



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VYUŽITÍ METOD TERMICKÉ ANALÝZY PŘI FYZIOLOGICKÉ CHARAKTERIZACI MIKROORGANISMŮ

APPLICATION OF THERMAL ANALYSIS IN PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF  
MICROORGANISMS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Silvia Kočiová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0979/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Silvia Kočiová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Využití metod termické analýzy při fyziologické charakterizaci mikroorganismů

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma diplomové práce.
2. Na základě literární rešerše navrhnout a realizovat sérii experimentů za účelem otestování využitelnosti pokročilých metod termické analýzy při fyziologické charakterizaci vybraných modelových mikroorganismů.
3. Analyzovat získaná experimentální data v kontextu zhodnocení využitelnosti testovaných instrumentálních technik při charakterizaci mikroorganismů.

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

-----  
Bc. Silvia Kočiová  
student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Táto diplomová práca sa zaoberá využiteľnosťou termickej analýzy pri vplyve stresových faktorov na mikroorganizmy. Hlavným cieľom prezentovanej práce bolo navrhnuť a realizovať sériu experimentov za účelom otestovania využiteľnosti pokročilých metód termickej analýzy pri charakterizácii mikroorganizmov. Ako modelové organizmy boli použité dva bakteriálne kmene: *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, ktorý sa líši v schopnosti produkcie polyhydroxyalkanoátov. Základnou technikou bola termogravimetrická analýza (TGA), ktorá bola optimalizovaná a využitá pri štúdiu transportu vody, správanie a stanovenie obsahu intracelulárnej vody s ohľadom na vplyv prítomnosti intracelulárnych PHB granúl. Výsledky tejto metódy boli následne podporené fotkami z TEM.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** mikroorganizmy, *Cupriavidus necator*, polyhydroxybutyrát, termická analýza

## **Abstract**

This diploma thesis deals with the applicability of thermal analysis in the influence of stress factors on microorganisms. The main aim of the presented work was to design and implement a series of experiments to test the usability of advanced methods of thermal analysis in the characterization of microorganisms. Two bacterial strains were used as model organisms: *Cupriavidus necator* H16 and its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, which differs in the ability to produce polyhydroxyalkanoates. The basic technique used thermogravimetric analysis (TGA), which was optimized and applied in the study of water transport, behavior and determination of intracellular water content with respect to the influence of the presence of intracellular PHB granules. The results of this method were subsequently supported by TEM photos.

**KEYWORDS:** microorganisms, *Cupriavidus necator*, polyhydroxybutyrate, thermal analysis

KOČIOVÁ, S. *Využití metod termické analýzy při fyziologické charakterizaci mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 69 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

### **Prehlásenie**

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

.....  
Bc. Silvia Kočiová

### **Pod'akovanie:**

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcemu svojej diplomovej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi Ph.D. za odborné vedenie práce, poskytnuté materiály, venovaný čas a cenné konzultácie potrebné pre vypracovanie diplomovej práce. Za pomoc pri experimentálnej časti by som sa chcela poďakovať Ing. Eve Slaninovej, za všetku pomoc a poskytnutie cenných rád, ktoré mi behom práce v laboratóriu poskytla.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Mikroorganizmy</b>	<b>10</b>
2.1.1	Klasifikácia mikroorganizmov	10
2.1.2	Baktérie	11
<b>2.2</b>	<b>Termická analýza</b>	<b>15</b>
2.2.1	Priebeh a vyhodnotenie termického merania	16
2.2.2	Termogravimetrická analýza	17
2.2.3	Diferenčná skenovacia kalorimetria	19
2.2.4	Využitie termickej analýzy pri štúdiu mikroorganizmov	20
<b>2.3</b>	<b>Dôležitosť vody v bunkách</b>	<b>23</b>
2.3.1	Metódy stanovenia intracelulárneho vodného priestoru	24
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité baktérie, chemikálie a prístroje</b>	<b>27</b>
3.1.1	Použité baktérie	27
3.1.2	Chemikálie použité ku kultivácií mikroorganizmov	27
3.1.3	Prístrojové vybavenie	27
<b>3.2</b>	<b>Kultivácia</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Štúdium intracelulárnej vody metódou termogravimetrickej analýzy</b>	<b>28</b>
3.3.1	Termogravimetrická analýza	29
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Termogravimetria – obecný prístup k vyhodnocovaniu</b>	<b>30</b>
4.1.1	Vplyv morfológie buniek	33
<b>4.2</b>	<b>Hyperosmotické experimenty</b>	<b>34</b>
4.2.1	Pohľad zrovnania – správanie jedného typu bunky v rôznych koncentráciách soli	34
4.2.2	Pohľad zrovnania – správanie rôznych typov buniek v rovnakých koncentráciách soli	36
<b>4.3</b>	<b>Hypoosmotické experimenty</b>	<b>40</b>
4.3.1	Pohľad zrovnania – správanie jedného typu bunky v rôznych koncentráciách soli	40
4.3.2	Pohľad zrovnania – správanie rôznych typov buniek v rovnakých koncentráciách soli	43
4.3.3	Pohľad zrovnania – správanie rovnakého typu bunky v rovnakej koncentracii soli – hyperosmotický šok vs. hypoosmotický šok	45
<b>4.4</b>	<b>Vyhodnotenie obsahov intracelulárnej vody</b>	<b>50</b>

<b>5</b>	<b>ZÁVER</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÁ LITERATÚRA</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK</b>	<b>60</b>
	<b>7.1 Použité skratky</b>	<b>60</b>
	<b>7.2 Použité symboly</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM PRÍLOH</b>	<b>61</b>
	<b>8.1 Hyperosmotické experomenty</b>	<b>61</b>
	<b>8.2 Hypoosmotické experimenty</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>PRÍLOHY</b>	<b>62</b>

# 1 ÚVOD

Baktérie ako mikroorganizmy sú na našej zemeguli prítomné všade. Rozmanitý je nie len ich výskyt, ale aj hostiteľské prostredia a mnohokrát dokážu prežívať aj pri extrémnych podmienkach. Prežitie organizmu od momentu k momentu závisí od jeho schopnosti cítiť a reagovať na zmeny v jeho prostredí, v ktorom môže žiť tak dlho, pokiaľ mu jeho podmienky umožňujú replikáciu. Baktérie sú však limitované, čo sa týka kontroly zmien prostredia alebo možnosti fyzicky ujsť z takýchto nepriaznivých podmienok. Preto, ak chcú prežiť, musia odpovedať zmenami vo vlastnej bunke. Napokon, čo ich nezabije, môže ich urobiť silnejšími.

Odpoveď na stres je v mikrobiológii v súčasnosti považovaná za všeobecný fenomén, ktorý môže byť rozšírený aj na pôsobenie antropogénnych faktorov, ako napr. znečistenie či genetické inžinierstvo. Baktérie v ich prirodzenom prostredí sa zvyčajne musia vyrovnávať s rôznymi stresovými podmienkami. Medzi ne patrí obmedzenie rôznych živín a s tým spojené intenzívne súťaž o ich zdroje, ďalej rôzne abiotické stresy, ako je neoptimálna teplota a pH alebo osmolalita, prípadne toxické kovové ióny či žiarenie. Na rozdiel od materiálov fyzikálnej povahy, ktoré odpovedajú na zmenu prostredia výlučne pasívne, živé organizmy reagujú pasívne alebo aktívne v závislosti na intenzite tejto zmeny. Napr. chladový stres spôsobuje u baktérií odlišné odpovede v závislosti od teploty.

Osmotický stres zažívajú baktérie, keď je osmotický tlak prostredia veľmi premenlivý, nízky alebo extrémne vysoký. Mechanizmy osmotickej tolerancie stresu určujú, či baktérie prežijú alebo budú rásť, pretože osmotický stres hlboko ovplyvňuje bunkovú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti. Keďže bakteriálne bunky môžu obsahovať približne 70 % vody zo svojej celkovej hmotnosti, transport vody dnu a von z bunky sa odráža na zmene parametrov intracelulárneho prostredia bunky. Bakteriálne cytoplazmatické membrány sú semipermeabilné, takže voda prúdi do buniek, keď ich médium sa zrieduje (znižuje sa v osmolalite), a z buniek, keď ich médium sa stáva koncentrovanejším (zvyšuje sa v osmolalite). Bakteriálne bunkové steny sú elastické a poréznejšie, ale menej tekuté ako cytoplazmatické membrány. Zvýšenie objemu buniek kvôli prítoku vody je obmedzené limitnou pružnosťou bunkovej steny, a naopak ak cytoplazmatický objem poklesne kvôli vodnému výtoku, môže to viesť k zataženiu elastických bunkových stien, oddelovaniu a zvrásneniu tekutej cytoplazmatickej membrány a narušeniu proteínových zostáv, ktoré prechádzajú cez bunkovú stenu. Tento proces je nazývaný pojmom plazmolýza. U gramnegatívnych baktérií môže pokles cytoplazmatického objemu viesť k zvýšeniu periplazmatického objemu. V zásade zmršťovanie cytoplazmy je obmedzené objemami cytoplazmatických molekúl a ich hydratačnej vody. To spôsobuje zhromažďovanie cytoplazmatických biopolymérov (predovšetkým proteínov a nukleových kyselín), ktoré môžu stabilizovať kompaktné molekulárne konformácie a zosilňovať asociácie. Osmotický stres tak predstavuje jeden z kľúčových faktorov prírodnej selekcie mikroorganizmov, na ktorý sa v súčasnosti sústreďuje pozornosť celej rady vedeckých disciplín.

Predložená diplomová práca sa zaoberá predovšetkým využiteľnosťou metód termickej analýzy pri štúdiu stanovenia intracelulárneho vodného priestoru. Navrhnutou technikou pre tieto účely bola použitá termogravimetria. Zároveň sa metóda z hľadiska použiteľnosti skúmala pri vplyve morfológických zmien, s ktorými by obsah intracelulárnej vody mohol byť

spojený. Rovnako bola táto metóda navrhnutá pre štúdium stresovej odpovedi, kde mohla poskytnúť zásadné informácie pri skúmaní transportných mechanizmov vody daných buniek. Konečnou snahou tejto práce je tak vyvinúť metódu štúdia zmien intracelulárneho obsahu vody, čo by predstavovalo cenné obohatenie súboru inštrumentálnych techník, ktoré sa v súčasnosti na Fakulte chemickej VUT v Brne používajú pri komplexnom štúdiu problematiky stresovej odpovedi mikroorganizmov.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Mikroorganizmy

Mikroorganizmus, skrátene mikrób, je prevažne jednobunková forma života, ktorá nie je pozorovateľná prostým okom [1]. Tieto mikroskopické organizmy sú najhojnejšími obyvateľmi Zeme vyskytujúce sa v obrovských množstvách. Výskyt mikroorganizmov totiž siaha už od týchto polárnych a vysokohorských biotopov až po tropické oblasti Afriky či Ázie [2], čo sa pochopiteľne odráža aj na ich rôznorodosti hostiteľných prostredí. Sú prítomné v telách iných živých organizmov, iné sa nachádzajú vo vzduchu a neodmysliteľnou súčasťou sú pôdy, ktoré sú ich primárnym prostredím [3]. Avšak nie vždy je ich všadeprítomnosť žiaduca, napríklad na operačných sálach a v niektorých technických prevádzkach sa používajú technológie brániace preniknutiu mikroorganizmov [4]. Mikroorganizmy v rámci ekosystému hrajú mnoho jedinečných a významných úloh, vykonávajú celú radu funkcií a podieľajú sa na rozmanitých dejoch, ako je fotosyntéza, ničenie odpadu, či infekcia iných organizmov [1]. Mikrobiológia je samostatný vedný odbor, ktorý skúma javy a ich príčinné súvislosti prebiehajúce na úrovni mikrosveta živých systémov [5].

Obecne sú to všetko organizmy, ktoré nie sú schopné tvoriť funkčne diferencované tkanivá alebo pletivá. Viac než 100 000 druhov mikroorganizmov sa vyznačuje spoločnými znakmi ako je predovšetkým malý rozmer (jednotky  $\mu\text{m}$  aj desatiny  $\text{mm}$ ) a relatívne veľký povrch, ktorý im následne umožňuje rýchly prísun živín [6]. Medzi neopomenuteľnú vlastnosť mikroorganizmov patrí aj ich rýchle prispôbenie nepriaznivým podmienkam, čiže ich adaptovateľnosť. Adaptáciu možno uviesť ako reakciu organizmu na špecifické vonkajšie podmienky, ktorá ale svojou akumuláciou po mnoho generácií spôsobuje zmeny genetickej informácie. Pokiaľ sa jedná o krátkodobé odozvy fyziológie jedinca na dočasné zmeny podmienok prostredia, ide o pojem aklimácia [7]. Dôležitý význam mikroorganizmov spočíva hlavne v tvorbe a zachovaní kolobehu ekosystému. Veľká časť uplatnenia mikroorganizmov je predovšetkým v oblasti priemyslu, napríklad v potravinárstve, farmácii, v chemickom priemysle či bioenergetike. Tiež sú hojne využívané ako modely pre molekulárne štúdium bunčných dejov [6].

#### 2.1.1 Klasifikácia mikroorganizmov

Primárne možno mikroorganizmy rozdeliť jednak na základe morfológie, teda podľa tvaru a štruktúry bunky (baktérie, archea, riasy, prvoky a slizovky, nižšie huby – kvasinky a plesne), a na základe fyziológie podľa typu metabolizmu [6].

Systém troch domén je spôsob, akým sa klasifikujú biologické organizmy. Tento systém klasifikácie rozlišuje eukaryotické organizmy, na bunky obsahujúce jadro, a na bunky bez jadra, ktoré sú rozdelené na dva typy prokaryotických organizmov. Mikroorganizmy sa teda delia na 3 domény, Archea, baktérie a eukaryoty, pričom každá doména sa ďalej rozdeľuje do ríše, kmeňov, tried atď [8]. Okrem základného rozdielu než je typ buniek (rozdiely v r-RNA) sa tieto tri domény líšia v štruktúre membránových lipidov, transférovej RNA molekuly, prípadne citlivosťou na antibiotiká [1, 8].

Ďalšie odlišnosti nájdeme aj medzi základnými charakteristikami jednotlivých domén živých organizmov. Baktérie, rovnako ako Archea [6], sú prokaryotickým, jednobunkovým

typom bunky. Ich bunečná stena obsahuje murein = peptidoglykan, a membránové lipidy sa vyznačujú esterovou väzbou. Rozmnožujú sa nepohlavne a ich spôsob výživy je autotrofný (zdrojom uhlíka je pre ne CO<sub>2</sub>; foto- alebo chemo-) aj heterotrofný (zdrojom uhlíka sú pre ne organické látky, CO<sub>2</sub> využívať nevedia; foto- alebo chemoorgano-). Fototrofné organizmy využívajú slnečnú energiu, chemotrofné energiu získavajú oxidáciou organických resp. anorganických látok. Podľa donorov elektrónov sú pre organotrofné organizmy zdrojom elektrónov organické látky. Naproti tomu sú litotrofy, ktoré elektróny získavajú z jednoduchých anorganických látok [9]. U Archeí bunečná stena neobsahuje murein, ale môže tam byť prítomný pseudomurein. Lipidy membrán majú étherovú väzbu, prepojenie dvojrstvy je v jednu tetraéterovú membránu. Rozmnožujú sa taktiež nepohlavne a spôsob výživy je chemoautotrofný alebo chemoheterotrofný, a to buď obligátne – organizmus striktné prijíma výživu daným spôsobom, alebo fakultatívne – metabolické dráhy sú prispôsobené pre oba spôsoby). Posledným typom sú Eukarye, ako eukaryotický typ bunky, ktoré obsahujú pravé jadro, organely a môžu byť aj mnohobunkové. Bunky mnohobunečných eukaryí sú diferencované podľa štruktúry, morfológie a fyziologickej funkcie. Spôsob rozmnožovania je nepohlavný (u jednobunkových) aj pohlavný (mnohobunkové) a výživujú sa buď obligátne chemoheterotrofne (živočíchy) alebo obligátne fotoautotrofne (rastliny) [6].

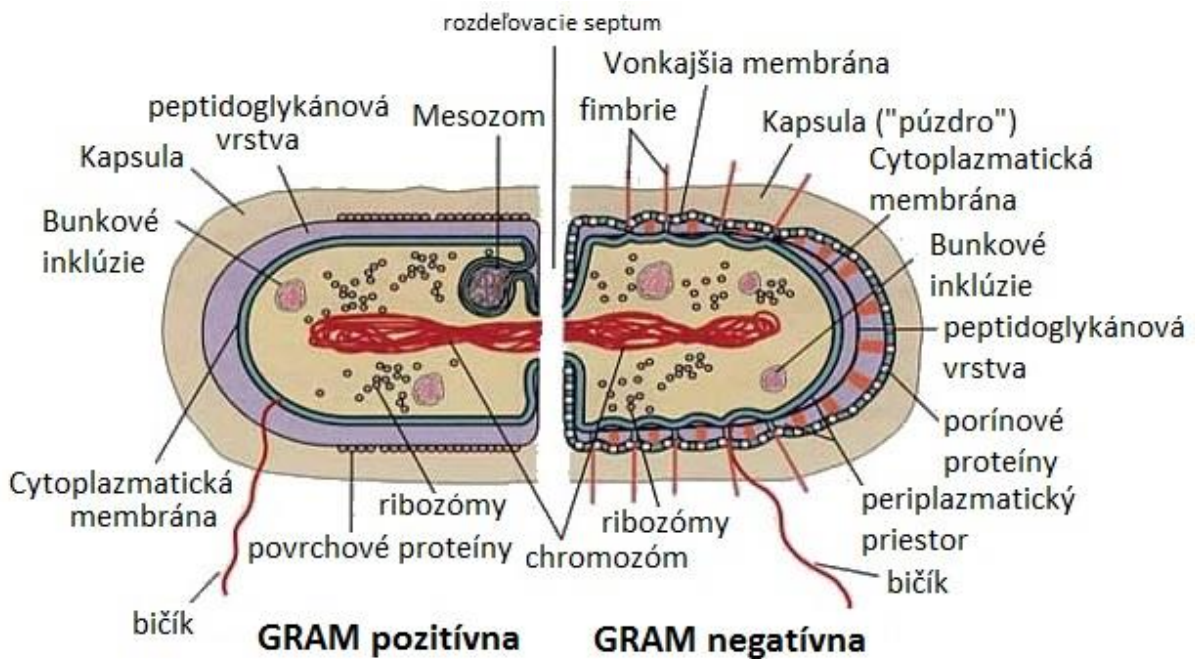
## **2.1.2 Baktérie**

Baktérie sú najstaršími organizmami na Zemi. Bolo už popísaných cez 3000 druhov jednobunkových organizmov, ktoré si môžu zaobstarať energiu a výživu z anorganických zdrojov. Vďaka evolúcií sa však táto vysoká nezávislosť na prostredí zmenila. Niektoré baktérie sa prispôbovali prostrediu, strácali schopnosť výživy z anorganických zdrojov. Výživu potrebovali doplniť aminokyselinami, cukrami aj bielkovinami, a adaptovali sa dokonca na určitého hostiteľa. Pomocou selekcie niektoré baktérie stratili schopnosť rasti mimo bunku a sú obligatornými intracelulárnymi parazitmi. Tým si zaistili vynaloženie čo najmenej energie na množenie [5].

Základnými tvarmi baktérií sú koky, paličky a zahnuté alebo špirálovité útvary. Vyskytovať sa môžu jednak jednotlivo, alebo aj v zoskupeniach [10].

### **2.1.2.1 Stavba bakteriálnej bunky**

Štruktúra bakteriálnej bunky pozostáva z niekoľkých základných častí. Prvou je cytoplazmatická membrána, ktorá je sídlom transportných, energetických a biosyntetických procesov [11]. Má jemnú štruktúru a okrem enzýmov zodpovedných za transport látok, sú taktiež prítomné enzýmy, ktoré syntetizujú bunečnú stenu. Cytoplazmatická membrána prilieha na tuhú bunečnú stenu, ktorá určuje tvar bunky a chráni ju mechanicky zvonku a zvnútra odoláva osmotickému tlaku. U grampozitívnych baktérií je bunečná stena silnejšia, a okrem peptidoglykanu obsahuje ešte kyselinu teichoovú. Gramnegatívne bunky majú ešte vonkajšiu membránu, ktorá je hlavnou permeabilnou bariérou. Prepúšťa pasívne vodu a selektívne niektoré látky s malou molekulou [5].



**Obrázok 1** Stavba bakteriálnej bunky s naznačenými rozdielmi v bunecnej stene u grampozitívnych/gramnegatívnych baktérii [12].

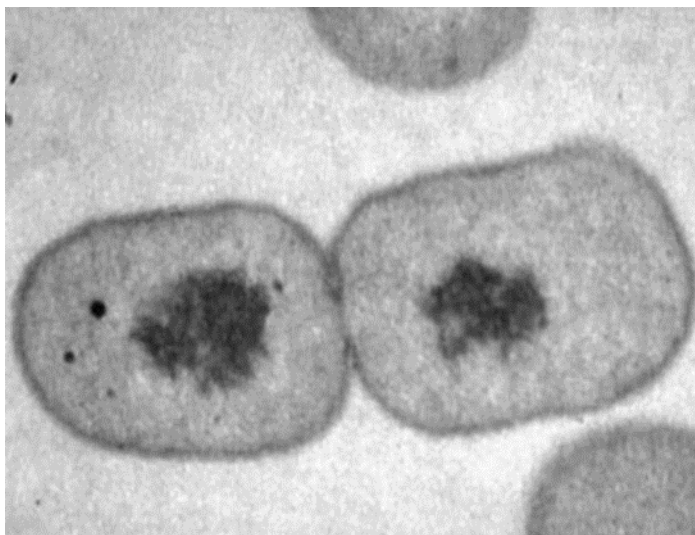
Bunecný priestor bakteriálnej bunky je vyplnený cytoplazmou. Jedná sa o tekutú, koloidnú hmotu obsahujúcu ribozómy, ktoré sú nástrojom proteosyntézy. Ďalej sú tam zásobné granule, ktoré primárne slúžia ako zásoba energie, ale okrem tejto funkcie majú význam diagnostický, pri diagnostickom farbení. Napríklad metachromatické granule (fosfátové granule), prítomné napr. u *Corynebacterium diphtheriae*, majú svoje meno podľa toho, že pri farbení je výsledná farba granúl odlišná od farby použitého farbiva a obvykle aj od okolia. Spôsobené je to chemickými reakciami fosfátových molekúl s použitými farbivami. Hlavná zložka vyskytujúca sa v cytoplazme je jadrová hmotá tvorená jediným cirkulárnym chromozómom pozostávajúcim z dvojvláknovej deoxyribonukleovej kyseliny DNA, ktorá je do seba uzavretá [11]. Dvojšróbovica DNA je ďalším stočením zavinutá do nepravidelnej štruktúry, ktorá je následne zvinutá do kľbka. Toto kľbko je stabilizované tromi bielkovinami, čím drží pohromade. Tento útvar sa nazýva nukleoid, pretože neobsahuje iba DNA, ale v malom množstve aj RNA a podobne ako jadro eukaryot aj bielkovinu [5].

Na povrchu bunky sa nachádzajú ešte vonkajšie štruktúry, akými sú glykokalyx, bičičky, fimbrie, prípadne púzdro [11].

### 2.1.2.2 *Cupriavidus necator* H16

Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16, skoršie nazývaná *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* H16 či *Wausteria eutropha*, je gram-negatívna, chemolitoautotrofná, široko rozšírená baktéria. Tento bakteriálny kmeň je rozsiahlo študovaný v rámci jeho schopnosti produkcie a akumulácie polyhydroxyalkanoátov (PHA) vo veľkom množstve [13].

Jedná sa o tyčinkovitú, nesporulujúcu, pôdnu  $\beta$ -proteobaktériu s fakultatívne anaeróbnym metabolizmom. *C. necator* H16 je pohyblivá baktéria s peritrichálnymi bičičkami. Je schopná rásť pri 41°C a je odolná voči niklu a kombinácií niklu a kadmia [13, 15]. Táto baktéria je schopná rásť iba na vodíku a oxide uhličitom ako jedinom zdroji uhlíka a energie [13]. V prípade, že v postredí nie sú prítomné organické látky, má schopnosť využívať  $H_2$  ako donor elektrónov. Týmto sa *C. necator* radí medzi tzv. „knallgas“ baktérie (baktérie využívajúce  $H_2$  ako donor elektrónov a  $O_2$  ako akceptor elektrónov). Baktéria však nie je vybavená enzýmom fruktóza-1,6-bisfosfatáza, a z tohto dôvodu spracováva fruktózu, glukózu a ďalšie cukorné látky prostredníctvom Entner-Doudoroffovej dráhy [17, 18]. V neprítomnosti kyslíku sa organizmus radí medzi denitrifikačné baktérie, ktoré za anaeróbných podmienok môžu ako konečný akceptor elektrónov využívať dusičnany [18, 19]. Ako zdroj energie slúži celá rada organických látok. Ak je tento bakteriálny kmeň kultivovaný na živiny bohatom médiu, bude prevládať aeróbnym metabolizmus [13, 20].

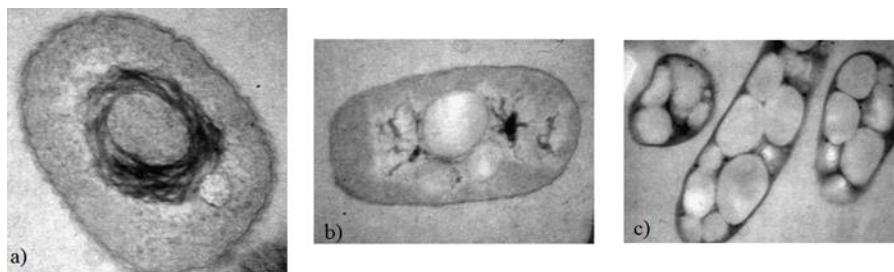


**Obrázok 2** Bunkové členenie *Cupriavidus necator* H16 v aktívnej fáze rastu [21].

Ako už bolo spomenuté vyššie, *Cupriavidus necator* H16 je hojne využívaný ako modelový organizmus, a to konkrétne pre genetiku a kontrolu autotrofnej fixácie oxidu uhličitého a oxidácie vodíka. Na základe tejto výhody, že dokáže rásť na  $H_2$ , môže byť rozvinutá ďalej ako bunková továreň v budúcich biotechnológiách na báze vodíka, na výrobu rôznych komerčne cenných látok ako sú metabolity a polyméry. V priemyselnom merítke sa používa tiež na výrobu biodegradovateľného termoplastu [13, 14].

Ďalšie využitie tohoto bakteriálneho kmeňa ako modelového organizmu je istotne zamerané na preskúmanie metabolizmu PHA. Zároveň ho možno považovať za potenciálneho priemyselného producenta týchto biopolymérov [14]. Polyhydroxyalkanoáty sú zásobné polyméry, ktoré sa akumulujú vo forme intracelulárnych granúl širokej škály taxonomicky odlišných skupín mikroorganizmov. V rámci rozsiahlej rozmanitosti PHA je najbežnejšie a najlepšie preštudovaný polyester 3-hydroxybutyrátu, poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) [22]. Je známe, že bakteriálna bunka *C. necator* H16 je schopná tak veľkej produkcie a akumulácie PHB, kedy polymér činí až 85% bunečnej suchej biomasy [18]. A to v závislosti od podmienok

fyziológického stresu, najmä podmienky, v ktorých je obmedzený prístup živín, a v prítomnosti prebytku uhlíka. Syntéza PHA je stimulovaná kultiváciou v jednoduchom minerálnom médiu [13], ktoré vyžaduje limitné koncentrácie esenciálnych nutričov, medzi ktoré sa radí najmä dusík, fosfor, horčík alebo síra, a ktoré teda preukázali, že syntézu PHA indukujú [24].



**Obrázok 3** *C. necator* H16 - tvorba PHB granúl [21];

- a) tvorba malých PHB granúl v blízkosti nukleoidu, baktérie pestované na kyseline palmového oleja [PKAO] s doplnením vysokého obsahu dusíka (nízky C/N pomer);
- b) baktérie pestované v minerálnom médiu [MM] doplnenom o 50 mM močoviny ako zdroji dusíka (nízky C/N pomer);
- c) baktéria s približne 60 hmot% PHB po 72h kultivácii s 5g/L PKAO a 5 mM močovinou (vysoký C/N pomer)

Biosyntéza a degradácia intracelulárneho PHB sa v bunkách vyskytuje súčasne [23], a preto sa dá metabolizmus PHB považovať za cyklický mechanizmus. Zdalo by sa, že PHA slúžia v prvom rade ako zásobný materiál uhlíka a energie v prípade, že exogénne zdroje uhlíka sa vyčerpajú. Zároveň však bolo dokázané, že kapacita pre akumuláciu a degradáciu intracelulárnych PHA tiež zvyšuje odolnosť bakteriálnej bunky na rôzne stresové podmienky. Príkladom môže byť práca vedeckého tímu Obruča a kol. [25], ktorej cieľom bolo zistiť možný vplyv akumulácie PHA v baktériách na fyzikálne vlastnosti buniek a ich cytoplazmy s ohľadom na možné prežitie stresu. Bunky *C. necator* H16 s rôznym obsahom PHB boli podrobené analytickej centrifugácii. Následne pozorovali, že stúpanie indexu nestability bakteriálnej kultúry sa zvyšovalo s nárastom obsahu PHB v bunkách. To znamená, že akumulácia PHB granúl v bunkách baktérií ovplyvňuje celkové fyzikálno-mechanické vlastnosti buniek, najmä sedimentačný potenciál a hustotu. Pomocou Cryo-SEM tiež naznačili, že natívne PHB granule dramaticky menia fyzikálno-mechanické vlastnosti cytoplazmy a celkové vlastnosti buniek, a tým poukazujú na ich dôležitú výhodu. V ďalšej práci sa zamerali na monomernú jednotku tohto polyméru, 3-hydroxybutyrát (3HB) [26]. U baktérií produkujúcich tento polymér sa vyskytuje tiež vo vysokej koncentrácii. Takže samotný PHB je pre nás zaujímavý aj z hľadiska toho, že u jeho producentov sa nachádza aj tento monomér, ktorý má pozoruhodné vlastnosti. 3HB študovali ako chemický chaperon, ktorý je schopný chrániť modelové enzýmy, lipázu a lysozým pred nepriaznivými účinkami vysokej teploty a oxidácie. Tepelne sprostredkovaná denaturácia lipázy za prítomnosti alebo neprítomnosti 3HB bola sledovaná pomocou dynamického rozptylu svetla (DLS). Tým sa odhalil významný ochranný účinok 3HB, ktorý sa zvyšoval s jeho vzrastajúcou koncentráciou. Okrem tepelnej denaturácie, 3HB preukázal schopnosť ochrany aj proti oxidačnému poškodeniu vyvolaného  $\text{Cu}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ . Rovnako dôležitý je aj kryoprotektívny účinok PHB [23]. Taktiež monomér 3HB bol identifikovaný ako účinný

ochranný prostriedok proti nepriaznivým účinkom mrazu. A to nie len pre bakteriálne bunky *C.necator*, ale aj kvasinky *S. cerevisiae* či modelový enzým lipázu [23].

PHB je vysoko biologicky odbúrateľný prírodný polyester pre rôzne aplikácie. Zvyšujúci sa dopyt po obnoviteľných, biologických výrobkoch je v súčasnosti hnacou silou globálneho trhu bioplastov. Tieto biopolyméry boli vyrábané aj komerčne, ale ich vysoké produkčné náklady z nich spravili ekonomicky neatraktívne plasty. Preto existuje celosvetové úsilie znižovať výrobné ceny pomocou nízkonákladových substrátov [24]. Príkladom môže byť štúdia výroby PHA z rastlinných olejov baktériou *C. necator* H16 vo vsádkovom režime. V práci boli okrem klasických rôznych druhov rastlinných olejov použité aj odpadné oleje z reštaurácii a potravinárskeho priemyslu. *C. necator* H16 produkovala PHB zo všetkých testovaných olejov, pričom najvyššie výťažky boli dosiahnuté z olejov odpadných. Začlenenie rôznych prekursorov bolo preštudované aj pre výrobu kopolymérov [27].

## 2.2 Termická analýza

Termín termická analýza všeobecne zahŕňa experimentálne metódy, pri ktorých sú analyzované fyzikálne a chemické vlastnosti študovaného systému pri tepelnom zaťažení (chladenie, ohrievanie, konštantná teplota). Všetky techniky termickej analýzy teda obsahujú také merania vlastností, kedy je teplota vzorky programovo riadená [28].

Pri termickej analýze sa v najjednoduchšom prípade teplota vzorky zvýši bez fyzikálnych alebo chemických zmien, ale mnoho materiálov sa správa viac komplexne. Príkladom môžu byť skupenské premeny, ako je topenie, var, sublimácia alebo kryštalizácia či rôzne chemické premeny. Dôležité je uvedomiť si, že každý materiál podlieha iným fázovým zmenám [29].

Študovanými systémami môže byť celá rada látok prípadne ich zmesi - najčastejšie sú to látky pevné, napr. minerály, horniny a podobne. Ako už bolo spomenuté vyššie, metódami termickej analýzy sú sledované, resp. analyzované zmeny ich zloženia alebo zmeny ich vlastností [28]. Fázové zmeny spôsobené zahrievaním sú obvykle buďto vratné (kedy sa po spätnom ochladení vzorka dostane do pôvodného stavu) [30]. V priebehu tepelného zaťaženia vzorky môže dochádzať k vyvolaniu alebo zmene intenzity procesu v závislosti na chemickej reakcii, rozkladu, dehydratácii alebo fázovej premene, ktoré môžu byť doprevádzané zmenou hmotnosti, objemu, uvoľňovaním alebo spotrebovaním energie, zmenou vodivosti atď. Podľa vlastnosti, ktorej zmena je sledovaná ako funkcia teploty sa nazýva aj príslušná analýza, viz *TABULKA 1*. Tepelné zaťaženie vzorky prebieha podľa určitého programu. Priebeh programu môže byť dynamický (zahrievanie alebo ochladzovanie) alebo statický (pri konštantnej teplote v závislosti na čase) alebo kombináciou týchto postupov [28].

Ak chceme prevádzkovať súčasné meranie viacerých vlastností v priebehu jedného experimentu, jedná sa o tzv. simultánnu termickú analýzu (STA) a popisuje sa skratkou použitých metód, napr. TGA/DTA.

V súčasnej dobe je hlavná pozornosť termickej analýzy smerovaná k analytickému a fyzikálno-chemickému využitiu týchto metód v rôznych odvetviach [28].

**Tabuľka 1** Základné metódy termickej analýzy

Metóda	Sledovaná vlastnosť	Označenie
<b>Termogravimetrická analýza</b>	Hmotnosť – meria sa hmotnosť vzorky v závislosti na teplote	TGA
<b>Diferenčná termická analýza</b>	Rozdiel teplôt – meria sa rozdiel teplôt medzi vzorkou a štandardom pri ohreve alebo chladnutí	DTA
<b>Diferenčná skenovacia kalorimetria</b>	Entalpia a tepelný tok – meria sa tepelný tok dodávaný do referetnej látky tak, aby teplotný rozdiel medzi vzorkou a štandardom bol nulový	DSC
<b>Termomechanická analýza</b>	Rozmer a mechanické vlastnosti	TMA
<b>Termooptometria</b>	Optické vlastnosti	TOA
<b>Termoakustická analýza</b>	Akustické vlastnosti	-

Väčšina metód termickej analýzy sleduje príslušné vlastnosti systému ako dynamickú funkciu teploty. Základným javom dôležitým pre tieto metódy je zmena entalpie,  $\Delta H$ . Každá fyzikálna a chemická zmena sa dá charakterizovať zmenou Gibbsovej voľnej energie,  $\Delta G$ , ktorá je daná vzorcom:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

kde  $\Delta H$  je zmena entalpie,  $T$  je absolútna teplota a  $\Delta S$  je zmena entropie v priebehu deja. Každý systém sa snaží dosiahnuť takého stavu, ktorému odpovedá nižšia hodnota Gibbsovej voľnej energie [28].

### 2.2.1 Priebeh a vyhodnotenie termického merania

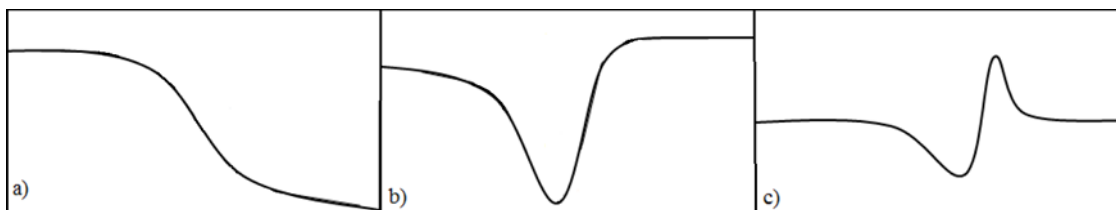
Pri meraní dochádza k prevodu fyzikálnej veličiny, ktorá je vzhľadom k svojej budúcej interpretácii dôležitá, na niektorú základnú veličinu, ktorú je možné s daným vybavením detekovať. Obvykle sú takýmito základnými veličinami elektrický prúd, napätie či frekvencia. Existujú však prípady, kedy pôvodne snímané fyzikálne veličiny nie sú elektrického pôvodu a vtedy sa používajú tzv. prevodníky. Pomocou nich sa tieto veličiny môžu previesť na základné elektrické, s ktorými sa lepšie pracuje.

Meraním sledovanej vzorky sa získajú dáta, ktoré popisujú stav danej vzorky na základe sledovaných fyzikálnych veličín ako odozvu na určité podmienky merania, alebo teda experimentálne podmienky, v ktorých sa vzorka postupne nachádza [31].

Moderné zariadenia, ktoré sa používajú pre experimenty v termickej analýze, sú najčastejšie zložené zo štyroch hlavných častí [29]. Prvou je držiak vzorky, potom je tu pec – v jej vnútri môžu byť regulované experimentálne parametre, ako je tlak, teplota, či atmosféra. Ďalej sú tu prítomné senzory, ktoré detekujú teplotu a merajú konkrétnu vlastnosť vzorky, a poslednou časťou je počítač, ktorý ovláda experimentálne parametre a teplotný program, zbiera dáta zo senzorov, vyhodnocuje ich a spracováva.



Výsledkom termickej analýzy je termoanalytická krivka, kedy sledovaná vlastnosť je znázornená ako funkcia teploty alebo času. Jedná sa teda o grafický či digitálny záznam, a je to základný zdroj informácií o správaní sa vzorky pri experimente. Schopnosť interpretácie dát hrá veľkú rolu pri správnom vyhodnocovaní kriviek. Obecne je krivku možné rozdeliť na dve hlavné časti, na tzv. základňu a termický efekt (nespojitosť). Základňa alebo tiež základná línia (baseline) predstavuje monotónnu časť krivky a odpovedá nulovému rozdielu meranej veličiny. Termický efekt naopak predstavuje oblasť ovplyvnenú prebiehajúcim termickým dejom a prejavuje sa napríklad zlomom, vlnou, píkom či osciláciou [32].



**Obrázok 4** Typické tvary termoanalytických kriviek; a) schod, b) pík, c) oscilácia [32].

## 2.2.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetria (TGA) je odvetvie termickej analýzy [33], ktoré skúma zmenu hmotnosti vzorky ako funkciu teploty (režim skenovania) alebo ako funkciu času (izotermický režim). V tomto prípade sa jedná o metódu, v ktorej je vzorka (miligramy až gramy) vystavená tepelnému namáhaniu a na citlivých mikrováhach je sledovaná zmena jej hmotnosti. Využíva sa pre analýzu rozkladu, tepelnej stability a kinetiky materiálov za rôznych podmienok prebiehajúcich vo vzorke. Tiež atmosféra, v ktorej meranie prebieha, je voliteľná. Volíme buď prostredie inertné, napríklad dusík alebo argón, alebo oxidačné, tu je najjednoduchšie použiť vzduch. Preto je veľmi dôležité optimalizovať dané podmienky/faktory, na ktorých je zmena hmotnosti vzorky závislá po celú dobu experimentu [34]. Dôležitý je aj výber kelímku, ktorý je využívaný behom merania. Kelímky slúžia ako nádoby na vzorky pre termoanalytické merania. Typ kelímku môže ovplyvniť kvalitu výsledkov či dôležité vlastnosti TGA signálu. Štandardné TGA kelímky sa používajú do teploty 1600 °C. Medzi známe typy patria kelímky hliníkové, korundové alebo platinové [35].

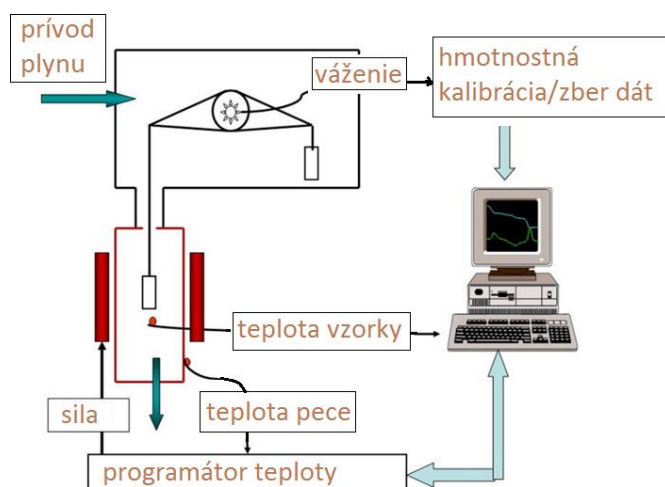
V metóde rozlišujeme 3 typy [34]:

- dynamická TGA – vzorka je vystavená podmienkam prebiehajúceho zvyšovania teploty zvyčajne lineárne s časom
- izotermická alebo statická TGA – vzorka sa udržiava pri konštantnej teplote po určitú dobu, počas ktorej sa zaznamená zmena hmotnosti
- nestatistická TGA – vzorka sa zahreje na konštantnú hmotnosť pri každej sérii zvyšovania teploty.

V rámci inštrumentácie termogravimetrickej analýzy prístroj pozostáva z niekoľkých častí [36]. Hlavnou súčasťou sú váhy s vysokou presnosťou, ktoré sú umiestnené v peci pre dosahovanie vysokých teplôt, ďalej sa tu nachádza programátor teploty, systém na zberanie dát a pomocné zariadenie poskytujúce prípadnú inertnú atmosféru. Prístroj tiež umožňuje



hmotnostnú kalibráciu pomocou kalibrovaných váh. Kalibrácia teploty vychádza z feromagnetického prechodu štandardov Curieho teploty (napríklad niklu).

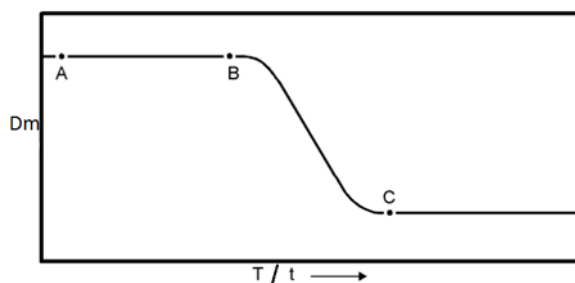


**Obrázok 5** Schématická ukážka inštrumentácie TGA [36].

Novšie prístroje umožňujú tzv. vysoko rozlišovaciú termogravimetriú, pri ktorej je rýchlosť ohrevu závislá na správaní samotnej vzorky a umožňuje efektívnejšie rozlíšiť prípadný priebeh dvoch procesov naraz. Ak je potrebné zistiť, aké látky sa zo vzorky v priebehu tepelného namáhania uvoľňujú, možno s výhodou použiť termogravimetriú kombinovanú s infračervenou spektroskopiou [34].

### 2.2.2.1 Záznam výsledku

Výsledky termogravimetrickej analýzy, ktoré majú naprogramované presné váhy pre zvýšenie teploty, sú zobrazené ako záznam o hmotnostnej zmene v závislosti od teploty alebo času. Tieto zobrazenia sú známe ako termogravimetrické krivky, skrátene TGA krivky. Hmotnostná zmena ( $Dm$ ) je obvykle vynesená v percentách na osi y, a teplota ( $T$ ) alebo čas ( $t$ ) na osi x [37].

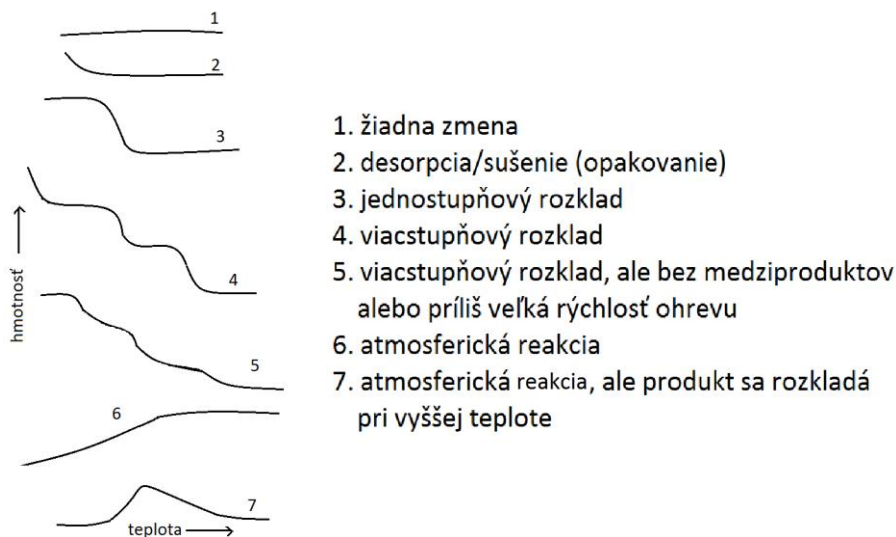


**Obrázok 6** Formalizovaná TGA krivka [33]

Na obrázku je zobrazená typická TGA krivka (*Obr. 6*), kde rovina AB na obrázku je taká časť krivky, kedy je hmotnosť v podstate konštantná alebo neexistuje žiadna zmena hmotnosti. Procesná teplota rozkladu, alebo počiatočná teplota B, je teplota pri ktorej kumulatívna zmena

hmotnosti dosiahne takú veľkosť, že termováhy ju dokážu detekovať. Pri konečnej teplote C dosahuje kumulatívna hmotnostná zmena svoje maximum.

Pri interpretácii TGA kriviek ich možno rozdeliť na sedem typov, kde sú klasifikované podľa ich tvaru (Obr. 7) [33].



**Obrázok 7** Klasifikácia TGA kriviek [33]

### 2.2.3 Diferenčná skenovacia kalorimetria

Hlavnou termoanalytickou metódou, ktorá sa bude využívať v tejto práci je metóda termogravimetrickej analýzy. Bežne sa však, možno aj vo väčšom rozsahu, využíva pre štúdium mikroorganizmov metóda DSC.

V tomto prípade sa jedná o jednu z najrozšírenejších metód termickej analýzy a v porovnaní s ostatnými metódami má pravdepodobne najuniverzálnejšie použitie. Testovať sa dajú ako pevné, tak aj kvapalné vzorky vo veľmi širokom rozmedzí teplôt [38]. Princíp metódy je v udržaní rovnakej teploty študovanej a referenčnej vzorky, ktoré sú zahrievané súčasne vedľa seba. Udržanie nulového rozdielu sa dosahuje buď dodaním energie do vzorky (ak v ňom prebieha endotermický dej) alebo do referenčnej látky (vo vzorke prebieha exotermický dej) [28]. Momentálna rozdielna teplota medzi vzorkou a referenciou, ktorú sa prístroj snaží okamžite kompenzovať, zapríčiňuje vznik signálu, ktorý súvisí s fázovou zmenou vo vzorke [38]. Teplotný rozdiel sa zaznamenáva graficky ako teplotná resp. časová závislosť a nazýva sa krivkou priameho ohrevu. Vykazuje maxima a minima podľa toho, či sa jedná o exotermickú alebo endotermickú reakciu. Pri vyhodnocovaní DSC kriviek je plocha píku priamoúmerná teplu uvoľnenému alebo spotrebovanému a výška píku je priamoúmerná rýchlosti reakcie. Kinetické prechody (vyparovanie, rozklad a iné) posúvajú píky k vyšším teplotám pri vyššej rýchlosti. Vyššia rýchlosť ohrevu zvyšuje citlivosť, ale opäť znižuje rozlíšenie dejov [28].

Takto teda môže byť vyhodnotená teplota topenia, teplota skelného prechodu, rôzne druhy kryštalizácii, tepelná kapacita a teplota degradácie. Okrem fázových prechodov sa dá DSC využiť pri testovaní kvality polymérnych a biopolymérnych materiálov, skiel, pri stanovení stability emulzií či hydratácia materiálov (množstvo voľnej a viazanej vody) [38].

## 2.2.4 Využitie termickej analýzy pri štúdiu mikroorganizmov

Spomínaná diferenčná skenovacia kalorimetria môže byť rovnako použitá aj pri štúdiu živých organizmov. Ako bioanalytická technika poskytuje v tomto prípade priame informácie o konformačných zmenách biomolekúl a ďalších intracelulárnych procesoch, konkrétne meraním procesu topenia rôznych štruktúrnych komponentov bunky [39]. Vzhľadom k jednoduchosti testovacej metódy sa už dlho využíva na charakterizáciu štruktúry a biochémie komplexných biologických systémov. A to najmä na pochopenie biochemických reakcií na endogénne a exogénne podnety. Avšak za jednoduchosťou experimentálneho aspektu metódy sa ukrýva náročná interpretácia komplexných kalorimetrických kriviek. Tá zahŕňa identifikáciu jednotlivých jasných termoabsorpčných píkov zodpovedných za tavenie rôznych subbunčných štruktúr v skúmaných vzorkách [40]. Napriek zložitosti spojených s výkladom komplexných kalorimetrických kriviek, Niven a kol. [41] a Obuchi a spol. [42] demonštrovali, že s vhodnou konštrukciou experimentálnych podmienok môže byť DSC mocným nástrojom pre vyšetovanie mechanizmu prežívania buniek vystavených vplyvom okolitého prostredia [39, 40].

Nugzar G. Bakradze a kol. [40] vykonávali kalorimetrické štúdie na baktériách *A. oxydans*, ktoré boli izolované z kovom-znečisteného prostredia. Konečným cieľom výskumu bolo identifikovať bunkové vlastnosti a schopnosť kov-redukujúceho mikroorganizmu prežiť v prostredí silne znečisteného toxickým šesťmocným chrómom Cr(VI), znížením Cr(VI) na Cr(III) formu.

*A. oxydans* sa vyznačuje komplexným morfológickým cyklom, kedy sa tvar bunky mení z tyčínok v logaritmickú fázu na koky v stacionárnej fáze [39]. Táto fenotypová premena odráža kvalitatívne, prípadne kvantitatívne zmeny subcelulárnych štruktúr, ktoré sa tavia v danom teplotnom intervale [40]. Pokiaľ ide o DSC termogramy komplexných biologických systémov, endotermické procesy možno spájať s intramolekulárnym (štruktúry aj konformácie) tavením subbunčných štruktúr v bunke. Exotermické procesy sú obecné spájané s makromolekulárnymi syntézami alebo s polymerizáciou určitých subbunčných štruktúr. V tejto štúdii [40] zvolili podmienky merania tak, aby boli pozorované iba endotermické píky, čím získali tepelné krivky, ktorých spektrálne charakteristiky predstavujú teplotnú závislosť zvýšenia tepelnej kapacity vzorky v dôsledku intramolekulárneho topenia jednotlivých biologicky aktívnych látok (proteíny, nukleové kyseliny, ribozómy, membrány, a iné membránové štruktúry). Všetky tepelné spektrá boli normalizované tak, aby intenzita maximálnych termoabsorpčných pík, alebo presnejšie oblasť pod nimi, odrážala proces topenia DNP (komplex DNA-proteín) v neporušených bunkách za predpokladu, že množstvo DNA v bunkách sa nemení v priebehu rastu kultúry.

Iný tím vedcov, Abuladze M.K. a kol. [39], previedli analýzu celých bakteriálnych buniek pomocou DSC, kedy sa sledovala dvojfázová stresová odpoveď závislá na dávke toxického oxidantu, manganistanu draselného. Modelovou kultúrou boli opäť pôdne baktérie *Arthrobacter oxydans*, na ktorých sa sledovali intracelulárne štruktúrne a funkčné zmeny na úrovni celých buniek.

Manganistan je známy tým, že prednostne reaguje s jednoreťazovou DNA a detekuje rozpustený promóter DNA v otvorenom komplexe, a to in vitro aj in vivo [43]. Fosfolipidy vnútri bunkovej membrány s obsahom nenasýtených mastných kyselín sú citlivé na oxidáciu

MnO<sub>4</sub><sup>2-</sup> na dvojitej väzbe uhlík-uhlík, čo má za následok tvorbu hydroxyketónov, diolov, a/alebo epoxidov. Takéto reakcie môžu následne vyvolať stratu funkcie membrány a bunkovú smrť. Polysacharidy tvoriace peptidoglykán bunkovej steny sú oxidované a odstránené, čo vedie k strate bunkovej stability a štruktúry [44].

Výsledky viacnásobných meraní v danej práci preukázali, že profil tepelných spektier závisí ako na podmienkach bunkovej kultúry, tak i na fáze jej rastu. Na základe poznatku tak môžu charakterizovať funkčný stav buniek [40]. Keďže *A. oxydans* sa vyznačuje komplexným morfológickým cyklom, celá táto fenotypová transformácia bola analyzovaná pomocou DSC, avšak výzkum toxického účinku manganistanu obmedzili len na určitú rastovú fázu bunky, a to stacionárnu [40].

Christopher A. Miles a kol. [45] uskutočnili kalorimetrické štúdie baktérii, kde porovnávali získané DSC termogramy širokej rady rôznych tepelne rezistentných organizmov. Tepelné poškodenie mikroorganizmov zahŕňa jednotlivé bunkové komponenty, vrátane membrán, ribozómov a nukleových kyselín. Naproti tomu existuje málo kalorimetrických štúdií tepelnej denaturácie baktérii, hoci DSC sa využila napr. pri štúdiu aktivácie tepla a spontánneho klíčenia spór, pri fázových prechodoch v lipidoch bakteriálnych membrán a tepelné správanie bakteriálnej buncenej vody [46,47,48]. Vo všetkých vegetatívnych organizmoch sa skúmala maximálna miera úmrtnosti [45], ku ktorej došlo pri teplotách nad začiatkom tepelnej denaturácie, tj. buncenej smrti a nevratnej denaturácie buncených komponentov, v rovnakom rozmedzí teplôt. Porovnali sa DSC termogramy celej rady baktérií a tiež sa rozvíjali rovnice, ktoré umožňujú výpočet rýchlosti, pri ktorej klesá počet životaschopných mikroorganizmov v kalorimetri, pretože ich teplota sa zvýši pri konštantnej rýchlosti. A práve to umožnilo porovnanie úmrtnosti s rysmi DSC termogramu, nakoľko organizmy citlivé na teplo vykazovali také rysy termogramu, ktoré u viac tepelne rezistentných typov neboli prítomné.

Aplikácie DSC siahajú taktiež aj do oblasti hodnotenia konzervačného ošetrovania potravín, kde tieto procesy sú používané na inaktiváciu mikroorganizmov a zvýšenie trvanlivosti potravín.

Konzervačné ošetrovanie má vplyv na buncené komponenty baktérii vznikajúcich v jedle, spôsobujú fyziologické zmeny v bunkách, až nakoniec smrť baktérii [49]. Pochopenie mechanizmu mikrobiálnej inaktivácie teplom je potenciálne užitočné pre optimalizáciu tepelného spracovania na odstránenie infekcií z jedla. Tepelná inaktivácia mikroorganizmov je spojená s ireverzibilnou denaturáciou membrán, ribozómov a nukleových kyselín. Avšak vzory makromolekulových zmien, ktoré indukujú buncenú smrť mikroorganizmov v priebehu tepelného spracovania stále nie je jasne známa [50].

DSC termogramy celej bakteriálnej bunky vykazujú rozdiely v tepelne indukovaných prechodoch, ktoré odhaľujú reakcie baktérii na teplo. Technika v tomto prípade umožňuje jednak monitorovanie, a tiež detekciu vplyvu tepelného spracovania na mobilné zložky bakteriálnych buniek vrátane ribozomálnej podjednotky, nukleových kyselín a komponentov buncenej steny. Taktiež rozdiely v ribozomálnej tepelnej stabilite rôznych baktérii súvisia s tepelnou toleranciou bakteriálnych buniek na teplo. V danej kapitole sa M. H. Tunick a kol. [49] zamerali na kvantitatívne hodnotenie životaschopných buniek z nameraných

kalorimetrických dát, a na vyhodnotenie vplyvu netermických procesov s využitím daných kalorimetrických údajov.

Jaesung Lee a Gönül Kaletunç [50] vo svojom výskume v roku 2002 hodnotili tepelnú stabilitu a reverzibilitu prechodov spojených s rôznymi bunkovými zložkami *E. coli* a *Lactobacillus plantarum* po ich tepelnom ošetrení. Životaschopnosť baktérii po tepelnom spracovaní v rozsahu teplôt 55 a 70 °C v DSC bola stanovená pomocou kalorimetrických dát i počtom mikroorganizmov, kde tieto hodnoty vykazovali lineárnu koreláciu. Porovnanie DSC skenov izolovaných ribozómov ďalej naznačili, že tepelná stabilita ribozómov u *E. coli* je väčšia než u *L. plantarum*, čo je zhodné s väčšou tepelnou toleranciou celých buniek *E. coli* pozorovaných zo straty životaschopnosti a z DSC skenov [50].

Termická analýza, konkrétne DSC, bola využitá aj pri analýze tepelných prechodov rôznych kmeňov baktérii *Bacillus* v práci J. R. Lepock a kolektívu [51]. Pozorované prechody odpovedajúce topeniu lipidov a rozloženiu DNA a proteínov boli porovnané s maximálnou teplotou rastu u jednotlivých druhov, použitej ako prostriedok identifikácie kritických termolabilných cieľov zodpovedných za inhibíciu rastu vyvolanú teplotou. Hlavná časť termického profilu predstavujúca nevratné prechody bola rozriešená aspoň do troch rôznych pík. Tie boli primárne identifikované a priradené k denaturácii proteínov. Zároveň táto štúdia ukazuje použiteľnosť DSC pri riešení prechodov v neporušených bunkách na základe tepelnej stability bunkových zložiek a tiež pre získanie celkového pohľadu na makromolekulárnu stabilitu.

Štúdie výskumného tímu Obruča a kol. [23] zamerané aj na baktérie *C. necator* H16 obsahujúce 3-hydroxybutyrát, v ktorých bol tento polymér identifikovaný ako kryoprotektant, už boli spomínané vyššie. V práci však využili aj termickú analýzu, ktorá im poskytla zaujímavý prehľad o aktivite vody vo vzorke. Ukázalo sa, že bunky s PHB granulami vykazujú vyššiu mieru transmembránového transportu vody, ktoré ich zároveň chránia pred tvorbou intracelulárneho ľadu.

Okrem samostatných prístrojov na termickú analýzu sa dajú tieto zariadenia aj rôzne prepojiť. A to buď simultánne, teda s iným prístrojom na termickú analýzu, alebo napríklad aj s hmotnostným spektrometrom. A. Peter Snyder a Ashish Tripathi a kol. [52] sa v roku 2005 zaoberal charakterizáciou mikroorganizmov pomocou prepojeného systému termogravimetrickej analýzy s detektorom hmotnostnej spektrometrie. Cieľom bolo preskúmať tepelný vývoj rozkladných produktov z mikroorganizmov, ktorých osobitým významom je práve to, že široká rada produktov a fragmentov je vytvorená z ich tepelného spracovania. Technika TGA-MS sa tradične využíva na vyšetrenie chemického zloženia a tepelných parametrov materiálov, ako je napríklad široká škála technických organických polymérov [53]. TGA-MS analýzy technických polymérov a energiu-produkujúcich zlučenín boli použité ako modely pre štúdium biochemických zlučenín a mikroorganizmov. Relatívny hmotnostný úbytok biochemických druhov a zlučenín u baktérii zo systému TGA umožnili porovnanie relatívnych množstiev tých istých látok v baktériách, získaných ale z konvenčných mikrobiologických extrakcií a izolačných techník. Štandardné biochemické látky, ako je napríklad kyselina dipokolinová, kyselina polyhydroxymaslová a peptidoglykán sa vyrábajú všeobecne v rovnakej teplotnej oblasti TWC profilu (TWC – thermal weight loss

chromatogram; chromatogram tepelnej hmotnostnej straty), ktorý poskytuje určitú mieru rozlíšenia. Zlúčeniny tak majú podobné hmotnostné spektrá v porovnaní s tými z mikroorganizmov [52].

Tím japonských vedcov, Bongmun Kang a kol. [54] v roku 2010, využil pri svojej štúdií mikroorganizmov simultánne termogravimetrii a diferenčnú termickú analýzu. Výskum bol zameraný na porovnanie horiacich vlastností/charakteristík medzi olejovými a neolejnatými mikroorganizmami. MO sú už dlho skúmané ako alternatíva k poľnohospodárskym a zvieracím zdrojom pre výrobu olejov a tukov. MO, ktoré akumulujú viac ako 20–25% ich hmotnosti ako lipidy, sú označované ako olejnaté druhy. Pre zlepšenie ich perspektívy pri výrobe biopalív sa musia dané olejnaté mikroorganizmy intenzívne študovať z hľadiska biochemických a fyziologických vlastností. Hodnotenie vlastností horenia MO je tiež dôležité pre testovanie potenciálnych olejnatých druhov a výrobu bionafty. Avšak len málo informácií je známych o fyzikálnych a chemických zmenách vyskytujúcich sa v mikroorganizmoch, keď sa zahrievajú na vzduchu [54, 55]. Simultánna TGA/DTA analýza je užitočná pre charakterizáciu tepelného správania materiálov, pričom v danej štúdií aplikovali tento systém na štúdium olejnatých a neolejových MO na účely posúdenia ich vlastností horenia. Základná metóda hmotnostného rozdielu bola použitá pre kvantitatívne určenie exotermického tepla vzniknutého z mikrobiálnych vzoriek. Oblasť pod exotermickými píkmi bola vypočítaná pomocou DTA kriviek a konvertovaná na tepelnú energiu, za použitia india ako štandardného materiálu [54].

### 2.3 Dôležitosť vody v bunkách

Kvapalná voda je vďaka svojim fyzikálno-chemickým vlastnostiam nevyhnutým predpokladom pre rozvoj života. Obsah vody v mikrobiálnych bunkách sa pohybuje v rozmedzí 70–90% z celkovej hmotnosti v závislosti na druhu a na fáze života mikroorganizmu [56]. Dostupnosť vody, indikovaná aktivitou vody, je daná ako podiel tlaku pár v roztoku ku tlaku pary čistej vody. Táto dostupnosť vody musí byť, s výnimkou niektorých osmofilných organizmov, vyššia ako 0,9 [57].

Voda je základným kritériom pre život, jej obsah v živých bunkách je nielen dôležitým parametrom v súvislosti so všetkými fyziologickými procesmi, ale je aj záujmom v súvislosti s účinkami toxických látok. Množstvo prvkov sa zvyčajne meria vo vzťahu k suchej hmote, sušine, kedy výpočet koncentrácie toxických alebo naopak prospešných prvkov v cytosole vyžaduje znalosť objemu bunky alebo aspoň vnútrobunkovej, teda intracelulárnej vody [56, 57].

Intracelulárna voda je voda vo vnútri buniek, ktorá obmýva všetky potrebné biologické molekuly, vrátane proteínov a nukleových kyselín. Bunky obsahujú rozdielne množstvo vody, kde tento obsah vody je však závislý skôr na úlohe daných buniek než na zdrojovom organizme [58]. Rozsah v akom sú vlastnosti intracelulárnej vody rovnaké ako pri vode v zriedených roztokoch je otázkou značného významu na bunkovú biológiu [59]. Ďalšou charakteristikou tejto vody je to, že sa nachádza vo viac usporiadanom stave než čistá voda. Svedčia o tom jej podstatne kratšie (NMR) spin-mriežkové a spin-spinové relaxačné časy. Viacmenej dôležitejšie je, že štruktúrovanie tejto vody môže byť riadené niektorými bunkovými zložkami. A tiež je nevyhnutná pre rozpoznávanie biomolekúl a organizáciu bunkového mechanizmu [58].

Všeobecne sa predpokladá, že všetka voda v bunkách má rovnaké pohybové a koligatívne vlastnosti ako voda vo voľnom kvapalnom stave. Tento predpoklad je použitý v štúdiách regulácie objemu, transmembránového pohybu rozpustených látok a elektrických potenciálov, rozpustené látky a pohyb roztoku, rozpustnosť látok a iné javy. Napriek tomu, I. L. Cameron a kol. [60] sa chceli dostať k rozsahu a ku zdroju neideálneho správania sa vody, a tak študovali pohybové a koligatívne vlastnosti vody v bunkách, v roztokoch aminokyselín a glycín peptidoch, ktorých povrchové vlastnosti sú známe. Taktiež do výzkumu zahrnuli roztoky hovädzieho séra albumínu, hemoglobínu a niektoré syntetické polypeptidy. Okrem štúdia pohybových vlastností vody v daných roztokoch bol tiež experimentálne vyvrátený predpoklad ideálneho osmotického pohybového správania intracelulárnej vody. Získané poznatky totiž preukazujú, že žiadna bunka sa nespráva ako dokonalý osmometer, čo znamená, že vždy je nejaká frakcia bunkovej vody, ktorá nereaguje na osmotický stres.

Obsah intracelulárnej vody v mikroorganizmoch je dôležitý parameter, ktorý je určujúcim faktorom ich fyziologických vlastností [61]. Rovnako meranie objemu mikroorganizmov je kľúčovým faktorom vo fyziologických štúdiách pre stanovenie intracelulárnych koncentrácií látok a pri porozumení morfológickým zmenám v priebehu rastového cyklu [62]. Sú to základné údaje, ktoré môžu byť použité na odhad absolútnych bunkových enzýmov a koncentrácií metabolitov. Absolútna koncentrácia enzýmov a metabolitov sú hlavným údajom pre vývoj spoľahlivých metabolických modelov a pre racionálne inžinierstvo priemyselných mikroorganizmov. A to hlavne ako môže koncentrácia ovplyvniť termodynamické a dynamické procesy v bunke [63]. Hoci bolo vyvinutých mnoho metód pre stanovenie koncentrácie bunkových komponentov vo vzorke s vysokou presnosťou, zásadné je merať intracelulárny vodný objem úplne správne, tak aby mohla byť dosiahnutá absolútna koncentrácia týchto bunkových zložiek. Hodnoty intracelulárnej vody boli viacmenej odhadnuté nejednoznačným spôsobom v mnohých prípadoch. Napríklad G. Bratbak a I. Dundas [64] zistili, že hodnota obsahu sušiny bakteriálnych buniek, ktorá sa javí ako štandard, môže byť až dvakrát vyššia než sa všeobecne predpokladá. Hlavným dôvodom pre tieto nízke odhady je nesprávna korekcia na intracelulárnu vodu pri odhade hmotnosti mokrých buniek. Použitím 3 bakteriálnych kmeňov dospeli k záveru, že obsah sušiny buniek sa pohybuje v rozmedzí približne od 31 do 57 % [63, 64].

### 2.3.1 Metódy stanovenia intracelulárneho vodného priestoru

Merania intracelulárneho vodného priestoru sú charakteristické pre svoju zložitosť a časovú náročnosť. Zároveň sú tieto stanovenia nevyhnutné v najrôznejších experimentoch, ako je napríklad vyšetrenie metabolizmu, transportné vlastnosti či transmembránové potenciály. Všeobecne platí, že v každom výpočte intracelulárnych koncentrácií na základe intenzity signálu, musí byť intracelulárny vodný priestor známy [65]. Hadassah Shinar a Gil Navon prezentovali metódu stanovenia intracelulárneho vodného priestoru na báze  $^{59}\text{Co}$  a  $^2\text{H}$  alebo  $^1\text{H}$  NMR. Podstatou experimentu, pre stanovenie intracelulárnej vody, bolo súčasné stanovenie nepriepustnosti membrány a voľného difúzneho celkového objemu vody. Pričom nepriepustnosť membrány určuje extracelulárny objem vody. Pri týchto experimentoch boli použité vzorky ľudskej krvi, ako membránou-nepriepustné zlučiny vybrali kobaltité komplexy a  $\text{D}_2\text{O}$  ako voľne difúzne zlučiny. Ich množstvo sa stanoví z ich  $^{59}\text{Co}$  a  $^2\text{H}$  NMR

intenzity signálu. Pri tomto spôsobe sa malé množstvo roztoku obsahujúce komplex kobaltu i D<sub>2</sub>O pridá k bunkovej suspenzii a vzorky bunkovej suspenzie a jej supernatantu sa podrobia meraniu NMR. Pri výpočtoch následne vychádzali zo vzťahu [65]:

$$V_w = V_{w,in} + V_{w,ex} \quad (2)$$

kde  $V_w$  je celkový vodný priestor bunky,  $V_{w,in}$  je intracelulárny vodný priestor a  $V_{w,ex}$  je extracelulárny vodný priestor [65].

NMR a tiež scintilácia sa preukázali ako vhodné techniky na určenie intracelulárnej vody. Bohužiaľ nevýhodou týchto metód sú veľké prístrojové výdavky a prípadne iné náklady s tým spojené. Zobrazovacie analýzy zase trpia veľkým výdajom ľudskej sily a v prípade skúmania malých baktérií majú rôzne limity či obmedzenia. Olejové odstred'ovanie je tiež uskutočniteľný spôsob. Lenže predpoklad, že iba 5% straty vody počas sušenia môže byť uvedený ako extracelulárna voda, je pomerne špekulatívne a musí to byť overené pre každý jednotlivý druh. A obzvlášť mikroorganizmy vylučujú hydrofilné slizy, prípadne kapsule, kedy sa to môže výrazne líšiť od predpokladanej 5% hodnoty [56].

Spomínané postupy môžu podľa Lei Wang a kol. [63] viesť k nadhodnoteniu intracelulárnej vody, a preto vyvinuli NAD<sup>+</sup> koncentračne závislú metódu pre presné stanovenie intracelulárneho vodného priestoru. Užitočnosť tohto spôsobu stanovenia demonštrovali na bunkách *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens*. Vzhľadom k tomu, že je veľmi ťažké úplne odstrániť extracelulárnu vodu bez straty vnútrobunkovej a iných prechavých metabolitov, stanovovali najskôr vodu extracelulárnu. To vykonali pomocou molekulej sondy NAD<sup>+</sup>, ktorá je bakteriálnou cytoplazmatickou membránou nepriepustná. Okrem toho, keďže prokaryotické bunky sú bez intracelulárneho rozčlenenia, dáta intracelulárneho vodného objemu môžu byť ľahko použité pre stanovenie absolútnych koncentrácií bunkových zložiek.

Feijo Delgado F. a kol. [66] vyvinuli neoptický postup, ktorý využíva vysokú permeabilitu vody bunkových membrán pre kvantifikáciu hmotnosti vody a sušiny živých buniek. Suchá a mokrá hmota sa typicky získajú vážením populácie pred a po sušení [64]. Ak je bunka vážená v tekutinách rozdielnych hustôt – kvapaliny založené na H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O – vodný podiel z bunky bude neutrálne vztlakovo vzostupovať v oboch meraniach, pretože intracelulárna voda je rýchlo nahradená D<sub>2</sub>O po ponorení do D<sub>2</sub>O tekutiny. Toto spojené váženie následne poskytuje priamu kvantifikáciu suchej hmotnosti bunky a jej nevodného objemu, čo umožňuje stanovenie parametra zvaného hustota za sucha – hustota sušiny bunky. Ak by prvé meranie bolo najskôr uskutočnené v nepriepustnej tekutine hustej ako D<sub>2</sub>O, intracelulárna voda by sa nadnášala nad bunkou. Po ponorení bunky do D<sub>2</sub>O je intracelulárna voda nahradená D<sub>2</sub>O, a vodná časť bunky tak už prispieva k jej vztlaku. Rozdielom medzi týmito dvoma meraniami sa získa intracelulárne množstvo vody, ktoré vylučuje suchý materiál, ktorého plávajúca hmota je v oboch prípadoch rovnaká [66].

V ďalšej štúdií prevedenej Terryn C. a kol. [67] sa podrobne popisujú a porovnávajú dve miestne metódy merania obsahu vody za využitia analytickej elektrónovej mikroskopie. Metódy sú aplikované na 2 skúšobných vzorkách, ľudské erytrocyty a pekárenské kvasinky *S. cerevisiae*. Prvá z metód je založená na zobrazovaní tmavého poľa. To sa aplikuje na lyofilizované biologické prerezané časti, čo umožňuje nepriame meranie obsahu vody na subcelulárnej úrovni zo zaznamenaných máp intenzity tmavého poľa. Druhá metóda využíva elektrónovú energetickú stratovú spektroskopiu. Následne metódou najmenších štvorcov



pospájaných medzi experimentálnym spektrom elektrónovej straty energie a referenčných spektier zmrazeného hydratovaného ľadu a makromolekulárnych zostáv môžeme odvodiť priamo koncentráciu miestnej vody v biologických prerezaných častiach na subcelulárnej úrovni.

Množstvo metód závislých na hmotnosti alebo koncentrácii je známych pre odhad hodnoty fyzikálneho parametra ako je objem intracelulárnej vody. Metóda, ktorá spočíva v termogravimetrickom analytickom procese sušenia mikroorganizmov môžeme považovať za rýchlu, hmotnostne závislú metódu a v súčasnosti asi najviac využívanú pre odhadovanie intracelulárnej a extracelulárnej vody mikrobiálnych buniek [56]. I cez svoju náročnosť pri vyhodnocovaní výsledkov, úpravou získaných surových dát hmotnostnej straty v priebehu sušenia sa dá získať presný a ľahko uskutočniteľný spôsob pre spomínané odlišenie vôd v bunkách.

Brazílski vedci [61] s ohľadom na oddelenie extracelulárnej vody od intracelulárnej využili termogravimetriu za použitia infračervených váh prostredníctvom rôznych sušiacich krokov. V tejto metóde je potrebné oveľa menšie množstvo vzorky než v iných bežných postupoch. Jedná sa tak o jednoduchší a rýchlejší spôsob s využitím bežného termogravimetrického zariadenia. V danej práci využili na stanovenie komerčne kvasinky *S. cerevisiae*, analyzované izotermicky s programom trvajúcim 30 min. Graf rýchlosti sušenia, ktorá je vynesená ako funkcia zvyškovej hmotnosti buniek, umožňuje identifikáciu kroku, v ktorom dochádza ku strate intracelulárnej vody a stanoveniu jej obsahu.

Obdobná metóda navrhnutá Uribe Larrea [62] tiež ukázala termogravimetrický spôsob sušenia balených mikroorganizmov. Opäť bola rýchlosť sušenia vynesená ku zvyškovej hmotnosti na identifikáciu a koreláciu odlišných typov bunkovej vody počas sušiaceho procesu so zmenou bunecnej hmotnosti [58, 62].

Illmer a kol. [56] siahli po rovnakej metóde, ale iných mikroorganizmoch. Na analýzu použili okrem kvasiniek *S. cerevisiae* aj prokaryotické bunky *Arthrobacter sp.* Rovnaký bol aj predpoklad, že sušenie mikrobiálnych buniek prebieha v dvoch fázach, kedy najskôr sa stráca viac nestála extracelulárna voda, a keď sa táto frakcia kompletne odparí, začne sa vyparovať voda intracelulárna. Zmena sušiaceho správania by mala byť spôsobená membránou a/alebo bunkovou stenou, ktoré nakrátko chránia intracelulárnu vodu pred odparovaním. Bod, v ktorom dochádza k danej zmene sušenia bol detekovaný a odvodený pomocou počítačových programov dostupných pre tieto účely.

V inej štúdií Obruču a kol. [68] bola termogravimetria použitá na kvantitatívnu analýzu osmoticky indukovanej dehydratácie bakteriálnych buniek. Celkový obsah vody vo vzorkách bol vypočítaný z obsahu zvyškovej hmotnosti po konečnom sušení. Zároveň bolo navrhnuté, že zmeny v rýchlosti eliminácie vody z bunkových vzoriek môžu byť použité ako indikátory kvantitatívneho obsahu rôznych foriem vody v bunecných vzorkách.

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Použité baktérie, chemikálie a prístroje

#### 3.1.1 Použité baktérie

Študovanými modelovými organizmami v experimentálnej časti práce boli dva kmene baktérií, *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutant *Cupriavidus necator* PHB<sup>4</sup>.

- bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 , získaný z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne;
- bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB<sup>4</sup>, zakúpený v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

#### 3.1.2 Chemikálie použité ku kultivácií mikroorganizmov

Nutrient Broth, (Himedia)

Dihydrogenfosforečnan draselný, (Sigma Aldrich Inc.)

Dihydrát hydrogenfosforečnan sodný, (Sigma Aldrich Inc.)

Síran amónny, (Sigma Aldrich Inc.)

Heptahydrát síranu horečnatého, (Sigma Aldrich Inc.)

Fruktóza, p.a., (Lach-Ner, ČR)

Chlorid sodný, (Sigma Aldrich Inc.)

Chlorid draselný, (Sigma Aldrich Inc.)

Destilovaná voda

#### 3.1.3 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga, Boeco U-32R

Centrifuga, Hettich MIKRO 200

Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments

Temperovaná trepačka Heidolph1000, Labicom s.r.o

Termostat, LS-35

Vortex, Heidolph Reax Top

Termogravimetrický analyzátor Q5000IR, TA Instruments

### 3.2 Kultivácia

Inokulum pre bakteriálnu kultiváciu bolo pripravené do 100 ml Erlenmayerových baniek. Každá banka obsahovala 50 ml submerzného média Nutrient Broth, ktoré bolo následne trikrát zaočkované bakteriologickou kľučkou z agarovej platne v sterilnom prostredí laminárneho boxu Aura mini. Takto pripravené inokulum bolo uchovávané 24 hodín na temperovanej trepačke pri frekvencii trepania 180 rpm a teplote 30 °C.

Na zaočkovanie produkčného minerálneho média a tzv. chudobného (Nutrient Broth) média, bolo použitých 5 obj.% inokula, s ohľadom na celkový objem produkčných médií. Kultivácia produkčného média prebiehala po dobu 72 hodín, opäť na temperovanej trepačke

s rovnakou frekvenciou 180 rpm a teplotou 30 °C. Všetky použité médiá boli sterilizované v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom po dobu 55 minút, pri teplote približne 120 °C.

Tabuľka 2 Zloženie Nutrient Broth (NB)

Beef extract	10 g·l <sup>-1</sup>
Pepton	10 g·l <sup>-1</sup>
NaCl	5 g·l <sup>-1</sup>
Agar	20 g·l <sup>-1</sup>

Tabuľka 3 Zloženie minerálneho média pre kultiváciu oboch použitých bakteriálnych kmeňov

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Fruktóza	20 g
Roztok stopových prvkov	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Roztok fruktózy a stopových prvkov boli tiež sterilizované za rovnakých podmienok ako živné médiá, s jednou výnimkou pri fruktóze, kedy ventil na tlakovom hrnci bol otvorený.

Tabuľka 4 Roztok stopových prvkov

FeCl <sub>3</sub>	9,7 g
CaCl <sub>2</sub>	7,8 g
CuSO <sub>4</sub>	0,156 g
CoCl <sub>2</sub>	0,119 g
NiCl <sub>2</sub>	0,118 g
CrCl <sub>2</sub>	0,062g
0,1 M HCl	1000 ml

### 3.3 Štúdium intracelulárnej vody metódou termogravimetrickej analýzy

Cieľom experimentu bolo otestovať použiteľnosť navrhnutej metódy, termogravimetrickej analýzy, pri štúdiu intracelulárnej vody v modelových bakteriálnych bunkách, prípadne z hľadiska jej použiteľnosti pri vplyve morfológických zmien, s ktorými by obsah intracelulárnej vody mohol byť spojený. Na posúdenie týchto parametrov boli buncné kultúry vystavené osmotickému stresu. Analýze sa podrobili bakteriálne kultúry *C. necator* H16 kultivované v minerálnom aj NB médiu, a tiež *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivované len v minerálnom médiu.

Príprava vzoriek pozostávala v niekoľkých krokoch. Z pripravených buncných suspenzií bolo niekoľkokrát odobrané po 10 ml do centrifugačných skúmaviek. Suspenzia buniek bola centrifugovaná pri otáčkach 5000 rpm, po dobu 5 min. Po odstránení supernatantu sa biomasa resuspendovala v 10 ml fyziologického roztoku PBS a opäť sa celá suspenzia scentrifugovala (5000 rpm, 5min). Supernatant bol znova odliaty a následne sa biomasa rozsuspendovala v 5 ml

roztoku fosfátového pufru so soľou. Koncentračná rada týchto soľných roztokov pozostávala zo 4 rôznych koncentrácií NaCl rozpusteného vo fosfátovom pufri (0 g NaCl/L pufru; 50 g/L, 100 g/L, 200 g/L). Tieto bunčné suspenzie v hypertonickom prostredí boli následne preliate do 50 ml Erlenmayerových baniek a umiestnené na trepačku po dobu 2 hodín pri 180 rpm a teplote 30 °C. Po uplynutí tejto doby sa zo suspenzie buniek odobralo približne 2,5 ml do mikroskúmaviek Eppendorf a tie sa stočili pri 14 800 rpm (5 minút pri teplote 20 °C). Na záver sa odlial supernatant a steny mikroskúmaviek sa osušili od prebytočného množstva extracelulárnej vody vo vzorkách.

*Tabuľka 5* Zloženie fyziologického roztoku PBS

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

*Tabuľka 6* Zloženie fosfátového pufru, 50 mM; pH=7,4

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,89 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,761 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tento postup prípravy vzoriek platí pre tzv. hyperosmotické experimenty. To znamená, že správanie a obsah intracelulárnej vody sa sledoval v hypertonickom prostredí, teda v prostredí o vysokej osmolalite. Naproti tomu sa uskutočnila rada tzv. hypoosmotických experimentov. V tomto prípade je postup prípravy vzoriek totožný s predchádzúcim až do fázy, kedy sú bakteriálne bunky po uplynutí 2 hodín v hypertonickom prostredí preliate do centrifugačných skúmaviek a stočené pri 5000 rpm po dobu 5 minút. Po odliatí supernatantu sa biomasa resuspenduje v 5 ml destilovanej vody, čím sa bakteriálne bunky dostávajú do úplne hypotonického prostredia. Suspenzie sa preliali do 50 ml Erlenmayerových baniek a umiestnili na trepačku (180 rpm, 30 °C) na 10 minút. Následne sa odoberie znova približne 2,5 ml z každej suspenzie buniek do mikroskúmaviek Eppendorf a scentrifuguje (14 800 rpm, 5min, 20 °C). Opäť sa odstráni supernatant a steny mikroskúmaviek sa osušia.

### 3.3.1 Termogravimetrická analýza

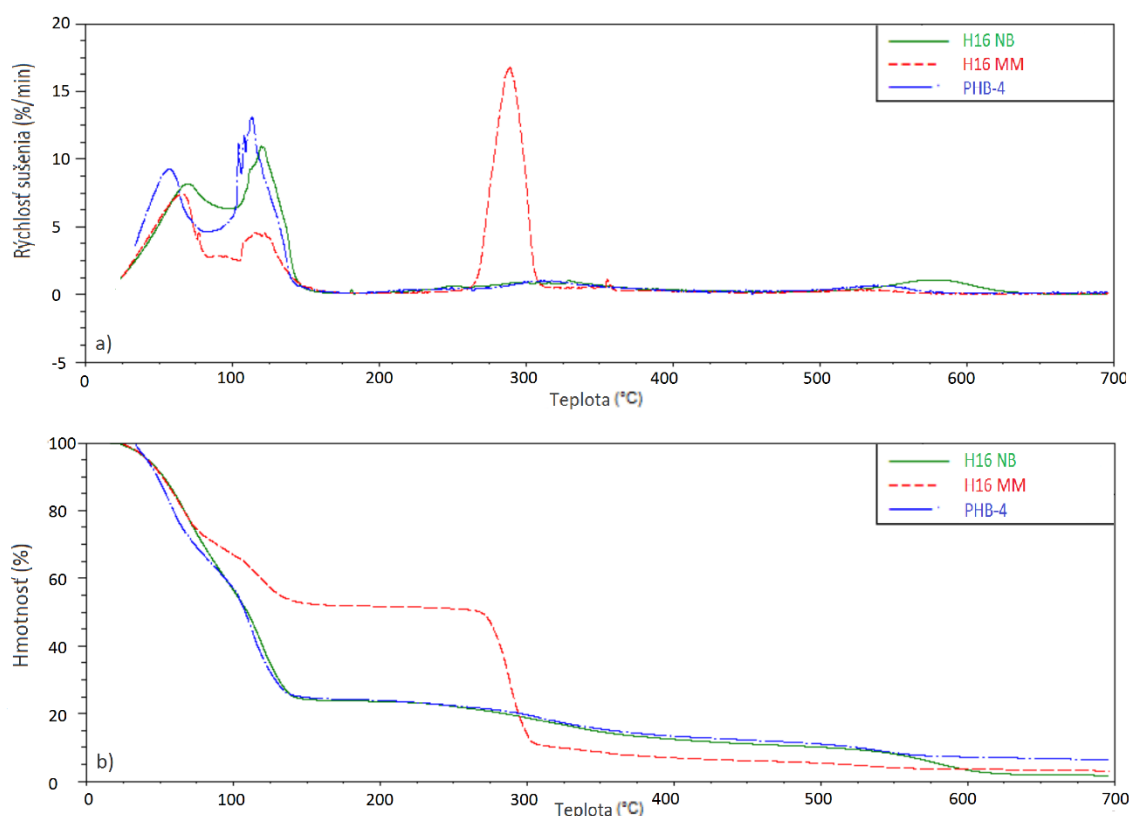
Termogravimetria bola realizovaná prostredníctvom prístroja TGA Q5000IR (TA Instruments). Vzorky boli podrobené izotermickému sušeniu pri teplote 70 °C, po dobu 40 minút. Následne bola teplota skokom zvýšená na 200 °C za účelom stanovenia celkového obsahu vody vo vzorke. Meranie prebiehalo v inertnej atmosfére dusíku s rýchlosťou ohrevu 10 °C/min.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kľúčovým cieľom experimentálnej časti tejto diplomovej práce bolo overiť využiteľnosť navrhovanej metódy pri štúdiu stanovenia obsahu intracelulárnej vody v modelových bakteriálnych bunkách. Na jeho dosiahnutie sa využila metóda termickej analýzy, termogravimetrická analýza, pomocou ktorej sme schopní odhadnúť, ako sa táto voda v daných bunkách správa, a či môže byť použiteľná aj v takej miere, že bude schopná reagovať aj na rozdiely v morfológii daných baktérií. Pre tento účel boli ako modelové baktérie zvolené *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, ktoré sa líšia tým, že zatiaľ čo prirodzený kmeň (H16) je schopný produkcie a akumulácie intracelulárnych granúl PHB, mutantný kmeň (PHB<sup>-4</sup>) túto schopnosť nemá.

### 4.1 Termogravimetria – obecný prístup k vyhodnocovaniu

Pri posúdení využiteľnosti TGA na riešenie tejto práce sme začali štandardne používaným typom TGA analýzy, a to konkrétne dynamickou termogravimetriou. Tento termogravimetrický záznam, Obr. 8, je závislosťou rýchlosti sušenia (a) a úbytku hmotnosti (b) na teplote.

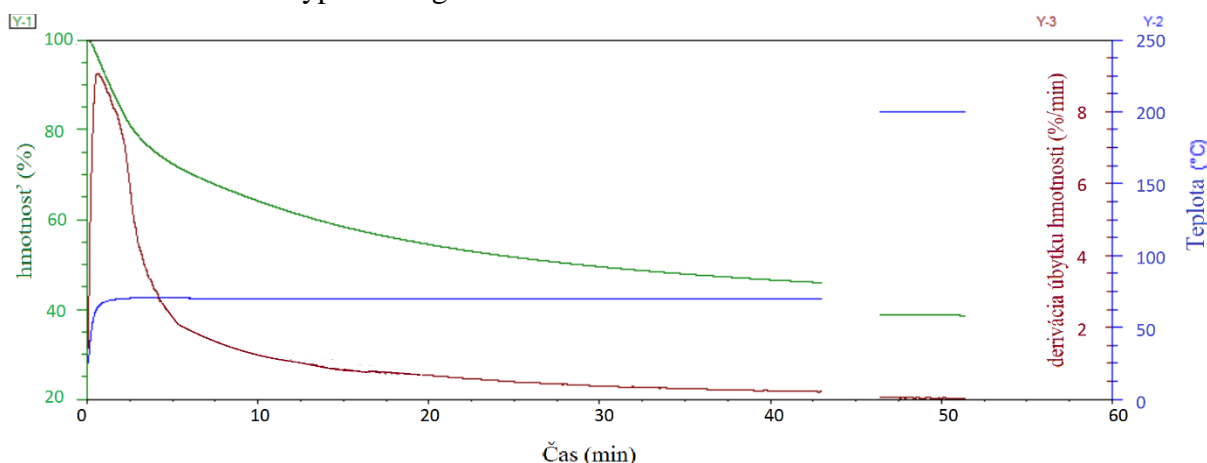


**Obrázok 8** Výsledky dynamickej TGA analýzy modelových buniek *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>-4</sup>. a) Teplotná závislosť rýchlosti zmeny hmotnosti, b) teplotná závislosť relatívnej hmotnosti (rýchlosť ohrevu 10 °C/min).

Na obrázku 8a) nám krivky na začiatku naznačujú 2 píky, odpovedajúce dvom oddeliteľným procesom spojené s úbytkom hmotnosti vzoriek. Tieto procesy by mohli vzhľadom k teplotnému rozsahu, pri ktorom prebiehajú, pravdepodobne odpovedať sušeniu dvoch foriem

vyskytujúcej sa vody, extracelulárnej a intracelulárnej vode. Avšak nie s veľkou presnosťou nám tento typ experimentu dokáže odlíšiť tieto dve vody, pretože v tomto prípade by sa musel klásť veľký dôraz na to, koľko extracelulárnej vody by sa do vzorky pred samotným meraním vnieslo. Pokiaľ by jej tam bolo prítomnej menej, tak by sa táto voda dokázala vysušiť pri oveľa nižšej teplote, než keby bolo vo vzorke podstatne vyššie množstvo tejto extracelulárnej vody. Využitelnosť takéhoto experimentu teda nemá pre naše účely veľký význam. Ale na druhej strane tu môžeme vidieť, najmä na zobrazení po *a)*, že do 200 °C sa rýchlosť sušenia ustáli na nule, z čoho možno usúdiť, že daná vzorka je už kompletne vysušená, bez toho aby dochádzalo k termickému rozkladu organickej hmoty buniek. Ďalej je u buniek s obsahom PHB granúl (*C. necator* H16 MM) vidieť pík pri 300 °C, kedy sa tento polymér rozkladá, ale to už nie je v oblasti riešeného problému.

Z uvedeného sa teda získali informácie o prítomnosti dvoch foriem vody, a zároveň dôležitý poznatok o teplote 200 °C, pri ktorej je zo vzorky kompletne odparená všetka voda. Na základe týchto informácií sa uskutočnili následne termogravimetrické izotermické experimenty pri teplote 70 °C (navrhnutá teplota, vyskytujúca sa v rozsahu teplôt, pri ktorých v rámci dynamickej TGA analýzy dochádzalo k sušeniu vzoriek). Na *Obr. 9* je vyobrazená klasická závislosť na čase tohto typu termogravimetrie.

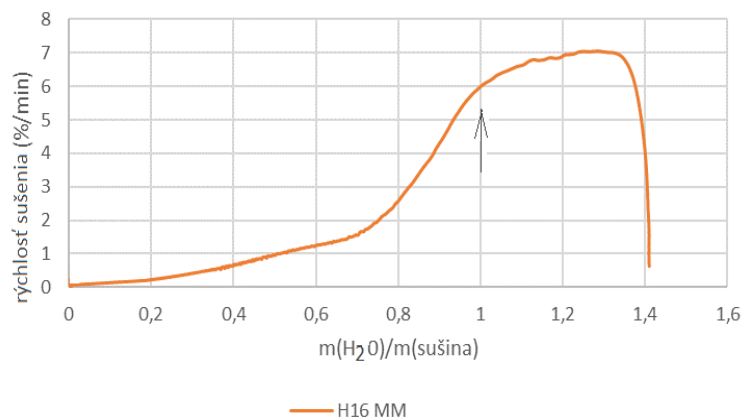


**Obrázok 9** Vzorový izotermický TGA signál pre *C. necator* H16, osmoticky nestresované bunky (0 g/L) – teplota (modrá), úbytok hmotnosti (zelená), a rýchlosť sušenia (červená) v závislosti na čase.

Samozrejme, na ustálenie požadovanej teploty je potrebný určitý čas, preto je tam vidieť určitý úvodný nábeh (modrá krivka). Tento úvodný nábeh sa nevyhodnocoval, nakoľko je daný samotným prístrojom, ktorý potrebuje nezbytnú dobu k vytemperovaniu na požadovanú teplotu. Po vytemperovaní vzorky nasleduje izotermálny krok, v ktorom spočíva statická TGA, a po ňom nasleduje krok absolútneho dosušenia pri 200 °C, pri ktorom sme vychádzali z predchádzajúceho experimentu (dynamickej TGA). Po celú dobu zároveň sledujeme úbytok hmotnosti (zelená krivka), ktorý pri skokovom zvýšení teploty na 200 °C ešte o niečo klesne. Dochádza k spomínanému dosušeniu, ktoré je dôležité na stanovenie celkovej sušiny vo vzorke. Samotná hmotnosť, resp. úbytok hmotnosti, nie je tak dôležitý ako zmeny rýchlostí sušenia (červená krivka). So zvyšujúcou sa teplotou, v dôsledku temperovania prístroja, sa zväčšuje aj rýchlosť sušenia. V momente dosiahnutia konštantnej teploty, by aj sušenie malo prebiehať konštantnou rýchlosťou, ale len v tom prípade, keby bola v systéme prítomná len voľná voda. Krivka by tak mala podobný priebeh ako pri teplotnej závislosti. Na grafe však pozorujeme jej

klesajúci charakter, ktorý je následkom úbytku najskôr najlabilnejšie viazanej vody s najväčšou rýchlosťou sušenia, potom nasleduje sušenie menej labilnej vody až dôjde k vyparovaniu najpevnejšie viazanej vody, ktorej rýchlosť sušenia je podstatne nižšia. Takisto možno zo závislostí demonštrovať, že bod zlomu rýchlosti sušenia odpovedá práve počiatku izotermálneho kroku, kedy sa prístroj vytemperoval na požadovanú teplotu 70 °C.

Z uvedenej časovej závislosti však nedostávame potrebné informácie o obsahu vody v bakteriálnych bunkách. Preto v ďalšom kroku pre naše potreby bol obsah intracelulárnej vody vyhodnocovaný podľa doporučenia Uribelarrea [58], kde vynášame rýchlosť sušenia v závislosti na obsahu vody na jednotku sušiny. V tejto závislosti už následne dokážeme hľadať hranicu medzi obsahom vody vo vzorke, kde sa rýchlosti menia v dôsledku zmeny mechanizmu sušenia. Na *Obr.10* máme závislosť rýchlosti sušenia na zbytkovej vode pre bunky bakteriálneho kmeňa *C. necator* H16 kultivovaných v minerálnom médiu (MM). Tu je potreba si uvedomiť, že pri popisovaní priebehu týchto doporučených závislostí, začíname od najvyššieho obsahu vody vo vzorke po najnižší, čo znamená, že dané závislosti sa čítajú zprava-dol'ava.

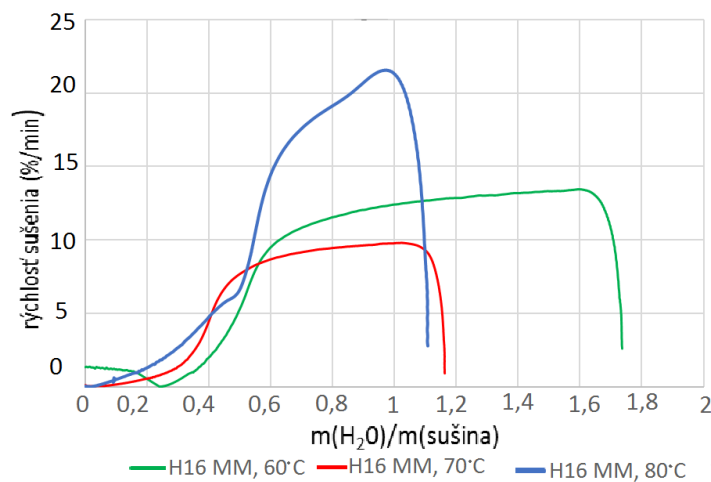


**Obrázok 10** Doporučené vyhodnocovanie sušenia buniek *C. necator* H16 MM na základe izotermickej TGA

Aby sme sa skutočne pozreli na správanie intracelulárnej vody, je dôležité zohľadniť, že nie vždy sa do vzoriek vnáša rovnaké množstvo extracelulárnej vody. Preto pri tomto spracovaní vynášame deriváciu úbytku hmotnosti, teda rýchlosť sušenia, ako funkciu špecifického obsahu vody (v gramoch vody na gram sušiny), stanovenej zo znalosti konečnej hmotnosti pri dosušení pri 200 °C. V dôsledku ustáľovania konštantnej teploty, ako bolo vysvetlené vyššie, dochádza najskôr (zprava) k zvyšovaniu rýchlosti sušenia. Potom nasleduje krok viacmenej izotermálny, kedy sa odparuje pravdepodobne voda extracelulárna, pretože odparovanie prebieha takmer konštantnou rýchlosťou. Následne dochádza k strmému poklesu rýchlosti, s tým ako sa najskôr sušia lepšie transportovateľné intracelulárne formy vody a potom pevnejšie viazané formy. Dosušovanie pri 200 °C je prakticky najpomalšie, až sa dostávame k nule (nulový špecifický obsah vody odpovedajúci kompletne dosušenej vzorke).

Pri izotermickej TGA je taktiež dôležitý vplyv teploty, pri ktorej daný izotermálny krok sušenia prebieha. Ako bolo popísané vyššie, meranie prebiehalo pri konštantnej teplote 70 °C. Tomu však predchádzala rada experimentov na overenie tejto teploty. Prvou skúšanou teplotou

bolo spomínaných 70 °C, a k nej sa pridali teploty o 10 °C vyššia a nižšia, teda 60 °C a 80 °C. Vyhodnotené závislosti pri jednotlivých teplotách možno sledovať na Obr. 11.



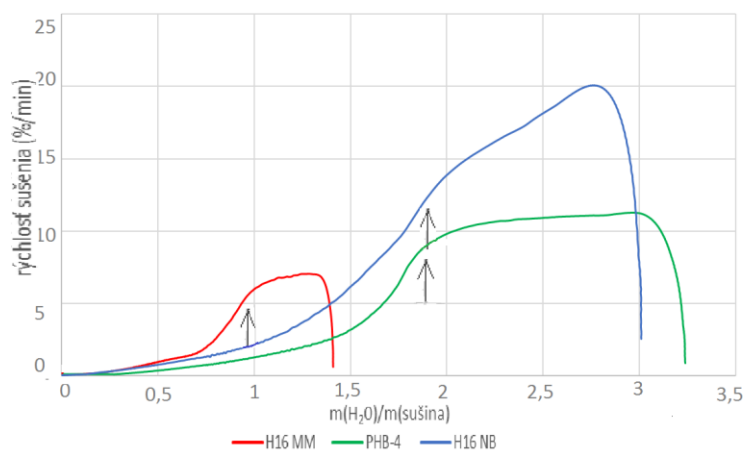
**Obrázok 11** Grafické závislosti rýchlostí sušenia pri jednotlivých teplotách izotermickej TGA

Zobrazený termogram pojednáva o sušení tej istej bunky pri troch rôznych teplotách. Pri teplote 80 °C môžeme pozorovať relatívne strmú časť krivky, ktorá odpovedá sušeniu extracelulárnej vody, a ktoré by malo prebiehať, na základe vyššie uvedeného, pomerne konštantnou rýchlosťou. Strmosť smernice tejto časti krivky naznačuje, že zo systému sa nesúši len extracelulárna voda, ale už z časti dochádza aj odparovaniu vody z vnútra bunky, pravdepodobne v dôsledku príliš vysokej nastavenej teploty. Pri teplotných programoch nastavených na 60 °C a 70 °C už tento dej nie je viditeľný, čo usudzujeme na pomerne konštantnom priebehu sušenia extracelulárnej vody. Avšak pri teplote 60 °C je pri konci, pri dosušovaní (naľavo) patrne zvýšenie rýchlosti sušenia. Z toho vyplýva, že pri 200 °C je ešte v systéme stále prítomná nejaká voda, a teda doba sušenia pri 60 °C nebola dostatočná na to, aby sa všetka voda vysušila. Naproti tomu, sušenie pri 70 °C je vhodné aj z hľadiska konštatného sušenia extracelulárnej vody, a rovnako je postačujúce aj na vysušenie veškerej vody v systéme.

#### 4.1.1 Vplyv morfológie buniek

V rámci ďalšieho overovania používanej metódy sme medzi sebou porovnali termogramy 3 typov buniek, a to *C. necator* H16 kultivovaných v MM, ktorý sa od *C. necator* PHB<sup>-4</sup> a *C. necator* H16 kultivovaných v NB z morfológického hľadiska líši produkciou a akumuláciou polyhydroxybutyrátu v podobe intracelulárnych granúl. Na Obr. 12 pozorujeme jednak tvary jednotlivých závislostí, ktoré korešpondujú s predchádzajúcimi poznatkami, a zároveň je vidieť, že hranica intracelulárnej vody pre H16 MM výrazne klesá oproti zvyšným dvom bunkám. Dôvodom je prítomnosť ďaleko väčšej sušiny u týchto buniek, H16 MM. Vďaka tomu, že tieto bunky obsahujú vo svojom intracelulárnom priestore granule polyméru, je v nich proporcionálne menej vody na jednotku sušiny. Danou metódou sme teda schopní vidieť morfológické rozdiely v bunkách, ktoré sa v tomto prípade prejavujú výrazným rozdielom v obsahu intracelulárnej vody, vyjadrenej relatívne k obsahu sušiny vzoriek.



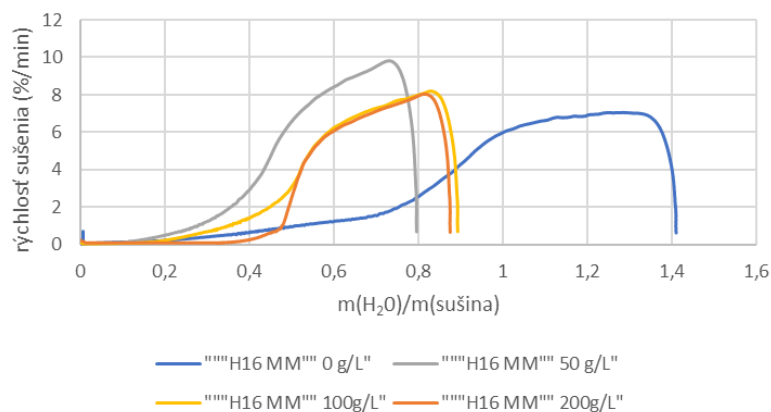


**Obrázok 12** Grafické závislosti rýchlostí sušenia jednotlivých typov buniek *C. necator*

## 4.2 Hyperosmotické experimenty

### 4.2.1 Pohľad zrovnania – správanie jedného typu bunky v rôznych koncentráciách soli

Zo širokej škály experimentov sa pre účely porovnania správania jednotlivých typov buniek vybrali reprezentatívne vzorky, s ktorými sa stále pracovalo pri nadchádzajúcom spracovaní. Na *Obr.13* je závislosť rýchlostí sušenia na zbytkovej vode pre bunky bakteriálneho kmeňa *C. necator* H16 kultivovaných v minerálnom médiu (MM).

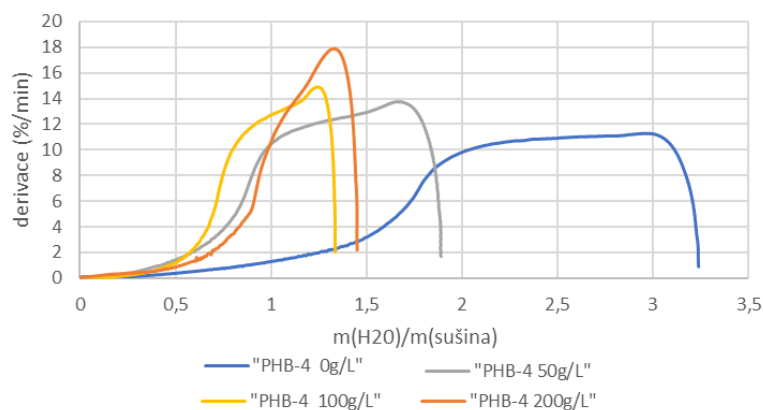


**Obrázok 13** *C. necator* H16 MM; porovnanie hyperosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným

Zobrazenie je priemetom porovnania osmoticky nenamáhaných buniek voči postupnému zvyšovaniu osmotického koncentrácie. Strmost' smernice pre sušenie extracelulárnej vody je v prípade osmoticky nenamáhaných buniek najnižšia, možno tu pozorovať takmer konštantnú rýchlosť sušenia, čo značí, že sa asi jedná o voľnú vodu mimo bunky. Spočiatku teda dochádza k sušeniu tejto extracelulárnej vody, a potom intracelulárnej. Zodpovedá tomu dvojrýchlostný profil sušenia, viditeľný pre všetky štyri závislosti.

Krivky predstavujúce jednotlivé stupne osmotického namáhania, čo sa tvaru týka, sa nejako významne medzi sebou nemenia. Možno tu pozorovať narastajúcu strmosť smernice pre sušenie extracelulárnej vody oproti osmoticky nenamáhaným bunkám, čo môže naznačovať, že nedochádza k sušeniu výhradne len extracelulárnej vody, ale čiastočne už môže byť z bunky transportovaná aj intracelulárna voda práve v dôsledku osmotického namáhania. Viacmenej je však rýchlosť sušenia intracelulárnej vody pre všetky koncentrácie rovnaká. Nerovnaká rýchlosť sušenia intracelulárnej vody, ktorá je vyššia oproti bunkám nenamáhaným, môže byť spôsobená tým, že v dôsledku osmotického stresu je intracelulárnej vody menej. Pretože predpokladáme, že čím je tam danej vody menej, o to pevnejšie je tam viazaná. Ak sú tam prítomné rôzne sily pútania vody, je viazaná na rôzne hydratované povrchy, tak už v prípade osmotického stresu dochádza k odstraňovaniu najmenej viazanej vody. Sušením takejto stabilnejšej viazanej vody je následne náročnejšie a smernica klesá o to strmšie. Zároveň je zrejмый posun hranice medzi extracelulárnou a intracelulárnou vodou, porovnaním závislostí pre namáhané voči nenamáhaným bunkám, ktorý bude diskutovaný ďalej.

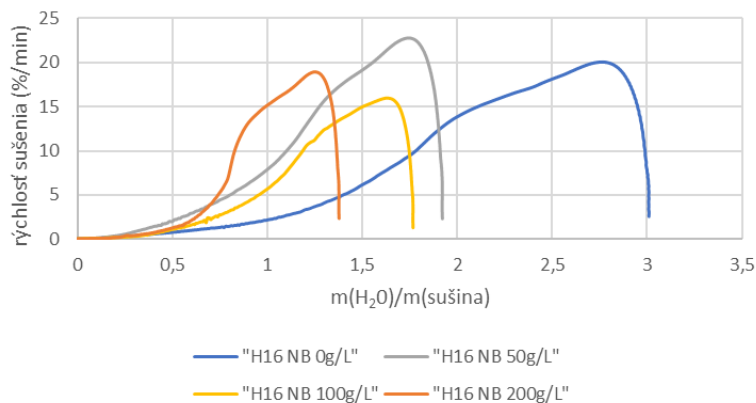
Nasledujúce zobrazenie poukazuje na závislosť rýchlostí sušenia na zbytkovej vode pre bunky bakteriálneho kmeňa *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálnom médiu.



**Obrázok 14** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>; porovnanie hyperosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným

Osmoticky nenamáhané bakteriálne bunky kmeňa *C. necator* PHB<sup>-4</sup> majú veľmi podobný tvar ako *C. necator* H16 MM, a teda je pozorovateľný jasný dvojrýchlostný charakter sušenia. Extracelulárna voda je sušená viacmenej rovnakou rýchlosťou – strmosť smernice je nízka a krivka je v danom úseku takmer rovná. Ďalej môžeme sledovať, pri osmotickom namáhaní najnižšou koncentráciou soli, 50 g/L, ako sa tvar krivky pomerne zachoval a dvojrýchlostný profil sušenia je stále pomerne viditeľný. Zvýšením osmotického stresu koncentráciou soli 100 g/L pozorujeme, že sušenie extracelulárnej vody sa už badateľne neuberá rovnakou rýchlosťou. Vystavením bakteriálnych buniek ešte extrémnejším koncentráciám soli vidíme, že rozdiel medzi sušením extracelulárnej a intracelulárnej vody je relatívne zmazaný a dvojrýchlostný profil sušenia sa preto stráca. Očividným javom sa stáva práve malá hranica medzi extracelulárnou a intracelulárnou vodou, ktorá prakticky splýva. Šikmosť smernice a uvedený dej môžu byť preto známkou plazmolýzy a určitého porušenia transportného mechanizmu vody bunkou.

Posledný graf (Obr.15) z tejto porovnávacej rady patrí pre bunky *C. necator* H16 kultivovaných v médiu Nutrient Broth (NB). Opäť sú k dispozícii vykreslené osmoticky namáhané oproti nenamáhaným bunkám.



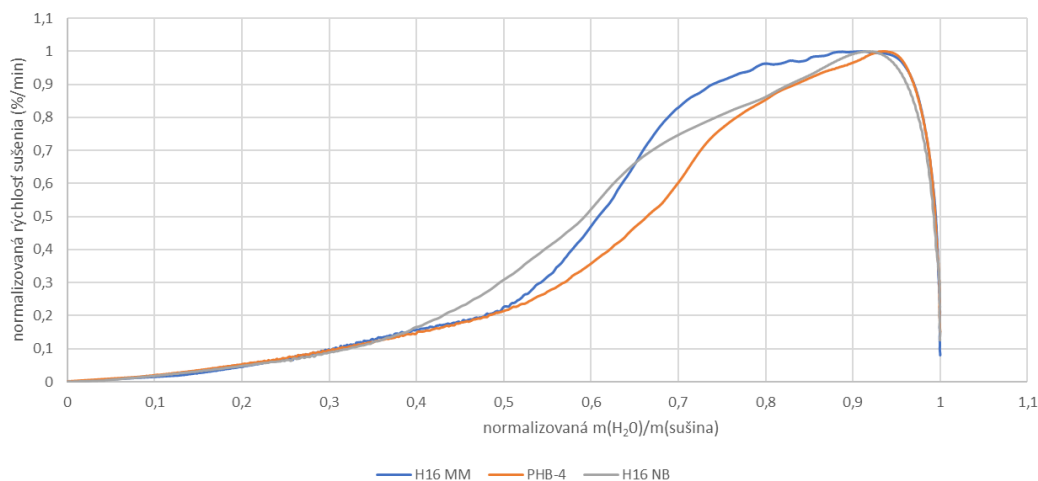
**Obrázok 15** *C. necator* H16 NB; porovnanie hyperosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným

V tomto zobrazení je vidieť, že už pri nenamáhaných bunkách je dvojsmernicový charakter horšie rozoznateľný. Rovnako pri stredných koncentráciách soli je rýchlostný profil takmer zmazaný. Tým, že sa v bunkách nenachádzajú granule príslušného polyméru, voda medzi extracelulárnym a intracelulárnym priestorom prechádza voľnejšie. Zároveň však nie je badateľné nejaké významné porušenie mechanizmu transportu vody.

#### 4.2.2 Pohľad zrovnania – správanie rôznych typov buniek v rovnakých koncentráciách soli

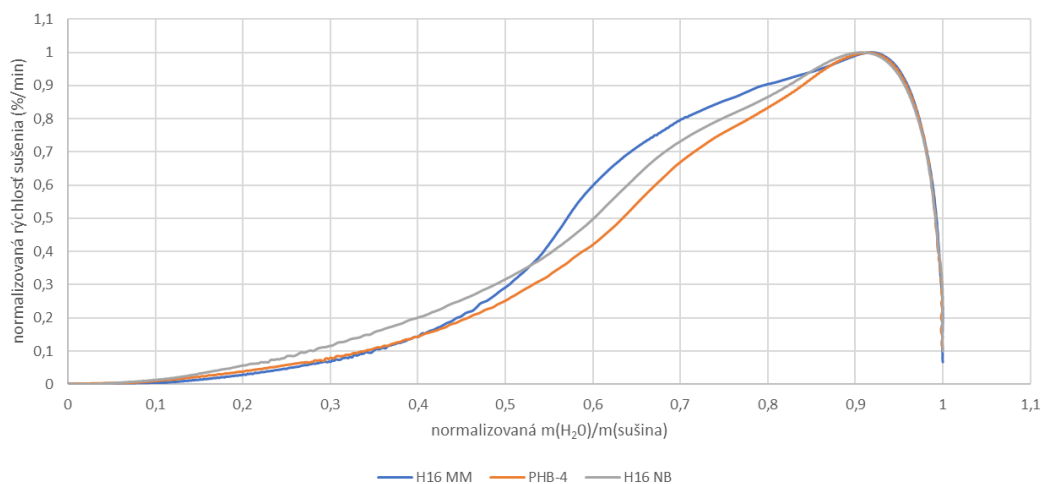
Derivácia úbytku hmotnosti, resp. rýchlosť sušenia nám hovorí koľko percent vody nám ubudne za rovnaký čas. Ale tým, že rýchlosť je ovplyvnená množstvom jednotlivých vôd, ktoré sa tam nachádzajú, tak záleží koľko celkového daného typu vody tam je. Preto boli v ďalšom kroku tvary kriviek normalizované, aby sme sa dostali naozaj k informácii, ktorá by sa mala prejavovať najmä tvarom uvedených závislostí. Táto normalizácia sa teda využila na porovnanie zmeny v tvare a oddelenie pohľadu na to, koľko ktorých vôd tam je. Pretože kľúčovou informáciou je bod zlomu – či je vôbec možné ho stanoviť a kde sa nachádza (diskutované ďalej).

Nadchádzajúce štyri grafy závislostí zobrazujú správanie rôznych typov buniek v jednotlivých stupňoch osmotického stresu. Obr.16 prezentuje osmoticky nenamáhané bakteriálne bunky. V tomto prípade to vyzerá, že dané závislosti sa v celku zrovnali, hoci na prvý pohľad sa to v predchádzajúcich grafoch tak nejavilo.



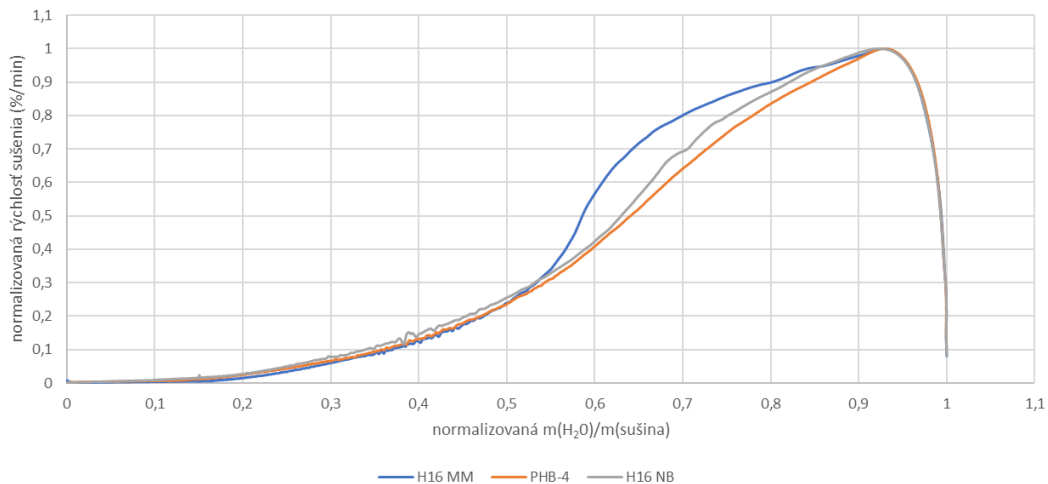
**Obrázok 16** Normalizácia pre hyperosmoticky nenamáhané bunky *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>, 0g/L

Zrovnali sa najmä bunky kmeňov PHB<sup>-4</sup> a H16 kultivované v NB, čo je pomerne logické, keď vezmeme do úvahy, že H16 kultivované v MM je bakteriálny kmeň, ktorý obsahuje granule polyméru. Pokiaľ sa zameriame opäť na tvar kriviek, tak je zrejмый dvojrýchlostný charakter sušenia, aj keď u PHB<sup>-4</sup> a H16 NB je tento rýchlostný profil horšie rozoznateľný. U H16 MM je rozdiel medzi extracelulárnou a intracelulárnou vodou najvýraznejší, významná je tiež nízka strmota smernice pre extracelulárnu vodu, ktorá značí viacmenej rovnakú rýchlosť sušenia.



**Obrázok 17** Normalizácia pre najnižší stupeň hyperosmotického stresu, 50 g/L, na bunkách *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

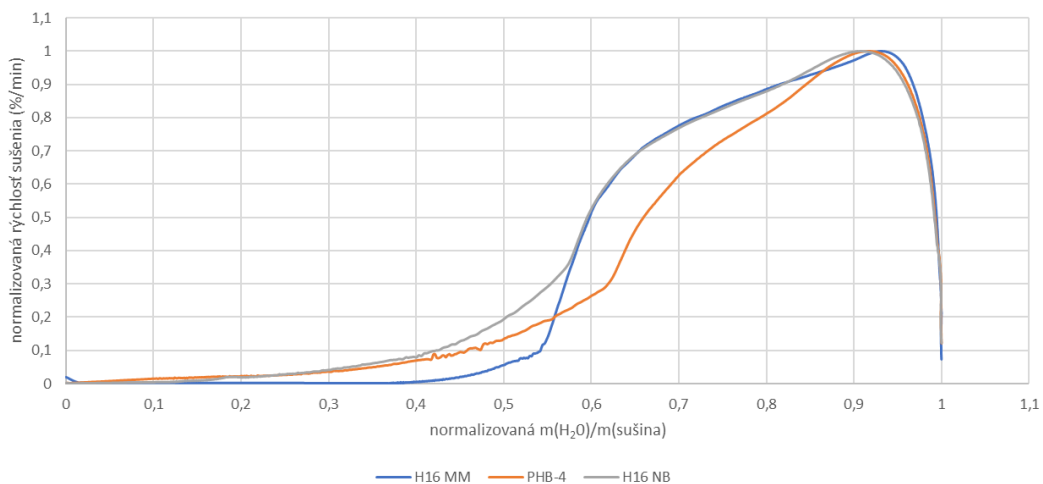
Najnižšia osmotická námaha (Obr.17), spôsobená koncentráciou soli 50 g/L, vyvolala u H16 MM jemnú stratu na jednoznačnom oddelení extracelulárnej vody od intracelulárnej, ale dvojsmerný profil je napriek tomu stále viditeľný. Bakteriálne bunky PHB<sup>-4</sup> a H16 NB však výrazne nemenia svoj tvar oproti nenamáhaným bunkám.



**Obrázok 18** Normalizácia pre stredný stupeň hyperosmotického stresu, 100 g/L, na bunkách *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

Na *Obr. 18* možno sledovať takmer úplné splynutie kriviek pre PHB<sup>-4</sup> a H16 NB, na ktorých je hranica medzi extracelulárnou a intracelulárnou vodou pomerne malá. Naproti tomu u H16 MM je stále jasne viditeľná. Obecne sa ale rýchlostné profily sušenia všetkých typov buniek nejako významne nemia od predchádzajúceho prípadu.

Za podmienok extrémneho osmotického šoku pri koncentrácií soli 200 g/L, je možné pozorovať správanie buniek najlepšie. Na *Obr. 19* majú bakteriálne bunky PHB<sup>-4</sup> ďaleko horšie rozoznateľný dvojrýchlostný profil sušenia. Taktiež je zjavné, že tvary kriviek pre bakteriálny kmeň H16 kultivovaných v NB a MM sú si značne podobné. Dôvodom, prečo je v tomto prípade u PHB<sup>-4</sup> badateľne splývajúca hranica medzi extracelulárnou a intracelulárnou vodou je pravdepodobne fakt, že na tomto bakteriálnom kmeni sa už prejavil efekt plazmolýzy.

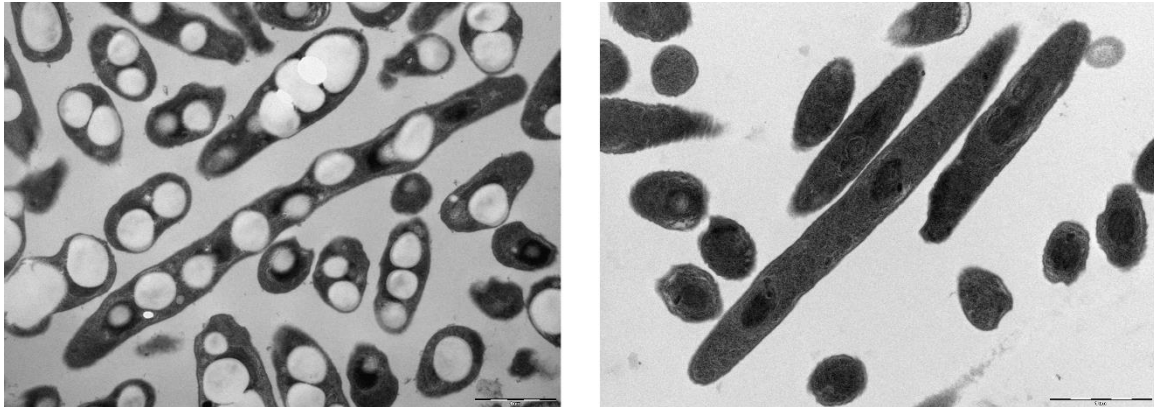


**Obrázok 19** Normalizácia pre najvyšší stupeň hyperosmotického stresu, 200 g/L, na bunkách *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

Obecne si však treba uvedomiť aj fakt, že rýchlosti sušenia bakteriálneho kmeňa H16 kultivovaného v MM sú podstatne menšie, zatiaľ čo u ostatných dvoch, najmä pri osmotickom namáhaní, sú rýchlosti ďaleko väčšie. Tieto rýchlostné rozdiely sa pri normalizácii stratia,

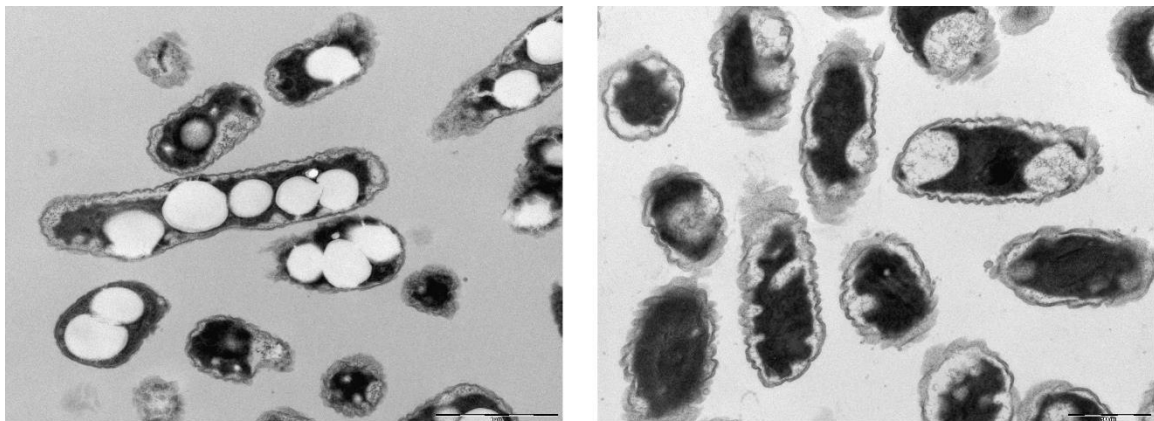
a preto bakteriálne bunky H16 v NB, ktoré sa v samostatných grafoch správaním približovali viac k PHB<sup>-4</sup>, už môžu v tomto normalizovanom pohľade kopírovať tvar skôr H16 v MM.

V rámci tejto kapitoly boli pre štúdium osmotického stresu použité snímky z Transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM) za účelom sledovania morfológických zmien v bakteriálnych bunkách. Predložené snímky boli zaobstarané ako súčasť diplomovej práce M. Miléřové [69]. Pomocou TEM boli pozorované kmene *C. necator* H16 v MM a PHB<sup>-4</sup> vystavené jednotlivých úrovniám hyperosmotického stresu.

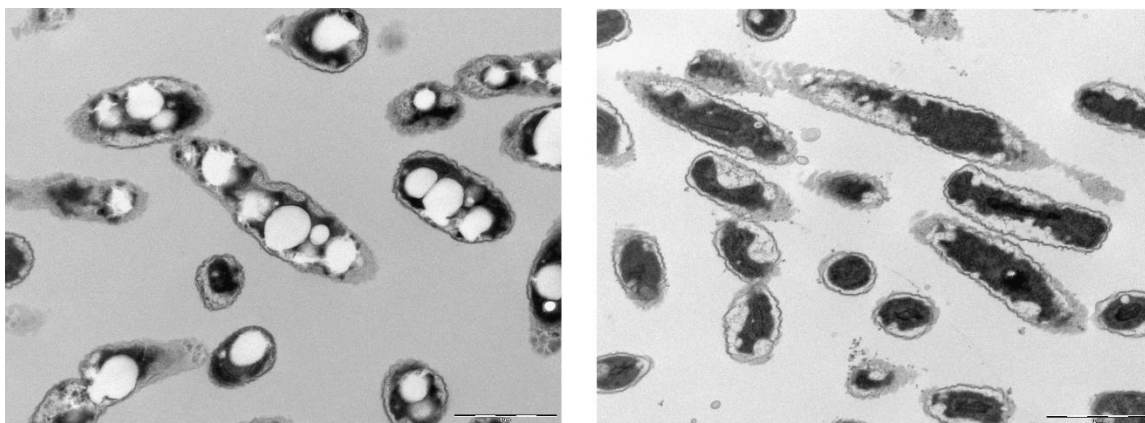


**Obrázok 20** Snímka *C. necator* H16 (vľavo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo); 0 g/L [69].

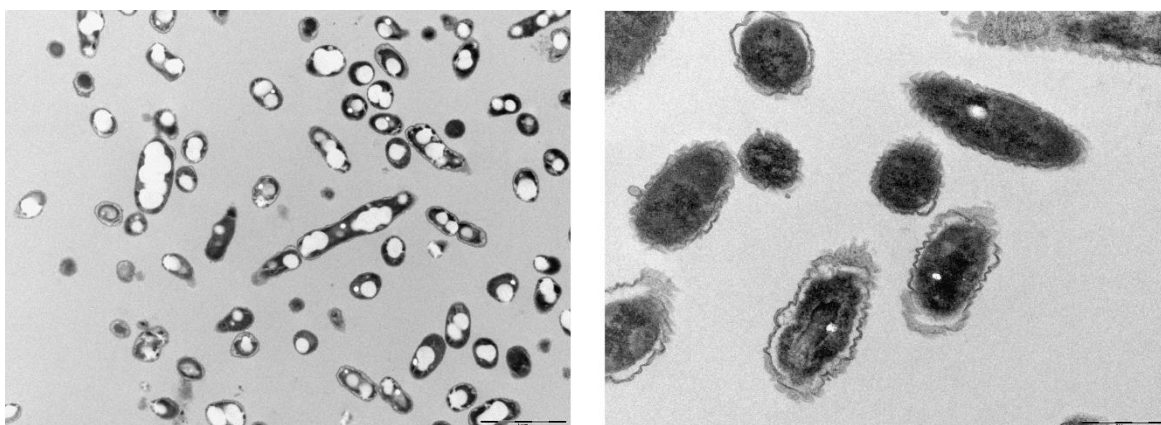
*Obr.20* poskytuje náhľad na intracelulárne granule PHB prítomné u produkčného kmeňa, zatiaľčo u mutantného kmeňa chýbajú, v dôsledku jeho neschopnosti produkcie a akumulácie daného polyméru.



**Obrázok 21** Snímka *C. necator* H16 (vľavo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo); 50 g/L [69].



**Obrázok 22** Snímka *C. necator* H16 (vľavo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo); 100 g/L [69].



**Obrázok 23** Snímka *C. necator* H16 (vľavo) a *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (vpravo); 200 g/L [69].

Uvedené snímky daných baktérií potvrdzujú vyššie spozorované skutočnosti, predpokladané z výsledkov termickej analýzy. Postupným zvyšovaním hyperosmotického šoku dochádza u buniek PHB<sup>-4</sup> k javu plazmolýzy, a to dokonca už pri najnižšej koncentrácii soli. Pri procese plazmolýzy sa bunka dehydratuje, cytoplazma sa zmršťuje a dochádza k odchlípeniu cytoplazmatickej membrány od bunkovej steny. Tieto štruktúrne zmeny možno pozorovať vo všetkých prípadoch vystavenia buniek hyperosmotickému prostrediu.

Naproti tomu, u PHB produkčného kmeňa nedochádza k významným morfológickým zmenám buniek. Intracelulárne granule tu pravdepodobne fungujú ako oporné stavebné kamene, ktoré chránia bunku pred deformačnými zmenami bunkovej steny.

### 4.3 Hypoosmotické experimenty

Pre lepšie posúdenie transportných mechanizmov vody v jednotlivých bakteriálnych bunkách sa uskutočnila séria hypoosmotických meraní. Po umelom vyvolaní osmotického stresu boli baktérie navrátené do úplne hypotonického prostredia (destilovaná voda) za účelom sledovania, či je bunka schopná opäť transportovať vodu do svojho bunecného priestoru.

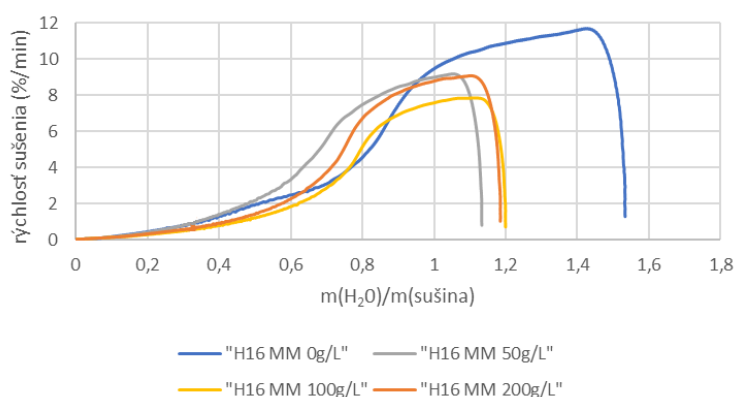
#### 4.3.1 Pohľad zrovnania – správanie jedného typu bunky v rôznych koncentráciách soli

*Obr.24* demonštruje zmeny v rýchlostiach sušenia hypoosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným bunkám. Zároveň pozorujeme na všetkých krivkách zachovaný



dvojrýchlostný charakter sušenia – hranica oddelenia daných vôd je v celku jasná. U nenamáhaných bakteriálnych buniek pozorujeme pomerne nízku strmú smernicu pre extracelulárnu vodu. Preto možno predpokladať, že najskôr dochádzalo k sušeniu extracelulárnej vody a potom k intracelulárnej.

Už pri najmenšom namáhaní je pozorovateľná značná zmena v rýchlosti sušenia najmä intracelulárnej vody. Možno povedať, že pri sušení vonkajšej vody už dochádza čiastočne k sušeniu intracelulárnej vody. Postupným zvyšovaním hypoosmotického namáhania sa táto rýchlosť významne nemení, no poloha smerníc naznačuje o niečo zhoršené oddelenie intracelulárnej vody od extracelulárnej. Výrazný posun je tiež v hranici medzi sušením extracelulárnej a intracelulárnej vody, porovnaním namáhaných buniek s nenamáhanými, diskutované ďalej. Z tvarov tiež možno usúdiť jednoznačne neporušený transportný mechanizmus.



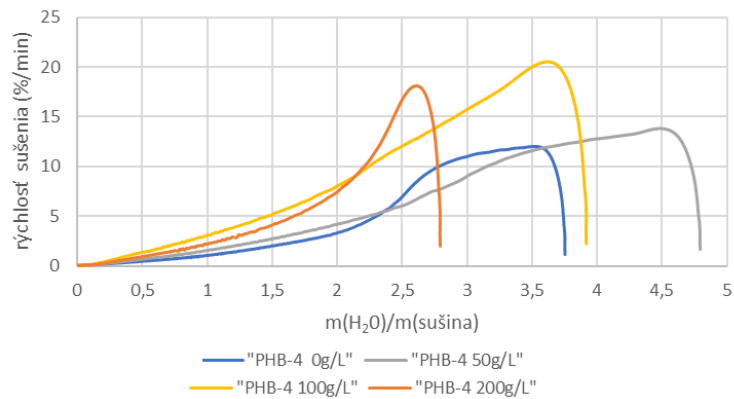
**Obrázok 24** *C. necator* H16 MM; porovnanie hypoosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným

Na Obr.25 máme závislosť rýchlosti sušenia na zbytkovej vode pre bunky bakteriálneho kmeňa *C. necator* PHB<sup>-4</sup> kultivovaných v minerálnom médiu. Nenamáhané bunky *C. necator* PHB<sup>-4</sup> po zavedení do hypotonického prostredia vykazujú dvojrýchlostný charakter sušenia, veľmi podobný H16 v MM. Nie je tu pozorovateľná žiadna významná deformácia tvaru závislosti. Po aplikovaní najnižšej koncentrácie soli na bunky PHB<sup>-4</sup> je na krivke značný rozdiel oproti nenamáhaným bunkám. Priesečník smerníc takmer splýva a sním aj jednoznačné odlíšenie extracelulárnej vody od intracelulárnej. Hypoosmotickým namáhaním pri koncentrácii soli 100 g/L, došlo k absolútnemu splynutiu smerníc, aj keď ešte neboli na bakteriálne bunky daného typu aplikované extrémne osmotické podmienky. V bunkách už tak mohlo dôjsť k čiastočnému porušeniu membrány a preto už nie sme schopní odlíšiť aká voda sa suší. Jej sušenie prebieha teda viacmenej dohromady.

Extrémna koncentrácia soli a následný návrat do hypotonického prostredia už bunky bakteriálneho kmeňa PHB<sup>-4</sup> zrejme nevydržali. Odlíšenie extracelulárnej vody od intracelulárnej je tu prakticky nemožné. Typický tvarový trend krivky úplne zanikol, z čoho logicky vyplýva, že už tu neexistuje ani hranica, resp. priesečník daných smerníc. Tvar krivky by mohol byť jasným dôkazom, že v bunkách došlo k plazmolýze. Mechanizmus transportu vody sa signifikantne porušil. V prípade porušenia membrány v dôsledku drastickej

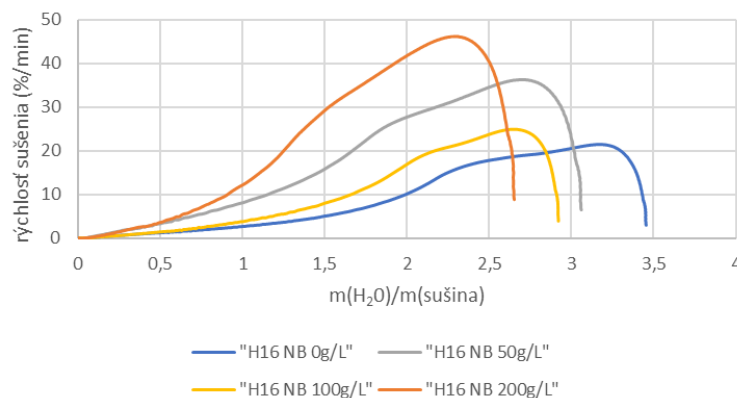


koncentrácie soli sú bunky rozbité prakticky všetky a čím viac budú bunky rozbité, tým menej je daná metóda použiteľná pre rozlíšenie intracelulárnej vody od extracelulárnej.



**Obrázok 25** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, porovnanie hypoosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným

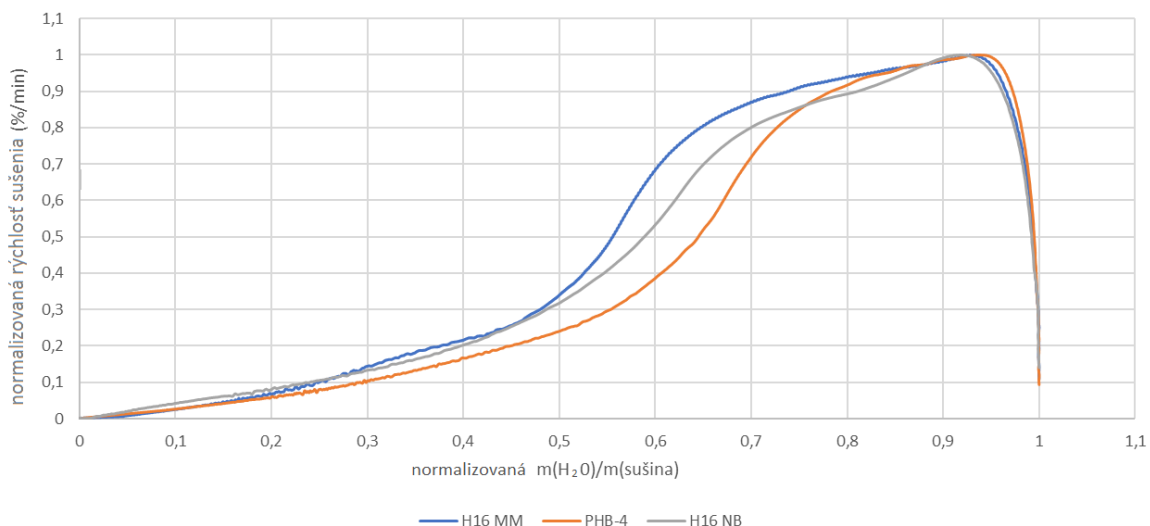
Posledným grafom z tejto porovnávacej rady patrí bunkám *C. necator* H16 kultivovaných v médiu Nutrient Broth (NB). Opäť sú k dispozícii vykreslené hypoosmoticky namáhané bunky oproti nenamáhaným bunkám. Obecne možno demonštrovať nie úplne jasný dvojrýchlostný profil už pri nenamáhaných bunkách a zväčšovaním osmotického stresu je tento rýchlostný charakter zreteľný stále menej a menej. Strmosť smernice pre extracelulárnu vodu so zvyšovaním koncentrácie soli postupne narastá, čo môže byť známkou toho, že v momente keď sa suší extracelulárna voda, už sa z bunky dostáva von aj voda intracelulárna. Pre najvyššiu koncentráciu je prechod veľmi zle rozoznateľný, a tak možno predpokladať porušenie transportného mechanizmu vody. Charakter sušenia sa takto javí podobný skôr pre bakteriálny kmeň PHB<sup>-4</sup>.



**Obrázok 26** *C. necator* H16 NB, porovnanie hypoosmoticky namáhaných buniek oproti nenamáhaným

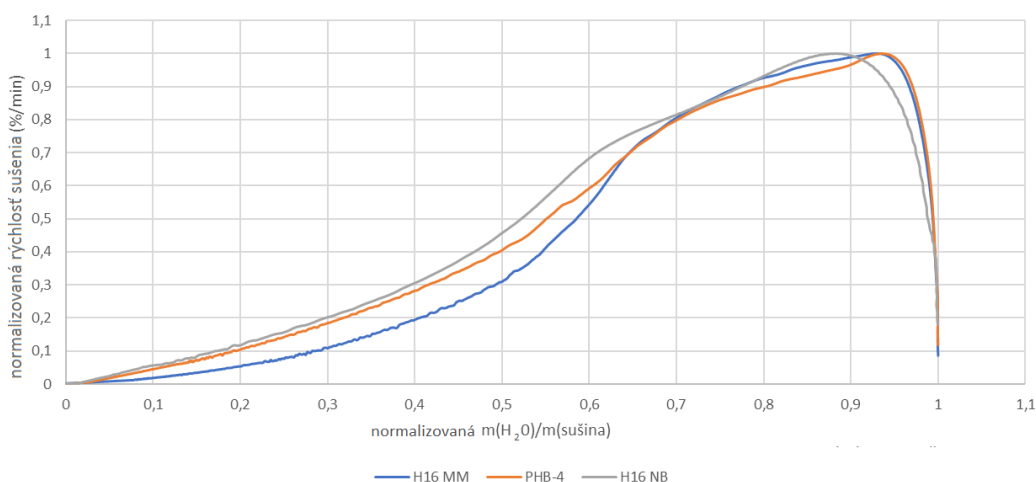
### 4.3.2 Pohľad zrovnania – správanie rôznych typov buniek v rovnakých koncentráciách soli

V tejto porovnávacej kapitole sa opäť využila normalizácia, za rovnakých podmienok a predpokladov ako bolo uvedené vyššie (kapitola 4.2.2). Grafické závislosti sú preložené cez seba na prehľadnejšie porovnanie tvarových vlastností kriviek jednotlivých buniek v postupne sa zvyšujúcom osmotickom strese, a ich návratom do hypotonického prostredia.



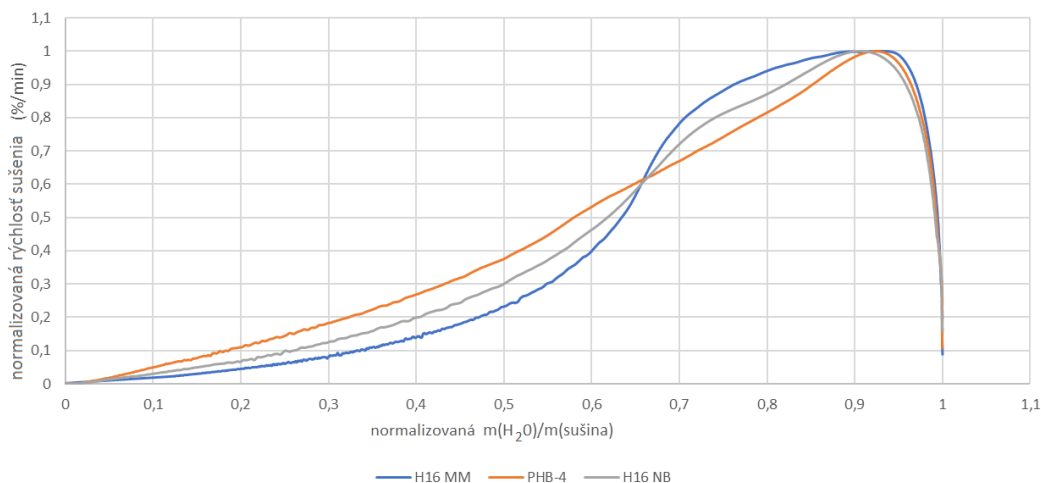
**Obrázok 27** Normalizácia pre hypoosmoticky nenamáhané bunky *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>, 0g/L

Obr.27 znázorňuje osmoticky nenamáhané bunky. Pozorovať môžeme relatívne zrovnanie kriviek, ktoré prezentujú dvojrýchlostný charakter sušenia, s viditeľnou hranicou medzi oddelením extracelulárnej vody od intracelulárnej. Zároveň však tento trend je najvýraznejší najmä u bakteriálneho kmeňa H16 MM.



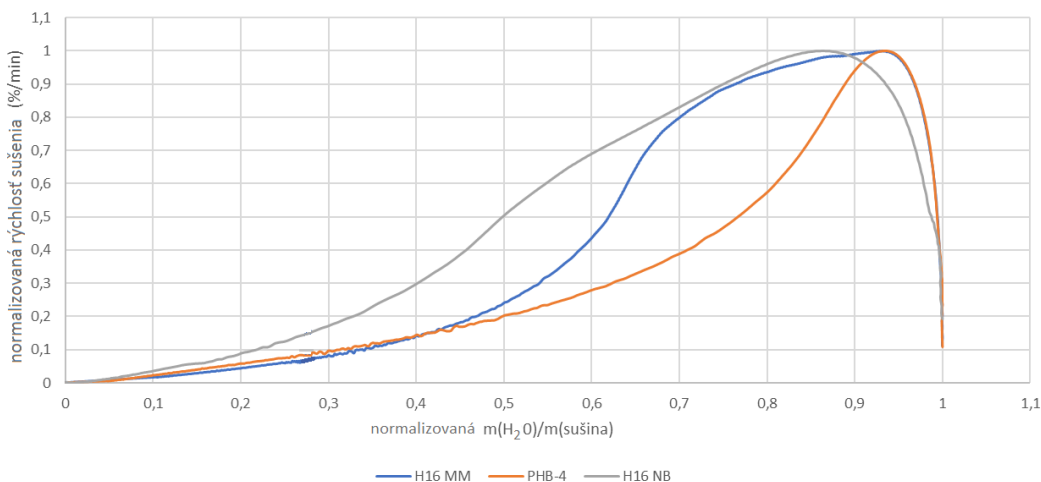
**Obrázok 28** Normalizácia pre najnižší stupeň hypoosmotického stresu, 50 g/L, na bunkách *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

Koncentrácia soli 50 g/L výrazne neovplyvnila správanie buniek kmeňov PHB<sup>-4</sup> a H16 v NB. Významnejšia zmena nastala u H16 MM, kde je očividná zmena v rýchlosti sušenia. Smernice sušenia extracelulárnej vody u všetkých typov buniek sa tu takmer prekryli, a tak to vyzerá, že táto voda sa v tomto prípade sušila rovnakou rýchlosťou. Navzdory tomu, že už najnižšia koncentrácia soli spôsobila výraznú zmenu u H16 MM, je jej rýchlostný profil stále dvojsmerný.



**Obrázok 29** Normalizácia pre stredný stupeň hypoosmotického stresu, 100 g/L, na bunkách *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

Zvýšením osmotického stresu koncentráciou soli 100 g/L (*Obr.29*) došlo k výraznej tvarovej zmene u PHB<sup>-4</sup> a H16 NB. U oboch týchto typov buniek je priesečník smerníc intracelulárnej a extracelulárnej vody ťažko badateľný. Keďže tieto bunky neobsahujú v svojom bunecnom priestore granule príslušného polyméru, tak sa tieto systémy správaním javia podobne. Vplyvom osmotického stresu sa bunky mohli potrhať, a preto spätné „nasávanie“ vody do vnútra bunky mohlo byť sprevádzané porušeným transportným mechanizmom membrány. Bakteriálny kmeň H16 MM si však aj pri takejto osmotickej námahe zachováva dvojrýchlostný charakter sušenia a s ním aj odlišenie extracelulárnej vody od intracelulárnej.



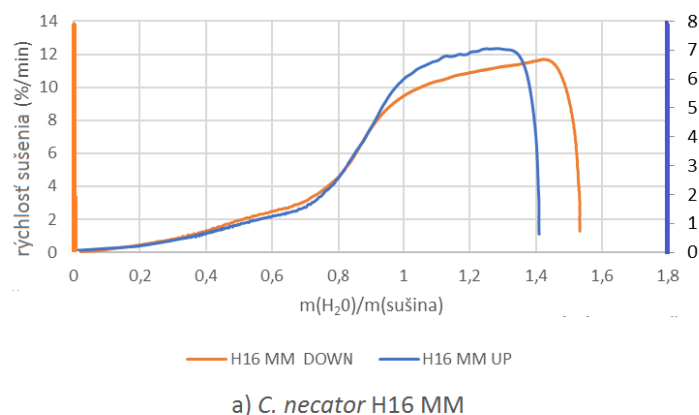
**Obrázok 30** Normalizácia pre najvyšší stupeň hypoosmotického stresu, 200 g/L, na bunkách *C. necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

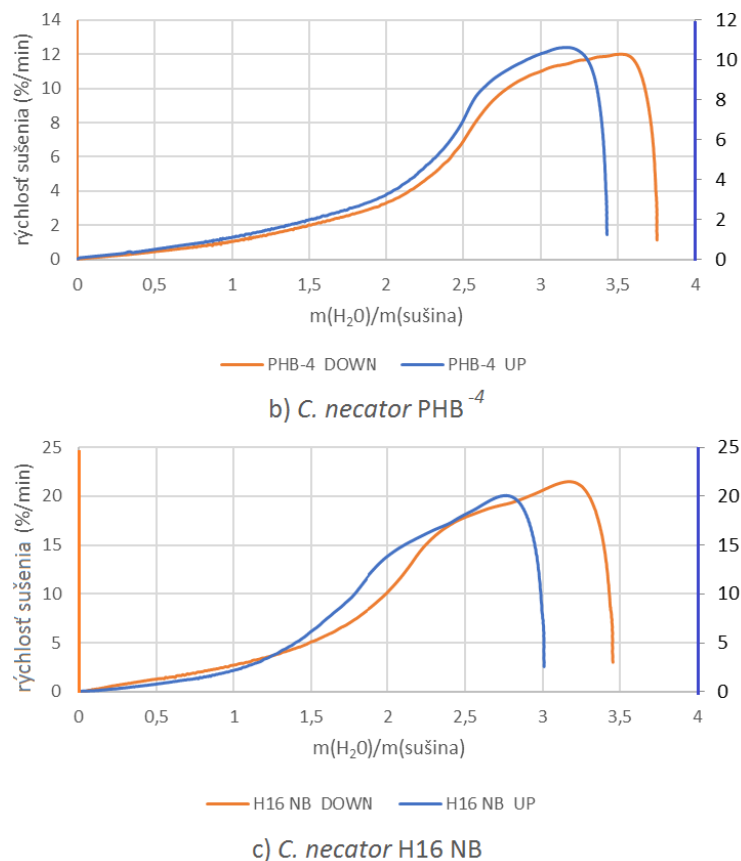
Ako už bolo spomenuté vyššie, extrémna koncentrácia soli spôsobuje zánik priesečníku smerníc (Obr.30), ba dokonca úplnú tvarovú deformáciu u bakteriálnych buniek PHB<sup>-4</sup>. Tento jav by sa mohol vysvetliť ako následok plazmolýzy, a s ňou aj úplne porušený mechanizmus transportu vody. Keďže H16 NB je typovo podobná bunka ako PHB<sup>-4</sup>, aj u týchto baktérii pozorujeme stratu rozoznateľnosti intracelulárnej vody od extracelulárnej, hoci tvar krivky nevykazuje také totálne porušenie tvaru oproti osmoticky nenamáhaným bunkám. V prípade H16 MM pozorujeme však úplný opak. Tieto bakteriálne bunky aj pri takejto drastickej koncentrácii soli síce menia rýchlosť sušenia oproti osmoticky nenamáhaným bunkám, ale zachovávajú si dvojrýchlostný profil sušenia. Efekt sa dá vysvetliť práve tým, že intracelulárnej vody je v dôsledku spôsobeného osmotického stresu v týchto bunkách menej, a tým pádom možno pozorovať ochranný mechanizmus granúl polyméru.

### 4.3.3 Pohľad zrovnania – správanie rovnakého typu bunky v rovnakej koncentrácii soli – hyperosmotický šok vs. hypoosmotický šok

Nasledujúca kapitola zahŕňa pohľad na správanie tých istých buniek na rovnakej úrovni osmotického stresu pri uskutočnených dvoch experimentoch, hyperosmotický šok vs. hypoosmotický šok. V ideálnom prípade, keďže sa porovnávajú rovnaké bunky, by mali byť závislosti z časti podobné. Podobný priebeh sa týka najmä konečnej fázy sušenia, a takisto hranica priesečníkov medzi extracelulárnou a intracelulárnou vodou by mal ležať približne pri rovnakej hodnote. Posúvať by sa teda mal len štart sušenia, podľa toho koľko extracelulárnej vody bolo do systému vnesené. A čím viac takejto vody tam mám, tým menšou rýchlosťou by sa mala sušiť. Za rovnakú časovú jednotku by teda malo ubudnúť menšie percento vody, a krivka v tejto časti by ležala pod tou druhou, kde je extracelulárnej vody na začiatku menej. Z uvedeného vyplýva, že extracelulárnej vody na začiatku sušenia je vždy viac pri hypoosmotickom šoku, kedy sa predpokladá spätný transportný mechanizmus vody do vnútra bunky.

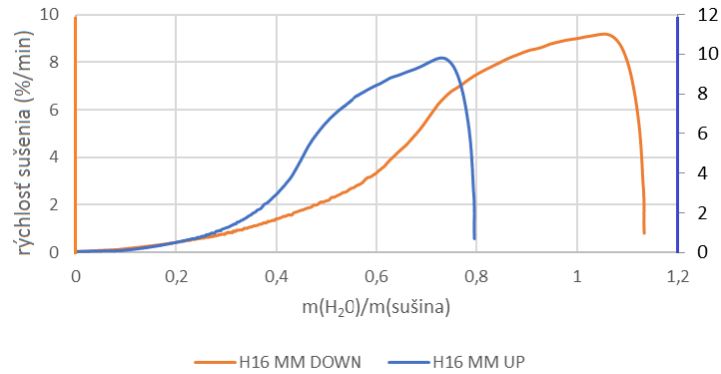
Obr.31 ponúka náhľad na prvú sériu porovnávacej rady, a to pre osmoticky nenamáhané bunky. Na obrázku 31a) môžeme pozorovať ideálne správanie buniek, ktoré bolo popísané vyššie, a podobne to vyzerá aj na obrázkoch po b) a c).



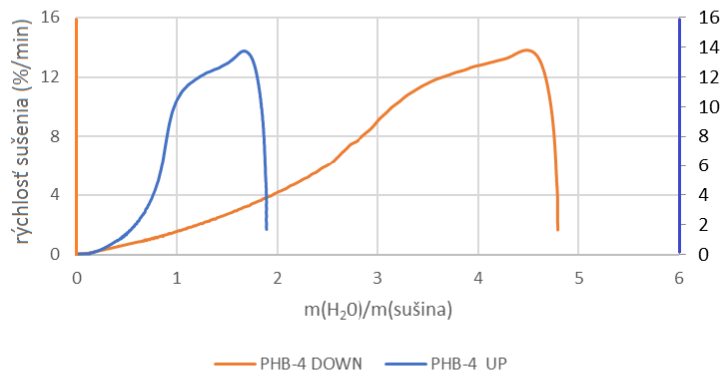


**Obrázok 31** Porovnávací graf osmoticky nenamáhaných buniek *C. necator*

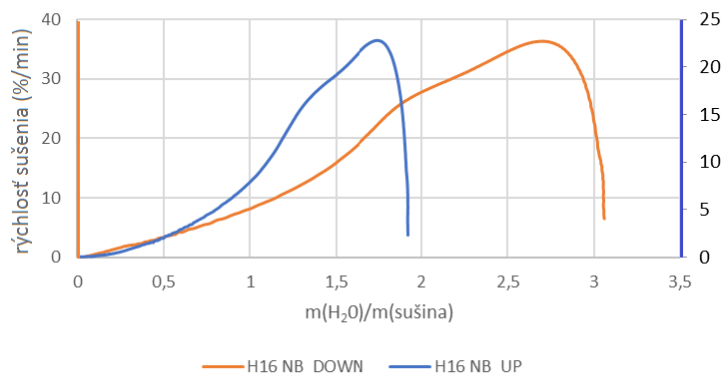
Ďalšou porovnávacou radou v poradí na Obr.32 je pre osmotické namáhanie pri najmenej drastickej koncentrácii soli, 50 g/L. Na týchto závislostiach je zreteľne vidieť ako hypoosmotický šok vplýva na jednotlivé bunky. Výrazný je aj posun štartu sušenia, kde pri nenamáhaných bunkách sa jednalo maximálne o 1 gram vody na gram sušiny, a tu sa pohybujeme až okolo 2,5 gramu vody na gram sušiny. Pre všetky typy buniek je významná zmena v rýchlosti sušenia, a taktiež prechod medzi sušením extracelulárnej a intracelulárnej vody sa tu stáva o niečo pozvoľnejší – nejedná sa tu o ostrú hranicu.



a) *C. necator* H16 MM



b) *C. necator* PHB<sup>-4</sup>

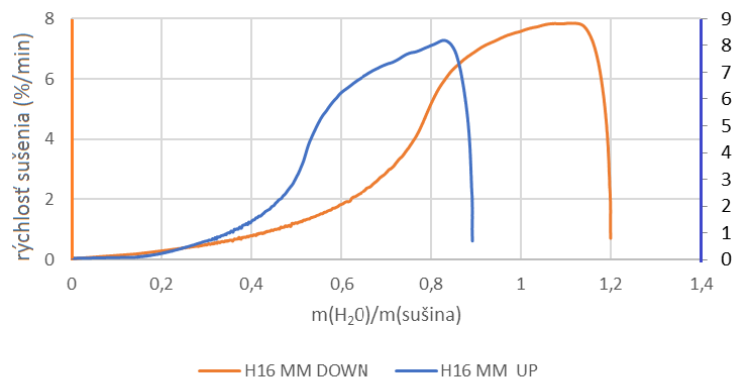


c) *C. necator* H16 NB

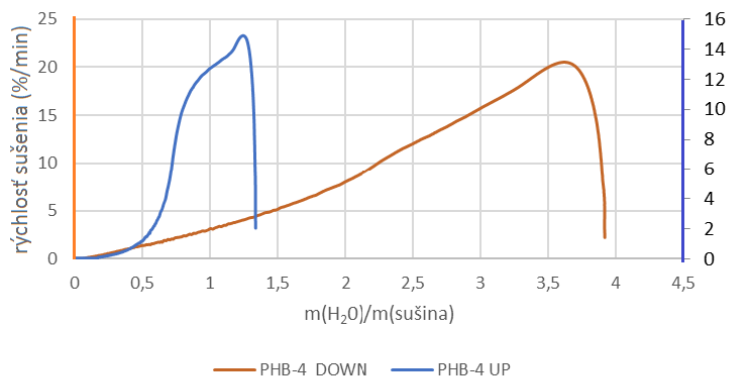
**Obrázok 32** Porovnávacia rada osmoticky namáhaných buniek *C. necator* koncentráciou soli 50 g/L

Nadchádzajúci Obr.33 zobrazuje bunky pri koncentrácii 100 g/L. Opäť možno pozorovať približne rovnaký posun štartu pri hypoosmotickom šoku ako v predchádzajúcom prípade. Zároveň sa tvary kriviek javia viac deformované u buniek s neprítomnosťou granúl ochranného polyméru v bunečnom priestore, pravdepodobne v dôsledku významného porušenia transportu vody membránou pri ich návrate do hypotonického prostredia. Predchádzajúci osmotický šok mohol bunečnú membránu tak zničiť, že po ich zavedení do vodného prostredia už neboli schopné normálne transportovať vodu. Opakom týchto skutočností je bakteriálny kmeň

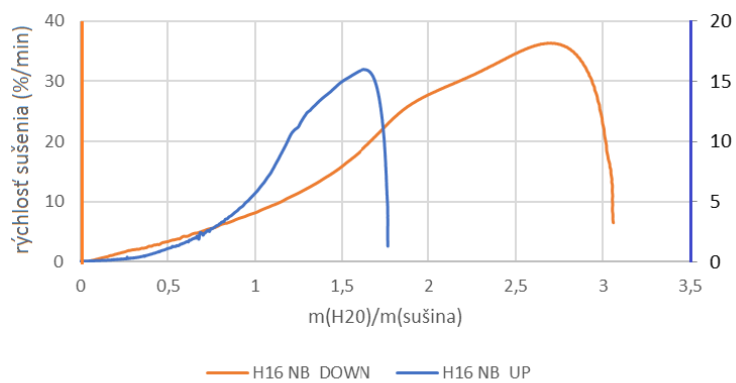
H16 MM, kedy tvar krivky je relatívne nezmenený, a teda možno usúdiť, že bunka nemá porušený mechanizmus transportu vody, a je schopná si vodu do bunčného priestoru v prípade potreby znova dopraviť.



a) *C. necator* H16 MM



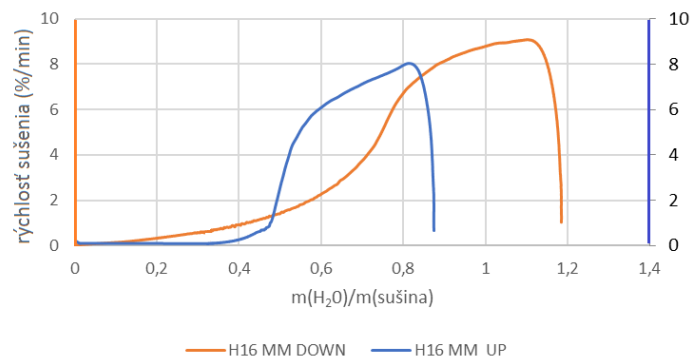
b) *C. necator* PHB<sup>-4</sup>



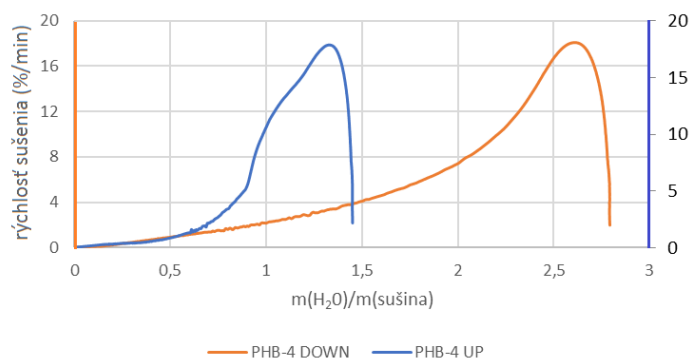
c) *C. necator* H16 NB

**Obrázok 33** Porovnávacia rada osmoticky namáhaných buniek *C. necator* koncentráciou soli 100 g/L

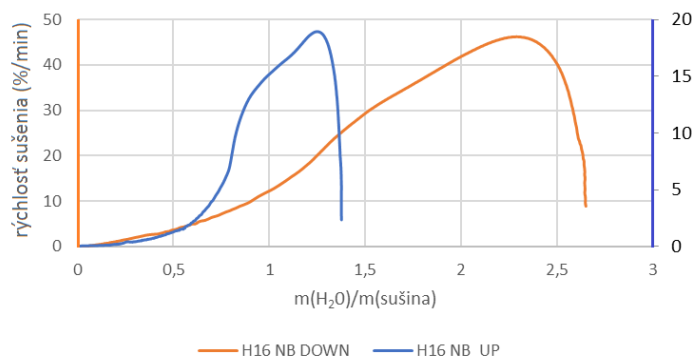
Zavedením buniek do najextrémnejších podmienok sa predchádzajúce následky len prehľadili. Demonštruje to *Obr.34*, najväčšmi pre PHB<sup>-4</sup> po *b)*, kedy sa bunky javia ako kompletne rozbité, s tým, že voda sa v tomto systéme suší pravdepodobne dohromady. Tento jav môže byť známkou už spomenutej plazmolýzy. U buniek H16 v MM na obrázku po *a)* však tieto drastické zmeny nepozorujeme, čo môže byť očividným dôkazom ochranného mechanizmu polymérnych granúl.



a) *C. necator* H16 MM



b) *C. necator* PHB<sup>-4</sup>



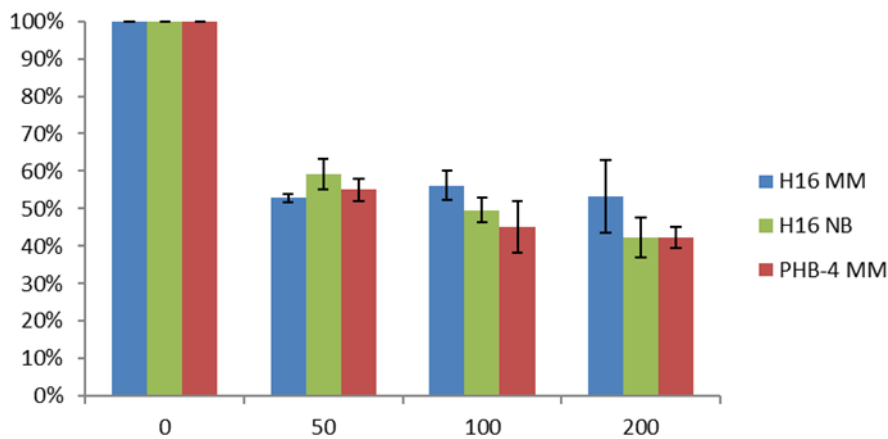
c) *C. necator* H16 NB

**Obrázok 34** Porovnávacia rada osmoticky namáhaných buniek *C. necator* koncentráciou soli 200 g/L

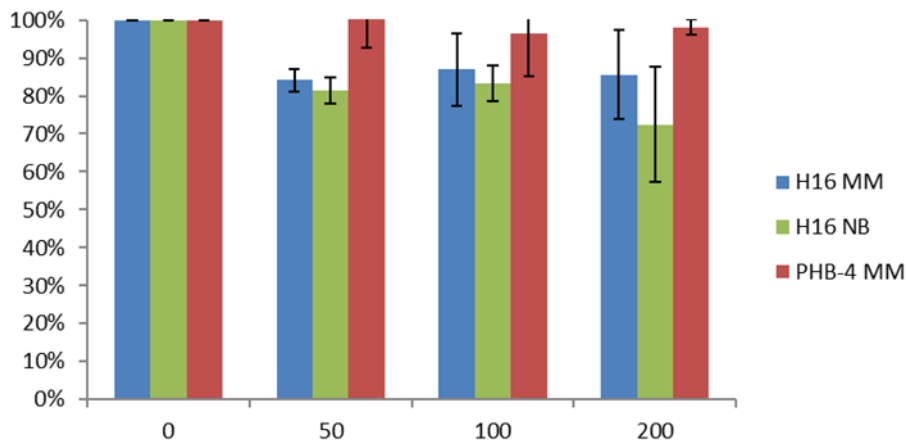


#### 4.4 Vyhodnotenie obsahov intracelulárnej vody

Táto kapitola obsahuje grafické porovnanie priesečníkov smerníc pre intracelulárnu a extracelulárnu vodu – teda porovnanie obsahov intracelulárnej vody. Keďže pracujeme so živými organizmami, každé bunky rastú inak a majú iný obsah intracelulárnej vody, nebolo by vhodné porovnávať medzi sebou jednotlivé šarže, čo sa týka absolútnej hodnoty intracelulárnej vody. Preto sú v rámci každej rady hodnoty priesečníkov percentuálne vzťahované k „referenčným“ hodnotám, teda k bunkám nenamáhaným. Presnejšie, na koľko percent pôvodnej vody u nenamáhaných buniek nám obsah vody po namáhaní klesol. Taktiež je k dispozícii porovnanie koľko vody z buniek ubúda, keď ich vložíme do hypertonického prostredia, a naopak keď ich vložíme naspäť do vody, teda hypotonického prostredia.



**Obrázok 35** Stĺpcový graf porovnania percentuálneho úbytku vody spôsobeného hyperosmotickým šokom



**Obrázok 36** Stĺpcový graf porovnania percentuálneho úbytku vody spôsobeného hypoosmotickým šokom

Z grafu na *Obr.35* sa dá usúdiť, že všetky koncentrácie soli znižujú obsah intracelulárnej vody u všetkých buniek približne narovnať. Významnejšie rozdiely možno pozorovať viacmenej u najvyššej osmotickej námahe, kde hlavne bakteriálnym bunkám kmeňa PHB<sup>-4</sup> klesá obsah vody až pod 50 % oproti bunkám nenamáhaným. Obecne sa dá konštatovať jasný

vplyv osmotického stresu u oboch typov buniek vo všetkých médiách, kde vidieť určité množstvo vody, ktoré odtiaľ ubúda, čiže sa transportuje z buniek von.

Naproti tomu, na *Obr.36* vidieť, že návrat buniek späť do vody zvýšil obsah intracelulárnej vody (podľa očakávania), ale už zďaleka nie narovnako u všetkých buniek. Zreteľné rozdiely sú vidieť najmä u PHB<sup>-4</sup>, ale vzhľadom k daným hodnotám, to už môže byť známkou toho, ako veľmi sú bunky poničené. Najvýznamnejšie rozdiely možno znova pozorovať pri extrémnych koncentráciách soli, kde sa najviac prejavuje zvýšená prestupnosť membrány.

Používaním danej metódy je dôležité brať do úvahy nie len tieto finálne hodnoty, ktoré neposkytujú štatisticky významné rozdiely medzi správaním jednotlivých buniek. Tvary kriviek vysušania však už túto informáciu poskytujú – môžeme vidieť ako jednoznačný priesečník vytvárajú jednotlivé smernice extracelulárnej a intracelulárnej vody, a naopak ako veľmi tieto smernice splývajú, čím dochádza k určitému prekrytiu, napríklad v dôsledku plazmolýzy.

## 5 ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo overiť využiteľnosť techniky termickej analýzy pri vplyve stresových faktorov na modelové mikroorganizmy, bakteriálne kmene *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutanta *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, líšiaceho sa v neschopnosti produkovať a akumulovať polyhydroxybutyrát ako zásobný polymér vo forme intracelulárnych granúl.

V rámci termickej analýzy boli prevedené experimenty prostredníctvom termogravimetrickej analýzy, zamerané na izotermické sušenie vzoriek pri 70 °C. Na úplne dosušenie vzoriek sa teplota následne skokovo zvýšila na 200 °C. Samotnému sušeniu predchádzali série experimentov, kedy bol na bunky vyvinutý osmotický stres rôznych úrovní formou tzv. hyperosmotických a hypoosmotických pokusov. Osmotický šok bol na baktériách prevedený pomocou koncentrovaných roztokov soli, do ktorých boli bakteriálne bunky vložené a porovnávané oproti správaniu buniek, ktoré sa vložili len do roztoku fosfátového pufru s 0 g NaCl na liter pufru. Solné roztoky boli pripravené v koncentráciách 50 g/L, 100 g/L a 200 g/L. Ďalej tieto merania umožnili rozdelenie celkového množstva vody vo vzorke na vodu extracelulárnu a intracelulárnu, teda vnútrobunkovú. Optimalizáciou vyhodnocovania získaných dát boli následne určené obsahy intracelulárnej vody v jednotlivých bunkách.

Sériou hyperosmotických experimentov sa preukázal transport vody von z buniek, kedy výsledný obsah intracelulárnej vody poklesol približne o polovicu v porovnaní s osmoticky nenamáhanými bunkami. A to prakticky bez ohľadu na úroveň spôsobeného osmotického šoku koncentrovanými roztokmi soli, či typu bunky. Pri hypoosmotických experimentoch, kde boli bakteriálne bunky po predchádzajúcom zasolení opäť vrátené do hypotonického prostredia, sa obsah vody výrazne zvýšil, ale i tak bol pozorovaný patrný rozdiel medzi týmito osmoticky namáhanými bunkami od nenamáhaných, a aj medzi jednotlivými bunkami navzájom.

Tomuto finálnemu stanoveniu predchádzali grafické závislosti, na ktorých možno sledovať správanie buniek pod vplyvom osmotického stresu, konkrétne ako prebiehalo sušenie vody u takýchto buniek. Pri hyperosmotických experimentoch, kedy v dôsledku zvýšenej osmolality bola voda z buniek transportovaná von, vykazovali krivky hlavne u buniek *C. necator* PHB<sup>-4</sup> patrné deformácie jednak v porovnaní s tými istými, ale osmoticky nenamáhanými bunkami, ale aj v porovnaní s bunkami *C. necator* H16 kultivovaných v minerálnom médiu. Okrem toho, že z takejto deformovanej grafickej závislosti už nedokážeme s presnosťou určiť a oddeliť extracelulárnu vodu od intracelulárnej, uvedená závislosť tiež môže byť známkou plazmolýzy, ktorá mohla v dôsledku vysokého osmotického stresu u týchto buniek nastať.

U hypoosmotických experimentoch sa predchádzajúce skutočnosti len prehĺbili. U bakteriálnych buniek *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, najmä vo vysokých koncentráciách soli, bol spätný návrat do hypotonického prostredia sprevádzaný značne porušeným transportným mechanizmom vody do buniek, pravdepodobne v dôsledku spomínanej plazmolýzy. Podobný priebeh, ale nie až v tak drastickej miere bolo pozorovaný aj u bakteriálnych buniek *C. necator* H16 kultivovaných v NB médiu, kde oba tieto typy buniek sa vyznačujú vo svojom intracelulárnom priestore práve neprítomnosťou príslušných granúl polyméru.

Opakom sledovaných javov sú bunky *C. necator* H16 v MM, kde bolo z kriviek jednotlivých závislostí síce vidieť patrné rozdiely v rýchlostiach sušenia, ale tvar kriviek si aj napriek vysokému osmotickému stresu zachovávali. Z toho možno usúdiť, že zo závislostí

bolo možné oddeliť extracelulárnu vodu od intracelulárnej, a že transportný mechanizmus vody u týchto buniek nebol porušený. Keďže sa v tom prípade jedná o bakteriálne bunky so schopnosťou produkovať a akumulovať granule polyhydroxybutyrátu, je teda podľa všetkého možné pozorovať ich ochranný mechanizmus voči spôsobenému osmotickému stresu.

Používaním danej metódy je dôležité nesústrediť sa len na konečné hodnoty obsahov intracelulárnej vody, ale posúdiť správanie bakteriálnych buniek aj na základe vyobrazených grafických závislostí. Tie totiž poskytujú cenné informácie najmä z hľadiska prípadných štruktúrnych zmien, ako je spomínaná plazmolýza. Zároveň v závislosti na tom, ako veľmi sú dané bunky vplyvom osmotického stresu poničené, tým menej sa stáva táto metóda použiteľnou, pretože drastickou deformáciou kriviek už nie je možné stanoviť obsah intracelulárnej vody v bakteriálnych bunkách.

## 6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] DR. RAJSHREE SAXENA. General Classification and Characterization of Microorganisms. In: Wwww.lab-traning.com [online]. 2015 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://lab-training.com/2015/02/02/general-classification-characterization-microorganism/>
- [2] Bakteriológia. In: Http://referaty.atlas.sk [online]. 2008 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://referaty.atlas.sk/prirodne-vedy/biologia-a-geologia/22549/?print=1>
- [3] PÔDA AKO PROSTREDIE MIKROORGANIZMOV. , Alexandra Šimonovičová a kol. Environmentálna mikrobiológia. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2013, s. 228-245. ISBN 978-80-223-3382-5.
- [4] Mikroorganizmy. Wwww.lisabon.blog.cz [online]. 2011 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://lisabon.blog.cz/1110/mikroorganizmy>
- [5] Schindler, J. Mikrobiologie. Pro studenty zdravotnických oborů. 2., doplněné a přepracované vydání. Praha: Grada Publishing , a.s., 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.
- [6] Márová, I. (2016). Biotechnologie přírodních látek úvod [PowerPoint].
- [7] Morgan-Kiss, R. M., Ivanov, A. G., Pocock, T., Król, M., Gudynaite-Savitch, L. and Hüner, N. P. A. (2005), THE ANTARCTIC PSYCHROPHILE, CHLAMYDOMONAS RAUDENSIS Ettl (UWO241) (CHLOROPHYCEAE, CHLOROPHYTA), EXHIBITS A LIMITED CAPACITY TO PHOTOACCLIMATE TO RED LIGHT1. Journal of Phycology, 41: 791–800. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04174.x
- [8] What is the Three-Domain System? [online]. [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://www.innovateus.net/science/what-three-domain-system>
- [9] METABOLIZMUS A VÝŽIVA MIKROORGANIZMOV. , Alexandra Šimonovičová a kol. Environmentálna mikrobiológia. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2013, s. 110-141. ISBN 978-80-223-3382-5
- [10] Bacteria Characteristics [online]. [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://biology.tutorvista.com/cell/bacterial-cell.html>
- [11] Nováková Elena, Jana Kompaníková, Martina Neuschlová, Anna Porubská: Lekárska mikrobiológia. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] 25.1.2013, posledná aktualizácia 9.1.2014 [cit. 2017-03-15] Dostupný z WWW: <http://portal.jfmed.uniba.sk/clanky.php?aid=203>. ISSN 1337-7396.
- [12] Thomas B. Bacterial Structure: Gram Staining Comparision. In: Wwww.wikieducator.org [online]. 2008 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: [http://wikieducator.org/Bacterial\\_Structure](http://wikieducator.org/Bacterial_Structure)
- [13] Proteomes - *Cupriavidus necator* [strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337] [*Ralstonia eutropha*] [online]. 2016 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000008210ň>
- [14] GARRITY, Edited by G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, Pts. A. 2nd ed., rev. New York: Springer, 2000. ISBN 978-038-7950-402.
- [15] Schembri, M. A., Bayla, R. C., Davies, J. K.: Phosphate Concentration Regulates

- Transcription of the Acinetobacter Polyhydroxyalkanoic Acid Biosynthetic Genes. 1995, Journal of Bacteriology, Vol. 177, Is. 15, p. 4501-4507.
- [16] KREUTZER, Martin F., Hirokazu KAGE a Markus NETT. Structure and Biosynthetic Assembly of Cupriachelin, a Photoreactive Siderophore from the Bioplastic Producer *Cupriavidus necator* H16. Journal of the American Chemical Society. 2012-03-21, ro\_. 134, \_ . 11, s. 5415-5422. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja300620z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja300620z>
- [17] UEATRONGCHIT, Techawaree a Yasuhisa ASANO. Highly selective l-threonine 3-dehydrogenase from *Cupriavidus necator* and its use in determination of l-threonine. Analytical Biochemistry. 2011, ro\_. 410, \_ . 1, s. 44-56. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2010.11.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269710007165>
- [18] Vandamme, P., Coenye, T.: Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, vol. 54, p. 2285–2289.
- [19] Schwartz, E. and Friedrich, B.: A physical map of the megaplasmid pHG1, one of three genomic replicons in *Ralstonia eutropha* H16, 2001, FEMS Microbiology Letters, Vol. 201, Issue 2, p. 213–219.
- [20] Pohlmann, A et al.: Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16, Nature Biotechnology, 2006, Vol. 24, p. 1257-1262. ISSN: 1087-0156.
- [21] Physiology of PHA metabolism. In: COBIOMATERIAL Research Laboratory [online]. Pulau Pinang, Malaysia [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://www.ecobiomaterial.com/who-i-am/physiology-of-pha-metabolism/>
- [22] Sudesh K, Abe H, Do Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci. 2000; 25: 1503–1555.
- [23] Obruca S, Sedlacek P, Krzyzanek V, Mravec F, Hrubanova K, Samek O, et al. [2016] Accumulation of Poly[3-hydroxybutyrate] Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. PLoS ONE 11[6]:e0157778. doi:10.1371/journal.pone.0157778
- [24] SHARMA, Parveen K., Jilagamazhi FU, Victor SPICER, Oleg V. KROKHIN, Nazim CICEK, Richard SPARLING a David B. LEVIN. Global changes in the proteome of *Cupriavidus necator* H16 during poly-[3-hydroxybutyrate] synthesis from various biodiesel by-product substrates. AMB Express [online]. 2016, 6[1], - [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1186/s13568-016-0206-z. ISSN 2191-0855. Dostupné z: <http://ambexpress.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0206-z>
- [25] S. Obruca, L. Duskocil, V. Krzyzanek, K. Hrubanova, P. Sedlacek, F. Mravec, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, I. Marova, "Polyhydroxyalkanoates in Bacterial Cells - More Than just Storage Materials", Materials Science Forum, Vol. 851, pp. 20-25, 2016
- [26] Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F. et al. Appl Microbiol Biotechnol (2016) 100: 1365. doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- [27] ŠNAJDAR, O., I. MÁROVÁ a S. OBRUČA. Production of Polyhydroxyalkanoates From Vegetable Oils by *Cupriavidus necator* H16. In: Studentská odborná konference

- Chemie a společnost 2010 - sborník příspěvků. Brno: FCH VUT, 2010, s. 76-81. ISBN 978-80-214-4212-2.
- [28] A. Kloužková, P.Zemenová, J.Kloužek a W.Pabst. Termická analýza. VŠCHT PRAHA, 2012. Studijní materiály k grantovému projektu. Dostupné z: <http://tresen.vscht.cz/sil/sites/default/files/Termick%C3%A1%20anal%C3%BDza.pdf>
- [29] HAINES, Edited by P.J. a G CONTRIBUTORS. Principles of thermal analysis and calorimetry [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002 [cit. 2015-02-14]. ISBN 978-184-7551-764.
- [30] BLAŽEK, Antonín. Termická analýza. 1. vyd. Praha: SNTL, 1972, 294 s. Moderní metody v chemické laboratoři.
- [31] ŠESTÁK, J. Měření termofyzikálních vlastností pevných látek. Praha: ACADEMIA, 1982, 345 s.
- [32] SLOBODIAN, Petr. Termická analýza materiálů. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2014, 153 s. ISBN 978-80-7454-403-3.
- [33] KALSOOM, Mohammed. Thermogravimetry Analysis (TGA). In: Www.slideshare.net [online]. Research Clinical Pharmacist at Riphah Institute Of Pharmaceutical Sciences, 2014 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/KalsoomMohammed/thermogravimetry-analysis-tga>
- [34] KUČERÍK, J. Termická analýza – termogravimetrie (TGA). Wwww.chempoint.cz [online]. Vysoké učení technické v Brně (Fakulta chemická), 2011 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>
- [35] Kelímky pro termickou analýzu. METTLER TOLEDO [online]. [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: [http://www.mt.com/cz/cs/home/products/Laboratory\\_Analytics\\_Browse/TA\\_Family\\_Browse/Crucibles.html](http://www.mt.com/cz/cs/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/TA_Family_Browse/Crucibles.html)
- [36] WOLFORD, Cameron. Thermal Analysis Syllabus: Theory and applications of TGA – Thermogravimetric Analysis DTG – Derived Thermogravimetry DTA - Differential Thermal analysis. [online]. In: . 2015 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://slideplayer.com/slide/2928694/>
- [37] CHATWAL, Gurdeep R. a Sham K. ANAND. Instrumental Methods of Chemical Analysis. 5th Ed. Himalaya Publishing House.
- [38] KUČERÍK, J. Termická analýza - Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC). Wwww.chempoint.cz [online]. Vysoké učení technické v Brně (Fakulta chemická), 2011 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>
- [39] ABULADZE, Marina K., Victor M. SOKHADZE, Emma N. NAMCHEVADZE, E. KIZIRIA, Leila V. TABATADZE, Lia V. LEJAVA, Sh. GOGICHAISHVILI a Nugzar B. BAKRADZE. Thermal Analysis of Whole Bacterial Cells Exposed to Potassium Permanganate Using Differential Scanning Calorimetry: a Biphasic Dose-Dependent Response to Stress. The Scientific World JOURNAL [online]. 2009, 9, 109-117 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1100/tsw.2009.3. ISSN 1537-744x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2009/614284/abs/>
- [40] BAKRADZE, Nugzar G., Marina K. ABULADZE, Victor M. SOKHADZE, et al. A Calorimetric Characterization of Cr(VI)-Reducing Arthrobacter oxydans at Different

- Phases of the Cell Growth Cycle. The Scientific World JOURNAL [online]. 2003, 3, 432-442 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1100/tsw.2003.33. ISSN 1537-744x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2003/180657/abs/>
- [41] Niven, G., Miles, C., and Mackey, B. (1999) The effect of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *E. coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *J. Gen. Microbiol.* 145, 419–425.
- [42] Obuchi, K., Iwahashi, H., Lepock, J., and Komatsu, Y. (2000) Calorimetric characterization of critical targets for killing and acquired thermotolerance in yeast. *Yeast* 16, 111–119.
- [43] Sasse-Dwight, S. and Gralla, J.D. (1989) KMnO<sub>4</sub> as a probe for lac promoter DNA melting and mechanism in vivo. *J. Biol. Chem.* 264(14), 8074–8081.
- [44] Waddell, J.P. and Mayer, G.C. (2003) Effects of Fenton's reagent and potassium permanganate applications on indigenous subsurface microbiota: a literature review. Proceedings of the 2003 Georgia Water Resources Conference, April 23–24, University of Georgia. Hatcher, K.J., Ed. University of Georgia, Athens.
- [45] MILES, CHRISTOPHER A., BERNARD M. MACKEY a SUSAN E. PARSONS. Differential Scanning Calorimetry of Bacteria. *Journal of General Microbiology*. UK, 1986, 0001-2751(132), 939-952
- [46] VERBEKEM, . N.. VANC AUWELAEFR. TH., & JADOT, R. (1981). Calorimetric aspects of heat activation of spores of *Phycomyces blakesleeianus*. *Biochemical and Biophysical Research Commun.* 98, 915-921 .
- [47] MCELHANEYR, . N. (1982). The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 30, 229-259.
- [48] GONDA, K. & KOGA, S. (1973). Low-temperature thermograms of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 19, 393-396.
- [49] Analysis of Foodborne Bacteria by Differential Scanning Calorimetry. KALETUNÇ, Gönül. *Calorimetry in food processing: Analysis and design of food systems*. Wiley-Blackwell and the Institute of Food Technologists, 2009, s. 147-164. ISBN 0813814839.
- [50] LEE, Jaesung a Gönül KALETUNÇ,. Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. The Ohio State University, Columbus, Ohio, 2002, 68(11), 5379-5386. DOI: 10.1128/AEM.68.11.5379–5386.2002.
- [51] SNYDER, A. Peter, Ashish TRIPATHI, Jacek P. DWORZANSKI, Waleed M. MASWADEH a Charles H. WICK. Characterization of microorganisms by thermogravimetric analysis–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2005, 536(1-2), 283-293 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1016/j.aca.2004.12.036. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004016721>
- [52] VYAZOVKIN, Sergey. Thermal Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2004, 76(12), 3299-3312 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1021/ac040054h. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac040054h>



- [53] KANG, Bongmun, Kohsuke HONDA, Tsunehiro AKI, Takeshi OMASA a Hisao OHTAKE. Simultaneous thermogravimetry and differential thermal analysis for comparing burning characteristics between oleaginous and non-oleaginous microorganisms. *Thermochimica Acta* [online]. 2011, 517(1-2), 115-120 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1016/j.tca.2011.01.040. ISSN 00406031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603111000748>
- [54] RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica* [online]. 1991, 11(5), 429-438 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1002/abio.370110506. ISSN 0138-4988. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/abio.370110506>.
- [55] LEPOCK, James R., Harold E. FREY a William E. INNIS. Thermal analysis of bacteria by differential scanning calorimetry: Relationship of protein denaturation in situ to maximum growth temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 1990, 1055(1), 19-26 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1016/0167-4889(90)90086-S. ISSN 01674889. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016748899090086S>
- [56] ILLMER, P., C. ERLEBACH a F. SCHINNER. A practicable and accurate method to differentiate between intraand extracellular water of microbial cells. *FEMS Microbiology Letters*. Innsbruck, Austria, 1999, 1999(178), 135-139.
- [57] DAWES, Ian W. a Ian W. SUTHERLAND. *Microbial physiology*. 2nd ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992. ISBN 0632024631.
- [58] Water structure and Science: Intracellular water [online]. Chaplin M., England, 2016 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: [http://www1.lsbu.ac.uk/water/intracellular\\_water.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/intracellular_water.html)
- [59] Clegg, James S. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 99, No. 1, Part 2: The Cytoplasmic Matrix and the Integration of Cellular Function. (Jul., 1984), pp. 167s-171s. Dostupné z: <http://links.jstor.org/sici?sici=0021-9525%28198407%2999%3A1%3C167s%3AIIWATCS%3E2.0.CO%3B2-9>
- [60] CAMERON, I. L., K. M. KANAL, C. R. KENNER a G. D. FULLERTON. A MECHANISTIC VIEW OF THE NON-IDEAL OSMOTIC AND MOTIONAL BEHAVIOR OF INTRACELLULAR WATER. *Cell Biology International*. 1997, 21(No. 2), 99-113.
- [61] ALCÁZAR, E. B., M. H. M. ROCHA-LEÃO a J. DWECK. YEAST INTRACELLULAR WATER DETERMINATION BY THERMOGRAVIMETRY. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2000, 59, 643-648.
- [62] Uribelarrea JL, Pacaud S, Goma G. New Method for Measuring the Cell Water-Content by Thermogravimetry. *Biotechnol Lett*. 1985; 7: 75-80
- [63] WANG, Lei, Yongjin J. ZHOU, Debin JI a Zongbao K. ZHAO. An accurate method for estimation of the intracellular aqueous volume of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2013, 93(2), 73-76 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.02.006. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770121300050X>
- [64] BRATBAK, G. a I. DUNDAS. Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 1984, 48(No. 4), 755-757.

- [65] SHINAR, Hadassah a Gil NAVON. The determination of intracellular water space by NMR. *FEBS Letters* [online]. 1985, 193(1), 75-78 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1016/0014-5793(85)80082-X. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2885%2980082-X>
- [66] Feijó Delgado F, Cermak N, Hecht VC, Son S, Li Y, et al. (2013) Intracellular Water Exchange for Measuring the Dry Mass, Water Mass and Changes in Chemical Composition of Living Cells. *PLoS ONE* 8(7): e67590. doi:10.1371/journal.pone.0067590
- [67] TERRY, C., J. MICHEL, L. KILIAN, P. BONHOMME a G. BALOSSIER. Comparison of intracellular water content measurements by dark-field imaging and EELS in medium voltage TEM. *The European Physical Journal Applied Physics*. 2000, 11(03), 215-226. DOI: 10.1051/epjap:2000156.
- [68] OBRUČA, S., P. SEDLÁČEK, F. MRAVEC, et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Czech Republic.
- [69] MILÉŘOVÁ, M. Studium odolnosti bakterií vůči vybraným stresovým faktorům. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 71 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

### 7.1 Použité skratky

PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHA	polyhydroxyalkanoáty
3HB	3-hydroxybutyrát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
DSC	diferenčná skenovacia kalorimetria
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
DNP	komplex DNA-proteín
Kryo-SEM	kryo skenovacia elektrónová mikroskopia
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
TGA	termogravimetrická analýza
STA	simultánna termická analýza
DTA	diferenčná termická analýza
MS	hmotnosť spektrometria
DLS	dynamický rozptyl svetla
NB	Nutrient Broth
MM	minerálne médium

### 7.2 Použité symboly

<i>Symbol</i>	<i>Význam symbolu</i>	<i>Jednotka</i>
V	objem	m <sup>3</sup>
G	Gibbsova energia	J
S	entropia	J·K <sup>-1</sup>
H	entalpia	J
T	teplota	K
t	čas	s

## 8 ZOZNAM PRÍLOH

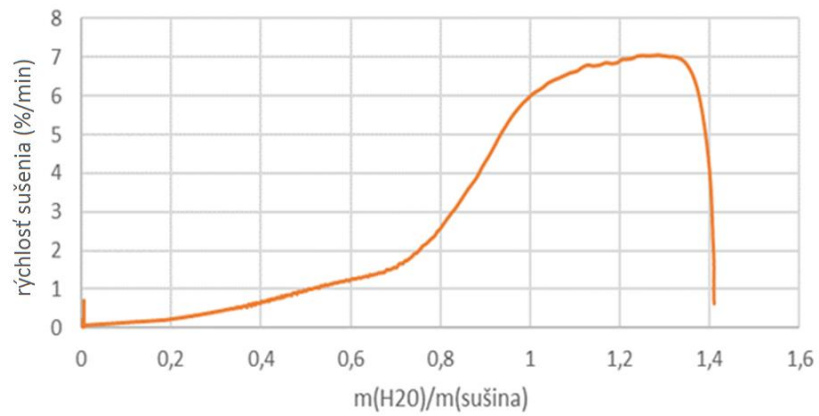
### 8.1 Hyperosmotické experomenty

- Obr. 37 C. Necator H16 MM, 0 g/L*
- Obr. 38 C. Necator H16 MM, 50 g/L*
- Obr. 39 C. Necator H16 MM, 100 g/L*
- Obr. 40 C. Necator H16 MM, 200 g/L*
- Obr. 41 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 0 g/L*
- Obr. 42 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 50 g/L*
- Obr. 43 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 100 g/L*
- Obr. 44 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 200 g/L*
- Obr. 45 C. Necator H16 NB, 0 g/L*
- Obr. 46 C. Necator H16 NB, 50 g/L*
- Obr. 47 C. Necator H16 NB, 100 g/L*
- Obr. 48 C. Necator H16 NB, 200 g/L*

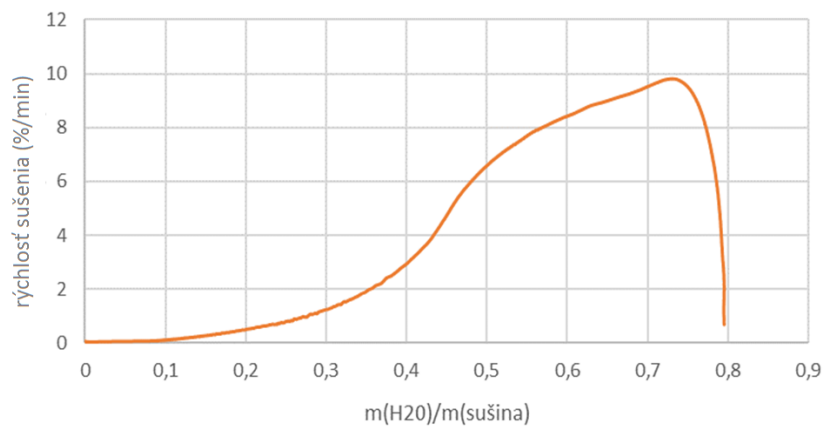
### 8.2 Hypoosmotické experimenty

- Obr. 49 C. Necator H16 MM, 0 g/L*
- Obr. 50 C. Necator H16 MM, 50 g/L*
- Obr. 51 C. Necator H16 MM, 100 g/L*
- Obr. 52 C. Necator H16 MM, 200 g/L*
- Obr. 53 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 0 g/L*
- Obr. 54 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 50 g/L*
- Obr. 55 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 100 g/L*
- Obr. 56 C. Necator PHB<sup>-4</sup>, 200 g/L*
- Obr. 57 C. Necator H16 NB, 0 g/L*
- Obr. 58 C. Necator H16 NB, 50 g/L*
- Obr. 59 C. Necator H16 NB, 100 g/L*
- Obr. 60 C. Necator H16 NB, 200 g/L*

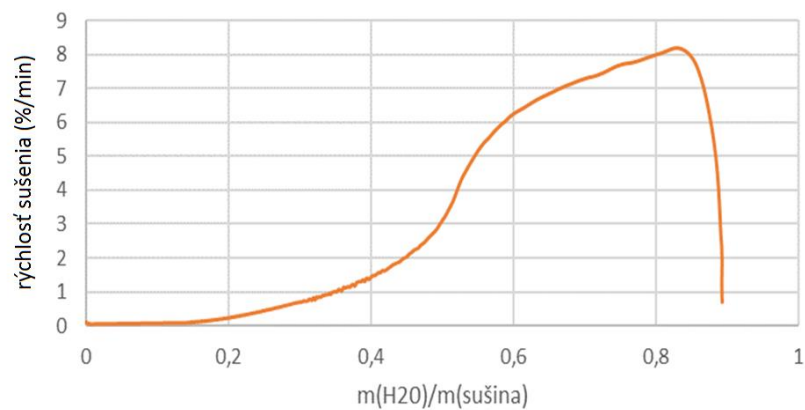
## 9 PRÍLOHY



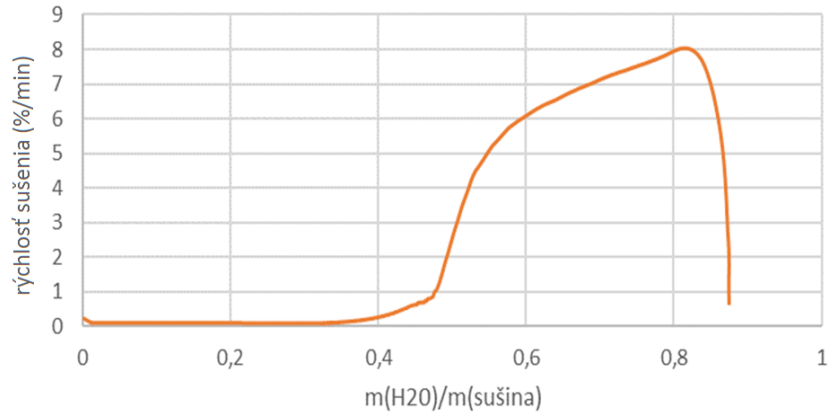
**Obrázok 37** *C. necator* H16 MM, 0 g/L



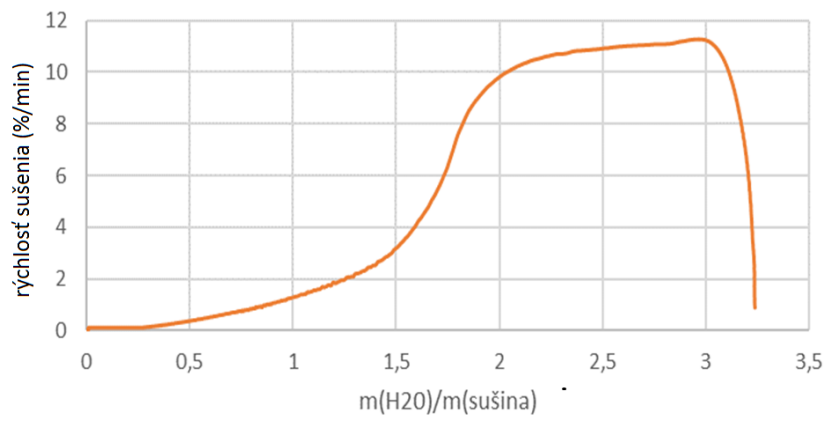
**Obrázok 38** *C. necator* H16 MM, 50 g/L



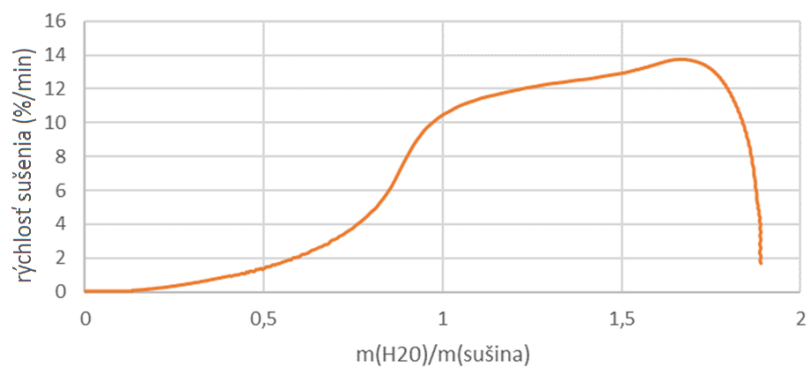
**Obrázok 39** *C. necator* H16 MM, 100 g/L



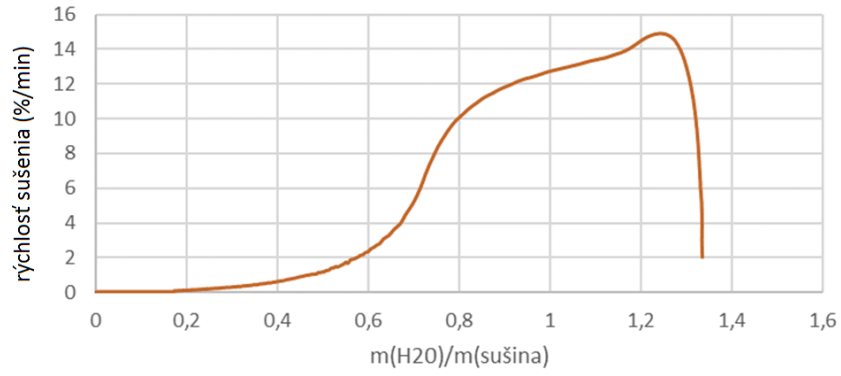
**Obrázok 40** *C. necator* H16 MM, 200 g/L



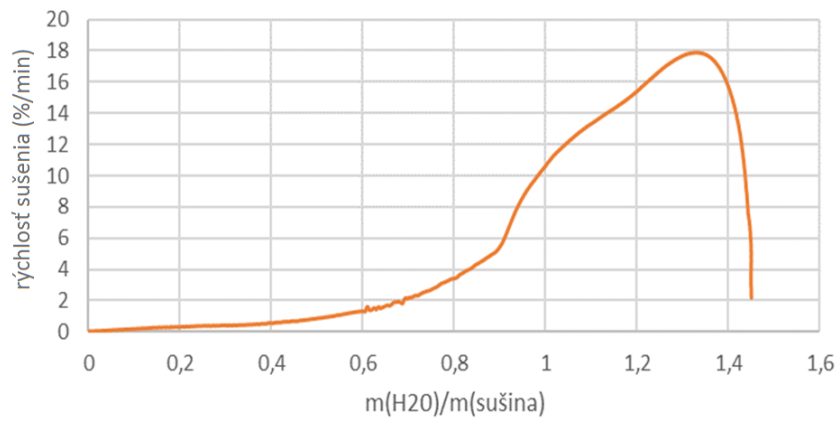
**Obrázok 41** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, 0 g/L



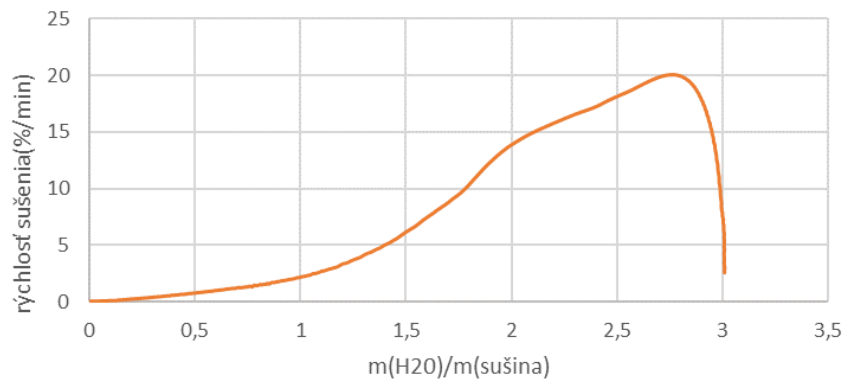
**Obrázok 42** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, 50 g/L



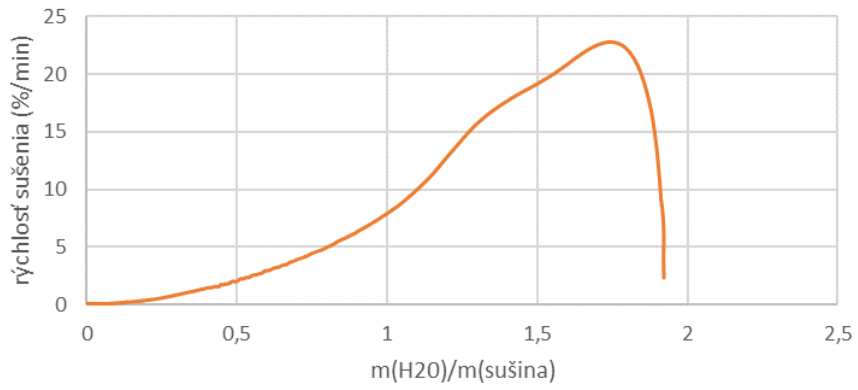
**Obrázok 43** *C. necator* PHB<sup>4</sup>, 100 g/L



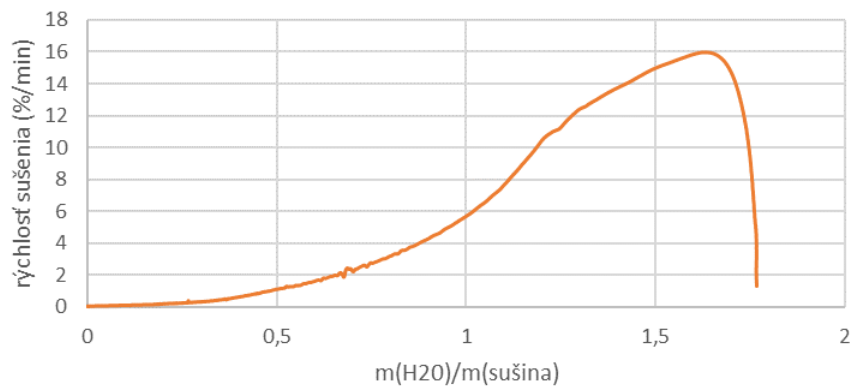
**Obrázok 44** *C. necator* PHB<sup>4</sup>, 200 g/L



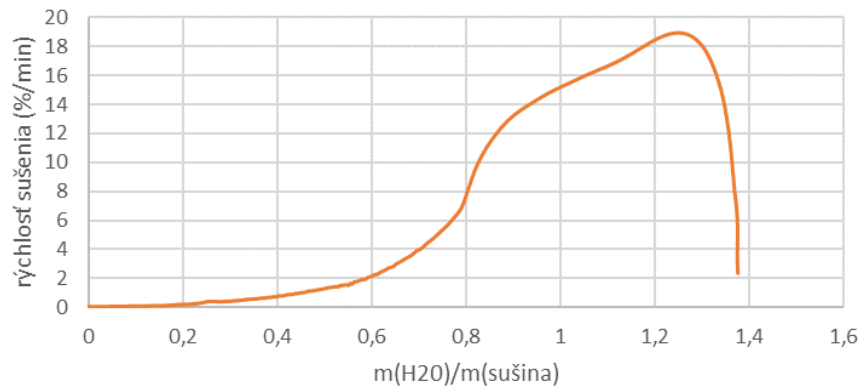
**Obrázok 45** *C. necator* H16 NB, 0 g/L



**Obrázok 46** *C. necator* H16 NB, 50 g/L

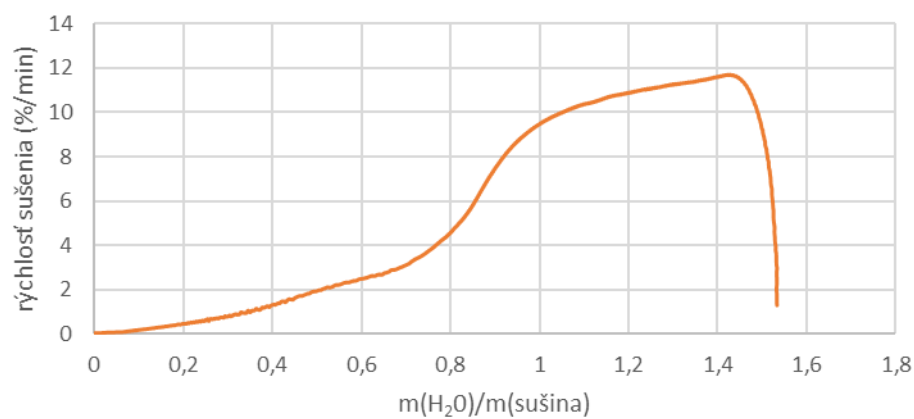


**Obrázok 47** *C. necator* H16 NB, 100 g/L

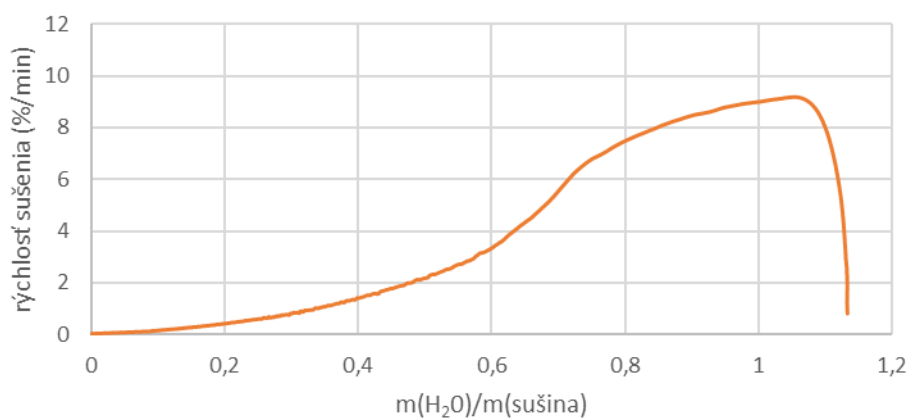


**Obrázok 48** *C. necator* H16 NB, 200 g/L

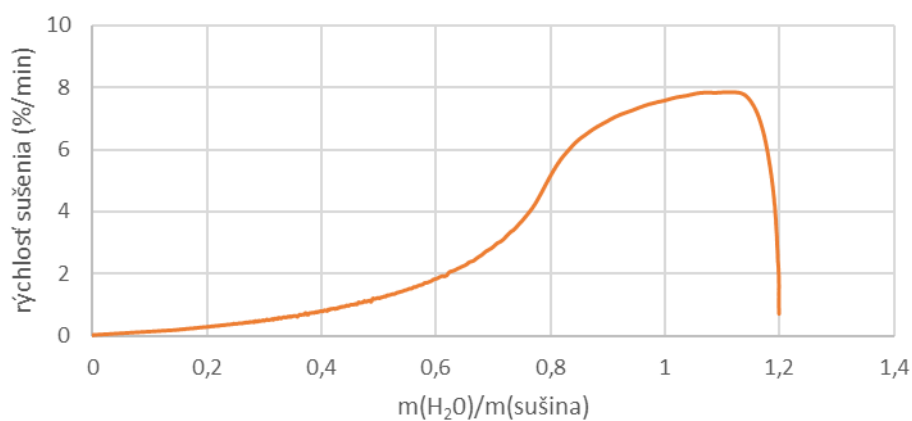




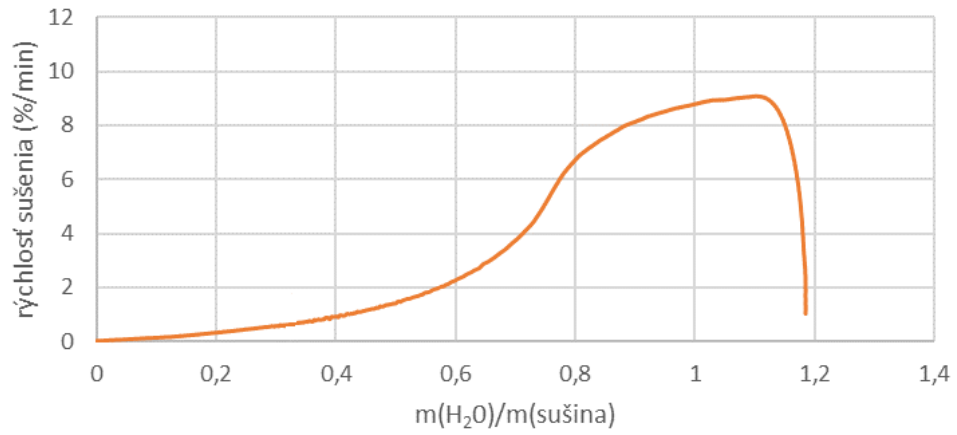
**Obrázok 49** *C. necator* H16 MM, 0 g/L



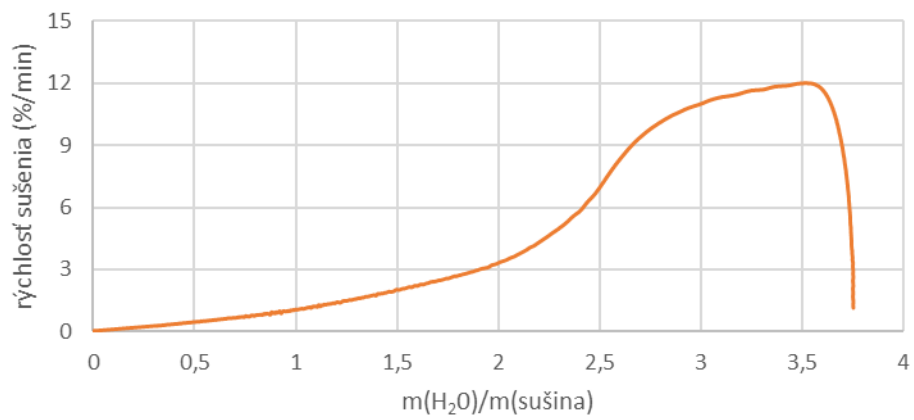
**Obrázok 50** *C. necator* H16 MM, 50 g/L



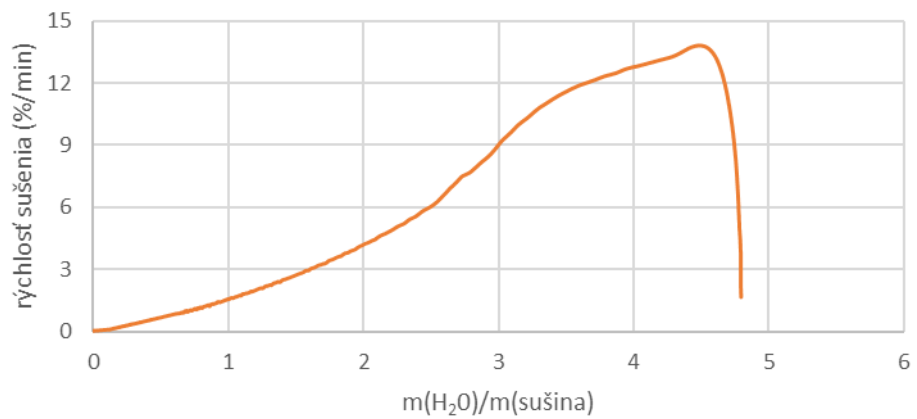
**Obrázok 51** *C. necator* H16 MM, 100 g/L



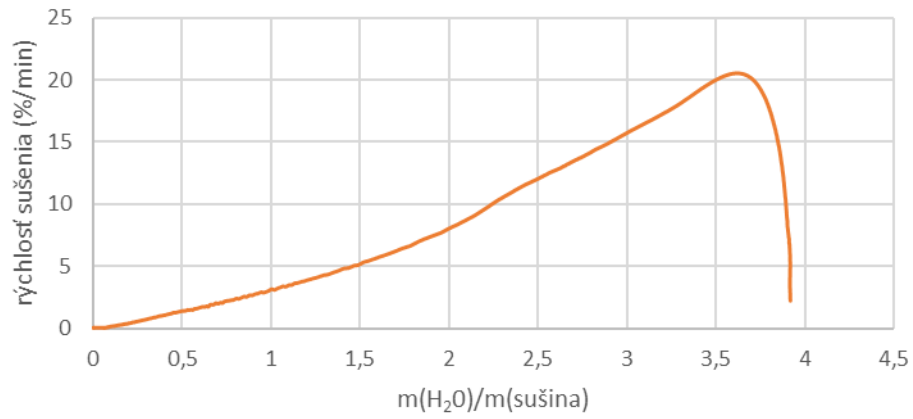
**Obrázok 52** *C. necator* H16 MM, 200 g/L



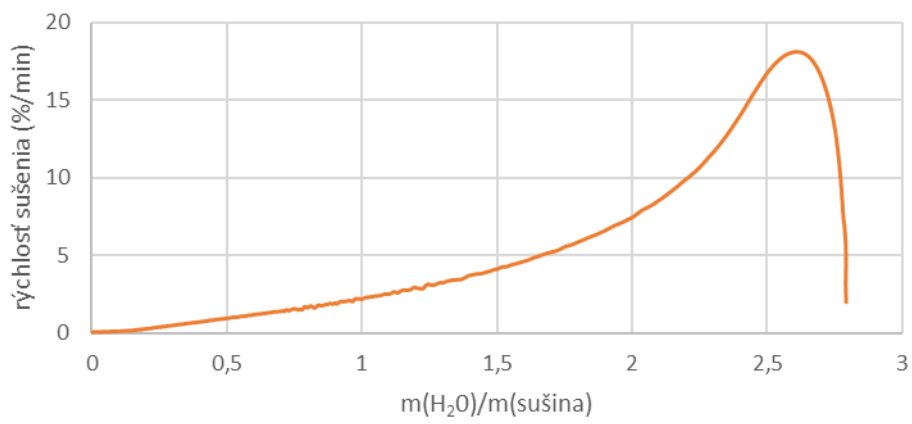
**Obrázok 53** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, 0 g/L



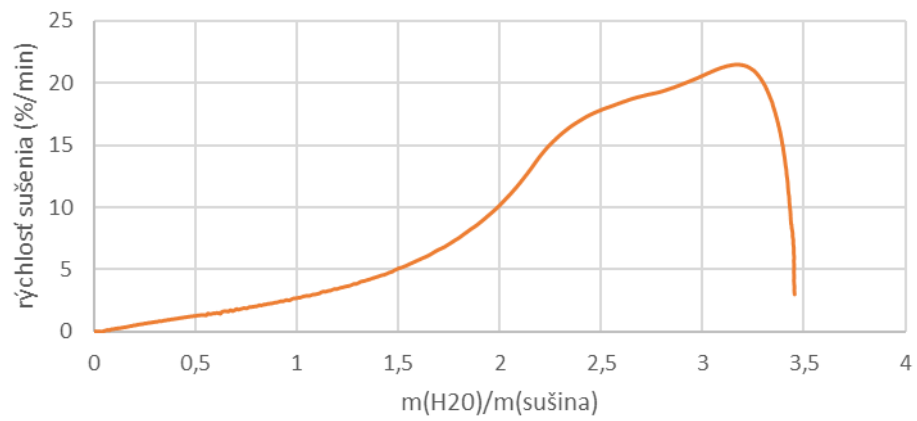
**Obrázok 54** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, 50 g/L



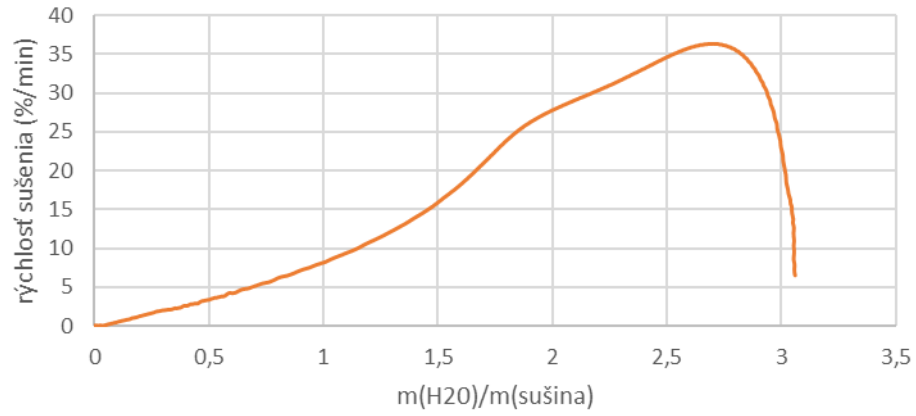
**Obrázok 55** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, 100 g/L



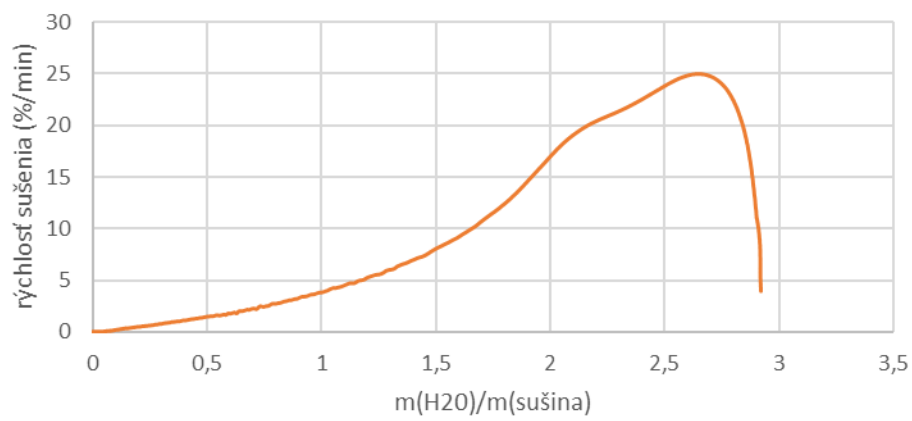
**Obrázok 56** *C. necator* PHB<sup>-4</sup>, 200 g/L



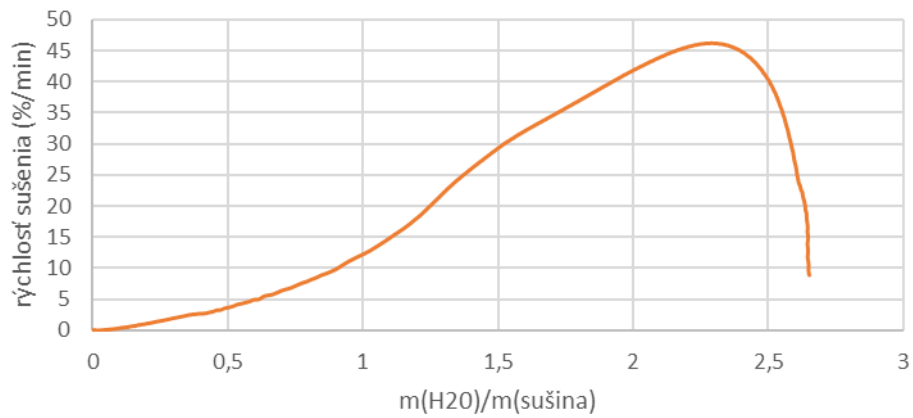
**Obrázok 57** *C. necator* H16 NB, 0 g/L



**Obrázok 58** *C. necator* H16 NB, 50 g/L



**Obrázok 59** *C. necator* H16 NB, 100 g/L



**Obrázok 60** *C. necator* H16 NB, 200 g/L