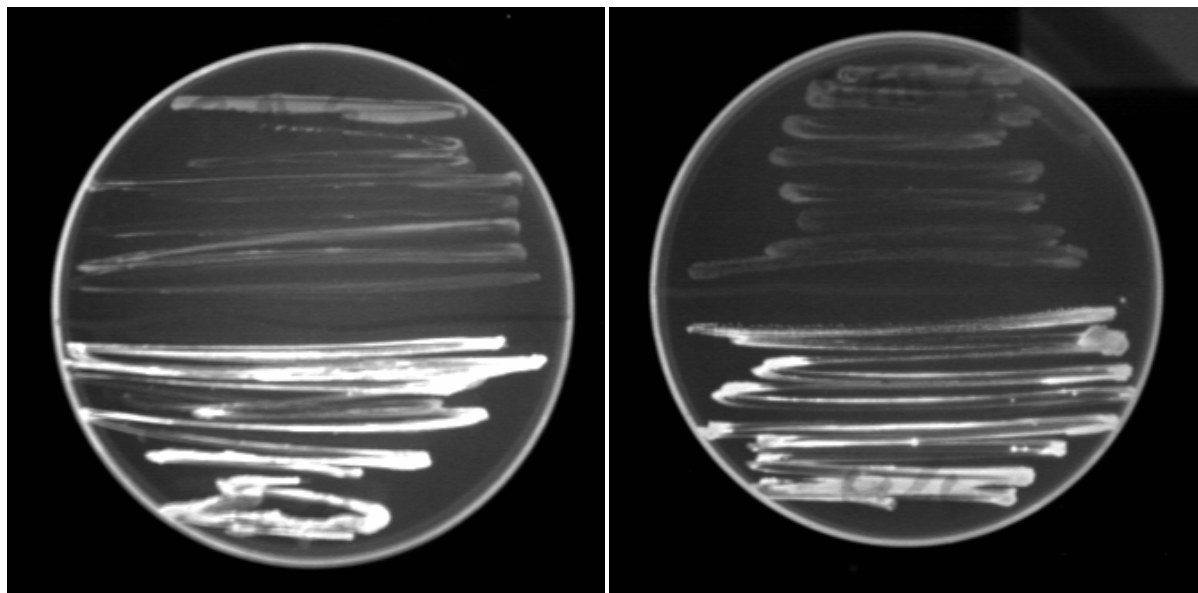
Graf 3: Závislost obsahu PHB na čase

4.4 Barvení živých buněk *Cupriavidus necator* H16 pomocí Nilské červeně

4.4.1 Intenzita barvení

Cílem tohoto experimentu bylo otestovat potenciální možnost barvení živých buněk pomocí NR. Konvenční barvení PHA produkujících buněk je založeno na fixaci buněčného preparátu ethanolem před aplikací barviva. Tento postup zajistí dostatečnou permeabilitu buněčné membrány pro barvivo, barvení je tedy velice senzitivní a ireversibilní. Na druhou

stranu tento postup inaktivuje prakticky všechny buňky ve vzorku. Pokud by se podařilo vyvinout postup pro barvení PHA produkujících buněk bez nutnosti fixace, našel by tento postup ve spojení se sortováním buněk celou škálu aplikací např. při selekci vysoce selektivních mutantů nebo při izolaci „nových“ PHA produkujících kmenů ze směsných bakteriálních konsorcií, případně při aplikaci viabilitní sondy kompatibilní s NR také při studiu zapojení PHA do stresové odezvy bakterií.

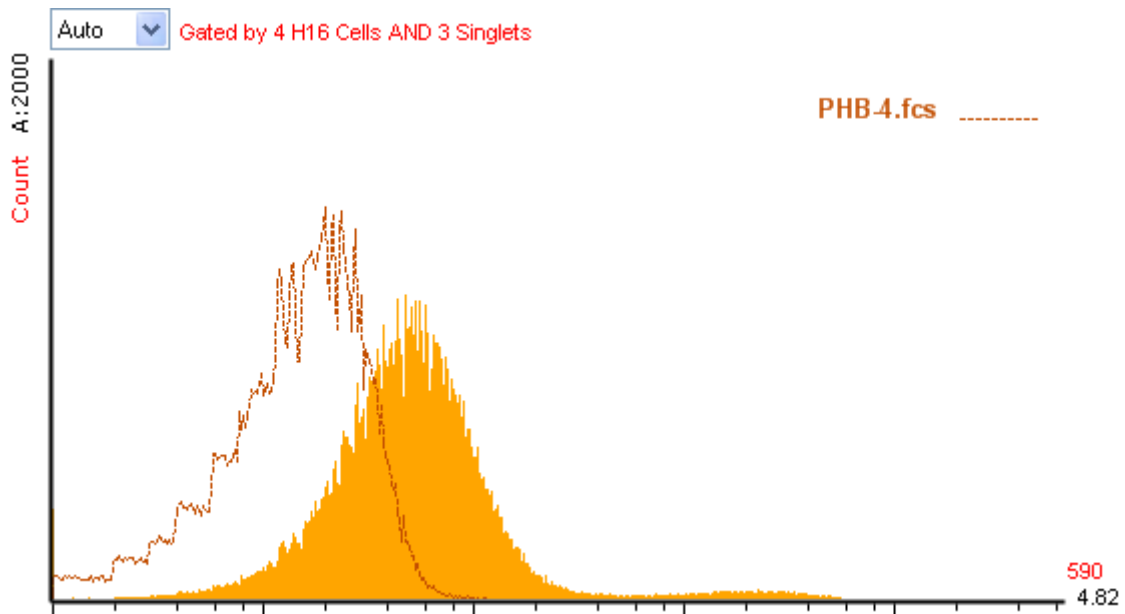


Obrázek 14: *Cupriavidus necator* PHB⁻4 (nahore) a *Cupriavidus necator* H16 (dole) na minerálním médiu s fruktózou a s přidavkem Nile Red pod UV analyzátozem. Na levé straně je navíc do média přidáno EDTA. Na pravé straně EDTA přidáno nebylo.

Viabilitní barvení Nilskou červení bylo již dříve popsáno pro kultivaci PHA produkujících kmenů při kultivaci na pevném médiu [34]. *C. necator* H16 při růstu na pevném médiu s přidavkem Nile Red pod UV zářením poskytuje fluorescenci, zatímco mutantní kmen *C. necator* PHB⁻4, který neprodukuje PHA, fluorescenci neposkytuje. Pro usnadnění prostupu Nile Red do buněk, bylo na jedné z Petriho misek v médiu 1mM EDTA. Na této misce je pak fluorescence intenzivnější.

Nicméně při submerzní kultivaci tento způsob barvení není možný, buňky pravděpodobně exkludují barvivo a intenzita barvení není dostačující k tomu, aby došlo k odlišení PHA akumulujících a neakumulujících buněk s využitím průtokové cytometrie (Obrázek 15).

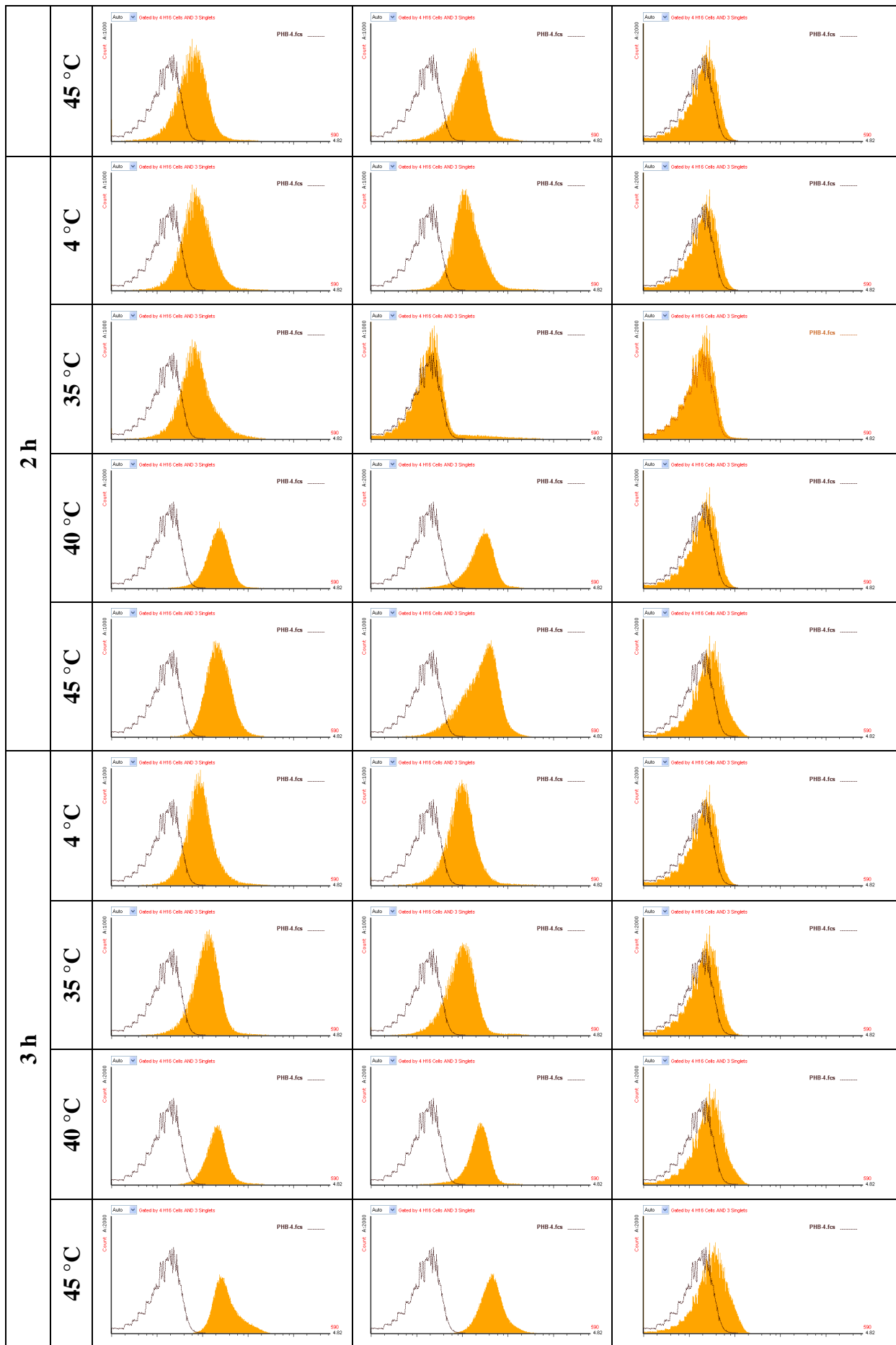
Zdá se tedy, že pokud jsou buňky kultivované submerzně za optimálních podmínek (30 °C) barvivo buď není schopno penetrovat buněčnou stěnu, nebo jsou buňky schopny barvivo aktivně exkludovat. Jednou z možností tedy bylo navýšit/snížit teplotu inkubace, což by mohlo mít negativní vliv, jak na propustnost buněčné stěny, tak případně na exkluzní mechanismus. Teplota nicméně byla udržována v rozmezí, ve kterém jsme neočekávali její okamžitý letální dopad na bakteriální buňky (4, 35, 40 a 45 °C). Výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 8.



Obrázek 15: Kmen *C. necator* H16 kultivovaný submerzně na minerálním médiu s fruktózou a s přidavkem Nile Red.

Tabulka 8: Vliv teploty na pronikání Nile Red do buňky

	<i>Cupriavidus necator</i> H16 barveno při inzulaci	H16 barveno v čase $t = 0$	<i>Cupriavidus necator</i> PHB 4 barveno při inzulaci
kontrola			
1 h	4 °C 	4 °C 	4 °C
	35 °C 	35 °C 	35 °C
	40 °C 	40 °C 	40 °C



Intenzita fluorescence závisí na prostupu Nile Red do buněk. Tento prostup podstatně závisí na teplotě a čase inkubace bakterií. Při snížení teploty na 4 °C intenzita barvení vzrostla jen nepatrně, a poté se v průběhu času prakticky nezměnila. O málo vyšší intenzitu měly buňky obarvené až před samotnou inkubací než buňky, které byly inkubovány na médiu s přídatkem Nile Red.

Při zvýšení teploty došlo k růstu intenzity fluorescence, který byl přímo úměrný navýšení teploty. Při měření po jedné hodině se intenzita změnila pouze minimálně. Píky neměly moc symetrický tvar a byly poměrně široké. Po dvou hodinách již byla změna intenzity výraznější a píky byly více symetrické. Intenzita signálu se při měření vzorku *C. necator* PHB⁻⁴ mírně zvýšila. Při teplotách 40 a 45 °C byl zřetelný rozdíl intenzit mezi oběma kmeny. Po třetí hodině již došlo jen k ustálení intenzity fluorescence u *C. necator* H16 a k dalšímu nárůstu intenzity u *C. necator* PHB⁻⁴.

Optimální podmínky pro obarvení PHA *in vivo* v bakterii *C. necator* jsou tedy na základě daného experimentu inkubace při 40-45 °C po dobu 2-3 hodin. Intenzita fluorescence však zdaleka nedosahuje takové intenzity, jako při barvení fixovaného preparátu, nicméně zdá se dostatečná k odlišení PHA produkujících buněk a případně také k separaci buněk s vysokým intracelulárním obsahem PHA.

4.4.2 Stanovení viability průtokovým cytometrem

Tabulka 9: Viabilita buněk po třech hodinách kultivace při různých teplotách

t [°C]	Počet živých buněk [%]
4	95,05
35	98,67
40	96,18
45	91,26

Z Tabulky 9 je patrné, že i malé změny teploty mají vliv na viabilitu bakterie. Pokles životaschopnosti však není natolik výrazný, abychom nemohli tvrdit, obarvené buňky zůstali živé.

4.4.3 Stanovení viability plotnovou metodou

Tabulka 10: Viabilita buněk po třech hodinách kultivace při různých teplotách

t [°C]	Miska			Průměr	Smodch výběr	KTJ*/ml
	1	2	3			
Kontrola (30 °C)	19	27	27	24	4,62	2,43·10 ⁹
4	33	47	31	37	8,72	3,70·10 ⁹
35	84	65	66	72	10,69	7,17·10 ⁹
40	95	78	70	81	12,77	8,10·10 ⁹
45	102	90	117	103	13,53	1,03·10 ¹⁰

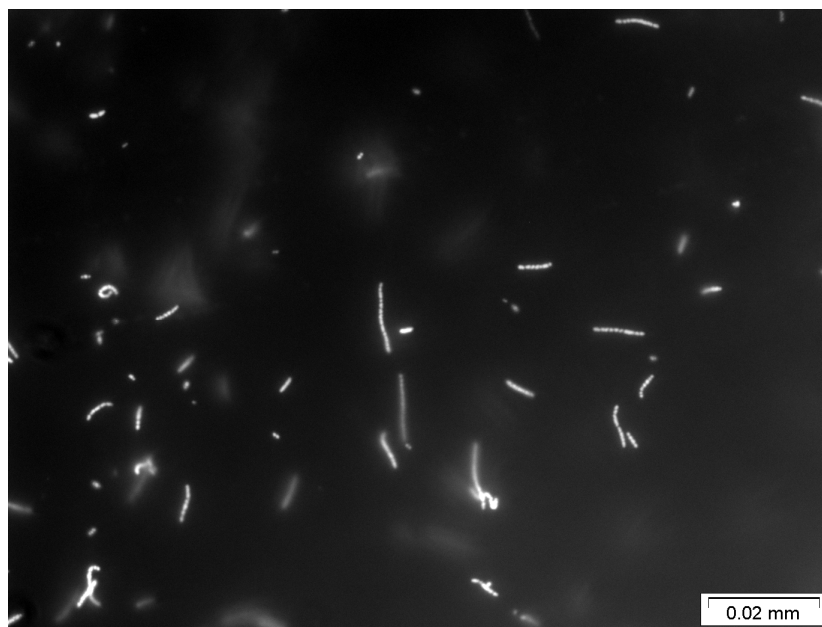
*KTJ – kolonie tvořící jednotka

Počty KTJ, ve vzorcích při různých teplotách, byly vyšší než v kontrolním vzorku. Lze tedy předpokládat, že použité teploty neměly negativní účinek na růst bakterií.

4.5 Pozorování granulí PHA pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu

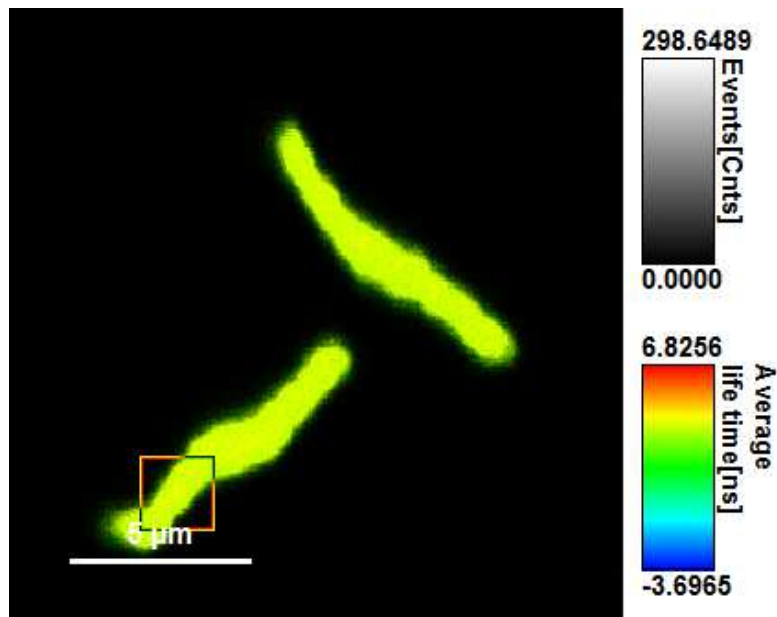
Studium geneze vzniku PHA granulí vyžaduje využití pokročilých mikroskopických technik. Proto byly v rámci této bakalářské práce otestovány některé mikroskopické techniky s výhledem na možnou potenciální aplikaci těchto metod, při podrobné studii morfologie a lokalizace PHA granulí v rámci jedné konkrétní buňky.

První technikou byla fluorescenční mikroskopie, fixované buňky byly barveny Nilskou červení, jak bylo popsáno v kapitole 3.8. Excitace probíhala při vlnové délce 365 nm a fluorescence byla snímána pomocí long-pass filtru (390 nm). Bylo možné pozorovat jednotlivé buňky, a v některých případech bylo možné dokonce pozorovat jednotlivé granule uvnitř buněk, jako jasné světlé body. Nicméně samotná fluorescenční mikroskopie neposkytuje dostatečné rozlišení a přiblížení pro podrobnější studium morfologie a lokalizace PHA granulí v buňce.



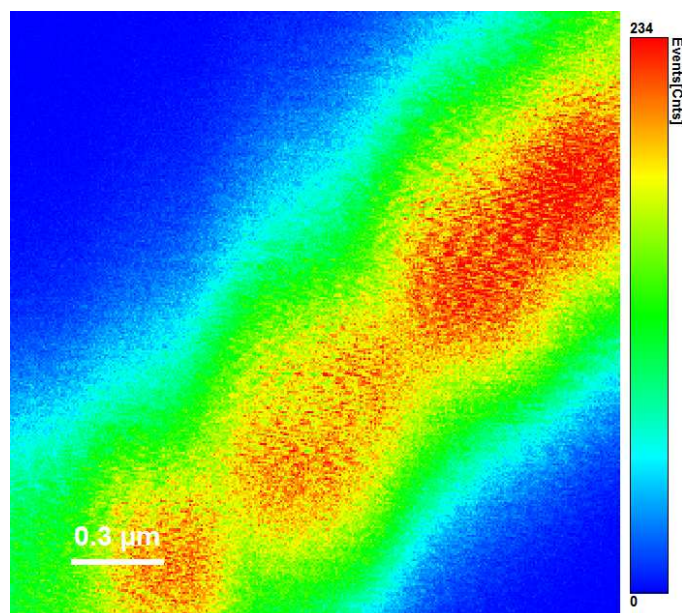
Obrázek 16: Buňky *C. necator* H16 pozorované pod fluorescenčním mikroskopem

Podrobnější studium intracelulárních PHB granulí je možno provést pomocí skenu v režimu FLIM (Fluorescence Life-Time Imaging). Excitace probíhala stejně jako v předchozím případě při vlnové délce 365 nm a fluorescence byla detekována pomocí long-pass filtru (390 nm). Obrázek 17 představuje hrubý sken kombinující jak informaci o intenzitě fluorescence tak o dobách života fluorescence.



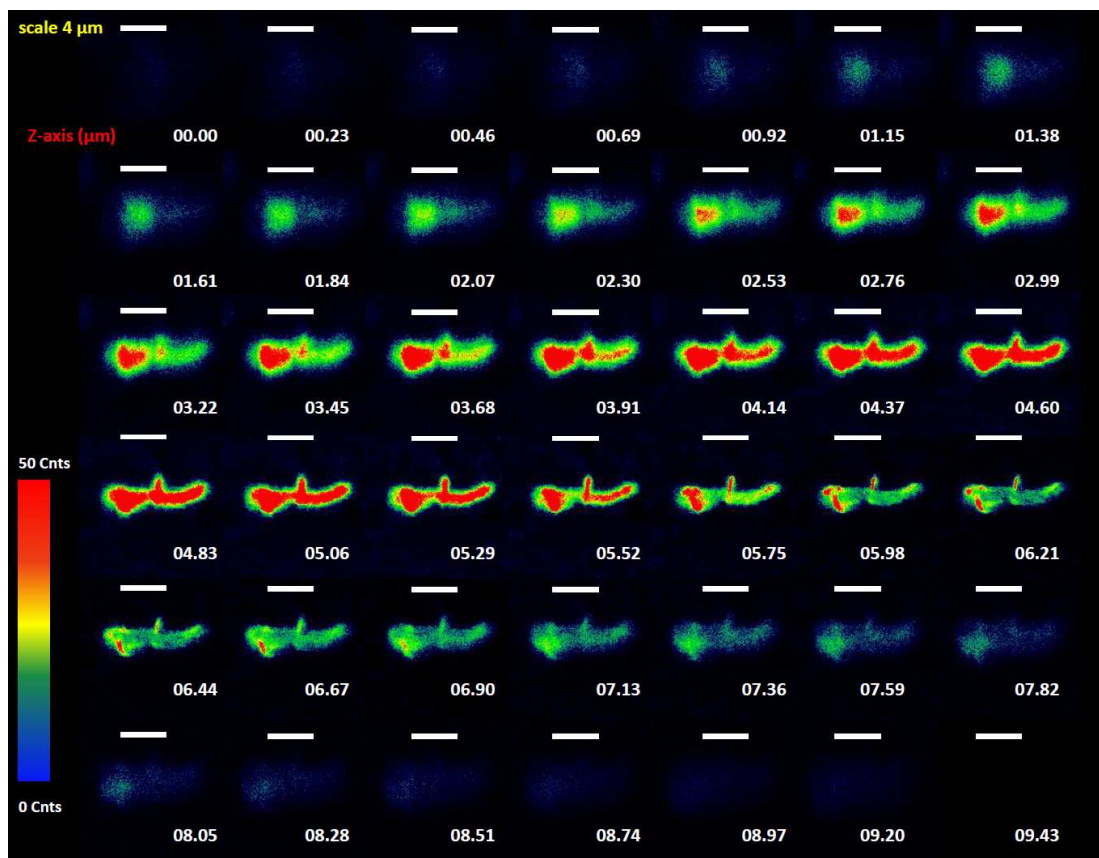
Obrázek 17: Buňky *C. necator* H16 pozorované, sken v režimu FLIM, hybridní obrázek kombinující jednak intenzitu fluorescence tak dobu života fluorescence

Na Obrázku 18 je možné pozorovat detail pro oblast označenou v Obrázku 17. V tomto případě byla detekována jen intenzita fluorescence. Je možné pozorovat jednotlivé granule a jejich lokalizaci v cytoplazmě.



Obrázek 18: Buňky *C. necator*, výřez pro Obrázek 17, znázornění dle intenzity fluorescence

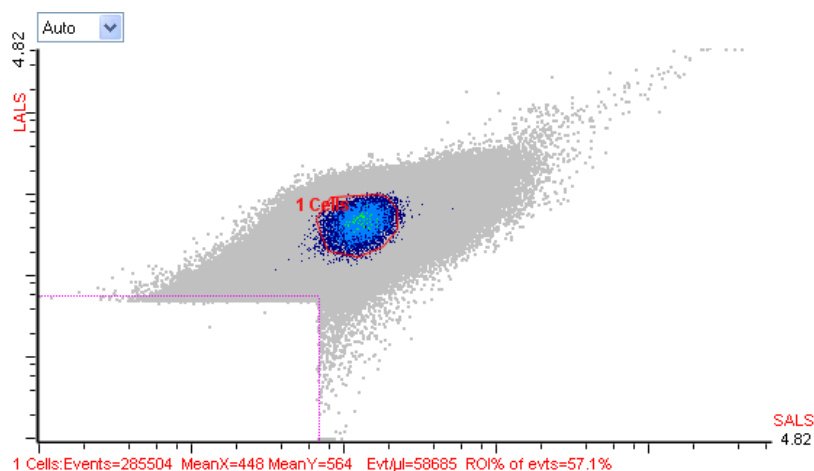
Morfologii granulí a jejich lokalizaci je možné pozorovat také ve třírozměrném prostoru, pokud se provede skenování jedné buňky v různých bodech pomyslné roviny z, jak je patrné z Obrázku 19. Pokročilá fluorescenční mikroskopie tedy je velice silným nástrojem, který může výrazně napomoci při studiu PHA granulí ve smyslu jejich lokalizace, morfologie, případně taky geneze jejich vzniku.



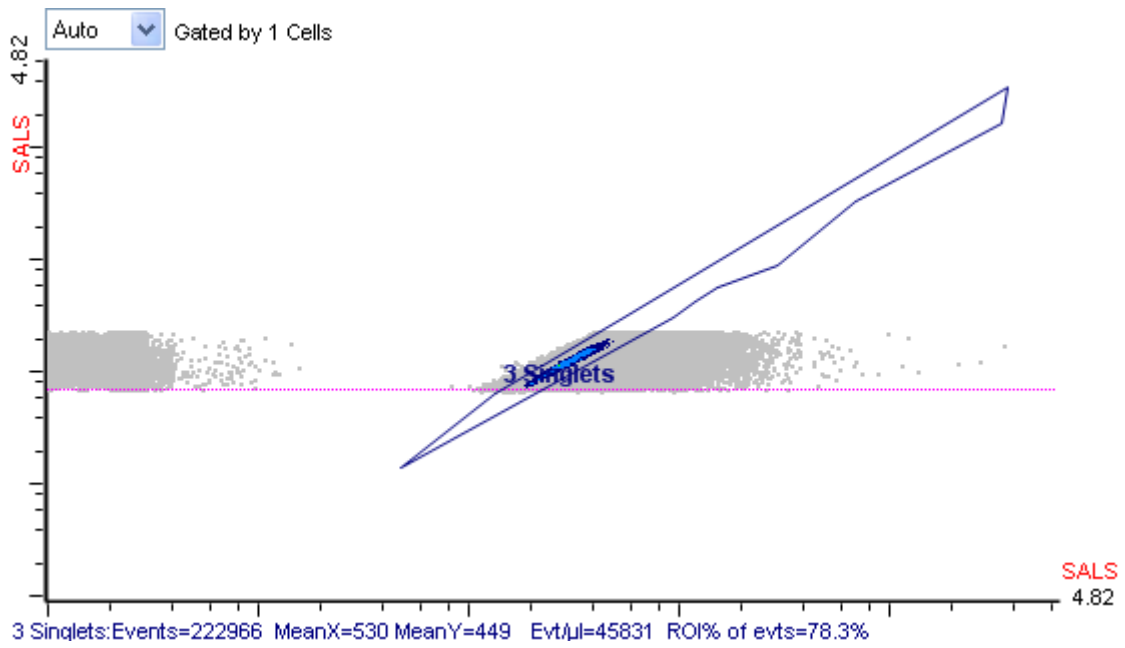
Obrázek 19: Buňka *C. necator* H16, řezy v rovině z po 0.23 μm , intenzita fluorescence vztažena na řez v bodě 4.60 μm .

4.6 Stanovování viability průtokovou cytometrií

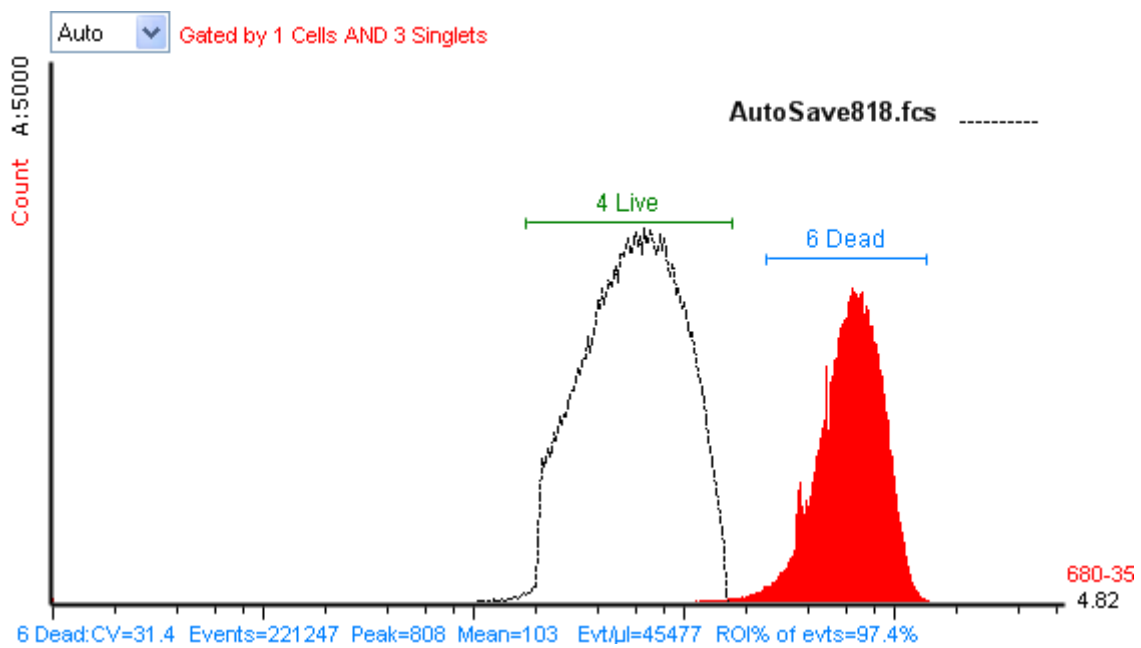
Průtoková cytometrie byla v rámci této bakalářské práce využita ke stanovení viability buněk *C. necator* vystavených různým exogenním stresům a k posouzení zapojení PHA do stresové odpovědi této bakterie. K tomuto účelu bylo optimalizováno barvení buněk pomocí propidium jodidu a následná analýza na průtokovém cytometru tak, jak je popsáno v kapitole 3.9.



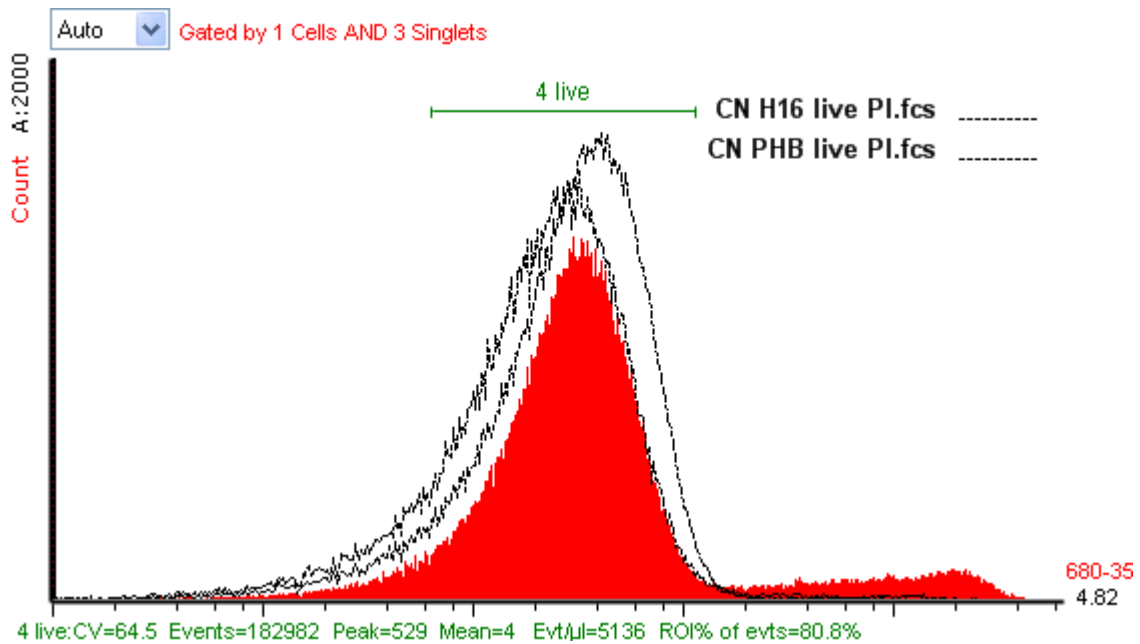
Obrázek 20: Označená populace na kanálech (SALS – Small angle light scattering, LALS – large angle light scattering)



Obrázek 21: Označená populace singletů



Obrázek 22: Histogram při měření mrtvých buněk při PMT 900 – osa x znázorňuje intenzitu signálu na červeném kanálu a osa y počet daných signálů. Reference (čárkovaně) zobrazuje pík z předchozího měření živých buněk.



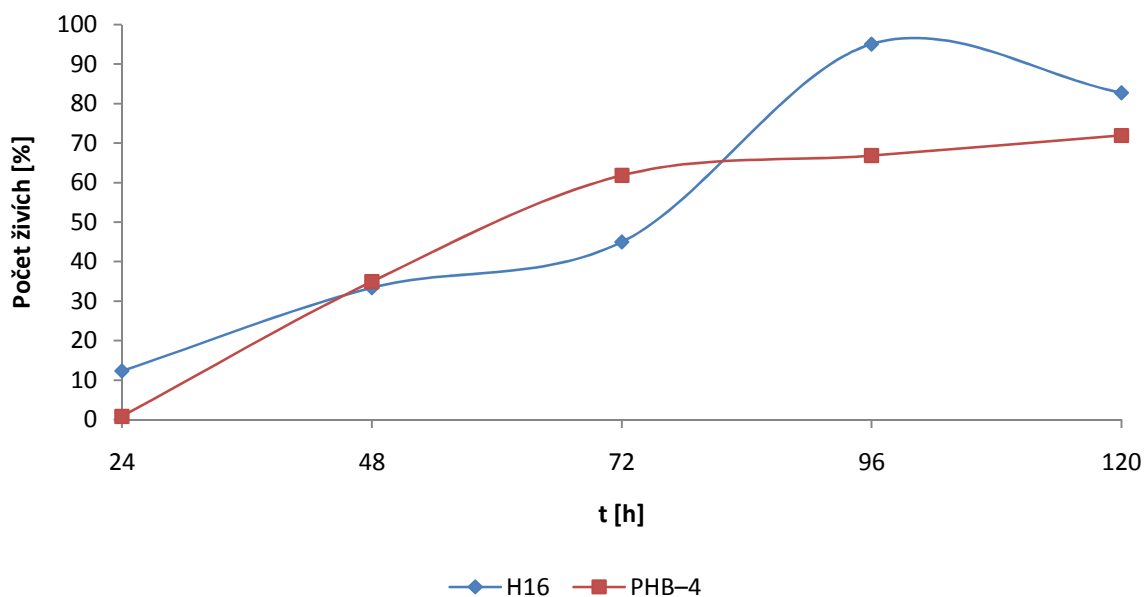
Obrázek 23: Histogram při měření směsi živých a mrtvých buněk. Obsah živých buněk je 80,8 %.

4.6.1 Ethanolový stres

Prvním testovaným stresovým faktorem byl ethanol. Jedná se o malou molekulu, která je schopna samovolně penetrovat bakteriální stěnu, navíc se jedná o metabolický produkt řady anaerobních mikroorganismů, je tedy vysoce pravděpodobné, že v přirozeném prostředí může ethanol působit jako přirozený stresový faktor. Ethanol byl aplikován v koncentraci 5 % a po 15 minutách od aplikace byla posouzena viabilita buněk *C. necator* H16 a *C. necator* PHB-4 submerzně kultivovaných 24, 48, 72, 96 a 120 hodin v minerálním médiu s fruktózou jako jediným uhlíkatým substrátem.

Tabulka 11: Procenta živých buněk po působení 5% ethanolu 15 minut v závislosti na době od inokulace

t [h]	počet živých buněk [%]	
	H16	PHB-4
24	12,33	0,77
48	33,33	34,89
72	44,93	61,81
96	95,04	66,8
120	82,71	71,96



Graf 4: Procenta živých buněk po působení 5% ethanolu 15 minut v závislosti na době od inokulace u jednotlivých kmenů bakterie *Cupriavidus necator*

Z Grafu 4 je patrná značná proměnlivost odolnosti vůči 5% ethanolu. Rozpětí viability v rámci všech měření je velmi široké. Odolnost obou kmenů je po 24 hodinách malá a mírně odolnější je *C. necator* H16. Malá odolnost je pravděpodobně způsobená nedostatečným vyvinutím buněk a neúplným buněčným obsahem. Dále se odolnost v průběhu týdne zvyšuje až do dosažení hodnoty 70-80 % živých buněk. Po 48 hodinách je odolnost obou kmenů stejná, a po 72 hodinách odolnost *C. necator* PHB⁻4 je dokonce větší než u kmene produkujícího PHA. Naopak po 96 a 120 hodinách již kmen *C. necator* H16 je výrazně odolnější.

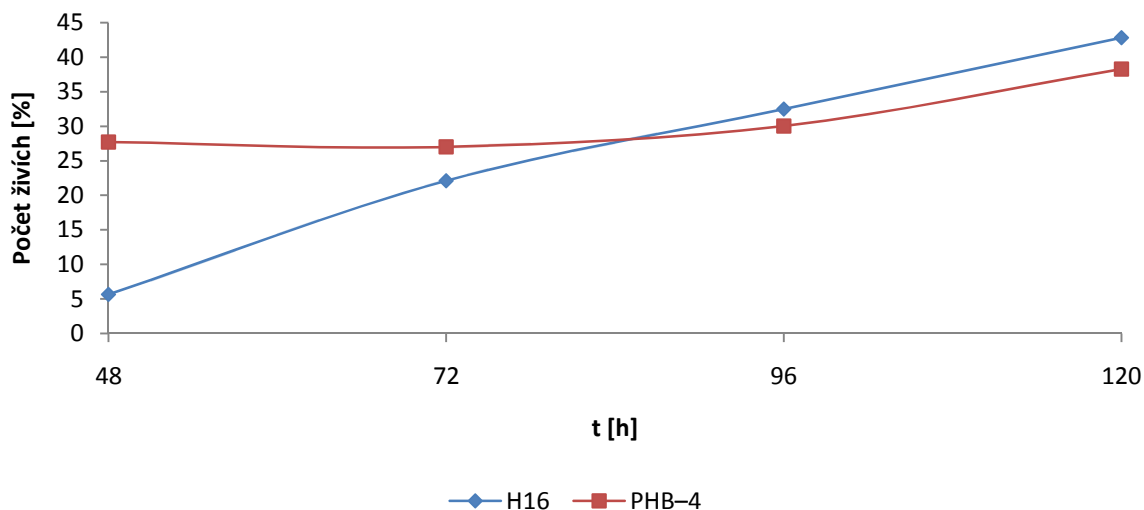
U kmene *C. necator* PHB⁻4 křivka odolnosti opisuje růstovou křivku (Graf 2), zatímco u kmene *C. necator* H16 se křivka podobá křivce obsahu PHB na čase (Graf 3). Na základě toho lze předpokládat, že produkce PHA výrazně ovlivňuje odolnost vůči ethanolu. Poměrně nízká odolnost kmene *C. necator* H16 po 48 a 72 hodinách lze vysvětlit tak, že metabolické dráhy mikroorganismu jsou nastaveny na produkci PHA. Následně v hodinách 96 a 120, kdy postupně v médiu dochází k limitaci uhlíkem a kmen prakticky přestane produkovat PHA, stane se odolnějším. Zvýšená odolnost může být důsledkem možností metabolizovat PHA a získanou energii využít k pokrytí energetických nákladů stresové odezvy.

4.6.2 Teplotní šok

Dalším testovaným stresovým faktorem byla vysoká teplota. Zvýšením teploty nad optimální teplotu dochází k výraznému snížení rychlosti růstu až do dosažení letální teploty, kdy rychlost růstu dosáhne téměř nulové hodnoty a buňky začnou umírat. Teplotní šok vytvoří díry v membráně a inaktivuje citlivé enzymy a ribozomy [36]. V experimentu byl teplotní šok proveden umístěním 1 ml kultury v mikrozkuhavce do vodní lázně vyhřáté na 60 °C a po 10 minutách byla posouzena viabilita buněk *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁻4 submerzně kultivovaných 48, 72, 96 a 120 hodin v minerálním médiu s fruktózou jako jediným uhlíkatým substrátem.

Tabulka 12: Procenta živých buněk po působení teploty 60 °C 10 minut v závislosti na době od inokulace

t [h]	počet živých buněk [%]	
	H16	PHB ⁻ 4
48	5,66	27,71
72	22,10	27,00
96	32,48	30,03
120	42,81	38,25



Graf 5: Procenta živých buněk po působení teploty 60 °C 10 minut v závislosti na čase u jednotlivých kmenů bakterie *Cupriavidus necator*

Graf 5 ukazuje, že působení 60 °C po dobu 10 minut má na oba kmeny silný smrtící účinek. Zatímco u kmene *C. necator* PHB⁻4 se v průběhu času odolnost vůči stresu nemění nebo jen mírně roste, tak u kmene *C. necator* H16 se odolnost v daném období rostla téměř lineárně. Při měření po 48 a 72 hodinách byl kmen *C. necator* PHB⁻4 odolnější. V čase 96 a 120 hodin je vyšší odolnost kmene *C. necator* H16. Rozdíl v odolnosti je však minimální oproti odolnosti vůči ethanolu ve stejných časech.

4.6.3 Stresový faktor – změna pH

Dalším testovaným stresovým faktorem byla změna pH. Vnější pH ovlivňuje jednak růst mikroorganismů, ale také regulační procesy metabolismu, což vede ke změně poměru jeho hlavních produktů. Vodíkový kation ani hydroxylový anion nemohou však volně difundovat cytoplazmatickou membránou a dostávají se do buňky i z buněk pouze prostřednictvím vratného aktivního transportu. Proto tyto ionty ovlivňují především aktivitu extracelulárních enzymů a funkce cytoplazmatické membrány, tj. především mechanismy transportu látek. Vnitrobuněčné pH se mění v souvislosti se změnou pH prostředí jen málo. [15]

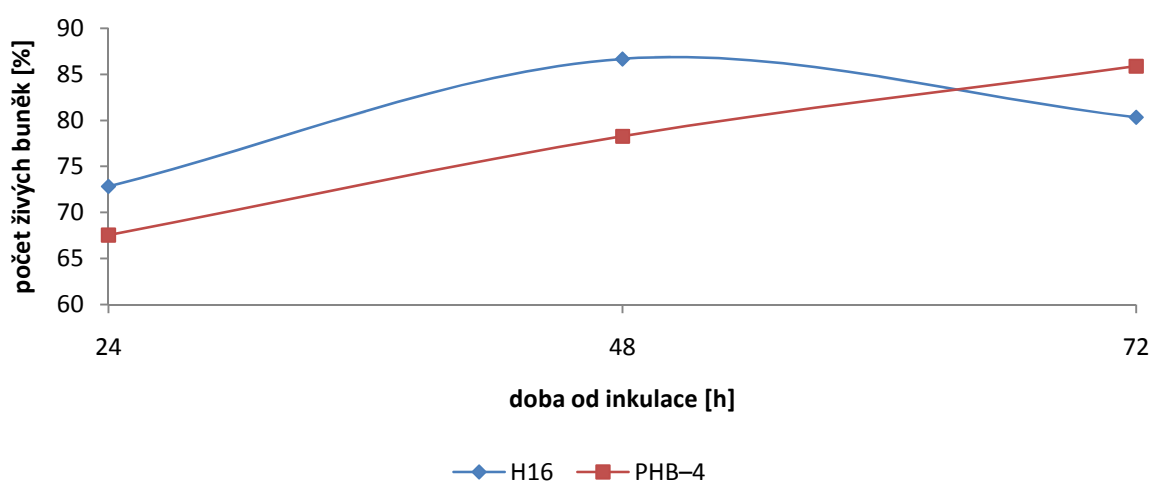
HCl nebo NaOH bylo aplikováno v koncentraci 0,01 nebo 0,1 mol·dm³ a po 60 minutách od aplikace byla posouzena viabilita buněk *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁻4 submerzně

kultivovaných 24, 48 a 72 hodin v minerálním médiu s fruktózou jako jediným uhlíkatým substrátem.

Tabulka 13: Procenta živých buněk po působení daného stresového faktoru v závislosti na době od inokulace

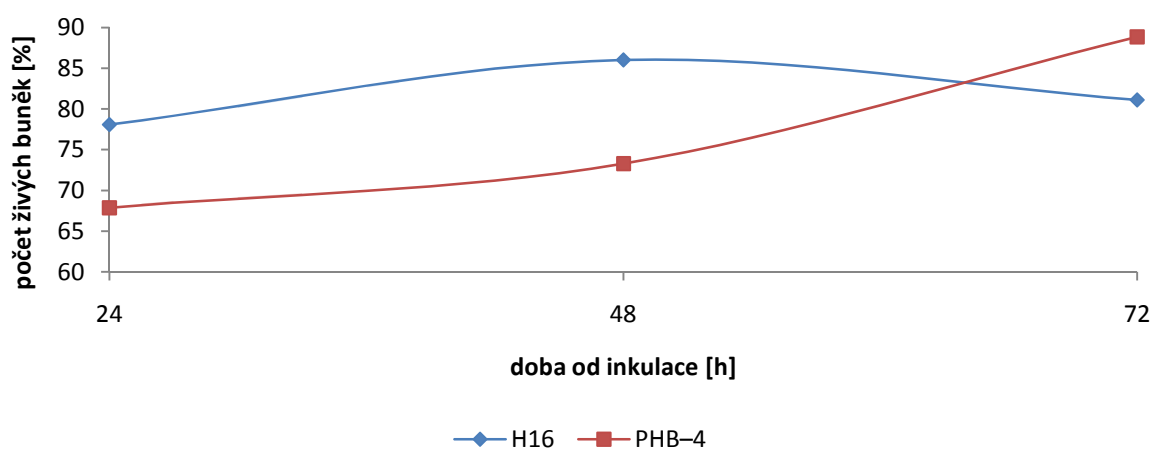
t [h]	počet živých buněk [%]					
	0,01 M HCl 60 minut		0,01 M NaOH 60 minut		0,1 M NaOH 60 minut	
	H16	PHB ⁻ 4	H16	PHB ⁻ 4	H16	PHB ⁻ 4
24	72,82	67,54	78,07	67,87	neměřeno	
48	86,67	78,29	86,01	73,29	14,03	8,07
72	80,34	85,9	81,09	88,84	4,68	8,51

0,01 M HCl po dobu 60 minut



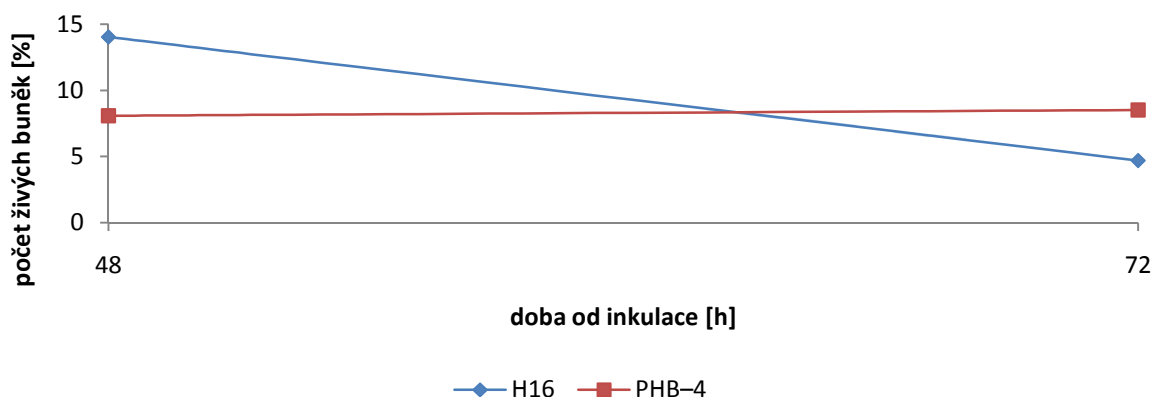
Graf 6: Procenta živých buněk po působení 0,01 M HCl po dobu 60 minut v závislosti na době od inokulace u jednotlivých kmenů bakterie *Cupriavidus necator*

0,01 M NaOH po dobu 60 minut



Graf 7: Procenta živých buněk po působení 0,01 M NaOH po dobu 60 minut v závislosti na době od inokulace u jednotlivých kmenů bakterie *Cupriavidus necator*

0,1 M NaOH po dobu 60 minut



Graf 8: Procenta živých buněk po působení 0,01 M NaOH po dobu 60 minut v závislosti na době od inokulace u jednotlivých kmenů bakterie *Cupriavidus necator*

Průběh křivek v Grafech 6, 7 a 8 je z hlediska posouzení vlivu schopnosti akumulovat PHA na odolnost prakticky identický. Při měření po 24 a 48 hodinách měl kmen *C. necator* H16 výrazně vyšší odolnost než *C. necator* PHB⁻4. Situace se však změnila v 72 hodině, kdy odolnost *C. necator* H16 klesla, zatímco odolnost mutantního kmene stále rostla. Tento jev může být způsobený tím, že při produkci PHA se buňka protahuje, tedy zvětšuje svůj povrch. To může negativně ovlivnit buněčnou stěnu, která poté při exogenním stresu vodíkovými kationty nebo hydroxylovými anionty, může být zranitelnější, než u kmene neprodukcující PHA.

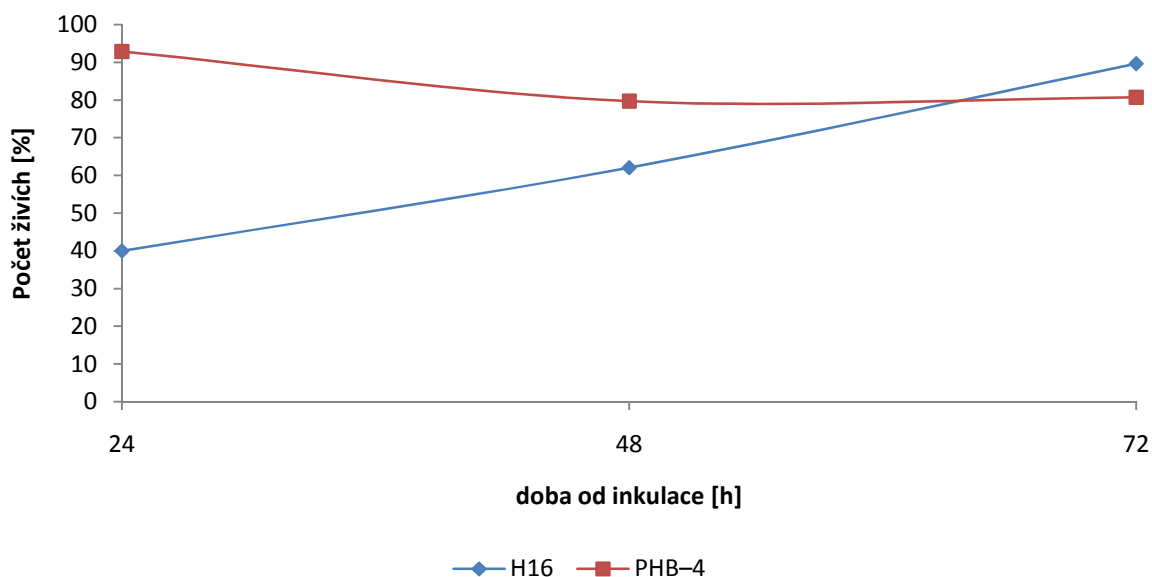
4.6.4 Stresový faktor – zmražení

Posledním testovaným stresovým faktorem bylo zmrazování. Zmražení, zejména pomalé, způsobuje tvorbu ledových krystalků v buňkách. Krystaly vody jednak zvětšují svůj objem, a jednak mají ostré hrany způsobující trhání buněčných struktur. Kromě toho, ale dochází i k vymrznání vody z cytoplasmy, které způsobuje velmi rychlé zahuštění buněčného roztoku. Ten následně může mít tak vysokou koncentraci, že bude pro samou buňku toxický.

Suspenze buněk byla umístěna do mrazícího boxu s teplotou -30 °C a po 60 minutách a následném rozmrznutí byla posouzena viabilita buněk *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁻4 submerzně kultivovaných 24, 48 a 72 hodin v minerálním médiu s fruktózou jako jediným uhlíkatým substrátem.

Tabulka 14: Procenta živých buněk po zmražení na -30 °C po dobu 60 minut v závislosti na době od inokulace

t [h]	počet živých [%]	
	H16	PHB ⁻ 4
24	39,94	92,82
48	62,05	79,68
72	89,59	80,69



*Graf 9: Procenta živých buněk po působení stresového faktoru v závislosti na době od inkulace u jednotlivých kmenů bakterie *Cupriavidus necator**

Z Grafu 9 je zřejmé, že v prvních 48 hodinách je vůči zmrznutí odolnější kmen *C. necator* PHB⁻4. Odolnost tohoto kmene však s časem mírně klesá, zato odolnost kmene *C. necator* H16 výrazně roste s nárůstem obsahu PHB a v 72. hodině se kmen jevil odolnější. Důvodem opět může být nastavení metabolických drah na produkci PHA, a až při snížení koncentrace uhlíku v mediu dojde ke zvýšení odolnosti kmene. Je možné, že vliv na zvýšení odolnosti vůči mrazu má také redukce volného cytoplasmatického prostoru v důsledku jeho zaplnění PHA granulemi.

5 ZÁVĚR

- V rámci této bakalářské práce byly testovány vybrané bakterie, jejichž schopnost akumulace PHA je popsána v literatuře – *Bacillus megaterium*, *Delftia acidovorans* a *Cupriavidus necator*. Všechny tyto bakterie byly schopny produkovat PHA ve formě intracelulárních granulí, které je možné při barvení fluorescenční sondou Nilská červeně pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu případně pomocí průtokové cytometrie. Podle obou ukazatelů se jako nejlepší producent jeví kmen *Cupriavidus necator* H16. Jelikož je tento kmen považován za modelový mikroorganismus ve vztahu k metabolismu PHA a navíc je možné komerčně zakoupit mutantní kmen neschopný produkce PHA, byl pro potřeby této bakalářské práce, jejíž hlavním cílem je studium zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi mikroorganismů, zvolen právě kmen *Cupriavidus necator*.
- *Cupriavidus necator* H16 při kultivaci na minerálním médiu s fruktózou jako uhlíkatým substrátem intenzivně akumuloval PHB až do 96. hodiny kultivace, kdy obsah PHA v buňkách dosáhl maxima – 79 % obsahu suché biomasy. Následně pravděpodobně došlo k vyčerpání uhlíkatého substrátu a bakteriální kultura začala metabolizovat PHA, protože obsah PHA v buňkách poklesl.
- Dalším parciálním úkolem této bakalářské práce bylo studium možnosti barvení živých PHA akumulujících buněk pomocí Nilské červeně. Konvenční barvení totiž využívá fixace preparátu pomocí ethanolu, což inaktivuje drtivou většinu buněk vzorku. Přímá aplikace barviva do kultivačního média je účinná při kultivaci na pevném médiu, nicméně při submerzní kultivaci je pomocí průtokové cytometrie prakticky nemožné odlišit PHA akumulující buňky od PHA neprodukujících. Penetrace barviva do viabilních buněk je nicméně možná při zvýšené teplotě – 40-45 °C. Tato teplota není vůči buňkám letální, pravděpodobně však částečně naruší strukturu buněčné membrány, případně inhibuje exkreční mechanismy, takže je možné odlišit PHA akumulující buňky s využitím průtokové cytometrie. Tato skutečnost může mít řadu aplikací především při selekci potenciálních průmyslových producentů s využitím FACS.
- Konfokální mikroskopie buněk barvených pomocí Nilské červeně a fixovaných v agarózovém gelu je velice silným nástrojem umožňujícím analýzu lokalizace PHA granulí v rámci buněk případně morfologie granulí nebo také geneze jejich vzniku.
- V rámci této bakalářské práce byla využita průtoková cytometrie k porovnání stresové odezvy bakterie *Cupriavidus necator* H16 a mutantního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻⁴ neschopného akumulace PHA. Za tímto účelem bylo optimalizováno barvení pomocí propidium jodidu. Bohužel propidium jodid není díky spektrálnímu překryvu kompatibilní s Nilskou červení a proto nemohlo být současně použito i viabilní barvení PHA produkujících buněk vyvinuté v rámci této bakalářské práce.
- Zdá se, že schopnost akumulace PHA navyšuje odolnost vůči ethanolu, vysoké teplotě a mražení především v pozdější fázi růstové křivky, kdy intracelulární obsah PHA v buňkách dosahuje svého maxima. Je pravděpodobné, že kultura v této fázi snadno využívá PHA jako energetický zdroj pro pokrytí energetických nákladů spojených se stresovým metabolismem.

- Je velice pravděpodobné, že do stresové odpovědi se silně promítá i změna morfologie buněk doprovázejících akumulaci PHA – obecně platí, že buňky se protahují, vzrůstá tak jejich povrch, nicméně intracelulární cytoplazmatický prostor se vyplňuje PHA granulemi, takže objem volné cytoplazmy je spíše menší. Je možné, že právě nárůst povrchu buněk je zodpovědný za nižší viabilitu PHA akumulujících buněk při expozici kyselému nebo zásaditému prostředí. Naopak redukce obsahu volného cytoplazmatického prostoru má pravděpodobně pozitivní vliv při vzniku ledových krystalů v průběhu mražení.
- Stresová odezva mikroorganismů je komplexní proces a proto jsou potřeba další experimenty zaměřené nejen na propojení metabolismu PHA a stresově-adaptačních metabolických procesů, ale je také potřeba vzít v potaz vliv schopnosti akumulace PHA na morfologii buněk a fyzikálně-chemické vlastnosti cytoplazmy. Metodologie vyvinutá v rámci této bakalářské práce může být využita v těchto dalších studiích.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SMART, K.A., CHAMBERS, K.M., LAMBERT, I., JENKINS, C. (1999) Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 57, 18-23.
- [2] HUTTER, K.J., GOHDE, W. and Emeis, C. (1975) Untersuchungen über die DNS-, RNS- und Proteinsynthese ausgewählter Mikroorganismenpopulationen mit Hilfe der Zytophotometrie und der Impulscytophotometrie. 1. Mitteilung : Methodische Untersuchungen über geeignete Farbverfahren. *Chem, Mikrobiol. Technol. Lebensm* 4, 29–32.
- [3] KELLER, Martin a Karsten ZENGLER. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 2004, roč. 2, č. 2, s. 141-150. ISSN 1740-1526. DOI: 10.1038/nrmicro819. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrmicro819>
- [4] DIAPER, J.P., K. TITHER a C. EDWARDS. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, roč. 38, č. 2, s. -. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/BF00174481. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00174481>
- [5] BRANSKÁ, B., M. LINHOVÁ, P. PATÁKOVÁ, L. PAULOVÁ a K. MELZUCH. STANOVENÍ VIABILITY MIKROORGANISMŮ POMOCÍ FLUORESCENČNÍ ANALÝZY. *Chemické listy*. 2011, č. 105, s. 586-593. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [6] FIŠAR, Zdeněk. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH. *Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze* [online]. 2009, 22.2.2009 [cit. 2013-03-09]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>
- [7] NOVÁK, J., G. BASAŘOVÁ, J. FIALA a P. DOSTÁLEK. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE VE VÝZKUMU KVASINEK *Saccharomyces cerevisiae* A JEJÍ APLIKACE V PRAXI. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 183-187. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_03_183-187.pdf
- [8] MÜLLER, Susann a Hazel DAVEY. Recent advances in the analysis of individual microbial cells. *Cytometry Part A*. 2009, 75A, č. 2, s. 83-85. ISSN 15524922. DOI: 10.1002/cyto.a.20702. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20702>
- [9] SHAPIRO, Howard M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003, 1, 681 p. ISBN 04-714-1125-6.
- [10] RAHMAN, Misha. SEROTEC. *Introduction to Flow Cytometry*. Kidlington, 2005. Dostupné z: <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- [11] HERZENBERG, Leonard A.; SWEET, Richard G.; HERZENBERG, Leonore A. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am*, 1976, 234.3: 108-117.
- [12] SPRING, Kenneth R. Fluorescence Microscopy. *Encyclopedia of Optical Engineering*. 2003, s. 548-555. ISSN 9780824709402. Dostupné z: http://www.microscopyu.com/references/pdfs/Spring_Fluorescence_Microscopy.pdf

- [13] JENDROSSEK, Dieter. Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria. *Biomacromolecules*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 598-603. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm049441r.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049441r>
- [14] WALKER G.M.: Yeast – Physiology and Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9
- [15] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [16] MARLES-WRIGHT, Jon a Richard J LEWIS. Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007, roč. 17, č. 6, s. 755-760. ISSN 0959440x. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.08.004.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X0700111X>
- [17] HALDENWANG, William G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological reviews*, 1995, 59.1: 1-30.
- [18] NIES D.H. Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria, *Archives of Microbiology*, 2004, vol. 181, 255-268 p. ISSN 1432-072X.
- [19] STORZ, Gisela a Regine HENGGE. *Bacterial stress responses*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, c2011, xv, 506 p. ISBN 15-558-1621-5.
- [20] FILLOUX, Alain. *Bacterial Regulatory Networks*. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press, c2012, xiii, 353 p., 15 p. of plates. ISBN 19-082-3003-7.
- [21] STANLEY, D., A. BANDARA, S. FRASER, P.J. CHAMBERS a G.A. STANLEY. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, č. 109, s. 13-24. ISSN 13645072. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>
- [22] FLICKINGER, Michael C.; Drew, Stephen W. *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, č. 1-5. John Wiley & Sons, 1999. 2024-2133 s. ISBN 1-59124-457-9
- [23] OBRUČA, S.: Controlled production and degradation of selected biomaterials. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [24] STEINBÜCHEL, Alexander a Henry E. VALENTIN. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, roč. 128, č. 3, s. 219-228. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x>
- [25] TIAN J., Sinskey A.J., Stubbe J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission elektron microscopy, *Journal of Bacteriology*, 2005, č. 187, 3814-3824 s., ISSN 0021-9193
- [26] REHM B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoates granule self-assembly: The key role of polyester synthase, *Biotechnology Letters*, 2006, č. 28, 207-213 s. ISSN 1573-6776

- [27] KADOURI D., JURKEVITCH E., OKON Y., CASTRO-SOWINSKI S. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 2005; č. 31, 55-67 s. ISSN 1549-7828
- [28] AYUB, Nicolás D.; TRIBELLI, Paula M.; LÓPEZ, Nancy I. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*, 2009, 13.1: 59-66.
Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00792-008-0197-z#>
- [29] SARDESAI N., BABU C.R. Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism is affected by changes in respiratory enzymatic activities due to cold stress in two psychrotrophic strains of *Rhizobium*. *Current Microbiology*, 2001, č. 42, 53-58 s. ISSN 1432-0991
- [30] ZHAO, Yan Hong, Hong Ming LI, Ling Fang QIN, Hong Hui WANG a Guo-Qiang CHEN. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, roč. 276, č. 1, s. 34-41. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>
- [31] HIROSHI, K., Takeshi O., Taisuke M., Takuza I.: 2008. Effective biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4-hydroxybutyrate fractions by *Wausteria eutropha* in presence of -amino acids. *Polymer International* 57:149-157
- [32] CODER, David M. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*. 2001, č. 15. DOI: 10.1002/0471142956.cy0902s15.
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142956.cy0902s15/full>
- [33] VIDAL-MAS, J., O. RESINA-PELFORT, E. HABA, J. COMAS, A. MANRESA a J. VIVES-REGO. Rapid flow cytometry – Nile red assessment of PHA cellular content and heterogeneity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCIB 40044) grown in waste frying oil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001, roč. 80, č. 1, s. 57-63. ISSN 00036072. DOI: 10.1023/A:1012208225286.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1012208225286>
- [34] Fixable Viability Dye eFluor® 780. *eBioscience* [online]. 2012 [cit. 2013-04-12].
Dostupné z: <http://www.ebioscience.com/fixable-viability-dye-efluor-780.htm>
- [35] SPIERKERMANN P, REHM BHA, KALSCHUEER R, BAUMEISTER D a STEINBUCHER A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol*. 1999, 171: 73-80.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914303>
- [36] TABATABAIE, F. a A. MORTAZAVI. Studying the Effects of Heat and Cold Shock on Cell wall Microstructure and Survival of Some LAB in Milk. *World Applied Sciences Journal*. 2008, roč. 4, č. 2, s. 191-194.