

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2022

Markéta Khýrová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ TECHNIKY AFM PŘI STUDIU
BIOLOGICKÝCH VZORKŮ**

STUDY OF BIOLOGICAL SAMPLES USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Khýrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1667/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Markéta Khýrová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití techniky AFM při studiu biologických vzorků

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat aktuální literární rešerši se zaměřením na vhodný výběr metody a přípravu biologických vzorků pro měření pomocí techniky AFM.
- 2) Na základě literární rešerše navrhnout vhodné imobilizační postupy biologických vzorků a experimentálně otestovat jejich použitelnost pro morfologickou analýzu pomocí AFM s ohledem na nastavení měření a příslušné vybavení.
- 3) Na základě výsledků realizovaných experimentů diskutovat výhody a nevýhody s ohledem na imobilizaci biologických vzorků, měřicí mód AFM a dané příslušenství.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Markéta Khýrová
studentka

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem bakalářské práce bylo studium Gram-negativních bakterií se schopností akumulovat polyhydroxyalkanoáty pomocí mikroskopie atomárních sil. V rámci experimentální části práce byly zkoumány bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Rhodospirillum rubrum* a *Halomonas halophila*. Konkrétním cílem bylo optimalizovat tuto mikroskopickou metodu pro výzkum jak bakterií na vzduchu, tak živých bakterií v jejich přirozeném prostředí. Optimalizace byla provedena s ohledem na jednoduchost, časovou náročnost a reprodukovatelnost provedení měření. Pro měření na vzduchu byla zvolena imobilizace 10× zředěné bakteriální suspenze vysušením na skleněném substrátu. Skenování bylo provedeno pomocí hrotu TESPA-V2 se sníženou konstantou tuhosti v QITM módu. V rámci měření bakteriálních vzorků v kapalině byly zkoumány různé postupy imobilizace bakterií na skleněném substrátu pomocí Poly-L-lysinu a Poly(ethyleniminu). Jako nejvhodnější fixace byla zvolena metoda s využitím Poly-L-lysinu. Pro měření v QITM módu v kapalném prostředí byly voleny hroty MLCT – A nebo SNL – B s konstantou tuhosti okolo 0,1 N/m. Nakonec byl proveden pokus o získání informací o adhezi a Youngově modulu vysušených i živých bakterií s ohledem na předpokládané ovlivnění mechanických vlastností buněk s rozdílným obsahem polyhydroxybutyrátu u bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroskopie atomárních sil, *Cupriavidus necator*, *Halomonas halophila*, *Rhodospirillum rubrum*, polyhydroxyalkanoáty, Poly-L-lysin

ABSTRACT

The purpose of this bachelor thesis was to study Gram-negative bacteria with the ability to accumulate polyhydroxyalkanoates using atomic force microscopy. During the experimental part were studied bacterial strains *Cupriavidus necator* H16 and its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, *Rhodospirillum rubrum*, and *Halomonas halophila*. The main aim was to optimise this microscopy method to study either bacteria in the air or bacteria in liquid medium under physiological conditions. The optimisation was done considering the procedure's simplicity, time demands, and reproducibility. 10× diluted bacterial suspension was dried on a glass surface for measurements in the air. Scanning was performed using TESPA-V2 tip with lowered Spring constant in QITM mode. Various procedures for immobilising bacteria on a glass substrate using Poly-L-lysine and Poly(ethyleneimine) were tested for measurements in liquid. The method using Poly-L-lysine was chosen as the most sufficient way of immobilisation. The tips MLCT – A or SNL – B with the spring constant around 0,1 N/m were applied for measurements in liquid using QITM mode. Finally, an attempt was made to obtain information about the adhesion and Young's modulus of dried and live bacteria concerning the high difference of polyhydroxybutyrate content between the bacterial strains *Cupriavidus necator* H16 and *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

KEYWORDS

Atomic force microscopy, *Cupriavidus necator*, *Halomonas halophila*, *Rhodospirillum rubrum*, polyhydroxyalkanoates, Poly-L-lysine

KHÝROVÁ, Markéta. *Využití techniky AFM při studiu biologických vzorků* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139135>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Eva Slaninová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Evě Slaninové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování této bakalářské práce, za ochotu, cenné rady, nápady a neutuchající optimismus. Nemalé díky patří také všem, kteří mi pomohli v laboratoři a při práci s mikroskopem.

OBSAH

1.	ÚVOD	9
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Prokaryotické buňky	10
2.1.1	Morfologie bakterií	10
2.1.2	Produkce polyhydroxyalkanoátů	13
2.1.3	Modelové mikroorganismy producentů PHA.....	15
2.2	Mikroskopie atomárních sil	16
2.2.1	Historie.....	16
2.2.2	Princip	16
2.2.3	Zobrazovací režimy	17
2.2.4	Charakterizace vzorků pomocí AFM	19
2.2.5	Měření biologických vzorků	19
2.3	Metody studia morfologie prokaryotických buněk	20
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Použité chemikálie, přístroje a organismy	23
3.1.1	Chemikálie	23
3.1.2	Přístroje	23
3.1.3	Testované hroty	24
3.1.4	Použité mikroorganismy	24
3.2	Kultivace	24
3.2.1	<i>Cupriavidus necator</i> H16 a PHB ⁻⁴	24
3.2.2	<i>Halomonas halophila</i>	25
3.2.3	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	26
3.3	Charakterizace narostlých kultur	27
3.3.1	Optická hustota.....	27
3.3.2	Plynová chromatografie	27
3.4	Optimalizace metody přípravy vzorků pro měření na AFM.....	28
3.4.1	Příprava vzorků	28
3.5	Nastavení AFM pro měření	30
3.6	Měření mechanických vlastností	30
3.7	Zpracování výstupu měření	30
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	Charakteristika měřených bakteriálních kmenů.....	31
4.1.1	Optická hustota.....	31
4.1.2	Plynová chromatografie	32
4.2	Optimalizace měření zvolených bakteriálních kmenů na vzduchu.....	32
4.2.1	Imobilizace.....	33
4.2.2	Výběr hrotu	33
4.2.3	Nastavení parametrů měření.....	34
4.2.4	Výsledky	34
4.3	Optimalizace měření bakteriálních kmenů v kapalině.....	37
4.3.1	Imobilizace.....	37
4.3.2	Výběr hrotu	39
4.3.3	Nastavení parametrů měření.....	40
4.3.4	Výsledky	40

4.4	Získané charakteristiky	45
4.5	Youngův modul a adheze	46
5.	ZÁVĚR	49
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55

1. ÚVOD

Bakterie jsou prokaryotní organismy s různými tvary a stavbou buňky. V základu všechny obsahují buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, cytoplazmu, ribozomy a chromozom. Podle složení buněčné stěny bakterie dělíme na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Některé kmeny bakterií disponují schopností akumulovat ve svém vnitřním prostoru zásobní látky zvané polyhydroxyalkanoáty neboli PHA, což jsou estery hydroxykarboxylových kyselin. Po extrakci z mikroorganismů vykazují tyto látky vlastnosti podobné konvenčním plastům s tou výhodou, že jsou nejen přírodního původu, ale také jsou biokompatibilní a biodegradabilní.

Za účelem vyšší produkce a nižších nákladů na výrobu, kdy by mohly PHA plně nahradit petrochemické plasty, je potřeba co nejvíce pochopit PHA-produkující bakterie. Jednou z možností může být využití metody mikroskopie atomárních sil, která je schopná jako jedna z mála mikroskopických metod poskytnout detailní informace o živých mikroorganismech za jejich fyziologických podmínek. Kromě 3D topografie snímku lze také získat mechanické vlastnosti vzorku či informace o adhezi při zachování viability buněk. Princip metody se zakládá na interakci hrotu s povrchem vzorku, kdy je možné provádět měření na vzduchu nebo v kapalném prostředí. Zásadní je u této metody fixace vzorku na vhodný substrát, výběr hrotu a šetrnost skenování.

Teoretická část předložené bakalářské práce pojednává o bakteriích především z pohledu morfologie a nastiňuje problematiku PHA se zmínkou o významných bakteriálních kmenech se schopností akumulace PHA. V textu je též vysvětlen princip metody mikroskopie atomárních sil spolu s některými používanými režimy skenování. V neposlední řadě je probrána problematika studia morfologie prokaryotických buněk a porovnání vybraných metod s mikroskopii atomárních sil.

V této práci je navržena imobilizace vybraných bakteriálních kmenů na skleněném substrátu pro potřeby skenování jak na vzduchu, tak ve fyziologickém prostředí fosfátového pufru. Práce se také zabývá volbou hrotu a nastavením přístroje pro měření s cílem získat co nejkvalitnější snímky nepoškozených bakterií a zhodnotit jejich vlastnosti v souvislosti s množstvím akumulovaných PHA. V rámci pokročilejší charakterizace vzorků bakterií pomocí mikroskopie atomárních sil byly na závěr proměřeny adhezní vlastnosti a Youngův modul u bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16 s vysokým obsahem PHA a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, který naopak neobsahuje žádné či minimální množství PHA granul.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Prokaryotické buňky

Prokaryota je skupina mikroorganismů s nepravým jádrem, která v sobě zahrnuje domény *Archaea* a *Bacteria*. Společným znakem obou domén je, že jejich tělo tvoří jedna prokaryotická buňka. Nicméně do domény *Archaea* se řadí spíše extrémofilní mikroorganismy [1]. Kromě extrémních podmínek, ve kterých se vyskytují *Archaea*, nalezneme bakterie ve vodě, půdě a přechodně i ve vzduchu, kdy vzduch nepředstavuje jejich přirozené prostředí, ale spíše formu transportu. Mimo jiné se bakterie nacházejí i na povrchu těla a sliznicích různých živočichů [2].

Doba od výskytu prvních prokaryotických buněk na Zemi se odhaduje na 3,5 miliardy let a bývají považovány za fylogenetické předchůdce eukaryotických buněk, jejichž první objevení se na planetě Zemi je odhadováno na 2 miliardy let po buňce prokaryotické [3]. Velikosti prokaryotické buňky se pohybuje v řádu několika μm [4].

V průběhu let byly popsány rozdíly mezi prokaryotickými buňkami domén *Archaea* i *Bacteria* na molekulární úrovni. Buňky obou domén ještě bývají často srovnávány s buňkou eukaryotickou jako základní stavební jednotkou eukaryotických organismů, kdy iniciace translace methioninem patří mezi nejvýznamnější společný znak domén *Archaea* a *Eukaryota*. Obě domény též nejsou, na rozdíl od *Bacteria*, citlivé na antibiotika (např. chloramfenikol a kanamycin) a postrádají peptidoglykan, ze kterého je složena buněčná stěna bakterií [4].

Nepřítomnost jaderné membrány a buněčných organel zase pojí domény *Archaea* a *Bacteria*, které mají ribozomy složené ze stejných podjednotek (30S a 50S). Čím se však *Archaea* od dalších dvou zmíněných domén liší, je především ve struktuře buněčných lipidů [4].

2.1.1 Morfologie bakterií

Prokaryotická buňka bakterií se vyznačuje různými tvary. Zjednodušeně lze tvary buněk rozdělit do tří základních skupin, které zahrnují různé varianty a uskupení. Základními typy jsou tyčinkovité, kulovité a vláknité tvary bakterií. Vyskytují se také některé bakterie se specifickým tvarem (např. bakterie s výběžky aj.) [5].

Nejrozšířenějším tvarem je právě tyčinkovitý. Na délku buňky mají vliv některé faktory jako např. fyziologický stav buněk. Tyčinky mohou být rovné, zakřivené (*vibria*) či ve tvaru spirály – spirily a spirochety [5].

Buňky kulovitého tvaru vykazují nejmenší povrch a označují se jako koky [2]. Některé druhy tvoří rozmanitá uspořádání buněk závislá na dělení bakterií v různých rovinách. „Provázky“ tvořené streptokoky vznikají při dělení v rámci jedné roviny. Dělením ve více rovinách je dosaženo tvarů tetrad, sarcin či hroznovitého uspořádání stafylokoků [1; 5].

Bakterie s vláknitým tvarem těla formují pravé mycelium. Tento tvar je charakteristický například pro zástupce rodu *Actinomyces* a *Nocardia*. Objevovat se mohou i řetězce buněk tvořící nerozvětvená vlákna či řetězce obalené vláknitou pochvou [1; 5].

2.1.1.1 Molekulární složení buněk

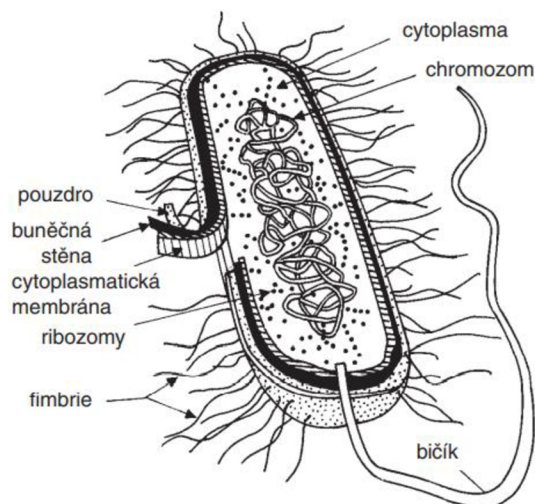
Podle Kaprálka existují tři nejdůležitější typy molekul. Nejprve jsou to malé molekuly s molekulovou hmotností (M_r) v řádu desítek Da, kam patří malé anorganické molekuly jako voda nebo amoniak. Dalším typem molekul jsou větší molekuly s M_r v řádu stovek Da

(např. monosacharidy, aminokyseliny, aj.) a v neposlední řadě makromolekuly s molekulovou hmotností v řádu tisíců Da a výše. Makromolekuly se dále pojí spontánně slabými vazbami a samovolně formují supramolekulární komplexy (tj. lipoproteiny, ribozomy, membrány atd.) [3].

Voda tvoří asi 80 % hmotnosti bakterie a její vlastnosti umožňují průběh životně důležitých dějů. Největší zastoupení v suché hmotnosti bakterie mají bílkoviny (cca 50 %). Ty v organismu zahrnují širokou škálu funkcí a nesou svůj podíl na expresi genů. Hlavní roli bílkovin představuje jejich mechanicko-stavební funkce, v případě enzymů pak katalytická funkce. Enzymy mohou tvořit enzymové komplexy, které jsou dalším příkladem výše zmiňovaných supramolekulárních celků. Bílkoviny spolu s nukleovými kyselinami, lipidy a sacharidy představují více než 90 % suché hmotnosti bakterie [3].

2.1.1.2 Stavba buňky

Mezi nepostradatelné komponenty prokaryotických buněk bakterií patří obal celé buňky nazývaný buněčná stěna, dále cytoplazmatická membrána ohraničující protoplast, cytoplazma a chromozom s ribozomy (viz obrázek 1). Kromě právě zmíněných nezbytných struktur se mohou u některých bakterií vyskytovat i další pomocné prvky – bičíky, pouzdra, fimbrie atd. Pouzdra různého složení se objevují například u bakterií *Leuconostoc*, *Streptococcus pneumoniae* nebo třeba *Bacillus anthracis* [3]. Fimbrie vytváří kupř. *Escherichia coli* a bičíky lze pozorovat u některých tyčinkovitých bakterií např. *Pseudomonas aeruginosa* [5].



Obrázek 1 Struktura bakteriální buňky [2]

- **Buněčná stěna**

Jak již bylo výše zmíněno, buněčná stěna tvoří obal buňky a zajišťuje její ochranu před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Jako jediný pevný útvar buňky poskytuje buněčná stěna vedle odolnosti proti mechanickému poškození i určitou rezistenci vůči negativnímu osmotickému tlaku vnějšího prostředí, záření nebo třeba chemickým látkám. Buněčná stěna navíc určuje tvar buňky a chová se jako semipermeabilní bariéra. Na obrázku 1 ji můžeme vidět mezi pouzdrém a cytoplazmatickou membránou. [4].

Základní stavební jednotkou buněčné stěny všech bakterií je peptidoglykan, který se skládá ze střídajících se jednotek N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny. Spojením zmíněných jednotek β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami vznikají lineární řetězce polysacharidů navzájem propojených pomocí tetra- nebo někdy pentapeptidů. Tyto oligopeptidy se napojují na karboxylovou skupinu N-acetylmuramové kyseliny a procesem transpeptidace dochází ke vzájemnému propojení peptidových řetězců a ke vzniku síťovité struktury. Narušení β -(1 \rightarrow 4) glykosidické vazby lze dosáhnout hydrolyzou pomocí lysozymu [1; 4].

Na základě tloušťky a dalšího složení buněčné stěny dělíme bakterie na Gram-pozitivní (G+) a Gram-negativní (G-). Silná vrstva peptidoglykanu v rozsahu 15 až 20 nm je typická pro G+ bakterie [3]. Síť peptidoglykanu je zde silnější, protože jsou propojeny téměř všechny zbytky N-acetylmuramové kyseliny. Skrze síť prostupují řetězce teichoové kyseliny, která je k peptidoglykanu vázaná kovalentně. Mezi další komponenty buněčné stěny G+ bakterií patří lipoteichoová kyselina či polysacharidy [4]. Typickou rozlišovací vlastností buněčné stěny G+ bakterií je její odezva na Gramovo barvení, podle jehož výsledku byla skupina pojmenována. Po Gramově barvení si tyto bakterie zachovávají modrofialovou barvu, což je důsledkem vzniku komplexu krystalové violeti s Lugolovým roztokem, který nelze odbarvit alkoholem [1].

Složitější uskupení buněčné stěny a slabou vrstvu peptidoglykanu lze pozorovat u Gram-negativních bakterií. Buněčná stěna G- bakterií neobsahuje teichoovou kyselinu, ale je pro ni charakteristická přítomnost vnější membrány z fosfolipidové dvojvrstvy, která ve svém uspořádání obsahuje proteiny, polysacharidy, lipoproteiny a poriny. Poslední dvě zmíněné makromolekuly často zabíhají i do periplazmatického prostoru nacházejícího se pod vnější membránou. V periplazmatickém prostoru se vyskytuje výše zmíněná slabá vrstva peptidoglykanu. G- bakterie se po aplikaci Gramova barvení vyznačují růžovým zbarvením [1].

- ***Cytoplasmatická membrána***

Další zmíněnou nepostradatelnou součástí buňky je cytoplasmatická membrána (viz obrázek 1). Cytoplasmatickou membránu tvoří především fosfolipidová dvojvrstva, která ohraničuje vnitřní prostor buňky. Některé v ní zabudované proteiny plní funkci přenašečů, a to především pro ionty a látky nelipofilní povahy. Jiné proteiny zase zajišťují průběh oxidační fosforylace nebo u fototrofních bakterií průběh fotosyntézy. Volnou difuzí se přes membránu transportují jen neutrální nízkomolekulární látky (molekuly vody, alkoholy apod.) [5].

- ***Cytoplazma***

Cytoplazma představuje prostředí pro průběh celé řady buněčných procesů. Je to viskózní až gelovitý vodný roztok biomolekul, který vyplňuje celý intracelulární prostor prokaryotické buňky. Nachází se v ní velké množství enzymů zajišťujících životní děje buňky (tj. glykolýzu, Krebsův cyklus, transkripci, translaci atd.) [4]. Cytoplazma prokaryotických buněk může mimo jiné obsahovat i pigmenty, které způsobují specifické zbarvení buněk. Často se jedná o karotenoidy, bakteriochlorofyl, černá barviva tzv. melaniny nebo např. barviva fenazinové povahy [5]. Cytoplazma kromě rozmanitých biomolekul zahrnuje i útvary jako granula, ribozomy či chromozom [3].

- ***Chromozom***

Prokaryotická buňka nemá pravé jádro a jaderný materiál je zde reprezentován jednou kruhově

uzavřenou dvouřetězcovou molekulou DNA. Bakteriální jádro neboli nukleoid se skládá nejen z molekuly DNA, ale i z RNA a bílkovin. Celý komplex není ohraničen membránou a je několikrát poskládán, neboť jeho rozměry výrazně přesahují délku buňky [4].

- **Ribozomy**

Ribozomy jsou makromolekuly skládající se z ribozomální RNA (rRNA) a bílkovin, které tvoří asi 1/3 hmotnosti ribozomu. Úkolem ribozomů je syntéza bílkovin a v každé buňce se nacházejí v odlišném množství. Pro ribozomy prokaryotické buňky je typický sedimentační koeficient 70S. V cytoplazmě se vyskytují v podobě dvou rozdělených podjednotek různého tvaru a konformace se sedimentačními koeficienty 30S a 50S, které se pojí během translace. Určitá část se nachází ve formě jednotlivých 70S ribozomů, ale nejčastěji se vytváří shluky 70S ribozomů překládající mediátorovou RNA (mRNA) [3].

- **Zásobní látky**

V podobě inkluzí či granulí se v cytoplazmě mohou objevovat také rezervní látky. Jako zásobárna fosfátu se v některých bakteriích hromadí volutin, vedle kterého může být, např. u sírných bakterií, zásobní látkou i síra. Nejčastěji se však jako rezerva energie vyskytuje glykogen a (specificky pro bakterie) kyselina β -hydroxymáselná [4]. Dále bylo dokázáno, že se v bakteriích akumulují různé polyhydroxyalkanoáty (PHA), což jsou polyestery nejen již zmíněné kyseliny β -hydroxymáselné, ale i jiných hydroxykyselin [6]. Mnoho zástupců jak bakterií, tak *Archaea* se vyznačuje schopností vytvářet PHA granule [7]. A právě bakterie produkující a akumulující PHA jsou předmětem zkoumání této bakalářské práce.

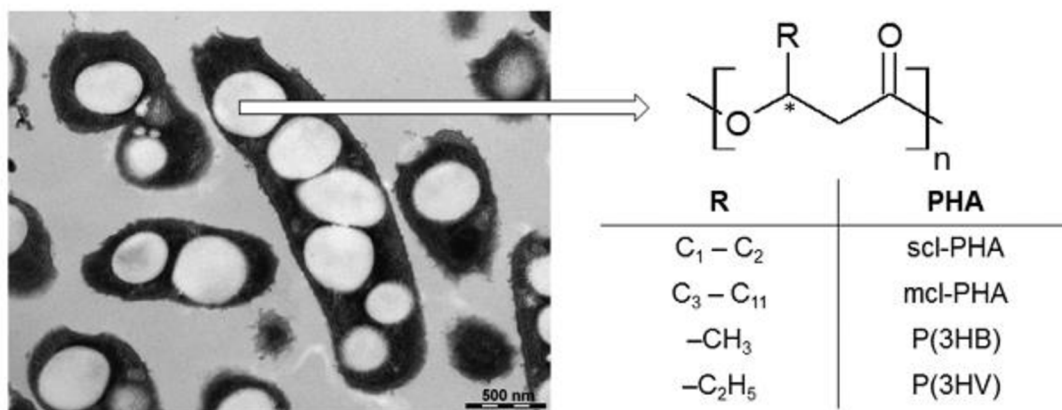
- **Ostatní struktury**

Kromě buněčné stěny mohou být prokaryotické buňky obaleny ostře ohraničenými polysacharidovými pouzdry, slizovou nebo difusní vrstvou zvanou glykokalyx. V prostoru cytoplazmy se někdy objevují malé struktury DNA zvané plazmidy uplatňující se např. při konjugaci (spájení). Z extracelulárních struktur jsou významné pili (fimbrie) a bičíky, které lze vidět na obrázku **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** Pili, tvořené bílkovinou pilin, se vyskytují pouze u G⁻ bakterií a jejich speciální formy mají svůj podíl na konjugaci. Bičíky představují pohybový aparát některých bakterií a bývají delší než samotné bakterie [3].

2.1.2 Produkce polyhydroxyalkanoátů

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole 2.1.1.2, mikroorganismy jsou schopné produkce a akumulace mnoha sekundárních metabolitů, mezi něž patří i polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA jsou alifatické polyestery různých hydroxykarboxylových kyselin, jejichž struktura je zobrazena na obrázku 2 [8]. Objeveny byly okolo roku 1920, ale největší zájem o tyto polyestery začal až kolem roku 1990. Snaha najít vhodnou biodegradabilní alternativu ke klasickým plastům vedla ke vzniku velkého množství publikací zabývajících se tématem PHA [9]. Jejich syntéza probíhá hlavně v bakteriích, kde jsou produkovány jako zásobárna energie většinou při nedostatku živin (např. N, P, S, O, Mg). Nicméně bakterie vystavena stresovým podmínkám musí mít dostatečný přísun uhlíku. Vyprodukované PHA se kumulují v cytoplazmě a tvoří intracelulární inkluze hydrofobního charakteru o velikosti 0,2–0,5 μm , kdy je v jedné granulí uchováno 10^3 – 10^4 řetězců [10]. V některých buňkách se přitom může nacházet 8–13 granulí, v jiných nalezneme pouze dvě granule, jak je vidět na obrázku 2. Na množství granulí v buňce se podílí proteiny a enzymy jako PHA polymeráza

i depolymeráza. Při podmínkách omezujících růst, mohou tvořit granule PHA až 90–97 % suché váhy bakterie [8; 10].



Obrázek 2 Transmisní elektronový snímek PHA granulí uvnitř bakterie *Cupriavidus necator* H16 (vlevo) a struktura PHA (vpravo) [6]

Jednotky těchto biopolymerů, konkrétně monomery PHA, jsou složeny z (R)-3-hydroxy mastných kyselin [8]. R (–) konfigurace všech chirálních uhlíků hlavního řetězce PHA zapříčiňuje jejich složitou chemickou syntézu. Tuto konfiguraci a kompletní stereospecifitu jsou schopny zajistit pouze bakterie [11]. Monomerní jednotky PHA tvoří zhruba 150 různých hydroxyalkanových kyselin a počet nově objevených se stále zvyšuje. Podle monomerních jednotek se PHA klasicky dělí do tří skupin. První skupinou jsou PHA s krátkým řetězcem značené scl-PHA (z angl. *short-chain-length*, monomer obsahuje 3–5 uhlíků), dále PHA se středně dlouhým řetězcem značené mcl-PHA (z angl. *medium-chain-length*, monomer obsahuje 6–14 uhlíků) a PHA s dlouhým řetězcem označované lcl-PHA (z angl. *long-chain-length*, monomer obsahuje více než 14 uhlíků) [8]. Každá skupina se od sebe navíc liší svými vlastnostmi, které mohou být ještě ovlivněny funkčními skupinami na bočním řetězci, mezi které patří např. halogeny, methylesterové skupiny, hydroxyl, epoxy, thiofenoxo aj. [11].

Vlastnosti těchto polymerů, které vznikají jako sekundární metabolity, se odvíjí od struktury daného polymeru. Vliv má, kromě zmíněných funkčních skupin na bočních řetězcích monomerních jednotek, ještě i délka řetězce monomeru, podobně jako rozvětvení a linearita monomeru. Mohou být krystalické, amorfní, flexibilní, tuhé i elastické [10]. Obecně jsou PHA granule v buňce amorfní a nerozpustné ve vodě. Po extrakci PHA granule krystalizují a disponují podobnými vlastnostmi jako konvenční plasty [8]. Největší výhodou je jejich biodegradabilita v kombinaci s rysy termoplastů (scl-PHA) nebo elastomerů (mcl-PHA). Použití PHA jako skvělé náhrady za petrochemické plasty také podporuje jejich biokompatibilita, netoxický charakter, nerozpustnost ve vodě nebo vysoký stupeň polymerace (10^5 – 10^7 Da) [8].

2.1.3 Modelové mikroorganismy producentů PHA

2.1.3.1 *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Cupriavidus necator H16 je bakteriální kmen Gram-negativních mikroorganismů náležící do třídy β -proteobacteria. Tento bakteriální kmen není patogenní, netvoří spory a řadí se k mezofilním bakteriím. *C. necator* PHB⁻⁴ představuje fenotypového mutanta bakterie *C. necator* H16, který byl použit v experimentální části jako negativní kontrola [12; 13].

V cytoplazmě akumuluje *C. necator* H16 hlavně scl-PHA, z nichž nejčastěji syntetizuje a ukládá do granul poly[(R)-3hydroxybutyrát] (PHB) [6]. Mezi enzymy odpovídajícími za syntézu PHB patří PHB syntáza, β -ketothioláza a NADPH dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza. Pro rozklad PHB při nedostatku uhlíku využívá *C. necator* H16 enzymy PHB depolymerázu a PHB-oligomer hydrolázy [14]. Výše zmíněné enzymy potřebné pro syntézu PHB jsou umístěny na PHA-operonu *phaCAB*. Gen pro β -ketothiolázu je značen jako *phaA*, pro acetoacetyl-CoA reduktázu je značen jako *phaB*, nicméně oba enzymy mohou být nahrazeny izoenzymy. Zásadní pro tvorbu PHB je gen *phaC* kódující PHB syntázu, která zajišťuje výslednou polymeraci meziproductů na PHB. Bylo zjištěno, že mutantní bakterie *C. necator* PHB⁻⁴ obsahuje v genu *phaC* mutaci způsobující nefunkčnost PHB syntázy. Ve výsledku není tento mikroorganismus schopen produkovat PHA, ale vykazuje tvorbu vyššího množství intermediátů syntézy PHB (pyruvát, acetyl-CoA) [15].

Bakterie *C. necator* H16 se jinak chová jako fakultativní chemolitotrof a za aerobních podmínek roste na organických substrátech, popřípadě vyžaduje H₂ v kombinaci s CO₂. Pro získání energie oxidují tyto buňky H₂ pomocí hydrogenáz. Za anaerobních podmínek provádí *C. necator* H16 denitrifikaci [12]. Významná je též schopnost bakterií tohoto kmene degradovat aromatické látky [14].

2.1.3.2 *Rhodospirillum rubrum*

Bakterie *Rhodospirillum rubrum* je jedním z představitelů α -proteobakterií rovněž produkující PHA [16]. Kromě aerobních podmínek je tento bakteriální kmen schopen růst i v anaerobním prostředí [17]. *R. rubrum* se řadí také mezi Gram-negativní druhy a velikost jednotlivých bakterií odpovídá 0,8–1 μ m. Kmen se vyznačuje především produkcí síry v průběhu fotosyntézy, která probíhá za anaerobních podmínek. V aerobních podmínkách fotosyntéza neprobíhá a kolonie jsou bezbarvé. Fotosyntetizující bakterie naopak nabírají fialovou barvu díky produkci pigmentů (karotenoidy aj.). Mimo potenciální využití kmene při výrobě vodíku jako paliva budoucnosti je schopen produkovat i akumulovat PHA, konkrétněji potom PHB [18].

2.1.3.3 *Halomonas halophila*

Halofilní mikroorganismy vyžadují ke svému životu substrát obsahující vyšší koncentraci solí. Mezi ně patří i *Halomonas halophila*, kmen nejlépe rostoucí v roztocích s hmotnostní koncentrací 7,5 % NaCl akumuluje PHA [19]. PHA granule zde mohou představovat způsob, jak bakterie zvládají žít ve slaných substrátech. *H. halophila* je striktně aerobní a podobně jako předchozí zmíněné bakterie je také Gram-negativní. Schopnost akumulace PHA jasně potvrzuje přítomnost genu *phaC*, což bylo potvrzeno i experimentálně. U tohoto bakteriálního

kmene byl také zjištěn vliv koncentrace NaCl na množství syntetizovaného PHB a na jeho vlastnosti (molekulární hmotnost, aj.) [20].

2.2 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM, *Atomic Force Microscopy*) je jedna z nejběžněji používaných druhů mikroskopie skenující sondou (SPM). Metoda je založená na těsném přiblížení detekční sondy ke zkoumanému vzorku, čímž získáme lokální trojrozměrný obraz vzorku. Princip AFM mimo jiné vychází ze skenovací tunelové mikroskopie (STM), což je odnož SPM. Za vynalezení STM byla vědcům Gerdu Binnigovi a Heinrichu Rohrerovi roku 1986 udělena Nobelova cena za fyziku [21].

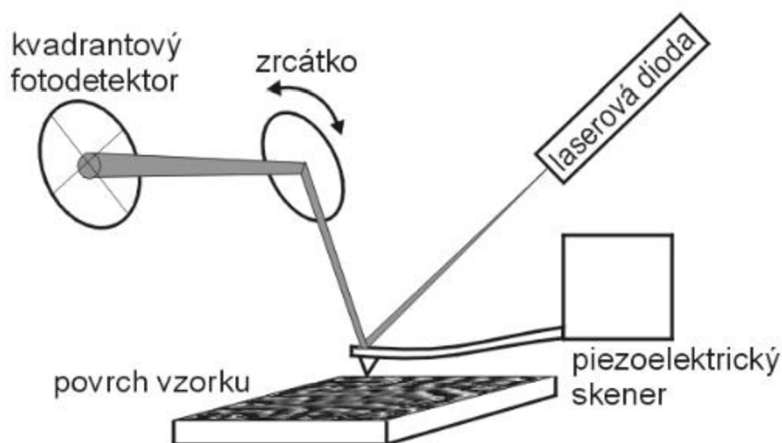
V nynější době se AFM stala fundamentálním nástrojem pro měření různorodých povrchů. Hlavní výhodou této metody je poskytnutí právě trojrozměrného obrazu měřeného vzorku, neboť ostatní metody jsou schopné poskytnout pouze topografický kontrast. Další předností AFM je jednoduchá příprava vzorku pro měření, a navíc lze měřit ve vzduchu, vakuu či vodném prostředí při různých teplotách [22]. AFM obecně detekuje distribuci (elektromagnetických) atomárních sil na povrchu zkoumaného vzorku, k jejichž vyvolání dochází přiblížením skenovacího hrotu k jeho povrchu [21]. Této metody se hojně využívá k měření interakcí v biologických systémech, protože lze zobrazit i nevodivé materiály. Velmi dobře se dají měřit mikroorganismy v jejich přirozeném prostředí, biopolymery nebo třeba buněčné membrány [23].

2.2.1 Historie

Jak je uvedeno výše, metoda AFM se vyvinula z SPM, tedy konkrétně ze systematických odchylek, které byly pozorovány při měření pomocí STM. Tyto odchylky způsobené silovými interakcemi mezi hrotem mikroskopu a vzorkem byly poté využity k samotnému měření [21]. O první sestavení mikroskopu atomárních sil se v roce 1985 zasloužili již zmiňovaní vědci G. Binnig a H. Rohrer, kteří se předtím zabývali výzkumem STM [24]. Právě oni přišli s nápadem využít silové interakce sondy se vzorkem k přímému měření. Během dalších let docházelo ke konstantnímu vylepšování a hledání nových prvků pro optimalizaci měření AFM [23].

2.2.2 Princip

Nejběžněji používaným AFM je ten s laserovou diodou [21]. Mikroskop je složen z několika částí (viz obrázek 3). Významný pro samotné měření je piezoelektrický skener, který slouží k pohybu hrotu. Dalšími esenciálními částmi jsou laserová dioda, fotodetektor (nejčastěji kvadrantní), elektrický obvod zpětné vazby mikroskopu a pomocné součásti. Nejdůležitějším pro samotné měření je však nosník (*cantilever*) se sondou zakončenou hrotem [23]. Hrot je kolmo připojen k nosníku, což je tenký proužek z pružného materiálu, nejčastěji křemíku pokrytého oxidem křemičitým nebo nitridem křemičitým. Pro speciální měření se mnohdy používá i jiných materiálů (antimon, hliník, zlato atd.) [21].



Obrázek 3 Princip detekce AFM [25]

Laserová dioda generuje laserový paprsek, kterým svítí na nosník, jak je patrné z obrázku 3. Z nosníku se paprsek odráží na fotodetektor. Při změně ohnutí nosníku se změní i úhel dopadu na fotodetektoru, který zaznamenává pozici dopadajícího paprsku a jeho změny. Citlivost fotodetektoru je velmi vysoká, protože poloměr zakřivení nosníku se pohybuje v rámci setin nanometrů [23].

Hrot se pohybuje nad vzorkem nebo se vzorku přímo dotýká. Na základě přiblížení hrotu ke vzorku mezi nimi vznikají síly, které způsobují výchylku nosníku. Tato výchylka zapříčiněná vzájemným působením hrotu se vzorkem je poté detekována. Zmíněné síly jsou přitažlivé nebo odpudivé, což závisí na vzdálenosti hrotu od vzorku. Přitažlivé síly působí, pokud je zmíněná vzdálenost dostatečně velká. Při velmi malých vzdálenostech zase působí síly odpudivé, které vznikají při překryvu elektronových orbitalů hrotu a vzorku [21].

Měřenými silami jsou při větších vzdálenostech nejčastěji síly Van der Waalsovy a při vzdálenostech menších, než je součet atomových poloměrů (překryv orbitalů), se měří síly odpudivé, plynoucí z Pauliho principu – síly krátkého dosahu. Další síly krátkého dosahu jsou adhezní, deformační, třecí nebo vazebné, jako je chemisorpce. Mezi síly působící na delší vzdálenost se počítají magnetické a elektrostatické, kdy jedna odpovídá signálu a druhá zapříčiňuje šum. Významnými silami jsou také kapilární síly, které mohou ztěžovat měření tím, že překryjí ostatní působící síly. Přítomnost zmíněných sil závisí na podmínkách daného měření [21].

2.2.3 Zobrazovací režimy

AFM je vybaven několika zobrazovacími režimy neboli módy. Různé módy se využívají pro různé charakteristiky vzorku a jsou aplikovány v mnoha oblastech výzkumu [24]. Nejčastěji se využívá 3 základních módů. Ze statických je to kontaktní (dotykový) režim. Další typ tvoří dynamické módy, kam spadají další dva často používané módy, a to bezkontaktní (bezdotykový) a pokleповý mód. Výběr režimu závisí na vlastnostech předmětu zkoumání a na silách, které se budou uplatňovat na povrch daného vzorku atd. [26]. V dnešní době již existuje i velké množství zdokonalených módů, které mají konkrétní nastavení pro měření specifických vzorků či umožňují studovat mnohé vlastnosti zobrazovaných povrchů bez časově náročné optimalizace [27].

2.2.3.1 Kontaktní režim

Při tomto režimu je hrot vždy v kontaktu s povrchem vzorku, po kterém se pohybuje, a profil zkoumaného vzorku způsobuje vychýlení nosníku. Jelikož se tento mód pohybuje ve velmi malých vzdálenostech, tak zde působí mezi hrotem a vzorkem odpudivé síly v řádech 10^{-7} N. Vlivem zmíněných odpudivých sil dochází k ohnutí nosníku směrem od povrchu. Rozlišení tohoto módu se pohybuje v rámci periodicity mřížky [21].

Dotykový režim lze provádět ve dvou variantách. První varianta je s konstantní výškou, kdy se musí zajistit konstantní poloha základny nosníku a měří se pouze jeho ohyb. Zde je velmi důležitá kalibrace nosníku. Druhá varianta je měření s konstantní silou, kdy je zajištěno konstantního ohnutí nosníku a tím se způsobí, že se při měření pohybuje celý nosník podle profilu nahoru a dolů. Tato varianta se využívá častěji pro měření biologických vzorků, i když je pomalejší. Kombinovaný režim již zmíněných módů představuje třetí variantu, která je ale málo používaná [21].

2.2.3.2 Bezkontaktní režim

V bezkontaktním režimu se hrot přímo nedotýká povrchu vzorku. A to z důvodu, aby se zabránilo poškození nebo kontaminaci vzorku. Hrot, který by mohl poškození způsobit, se zde nachází ve vzdálenosti 1–10 nm nad povrchem. Při měření se využívají hlavně Van der Waalsovy síly. Nosník v tomto režimu kmitá okolo své 1. rezonanční frekvence s amplitudou, při které nedojde k dotyku hrotu s povrchem vzorku. Síly, které na hrot s nosníkem působí, mění jeho frekvenci, a na základě rozdílné vzdálenosti hrotu od vzorku se může vyhodnocovat topografický obraz povrchu. V tomto režimu mohou být sledovány rovněž změny rezonanční frekvence nosníku [21]. Tento režim je často využíván a osvědčil se hlavně pro měření biologických vzorků nebo tenkých organických filmů, tedy celkově měkkých vzorků [24]. Nemalý význam v rámci měření v tomto módu má volba materiálu nosníku [21].

2.2.3.3 Poklepový režim

Kombinace předchozích režimů dala vzniknout poklepovému módu, kdy nosník kmitá v blízkosti své rezonanční frekvence, avšak amplituda se liší podle přiblížení vzorku. Po přiblížení hrotu ke vzorku pokrytému vrstvou kapaliny na něj začnou působit Van der Waalsovy, elektrostatické a další síly, díky čemuž dojde ke zvýšení amplitudy, až se hrot dotkne povrchu vzorku [26]. Při dotyku ztratí hrot energii a dojde ke snížení amplitudy nosníku, čímž hrot opět kmitá v bezkontaktním režimu. Vhodně nastavený poklepový režim je obecně vlídnější ke vzorku, protože posun hrotu do stran probíhá v okamžiku, kdy není se vzorkem v kontaktu. Tento režim vznikl jako optimalizace obou předchozích režimů. Nedochází tolik k poškození vzorku, ale zároveň je zajištěno vyšší rozlišení díky dotyku. Nicméně vzorek může stále být kontaminován hrotem [21].

2.2.3.4 Kvantitativní zobrazování (QITM Quantitative Imaging)

Mezi progresivní módy patří QITM, díky kterému lze jednoduše zobrazovat měkké vzorky s horší přilnavostí k substrátu. Hodí se zejména pro zobrazování buněk či mikroorganismů v laboratorní atmosféře i v kapalném prostředí. Princip tohoto režimu je založen na přibližování a (po dosažení určité síly) oddalování hrotu od vzorku, kdy lze získat informace o adhezi,

tuhosti, výšce vzorku aj. Výhodou je, že se hrot dotkne vzorku pouze jednou v rámci každého měřeného pixelu [27].

2.2.4 Charakterizace vzorků pomocí AFM

Hlavní uplatnění AFM je v měření fyzikálních sil a trojrozměrném zobrazování povrchů. Díky měření sil lze získat především mechanické vlastnosti, např. Youngův modul nebo tvrdost. Jak už bylo několikrát zmíněno, také se při zobrazování během měření postupně generuje trojrozměrný obraz povrchu vzorku. Mnohdy se musí výstup v průběhu měření upravovat, a i přesto není získaný obraz často dostatečně kvalitní (především u biologických vzorků). Na místě jsou tedy pozdější úpravy snímků [26].

Měřenými vlastnostmi pomocí AFM mohou být: hydrofobicita či hydrofilita, náboj povrchu, mechanické vlastnosti atd. Při měření mikroorganismů se mapují povrchové vlastnosti jako je elasticita buněčné stěny, turgor, adheze a další charakteristiky [23]. Stejně tak se prostřednictvím AFM měří strukturní uspořádání vzorků, např. struktura živých buněk v reálném čase s rozlišením v rámci nanometrů. AFM tak celkově poskytuje celou řadu možností, jak charakterizovat různé vzorky za odlišných podmínek [28].

2.2.5 Měření biologických vzorků

Zpracování biologických vzorků, a tedy i příprava daného vzorku pro měření pomocí AFM, se odvíjí od charakteru vzorku, ať už se jedná o vzorek tkáně či bakteriální buňky, a proto je nutné dopředu zvážit vhodný režim, výběr sondy a dalších parametrů. Konkrétní podmínky měření mikroorganismů souvisí s negativním nábojem na jejich povrchu, způsobeným přítomností aniontů, karboxylových skupin a fosfátů v povrchové membráně [23]. Také správná příprava substrátu a vytvoření kontrolovaného prostředí s požadovanými parametry představuje základní podmínku úspěšného měření [26]. Nejdůležitější je upevnění a imobilizace vzorku k hladkému povrchu buď adsorpce k substrátu, nebo chemickou fixací, aniž by se narušil nativní stav biologického vzorku. Nejvíce využívanými substráty jsou slída, sklo a oxid křemičitý [23].

Slída (muskovit) je velmi často používaným substrátem, který je ideální pro zobrazování DNA, komplexů DNA s proteiny nebo třeba pomocných lipidových filmů. Jako minerální materiál s mnoha nanometrovými vrstvami může být snadno rozštípnut, čímž se získá negativně nabitý, čistý a rovný povrch. Modifikace povrchu slídy může proběhnout různými způsoby za účelem podpory adsorpce nebo navázání biomolekul kovalentními vazbami [29]. Pro bakterie, na rozdíl od biomolekul, není slída tolik vhodným substrátem, protože při použití jednoduché adsorpce neposkytuje povrch slídy bakterii dostatečnou kontaktní plochu a ta se může snadno uvolnit [23].

Dalším zmíněným substrátem pro biologické vzorky je sklo, vhodné především pro zobrazování větších struktur a buněk. Jeho poměrně hrubý povrch se moc nehodí při zobrazování adsorbovaných molekul. Sklo je nutné vhodně očistit, protože je vždy pokryto organickými částicemi, které mohou kontaminovat vzorek. Povrch tohoto substrátu lze také modifikovat např. molekulami silanu, aj. [29].

Oxid křemičitý je polovodivý materiál. Zatímco se vyznačuje hladším povrchem, než má sklo, je náročnější na manipulaci a je také mnohem dražší variantou [29].

2.2.5.1 *Metody imobilizace*

Jelikož byly v rámci experimentální práce této bakalářské práce proměřeny buňky různých bakteriálních kmenů, byla rešerše ohledně metod imobilizace biologických vzorků zaměřena tímto směrem. Upevnění bakterií lze provést několika způsoby a jeho správné provedení je nezbytným předpokladem pro úspěch celého měření. Metody se mohou dělit v závislosti na tom, v jakém prostředí bude samotné zobrazování probíhat. Nejčastějšími přístupy imobilizace jsou vysušení, adsorpce a chemická fixace [23].

V prostředí vzduchu je nejjednodušším způsobem imobilizace vysušením. Kapička suspenze buněk se po nanesení na substrát nechá zaschnout na vzduchu a následně po vyschnutí probíhá měření [30]. Navíc bylo zjištěno, že při správném skladování je možné vysušené vzorky opět použít i po několika letech. Opětovná rehydratace také není vyloučena [31]. Přestože se jedná o silnou imobilizaci, jejím omezujícím faktorem je snížení viability buněk v důsledku ztráty vody [23].

Komplexnější a komplikovanější přístup fixace vyžaduje zobrazování ve vodném prostředí, ať už se jedná o zobrazování přímo ve vodě, kultivačním médiu či pufru. Hlavním důvodem zobrazování ve vodných prostředích je zkoumání živých buněk. Imobilizace by tedy měla zachovat životaschopnost buněk, nejlépe bez morfologických změn. Neméně důležitý je též aspekt síly fixace a její stability v čase z důvodu časově náročných měření [32].

Jednou z možností může být imobilizace krátkým vysušením s následnou rehydratací, ale i to může vést k ovlivnění viability či morfologie zobrazovaných buněk [33]. Jiný přístup představuje fixace buněk chemicky, pomocí kovalentních vazeb. Zde je častá úprava povrchu substrátu třeba glutaraldehydem. Vlivem kovalentních vazeb však není vyloučena ztráta viability způsobená např. denaturací proteinů. Použitím kovalentních vazeb pro fixaci lze dosáhnout snímků s vysokým rozlišením [23].

Velmi významná a často aplikovaná imobilizace buněk spočívá v ošetření povrchu substrátu polykationty. Vzniklé elektrostatické interakce upevní záporně nabitě buňky bez mechanického namáhání. Standardně se substráty za účelem získání kladně nabitého povrchu ošetřují Poly-L-lysinem (PLL) nebo Poly(ethyleniminem) (PEI). Podstatná je zde iontová síla použitého média, která by měla být co nejnižší [33].

PLL je činidlo hojně využívané v různých studiích pro upevnění bakterií k substrátu [30; 32; 34; 35].

PEI již byl v minulosti úspěšně použit v některých předchozích studiích zkoumajících bakterie pomocí AFM [36; 37]. Je to polymer schopný vytvořit kladně nabitý povrch substrátu. Vyskytuje se v lineární i v rozvětvené formě, která byla použita v této bakalářské práci. PEI byl zvolen jako imobilizační činidlo, přestože by mohl mít vliv na propustnost vnější membrány G⁻ bakterií [38]. Podle studie skupiny Helander et al. [38] by však PEI neměl výrazně působit na růst bakterií.

2.3 **Metody studia morfologie prokaryotických buněk**

Pro studium morfologie buněk existuje celá řada mikroskopických technik, lišících se principem a podmínkami měření, k nimž patří především světelná, fluorescenční a konfokální rastrovací mikroskopie. Tyto techniky se odlišují nejen principem, ale i mírou rozlišení

a přiblížení, které mohou poskytnout. S ohledem na vysoké rozlišení se využívají mimo AFM také například skenovací elektronová (SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Vůči zmíněným technikám má AFM několik výhod, ale i nevýhod [39].

Zatímco rozlišení světelné a fluorescenční mikroskopie je omezeno vlnovou délkou světla a limit se pohybuje okolo 0,2 μm , AFM dosahuje rozlišení v rámci nanometrů. Nejen u AFM, ale i u světelné a fluorescenční mikroskopie mohou být vzorky pozorovány jak ve vzduchu, tak ve vodném prostředí. Tudiž lze v těchto případech pozorovat živé i neživé buňky [39; 40].

Jisté zdokonalení fluorescenční techniky představuje konfokální skenovací mikroskopie, díky níž lze získat 3D obrazy vzorků [39]. Konfokální mikroskopie odstiňuje nepřesnosti fluorescenčních mikroskopů využitím clonky (*pinhole*) a umožňuje tak získání kvalitnějšího obrazu. Nevýhodu oproti AFM může představovat rozlišení, které je stále omezeno vlnovou délkou světla, nebo nutnost použití fluorescenčního barvení nefluoreskujících vzorků, což představuje další problém, a dále také vybělování (*photobleaching*) fluoroforů. Proto je u této techniky zásadní nalézt kompromis mezi degradací fluoroforů, rozlišením a rychlostí skenování vzorku [41]. N. Mitik-Dineva et al. využili porovnání výsledků z konfokálního mikroskopu s AFM ke studiu produkce neznámých extracelulárních látek bakteriemi *Pseudoalteromonas issachenkonii* [40]. Sadin et al. zase velmi podrobně popisuje využití metody AFM v kombinaci s konfokální skenovací mikroskopií k dosažení ještě vyššího rozlišení zobrazení. Ve studii je detailně popsán postup měření a výhody zmíněného spojení, které považuje za velmi přínosné pro pozorování živých buněk a slibuje získání cenných informací z obou technik, jako jsou možnost sledovat skenovaný objekt nebo přímá kombinace mapování sil pomocí AFM s konfokálními snímky na jedné platformě [42].

V minulosti byly pro dosažení vysokých rozlišení, pohybujících se v rámci nanometrů, nejvíce používány elektronové mikroskopy. Pro lepší pochopení morfologie a uspořádání buněk je důležité se pohybovat v nano-měřítku. Transmisní elektronový mikroskop (TEM) využívá vlnové délky elektronů a tím dosahuje potřebného rozlišení. Principem je detekce elektronů procházejících vzorkem, který musí být velmi tenký a vodivý. Biologické vzorky se proto často barví těžkými kovy. Hlavní nevýhoda TEM oproti AFM tedy bude ve složitější přípravě vzorku, který by navíc měl být odolný vůči vakuu, jež TEM vyžaduje. Oproti tomu zobrazování vzorků pomocí AFM je možné i za laboratorních podmínek a vyžaduje pouze dobrou vazbu buněk na substrát [39; 43]. Na rozdíl od AFM není metoda TEM schopná měření živých buněk a často dochází ke vzniku artefaktů při přípravě vzorků. Na druhou stranu TEM zprostředkovává vysoké rozlišení a dovoluje kvantitativní analýzu [44]. Obě metody byly použity například ve studii provedené skupinou Bassas et al. [43], která se přímo zabývala zobrazováním bakterií obsahující PHA.

Druhým základním typem ze skupiny elektronových mikroskopů je skenovací elektronový mikroskop (SEM). Podobně jako u TEM je i zde velmi náročná příprava vzorku, ale již není potřeba tenkých řezů, protože technika SEM je založena na detekci elektronů odražených z povrchu vzorku. Kromě barvení a fixace buněk je opět nutné zajistit prostředí vakua, a tudíž není reálné zobrazení živých bakterií [39]. Jak už bylo několikrát napsáno, v tomto má AFM nepřekonatelnou výhodu nad elektronovými mikroskopy, kdy lze měřit biologické vzorky v kapalném prostředí i ve vzduchu (popř. ve vakuu) [22]. SEM také neumožňuje kvantifikaci a často opět dochází ke vzniku artefaktů způsobených během přípravy vzorku [37]. Na základě

detekovaných elektronů můžeme u SEM získat informaci o topografii nebo o chemickém složení povrchu vzorku. Zobrazovaná oblast je mnohem větší než u AFM, ale výstup je pouze dvojrozměrný. U AFM se obecně měří jen fyzikální vlastnosti a má malou zobrazovací oblast, kdy oproti SEM lze zobrazit plochu maximálně $150 \times 150 \mu\text{m}$. SEM má také lepší hloubku ostrosti a jeho měření je podstatně rychlejší než u AFM [22; 26]. Studie kombinující či porovnávající techniky SEM i AFM jsou velmi časté a shrnují jak výhody, tak nevýhody těchto technik [37; 39; 40; 44].

Obecně lze říci, že je AFM velice vhodnou metodou pro zobrazování prokaryotických buněk, neboť zachování nativního stavu a viability buněk představuje spolu s vysokým rozlišením obrazů a poměrně jednoduchou přípravou vzorku hlavní přednosti této metody. Jako výhodné se zdá být spojení AFM s jinými technikami pro dosažení podrobnějších informací a získání tak komplexního pohledu na prokaryotické buňky v nano-měřítku.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části bylo optimalizovat metodu měření buněk různých bakteriálních kmenů pomocí mikroskopie atomárních sil jak ve vzduchu, tak v kapalném prostředí. Důraz byl kladen především na přípravu reprodukovatelné imobilizace vzorků v kombinaci s volbou vhodného hrotu pro měření vybraných mikroorganismů. Měření bylo prováděno na přístroji NanoWizard 4 na Fakultě chemické VUT.

3.1 Použité chemikálie, přístroje a organismy

3.1.1 Chemikálie

Biotin (Sigma Aldrich Inc.)

CH₃Cl (Penta)

D-Fruktosa (Lach-Ner)

Glukosa (Lach-Ner)

H₂SO₄ (Sigma Aldrich Inc.)

Isopropylalkohol (Penta)

KH₂PO₄ (Lach-Ner)

K₂HPO₄/KH₂PO₄ (Lach-Ner)

Komplexní živné médium

Kyselina benzoová (Lach-Ner)

Kyselina kapronová (98 %, Carl Roth)

Lenox LB Broth (Sigma Aldrich Inc.)

MgSO₄·7 H₂O (Lach-Ner)

NaCl (Lach Ner)

Na₂HPO₄·12 H₂O (Lachema)

NaOH (Lachema)

(NH₄)₂SO₄ (Sigma Aldrich Inc.)

Nutrient Broth (Himedia)

Octan sodný (Penta)

Peptone (Himedia)

Poly-L-lysine hydrobromide (P6282, Sigma Aldrich Inc.)

Poly(ethyleneimine) solution (181978, Sigma Aldrich Inc.)

Roztok stopových prvků

SYN salts

Yeast extract powder (Himedia)

3.1.2 Přístroje

Analytické váhy, Boeco

Bruker/JPK NanoWizard 4 AFM

Centrifuga EBA 200

Laboratorní sklo a běžné vybavení laboratoře

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Magnetická míchačka MMS-3000, Biosan
Mikrocentrifuga Sigma 1-14, Sartorius
NanoPhotometr P3, IMPLEN
pH metr, XS Instruments
Plynový chromatograf, GC-FID, Thermo, TRACE 1300
Temperovaná třepačka Orbitah shaker ES-20, Biosan
Tlakový hrnec, Tefal
Vortex, Benchmixer V2

3.1.3 Testované hroty

MLCT – A, C (hroty z Si₃N₄ s průměrem 20 nm)
SNL – B (hrot z Si₃N₄ s průměrem 2 nm)
TESPA-V2 (křemíkový hrot s průměrem 7 nm)

3.1.4 Použité mikroorganismy

V experimentální části byly používány čtyři bakteriální kmeny, které (kromě jednoho – negativní kontrola *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴) mají schopnost akumulovat ve větší míře PHA. Nejpoužívanějším kmenem byl *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726, na kterém probíhaly všechny původní testy imobilizace. Zbylé testovací kmeny byly *Halomonas halophila* CCM 3662, získaný (stejně jako *C. necator* H16) z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně, dále mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ DSM 514 a *Rhodospirillum rubrum* DMS 467, oba z německé sbírky Liebnitz institutu (German Collection of Microorganism and Cell Cultures).

3.2 Kultivace

Bakteriální kmeny *Halomonas halophila*, *Cupriavidus necator* H16 a PHB⁻⁴ byly uchovávány v kryozkumavkách v 10 obj. % glycerolu jakožto kryoprotektantu, v celkovém množství 1,5 ml směsi v mrazáku při –80 °C. Bakterie *Rhodospirillum rubrum* se uchovávaly obdobným způsobem v 15 obj. % glycerolu. Jednotlivé kmeny vyžadovaly odlišné podmínky kultivace rozepsané níže.

3.2.1 *Cupriavidus necator* H16 a PHB⁻⁴

Pro kultivaci bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a PHB⁻⁴ byl připraven roztok Nutrient Broth (NB) podle návodu na koncentraci 25 g/l. Do Erlenmeyerových baněk (100 ml) bylo umístěno 50 ml připraveného NB o složení:

Beef extract	10 g/l
NaCl	5 g/l
Pepton	10 g/l

Takto připravené baňky se zazátkovaly a nechaly sterilovat v tlakovém sterilačním hrnci při teplotě 220 °C a polouzavřeném ventilu po dobu 30 minut. Po sterilaci proběhlo chlazení baněk s NB na laboratorní teplotu a následně naočkování média příslušnými kulturami

za sterilních podmínek v laminárním boxu. Každé inokulum se vždy kultivovalo po dvou vzorcích a do připravených baněk přišlo 300–750 μ l suspenze rozmrazených bakterií. Po zaočkování byly baňky s inokuly okamžitě umístěny do třepačky vyhřívané na 30 °C a kultivovány při 180 rpm.

Po 24hodinové kultivaci se přeočkovalo 5 ml (5 obj. %) inokula do nového, předem připraveného produkčního média s následujícím složením:

Destilovaná voda	1 l
KH ₂ PO ₄	1,02 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	11,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g

Po 100 ml takto nachystaného produkčního média bylo rozlito do Erlenmeyerových baněk (250 ml) a bylo vysterilováno obdobně, jak je zmíněno výše u sterilace NB. Po vychlazení bylo do média v očkovacím boxu ještě přidáno 100 μ l (1 ml/l) roztoku stopových prvků (MES) a 5 ml fruktosy o koncentraci 20 g/l, která zde plní roli zdroje uhlíku pro tvorbu PHA. Nakonec byly přidány jednodenní kultury (inokula). Tímto způsobem připravené baňky byly umístěny na třepačku při 30 °C, 180 rpm na dobu 72 h. Po uplynutí kultivační doby probíhal odběr vzorků pro měření na AFM. Roztok MES obsahoval následující složky:

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

3.2.2 *Halomonas halophila*

Pro tvorbu inokula bakterií *Halomonas halophila* se připravilo komplexní živné médium (CNM) o složení:

Destilovaná voda	1 l
Glukosa	1 g
NaCl	66 g
Peptone	15 g
Yeast extract powder	3 g

Příprava a kultivace inokula zde probíhala stejným způsobem jako u kmenu *C. necator*, jen s rozdílem použití CNM místo NB.

Po 24 hodinách kultivace následovalo opět přeočkování do produkčního média skládajícího se z těchto komponent:

Destilovaná voda	1 l
KH ₂ PO ₄	1,02 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	66 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	11,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g

Do Erlenmeyerových baněk (250 ml) se 100 ml vysterilovaného produkčního média obohaceného o NaCl bylo sterilně napipetováno 100 µl (1 ml/l) roztoku MES, 5 ml glukosy o koncentraci 20 g/l a 5 ml bakteriální kultury. Kultivace poté probíhala stejně jako u bakterií *C. necator*, na třepačce po dobu 72 h při 30 °C a 180 rpm. Následně probíhal odběr narostlých kultur.

3.2.3 *Rhodospirillum rubrum*

Bakterie se z kryozkumavek očkovaly na sterilní Petriho misky obsahující směs agaru o koncentraci 1,7 hm. % a LB broth skládající se ze čtyř složek:

Destilovaná voda	1 l
NaCl	5 g
Trypton	10 g
Yeast extract	5 g

R. rubrum se na takto připravených Petriho miskách kultivovalo 5 dní ve tmě při 30 °C. Poté se bakterie sterilně přeočkovávaly do 100 ml submerzního LB média v Erlenmeyerových baňkách (500 ml) a nechaly se kultivovat 3 dny na třepačce opět ve tmě při 30 °C a 160 rpm. Po uplynulé kultivaci se vždy měřila optická hustota (OD) narostlé kultury při 660 nm proti LB médiu jako blanku. Hodnota OD by se zde měla pohybovat okolo absorbance 1. Podle výsledné hodnoty OD se volí množství inokula, které se očkuje do produkčního média na počáteční hodnotu OD cca 0,1.

Pro AFM měření byly testovány tři verze produkčního média lišící se ve zdroji uhlíku. Základní složení média pro jednu kultivaci *R. rubrum* je:

Biotin	0,1 ml
Destilovaná voda	744 ml
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	0,5 ml
SYN salts	200 ml
Zdroj uhlíku	50 ml

Složení SYN salts na 1 l destilované vody:

CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,66 g/l
Chelated FeMo	50 ml
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,25 g/l
MOPS pufr	10,5 g/l
NH ₄ Cl	5 g/l

NiCl₂

5 ml

Připravený roztok se následně upravoval 30% roztokem NaOH na pH 7,1 a byl sterilován ve sterilizačním hrnci při otevřeném ventilu po dobu 30 minut při 220 °C.

Jako zdroj uhlíku byl použit acetát, fruktosa nebo hexanoát. Každý v takovém množství, aby celková koncentrace uhlíku ve 100 ml média odpovídala 100 mM. K tomu byly použity roztoky o koncentraci 340 mM pro hexanoát a fruktosu. V případě acetátu se použil 1 M roztok.

Po sterilním zaočkování bakterií do připravených médií s příslušným zdrojem uhlíku probíhala kultivace na třepačkách při 30 °C, 160 rpm a ve tmě. Odběry bakterií pro měření na AFM probíhaly po 24 a po 48 hodinách kultivace.

3.3 Charakterizace narostlých kultur

3.3.1 Optická hustota

Po kultivaci se provádělo měření optické hustoty (OD, z angl. *optical density*) narostlých kultur. Absorbance vzorku bakterií kmene *C. necator* a *H. halophila* se odečítala při vlnové délce 630 nm a pro *R. rubrum* při 660 nm. Měření probíhalo v plastových kyvetách obsahujících 1 ml vhodně naředěného vzorku a jako blank sloužila destilovaná voda či fosfátový pufr pro *R. rubrum*. Pro každou kulturu byla provedena dvě měření absorbance, která se poté zprůměrovala.

3.3.2 Plynová chromatografie

Množství PHA v biomase bylo určováno pomocí plynové chromatografie. Příprava vzorku probíhala následujícím způsobem: Nejprve se připravila biomasa na sušení, kdy z každé narostlé kultury byly odebrány dva vzorky po 10 ml do centrifugačních zkumavek a centrifugovány. Centrifugace probíhala po dobu 5 minut při 6000 otáčkách. Následně byl slit supernatant a sediment se rozsuspendoval v 10 ml destilované vody za pomoci vortexu. Takto připravené suspenze se znovu umístily do centrifugy na 6000 otáček a po 5 minutách centrifugace byl odlit supernatant. Odstředěná biomasa se umístila do sušárny na 70 °C, kde byla vysušena a následně zvážena na analytických vahách.

Do krimpovacích vialek bylo na analytických vahách naváženo 9–11 mg z předem vysušené biomasy, kdy se z každého vzorku připravila 1 vialka. Do každé připravené vialky se přidal 1 ml CH₃Cl a 0,8 ml vnitřního standardu složeného z 15% roztoku H₂SO₄ v methanolu a kyseliny benzeové o koncentraci 5 mg/ml. Takto připravené vialky byly uzavřeny pomocí krimpovacích kleští a umístěny do topného bloku na vialky, kde probíhala esterifikace po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C.

Po esterifikaci se obsah vychladlých vialek přelil do větších 4 ml vialek, kam bylo dále přidáno 0,5 ml 50 mM NaOH za účelem přečištění a neutralizace vzorku. Po protřepání se rozdělil obsah větších vialek na spodní organickou a horní vodnou fázi, kdy v sobě spodní fáze zahrnovala námi zkoumané produkty esterifikace PHA. Do dalších vialek bylo odebráno 50 µl organické fáze a smícháno s 900 µl isopropylalkoholu, čímž byly vzorky připravené pro následnou plynovou chromatografii.

3.4 Optimalizace metody přípravy vzorků pro měření na AFM

3.4.1 Příprava vzorků

Pro zobrazování vzorků bakterií na vzduchu a v kapalném prostředí pomocí AFM byly použity různé imobilizační postupy. Při volbě vhodné metody byl kladen důraz především na jednoduchost přípravy a kvalitu dané fixace. Příprava všech vzorků probíhala na skleněných podložních sklíčkách představujících substrát pro uchycení bakterií. Kontaminaci vzorků se předcházelo umístěním všech sklíček do sterilních Petriho misek. Veškerá manipulace se vzorky probíhala v rukavicích a co nejrychleji s minimálním otevíráním Petriho misek.

3.4.1.1 Zobrazování na vzduchu

Po kultivaci byly bakteriální kmeny 2× promyty fosfátovým pufrům (PBS) o složení:

Destilovaná voda	1 l
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,44 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Pro halofilní bakterie *H. halophila* bylo do PBS pufru ještě přidáno 66 g/l NaCl. Promyté bakterie byly následně zředěny 10×, 100×, 1000× a včetně neředěného vzorku bylo nanášeno 50 µl různě zředěných suspenzí buněk na sklíčka. Většina suspenze byla ze sklíčka ihned odsáta zpět do pipety a malá část vzorku, která na sklíčku zůstala, se nechala zaschnout v Petriho misce při laboratorní teplotě. Druhá varianta přípravy vzorku vyžadovala pouze 5 µl bakteriální suspenze rozprostřených na sklíčku pomocí pipety do kruhu o průměru 1 cm.

Totožné postupy byly provedeny také s destilovanou vodou místo PBS.

3.4.1.2 Zobrazování v kapalině

Pro měření mikroorganismů v kapalném prostředí bylo aplikováno několik postupů imobilizace za použití Poly-L-lysin hydrobromidu a Poly(ethyleniminu), zakoupených od společnosti Sigma Aldrich Inc. Po dvojnásobném promytí buněk v příslušném pufru byly bakterie skenovány při různém ředění v závislosti na OD narostlé kultury. Ředění kultur přitom zpravidla odpovídalo právě ředění, které vyhovovalo měření OD. I zde byla všechna sklíčka vždy uložena ve sterilních Petriho miskách, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků prachem či jinými nečistotami. Kromě použitých fixačních činidel byla též provedena imobilizace vysušením s následnou rehydratací prostým přelitím vysušených bakterií destilovanou vodou.

- **Poly-L-lysin**

Imobilizace pomocí Poly-L-lysinu (PLL) byla provedena s PLL ve formě Poly-L-lysin hydrobromidu, který byl podle instrukcí od výrobce naředěn na koncentraci 1 mg/ml. Fixace buněk pomocí PLL byla testována v několika variantách, které byly následně srovnány (viz níže a, b, c). Pro fixace byly použity suspenze bez ředění, s ředěním 10×, 100× a s ředěním podle OD (20× nebo 50×). Naředěný roztok PLL byl uchováván ve zkumavkách v množství 5 ml v mrazáku při -20 °C. Rozmrazení proběhlo vždy těsně před použitím a následně byl roztok

ihned vrácen zpět do mrazáku.

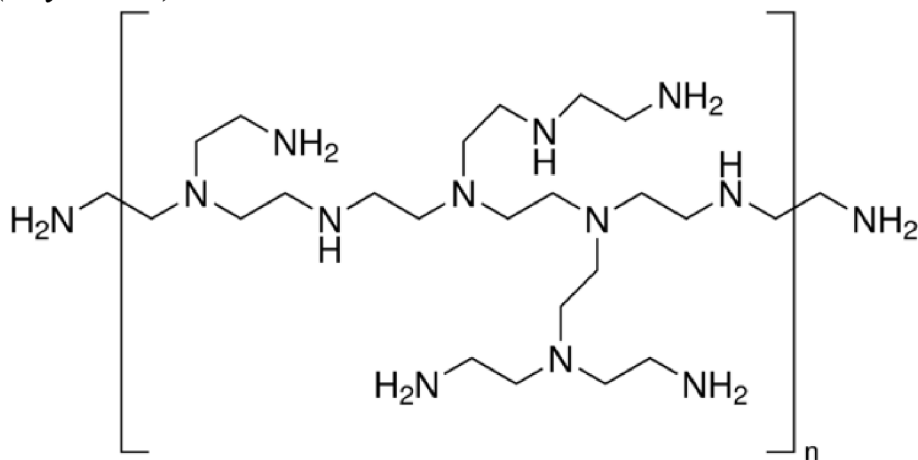
Testované imobilizační postupy:

a) Na podložní sklo bylo aplikováno 1 ml 0,01 mg/ml roztoku PLL. Sklíčko bylo umístěno do uzavřené Petriho misky, kde fixační činidlo působilo 5 minut a po uplynutí této doby bylo pečlivě opláchnuto destilovanou vodou. Před nanesením vhodně zředěné suspenze buněk se nechalo sklíčko 1 h a v druhé variantě 2 h schnout při laboratorní teplotě. 1 ml suspenze živých bakterií byl napipetován na zaschlý povrch podložního skla a po 5 minutách bylo sklíčko omyto 10 ml PBS, ihned umístěno do Petriho misky a zalito 20 ml PBS tak, aby bakterie nebyly vystaveny vysychání. Takto připravený vzorek byl poté podroben samotnému měření pomocí AFM.

b) 0,5 ml 0,01 mg/ml roztoku PLL se nechalo na podložním skle působit po dobu 1 h při laboratorní teplotě, následně bylo sklo omyto destilovanou vodou a ihned pokryto 1 ml bakteriální suspenze na dobu 1 h. Poté bylo sklíčko spláchnuto 10 ml příslušného pufru, uloženo zpět do Petriho misky a zalito 20 ml pufru, čímž byl vzorek připraven pro měření.

c) Další vzorek byl připraven tak, že se po nanesení a rozetření 20 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 70 μ l a 100 μ l 0,01% roztoku PLL nechalo činidlo zaschnout na podložním skle umístěném v sušárně rozeřáté na 50 °C. Po uschnutí povrchu na něj byla za laboratorní teploty napipetována suspenze bakterií (1 ml) na 30 min, která byla následně opláchnuta 10 ml pufru. Sklo bylo ihned uloženo do sterilní Petriho misky a zalito 20 ml příslušného pufru.

- **Poly(ethylenimin)**



Obrázek 4 Struktura použitého PEI

Dalším imobilizačním činidlem byl zvolen Poly(ethylenimin) (PEI) zakoupený ve formě 50 hm. % PEI v H₂O. Na obrázku 4 lze pozorovat primární, sekundární i terciální aminoskupiny, díky nimž vzniká vrstva polykationtů na skleněném substrátu.

Nejprve byl připraven 0,2% vodný roztok PEI, který byl v množství 1 ml aplikován na podložní sklo. Vzorek se nechal adsorbovat za laboratorní teploty po dobu 3 h, 6 h a 24 h. Poté bylo podložní sklo opláchnuto destilovanou vodou a ihned na něj byl napipetován 1 ml nezředěné bakteriální suspenze. Po jedné hodině byly neuchycené bakterie spláchnuty 10 ml PBS a sklíčko bylo zalito v Petriho misce 20 ml PBS.

3.5 Nastavení AFM pro měření

Pro měření jednotlivých bakterií byl zvolen QI™ mód, který by měl být nejšetrnějším a podle výsledků literární rešerše také nejvhodnějším režimem pro zobrazování živých buněk. Všechna měření byla prováděna při teplotě 25 °C. Nastavení přístroje pro měření v QI™ módu bylo následující:

Při výběru hrotu bylo nutné dbát na jeho parametry, které významně ovlivňují celé měření. Po nasazení vybraného hrotu do držáku a umístění do hlavy mikroskopu byl předem připravený vzorek položen na základnu mikroskopu. Po nasazení hlavy mikroskopu na základnu byla pomocí pozičních šroubů vybrána oblast pro skenování.

V programu JPK SPM Desktop byl vybrán mód QI™ Advanced Imaging, kdy bylo následně nutné zacílit laser na vybraný hrot a vyrovnat polohu detektoru tak, aby paprsek laseru mířil doprostřed čtyřkvadrantního detektoru. S vyrovnaným detektorem bylo potřeba v programu vybrat název čipu, na kterém se nacházel zvolený hrot, prostředí pro měření, teplotu okolí a předpokládanou výšku vzorku. Následně byla provedena kalibrace nosníku.

V případě zobrazování v kapalném médiu byl před kalibrací ponořen hrot s držákem do kapaliny nad vzorkem, kdy musela být upravena poloha zrcátka, a hrot byl hodinu smáčen pro ustálení signálu. Následovala již zmiňovaná kalibrace nosníku, která stanovila hodnotu *Setpoint* (sílu hrotu na vzorek).

V kartě *Acquire data* byly upraveny parametry *Setpoint*, *Z Speed* (rychlost skenování) a *Pixel Time* určující délku skenování jednoho pixelu. V neposlední řadě byla nastavena velikost skenované plochy, která mohla být až 100×100 μm, a celkové rozlišení a kvalita získaného obrazu pod názvem *Pixels*. Po finálním nastavení parametrů bylo spuštěno automatické přiblížení hrotu ke vzorku pomocí piezoelektrického efektu.

3.6 Měření mechanických vlastností

V rámci experimentálního měření byla provedena charakterizace mechanických vlastností bakterií kmene *Cupriavidus necator* H16 a *C. necator* PHB⁴. Měření bylo provedeno jak na vzduchu s vysušenými vzorky, tak v kapalném prostředí PBS. Nastavení mikroskopu bylo upraveno na delší dobu skenování (10 min na vzduchu a minimálně 20 min v PBS) za účelem získání kvalitních křivek přiblížení a retrakce, z jejichž průběhu by bylo možné určit Youngův modul či adhezi.

3.7 Zpracování výstupu měření

Snímky získané z měření byly následně vyhodnoceny a zpracovány prostřednictvím programu JPK Data Processing, konkrétně charakteristiky *Adhesion*, *Height a Slope Fit*. Každou tuto charakteristiku lze samostatně vybrat pro zpracování a upravovat. Snímky byly dále doplněny měřítkem či přímkou znázorňující vzdálenost dvou bodů. QI™ mód také umožňuje zpracovat křivky naměřené během skenování. Ze získaných křivek byla vypočítána adheze vzorku a Youngův modul.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální část této bakalářské práce byla provedena na základě teoretických poznatků získaných z literární rešerše. Cílem práce bylo seznámit se s mikroskopem atomárních sil a zvolit vhodný mód, použitelný pro zobrazování buněk vybraných bakteriálních kmenů. Kromě volby módu byly porovnávány hroty s různými charakteristikami, které by co nejméně poničily bakterie, ale zároveň aby bylo dosaženo snímků s vysokým rozlišením. Pro měření byly testovány a hodnoceny také odlišné imobilizační postupy s využitím vícero fixačních činidel. Každý bakteriální kmen byl též charakterizován z hlediska množství akumulovaných PHA a narostlé biomasy.

4.1 Charakteristika měřených bakteriálních kmenů

4.1.1 Optická hustota

Optická hustota jednotlivých bakteriálních suspenzí byla získána podle postupu, který je popsán v kapitole 3.3.1. Z výsledků naměřené optické hustoty jednotlivých kultur bylo následně vyhodnoceno další ředění pro analýzu pomocí AFM. Jako nejvhodnější bylo experimentálně zvoleno použití stejného ředění pro AFM jako pro měření hodnoty OD.

Bakterie *C. necator* H16 byly zvoleny pro svou vysokou produkci PHB. Jak lze vidět v tabulce 1, pro bakterie *C. necator* H16 byly naměřeny nejvyšší hodnoty optické hustoty a po 72 h kultivace vykazovaly největší koncentraci buněk v suspenzi. U negativní kontroly (*C. necator* PHB⁻⁴) byly naměřeny zřetelně nižší hodnoty OD poukazující na menší narostlou biomasu (1,40 a 1,45 g/l). Jejich výsledné ředění se také odpovídajícím způsobem lišilo. O něco více než *C. necator* PHB⁻⁴ narostl bakteriální kmen *H. halophila*, u kterého též stačilo ředění 20×. U této bakterie se muselo dávat pozor na salinitu prostředí a v rámci měření na AFM byl testován vliv vysoké salinity prostředí (66 g/l NaCl) na průběh skenování. Dále byly analyzovány bakterie kmene *R. rubrum* rostoucí na třech různých substrátech, kdy byl porovnáván vliv výběru substrátu na množství narostlé biomasy. Hodnoty OD jsou zde násobně vyšší pro 48 h kultivaci, kdy musela být bakteriální suspenze 10× ředěna, oproti 24 h kultivaci, kdy ředění nebylo potřeba. Výběr substrátu měl také vliv na rozmanitost množství vyprodukovaného PHB, které se charakterizovalo pomocí plynové chromatografie.

Tabulka 1 Optická hustota jednotlivých bakteriálních kmenů

Vlnová délka	Bakteriální kmen	Substrát	Měření AFM	Stáří	OD	Ředění
630 nm	<i>C. necator</i> H16	Fruktosa	na vzduchu	72 h	44,35	50×
	<i>C. necator</i> PHB ⁻⁴	Fruktosa	na vzduchu	72 h	3,56	20×
	<i>C. necator</i> H16	Fruktosa	v PBS	72 h	38,85	50×
	<i>C. necator</i> PHB ⁻⁴	Fruktosa	v PBS	72 h	3,45	20×
	<i>H. halophila</i>	Glukosa	na vzduchu i v PBS	72 h	8,51	20×
660 nm	<i>R. rubrum</i>	Acetát	na vzduchu i v PBS	24 h	0,84	neředěno
	<i>R. rubrum</i>	Fruktosa	na vzduchu i v PBS	24 h	0,42	neředěno
	<i>R. rubrum</i>	Hexanoát	na vzduchu i v PBS	24 h	0,23	neředěno
	<i>R. rubrum</i>	Acetát	v PBS	48 h	2,52	10×
	<i>R. rubrum</i>	Fruktosa	v PBS	48 h	4,31	10×
	<i>R. rubrum</i>	Hexanoát	v PBS	48 h	1,94	10×

4.1.2 Plynová chromatografie

Data z plynové chromatografie byla získána podle postupu popsaného v kapitole 3.3.2 a charakterizují množství PHB akumulovaného v jednotlivých bakteriálních kmenech. Tyto výsledky představují klíčovou informaci ke zhodnocení snímků získaných pomocí AFM. U bakterií s vysokým množstvím vyprodukovaného PHB lze totiž předpokládat vyšší profil, případně rozdílnou topografii povrchu buňky.

Tabulka 2 Množství biomasy a koncentrace PHB v g/l a v % suché biomasy pro jednotlivé bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Stáří	Měření AFM	Biomasa (g/l)	PHB (g/l)	PHB
<i>C. necator</i> H16	72 h	na vzduchu	9,11	8,57	94,1 %
<i>C. necator</i> PHB-4	72 h	na vzduchu	1,45	0,01	0,7 %
<i>C. necator</i> H16	72 h	v PBS	8,98	7,49	83,4 %
<i>C. necator</i> PHB-4	72 h	v PBS	1,40	0,01	0,7 %
<i>H. halophila</i>	72 h	na vzduchu i v PBS	1,49	0,65	43,6 %
<i>R. rubrum</i> (acetát)	24 h	na vzduchu i v PBS	0,07	0,02	28,6 %
<i>R. rubrum</i> (fruktosa)	24 h	na vzduchu i v PBS	0,03	nestanoveno	nestanoveno
<i>R. rubrum</i> (hexanoát)	24 h	na vzduchu i v PBS	0,02	nestanoveno	nestanoveno
<i>R. rubrum</i> (acetát)	48 h	v PBS	0,55	0,07	12,7 %
<i>R. rubrum</i> (fruktosa)	48 h	v PBS	0,86	0,01	1,2 %
<i>R. rubrum</i> (hexanoát)	48 h	v PBS	0,66	0,03	4,5 %

Jak je vidět v tabulce 2, tak největší množství PHA se prokázalo u kmene *C. necator* H16. Nejnižší množství PHB pak bylo zaznamenáno u *C. necator* PHB⁻⁴, což odpovídá předpokladům. Díky tomuto velkému rozdílu v množství PHB mohly být porovnávány bakterie stejného kmene (s různou produkcí PHB) pomocí AFM.

H. halophila obsahovala po 72 h kultivace 43,6 % PHB, kdy množství narostlé biomasy bylo podobné jako u *C. necator* PHB⁻⁴. Jak již bylo zmíněno, u tohoto bakteriálního kmene šlo především o prověření vlivu salinity na průběh měření na AFM. Výsledky z GC poté byly využity pro porovnání vlivu množství naakumulovaného PHB na výšku a topografii bakterií. Bakterie kmene *R. rubrum* rostoucí na fruktose a hexanoátě neměly po jednodenní kultivaci dostatečné množství biomasy, a proto je nebylo možné analyzovat pomocí plynové chromatografie. I přesto se časné kultivační hodiny využily pro měření na AFM skrze zjištění vlivu substrátu na samotnou morfologii buněk a pro porovnání této morfologie se staršími kulturami.

Vliv akumulovaného PHB na výšku buňky se hodnotil především u kultur o stáří 48 h. Nejvyšší množství vyprodukovaného PHB bylo potvrzeno u bakterie *R. rubrum* rostoucí na acetátě s koncentrací 0,07 g/l (12,7 % PHB suché biomasy). Po 48 h kultivace byla nejnižší koncentrace PHB naměřena u kultur rostoucích na fruktose, kde však narostlo největší množství biomasy.

4.2 Optimalizace měření zvolených bakteriálních kmenů na vzduchu

Jak už bylo zmíněno výše, pro měření bakteriálních buněk pomocí AFM na vzduchu je velmi důležitá imobilizace samotného vzorku, výběr vhodného hrotu a zvolené parametry měření.

4.2.1 Imobilizace

Imobilizace na vzduchu probíhala vysušením nanesené suspenze buď v PBS nebo v destilované vodě na podložní sklo. Vzorke obsahující PBS byly v tomto případě nepoužitelné, jelikož se při vysychání suspenze začaly tvořit krystaly solí obsažených v pufru. Tato skutečnost znamenala, že se pomocí AFM nepodařilo získat žádný snímek bakterie.

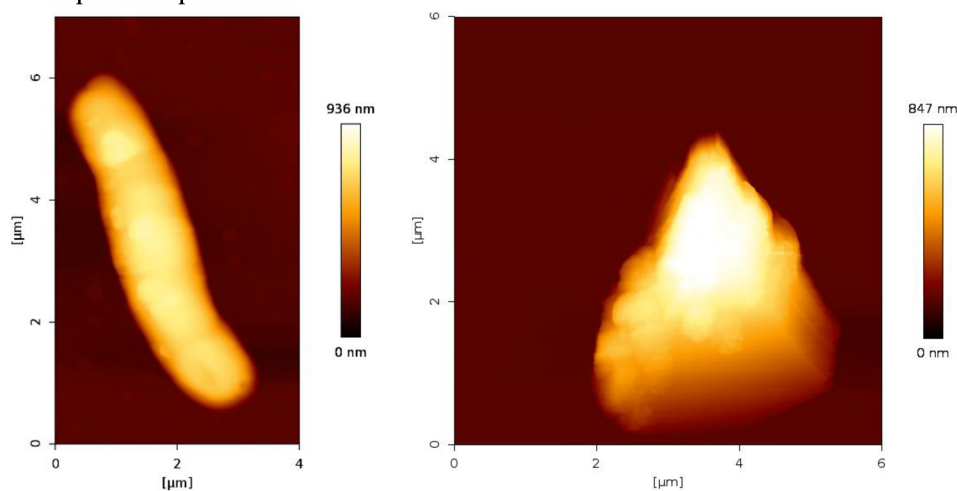
Naproti tomu vzorky bakterií suspendovaných v čisté vodě dokonale vyschly a na sklíčku nebyly pozorovány žádné rušivé elementy. Podle vybraného ředění se často vytvořila zakalená skvrna, která indikovala oblast pro skenování. V tomto případě se u všech skenovaných bakterií prokázalo nejvhodnějším ředění 10 \times . Neředěné vzorky obsahovaly příliš mnoho bakterií a povrch byl velmi členitý a vysoký, protože bakterie byly hustě u sebe a překrývaly se. Naopak vyšším ředěním bylo dosaženo nízkého počtu bakterií ve skenovací oblasti.

Pro přípravu vzorků byl preferován postup s rozetřením 5 μ l suspenze na průměr kruhu 1 cm. Tato varianta totiž pracovala s menším množstvím suspenze, ale kvalitní snímky byly získány v obou případech.

4.2.2 Výběr hrotu

Při měření na vzduchu byly testovány různě opotřebené hroty TESP-V2, kde se na čipu nachází vždy pouze jeden nosník s hrotem. Výrobce uváděná hodnota *Spring Constant* neboli konstanta tuhosti nosníku je 42 N/m. Zmíněný hrot je vhodný především pro měření v pokleповém módu při zobrazování na vzduchu. Nejprve byly použity úplně nové hroty, které však byly příliš „tuhé“, během měření docházelo k ničení bakteriálních povrchů a výsledkem byly snímky poničených bakterií (viz obrázek 5). Teprve po dostatečném opotřebenování hrotu a jeho „otupění“ se podařilo získat snímky neponičených bakterií. V tomto případě hrot po kalibraci vykazoval konstantu tuhosti jen 23 N/m.

Pro měření na vzduchu bylo také testováno použití hrotu měkčího již z výroby, a to konkrétně SNL – B s konstantou tuhosti 0,12 N/m, ale přístroj po spuštění sken okamžitě zastavil a nešlo v měření dále pokračovat. To mohlo být způsobeno tím, že je zmíněný hrot specifikován pro měření v kapalném prostředí.



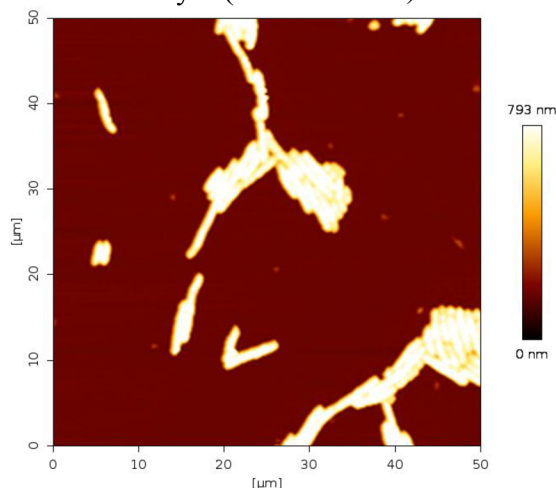
Obrázek 5 Snímek bakterie *C. necator* H16 neporušené (vlevo) a mechanicky porušené během měření (vpravo)

4.2.3 Nastavení parametrů měření

Předpokládaná výška vzorku byla při střední adhezi nastavena na 500 nm. Hodnota *Setpoint* byla vždy při měření hrotem TESP-V2 ponechána podle kalibrace a pohybovala se v rozmezí 60–90 nN. Stejně tak se pro měření nijak neupravovala přednastavená hodnota *Z lenght*, jejíž hodnota byla většinou 300 nm. Ukázalo se, že je nejlepší udělat prvotní sken většího rozsahu (např. 50×50 μm) s nižším rozlišením. A pro další skeny již byly vybírány konkrétní bakterie a velikost rozlišení byla volena buď 256×256 pixelů, nebo 512×512 pixelů. Časově zabralo poslední zmíněné rozlišení asi třikrát delší dobu než rozlišení 256×256 pixelů, konkrétně kolem 30 minut.

4.2.4 Výsledky

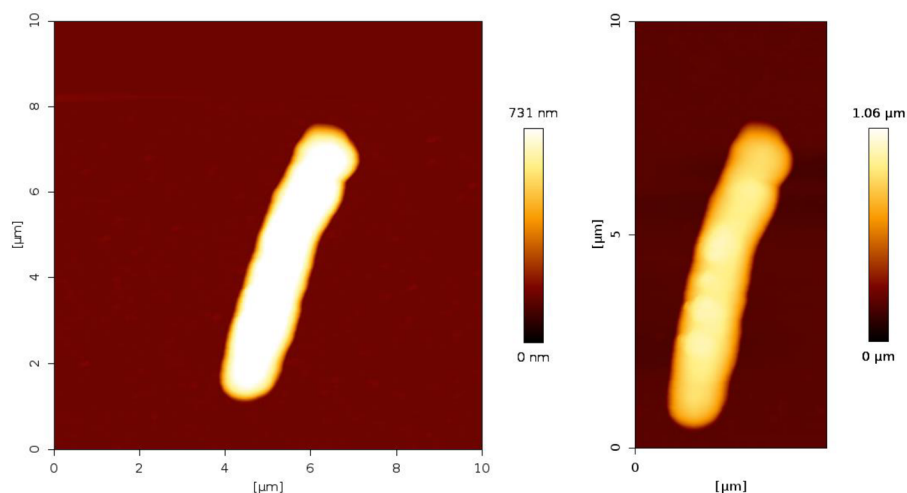
Výsledné snímky bakterií byly v programu JPK Data Processing upraveny a opatřeny osami i stupnicí udávající výšku ve směru osy z (viz obrázek 6).



Obrázek 6 *Cupriavidus necator* HI6 na velkém skenu 50×50 μm

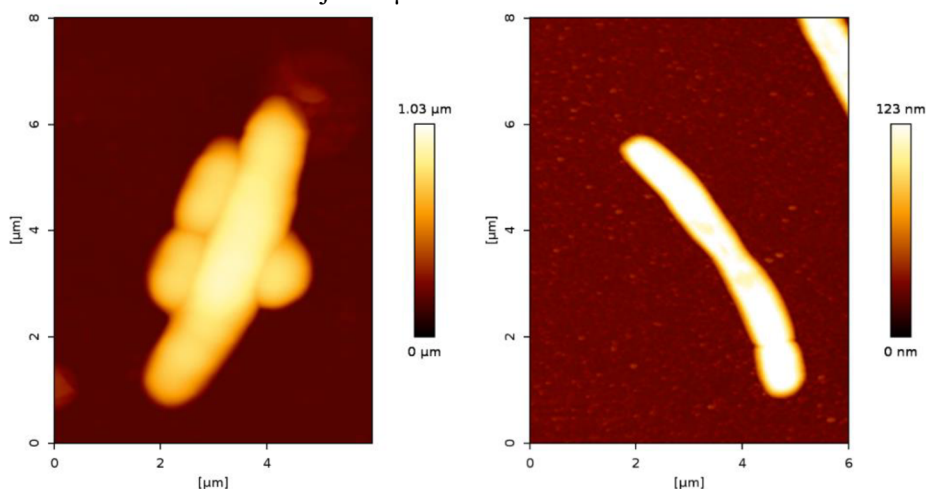
U osamocených bakterií natočených kolmo ke směru skenování byly provedeny podrobnější skeny, které můžeme vidět na následujících obrázcích. Bylo důležité volit kolmo natočené bakterie, aby se zamezilo vzniku nežádoucích fragmentů a artefaktů při měření. Jak bylo zmíněno výše v kapitole 4.2.14.2.1, všechny snímky byly pořízeny při ředění bakteriální suspenze 10×.

Na následujícím obrázku 7 lze pozorovat porovnání různého rozlišení při skenování jedné bakterie. Jak je vidět, tak rozlišení 256×256 pixelů (obrázek 7 vlevo) oproti rozlišení 512×512 pixelů (obrázek 7 vpravo) je naprosto postačující, a proto bylo toto rozlišení i nadále používáno pro skenování jednotlivých bakterií.



Obrázek 7 Snímky bakterie *C. necator* H16 při rozlišení 256×256 (vlevo) a 512×512 pixelů (vpravo)

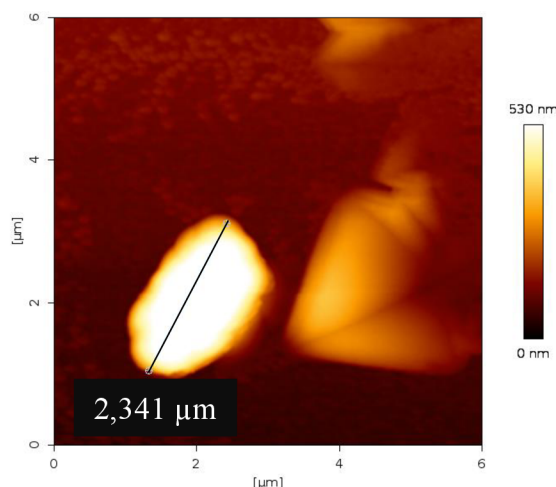
Výše vyobrazená bakterie *Cupriavidus necator* H16 se řadí mezi producenty PHA. Snímky z AFM zde ukazují topografii jejího povrchu. Jak již bylo dříve zmíněno, výška bakterie je ovlivněna především množstvím akumulovaných PHA, a tedy i velikostí granulí. Při srovnání snímků *C. necator* H16 s obrázkem mutantní bakterie *C. necator* PHB⁻⁴, která není schopna produkovat PHA, se jejich výška i členitost povrchu značně liší, což je viditelné na obrázku 8. Zde je rozdíl mezi reálnými výškami oskenovaných bakterií konkrétně 600 nm, kdy zde zobrazená bakterie *C. necator* H16 má maximální naměřenou výšku 710 nm. Při srovnání snímků s odpovídajícími výsledky plynové chromatografie, kdy pro *C. necator* H16 vyšlo množství PHB na 94,1 % suché biomasy a pro *C. necator* PHB⁻⁴ vyšlo 0,7 %, je jasně patrný vliv vyprodukovaných PHB na výšku vzorku. Z obrázku je též viditelný rozdíl v mohutnosti bakterií, kdy *C. necator* H16 působí plnějším, více zavalitým dojmem s šířkou 1,5 μm v nejširším místě. Naproti tomu *C. necator* PHB⁻⁴, postrádající PHB granule, je mnohem tenčí s malou výškou a maximální šířkou jen 1 μm.



Obrázek 8 Bakterie *Cupriavidus necator* H16 (vlevo) a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ (vpravo)

Dále byl skenován bakteriální kmen *H. halophila*, taktéž akumulující PHA. Na následujícím obrázku 9 lze pozorovat rozměry a tvar této bakterie ve vysušené formě. Ze značné výšky bakterie můžeme soudit přítomnost PHB granulí, což potvrzují i výsledky z plynové chromatografie, kde vyšlo množství PHB na 43,6 %. V porovnání s *C. necator* H16 je to

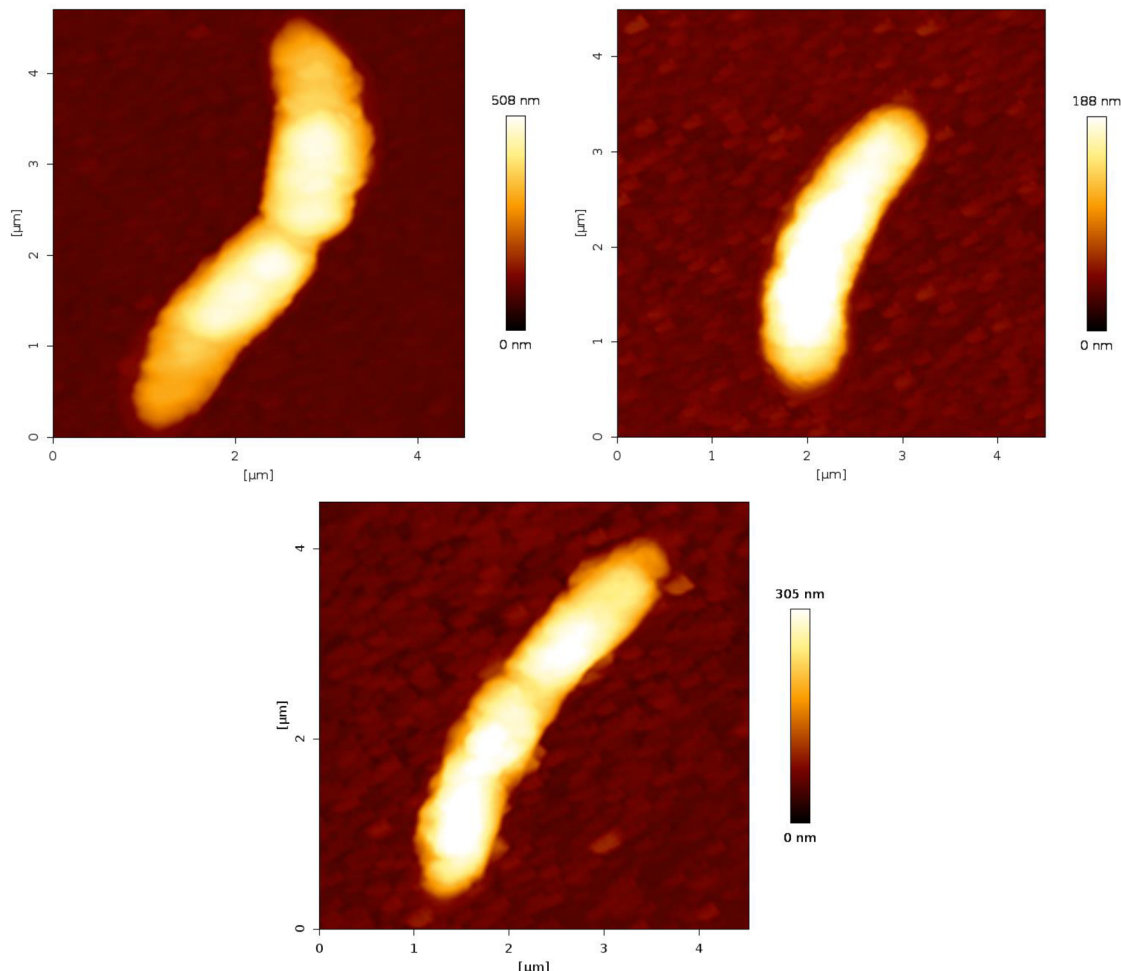
o 50,5 % méně obsahu PHB v biomase. Reálná maximální výška bakterie na obrázku 9 je 513 nm, což je už jen o 200 nm méně než maximální výška *C. necator* H16 na obrázku 8. Při přípravě vzorku vysušené bakterie *H. halophila* byla opět bakteriální suspenze promyta 2× v destilované vodě za účelem odstranění jednak metabolitů a nečistot, ale také nadbytečné soli, která byla v kultivačním médiu ve velkém množství. Vzorek tedy vysychal v suspenzi s destilovanou vodou, ale jak je možné pozorovat na obrázku 9, tak se vedle bakterie pravděpodobně nachází krystal z použitého pufru. Tyto reziduální krystaly byly pozorovány v přítomnosti všech skenovaných bakterií. Pro odstranění krystalů je tedy nejspíše potřeba suspenzi vícekrát promýt destilovanou vodou. Celkově se zdá, že krystaly výrazně neovlivnily morfologii skenovaných bakterií. Větší vliv mělo pravděpodobně jejich vysušení. Naměřené bakterie se též zdají menší, než by měly být [45]. Vzhledem ke statistické významnosti by však bylo potřeba proměřit větší množství buněk.



Obrázek 9 Snímek $6 \times 6 \mu\text{m}$ bakterie *Halomonas halophila* s naznačenou délkou buňky

V neposlední řadě byly ve vysušeném stavu skenovány kultury *Rhodospirillum rubrum* staré 24 h, kultivované v různých substrátech (viz kapitola 3.2.3.). Odlišné substráty byly voleny pro zjištění nárustu biomasy a produkce PHA při různých podmínkách kultivace. Po 24 h bakterie pravděpodobně ještě neobsahovaly větší množství PHA granulí, protože jejich výškový profil není tak výrazný, což ukazuje snímek 10. Pro zjištění hodnoty OD tyto kultury nemusely být ředěny. Nejvyšší koncentrace buněk v suspenzi byla naměřena při kultivaci na acetátě s $\text{OD} = 0,84$. U této kultury bylo také zjištěno, že obsahuje 28,6 % PHB. *R. rubrum* rostoucí na acetátě má z použitých substrátů nejvyšší profil s maximální výškou 397 nm. Z obrázku 10 (vlevo nahoře) je též znatelné mírné zahnutí dvou bakterií a nelze si nevšimnout, že obě bakterie mají většinu hmoty nahromaděnou v koncových částech buněk. Pro bakterie rostoucí na acetátě byla naměřena hodnota $\text{OD} = 0,42$. Je tedy druhou nejvíce koncentrovanou kulturou *R. rubrum*, kdy však neposkytla dostatečné množství biomasy pro charakterizaci pomocí GC. Výška bakterie zobrazené na snímku 10 vpravo nahoře je 182 nm a lze předpokládat jen velmi malé množství vyprodukovaného PHB. Při porovnání této bakterie s bakterií *C. necator* PHB⁻⁴ (viz obrázek 8 vpravo) se maximální výška liší jen o 72 nm. U *R. rubrum* rostoucí na fruktose je též patrné větší zahnutí buňky s pravidelně rozloženým obsahem. Nejmenší koncentrace buněk v suspenzi byla naměřena u bakterií *R. rubrum*, jejichž kultivace probíhala v hexanoátě. Hodnota optické hustoty činila 0,23 a stejně jako u bakterií rostoucích na fruktose nebyla

změřena koncentrace PHB z důvodu malého množství biomasy. Maximální výška vysušených *R. rubrum* na hexanoátě byla 266 nm a z těchto dat lze odhadovat, že tyto bakterie obsahovaly více PHB než v případě použití fruktosy. Na snímku 10 dole jsou vidět pravděpodobně dvě bakterie s minimálním zahnutím. Kromě použitého substrátu mohlo mít na morfologii vliv i vysušení bakterií, proto proběhly další skeny v kapalném prostředí s živými bakteriemi.



Obrázek 10 Snímky $4,5 \times 4,5 \mu\text{m}$ bakterie *R. rubrum* rostoucí na acetátě (vlevo nahoře), na fruktose (vpravo nahoře) a na hexanoátě (dole)

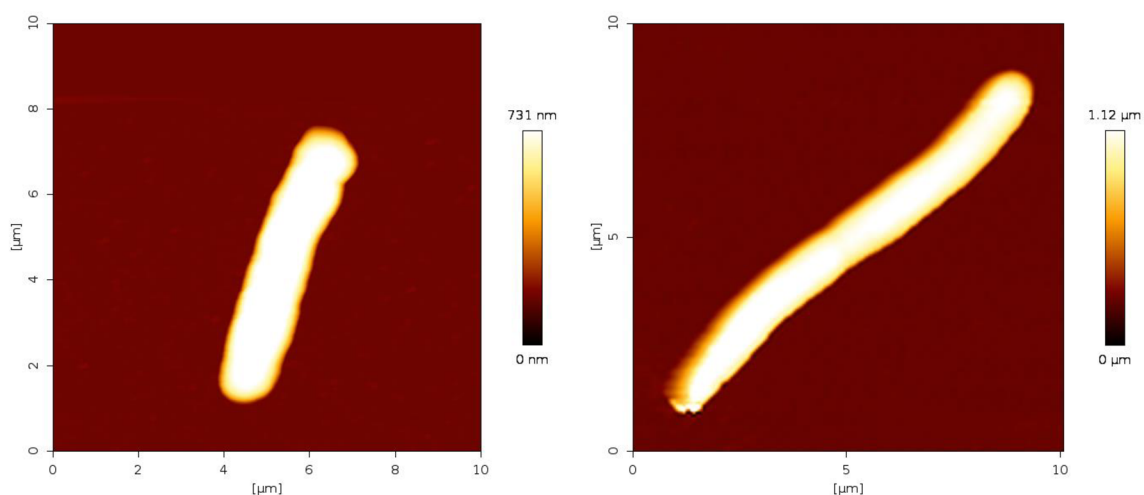
4.3 Optimalizace měření bakteriálních kmenů v kapalině

Měření bakterií v kapalném prostředí představuje způsob, jak sledovat živé bakterie za fyziologických podmínek. Umožňuje to též srovnat výsledky s vysušenými bakteriemi a sledovat změny morfologie spojené s vysušením. Měření v kapalinách je náročnější z hlediska přípravy vzorku a časové náročnosti celého měření. Podstatná pro úspěch měření je zde volba optimálního postupu imobilizace a výběr vhodného hrotu.

4.3.1 Imobilizace

Nejprve byl proveden pokus s imobilizací vysušením a následným přelitím vysušených bakterií destilovanou vodou. Tato imobilizace se zdála jako slibná, protože bakterie během měření téměř nedriftovaly z měřené polohy. Snímky byly provedeny s $10\times$ zředěnou bakteriální suspenzí. Tento pokus byl proveden pouze s *Cupriavidus necator* H16. Měřené bakterie byly

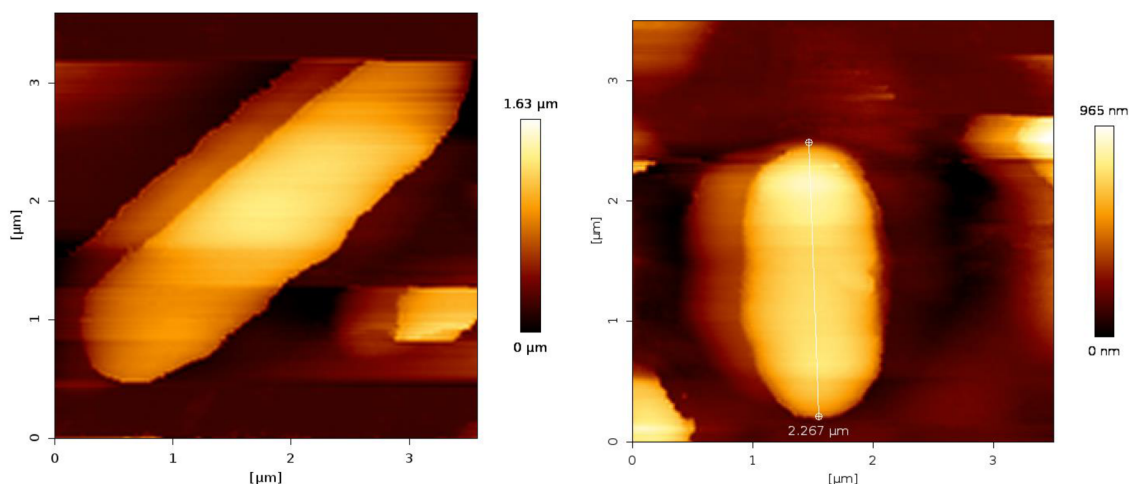
sušené týden a zdají se být o něco tenčí než čerstvě vysušené bakterie měřené ihned po vyschnutí na vzduchu (viz obrázek 11). Je možné, že čerstvě vysušené bakterie si ještě ponechaly určitou část intracelulární vody a zachovaly si původní tvar. Naproti tomu byly rehydratované bakterie o asi 100 nm vyšší, což mohlo být způsobeno počátečním rozdílem ve výšce těchto dvou bakterií. Další možností je, že při rehydrataci bakterie nasála větší množství vody a tím vznikl zmiňovaný rozdíl ve výšce. Pro skenování v kapalině zde byl úspěšně testován hrot SNL – B s větší pružností nosníku.



Obrázek 11 Sken bakterie *C. necator* H16 na vzduchu pomocí hrotu TESPA-V2 (vlevo) a sken jiné bakterie *C. necator* H16 po rehydrataci pomocí hrotu SNL – B (vpravo)

4.3.1.1 Imobilizace pomocí PEI

U této imobilizace byly testovány různé časy adsorpce 0,2% roztoku PEI na skleněný povrch (viz kapitola 3.4.1.2). Fixace byla provedena na základě dvou článků, kde skupina Velegol et al. využila adsorpce roztoku PEI o koncentraci 0,2 % po dobu 3–5 h a skupina Greif et al. použila adsorpci 0,1% roztok PEI po dobu 30 min, kdy v obou publikovaných experimentech byla fixace úspěšná [36; 37]. V námi realizovaných experimentech byly po 3 hodinách adsorpce PEI provedeny jen větší skeny bakterií, protože vybraná bakterie se při bližším skenování vždy z fixace uvolnila, jak lze vidět na obrázku 12 vlevo. Stejný problém byl pozorován i při 24hodinové adsorpci. Nejpevněji fixovány byly bakterie po 6hodinové adsorpci PEI (viz obrázek 12 napravo). Z důvodu časové náročnosti však tento způsob imobilizace nebyl v následujících experimentech používán. Všechny skenované bakterie byly navíc „zdvojené“, což mohlo být způsobené vadou použitého hrotu nebo snahou bakterie se během skenování pohybovat, což by svědčilo o nedostatečné imobilizaci. Ve zmiňovaném článku skupiny Velegol et al. byl řešen stejný problém se „zdvojením“ nebo „stínem“ bakterií. Jejich vysvětlení spočívalo v geometrii hrotu, který nezvládl spolehlivě oskenovat vysokou bakterii. Průměrná výška jimi skenovaných bakterií *Escherichia coli* byla 0,75–1,2 μm [36]. Podle obrázku 12 lze předpokládat podobnou výšku zde měřených bakterií *C. necator* H16, kde jich navíc lze vidět více u sebe, což je důsledek nedostatečného ředění bakteriální suspenze (10×). Malé ředění tu bylo použito pro zvýšení pravděpodobnosti zafixování bakterií, ale pro použití Poly-L-lysinu již bylo ředění zoptimalizováno.



Obrázek 12 Imobilizace pomocí PEI při 3hodinové (vlevo) a 6hodinové (vpravo) adsorpci

4.3.1.2 Imobilizace pomocí PLL

Z metod vyjmenovaných a popsanych v kapitole 3.4.1.2 byl po proměření všech variant zvolen jako optimální postup c). Tedy nechat roztok PLL zaschnout na podložním skle a následně na něj aplikovat na půl hodiny suspenzi bakterií. Minimální množství potřebné k dostatečné fixaci bakterií, které bylo aplikováno na podložní sklo, bylo stanoveno na 100 μl pro všechny bakterie. Toto množství schlo v sušárně při 50 °C zhruba 1 hodinu. Inspirací k tomuto postupu byly články skupiny Bolshakova et al. a Lonergan et al. [30; 35]. V obou člancích byl postup proveden se zaschnutím roztoku PLL buďto na slídě nebo na podložním skle. V obou případech byla imobilizace úspěšná. Skupina Lonergan et al. ji dokonce vyhodnotila jako lepší než fixaci želatinou [35].

U zbylých dvou variant fixace, tedy a) a b), se neuchytily žádné bakterie ani při opakovaných pokusech. Imobilizace a) byla provedena na základě článku od Benn et al. využívající jen krátké adsorpce PLL na substrát [32]. V postupu použili k sušení sklíček po adsorpci a omytí dusík, kdežto v námi realizovaném experimentu byla sklíčka ponechána schnout v Petriho miskách při laboratorní teplotě. V článku zmiňují vliv složení kapalného prostředí a druh bakteriálního kmene na celkovou imobilizaci. Celkově hodnotili tento postup imobilizace kladně s vysokou viabilitou bakterií. Nutno také podotknout, že v článku použili jinou formu PLL než v našem případě, a to P4832 od Sigma Aldrich Inc., což nejspíš mělo vliv na výše uvedený neúspěch této imobilizace.

Článek, který byl inspirací pro fixaci b), se věnoval porovnání želatiny a PLL o různých molekulových hmotnostech [34]. Všechna činidla byla nanášena na slídu. Použité roztoky PLL měly jinou molekulovou hmotnost než roztok použitý v této bakalářské práci (70 000–150 000). Na rozdíl od postupu v tomto článku, kdy byly bakterie na ošetřené sklíčko ponechány pouze 10 min, byla v našem případě ponechána bakteriální suspenze na sklíčko hodinu. Ani tato úprava však neposkytla dostatečné podmínky pro fixaci buněk.

4.3.2 Výběr hrotu

Při výběru ideálního hrotu pro skenování živých bakterií hrála roli především ohebnost nosníku a velikost hrotu (viz tabulka 3). Pro měření byly porovnávány nosníky typu SNL a MLCT (oba

obsahující hroty složené z nitridu křemičitého). Na SNL disku byl testován jeden hrot z celkových čtyř, a to hrot B s konstantou tuhosti 0,12 N/m. Celkově se hroty s konstantou tuhosti pohybující se okolo 0,1 N/m zdály pro měření bakterií vhodné. Z toho důvodu byl také na disku MLCT nejvíce testován hrot A s konstantou 0,07 N/m, díky kterému bylo získáno velké množství obrázků. Hrot MLCT – C neposkytl výsledek žádný (0,01 N/m), kvůli chybě způsobené nejspíše nízkou nastavenou charakteristikou *Setpoint*. Tento hrot měl také nejnižší *Spring constant* ze všech hrotů na disku, a i to mohlo být důvodem, proč se analýza s jeho využitím nezdařila.

Tabulka 3 Srovnání použitých hrotů

Čip	Hrot	<i>Spring constant</i> (N/m)	Průměr hrotu (nm)	Použití
TESPA-V2	TESPA-V2	42	7	vzduch
SNL	B	0,12	2	kapalina
MLCT	A	0,07	20	kapalina
	C	0,01	20	kapalina

4.3.3 Nastavení parametrů měření

Při nastavené hodnotě adheze na „střední“ byla předpokládaná výška vzorku nastavena na 1 μm . Charakteristika *Setpoint* se po kalibraci hrotu SNL – B nechávala na přednastavené hodnotě. Měnila se vždy jen po kalibraci hrotu MLCT – A, protože bylo zjištěno, že software zde nastavuje *Setpoint* příliš nízký (0,12–0,18 nN) a hrot se není schopen přiblížit k povrchu vzorku. Ideální hodnota *Setpoint* je pro začátek měření bakterií 0,4–0,5 nN. Pro menší skeny jednotlivých bakterií byly hodnoty (po prvotním přiblížení hrotu ke vzorku) upraveny nejčastěji na 0,2 nN. Toto nastavení bylo pro bakterie nejšetrnější a ty se během skenování nepohybovaly.

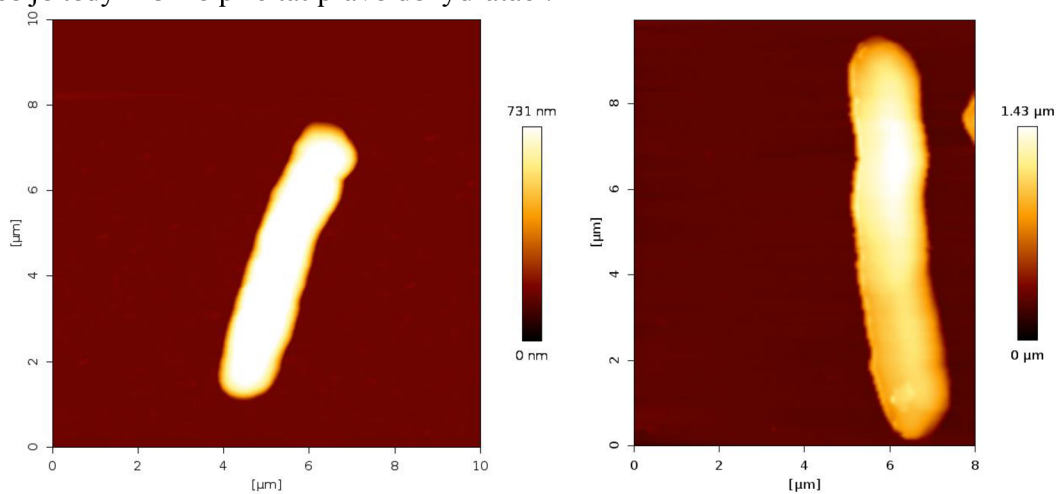
První sken při měření v kapalném médiu byl vždy $10 \times 10 \mu\text{m}$ za přednastavené hodnoty *Z length*. Takto malý sken se volil za účelem ověření výšky vzorku a předejití destrukce hrotu. Další skenování probíhalo stejným způsobem jako měření na vzduchu (viz kapitola 4.2.3). U malých skenů bylo voleno rozlišení 256×256 pixelů.

4.3.4 Výsledky

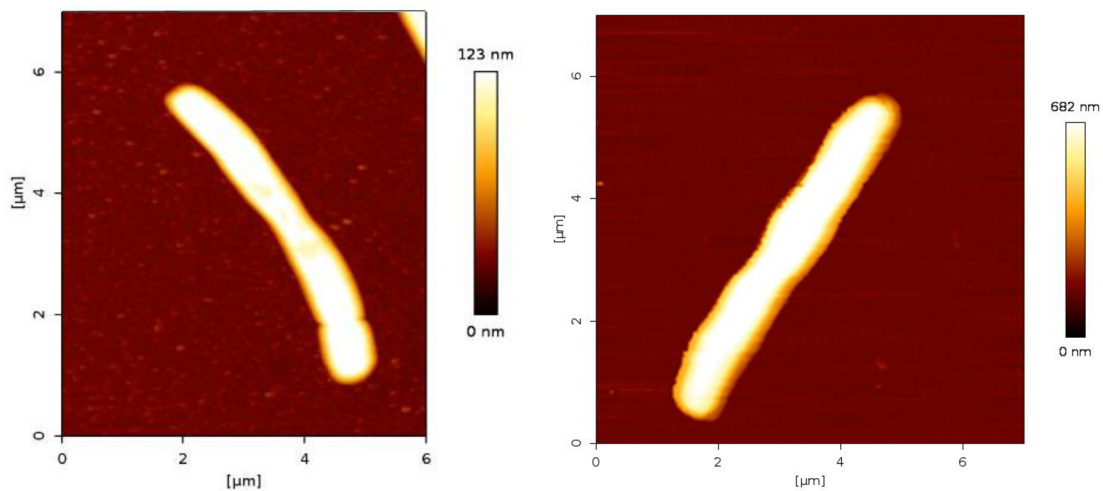
Podle předpokladu byly bakterie skenované v kapalném prostředí vyšší než bakterie skenované na vzduchu, u nichž došlo ke ztrátě výrazného podílu intracelulární vody vysušením. Pro získání kvalitních snímků v kapalném prostředí musela být na rozdíl od měření na vzduchu optimalizována především imobilizace, kdy se osvědčilo nechat zaschnout roztok PLL o koncentraci 0,01 mg/ml na podložním skle, kam se následně adsorbovaly bakterie. Takto připravené vzorky vydržely i opakované měření bez odtržení bakterie od substrátu. Důležitou roli v tom hrála také hodnota *Setpoint*, protože oproti měření na vzduchu docházelo zpočátku při skenování v kapalině k výrazným deformacím bakterií, způsobených právě vysoko nastavenou hodnotou *Setpoint*. Mimo jiné bylo potřeba zvolit vhodnou konstantu tuhosti hrotu (stejně jako při měření na vzduchu). Na základě experimentálních výsledků se jako optimální jeví konstanta tuhosti okolo 0,1 N/m.

Níže lze vidět porovnání skenů dvou různých bakterií kmene *C. necator* H16 měřených na vzduchu a poté v PBS (viz obrázek 13). Jak již bylo zmíněno, hlavní rozdíl je ve výšce obou bakterií, kdy v prostředí PBS byla průměrná naměřená výška bakterií 1 μm , zatímco pro vysušené bakterie se výška pohybovala okolo 700 nm. Naměřené hodnoty z GC dokonce ukazují, že vysušené bakterie obsahovaly větší množství PHB (94,1 %) oproti bakteriím měřeným v PBS (83,4 %). Je tedy možné, že při stejných koncentracích PHB by byl rozdíl ve výšce bakterií ještě markantnější.

Obdobně velký rozdíl ve výšce byl pozorován i pro bakterie *C. necator* PHB⁻⁴, kdy průměrná výška naměřená v PBS byla 650 nm a na vzduchu jen 100 nm (viz obrázek 14). Výsledky z GC ukazují pro oba typy měření stejně nízkou koncentraci PHB, která byla 0,01 g/l (0,7 %). Rozdíl ve výšce je tedy možné přičítat právě dehydrataci.



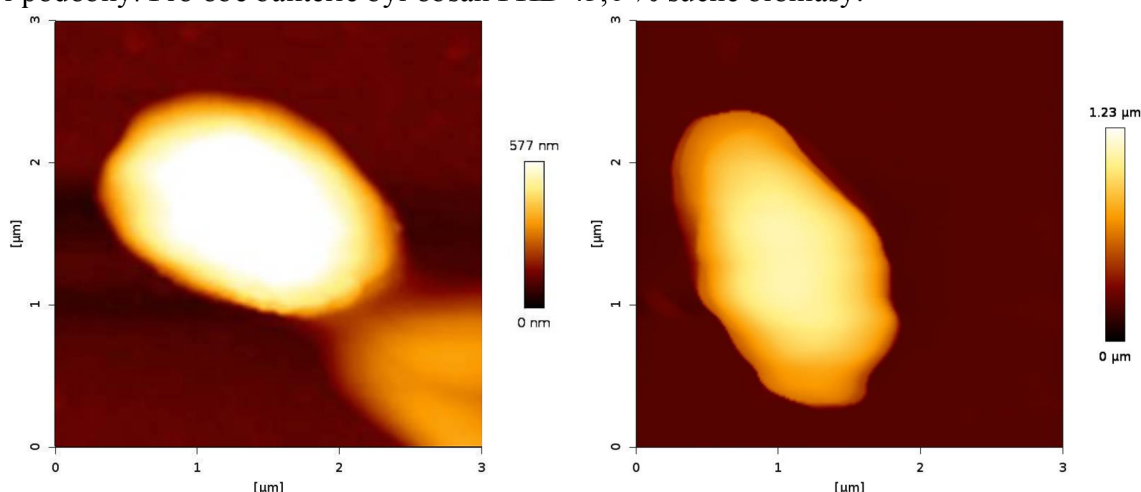
Obrázek 13 Porovnání snímků bakterie *C. necator* H16 na vzduchu (vlevo) a v PBS (vpravo)



Obrázek 14 Porovnání snímků bakterie *C. necator* PHB⁻⁴ na vzduchu (vlevo) a v PBS (vpravo)

Stěžejní při měření v kapalině bylo opět porovnání mutantních bakterií kmene *C. necator*, kde je též jasně vidět profilový rozdíl mezi bakteriemi produkujícími a neprodukujícími PHA. Při srovnání bakterií na snímku 13 a 14 je možné pozorovat znaky typické pro jednotlivé mutantní bakterie ať už ve vysušeném, nebo nativním stavu. Typická mohutnost a větší šířka dává jednoznačně rozpoznat bakterii *C. necator* H16 oproti úzké buňce jejího mutantu.

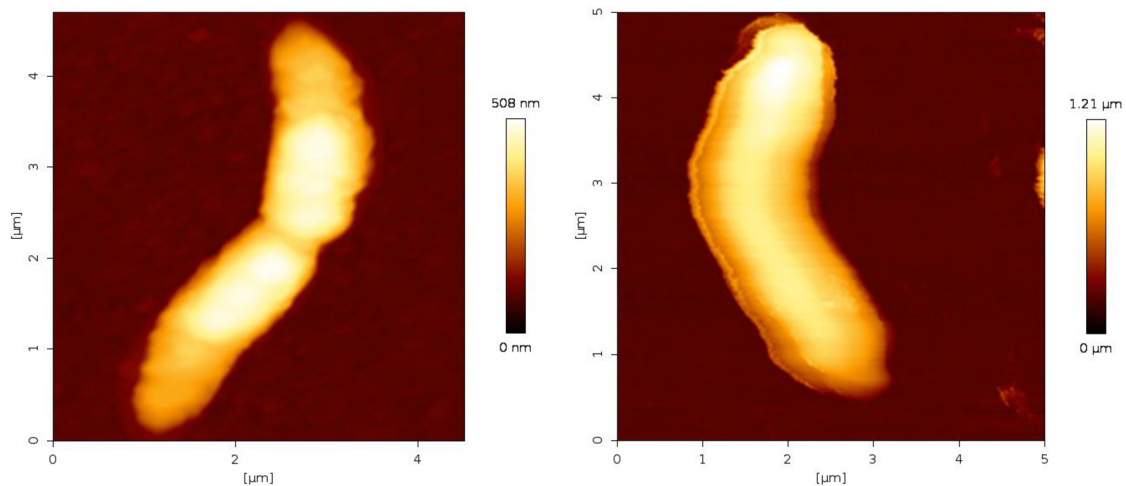
Na obrázku 15 (vpravo) je bakterie *Halomonas halophila* představující jedinou bakterii v této práci skenovanou v prostředí fosfátového pufru, který byl obohacen o 66 g/l NaCl, jelikož se jedná o halofilní mikroorganismus. Zde bylo ověřeno, že se dají získat i snímky mikroorganismů v prostředí s velmi vysokou salinitou. Během měření nezpůsobovala vyšší koncentrace soli žádné problémy. Důraz ale po měření musel být kladen na kvalitní očištění hrotu od zbytků média. Na snímcích níže je opět možné vidět porovnání dvou bakterií *H. halophila* měřených za různých podmínek (v PBS a vysušené). Bakterie na obrázku 15 vlevo je vysušená a má výšku 400 nm, kdežto bakterie vpravo je měřená v prostředí PBS a má výšku 800 nm. Znovu lze pozorovat rozdíl způsobený dehydratací. Tvar se jinak v obou případech jeví podobný. Pro obě bakterie byl obsah PHB 43,6 % suché biomasy.



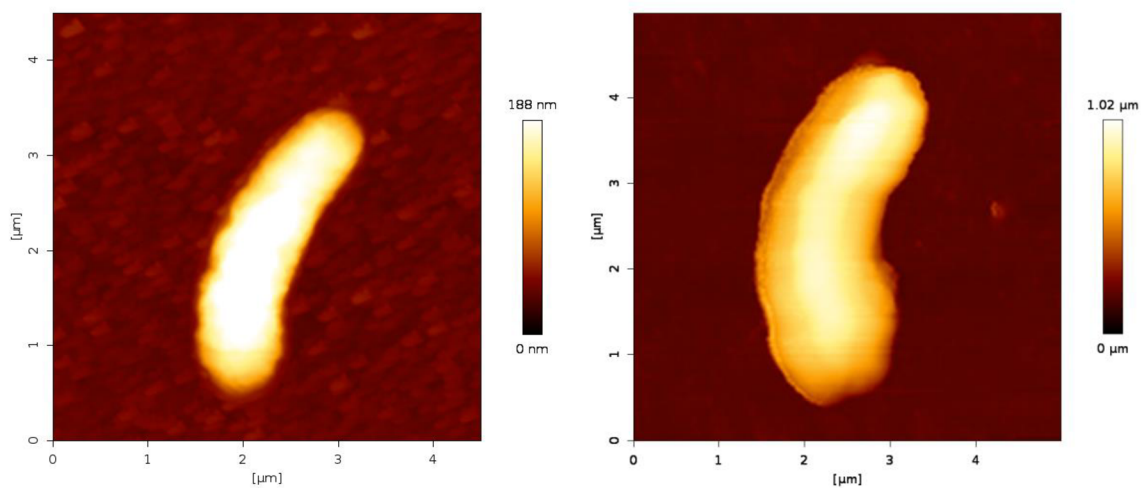
Obrázek 15 Bakterie *H. halophila* vysušená (vlevo) a v PBS s koncentrací NaCl 66 g/l (vpravo)

V neposlední řadě byly získány i snímky bakterií kmene *Rhodospirillum rubrum* kultivovaných na různých substrátech ve dvou růstových fázích (viz obrázek 16 až 19). Pro porovnání jsou níže uvedeny snímky bakterií po 24hodinové kultivaci naměřené v PBS a na vzduchu a na snímku 19 jsou bakterie po 48hodinové kultivaci. Podle naměřené optické hustoty nebyly 24 h staré bakterie pro zobrazování nijak ředěny. Množství biomasy v g/l též potvrdilo, že je koncentrace bakterií v médiu malá a ředění není potřeba (viz tabulka 2). Plynová chromatografie byla provedena pouze pro bakterie rostoucí na acetátě (28,6 % PHB), a i z AFM-snímku lze usoudit, že po 24 hodinách tyto bakterie nejlépe narostly, jelikož vykazují nevyšší profil (viz obrázek 16). V rámci všech použitých substrátů lze na obrázcích 16 až 18 znovu pozorovat změnu ve výšce u živých bakterií oproti vysušeným. Bakterie se také ve vodném prostředí zdají být větší a mnohem mohutnější než po vysušení. Typické zahnutí bakterií tohoto kmene je nejlépe viditelné u bakterií rostoucích na acetátě a fruktose, kde je i výraznější oproti jejich vysušeným protějškům. *R. rubrum* rostoucí na hexanoátě nevykazuje takové výrazné zahnutí, což může způsobovat právě použitý substrát. Mimo jiné si lze opět povšimnout rozložení hmoty v jednotlivých bakteriích, kde bakterie rostoucí na acetátě mají v obou případech (živé i vysušené) hmotu nahromaděnou v koncových částech buněk, kdežto u dalších dvou kultivací se obsah jeví stejnoměrně rozmístěn.

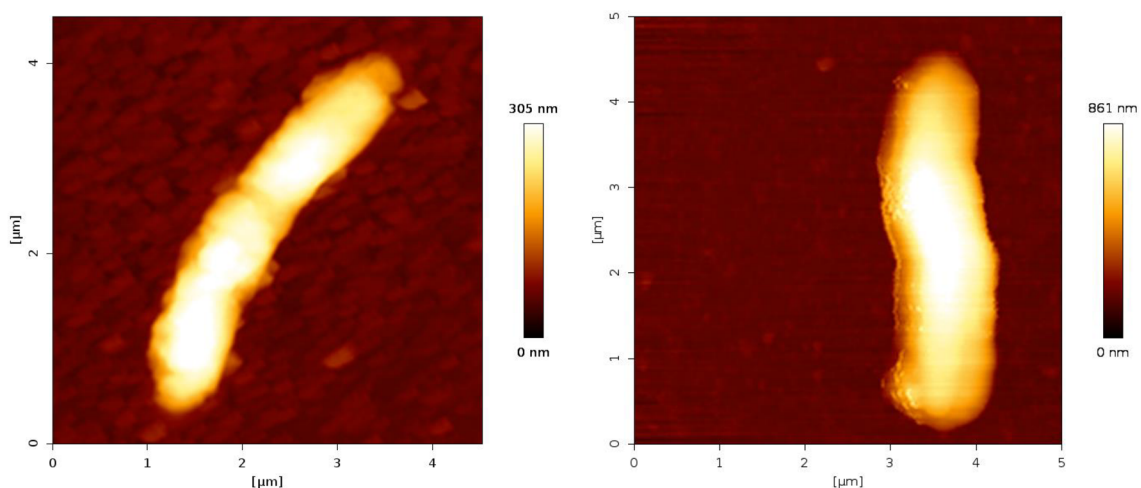
Jak již bylo dříve zmíněno, pro kultivace s fruktosou a hexanoátem nejsou známy koncentrace PHB v buňkách. Je jen možné odhadovat, že je jejich koncentrace v bakteriích nižší než v případě acetátu.



Obrázek 16 Bakterie *R. rubrum* rostoucí 24 h na acetátě měřené na vzduchu (vlevo) a v PBS (vpravo)



Obrázek 17 Bakterie *R. rubrum* rostoucí 24 h na fruktose měřené na vzduchu (vlevo) a v PBS (vpravo)

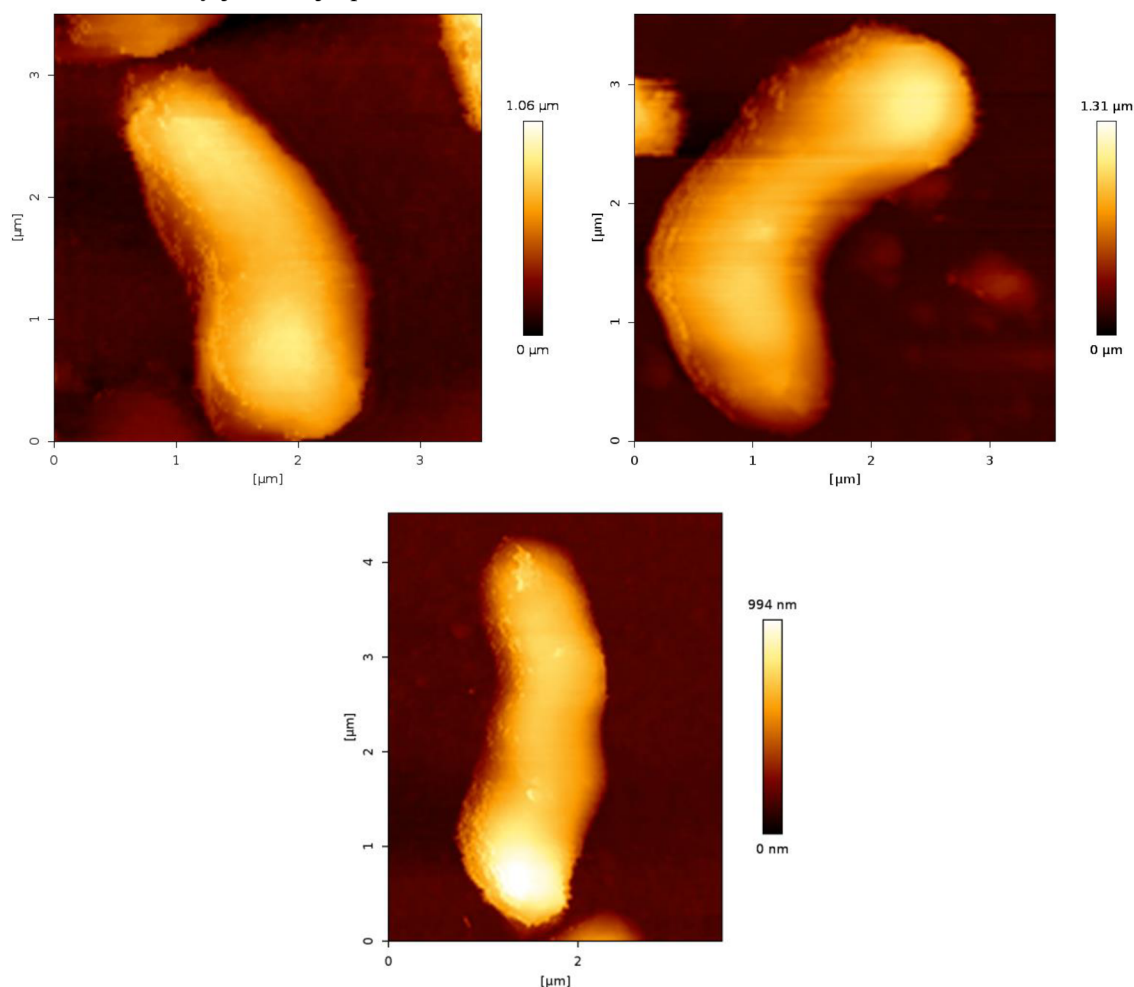


Obrázek 18 Bakterie *R. rubrum* rostoucí 24 h na hexanoátě měřené na vzduchu (vlevo) a v PBS (vpravo)

Kultury kultivované po dobu 48 h byly ředěny pouze $2\times$, i když se pro získání optické hustoty kultury ředily $10\times$. Zde bylo potvrzeno, že u málo naředěných kultur je obtížnější vybrat samostatnou bakterii pro skenování.

Získané skeny neukazují výrazný výškový rozdíl mezi oběma časy kultivace (viz obrázky 16 až 19). Bohužel zde není možné určitě posoudit vztah mezi výškou bakterie a množstvím PHA v závislosti na době kultivace. Jednak se výška bakterií na stejných substrátech během 24 hodin výrazně nezměnila a za druhé chybí výsledky z plynové chromatografie pro kultivaci na fruktose a hexanoátě. U kultivace na acetátu sice došlo ke zvýšení obsahu akumulovaných PHA, ale snímky potvrzují výšku bakterií okolo 900 nm pro oba časy odběru. Je možné pouze odhadovat, že i po 48 h kultivace je množství a velikost granul s PHA tak malé, že výrazně neovlivní tvar a morfologii bakterie. Jednoznačně šel zaznamenat nárůst biomasy u všech substrátů, a tudíž muselo být upraveno ředění vzorků – jak je již zmíněno výše. Největší nárůst biomasy byl pozorován u bakterií rostoucích na fruktose (z 0,03 g/l na 0,86 g/l během 24 h). Velký skok byl naměřen i u bakterií rostoucích na hexanoátě (z 0,02 g/l na 0,66 g/l).

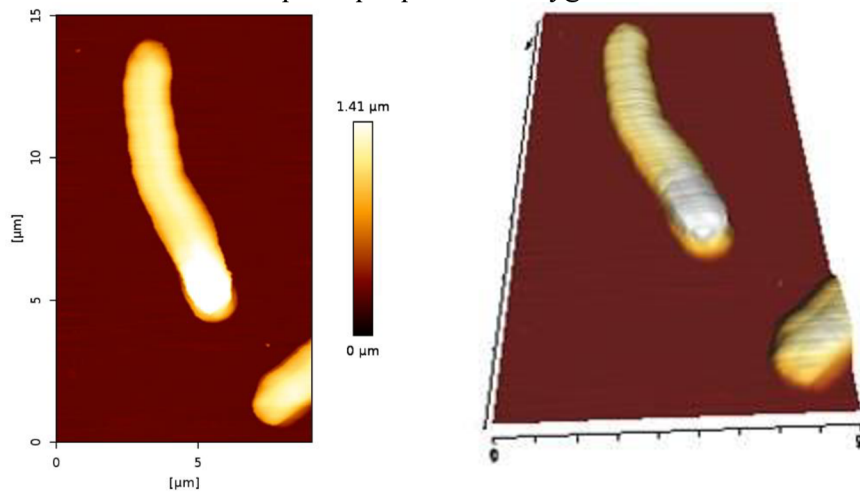
Je však možné pozorovat jistou změnu tvaru. Bakterie rostoucí na fruktose se zdají po 48 h kultivace více zahnuté, bakterie rostoucí na hexanoátě se též zdá být mírně zahnutá. Na obrázku 19 lze též pozorovat, že větší část vnitřní hmoty je nahromaděna v koncových částech bakterií, kdy je to nejlépe viditelné u bakterie rostoucí na hexanoátě.



Obrázek 19 *R. rubrum* po 48 hodinách kultivace na acetátě (vlevo nahoře), fruktose (vpravo nahoře) a hexanoátě (dole)

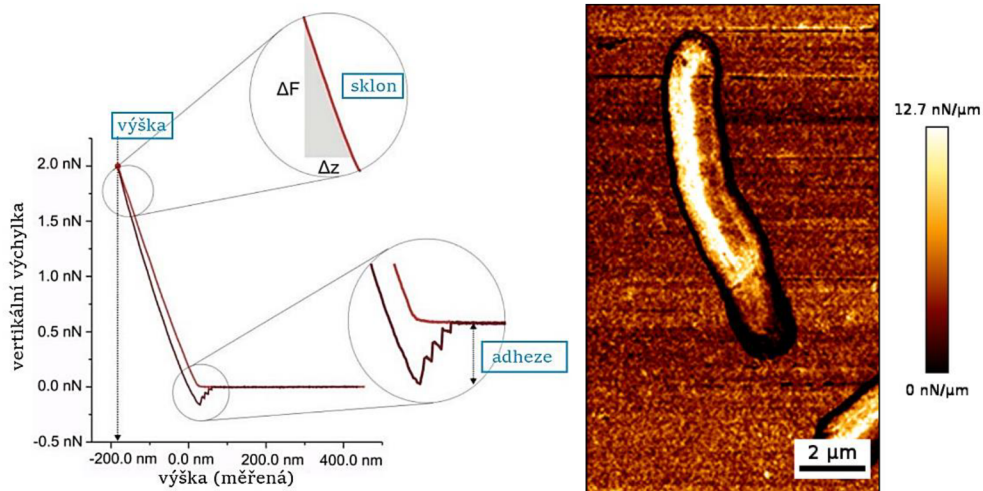
4.4 Získané charakteristiky

Výškový profil vzorku je základní charakteristikou při měření. Z topografického obrázku lze vyčíst výšku jednotlivých bakterií a udělat si lepší představu o jejich chování při vysušení oproti živé formě. Z těchto obrázků lze pro lepší představu vygenerovat též 3D snímky.



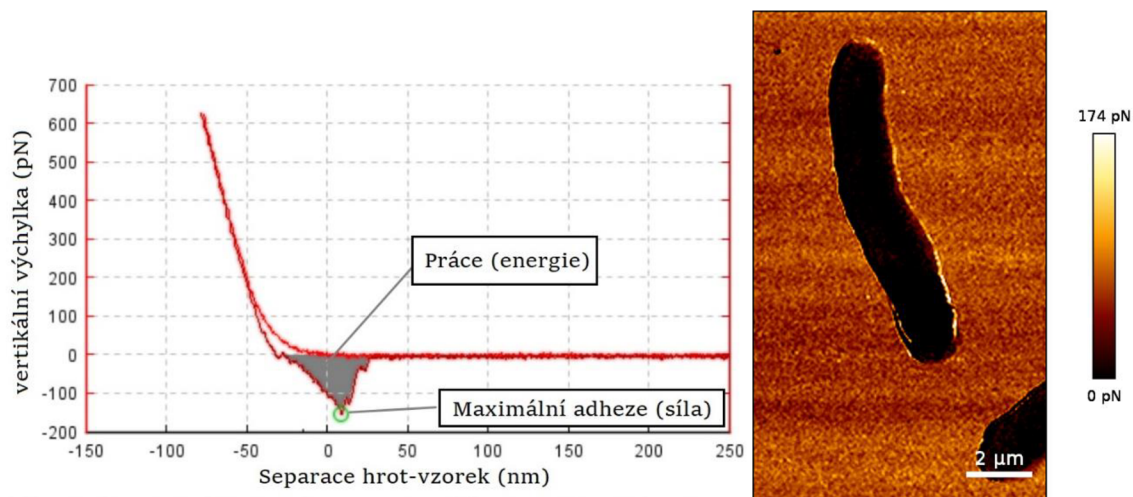
Obrázek 20 Charakteristika Height (vlevo) a 3D snímek (vpravo) živé bakterie *C. necator* H16

Mezi další získané charakteristiky se řadí *Slope Fit* (viz obrázek 21), což je parametr udávaný v jednotkách N/m, který poskytuje základní informaci o elasticitě vzorku – pro přesné hodnoty je nutné vypočítat Youngův modul. Mapa elasticity je generována na základě lineárního proložení křivek závislosti síly na vzdálenosti (změny v amplitudě nosníku). Po kalibraci nosníku lze tedy získat informaci o tuhosti vzorku pro každý pixel v rámci jednoho snímku [46].



Obrázek 21 Obecná podoba křivky závislosti síly na vzdálenosti (vlevo) – upraveno [46] a experimentálně získaná charakteristika Slope Fit pro *C. necator* H16 v PBS (vpravo)

Charakteristika *Adhesion* je udávána v jednotkách N a je vyhodnocena softwarem opět na základě křivky závislosti síly na vzdálenosti (viz obrázek 22). Představuje sílu, která je nutná k separaci hrotu od vzorku. Zpracování softwarem probíhá pro každý pixel snímku, čímž získáme mapu adheze. Výpočet probíhá pro záporné hodnoty křivky retrakce [46].



Obrázek 22 Obecná podoba způsobu určení oblasti pro výpočet maximální adheze a práce adheze v grafu závislosti síly na vzdálenosti (vlevo) – upraveno [46] a experimentálně získaná charakteristika Adhesion pro *C. necator* H16 v PBS

4.5 Youngův modul a adheze

Po optimalizaci měření bakterií za pomoci mikroskopie atomárních sil bylo provedeno měření s pokusem získat hodnotu Youngova modulu (E) a tím získat informaci o tuhosti jednotlivých bakterií. Během měření bylo zjištěno, že se vypočítané hodnoty E odlišují v závislosti na nastavené hodnotě *Setpoint*, rychlosti a délce skenování. Při porovnávání bakterií je tedy nutné dbát na stejné podmínky skenování. Pro vysušené bakterie byl sken nastaven na čas zhruba 10 minut, kdy nebyly pozorovány žádné významné interference a křivky měly klasický průběh jak pro *C. necator* H16 (viz obrázek 23), tak pro *C. necator* PHB⁻⁴ (viz obrázek 24). Měření bylo provedeno s hrotem TESP-V2 se *Spring Constant* 23 N/m.

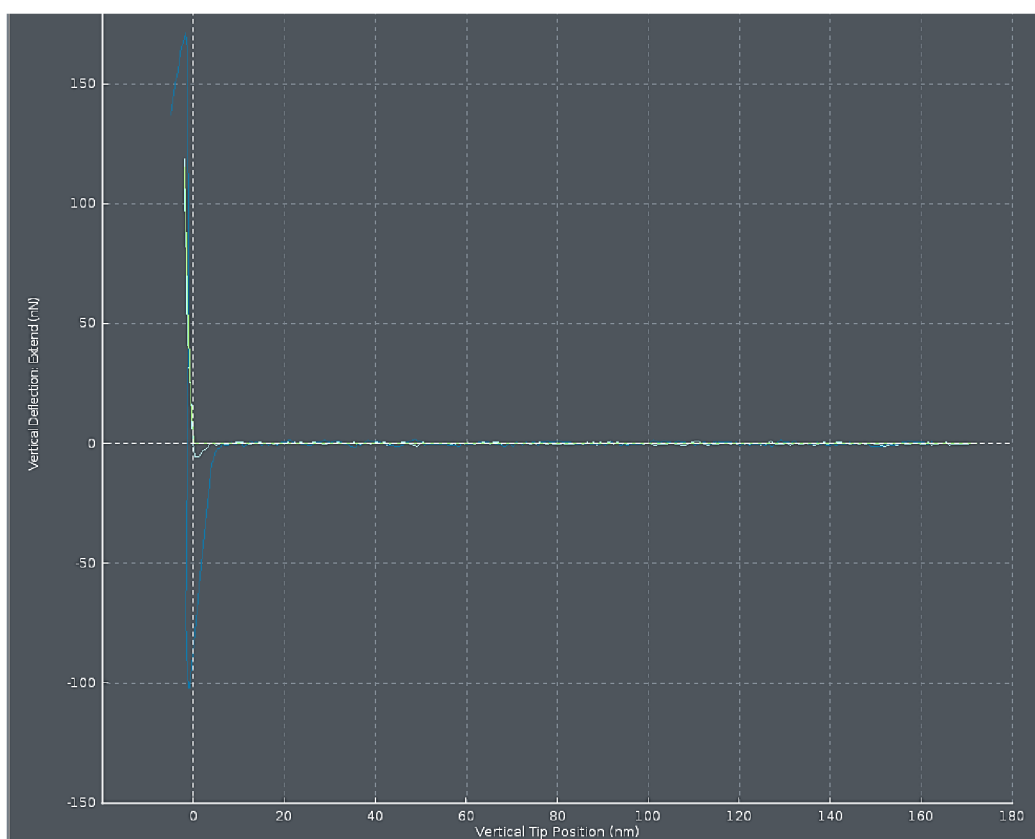
Na druhou stranu při skenování v kapalném prostředí bylo potřeba dobu výrazně prodloužit, neboť při krátké době měření křivky nevykazovaly klasický průběh a pohybovaly se značně daleko od sebe. Ani při skenu dlouhém 1 hodinu se křivky dostatečně nepřiblížily. Je možné usuzovat, že je to způsobeno velkou citlivostí hrotu, kdy byl pro měření použit hrot MLCT-A se *Spring Constant* 0,07 N/m. Skenování bylo citlivé na jakékoli otřesy či hlasitější zvuky, které se okamžitě projeví na průběhu křivek. Youngův modul je v tomto případě spíše orientační a je nutno ho brát jako porovnání dvou skenů provedených za obdobných podmínek.

Během měření dlouhých časových úseků v kapalině se objevil problém v tom, že mikroskop často dlouhý sken ukončil předčasně. *Setpoint* byl povětšinou nastaven velmi nízko (0,2 nN), aby se předešlo deformaci bakterií. Je však možné, že kvůli tomu hrot v průběhu měření ztratil signál a sken se ukončil. Do budoucna je tedy doporučeno optimalizovat velikost hodnoty *Setpoint* v kombinaci s jinými hroty pro dosažení ideálního tvaru křivek a pro získání adekvátních hodnot adheze a Youngova modulu.

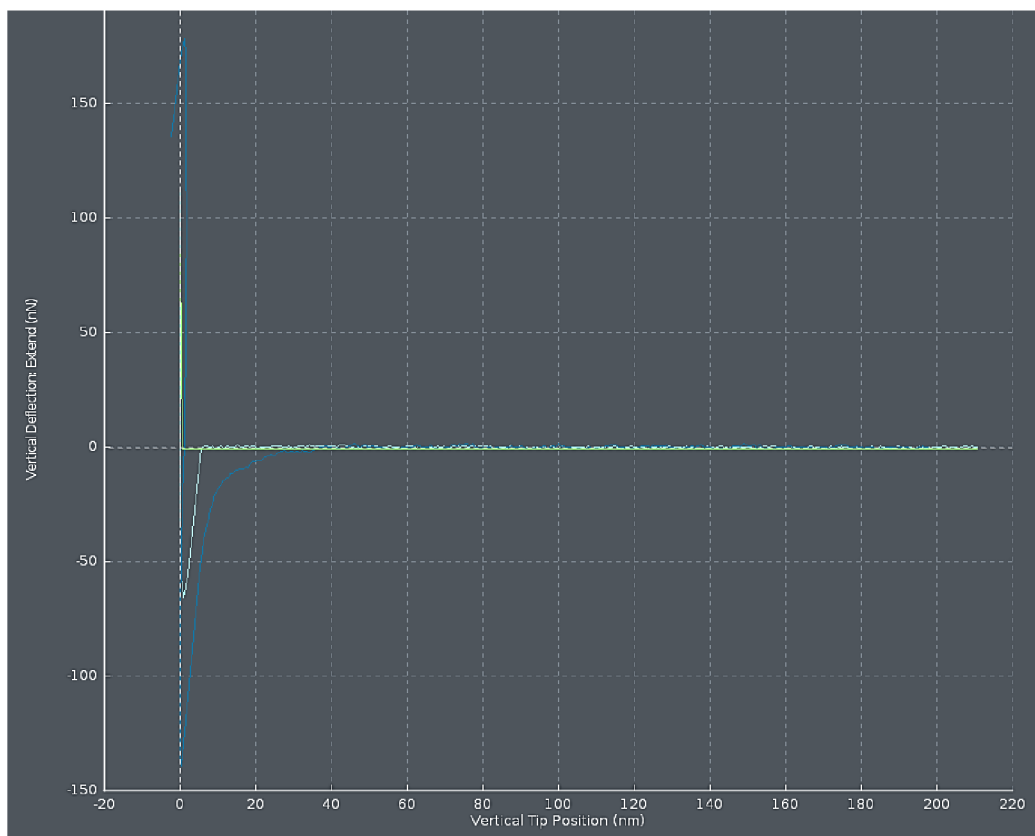
Vyhodnocení Youngova modulu bylo provedeno v programu JPK Data Processing podle doporučení v listu Application Note od společnosti JPK Industries [47]. Hodnoty Youngova modulu byly získány za použití Hertzova modelu aproximace dat. Důležité, pro použití tohoto modelu, bylo znát průměr hrotu a Poissonův poměr, který udává informaci o změně tloušťky a délky materiálu při deformaci tahem a tlakem [48]. Ve výše zmiňovaném dokumentu

je doporučeno nastavit tento poměr pro biologické vzorky na hodnotu 0,5 [47]. Pro materiál použitých hrotů je však doporučeno použít hodnoty 0,23, a proto byla zvolena a používána hodnota Poissonova poměru 0,3. Hodnoty E vysušených bakterií se pohybovaly kolem 10 GPa pro *Cupriavidus necator* H16 a v řádu desítek až stovek GPa pro *C. necator* PHB⁻⁴. Při měření v kapalném médiu vycházely hodnoty Youngova modulu pro *C. necator* PHB⁻⁴ ve stovkách kPa. Během skenování jedné bakterie při různých délkách skenu (20 a 40 min) byl pozorován rozdíl v Youngově modulu v rámci jednoho řádu, což dokazuje nutnost měření za stejných podmínek.

Z dat byly též stanoveny hodnoty adheze bakterií. Pro vysušené bakterie *C. necator* H16 se hodnoty adheze pohybovaly okolo 10 nN, kdežto pro *C. necator* PHB⁻⁴ byla adheze stanovena mezi hodnotami 80–140 nN. V kapalném prostředí vykazovaly bakterie *C. necator* PHB⁻⁴ nižší adhezi, a to v rámci stovek pN (300–700 pN).



Obrázek 23 Průběh křivek při měření vysušené bakterie *C. necator* H16 (modrá – křivka retrakce, bílá – křivka přiblížení, zelená – Hertzova aproximace dat)



Obrázek 24 Průběh křivek při měření vysušené bakterie *C. necator* PHB⁴ (modrá – křivka retrakce, bílá – křivka přiblížení, zelená – Hertzova aproximace dat)

5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala studiem Gram-negativních bakterií se schopností akumulovat PHA pomocí mikroskopie atomárních sil. Cílem bylo optimalizovat použití této metody pro výzkum jak vysušených bakterií na vzduchu, tak živých bakterií v kapalném prostředí. Optimalizace byla provedena ve směru volby vhodného substrátu, imobilizace, hrotu a nejšetrnějšího nastavení procesu skenování.

Pro práci byly kultivovány bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 spolu s jeho fenotypovým mutantem *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ pro srovnání bakterií produkujících a neprodukujících PHA, dále halofilní kmen *Halomonas halophila* a kmen *Rhodospirillum rubrum* rostoucí na třech různých substrátech. U každé kultivace byla provedena charakterizace pomocí optické hustoty a stanovení koncentrace PHA použitím plynové chromatografie.

Pro imobilizaci bakterií při měření na vzduchu bylo provedeno prosté vysušení vhodné naředěné bakteriální suspenze na skleněném substrátu. Experimentálně bylo stanoveno jako ideální všechny suspenze ředit 10×. Úspěšného měření bylo dosaženo s „opotřebovaným“ hrotem TESP-V2 s konstantou tuhosti 23 N/m, neboť nové hroty s konstantou tuhosti 42 N/m bakterie vždy mechanicky poškodily. Srovnáním jednotlivých měření byl potvrzen významný výškový rozdíl mezi bakteriemi produkujícími PHA, které byly značně vyšší, a bakteriemi bez schopnosti produkovat PHA.

Při fixaci živých bakterií v kapalině byla testována dvě různá fixační činidla, a to Poly-L-lysin a Poly(ethylenimin). Každé imobilizační činidlo bylo aplikováno na skleněný substrát v několika různých postupech za účelem najít nejjednodušší a nejspolehlivější metodu fixace. Použití Poly-L-lysinu bylo vyhodnoceno jako nejspolehlivější varianta a následně s ním byla provedena měření všech bakterií v kapalném prostředí. Bakteriální suspenze byly pro analýzu pomocí mikroskopie atomárních sil ředěny stejně jako pro zjištění hodnoty optické hustoty. Tato ředění byla experimentálně stanovena jako nejvhodnější.

Při výběru hrotu pro měření v kapalině hrála klíčovou roli opět konstanta tuhosti. Ze tří testovaných hrotů se nejvíce osvědčil hrot MLCT-A (0,07 N/m), který během skenování poskytoval stabilní výsledky. Kvalitní snímky byly naměřeny i s hrotem SNL-B s konstantou tuhosti 0,12 N/m.

Všechna měření ve vzduchu i v kapalině probíhala v QITM módu, jehož výstup skenování zahrnoval informace nejen o výšce a morfologii vzorku, ale také informace o adhezi a elasticitě. Po úspěšné optimalizaci měření se finální část bakalářské práce zaměřila na využití mikroskopie atomárních sil k charakterizaci mechanických vlastností skenovaných vzorků a získání kvantitativních informací ohledně adheze a Youngova modulu buňky. Tyto charakteristiky lze získat z průběhu křivek přiblížení a retrakce. Při skenování ve vzduchu tyto křivky vykazovaly klasický průběh i při kratší době skenu. Naopak ve vodném prostředí byly pozorovány značné odchylky ve tvaru křivek a je nutné v rámci navazujícího studia tento typ analýzy dále optimalizovat.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. Obecná mikrobiologie. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020, s. 5-9, 621 s. ISBN 978-80-7553-844-4.
- [2] SCHINDLER, Jiří. Co jsou vlastně bakterie?. *Ze života bakterií*. Praha: Academia, 2008, s. 11-14. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1666-9.
- [3] KAPRÁLEK, František. Bakteriální buňka. *Fyziologie bakterií: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty přírodověd. fakult, skupiny oborů 15 Biologické vědy*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, s. 33-136, 603 s. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).
- [4] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4811-5.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Morfologie, cytologie a způsoby rozmnožování mikroorganismů. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, s. 27-57. ISBN 80-200-1024-6.
- [6] OBRUČA, Stanislav, Petr SEDLÁČEK, Martin KOLLER, Dan KUČERA a Iva PERNICOVÁ. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856-870 [cit. 2022-01-22]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [7] OBRUČA, Stanislav. *Valorizace odpadů potravinářského průmyslu: Valorisation of waste products of food industry*. Brno: VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-214-5200-8.
- [8] MUHAMMADI, , SHABINA, Muhammad AFZAL a Shafqat HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. 2015, **8**(3-4), 56-77 [cit. 2021-05-07]. ISSN 1751-8253. Dostupné z: doi:10.1080/17518253.2015.1109715
- [9] GUZIK, Maciej, Tomasz WITKO, Alexander STEINBÜCHEL, Magdalena WOJNAROWSKA, Mariusz SOŁTYSIK a Sławomir WAWAK. What Has Been Trending in the Research of Polyhydroxyalkanoates? A Systematic Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, **8** [cit. 2021-05-07]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00959
- [10] SHAHID, Salma, Sadia RAZZAQ, Robina FAROOQ a Zill-i-Huma NAZLI. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **166**, 297-321 [cit. 2021-05-07]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.187
- [11] ZINN, M. a R. HANY. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials* [online].

- 2005, **7**(5), 408-411 [cit. 2021-05-07]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200500053
- [12] PANICH, Justin, Bonnie FONG a Steven SINGER. Metabolic Engineering of *Cupriavidus necator* H16 for Sustainable Biofuels from CO₂. *Trends in Biotechnology* [online]. 2021, **39**(4), 412-424 [cit. 2022-01-22]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2021.01.001
- [13] LITTLE, Gareth, Muhammad EHSAAN, Christian ARENAS-LÓPEZ, Kamran JAWED, Klaus WINZER, Katalin KOVACS, Nigel MINTON a David RASKO. Complete Genome Sequence of *Cupriavidus necator* H16 (DSM 428). *Microbiology Resource Announcements* [online]. 2019, **8**(37) [cit. 2022-01-22]. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:10.1128/MRA.00814-19
- [14] POHLMANN, Anne, Wolfgang FRICKE, Frank REINECKE et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* [online]. 2006, **24**(10), 1257-1262 [cit. 2022-01-22]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1244
- [15] RABERG, Matthias, Birgit VOIGT, Michael HECKER, Alexander STEINBÜCHEL a Marie-Joelle VIROLLE. A Closer Look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) Negative Phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(5) [cit. 2022-01-22]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0095907
- [16] DE MEUR, Quentin, Adam DEUTSCHBAUER, Matthias KOCH, Guillaume BAYON-VICENTE, Paloma CABECAS SEGURA, Ruddy WATTIEZ a Baptiste LEROY. New perspectives on butyrate assimilation in *Rhodospirillum rubrum* S1H under photoheterotrophic conditions. *BMC Microbiology* [online]. 2020, **20**(1) [cit. 2022-01-22]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-020-01814-7
- [17] CAVAZZA, Christine, Véronique COLLIN-FAURE, Julien PÉRARD, Hélène DIEMER, Sarah CIANFÉRANI, Thierry RABILLOUD a Elisabeth DARROUZET. Proteomic analysis of *Rhodospirillum rubrum* after carbon monoxide exposure reveals an important effect on metallic cofactor biosynthesis. *Journal of Proteomics* [online]. 2022, **250** [cit. 2022-01-22]. ISSN 18743919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2021.104389
- [18] MUNK, A., Alex COPELAND, Susan LUCAS et al. Complete genome sequence of *Rhodospirillum rubrum* type strain (S1T). *Standards in Genomic Sciences* [online]. 2011, **4**(3), 293-302 [cit. 2022-01-22]. ISSN 1944-3277. Dostupné z: doi:10.4056/sigs.1804360
- [19] QUESADA, E., A. VENTOSA, F. RUIZ-BERRAQUERO a A. RAMOS-CORMENZANA. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1984, **34**(3), 287-292 [cit. 2022-01-22]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-34-3-287
- [20] KUČERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriana KOVALČÍK et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas*

- halophila. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **256**, 552-556 [cit. 2022-01-22]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.02.062
- [21] MACHALA, Libor, Milan VŮJTEK, Roman KUBÍNEK a Miroslav MAŠLÁŇ. Mikroskopie skenující sondou. In: *Atmilab.upol.cz* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého Olomouc, 2003 [cit. 2022-01-22]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/mss/>
- [22] STYLIANOU, Andreas, Stylianos-Vasileios KONTOMARIS, Colin GRANT a Eleni ALEXANDRATOU. Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions. *Scanning: Atomic Force Microscopy: In Sickness and in Health* [online]. 2019, **2019**, 25 [cit. 2021-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/8452851>
- [23] DOROBANTU, Loredana a Murray GRAY. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning* [online]. 2010, **32**(2), 74-96 [cit. 2021-04-12]. ISSN 01610457. Dostupné z: doi:10.1002/sca.20177
- [24] MAVER, U., T. MAVER, Z. PERSIN, M. MOZETIC, A. VESEL, M. GABERSCEK a K. STANA-KLEINSCHEK. Polymer Characterization with the Atomic Force Microscope. *Polymer Science* [online]. InTech, 2013 [cit. 2022-05-19]. ISBN 978-953-51-0941-9. Dostupné z: doi:10.5772/51060
- [25] KUBÍNEK, Roman, Milan VŮJTEK a Renáta HOLUBOVÁ. *Mikroskopie atomárních sil* [online]. In: . Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální fyziky, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, Česká Republika, s. 8 [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/mfi.pdf>
- [26] JAWAD, Akram. *AFM Handbook; Theoretical Principles and Experimental Parameters: An introduction to Theoretical principles and Experimental Parameters of Atomic force Microscopy (AFM)*. Beau Bassin (Mauritius): Scholars' Press, 2020. ISBN 978-613-8-94061-6. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/344076092_AFM_Handbook_Theoretical_Principles_and_Experimental_Parameters
- [27] *The NanoWizard AFM Handbook: Version 6.0* [online]. Berlin: JPK Instruments, 2018.
- [28] DUFRÊNE, Yves F. AFM for nanoscale microbe analysis. *The Analyst* [online]. 2008, **133**(3), 297-301 [cit. 2021-05-06]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/B716646J
- [29] EL KIRAT, K., I. BURTON, V. DUPRES a Y. DUFRENE. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* [online]. 2005, **218**(3), 199-207 [cit. 2021-05-06]. ISSN 0022-2720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01480.x
- [30] BOLSHAKOVA, A.V, O.I KISELYOVA, A.S FILONOV, O.Yu FROLOVA, Y.L LYUBCHENKO a I.V YAMINSKY. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy* [online]. 2001, **86**(1-2), 121-128 [cit. 2022-01-22]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3991(00)00075-9

- [31] BOLSHAKOVA, A.V., O.I. KISELYOVA a I.V. YAMINSKY. Microbial Surfaces Investigated Using Atomic Force Microscopy. *Biotechnology Progress* [online]. 2004, **20**(6), 1615-1622 [cit. 2022-01-22]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp049742c
- [32] BENN, Georgina, Alice PYNE, Maxim RYADNOV a Bart HOOGENBOOM. Imaging live bacteria at the nanoscale: comparison of immobilisation strategies. *The Analyst* [online]. 2019, **144**(23), 6944-6952 [cit. 2022-01-22]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C9AN01185D
- [33] LOUISE MEYER, Rikke, Xingfei ZHOU, Lone TANG, Ayyoob ARPANAEI, Peter KINGSHOTT a Flemming BESENBACHER. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* [online]. 2010, **110**(11), 1349-1357 [cit. 2022-01-22]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultramic.2010.06.010
- [34] DOKTYCZ, M.J., C.J. SULLIVAN, P.R. HOYT, D.A. PELLETIER, S. WU a D.P. ALLISON. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* [online]. 2003, **97**(1-4), 209-216 [cit. 2022-03-15]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3991(03)00045-7
- [35] LONERGAN, N.E., L.D. BRITT a C.J. SULLIVAN. Immobilizing live Escherichia coli for AFM studies of surface dynamics. *Ultramicroscopy* [online]. 2014, **137**, 30-39 [cit. 2022-03-15]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultramic.2013.10.017
- [36] VELEGOL, Stephanie a Bruce LOGAN. Contributions of Bacterial Surface Polymers, Electrostatics, and Cell Elasticity to the Shape of AFM Force Curves. *Langmuir* [online]. 2002, **18**(13), 5256-5262 [cit. 2022-03-15]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la011818g
- [37] GREIF, Dominik, Daniel WESNER, Jan REGTMEIER a Dario ANSELMETTI. High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells. *Ultramicroscopy* [online]. 2010, **110**(10), 1290-1296 [cit. 2022-01-22]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultramic.2010.06.004
- [38] HELANDER, Ilkka, Hanna-Leena ALAKOMI, KyÖsti LATVA-KALA a Pertti KOSKI. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology* [online]. 1997, **143**(10), 3193-3199 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-143-10-3193
- [39] ALLISON, David, Ninell MORTENSEN, Claretta SULLIVAN a Mitchel DOKTYCZ. Atomic force microscopy of biological samples. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2010, **2**(6), 618-634 [cit. 2022-01-22]. ISSN 1939-5116. Dostupné z: doi:10.1002/wnan.104
- [40] MITIK-DINEVA, Natasa, James WANG, Radu MOCANASU, Paul STODDART, Russell CRAWFORD a Elena IVANOVA. Impact of nano-topography on bacterial attachment. *Biotechnology Journal* [online]. 2008, **3**(4), 536-544 [cit. 2022-01-22]. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200700244

- [41] ST. CROIX, Claudette, Stuart SHAND a Simon WATKINS. Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. *BioTechniques* [online]. 2005, **39**(6), 2-5 [cit. 2022-01-22]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/000112089
- [42] SANDIN, Joree, Surya ARYAL, Thomas WILKOP, Christopher RICHARDS a Martha GRADY. Near Simultaneous Laser Scanning Confocal and Atomic Force Microscopy (Conpokal) on Live Cells. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2020, (162) [cit. 2022-01-22]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/61433
- [43] BASSAS, M., J. DIAZ, E. RODRIGUEZ, M. ESPUNY, M. PRIETO a A. MANRESA. Microscopic examination in vivo and in vitro of natural and cross-linked polyunsaturated mclPHA. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, **78**(4), 587-596 [cit. 2021-05-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-008-1350-4
- [44] SURMAN, S.B., J.T. WALKER, D.T. GODDARD et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1996, **25**(1), 57-70 [cit. 2022-01-22]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/0167-7012(95)00085-2
- [45] SEDLÁČEK, Petr, Eva SLANINOVÁ, Martin KOLLER, Jana NEBESÁŘOVA, Ivana MÁROVA, Vladislav KRZYŽÁNEK a Stanislav OBRUČA. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 129-136 [cit. 2022-05-19]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2018.10.005
- [46] *Technical Note: QI mode - Quantitative Imaging with the NanoWizard 3 AFM* [online]. JPK Instruments, 2022 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-tech-quantitative-imaging.14-1.pdf>
- [47] *Application Note: Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy* [online]. In: . JPK Instruments [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-app-elastic-modulus.14-1.pdf>
- [48] Co je Poissonův poměr? | Je to kompletní návod | 5+ otázek a odpovědí. In: *Cs.lambdageeks.com* [online]. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://cs.lambdageeks.com/poissons-ratio/>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

G-	Gram-negativní bakterie
G+	Gram-pozitivní bakterie
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
scl PHA	short-chain-length PHA
mcl PHA	medium-chain-length PHA
lcl PHA	long-chain-length PHA
AFM	Mikroskop atomárních sil (Atomic force microscope)
SPM	Mikroskopie skenovací sondou (Scanning probe microscopy)
STM	Tunelová skenovací mikroskopie (Scanning tunneling microscopy)
PLL	Poly-L-lysine
PEI	Poly(ethylenimine)
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie (Scanning electron microscopy)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie (Transmission electron microscopy)
NB	Nutrient Broth
OD	Optická hustota (Optical density)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
QI	Kvantitativní zobrazování (Quantitative imaging)
E	Youngův modul