



# 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

## STUDIUM PRODUKCE PHA U EXTREMOFILNICH ZÁSTUPCŮ RODU BACILLUS A PŘÍBUZNÝCH RODŮ

STUDY ON PHA PRODUCTION IN EXTREMOPHILES FROM GENUS BACILLUS AND RELATED GENUSES

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nikola Reinohová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Iva Pernicová, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1665/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Nikola Reinohová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Iva Pernicová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Studium produkce PHA u extremofilních zástupců rodu Bacillus a příbuzných rodů

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium produkce PHA u vybraných bakteriálních zástupců
3. Molekulární charakterizace PHA syntázy u studovaných kmenů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

-----  
Nikola Reinohová  
student(ka)

-----  
Ing. Iva Pernicová, Ph.D.  
vedoucí práce

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

V Brně dne 1.2.2021

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

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí extremofilních zástupců rodu *Bacillus* a příbuzných rodů. V rámci práce byly zkoumány jak sbírkové mikroorganismy *Ureibacillus composti* DSM 171951, *Alkalibacillus haloalkaliphilus* DSM 5271, *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446, *Halobacillus halophilus* CCM 3527, *Thermobacillus composti* DSM 18247 a *Bacillus licheniformis* CCM 2206, tak i izolované mikroorganismy z přírodních zdrojů *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK7, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2, *Geobacillus thermodenitrificans* F101, *Geobacillus thermodenitrificans* F102, *Geobacillus stearothermophilus* A12 a *Geobacillus* sp. AH11. V teoretické části jsou popsány extremofilní mikroorganismy, polyhydroxyalkanoáty a jejich využití. V experimentální části byla provedena detekce produkce PHA na úrovni genotypu pomocí metody PCR, kde byla zjišťována přítomnost PHA syntáz první a čtvrté třídy pro určité zástupce a taktéž přítomnost genu *16SrRNA*. Dále byla testována produkce PHA na úrovni fenotypu, kde se testovala utilizace různých uhlíkových zdrojů a schopnost mikroorganismů tvořit s různými prekurzory kopolymery 4HB a 3HV při různých teplotách. Kopolymery jsou velice zajímavé svými vlastnostmi, díky kterým mají širokou škálu využití. Jako nejlepším zástupcem se pro produkci PHA v této práci ukázal mikroorganismus *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2 s produkcí PHA až 1,99 g/l a kopolymeru 3HV až 0,49 g/l.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanotáty, extremofilní mikroorganismy, *Ureibacillus composti*, *Alkalibacillus haloalkaliphilus*, *Thermobacillus composti*, *Bacillus licheniformis*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus* sp.

## ABSTRACT

This Bachelor thesis is focused on study of production of polyhydroxyalkanoates by extremophilic bacteria of genus *Bacillus* and related genera. In this thesis were studied microorganisms from German and Czech collections *Ureibacillus composti* DSM 171951, *Alkalibacillus haloalkaliphilus* DSM 5271, *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446, *Halobacillus halophilus* CCM 3527, *Thermobacillus composti* DSM 18247, *Bacillus licheniformis* CCM 2206 and isolated microorganisms from natural sources *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK7, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2, *Geobacillus thermodenitrificans* F101, *Geobacillus thermodenitrificans* F102, *Geobacillus stearothermophilus* A12, *Geobacillus* sp. AH11. The theoretical part describes extremophilic microorganisms, polyhydroxyalkanoates and their applications. In the experimental part, the detection of PHA production at the genotype level was performed using the PCR method, where the presence of first and fourth class PHA synthases was detected. Detection of presence of the *16S rRNA* gene was performed by PCR. PHA production was also tested at the phenotype level, where the ability of utilization of different carbon sources and the ability of microorganisms to form 4HB and 3HV copolymers with different precursors at different temperatures was monitored. Copolymers are very interesting because of their properties, which make them suitable for a wide range of applications. The microorganism *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2 proved to be the best representative for PHA production in this work, producing PHA up to 1,99 g/l and 3HV copolymer up to 0,49 g/l.

## KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, extremophilic microorganisms, *Ureibacillus composti*, *Alkalibacillus haloalkaliphilus*, *Thermobacillus composti*, *Bacillus licheniformis*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus* sp.

REINHOVÁ, Nikola. *Studium produkce PHA u extremofilních zástupců rodu Bacillus a příbuzných rodů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131520>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Iva Pernicová.

### **Prohlášení**

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

.....

podpis studenta

### ***Poděkování:***

Ráda bych velice poděkovala vedoucí mé bakalářské práce paní doktorce Ing. Ivě Pernicové, Ph.D., za pomoc v laboratoři a vytváření celé této práce, za velice vstřícný přístup a čas, který mi byl věnován. Taktéž bych velice ráda poděkovala všem, kteří mi v laboratoři velice ochotně pomohli a přispěli tak ke vzniku této práce.

## Obsah

1. ÚVOD .....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1. Extremofilní mikroorganismy .....	9
2.1.1. Biotechnologické využití extremofilních mikroorganismů.....	9
2.1.2. Termofilní mikroorganismy .....	11
2.1.3. Halofilní mikroorganismy .....	12
2.1.4. Acidofilní mikroorganismy .....	12
2.1.5. Alkalofilní mikroorganismy .....	12
2.2. Vybraní zástupci extremofilních mikroorganismů .....	13
2.2.1. Rod <i>Bacillus</i> .....	13
2.2.2. <i>Thermobacillus composti</i> .....	13
2.2.3. <i>Alkalibacillus haloalkalophilus</i> .....	13
2.2.4. <i>Halobacillus halophilus</i> .....	14
2.2.5. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> .....	14
2.2.6. <i>Ureibacillus composti</i> .....	14
2.2.7. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	14
2.2.8. Rod <i>Geobacillus</i> .....	15
2.2.9. <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> .....	15
2.2.10. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	15
2.2.11. <i>Aneuribacillus thermoaerophilus</i> .....	15
2.3. Polyhydroxyalkanoaty .....	15
2.3.1. Struktura .....	16
2.3.2. Biosyntéza .....	17
2.3.3. Biodegradace .....	19
2.3.4. Využití.....	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
3.1. Použité chemikálie.....	21
3.2. Použité přístroje .....	22
3.3. Použité mikroorganismy .....	22
3.4. Použitá média .....	23
3.5. Kultivace mikroorganismů .....	25
3.5.1. Příprava inokulí.....	25
3.5.2. Příprava produkčních médií .....	25
3.6. Stanovení obsahu biomasy .....	26

3.6.1.	Spektrofotometrické stanovení biomasy .....	26
3.6.2.	Gravimetrické stanovení biomasy .....	26
3.7.	Stanovení obsahu PHA v biomase pomocí plynové chromatografie .....	26
3.8.	Molekulární metody .....	27
3.8.1.	Izolace DNA z tekutých kultur.....	27
3.8.2.	Polymerázová řetězová reakce PCR .....	27
3.8.3.	Analýza výsledků PCR pomoc elektroforézy na agarózovém gelu .....	28
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	30
4.1.	Testování produkce PHA na úrovni genotypu .....	30
4.2.	Screening produkce PHA u sbírkových mikroorganismů .....	32
4.3.	Screening produkce PHA u přírodních izolátů.....	33
4.3.1.	Výběr uhlíkového zdroje .....	33
4.3.2.	Testování produkce kopolymeru s 4HB .....	36
4.3.3.	Testování produkce kopolymerů 3HV .....	39
5.	ZÁVĚR .....	44
6.	ZDROJE.....	46
7.	SEZNAM ZKRATEK .....	52

## 1. ÚVOD

Polyhydroxyalkanoáty jsou v posledních letech velice zkoumaným materiálem, který by v budoucnu mohl částečně nahradit syntetické plasty, které velice zatěžují planetu. Syntetické plasty se vyskytují takřka ve všech průmyslových odvětvích, ať už jako součástky do aut nebo obalové materiály. Nejvíce však zatěžují životní prostředí plastové výrobky na jedno použití nebo právě obalové materiály. Tyto výrobky by bylo dobré nahradit nějakou vhodnou alternativou, jako jsou například polyhydroxyalkanoáty. Polyhydroxyalkanoáty jsou biodegradabilní a biokompatibilní a díky svým dobrým mechanickým a chemickým vlastnostem by bylo možné je využívat ve zdravotnictví, farmacii a taktéž by mohly sloužit jako obaly potravin. Ačkoli jsou vlastnosti a využití polyhydroxyalkanoátů velice zajímavé, hlavní překážkou a problémem jsou vysoké finanční nároky.

Polyhydroxyalkanoáty jsou produkovány mikroorganismy jako zásobní zdroj uhlíku a energie. Mezi těmito zástupci mikroorganismů se vyskytují taktéž extremofilní mikroorganismy. Ty jsou svými vlastnostmi velice zajímavé, jelikož vyžadují buď velice nízkou nebo velice vysokou teplotu, pH, anebo dokonce salinitu. To z jejich prostředí dělá takové prostředí, které je velice nevhodné pro běžné druhy kontaminujících bakterií. Tento fakt by mohl pomoci ke snížení finančních nákladů, jelikož prostředí produkce by nemuselo probíhat ve velice sterilních podmínkách. Taktéž při vhodném složení média a výběru vhodných prekurzorů a teploty, lze pomocí mikroorganismů vyprodukovat různé polymery, které se vyznačují různými vlastnostmi, které vylepšují mechanické vlastnosti výsledného polymeru. Lze tedy říct, že při vhodném výběru mikroorganismu a podmínek pro daný mikroorganismu by se dala cena produkce PHA snížit a mohly by tak být více dostupné.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Extremofilní mikroorganismy

Za extremofilní mikroorganismy se považují takové, které prosperují v extrémních podmínkách. Extrémními podmínkami mohou být vysoké či velice nízké pH, teplota a salinita v porovnání s normálními podmínkami ve kterých prosperují běžné organismy. Jako normální podmínky považujeme teplotu 20–40 °C, hodnota pH okolo 7 a atmosférický tlak. Nejen že mikroorganismy tyto extrémní podmínky tolerují, ale i vyžadují pro růst a přežití. Prostředí, ve kterých se vyskytují mohou být solná jezera, geotermální prameny, nebo i člověkem vytvořené prostředí jako chladárna. Přežití v těchto nepříznivých podmínkách se u nich vyvinuly určité chemické a strukturální adaptace. Jejich enzymy jsou odlišné a mohou mít široké množství aplikací. Rozdělení extremofilních mikroorganismů zobrazuje tabulka 1 [1,2].

Tabulka 1: Rozdělení a příklady extremofilních mikroorganismů [1]

Enviromentální parametr	Typ	Podmínky	Příklady
Teplota	Hypertermofilní Termofilní Psychofilní	Růst > 80 °C Růst 45-80 °C Růst < 15 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> <i>Synechococcus lividis</i> <i>Psychrobacter</i>
Tlak	Piezofilní (barofilní)	Vyžadují vysoký tlak	
Salinita	Halofilní	Vyžaduje vysoký obsah soli (2-5 M NaCl)	<i>Dunaliella salina</i>
pH	Alkalofilní Acidofilní	pH > 9 Nízké pH	<i>Bacillus firmus</i> <i>Cyanidium caldarium</i>
Radiace		Tolerují radiaci	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Vysušení	Xerofilní	Tolerují nedostatek vody	<i>Artemia salina</i>

#### 2.1.1. Biotechnologické využití extremofilních mikroorganismů

Extremofilní mikroorganismy díky svým vlastnostem, které jim umožňují přežít v nepříznivých podmínkách, jako je vysoká teplota, salinita anebo pH, jsou velice zkoumané pro jejich schopnost produkce metabolitů, kterými jsou například polyhydroxyalkanoáty a extremozymy, což jsou enzymy fungující v extrémních podmínkách. Uplatnění extremofilních enzymů v průmyslu k vidění v tabulce 2 [3, 4].

Tabulka 2. Aplikace vybraných extrémofilních mikroorganismů a jejich enzymů v průmyslu [4]

Mikroorganismus	Zdroj	Enzym	Optimální reakční teplota [°C]	Využití
Termofilní <i>Anoxybacillus</i> sp. GXS-BL	Termální prameny	$\alpha$ -amyláza	60	Potravinářský, farmaceutický, a bioenergetický průmysl, detergent
<i>Erwinia</i> sp. E602	Zmrzlá půda	Chladuvzdorná $\beta$ -galaktosidáza	40	Mléčný průmysl
<i>Alteromonas</i> sp. ML117	Moře	$\beta$ -galaktosidáza	10	Potravinářský průmysl
<i>Bacillus subtilis</i> Lucky9	Není známo	Alkalitolerantní xylanáza	60	Biopalivo a potravinářství
<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	Půda	Termostabilní endoglukanáza	65	Biorafinerie
Termofilní <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB16	Termální prameny	Alkalická lipáza	50	Organické syntézy, detergent, bionafta
<i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7	Antarktická půda	Chladuvzdorná $\beta$ -glukosidáza	30	Biorafinerie, ethanol

Termofilní mikroorganismy prosperují při vyšších teplotách s optimálním růstem okolo 45-80 °C a jsou poslední dobou velice zkoumané pro využití v biotechnologických procesech. Nejvíce byly využívány pro přípravu ethanolu v laboratorních měřicích a jsou taktéž významným zdrojem termostabilních enzymů. Termostabilní enzymy našly široké pole uplatnění v průmyslu především díky jejich odolnosti vůči vysokým teplotám a denaturačním činidlům. Uplatnění nachází například při výrobě bioenergie a při anaerobní fermentaci. Dále je možné uplatnění například v biosenzorech. Dále se dají využít v čistících prostředcích, kde mohou být potřeba enzymy stabilní při vysokém pH a vysoké teplotě [4, 5].

Psychrofilní mikroorganismy prosperující v chladném prostředí a produkují exopolysacharidy, které umožňují psychrofilní bakterii přežít nízké teploty. Tyto polysacharidy můžou být využity v biomedicíně, potravinářském průmyslu a pro výrobu biomateriálů, bohužel jejich produkce pomocí psychrofilních bakterií je velice nízká. Enzymy psychrofilních mikroorganismů můžou fungovat při velice nízkých teplotách, což jim dává určité výhody v biotechnologiích [4].

Alkalofilní mikroorganismy jsou využívány v biotechnologické výrobě produktů pro běžný trh a taktéž jsou zkoumány pro produkci antibiotik. Nejstudovanějšími mikroorganismy v tomto odvětví jsou všudypřítomné mikroorganismy rodu *Bacillus*. Alkalofilní mikroorganismy rodu *Bacillus* se nepovažují patogenní a mají vysokou produkční kapacitu extracelulárních enzymů. Enzymy alkalofilních mikroorganismů mají díky jejich termostabilitě

a substrátové specifitě potenciál pro produkci biopaliv. Taktéž xylanáza alkalofilů má využití v procesu bělení sodných buničin bez úpravy pH, což velice snižuje náklady [4,6,7].

Enzymy acidofilních mikroorganismů vykazují stabilitu při nízkém pH a vysoké teplotě, což z nich dělá mikroorganismy, které mají velký potenciál pro využití v průmyslu. V škrobárenském průmyslu by mohla být využita  $\alpha$ -amylasa *Alicyclobacillus acidocaldarius* a *Bacillus acidicola*, kde je potřeba enzym, co je stabilní při nízkém pH a vysoké teplotě. Dále by mohly najít využití ve farmaceutickém průmyslu a mikrobiohydrometalurgie. Enzym xylanáza produkovaná acidofilní bakterií *Penicillium oxalicum* GZ-2 je využitelný při výrobě biopaliv, zvířecího krmení a v potravinářském průmyslu [4,6,8].

Halofilní mikroorganismy hrají roli při fermentační produkci potravin, kde dodávají potravinám charakteristickou chuť a aroma. Díky velice slanému prostředí, ve kterém prosperují, je velice nízké riziko kontaminace. Enzymy, jako jsou  $\alpha$ -amyláza, lipáza a glukooamyláza, mají potenciál při výrobě biopaliv a mastných kyselin. Kompatibilní soluty, kterými jsou ectoiny a hydroxyectoiny, se mohou uplatnit v biotechnologických aplikacích jako stabilizátory biomolekul proti stresu [4,6,9]

### 2.1.2. Termofilní mikroorganismy

Termofilními mikroorganismy myslíme takové, které prosperují při vysokých teplotách. Vyskytují se v půdě, vulkanických prostředích a geotermálních pramenech. Jejich schopnost přežít a růst v teplotách nad 45 °C je způsobena tepelně stabilními makromolekulami. Díky růstu ve vysoké teplotě jsou enzymy fyzikálně a chemicky stabilní. Rody *Bacillus* a *Clostridium* jsou běžné v samo ohřevných prostředích jako je například kompost, zde je také velká druhová rozmanitost mikroorganismů. Na druhou stranu v termálních pramenech, kde je teplota stabilně udržována nad 60 °C, je druhová rozmanitost podstatně nižší, vyskytují se zde například rody *Thermus* a *Thermoanaerobium*. Druhová rozmanitost záleží i na dalších parametrech prostředí, jako je pH a množství živin. Alkalické nebo kyselé prostředí obsahuje menší zastoupení druhů než neutrální prostředí. Horní teplotní hranice ještě není známa, ovšem vysoká teplota klade fyzikálně chemické omezení pro mikroorganismy vyžadující komplexní membránovou organizaci [10].

Proteiny, nukleové kyseliny a lipidy mají malé strukturální rozdíly od mezofilních mikroorganismů díky kterým jsou v těchto extrémních podmínkách schopni přežít. Produkované specifické polyaminy fungují jako ochrana makromolekul před vysokou teplotou. Dalším přizpůsobením na extrémní teplotu je vyšší obsah nasycených mastných kyselin v membránových lipidech, což zajišťuje správnou funkci membrány [10].

### 2.1.3. Halofilní mikroorganismy

Halofilní mikroorganismy jsou tolerantní vůči vysoké koncentraci soli v prostředí kde žijí. Místem výskytu bývají slaná a solná jezera s vysokou koncentrací NaCl, většina těchto prostředí vznikla odpařením mořské vody. Pro přežití v těchto podmínkách si vyvinuli dva mechanismy. Prvním mechanismem je akumulace a syntéza kompatibilních solutů, které mají funkci stabilizátoru. Druhým mechanismem je řízení úrovně soli pomocí příjmu  $K^+$  iontů do cytoplazmy k vyrovnání osmotického tlaku, z cytoplazmy se uvolňuje  $Na^+$ . Mikroorganismy využívající tento mechanismus mění chemické složení proteinů tak, že obsahují více soli, čehož dosáhnou zvýšením koncentrace soli v cytoplazmatické membráně na úroveň koncentrace soli v okolním prostředí [11,12].

Jsou hlavním zdrojem zkoumání bioaktivních sloučenin jako jsou například antioxidanty nebo kompatibilní soluty. Kompatibilní soluty, neboli osmoticky aktivní látky, kterými mohou být například ectoin a hydroxyectoin, udržují buňku v pozitivní vodní rovnováze a jsou kompatibilní s buněčným metabolismem. Také se může jednat o sacharidy (trehalóza) nebo o aminokyseliny a jejich deriváty. Mohou se uplatnit v biotechnologických aplikacích jako stabilizátory biomolekul proti stresu. Halofilní mikroorganismy se taktéž využívají k produkci polyhydroxyalkanoátů, kde se k producentům řadí hlavně archea *Haloferax mediterranei* či bakteriální rod *Halomonas* [6,9,13,14].

### 2.1.4. Acidofilní mikroorganismy

Jedná se o mikroorganismy, které prospívají v kyselém prostředí jako jsou sirné prameny, kde se vyskytují především *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfobolus haonensis* a *Vulcanisaeta thermophila*, nebo vulkanická jezera a gejzíry. Toto prostředí se vyznačuje hodnotou pH okolo 4. Aby tyto mikroorganismy mohly v těchto podmínkách přežít, jsou nutné určité buněčné adaptace, které pomáhají udržet pH v buňce okolo 5-7. Mají vyvinutý mechanismus, který pumpuje protony z buněčného prostoru, a tak udržují pH cytoplazmy neutrální. Mikroorganismy produkují enzymy jako například amylázy, ligázy a esterázy, které jsou stabilní při pH 1,7- 4. Výhodou těchto mikroorganismů je ta, že díky růstu při nízkém pH, se velice snižuje riziko kontaminace vzorku jinými mikroorganismy [8,15].

### 2.1.5. Alkalofilní mikroorganismy

Mikroorganismy, které jsou schopné přežít a prosperovat v prostředí s hodnotou pH okolo 9-10. Přírozeným prostředím těchto mikroorganismů jsou například alkalická jezera,

kteřá obsahují  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , podzemní voda s obsahem  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Některé mikroorganismy se dokonce vyskytují i v běžné půdě. V alkalickém prostředí přežívají díky stavbě buněčné stěny. Ta obsahuje kyselé polymery, které mají schopnost na povrchu stěny adsorbovat sodíkové a hydroxoniové ionty a tím odpuzovat ionty hydroxidové [16,17].

## 2.2. Vybraní zástupci extremofilních mikroorganismů

### 2.2.1. Rod *Bacillus*

Zástupci rodu *Bacillus* jsou převážně aerobní, ale někteří zástupci jsou fakultativně anaerobní i striktně anaerobní. Jsou to sporující tyčinky, které jsou v přírodě takřka všudypřítomné. V tomto rodu jsou k nalezení jak gram-positivní zástupci, tak i gram-negativní. Jedná se o rozsáhlý rod s velkou škálou podmínek, ve kterých se vyskytují. Lze zde najít termofilní, psychofilní, alkalifilní, halofilní i acidofilní zástupce. Mají také širokou škálu uplatnění, například lékařství, farmaceutický průmysl a jiné průmysly, kde se uplatňuje jejich schopnost produkce řady enzymů [18,19].

### 2.2.2. *Thermobacillus composti*

Zástupci rodu *Thermobacillus* jsou tyčinkovité, nepohyblivé bakterie. Jsou aerobní, termofilní a tvoří nepravidelné kolonie. Optimální růst je při 55 °C a při hodnotě pH 7,8. Také pro optimální růst vyžadují přítomnost  $\text{CO}_2$  [20].

*Thermobacillus composti* je středně termofilní, aerobní, nepohyblivá tyčinka s optimální teplotou růstu okolo 50 °C a hodnotou pH přibližně 9. Kolonie mají většinou kruhový tvar a krémově bílou barvu [21].

### 2.2.3. *Alkalibacillus haloalkalophilus*

Rod *Alkalibacillus* zahrnuje převážně gram-positivní bakterie, ale u starších kultur mohou být gram-variabilní. Tvoří sférické endospory a jsou převážně obligátně aerobní. Tvoří krémově bílé kolonie na médiu obsahující sůl. Optimální podmínky pro růst jsou při koncentraci  $\text{NaCl}$  je 10 % a pH 7-10 u většiny druhů. Teplotní rozsah je 15 až 50 °C s optimem okolo 30 °C [22,23].

*Alkalibacillus haloalkaliphilus* jsou striktně alkalifilní a halofilní pohyblivé tyčinky, které tvoří sférické spory. Kolonie na médiu obsahující 5-10 %  $\text{NaCl}$  jsou bílé, zatímco při obsahu  $\text{NaCl}$  20 % mají kolonie nažloutlou barvu. Optimální pH pro růst je přibližně 9,7 [23].

#### **2.2.4. *Halobacillus halophilus***

Bakterie rodu *Halobacillus* tvoří krémově bílé, žluté až oranžové kruhové kolonie. Jsou chemoorganotrofní a striktně aerobní. Optimální podmínky pro růst jsou při koncentraci soli 5 – 10 %, teplotě okolo 35 °C a hodnotě pH mezi 7 až 8. Vyskytují se v hypersalinních prostředích, jako je například slaná půda nebo fermentované potraviny [24].

*Halobacillus halophilus* je bakterie s oválnými buňkami, která se vyskytuje v párech, anebo v triádách. Tvoří kulaté kolonie s oranžovým zbarvením. Optimální teplota je mezi 15 °C až 37 °C a optimální hodnota pH je mezi 7-9. Jedná se o aerobní gram-pozitivní bakterii, která prosperuje v prostředí obsahující sůl. Bakterie původně izolována ze slané zálivu Severního moře v Německu [24,25].

#### **2.2.5. *Alicyclobacillus acidocaldarius***

Bakterie rod *Alicyclobacillus* jsou termo-acidofilní, aerobní tyčinky. Skoro všechny druhy jsou gram-pozitivní, jediným gram-negativním zástupcem je *Alicyclobacillus sendaiensis*. Teplota růstu většiny zástupců je v rozmezí 20-70 °C a optimální teplota růstu v rozmezí 35-65 °C. Optimální hodnota většiny zástupců pH je mezi 3-5,5. Zástupci jako *A. disulfooxidans* a *A. tolerans* jsou schopné růst při hodnotě pH pod 1,5 s optimem mezi 1,5-2 [26].

#### **2.2.6. *Ureibacillus composti***

Rod *Ureibacillus* zahrnuje termofilní aerobní bakterie, které vytvářejí sférické endospory. [27]

Jedná se o gram-negativní pohyblivou tyčinku, tvořící světle hnědé kruhové kolonie. Prosperuje při velkém rozsahu teploty od 37 °C po 60 °C, rozpětí pH 6-8, toleruje až 5 % NaCl [28].

#### **2.2.7. *Bacillus licheniformis***

Jde o gram-pozitivní bakterii bakterii, která je blízce příbuzná mikroorganismu *Bacillus subtilis*. Většina *Bacillů* je převážně aerobních, ovšem *Bacillus licheniformis* je fakultativně anaerobní. Některé izoláty jsou schopny denitrifikace [29].

### **2.2.8. Rod *Geobacillus***

Zástupci rodu *Geobacillus* jsou gram-pozitivní, termofilní, aerobní, popřípadě fakultativně anaerobní, mikroorganismy, které tvoří spory. Většina mikroorganismů z rodu *Geobacillus* prosperuje při teplotě od 45-70 °C. Spory jsou odolné vůči ultrafialovému světlu, vysušení a tepelné inaktivaci [30].

### **2.2.9. *Geobacillus thermodenitrificans***

*Geobacillus thermodenitrificans* je termofilní gram-pozitivní bakterie, která se vyskytuje v geotermálních oblastech. Produkuje termostabilní enzymy, které by mohly potenciálně využít v průmyslu [31].

### **2.2.10. *Geobacillus stearothermophilus***

*Geobacillus stearothermophilus* termofilní aerobní bakterie, která tvoří termotolerantní, elipsoidní spory. Optimální teplota pro růst je 55 °C, při které má vysokou rychlost růstu. Jde o běžný kontaminant mléčných výrobků [32].

### **2.2.11. *Aneuribacillus thermoaerophilus***

Zástupci rodu *Aneurinibacillus* jsou pohyblivé tyčinky, které jsou gram-pozitivní a převážně aerobní [33].

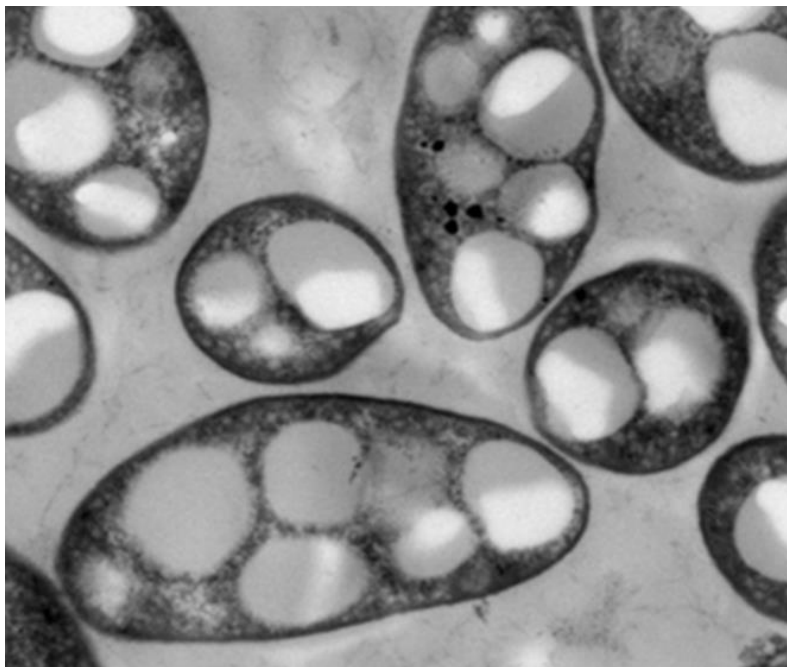
*Aneuribacillus thermoaerophilus* je termofilní mikroorganismus, který prosperuje při 50 °C a při pH 8. Produkuje termostabilní lipázy, které jsou tolerantní vůči organickým rozpouštědlům [34].

## **2.3. Polyhydroxyalkanoáty**

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolymery, které jsou syntetizovány mikroorganismy jako zdroj uhlíku a energie. Většina mikroorganismů je syntetizují při nadbytku uhlíku a při omezených nutričních podmínkách. V buňce jsou shromažďovány ve formě intracelulárních granulí, které je možné vidět na obrázku 1 [35].

Jsou biodegradabilní a biokompatibilní a díky tomu se také nazývají jako zelené plasty. Jsou vhodnou alternativou k petrochemickým plastům, které znečišťují planetu, a tak snížit zatížení přírody, která je momentálně velice plasty znečištěná. Výhodou polyhydroxyalkanoátů je jejich úplná biodegradabilita na vodu a CO<sub>2</sub>. Také mají širokou škálu využití třeba v medicíně jako nosiče léčiv nebo díky tomu, že nemají negativní účinek na organismus, jako scaffold v tkáňovém inženýrství. Využitelné je ovšem ale pouze malé

množství polyhydroxyalkanoátů. Nejvíce žádanými PHA jsou poly-3-hydroxybutyrát (P3HB), poly-4-hydroxybutyrát (P4HB) a jejich kopolymery. Nevýhodou polyhydroxyalkanoátů jsou jejich vysoké náklady na výrobu, která je až 10 – krát vyšší než výroba petrochemických plastů [35-37].

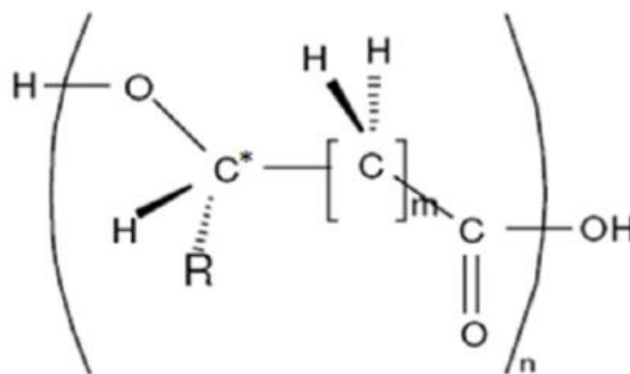


Obrázek 1. Intracelulární granule PHA [38]

### 2.3.1. Struktura

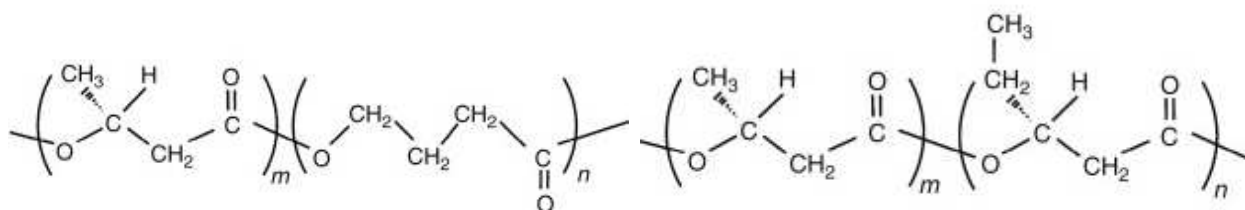
Fyzikální a chemické vlastnosti PHA závisí na postranních řetězcích a chemické struktuře. V základě se skládají z (R)-3-hydroxy mastné kyseliny s velkou škálou různých postranních řetězcích. Ostatní kyseliny mají hydroxylovou skupinou v 4- a 5- skupině. PHA se rozděluje do tří základních skupin. Polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem PHA<sub>SCL</sub> (short chain length), které obsahují 3-5 uhlíkových atomů, mohou být produkovány mikroorganismem *Cuprividius necator*, mezi PHA<sub>SCL</sub> se řadí poly-3-hydroxybutyrát (3HB) nebo poly-4-hydroxybutyrát (4HB). PHA<sub>SCL</sub> jsou křehké krystalické látky s vysokou teplotou tání. Druhým typem PHA jsou se středně dlouhým řetězcem PHA<sub>MCL</sub> (medium chain length), který se skládá z 6-14 uhlíkových atomů, které mohou být produkovány mikroorganismy jako *Pseudomonas oleovorans*. Jsou více žádané jak PHA s krátkým řetězcem díky jejich vysoké pružnosti, pevnosti a taktéž nízká teplotě tání. Posledním typem jsou polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem PHA<sub>LCL</sub> (long chain length), které obsahují víc jak 14 uhlíkových atomů. Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů na obrázku 2 [39, 40]





Obrázek 2. Obecná struktura PHA [41]

Polyhydroxyalkanoáty taktéž tvoří kopolymery. Na vlastnosti kopolymeru má velký vliv procentuální zastoupení jednotlivých polymerů. Kopolymer P(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) má díky inkorporaci poly-3-hydroxyvalerátu do struktury poly-3-hydroxybutyrátu lepší vlastnosti jako například nižší teplotu tání, je flexibilnější a je méně krystalický. Struktura kopolymerů na obrázku 3 [42,43].

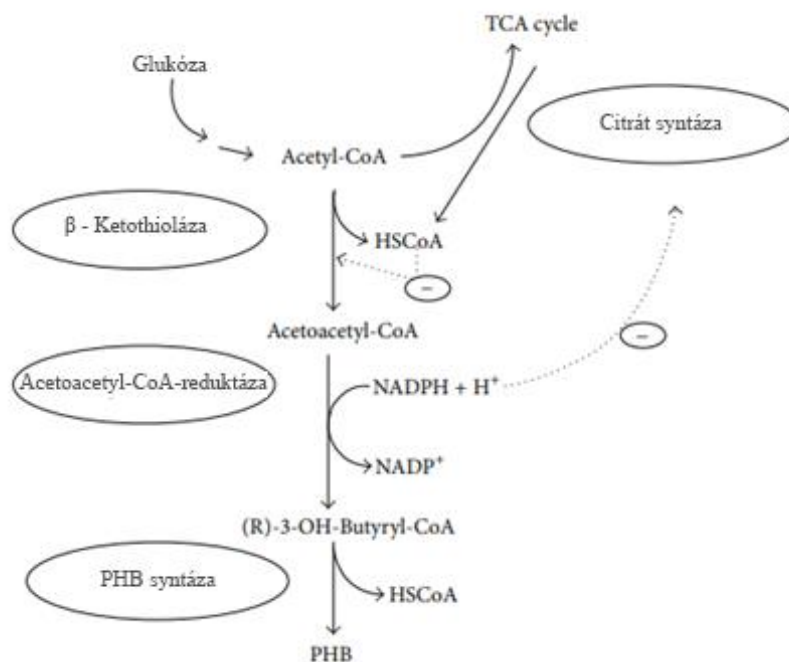


Obrázek 3. Chemická struktura kopolymerů [43]

Dalším častým kopolymerem je poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát), kde jsou opět vlastnosti velice ovlivněny procentuálním zastoupením jednotlivých polymerů. Kopolymer je méně krystalický při menší koncentraci 4-hydroxybutyrátu. [43].

### 2.3.2. Biosyntéza

PHA jsou syntetizovány řadou gram negativních a gram pozitivních bakterií. Mikroorganismy, které produkují PHA mají metabolickou schopnost polyhydroxyalkanoáty biosyntetizovat a akumulovat je v cytoplazmě. Nejvíce prostudovaným mikroorganismem pro biosyntézu PHA je *Cuprivadius necator* a slouží proto pro popis jako modelový mikroorganismus a jeho metabolická dráha je k vidění na obrázku 4 [44,45].



Obrázek 4. Metabolická dráha biosyntézy poly-3hydroxybutyrátu *Cupravidius necator* [45]

Biosyntéza poly-3-hydroxybutyrátu je zahájena kondenzací dvou molekul acetyl-CoA pomocí  $\beta$ -ketothiolázy, která je regulována koenzymem A, za vzniku acetoacetyl-CoA. Následně pomocí NADPH dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy katalyzuje redukce acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, ze kterého je pomocí PHA syntázy polymerizován poly-3-hydroxybutyrát. Při zvýšené koncentraci NADPH a NADH dojde k inhibici enzymů citrátového cyklu, což způsobí dostupnost acetyl-CoA a  $\beta$ -ketothiolázy a možný průběh reakce pro syntézu 3HB [44].

Další biosyntetickou dráhou je beta oxidace mastných kyselin, kdy mastné kyseliny jsou využity jako zdroj uhlíku. Řetězec mastné kyseliny se s každým cyklem zkrátí o dva uhlíky za vzniku acetyl-CoA a acyl-CoA. Dalším krokem je oxidace acyl-CoA na 3-ketoacyl-CoA. Následně dochází k polymeraci pomocí PhaC syntázy R-3-hydroxyacyl-CoA na polymerní sloučeniny [46,47].

Biosyntéza mastných kyselin de novo je hlavní dráhou při růstu na zdroji uhlíku, který je metabolizován za vzniku acetyl-CoA. Dochází k elongaci řetězce, při které dochází ke kondenzaci molekul acetyl-CoA na 3-hydroxyacetyl-CoA, který se podílí na syntéze PHA [47,48].

PHA syntáza hraje hlavní roli při biosyntéze PHA. PHA syntáza (PhaC) katalyzuje polymeraci 3-R-hydroxyacyl-CoA do podoby PHA polymerů. PHA syntázy se dělí do 4 tříd na základě složení podjednotek a substrátové specifitě. Syntázy třídy I a II jsou složeny z jedné

podjednotky (PhaC) a mohou produkovat PHA<sub>SCL</sub> a PHA<sub>MCL</sub>. I. třída využívá CoA thioestery různých R-3-hydroxymastných kyselin obsahující 3–5 atomů uhlíku, třída II. se liší tím, že upřednostňuje řetězce s obsahem 6–14 atomů uhlíku. Třída III vyžaduje dva typy podjednotek PhaC a PhaE, přednostně syntetizuje PHA<sub>SCL</sub>. Poslední IV. třída je obdobou třídy III, ovšem PhaE je nahrazena PhaR, tato třída je charakteristická pro bakterie rodu *Bacillus* a jemu příbuzným rodům [49,50].

### 2.3.3. Biodegradace

Nejvíce přínosnou vlastností polyhydroxyalkanoátů je jejich biodegradabilita pomocí aerobní a anaerobních bakterií a plísní v rozmanitém prostředí, kterými jsou půda, jezera, mořská voda apod. Míra biodegradability je ovlivněna mnoha vnějšími faktory, jako je například velikost populace mikroorganismů, teplota, pH a konkrétní vlastnosti daného polyhydroxyalkanoátu. Konečným produktem po biodegradaci PHA je oxid uhličitý a voda. U poly-3-hydroxybutyrátu trvá degradace okolo 70 týdnů [51].

Mikroorganismy využívají extracelulární PHA depolymerázu pro rozložení PHA na ve vodě rozpustné oligomery a monomery, které dále využívají jako zdroj uhlíku. Extracelulární PHA depolymerázu má jiné vlastnosti než intracelulární, jelikož intracelulární PHA jsou nekystalizující elastomery, které je možné degradovat pomocí intracelulární depolymeráz. Enzymatická degradace je heterogenní reakce, jelikož polymer PHA je ve vodě nerozpustný, zatímco enzym je ve vodě rozpustný. Degradace zahrnuje dva kroky, adsorpci enzymu na povrch PHA a hydrolýzu polymerních řetězců [5,52].

### 2.3.4. Využití

Díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě jsou PHA potenciální látky v širokém spektru odvětví. Polyhydroxyalkanoáty jsou velkým kandidátem pro částečné nahrazení petrochemických plastů. Především by mohly být využity pro balení potravin, kde by mohla být výhodou ochrana před zkažením díky velice vysoké kyslíkové bariéře, kterou PHA folie poskytují [41,53].

Mají také potenciál v lékařském odvětví. V tkáňovém inženýrství lze polyhydroxybutyrát využít jako matici pro proliferaci různých lidských buněk. PHA byly zkoumány v kostním inženýrství a nezpůsobovaly žádné chronické záněty ani po roce od použití. Výzkumy probíhají i v srdečním tkáňovém inženýrství, kde by polyhydroxyalkanoáty mohly být využity jako scaffold pro konstrukci srdeční chlopně [41,53].

Díky své schopnosti biodegradace je velký zájem o použití PHA jako nosič léků. Kdy je PHA použita jako obal, který začne uvolňovat léčivou látku v moment kdy začne degradovat. Hydrolyza PHA taktěž vede ke zdroji chirální synthonů, které lze využít jako materiál pro syntézu aromatických látek, feromonů, vitamínů a antibiotik [41,53].

PHA našly své využití v nanotechnologiích, kde díky své kompatibilitě jsou využity jako výchozí látky pro spoustu produktů, například pro výrobu proteinových čipů pro detekci viru hepatitida B nebo výrobu nanogelů. Scaffold z PHA nanovláken byl zkoumán pro růst nervových buněk jako náhrada přírodní mezibuněčné hmoty, tento scaffold vykazoval dobrou adhezi a životaschopnost buněk [53].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Použité chemikálie

Seznam chemikálií použitých při experimentech jsou zobrazeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Použité chemikálie

Názvy chemikálií a výrobce
1,4-butandiol (Sigma-Aldrich)
Agar (HiMedia)
Agarosa (Sigma-Aldrich)
Citrát amonno-železitý (Fluka)
D-Glukóza monohydrát (Lach:Ner)
Dihydrogenfosforečnan draslený (Lach:Ner)
Glycerol (Lach:Ner)
Hovězí extrakt (HiMedia)
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach:Ner)
Hydroxid sodný (Lach:Ner)
Chlorid amonný (Lach:Ner)
Chlorid sodný (Lach:Ner)
Chlorid vápenatý dihydrát (Lach:Ner)
Chlorid měďnatý dihydrát (Sigma-Aldrich)
Chlorid kobaltnatý hexahydrát (Sigma-Aldrich)
Chlorid manganatý hexahydrát (Sigma-Aldrich)
Chlorid železitý hexahydrát (Lach:Ner)
Chlorid hořečnatý hexahydrát (Lach:Ner)
Chloroform p.a. (Lach:Ner)
Isopropylalkohol p.a. (Lach:Ner)
Kvasničný extrakt (HiMedia)
Kyselina benzoová (Lach:Ner)
Kyselina boritá (Sigma-Aldrich)
Kyselina sírová (Lach:Ner)
Kyselina valerová (Sigma-Aldrich)
Kyseliny levulová (Sigma-Aldrich)
Molybdenan sodný dihydrát (Sigma-Aldrich)
Nutrient broth (HiMedia)
Pepton (HiMedia)
Propionát sodný (Sigma-Aldrich)
Síran amonný (Lach:Ner)
Síran manganatý monohydrát (Lach:Ner)
Síran hořečnatý heptahydrát (Lach:Ner)
Síran zinečnatý heptahydrát (Sigma-Aldrich)
Síran kobaltnatý heptahydrát (Sigma-Aldrich)
Sojový pepton (HiMedia)

Názvy chemikálií a výrobce
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach:Ner)
$\gamma$ -butyrolakton (Sigma-Aldrich)

### 3.2. Použité přístroje

Seznam použitých zařízení zobrazuje tabulka 4.

Tabulka 4. Seznam použitých přístrojů

Použité přístroje
Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
Centrifuga, HETTICH EBA200
Centrifuga, HETTICH EBA20
Nanofotometr, Implen
Termostat, BioTech IP60
Termostat, BioTech IP100U
pH metr, IX intruments
Třepačka, LABWIT ZWYR D2401
Třepačka, IKA KS4000
Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
Termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 130
Váhy, Kern EW 620-3NM
Vortex, Benchmark BenchMixer
Magnetická míchačka (Zjistit)
Termocycler, BIO-RAD My CyclerTM

### 3.3. Použité mikroorganismy

Při této práci byly využity sbírkové mikroorganismy z české sbírky mikroorganismů CCM a německé sbírky mikroorganismů DSM. Taktéž byly využity termofilní izoláty z přírodních vzorků aktivovaného kalu a kompostu. Izolace a taxonomické zařazení izolátů nebylo předmětem bakalářské práce. Taxonomické zařazení izolátů proběhlo na základě sekvenace genu *16SrRNA*. Seznam použitých mikroorganismů je k vidění v tabulce 5 a v tabulce 6.

Tabulka 5. Seznam použitých sbírkových mikroorganismů

<b>Použité sbírkové mikroorganismy</b>
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446
<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> DSM 5271
<i>Bacillus licheniformis</i> CCM 2206
<i>Halobacillus halophilus</i> CCM 3527
<i>Thermobacillus composti</i> DSM 18247
<i>Ureibacillus composti</i> DSM 17951

Tabulka 6. Použité izoláty

<b>Použité izoláty</b>
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> LK7
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> F109
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> AFn2
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F101
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F102
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> A12
<i>Geobacillus</i> sp. AH11

### 3.4. Použitá média

Použitá média pro kultivaci mikroorganismů a produkci polyhydroxyalkanoátů jsou zobrazeny v tabulce 7 a 8.

Tabulka 7. Seznam použitých komplexních medií

<b>Označení</b>	<b>Složení [g/l]</b>	
M 220	Sojový pepton	15
	Pepton	5
	NaCl	5
	pH 7,3	
M 31	Pepton	5
	Hovězí extrakt	0,3
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,0132
	Po sterilizaci	
	M1	0,01 ml/l
	pH 9,7	
M1	NaHCO <sub>3</sub>	0,42
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bezvodý	0,53

Označení	Složení [g/l]	Označení
M 402	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
	Kvasničný extrakt	2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
	Po sterilizaci	
	Glukóza	5
M 54	Nutrient broth	25
	NaCl	30
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	5
	pH 7,2	
M 88	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,3
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,28
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,07
	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,002
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,0018
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	0,0045
	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,00022
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,00005
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,00003
	CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,00001
	Kvasničný extrakt	5
	pH 9	
	NB médium	Nutrient Broth

Tabulka 8. Seznam použitých minerálních medií

Označení	Složení [g/l]	
PM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
	NH <sub>4</sub> Cl	1
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02
	NH <sub>4</sub> Fe <sup>III</sup> citrát	0,001
	Kvasničný extrakt	0,5
	Po sterilizaci	
	Uhlíkatý zdroj	
	TES II	1 ml/l
TES II	EDTA	50
	FeCl <sub>3</sub>	8,3
	ZnCl <sub>2</sub>	0,84
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1
	MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1
	Destilovaná voda	1000 ml



### 3.5. Kultivace mikroorganismů

#### 3.5.1. Příprava inokulí

Inokula byla připravována v objemu 50 ml ve 100 ml Erlenmeyerově baňce. Pro sbírkové mikroorganismy byla použita originální média upravena na odpovídající podmínky, které vyžadují. Pro izoláty bylo použito médium Nutrient Broth. Kultivace mikroorganismů probíhala po dobu 24 hodin. Kultivační média a podmínky pro jednotlivé sbírkové mikroorganismy zobrazuje tabulka 9.

Tabulka 9. Kultivační podmínky sbírkových mikroorganismů

Mikroorganismus	Médium	Kultivační podmínky
<i>Ureibacillus composti</i> DSM 17951	M 220	Teplota 50 °C
		pH 7,3
<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> DSM 5271	M 31	Teplota 30 °C
		5 % NaCl
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446	M 402	Teplota 60 °C
		pH 3,5
<i>Halobacillus halophilus</i> CCM 3527	M 54	Teplota 30 °C
		pH 7,2
<i>Thermobacillus composti</i> DSM 18247	M 88	Teplota 50 °C
		pH 9
		0,5% kvasničný extrakt

#### 3.5.2. Příprava produkčních médií

Produkční média byla připravována v objemu 100 ml v 250 ml Erlenmeyerově baňce. Jako produkční médium u všech mikroorganismů bylo použito médium PM., přesné složení v tabulce 8. Jako zdroje uhlíku pro sbírkové mikroorganismy byly glukóza 20 g/l, glycerol 20 g/l. Zdroje uhlíku u izolátů byly glukóza 20 g/l, glycerol 20 g/l. U sbírkových mikroorganismů bylo médium upraveno podle vyžadovaných podmínek daného mikroorganismu. Připravené produkční médium bylo zaočkováno z inokulí 10 % po 24 hodinách kultivace. Délka kultivace mikroorganismů v produkčním médiu byla 72 hodin. U izolátů byl pokus proveden při 50 °C a 60 °C.

Pro testování produkce kopolymerů s prekurzory 4HB byl u sbírkových kmenů použit 1,4-butandiol o koncentraci 4 g/l. U přírodních izolátů byly testovány 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l a  $\gamma$ -butyrolakton o koncentraci 8 g/l. Prekurzory sloužily jako jediný zdroj uhlíku.

Po zvolení ideálního zdroje uhlíku pro daný izolát bylo připraveno produkční médium PM s daným zdrojem uhlíku a prekurzory 3HV, a to propionát sodný 2 g/l, kyselina valerová

2 g/l a kyselina levulová 2 g/l. Kultivace byla opět prováděna po dobu 72 hodin a při teplotách 50 °C a 60 °C. Prekurzor byl přidán po 24 hodinách kultivace.

### **3.6. Stanovení obsahu biomasy**

Stanovení obsahu biomasy probíhalo po 72 hodinách kultivace mikroorganismu v produkčním médiu. Stanovení probíhalo spektrofotometricky a gravimetricky.

#### **3.6.1. Spektrofotometrické stanovení biomasy**

Stanovení biomasy spektrofotometricky probíhalo ve spektrofotometru při nastavené vlnové délce 630 nm. Měřilo se oproti destilované vodě v kyvetě.

#### **3.6.2. Gravimetrické stanovení biomasy**

Pro gravimetrické stanovení bylo po 72 hodinách kultivace mikroorganismu v produkčním médiu odebráno 2x 10 ml do centrifugační zkumavky. Následně bylo toto množství stočeno v centrifuze při 6000 otáčkách/minutu po dobu 5 minut. Po této době byl roztok nad sedimentem opatrně slit od sedimentu. Sediment byl následně promyt 5 ml destilované vody a tato směs byla pečlivě zvortexována. Poté byl vzorek opět umístěn do centrifugy, která byla taktéž nastavena na 5 minut a 6000 otáček/min. Supernatant byl slit a sediment byl sušen do konstantní hmotnosti. Po vysušení byla biomasa zvážena na analytických vahách.

### **3.7. Stanovení obsahu PHA v biomase pomocí plynové chromatografie**

Pro stanovení obsahu PHA ve vzorcích bylo použito 5-8 g vysušené biomasy, ta byla převedena do krimpovacích vialek do které byl následně přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi (15 %  $H_2SO_4$  v methanolu s vnitřním standardem 5 mg/ml kyseliny benzoové). Vialky byly uzavřeny a přesunuty do termobloku, kde probíhala esterifikace po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C. Po této době byly vialky schlazeny a převrhnuty do větších vialek s obsahem 0,5 ml 50 mM NaOH. Ze spodní fáze bylo odebráno 50  $\mu$ l vzorku, které bylo převedeno do malé šroubovací vialky s obsahem 900  $\mu$ l isopropylalkoholu. Tato směs byla uzavřena a analyzována pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem.

### 3.8. Molekulární metody

#### 3.8.1. Izolace DNA z tekutých kultur

Pro izolaci DNA z tekuté kultury byl odebrán jeden 1 ml do sterilní mikrozkušavky, který byl následně pomocí centrifugy odstředěn při 6000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Supernatant byl sterilně odebrán a k sedimentu bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru (5mM TrisHCl, pH 8,5), poté byl sediment rozsuspendován a inkubován v termobloku po dobu 10 minut při 98 °C. Po této době byl vzorek centrifugován po dobu 10 minut při 10000 otáčkách za minutu. Následně bylo 60 µl supernatantu převedeno do další sterilní mikrozkušavky.

#### 3.8.2. Polymerázová řetězová reakce PCR

Po vyizolování DNA ze vzorku byly pomocí PCR metody amplifikovány úseky DNA. Směs pro amplifikaci úseku genu *16SrRNA* a *phaC*, což je gen kódující syntázu PHA první třídy, byla připravena směs o složení zobrazené v tabulce 10.

Tabulka 10. Složení PCR směsi pro amplifikaci *16SrRNA* a *phaC*

Složka	Objem [µl]
MasterMix	12,5
Mg <sup>2+</sup>	2,6
16S F (20x zředěné)	1
16S R (20x zředěné)	1
G-D (20x zředěné)	1
G <sub>1</sub> R (20x zředěné)	1
DNA	2
PCR voda	3,9

Vedle vzorků byla také připravena negativní kontrola, která místo vyizolované DNA obsahovala PCR vodu, a pozitivní kontrola, která obsahovala DNA modelového mikroorganismu *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Tato reakční směs byla přemístěna do thermocycleru, kde polymerázová řetězová reakce probíhala podle teplotního programu zobrazeném v tabulce 11.

Tabulka 11. Teplotní program PCR

	Teplota [°C]	Čas [s]	Cykly
1.	94	30	1
2.	94	30	30
	55*	30	
	68	90	
3.	68	30	1

\*Annealingová teplota

Tento proces byl proveden i pro amplifikaci úseku genu kódujících PHA syntázy IV. třídy, a to pro poddruhy *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* a *Aneurinibacillus* sp. Složení PCR směsi pro jednotlivé poddruhy je vyobrazen v tabulce č. 12.

Tabulka 12. Složení PCR směsi pro poddruhy IV. třídy

<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Aneurinibacillus</i> sp.	
Složka	Objem [μl]	Složka	Objem [μl]	Složka	Objem [μl]
MasterMix	12,5	MasterMix	12,5	MasterMix	12,5
PhaBc F	1	PhaBm F	1	phaC F	1
PhaBc R	1	PhaBm R	1	phaC R	1
PCR voda	8,5	PCR voda	8,5	PCR voda	8,5

Ke každé směsi byly opět přidány 2 μl vyizolované DNA, do pozitivní kontroly 2 μl DNA mikroorganismu pro konkrétní poddruh: *Bacillus cereus* CCM CCM 2010<sup>T</sup>, *Bacillus megaterium* CCM 2037, *Aneurinibacillus* sp. H1 CCM 8960, a negativní kontrola obsahovala 2 μl PCR vody. Reakční směs byla přemístěna do thermocycleru. Teplotní program pro *Bacillus cereus* a *Bacillus megaterium* je zobrazen v tabulce 11. Teplotní program pro *Aneurinibacillus* se lišil v annealingové teplotě, která byla 65 °C.

Sekvence použitých primerů zobrazuje tabulka 13.

Tabulka 13. Sekvence použitých primerů

Cílový gen	Velikost [bp]	Primer	Sekvence primeru
16SrRNA [55]	1500	16S F	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
		16S R	GGTACCTTGTTACGACTT
PHA syntáza I. Třídy [56]	551	G-D	GTGCCGCCSYRSATCAACAAG T
		G <sub>1</sub> R	GTTCCAGWACAGSAKRTCGAA
PHA syntáza IV třídy <i>B. cereus</i> [57]	500	PhaBc F	CTTGGTTAYTGCATGGGNGGAAC
		PhaBc R	ACTTGRYRKGGCANDGCRA <sub>1</sub> TRTGAT
PHA syntáza IV třídy <i>B. megaterium</i> [58]	1000	PhaBm F	CGTGCAAGAGTGGGAAAAAT
		PhaBm R	TCGCAATATGATCACGGCTA
PHA syntáza IV třídy <i>Aneurinibacillus</i> [59]	299	phaC F	ACACTGGGTATCATTCCACCGG
		phaC R	GCGGCAATGTTTAGCACGTTG

### 3.8.3. Analýza výsledků PCR pomoc elektroforézy na agarózovém gelu

Po ukončení PCR bylo provedena elektroforéza na agarózovém gelu, kde dochází k rozdělení molekul na základě velikosti. Gel obsahoval 2 % agarózy v 1x koncentrovaném TBE pufru (složení TBE v tabulce 14), po rozpuštění agarózy bylo přidáno 6 μl barviva Midori Green.

Tabulka 14. Složení TBE

Složení [g/l]	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	55
EDTA	9,3

Vzorek DNA byl smíchán s nanášecím pufrem Yellow load a následně byl aplikován do jamek gelu. Do jedné z jamek byl aplikován žebříček FastGenne 100 bp DNA Ladder pro porovnání velikosti vzorku. Takto připravený gel byl přemístěn do elektroforetické vany a přelit TBE pufrem. Vyhodnocení elektroforézy probíhalo pod UV světlem.

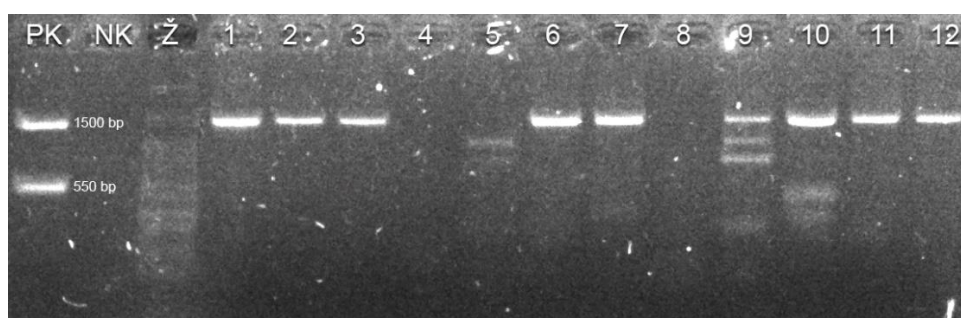
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byla zkoumána produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí extremofilních sbírkových mikroorganismů a přírodních izolátů. Byly vybrány extremofilní mikroorganismy z toho důvodu, že díky extrémním podmínkám, ve kterých prosperují, se razantně snižuje riziko případné kontaminace, což snižuje náklady na udržení sterilního prostředí. U vybraných mikroorganismů byla testována produkce PHA jak na úrovni fenotypu, tak na úrovni genotypu.

### 4.1. Testování produkce PHA na úrovni genotypu

Testování schopnosti produkce PHA na úrovni genotypu probíhalo pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Byla zjišťována přítomnost úseku genu *16SrRNA*, který potvrzuje přítomnost bakteriální DNA a genu kódující PHA syntázy určitých tříd u vybraných zástupců extremofilních mikroorganismů, kterými jsou sbírkové mikroorganismy *Ureibacillus composti* DSM 17951, *Alkalibacillus haloalkaliphilus* DSM 5271, *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446, *Halobacillus halophilus* CCM 3527, *Bacillus licheniformis* CCM 2206 a přírodní izoláty, které byly izolovány pomocí osmoselektce z kompostu a aktivovaného kalu a taxonomicky zařazeny na základě sekvenace genu *16SrRNA* v rámci dizertační práce [59] jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK7, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2, *Geobacillus thermodenitrificans* F101, *Geobacillus thermodenitrificans* F102, *Geobacillus stearothermophilus* A12 a *Geobacillus* sp. AH11. U sbírkového mikroorganismu *Thermobacillus composti* DSM 18247 se nepodařilo vyizolovat DNA v takové kvalitě, aby mohla být testována přítomnost PHA syntázy na úrovni genotypu.

Pomocí multiplex PCR byla zjišťována přítomnost genu *16SrRNA* o velikosti 1500 bp a genu kódující PHA syntázu I. třídy o velikost 551 bp.



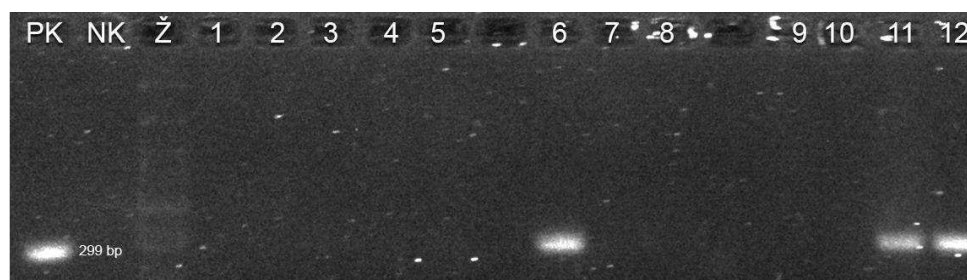
Obrázek 5. Gelová elektroforéza multiplex PCR: PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola, Ž – žebříček, 1 – DSM 17951, 2 – DSM 5271, 3 – DSM 446, 4 – CCM 3527, 5 – izolát AH11, 6 – izolát LK7, 7 – CCM 2206, 8 – izolát F101, 9 – izolát F102, 10 – izolát A12, 11 – izolát F109, 12 – izolát AFn2

Výsledná elektroforéza je zobrazena na obrázku 5. U bakterie *Halobacillus halophilus* CCM 3527, izolátu *Geobacillus* sp. AH11 a izolátu *Geobacillus thermodenitrificans* F101

nebyla detekována přítomnost ani jednoho bendu, což mohlo být způsobeno neproběhlou amplifikací. To může být způsobeno inhibicí DNA polymerázy, například u halofilního mikroorganismu *Halobacillus halophilus* CCM 3527 mohla být důvodem vysoká koncentrace soli. Přítomnost PHA syntázy první třídy byla zjištěna pouze u izolátu A12, který se řadí do rodu *Geobacillus*. Ovšem pokud se podíváme na příbuzné druhy z rodu *Geobacillus*, v našem případě izoláty F101, F102 a AH11, můžeme si povšimnout, že zde PHA syntáza první třídy nebyla zjištěna. Jednak to může ukazovat na velkou rozmanitost tohoto druhu, ale je také možné, že se může jednat o jiný druh, jelikož byly izoláty taxonomicky zařazeny pouze na základě sekvenace *16SrRNA*.

Také byla testována přítomnost PHA syntázy IV. třídy. Pro námi použité mikroorganismy by měla být typická právě PHA syntáza IV. třídy, protože je charakteristická pro rod *Bacillus* a jemu příbuzné rody [50]. Avšak čtvrtá třída je rozmanitá, dělí se na více podskupin a je tudíž velmi heterogenní. PHA syntázu kategorie čtvrté třídy byla stanovena pro skupinu *B. megaterium* a *B.cereus*. Pozitivní kontrola *B. megaterium* má velikost ampliconu pro gen kódující PHA syntázu 1000 bp a pozitivní kontrola *B. cereus* má velikost ampliconu 500 bp. Ani jedna z těchto podskupin nebyla detekována u námi vybraných mikroorganismů.

Taktéž byla testována přítomnost PHA syntáz čtvrté třídy pro skupinu rodu *Aneurinibacillus* sp., kde výsledný amplicon má velikost 299 bp. Výsledná elektroforéza, která je zobrazena na obrázku 6, nám ukazuje, že v našem případě se potvrdila přítomnost PHA syntázy čtvrté třídy u izolátů AFn2, LK7 a F109, které jsou taxonomicky zařazeny k rodu *Aneurinibacillus*. Tyto tři mikroorganismy by měly být schopni produkce PHA.



Obrázek 6. Gelová elektroforéza *Aneurinibacillus* PCR stanovení PHA syntázy čtvrté třídy: PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola, Ž – žebříček, 1 – DSM 17951, 2 – DSM 5271, 3 – DSM 446, 4 – CCM 3527, 5 – izolát AH11, 6 – izolát LK7, 7 – CCM 2206, 8 – izolát F101, 9 – izolát F102, 10 – izolát A12, 11 – izolát F109, 12 – izolát AFn2

Výsledkem testování schopnosti produkce PHA na úrovni genotypu bylo zjištěno, že v případě testování mikroorganismů na přítomnost genu kódující PHA syntázu první kategorie byl zjištěn pozitivní výsledek pouze u izolátu A12, taxonomicky zařazen jako *Geobacillus stearothermophilus*, u kterého je přítomnost PHA syntázy již známa [50]. Ačkoli i izoláty F101, F102 a AH11 byly taxonomicky zařazeny jako zástupci rodu *Geobacillus*, syntáza u nich v našem případě nebyla potvrzena. V případě přítomnosti PHA syntázy čtvrté

kategorie pro *Aneurinibacillus* byla u všech 3 zkoumaných taxonomicky zařazených izolátů jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus* potvrzena přítomnost PHA syntázy, kde se taktéž přítomnost očekávala [60]. U zbylých mikroorganismů, kde ani v jednom případě nebyla PHA syntáza námi potvrzena, mohlo být způsobeno nepadnoucími primery pro konkrétní mikroorganismy.

#### 4.2. Screening produkce PHA u sbírkových mikroorganismů

Produkce polyhydroxyalkanoátů byla zkoumaná u sbírkových zástupců extremofilních mikroorganismů. Byly zvoleny 2 zdroje uhlíku, glycerol a glukóza, taktéž byla zkoumána produkce s prekurzorem kopolymeru 4HB a to 1,4-butandiolem. Kultivace probíhala pod dobu 72 hodin při podmínkách, které jsou podle sbírky pro mikroorganismy optimální.

Tabulka 15. Hodnoty biomasy a PHA daných mikroorganismů při určitých zdrojích uhlíku

	Zdroj uhlíku	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]
<i>Halobacillus halophilus</i> CCM 3527	glycerol	0,05 ± 0,07	-
	glukóza	0,06 ± 0,00	-
	bez zdroje	0,15 ± 0,00	-
<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> DSM 5271	glycerol	0,83 ± 0,14	0,004 ± 0,003
	glukóza	0,52 ± 0,07	-
	bez zdroje	0,15 ± 0,01	-
<i>Ureibacillus composti</i> DSM 17951	glycerol	0,30 ± 0,01	0,003 ± 0,000
	glukóza	0,22 ± 0,01	-
	bez zdroje	0,40 ± 0,11	-
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446	glycerol	0,18 ± 0,08	-
	glukóza	0,17 ± 0,06	-
	bez zdroje	0,10 ± 0,00	-
<i>Thermobacillus composti</i> DSM 18247	glycerol	0,40 ± 0,01	-
	glukóza	0,41 ± 0,04	0,002 ± 0,000
	bez zdroje	0,03 ± 0,00	-

Z tabulky 15 je patrné, že hodnoty biomasy byly ve všech případech poměrně nízké. Jediná detekovaná hodnota P3HB je patrná ve velice malých množstvích na glycerolu u mikroorganismu *Alkalibacillus haloalkaliphilus* DSM 5271 a *Ureibacillus composti* DSM 17951, na glukóze u mikroorganismu DSM 18247.

Tabulka 16. Hodnota biomasy a PHA s prekurzorem 1,4-butandiol

	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]
CCM 3527	0,11 ± 0,05	-
DSM 5271	0,42 ± 0,00	-
DSM 17951	0,33 ± 0,11	-
DSM 446	0,22 ± 0,10	-
DSM 18247	0,02 ± 0,00	-



Při produkci s prekurzorem 1,4-butandiol nebyla v našem případě detekována žádná produkce u těchto vybraných mikroorganismů. Taktéž hodnoty biomasy byly ve velice nízkých hodnotách, které jsou k vidění v tabulce 16.

Jedná se o velice zajímavé extremofilní mikroorganismy i například z hlediska kultivačních podmínek a mohly by se uplatit jako producenti enzymů nebo jiných metabolitů. V našem případě ovšem kultivační podmínky produkce nejspíše nebyly optimální a byla by potřeba následující optimalizace těchto podmínek. Avšak i tak není jisté, zda by v jiných podmínkách produkovaly PHA. Popřípadě mohlo dojít k tomu, že mikroorganismům nevyhovovalo uchování v kryozkumavkách, díky čemuž následně v médiích dostatečně nevyrostly a taktéž ani neprodukovaly.

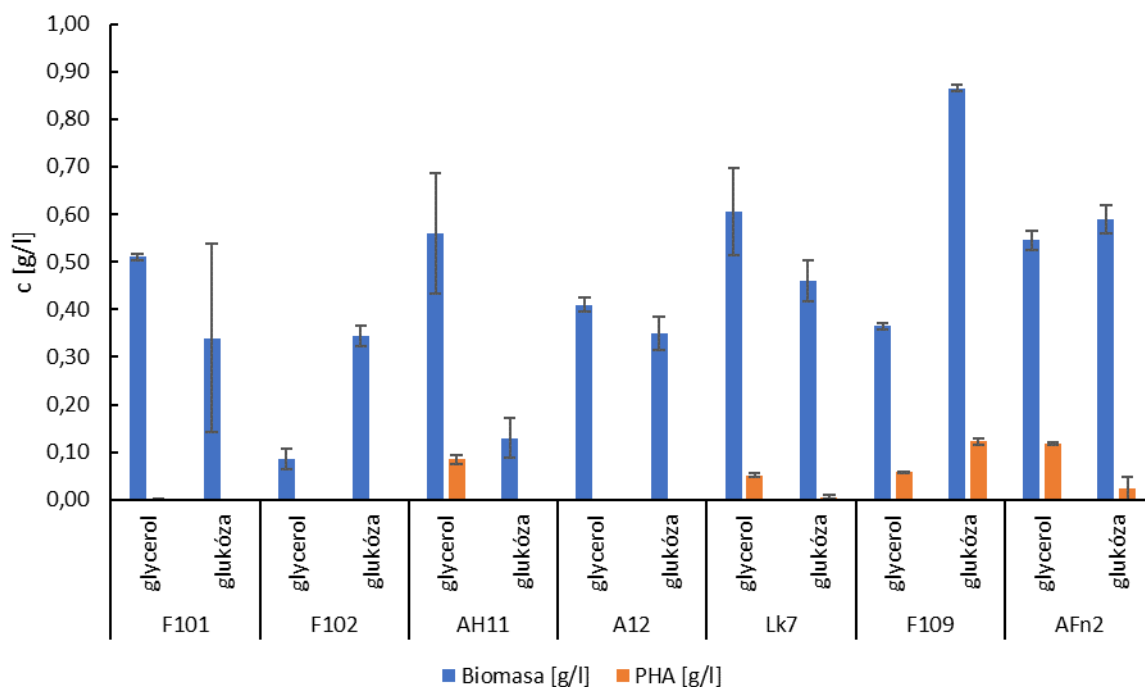
Dalším zkoumaným mikroorganismem byl *Bacillus licheniformis* CCM 2206. Produkce probíhala při 50 °C se zdroji uhlíku glukóze a glycerolu. Dále byla sledována produkce s prekurzory 4HB 1,4-butandiolem a  $\gamma$ -butyrolaktonem. Hmotnost biomasy při uhlíkových zdrojích byla velice podobná, ovšem u 1,4-butandiolu byla velice nízká. U prekurzoru  $\gamma$ -butyrolakton byla hmotnost biomasy nulová. Tento mikroorganismus v našem případě neprodukoval PHA ani na jedné z testovaných podmínek.

### **4.3. Screening produkce PHA u přírodních izolátů**

Studium produkce PHA u izolovaných mikroorganismů z přírodního zdroje probíhala při dvou teplotách 50 °C a 60 °C. Důvodem zkoumání růstu a produkce při 60 °C je především to, že by se tímto mohly výrazně snížit náklady na udržení sterilního prostředí, jelikož riziko kontaminace je mnohem nižší, a tím i snížit celkové produkční náklady na výrobu PHA. Probíhala produkce na dvou uhlíkových zdrojích glycerolu a glukóze, taktéž byla zkoumána produkce 4HB s prekurzory 1,4-butandiola a  $\gamma$ -butyrolakton a schopnost produkce kopolymerů 3HV s prekurzory: kyselina valerová, kyselina levulová a propionát sodný; s vybraným vhodným zdrojem uhlíku pro daný mikroorganismus.

#### **4.3.1. Výběr uhlíkového zdroje**

U všech izolovaných mikroorganismů z přírodního zdroje byla sledována schopnost využití uhlíkového zdroje v médiu k produkci polyhydroxyalkanoátů. Jako zdroje uhlíku byly použity glycerol a glukóza. Produkce probíhala při 50 °C a 60 °C a po 72 hodinách bylo stanoveno množství biomasy a koncentrace PHA.

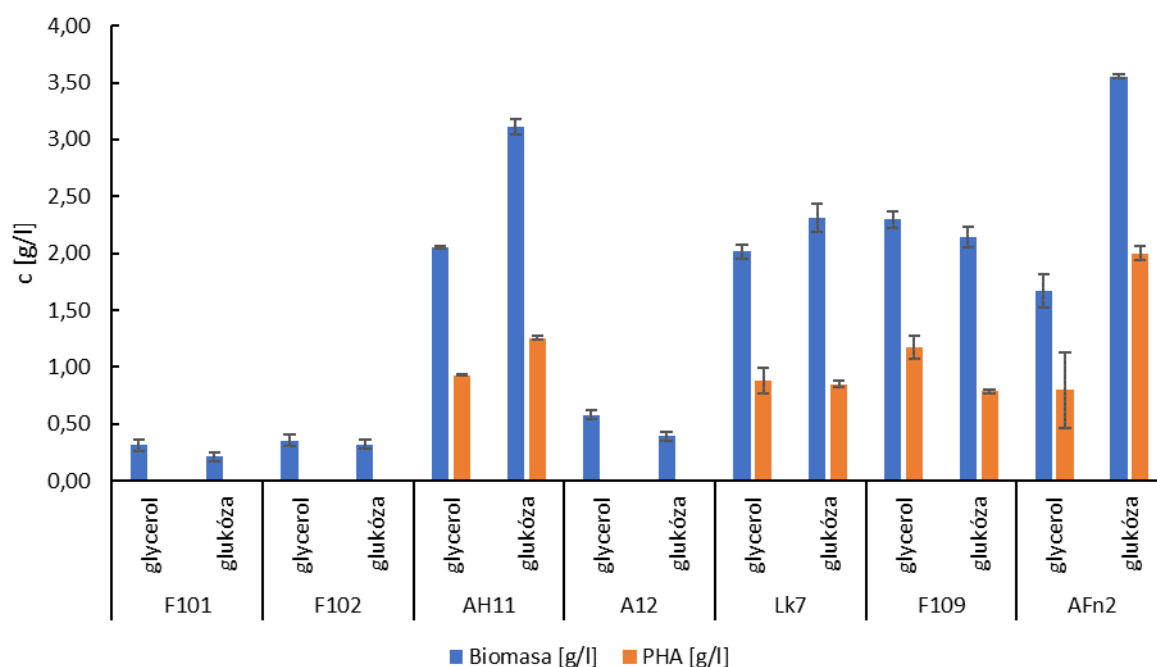


Obrázek 7. Graf koncentrace biomasy a PHA u jednotlivých mikroorganismů na určitém zdroji uhlíku při 60 °C

Z obrázku 7 lze vyčíst, že produkce PHA při 60 °C byla velice nízká. U mikroorganismů *Geobacillus thermodenitrificans* F101 a *Geobacillus thermodenitrificans* F102 lze vidět, že ačkoli jde o jeden druh, koncentrace biomasy se na každém zdroji uhlíku liší. U izolátu F101 byla vyšší koncentrace biomasy na glycerolu, zatímco u F102 byla vyšší koncentrace na glukóze. Avšak ani jeden z těchto mikroorganismů při 60 °C neprodukoval PHA. Taktéž u izolátu *Geobacillus stearothermophilus* A12 nebyla v našem případě zaznamenána žádná produkce PHA, i když byla u tohoto izolátu byla detekována PHA syntáza první třídy. Dále můžeme vidět, že mikroorganismy *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109 a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Lk7 vykazovaly produkci PHA. Ovšem můžeme si všimnout, že vlastnosti mikroorganismů jsou velice rozmanité, izolát Lk7 obsahoval vyšší koncentraci biomasy na glycerolu, kde byla koncentrace biomasy 0,60 g/l a produkce PHA dosahovala necelých 9 % hmotnosti suché biomasy, zatímco izolát F109 rostl lépe na glukóze, kdy koncentrace biomasy dosahovala 0,86 g/l a produkce PHA necelých 15 hm. %. Izolát AFn2 lépe rostl na glukóze, ale vyšší produkce byla zaznamenána glycerolu.

Obrázek 8 zaznamenává produkci PHA na různých zdrojích uhlíku při 50 °C. Z naměřených dat je patrné, že většina mikroorganismů rostla a produkovala daleko více při 50 °C než při 60 °C. Maximální hodnota biomasy při 50 °C dosahovala až 3,5 g/l u izolátu AFn2, zatímco při 60 °C dosahovala hodnota biomasy maximálně 0,9 g/l. U mikroorganismů F101, F102 a A12 se hodnota biomasy při obou teplotách příliš nelišila. Za to u bakterií označených jako AH11, Lk7, F109 a AFn2 lze konstatovat, že produkce i koncentrace biomasy

byla podstatně vyšší u 50 °C, takže by se dalo říci, že se jedná spíše o mírné termofily. U mikroorganismu AFn2 dosahovala produkce nejvyšší procentuální zastoupení PHA v biomase na glukóze, a to 56 % na suchou biomasu, což odpovídá koncentraci 1,99 g/l. U mikroorganismu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109 na glycerolu byl taktéž zaznamenán vysoký podíl PHA v biomase, a to 1,18 g/l. Je zajímavé, že preferovaný zdroj uhlíku se při rozdílných teplotách lišil. Při 60 °C byl u mikroorganismů AH11 a Lk7 větší růst na glukóze, zatím co při 50 °C mikroorganismy více rostly na glycerolu. Taktéž u mikroorganismu F109 můžeme vidět rozdílný růst na různých zdrojích uhlíku při různých teplotách. I procentuální podíl PHA se při teplotách podstatně lišil, jak již bylo zmíněno při 50 °C nejvyšší podíl PHA v biomase činil hm. 56 %, zatímco při 60 °C produkce PHA byla velice nízká a procentuální zastoupení v biomase nepřesahovalo 20 hm. %.



Obrázek 8. Graf koncentrace biomasy a PHA u jednotlivých mikroorganismů na určitém zdroji uhlíku při 50 °C

Většina mikroorganismů produkovala pouze 3HB, ovšem u izolátů Lk7, AH11, F109 a AFn2 byla zaznamenána i nepatrná produkce 3HV. Nejvyšší zastoupení 3HV bylo u izolátu AFn2, kde hodnota na glukóze při 60 °C dosahovala 18 mol. %, ovšem celková koncentrace PHA byla velice nízká. Při 50 °C bylo pozorováno lehce vyšší zastoupení 3HV na glycerolu. Mohlo by se tedy jednat o vhodné producenty kopolymeru P(3HV-co-3HB).

Při porovnání námi naměřených dat u izolátů AFn2, Lk7 a F109, taxonomicky zařazených jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, s výsledky studie, která je zaměřená na produkci PHA u *Aneurinibacillus* sp. H1 [60], si lze všimnout rozdílů produkce PHA mezi různými zdroji uhlíku. Ve studii jako nejlepším zdrojem uhlíku pro produkci PHA vycházel glycerol a druhým nejlepším zdrojem uhlíku glukóza [60]. Glycerol jako nejlepší zdroj uhlíku pro produkci PHA můžeme v našem případě potvrdit u izolátů Lk7 a F109, kde se koncentrace PHA pohybovala pouze 1 g/l. Toto nelze potvrdit u izolátu AFn2 kde nejlepším zdrojem uhlíku pro produkci PHA vycházela glukóza, kde koncentrace v biomase dosahovala téměř hodnoty 2,00 g/l, na rozdíl od glycerolu, u které byla koncentrace PHA v biomase pouze 0,8 g/l. Při 60 °C koncentrace PHA ve studii byla 0,24 g/l [60], ovšem v našem případě u všech tří izolátů Lk7, F109 a AFn2 byla produkce velice nízká a mnohdy nedosahovala ani hodnoty 0,1 g/l.

Ze studie zaměřené na produkci PHA pomocí *Geobacillus* sp. AY946034 vyplývá, že nejlepším zdrojem uhlíku pro produkci PHA při 60 °C je glukóza a zatím co produkce PHA na glycerolu nebyla zaznamenána [64]. Ovšem v našem případě u izolátu *Geobacillus* sp. AH11 byla zaznamenána produkce na glycerolu, ovšem žádná produkce nebyla zaznamenána na glukóze. Zatím co při 50 °C byla zaznamenána produkce na obou zdrojích uhlíku, kde se jako lepší zdroj uhlíku pro produkci PHA ukázala glukóza.

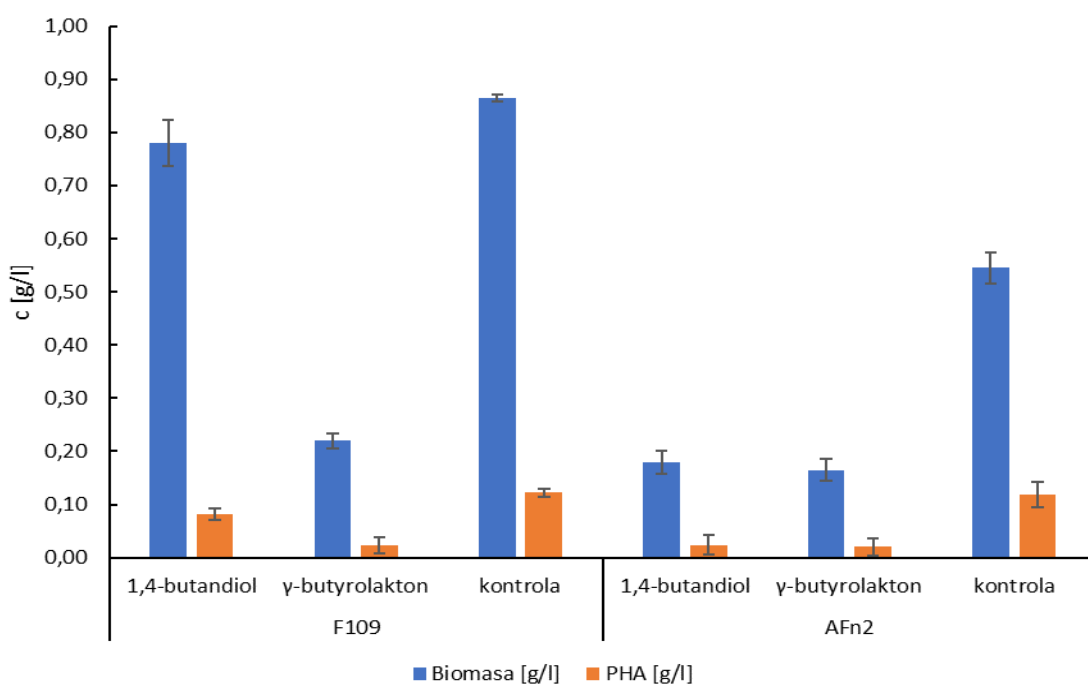
Z naměřených dat vyplývá, že každý mikroorganismus reaguje na různý zdroj uhlíku při rozdílné teplotě jinak. Všeobecně byla koncentrace biomasy u všech mikroorganismů při 60 °C nižší, avšak růst na jednotlivých zdrojích uhlíku byl při různých teplotách u některých mikroorganismech rozdílný. Produkce PHA byla taktéž teplotou velice ovlivněna, kdy při 60 °C byla produkce v porovnání s produkcí při 50 °C nižší, ovšem u některých mikroorganismů byla sledována změna zdroje uhlíku, na kterém více produkovaly, při různých teplotách.

#### **4.3.2. Testování produkce kopolymeru s 4HB**

Poly-4-hydroxybutyrát je svými vlastnostmi velice zajímavý, jde o termoplastický biopolymer, který je velice silný, avšak jeho mechanické vlastnosti jsou zajímavé především díky tomu, že se může až 10x natáhnout, než dojde k porušení [61]. Taktéž díky své dobré biokompatibilitě je velice zajímavým biopolymerem pro tělní implantáty [61]. Kopolymery s 4HB jsou taktéž velice zajímavé svými vlastnostmi. Procentuální zastoupení 4HB v kopolymeru ovlivňuje především jeho elastické vlastnosti, kde při vyšším zastoupení 4HB je kopolymer více elastický, a naopak při nízkém zastoupení 4HB je velice krystalický [43].

Produkce 4HB byla testována u všech izolátů a byly využity prekurzory 1,4-butandiol a  $\gamma$ -butyrolakton jako jediný zdroj uhlíku. Produkce probíhala při teplotách 50 °C a 60 °C.

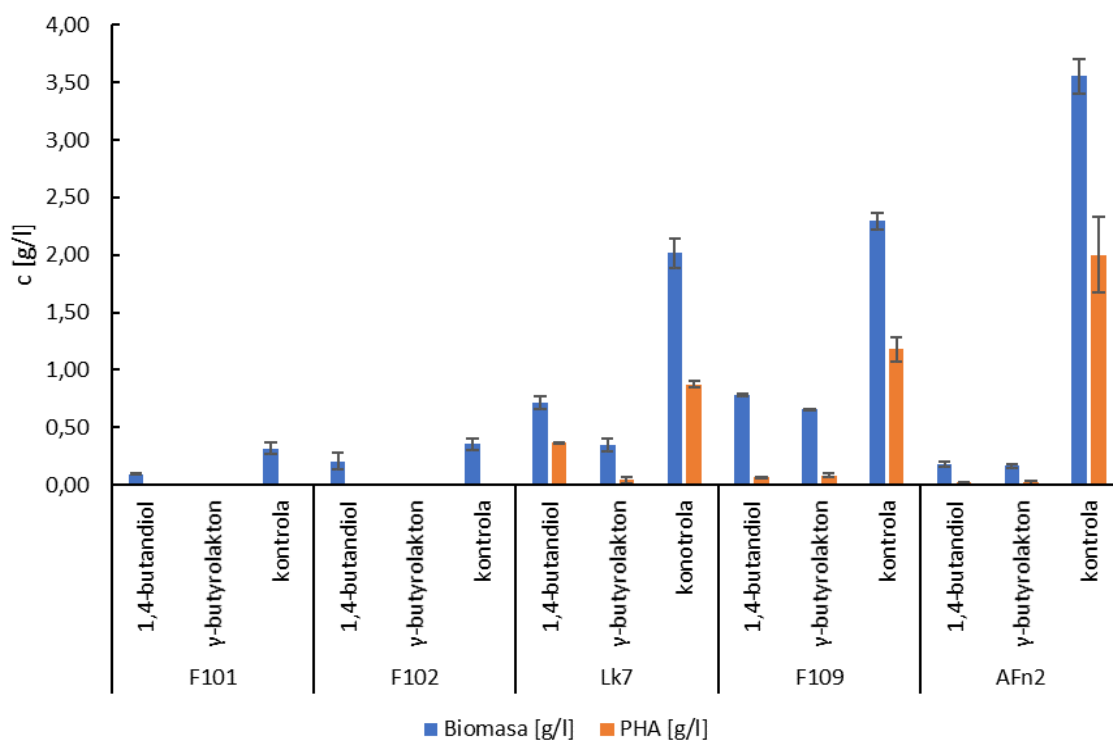
Při 60 °C byla zaznamenána produkce PHA s těmito prekurzory pouze u mikroorganismů *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2 a F109. U zbylých mikroorganismů byly tyto podmínky nevyhovující a nebylo tak možné ani stanovení biomasy. Na obrázku 9 u mikroorganismu F109 můžeme sledovat, že produkce u 1,4-butandiolu byla podstatně vyšší než u  $\gamma$ -butyrolakton, a dokonce dosahovala téměř stejných hodnot jako při použití glycerolu jako zdroj uhlíku. Celkově byla koncentrace biomasy u izolátu F109 vyšší než u izolátu AFn2. Ačkoli obsah biomasy byl na 1,4-butandiolu vyšší, ani u jednoho z mikroorganismů nebyla zaznamenána produkce 4HB. S prekurzorem  $\gamma$ -butyrolakton byla produkce PHA velice nízká, avšak u obou mikroorganismů byla zaznamenána produkce 4HB, avšak velmi zanedbatelná a nedosahovala ani 5 mol. %.



Obrázek 9. Graf koncentrace biomasy a PHA při 60 °C

Výsledky produkce PHA při 50 °C za využití prekurzorů monomeru 4HB je zobrazena na obrázku 10. U izolátů AH11 a A12 nebyla opět zaznamenána žádná koncentrace biomasy, nastavené kultivační podmínky tedy nejspíše nejsou vhodné pro tyto bakterie. Izoláty F101 a F102 byly schopny využít pouze 1,4-butandiol, avšak tento prekurzor nebyly schopny využít pro tvorbu PHA. Izoláty Lk7, F109 a AFn2 byly schopny produkovat PHA i kopolymer a lze zde opět sledovat rozdíly produkce PHA u jednoho rodu mikroorganismu. U izolátů AFn2 a F109 byla zaznamenána velice nízká produkce PHA. Pro tvorbu 4HB u těchto dvou izolátů byl lepším prekurzorem  $\gamma$ -butyrolakton, ovšem koncentrace PHA se pohybovala pouze okolo

hodnoty 0,06 g/l, ale molární podíl 4HB zde dosahoval hodnot až 22 mol. % V případě prekurzoru 1,4-butandiol se koncentrace PHA pohybovala pouze okolo hodnoty 0,03 g/l a molární zastoupení 4HB okolo 12 mol. %. U izolátu Lk7 byl pro produkci PHA lepší prekurzor 1,4-butandiol, kde ačkoli koncentrace PHA byla 0,37 g/l, molární zastoupení 4HB bylo pouze do 5,5 mol. %.



Obrázek 10. Graf koncentrace biomasy a PHA při 50 °C

Tabulka 18 zobrazuje zastoupení jednotlivých monomerů při produkci PHA za využití prekurzorů pro 4HB. Ačkoli se jedná o druhově stejné mikroorganismy, všechny tři jsou taxonomicky zařazeny jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, lze mezi nimi pozorovat značné rozdíly. U mikroorganismu Lk7 byly hodnoty 4HB nízké, zastoupení 4HB při použití 1,4-butandiolu se pohybuje okolo 5 mol. %. U mikroorganismů F109 a AFn2 byly hodnoty podstatně vyšší. U izolátu F109 dokonce zastoupení monomeru 4HB při použití  $\gamma$ -butyrolaktonu dosahuje téměř 23 mol. %. Izoláty F109 a AFn2 více produkovaly 4HB na  $\gamma$ -butyrolaktonu, zatímco u izolátu Lk7 bylo vyšší zastoupení 4HB bylo použít 1,4-butandiolu.

Tabulka 17. Procentuální zastoupení monomerů u mikroorganismů a určitých prekurzorech

		PHA [g/l]	3HB [mol.%]	4HB [mol.%]
<b>Lk7</b>	1,4-butandiol	0,367 ± 0,007	93,5	5,5
	γ-butyrolakton	0,041 ± 0,026	95,0	1,8
<b>F109</b>	1,4-butandiol	0,069 ± 0,003	82,8	12,7
	γ-butyrolakton	0,084 ± 0,021	75,4	22,5
<b>AFn2</b>	1,4-butandiol	0,024 ± 0,001	84,7	13,0
	γ-butyrolakton	0,020 ± 0,016	83,9	16,1

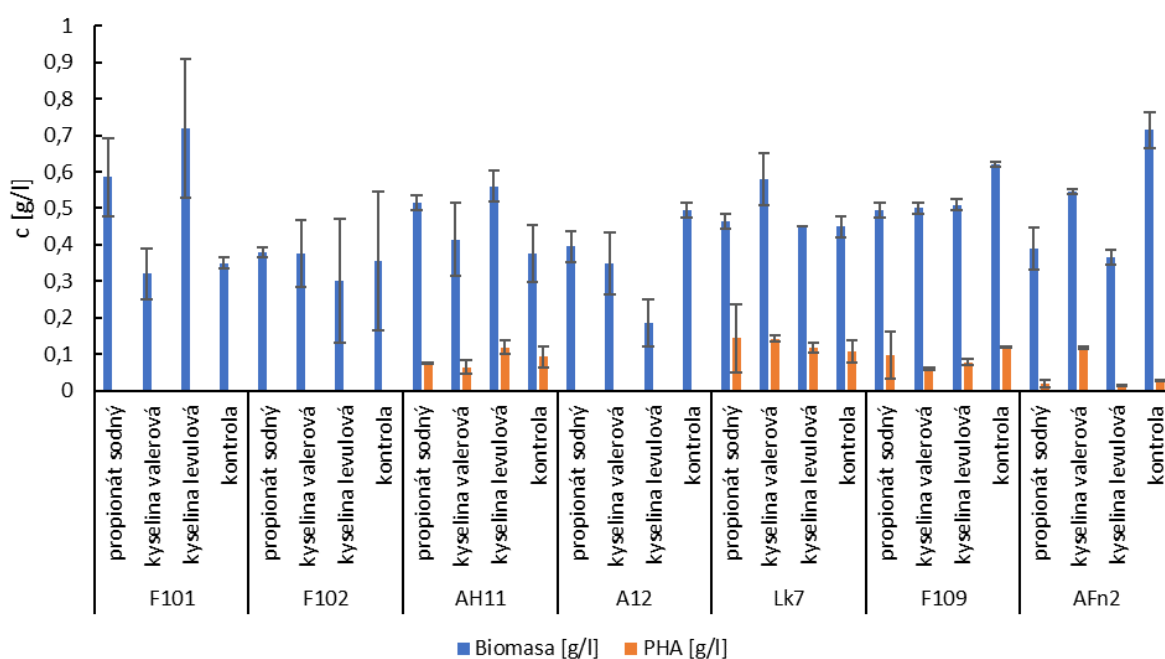
Izoláty F101, F102, A12 a AH11 nevykazovaly produkci PHA ani při jedné teplotě, lze tedy říci, že tyto podmínky nebyly pro tyto mikroorganismy vhodné. V případě izolátu Lk7 byla zaznamenána produkce PHA pouze při 50 °C, zatímco u izolátů F109 a AFn2 byla produkce PHA zaznamenána při obou teplotách. Ze studie produkce PHA pomocí bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 [60] byla stejně jako v našem případě u izolátu Lk7 lepší produkce 4HB zaznamenána u 1,4-butandiolu. Rozdíl nastává u izolátů AFn2 a F109, kde byla zaznamenána vyšší produkce 4HB při použití γ-butyrolaktonu. Na rozdíl od bakterie uvedené ve studii, kde produkce dosahovala zastoupení až 79 mol. % monomeru 4HB v kopolymeru, ve všech našich případech bylo zastoupení monomeru 4HB v kopolymeru velice nízké a dosahoval nejvyšší zastoupení maximálně 22 mol. % o koncentraci 0,02 g/l.

#### 4.3.3. Testování produkce kopolymerů 3HV

Polyhydroxyalkanoáty mají velikou rozmanitost vlastností, která je dána velkou možností kopolymerů. Na rozdíl od čistého poly-3-hydroxybutyrátu jsou kopolymery poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) více biodegradabilní, rychlost rozkladu je o poznání rychlejší, ovšem velice záleží na poměrech jednotlivých polymerů [62]. Poměr jednotlivých polymerů ovlivňuje i jeho mechanické vlastnosti, kdy na termostabilitě se převážně podílí právě 3HV [62]. Kopolymery s 3HV jsou taktéž méně krystalické a více flexibilní [43]. 3HV je tedy velice zajímavým objektem pro studium produkce u extremofilních bakterií, převážně díky těmto vlastnostem.

Jako prekurzory 3HV byly použity propionát sodný, kyselina valerová a kyselina levulová. Byla taktéž provedena kontrola bez přídavku prekurzoru. Prekurzory byly přidány po 24 hodinách, protože mohou mít inhibiční účinek na růst daných mikroorganismů. Pokus byl opět proveden při dvou kultivačních teplotách, a to při 50 °C a 60 °C. Pro mikroorganismy F101, F102, A12, AH11 a F109 byl vybrán zdroj uhlíku glycerol, pro AFn2 byla vybrána jako zdroj uhlíku glukóza.

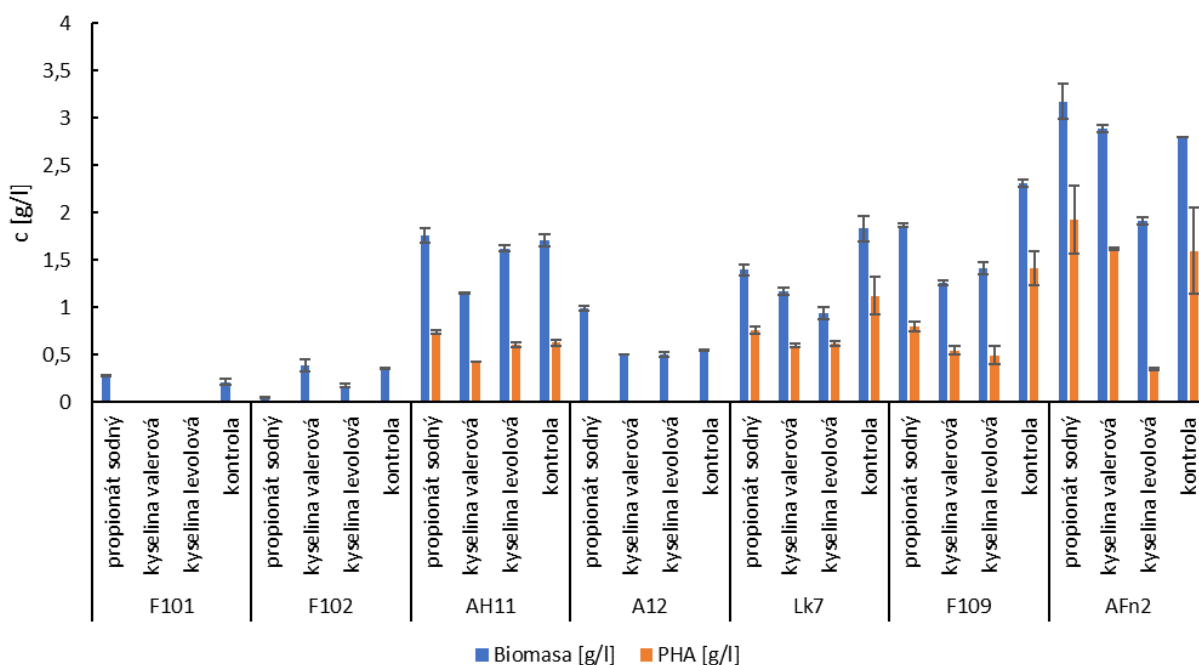
Screening produkce PHA při 60 °C za využití prekurzorů 3HV u mikroorganismů můžeme pozorovat na obrázku 10. I přestože byly izoláty *Geobacillus thermodenitrificans* F101, F102 a *Geobacillus stearothermophilus* A12 schopni růstu i v přítomnosti prekurzorů, nebyla u nich detekována žádná produkce PHA. U izolátu *Geobacillus* sp. AH11 si můžeme povšimnout, že koncentrace biomasy byla vyšší s prekurzory než u samotné kontroly. Produkce PHA byla vyšší než u kontroly pouze s prekurzorem kyselinou levulovou, kde koncentrace byla 1,12 g/l a zastoupení PHA dosahovala hodnoty 21 % hmotnosti suché biomasy. U izolátu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Lk7 byly zaznamenány lehce vyšší hodnoty biomasy i PHA s prekurzory propionátem sodným a kyselinou valerovou než u samotné kontroly. U izolátu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109 převažovala koncentrace biomasy u kontroly. Koncentrace biomasy u prekurzorů se pohybovala okolo 0,50 g/l, zatím co u kontroly byla koncentrace biomasy 0,62 g/l. V případě PHA byla koncentrace téměř stejná u kontroly a prekurzoru propionátu sodného, kde hodnota dosahovala 19,7 % hmotnosti suché biomasy. U zbylých prekurzorů zastoupení PHA v suché biomase nepřesáhlo 15 hm. %. Taktéž u izolátu AFn2 byla zaznamenána vyšší koncentrace biomasy u kontroly než u prekurzorů. V případě produkce PHA byla zaznamenána nejvyšší koncentrace u kyseliny valerové, která činila 0,12 g/l a zastoupení 21 % hmotnosti suché biomasy, u kontroly a zbylých prekurzorů nepřesáhla hodnota koncentrace PHA 0,03 g/l. Molární zastoupení 3HV nebylo u žádného ze zkoumaných mikroorganismů příliš vysoké. Zastoupení 3HV u izolátů AH11, Lk7 a F109 nepřekročilo v žádném vzorku 8 mol. %. Pouze u mikroorganismu AFn2 byla zaznamenána s prekurzorem kyselinou valerovou zastoupení 3HV 12,6 mol. % o koncentraci 0,015 g/l.



Obrázek 11. Graf koncentrace biomasy a PHA při 60 °C s prekurzory: propionát sodný, kyselina valerová a kyselina levulová



Izoláty F101, F102 a A12 nebyly schopny produkovat PHA při 50 °C (Obrázek 12), hodnota biomasy byla taktéž velice nízká. U bakterie *Geobacillus* sp. AH11 byla zaznamenána lehce vyšší koncentrace biomasy u propionátu sodného než u kontroly. Koncentrace biomasy u propionátu sodného činila 1,75 g/l, zatím co u kontroly, kde byl zdroj uhlíku glycerol, byla koncentrace 1,70 g/l. V případě PHA byla taktéž nejvyšší koncentrace zaznamenána u propionátu sodného s koncentrací PHA 0,74 g/l a zastoupením 42 % hmotnosti suché biomasy. U izolátu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Lk7 hodnoty biomasy i PHA byly nejvyšší u kontroly, ovšem nejvyšší zastoupení PHA bylo zaznamenáno u prekurzoru kyseliny levulové, kde zastoupení PHA dosahovalo 66 % hmotnosti suché biomasy. U kontroly, kde zdrojem uhlíku byl glycerol, koncentrace biomasy dosahovala 1,83 g/l a zastoupení PHA 61 % hmotnosti suché biomasy, což odpovídá koncentraci 1,12 g/l. Taktéž izolát F109 dosahoval v přítomnosti glycerolu u kontroly vyšší koncentrace biomasy a PHA než a prekurzorů. Koncentrace biomasy u kontroly zde dosahovala hodnoty 2,3 g/l s koncentrací PHA 1,41 g/l a produkce dosahovala 61 % hmotnosti suché biomasy. V případě prekurzorů zde byl nejvhodnějším prekurzorem propionát sodný, který dosahoval koncentrace PHA 0,8 g/l. U izolátu AFn2 byla zaznamenána vysoká produkce PHA na propionátu sodném a kyselině valerové, kde dokonce koncentrace biomasy i PHA převyšovaly produkci pouze na glukóze jako jediném zdroji uhlíku. U propionátu sodného byla zaznamenána vysoká koncentrace PHA, a to 1,93 g/l, u kyseliny valerové byla koncentrace PHA 1,62 g/l a na kontrole 1,59 g/l.



Obrázek 12. Graf koncentrace biomasy a PHA při 50 °C s prekurzory: propionát sodný, kyselina levulová a kyselina valerová

Zastoupení jednotlivých monomerů v kopolymeru při kultivaci při 50 °C zobrazuje tabulka 20. U izolátu *Geobacillus* sp. AH11 bylo zaznamenáno nejvyšší molární zastoupení 3HV s prekurzorem propionátem sodným, které dosahovalo hodnoty 39 mol. %, ovšem celková koncentrace PHA zde byla pouze 0,74 g/l. Vysoké zastoupení 3HV 29,8 mol. % bylo zaznamenáno u izolátu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Lk7, kde koncentrace PHA dosahovala hodnoty 1,4 g/l. U izolátu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109 bylo zaznamenáno nejvyšší zastoupení 3HV u propionátu sodného, kde koncentrace PHA činila téměř 0,8 g/l a zastoupení monomeru 3HV zde bylo 21 mol. %. U AFn2 byl zaznamenán nejvyšší podíl 3HV s kyselinou valerovou, kde byl podíl 3HV 30,8 mol. % a celková koncentrace PHA dosahovala 1,6 g/l. Můžeme si povšimnout, že ačkoli se u izolátů Lk7, F109 a AFn2 jedná o stejný druh, nejvyšší koncentrace 3HV byla u AFn2 zaznamenána u kyseliny valerové, zatím co u F109 a Lk7 u propionátu sodného. Je tedy možné, že se v případě AFn2 by se jednalo o jiný kmen, jelikož jde pouze o taxonomické zařazení na základě sekvenace *16SrRNA*, pro 100 % určení o jaký mikroorganismus se jedná by bylo zapotřebí více testů. Ovšem z podobných výsledků u izolátů F109 a Lk7 můžeme říci, že se bude jednat o příbuzné druhy.

Tabulka 18. Procentuální zastoupení 3HB a 3HV u jednotlivých mikroorganismů a prekurzorů

		PHA [g/l]	3HB [mol.%]	3HV [mol.%]
<b>AH11</b>	propionát sodný	0,742 ± 0,015	61,0	39,0
	kyselina valerová	0,424 ± 0,000	78,2	21,8
	kyselina levulová	0,609 ± 0,024	95,4	4,6
	kontrola	0,627 ± 0,028	94,2	5,8
<b>Lk7</b>	propionát sodný	0,761 ± 0,037	70,2	29,8
	kyselina valerová	0,601 ± 0,021	94,4	5,6
	kyselina levulová	0,624 ± 0,028	64,9	5,9
	kontrola	1,121 ± 0,119	93,7	5,7
<b>F109</b>	propionát sodný	0,799 ± 0,055	78,9	21,1
	kyselina valerová	0,547 ± 0,041	96,4	3,6
	kyselina levulová	0,495 ± 0,098	97,2	2,8
	kontrola	1,411 ± 0,117	96,6	3,4
<b>AFn2</b>	propionát sodný	1,930 ± 0,358	84,8	15,2
	kyselina valerová	1,618 ± 0,014	69,2	30,8
	kyselina levulová	0,354 ± 0,014	97,0	3,0
	kontrola	1,597 ± 0,371	98,2	1,8

Při porovnání teplot můžeme říci, že vhodnější teplotou pro produkci kopolymeru 3HV je v našem případě u všech zkoumaných izolátů 50 °C. Nejvyšší molární zastoupení 3HV byla zaznamenána při 50 °C s kyselinou valerovou 0,50 g/l u izolátu AFn2, který jako jediný měl zdroj uhlíku glukózu. Ze studie zaměřující se na produkci PHA u *Aneurinibacillus* sp. H1,

vychází, že nejvhodnějším prekurzorem pro tvorbu 3HV byla kyselina valerová [60]. Tato skutečnost byla potvrzena i v našem případě u izolátu AFn2. Ovšem v případě izolátů Lk7 a F109, ačkoli se jedná o stejný druh, se jako nejvhodnějším prekurzorem ukázal propionát sodný, zatím co produkce s prekurzorem kyselinou valerovou v těchto dvou případech nevykazovala příliš velkou tvorbu kopolymeru 3HV.

## 5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřovala na studium produkce PHA pomocí extrémofilních zástupců rodu *Bacillus* a příbuzných rodů. Byly využity jak sbírkové mikroorganismy *Ureibacillus composti* DSM 171951, *Alkalibacillus haloalkaliphilus* DSM 5271, *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446, *Halobacillus halophilus* CCM 3527, *Thermobacillus composti* DSM 18247 a *Bacillus licheniformis* CCM 2206, tak i izolované mikroorganismy z přírodních zdrojů *Aneurinibacillus thermoaerophilus* LK7, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2, *Geobacillus thermodenitrificans* F101, *Geobacillus thermodenitrificans* F102, *Geobacillus stearothermophilus* A12 a *Geobacillus* sp. AH11.

V experimentální části bylo provedeno testování schopnosti produkce PHA na úrovni genotypu, kde byla pomocí metody PCR zkoumána přítomnost genu *16SrRNA* a PHA syntáz první a čtvrté třídy pro různé bakterie. Přítomnost PHA syntázy první třídy byla detekována pouze u izolátu *Geobacillus stearothermophilus* A12. PHA syntázy čtvrté třídy pro zástupce *Aneurinibacillus* byla potvrzena u všech našich zástupců tohoto rodu (*Aneurinibacillus thermoaerophilus* Lk7, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* F109 a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2), ovšem PHA syntáza čtvrté třídy pro zástupce rodu *Bacillus* nebyla zjištěna u žádného námi zkoumaného mikroorganismu.

Taktéž byla sledována produkce PHA na zdrojích uhlíku, kterými byly glycerol a glukóza, při 50 °C a 60 °C. U izolátů *Geobacillus thermodenitrificans* F101, *Geobacillus thermodenitrificans* F102 a *Geobacillus stearothermophilus* A12 nebyla v našem případě prokázána produkce PHA na žádném zdroji uhlíku ani při jedné teplotě. U izolátů AH11, F109 a Lk7 byl stanoven jako nejvhodnější zdroj uhlíku glycerol, u bakterie AFn2 byla jako nejvhodnější zdroj uhlíku stanovena glukóza. Produkce PHA dosahovala vyšších koncentrací při kultivaci při teplotě 50 °C. Dále byla zkoumána produkce kopolymerů 4HB s prekurzory 1,4-butandiolem a  $\gamma$ -butyrolaktonem při 50 °C a 60 °C. Při 60 °C byla produkce PHA zaznamenána pouze u izolátů AFn2 a Lk7, kde v obou dvou případech byla produkce 4HB velice nízká a pouze na prekurzoru  $\gamma$ -butyrolaktonu. V tomto případě se opět jako vhodnější teplota pro produkci PHA potvrdilo 50 °C. Produkce PHA byla prokázána pouze u izolátů F109, Lk7 a AFn2. U izolátu Lk7 byl vhodnějším prekurzorem pro produkci 4HB 1,4-butandiol, zatím co u izolátů F109 a AFn2 byla zaznamenána vyšší produkce 4HB s prekurzorem  $\gamma$ -butyrolakton.

Při testování schopnosti mikroorganismů tvořit kopolymer P(3HB-co-3HV) se opět jako nejvhodnější teplota prokázalo 50 °C. Produkce kopolymeru byla opět prokázána pouze

u izolatů AH11, Lk7, AFn2 a F109. Jako vhodný prekurzor pro tvorbu 3HV se u AFn2 ukázala kyselina valerová, u izolatů AH11, Lk7 a F109 byl vhodným prekurzorem propionát sodný. Celkově jako nejlepším producentem 3HV se ukázal izolat taxonomicky zařazený jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus* AFn2, který vykazoval vysoké hodnoty PHA i zastoupení monomeru 3HV, kde zastoupení s prekurzorem kyselinou valerovou dosahovalo až hodnoty 30 mol. % a koncentrace PHA zde dosahovala hodnoty 1,61 g/l.

## 6. ZDROJE

- [1] ROTHSCILD, Lynn J. a Rocco L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 2001, **409**(6823), 1092-1101. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35059215
- [2] Satyanarayana, T. & Raghukumar, C & Shivaji, Sisinthy. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current science*. 89. 78-90.
- [3] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856-870. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [4] ZHU, Daochen, Wasiu Adewale ADEBISI, Fiaz AHMAD, Sivasamy SETHUPATHY, Blessing DANSO a Jianzhong SUN. Recent Development of Extremophilic Bacteria and Their Application in Biorefinery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, **8**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00483
- [5] BERGQUIST, P.L., D.R. LOV, J.E. CROFT, M.B. STREIFF, R.M. DANIEL a W.H. MORGAN. Genetics and Potential Biotechnological Applications of Thermophilic and Extremely Thermophilic Microorganisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. 1987, **5**(1), 199-244. ISSN 0264-8725. Dostupné z: doi:10.1080/02648725.1987.10647838
- [6] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **50**, 94-100. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- [7] KULKARNI, Snehal, Kusum DHAKAR a Amaraja JOSHI. Alkaliphiles. *Microbial Diversity in the Genomic Era* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 239-263. ISBN 9780128148495. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814849-5.00015-0
- [8] SHARMA, Archana, Deepak PARASHAR a Tulasi SATYANARAYANA. Acidophilic Microbes: Biology and Applications. RAMPELOTTO, Pabulo H, ed. *Biotechnology of Extremophiles* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-04-28, s. 215-241. Grand Challenges in Biology and Biotechnology. ISBN 978-3-319-13520-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-13521-2\_7
- [9] MARGESIN, Rosa a Franz SCHINNER. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* [online]. 2001, **5**(2), 73-83. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s007920100184
- [10] ZEIKUS, J.G. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1979, **1**(4), 243-252 [cit. 2021-7-18]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/0141-0229(79)90043-7
- [11] OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. **28**(1), 56-63. ISSN 13675435. Dostupné z: doi:10.1038/sj/jim/7000176
- [12] LIU, Changli, Dennis Kingsley BAFFOE, Yuanlong ZHAN, Mengying ZHANG, Yahui LI a Guocai ZHANG. Halophile, an essential platform for bioproduction. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2019, **166**. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2019.105704

- [13] REINA-BUENO, Mercedes, Montserrat ARGANDOÑA, Manuel SALVADOR, et al. Role of Trehalose in Salinity and Temperature Tolerance in the Model Halophilic Bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(3). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0033587
- [14] THOMAS, Tatiana, Kumar SUDESH, Alexis BAZIRE, Anne ELAIN, Hua Tiang TAN, Hui LIM a Stéphane BRUZAUD. PHA Production and PHA Synthases of the Halophilic Bacterium *Halomonas* sp. SF2003. *Bioengineering* [online]. 2020, **7**(1). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering7010029
- [15] SHARMA, Archana, Yutaka KAWARABAYASI a T. SATYANARAYANA. Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles* [online]. 2012, **16**(1), 1-19. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-011-0402-3
- [16] GRANT, 3. Alkaliphiles: Ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1990, **75**(2-3), 255-269. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1097(90)90536-Y
- [17] SARETHY, Indira P., Yashi SAXENA, Aditi KAPOOR, Manisha SHARMA, Sanjeev K. SHARMA, Vandana GUPTA a Sanjay GUPTA. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2011, **38**(7), 769-790. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-011-0968-x
- [18] WHITMAN, William B, Fred RAINEY, Peter KÄMPFER, Martha TRUJILLO, Jonsik CHUN, Paul DEVOS, Brian HEDLUND a Svetlana DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608
- [19] Turnbull PCB. *Bacillus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 15. PMID: 21413260.
- [20] WHITMAN, William B, Fred RAINEY, Peter KÄMPFER, Martha TRUJILLO, Jonsik CHUN, Paul DEVOS, Brian HEDLUND a Svetlana DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608
- [21] WATANABE, Keiko, Norio NAGAO, Shuich YAMAMOTO, Tatsuki TODA a Norio KUROSAWA. *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2007, **57**(7), 1473-1477. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.64672-0
- [22] JEON, Che Ok, Jee-Min LIM, Jung-Min LEE, Li-Hua XU, Cheng-Lin JIANG a Chang-Jin KIM. Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2005, **55**(5), 1891-1896. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.63456-0
- [23] WHITMAN, William B, Fred RAINEY, Peter KÄMPFER, Martha TRUJILLO, Jonsik CHUN, Paul DEVOS, Brian HEDLUND a Svetlana DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608

- [24] WHITMAN, William B, Fred RAINEY, Peter KÄMPFER, Martha TRUJILLO, Jonsik CHUN, Paul DEVOS, Brian HEDLUND a Svetlana DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608
- [25] ROESSLER, Markus a Volker MÜLLER. Quantitative and Physiological Analyses of Chloride Dependence of Growth of *Halobacillus halophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1998, **64**(10), 3813-3817. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.64.10.3813-3817.1998
- [26] SMIT, Yvette, Michelle CAMERON, Pierre VENTER a R. Corli WITTHUHN. Alicyclobacillus spoilage and isolation – A review. *Food Microbiology* [online]. 2011, **28**(3), 331-349. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2010.11.008
- [27] WHITMAN, William B, Fred RAINEY, Peter KÄMPFER, Martha TRUJILLO, Jonsik CHUN, Paul DEVOS, Brian HEDLUND a Svetlana DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608
- [28] WEON, Hang-Yeon, Seon-Young LEE, Byung-Yong KIM, Hyung-Jun NOH, Peter SCHUMANN, Jong-Shik KIM a Soon-Wo KWON. *Ureibacillus composti* sp. nov. and *Ureibacillus thermophilus* sp. nov., isolated from livestock-manure composts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2007, **57**(12), 2908-2911. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.65232-0
- [29] REY, Michael W, Preethi RAMAIYA, Beth A NELSON, et al. *Genome Biology* [online]. **5**(10). ISSN 14656906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2004-5-10-r77
- [30] HUSSEIN, Ali H., Beata K. LISOWSKA a David J. LEAK. *The Genus Geobacillus and Their Biotechnological Potential* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 1-48. Advances in Applied Microbiology. ISBN 9780128022498. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aams.2015.03.001
- [31] GARG, N., W. TANG, Y. GOTO, S. K. NAIR a W. A. VAN DER DONK. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2012, **109**(14), 5241-5246. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1116815109
- [32] KOTZEKIDOU, P. BACILLUS | *Geobacillus stearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus*). *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 129-134. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00020-3
- [33] HASHMI, Isha, Saskia BINDSCHEDLER a Pilar JUNIER. Firmicutes. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 363-396. ISBN 9780128234143. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00018-6
- [34] MASOMIAN, Malihe, Raja Noor Zaliha Raja Abd RAHMAN, Abu Bakar SALLEH a Mahiran BASRI. A unique thermostable and organic solvent tolerant lipase from newly isolated *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ: physical factor studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **26**(9), 1693-1701. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-010-0347-1
- [35] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45-56. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001



- [36] ZHENG, Yang, Jin-Chun CHEN, Yi-Ming MA a Guo-Qiang CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering* [online]. 2020, **58**, 82-93. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.07.004
- [37] JAVAID, Hadiqa, Ali NAWAZ, Naveeda RIAZ, et al. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by the Valorization of Biomass and Synthetic Waste. *Molecules* [online]. 2020, **25**(23). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25235539
- [38] GIUBILINI, Alberto, Federica BONDIOLI, Massimo MESSORI, Gustav NYSTRÖM a Gilberto SIQUEIRA. Advantages of Additive Manufacturing for Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Bioengineering* [online]. 2021, **8**(2). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering8020029
- [39] ROY, Ipsita a P. M., Visakh P. M., VISAKH. Polyhydroxyalkanoate (PHA) based blends, composites and nanocomposites. Cambridge: Royal Society of Chemistry, [2015]. RSC green chemistry series, 30. ISBN 978-1-78262-231-4.
- [40] MOZEJKO-CIESIELSKA, Justyna, Karolina SZACHERSKA a Paulina MARCINIAK. Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2019, **27**(6), 1151-1166. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-019-01422-1
- [41] KOLLER, Martin, Anna SALERNO, Alexander MUHR, Angelika REITERER, Emo CHIELLINI, Sergio CASELLA, Predrag HORVAT a Gerhart BRAUNEGG. Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters. SALEH, Hosam El-Din, ed. *Polyester* [online]. InTech, 2012, 2012-09-26. ISBN 978-953-51-0770-5. Dostupné z: doi:10.5772/48737
- [42] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [43] BAYARI, Sevgi a Feride SEVERCAN. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *Journal of Molecular Structure* [online]. 2005, **744-747**, 529-534. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2004.12.029
- [44] KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* [online]. 2011, **5**(7), 620-634. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2011.60
- [45] SHRIVASTAV, Anupama, Hae-Yeong KIM a Young-Rok KIM. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1-12. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/581684
- [46] LIU, Qian, Ge LUO, Xin Rong ZHOU a Guo-Qiang CHEN. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering* [online]. 2011, **13**(1), 11-17. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2010.10.004

- [47] REHM, Bernd H. A., Timothy A. MITSKY a Alexander STEINBÜCHEL. Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by Pseudomonads: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, **67**(7), 3102-3109. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.7.3102-3109.2001
- [48] REHM, Bernd H.A., Niels KRÜGER a Alexander STEINBÜCHEL. A New Metabolic Link between Fatty Acid de Novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1998, **273**(37), 24044-24051. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.37.24044
- [49] JIA, Kaimin, Ruikai CAO, Duy H. HUA a Ping LI. Study of Class I and Class III Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases with Substrates Containing a Modified Side Chain. *Biomacromolecules* [online]. 2016, **17**(4), 1477-1485. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.6b00082
- [50] YANG, Chao, Wei ZHANG, Ruihua LIU, Chi ZHANG, Ting GONG, Qiang LI, Shufang WANG a Cunjiang SONG. Analysis of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene and PHA-producing bacteria in activated sludge that produces PHA containing 3-hydroxydodecanoate. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2013, **346**(1), 56-64. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/1574-6968.12201
- [51] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1996, **49**(1), 1-14. ISSN 00063592. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:11::AID-BIT13.0.CO;2-P
- [52] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. 2005, **40**(2), 607-619. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- [53] MASOOD, Farha, Tariq YASIN a Abdul HAMEED. Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2014, **35**(4), 514-521. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2014.913548
- [55] EDWARDS, K. J., M. E. KAUFMANN a N. A. SAUNDERS. Rapid and Accurate Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2001, **39**(9), 3047-3051. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.39.9.3047-3051.2001
- [56] REVELO ROMO, Dolly Margot, Maria Victoria GROSSO, Nubia Carmenza MORENO SOLANO a Dolly MONTOYA CASTANO. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2007, **10**(3), 0-0. ISSN 07173458. Dostupné z: doi:10.2225/vol10-issue3-fulltext-13
- [57] CIBICHAKRAVARTHY, Balasubramanian, Subramani ABINAYA a Solai Ramatchandirane PRABAGARAN. Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **103**, 613-620. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.100

- [58] NAYAK, Pramoda Kumar, Ajeet Kumar MOHANTY, Teja GAONKAR, Ashwani KUMAR, Saroj N. BHOSLE a Sandeep GARG. Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for phaC Gene of *Bacillus megaterium*. *ISRN Bacteriology* [online]. 2013, **2013**, 1-12. ISSN 2314-6273. Dostupné z: doi:10.1155/2013/562014
- [59] PERNICOVÁ, Iva. *IDENTIFIKACE A IZOLACE PHA PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ*. Brno, 2021. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [60] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* [online]. 2020, **12**(6). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235
- [61] ZHOU, Xiao-Yun, Xiao-Xi YUAN, Zhen-Yu SHI, De-Chuang MENG, Wen-Jun JIANG, Lin-Ping WU, Jin-Chun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* [online]. 2012, **11**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-11-54
- [62] LIU, Qingsheng, Hongxia ZHANG, Bingyao DENG a Xiaoyan ZHAO. Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Structure, Property, and Fiber. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2014, **2014**, 1-11. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2014/374368
- [63] ROCHA, Rafael C. S., Luiziana F. DA SILVA, Marilda K. TACIRO a José G. C. PRADELLA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, **24**(3), 427-431. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-007-9480-x
- [64] Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain [online]. 2015. Giedraityte Grazina, Kalediene Lilija, January 2015. ISSN 0235-7216. Dostupné také z: <https://epublications.vu.lt/object/elaba:8206134/>

## 7. SEZNAM ZKRATEK

<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>PHA</b>	Polyhydroxyalkanoát
<b>3HB</b>	Poly-3-hydroxybutyrát
<b>3HV</b>	Poly-3hydroxyvalerát
<b>4HB</b>	Poly-4-hydroxybutyrát
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b>TBE</b>	Tris-borát-EDTA pufr
<b>P(3HB-<i>co</i>-3HV)</b>	Poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)